

**Aus dem
Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF)
an der Universität Hamburg**

**Direktor:
Prof. Dr. rer. nat. Richard Ivell**

**Aktuelle Adresse:
School of Molecular and Biomedical Sciences
The University of Adelaide, AUSTRALIA 5005**

**Ratten *Insulin-like factor 3 (InsI3)* Gen:
Charakterisierung und Regulation durch den
Transkriptionsfaktor
Steroidogenic Faktor 1 (SF-1)**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

vorgelegt von

**Helen Sadeghian
aus Abhar/Iran**

Hamburg, 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in

Meiner Tochter „Celine Rose“ gewidmet

Inhaltsverzeichnis.....	I-II
Ziel der Arbeit.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Männliche Subfertilität - Ein Problem des 20. Jahrhunderts?.....	1
1.2 Die Morphologie der Leydigzelle	5
1.3 Die Rolle der Leydigzelle bei der hormonellen Steuerung	6
1.3.1 LH als gonadotroper Stimulus der Testosteron-Synthese	7
1.3.2 Herkunft des Cholesterols für die Steroidsynthese	8
1.3.3 Die Rolle der Transkriptionsfaktor SF-1	8
1.4 Der Insulin-ähnliche Faktor 3 (InsI3).....	9
2 Material und Methoden	13
2.1 Bakterienstamm	13
2.2 Verwendete <i>Primer</i>	13
2.3 Verwendete Vektoren.....	14
2.4 Isolierung von Gesamt-RNA	15
2.5 cDNA-Synthese.....	16
2.6 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.6.1 PCR mit cDNA	18
2.6.2 PCR mit genomischer DNA.....	19
2.6.2.1 PCR mit genomischer DNA der Ratte.....	19
2.6.2.2 PCR mit genomischer DNA der Maus	20
2.6.3 Herstellung von Rattenpromotor-Deletionskonstrukten durch PCR	20
2.6.4 <i>Colony</i> -PCR.....	21
2.7 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese	21
2.8 Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Gel.....	22
2.9 Restriktionsverdau von DNA.....	22
2.10 Ligation von DNA.....	23
2.11 Herstellung von kompetenten Bakterien	24
2.12 Transformation und Ausplattieren der Bakterien	25
2.13 Plasmid-Präparationen	26
2.13.1 Plasmid-Minipräparation.....	27
2.13.2 Endotoxin-freie Plasmid-Maxipräparation.....	28
2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
2.15 DNA-Sequenzierung	29
2.16 Zellkultur	32
2.16.1 Kultur	32
2.16.2 Lagerung bei -80°C	32
2.16.3 Zelllinien	33
2.17 Bestimmung der Progesteron- Konzentration mittels ELISA.....	33
2.18 Transfektion	38
2.18.1 Transfektion mittels Liposomen	38
2.19 „Reporter gene assays“	39
2.19.1 Luciferase-Messung	39
2.19.2 β -Galactosidase-Messung.....	40
2.20 „Electrophoretic mobility shift assay“(EMSA)	40
2.20.1 Herstellung von Kernproteinen aus Zellen	42
2.20.2 In vitro-Translation des klonierten Transkriptions- Faktors SF-1.....	43
2.20.3 Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden	44

2.20.4 Radioaktive Endmarkierung von DNA-Fragmenten	45
2.21 Immunhistochemie	46
2.22 Liste der verwendeten Lösungen	49
2.23 Firmenverzeichnis	50
3 Ergebnisse	51
3.1 Expression des INSL3-Proteins im Hoden der Ratte	51
3.1.1 <i>Ins/3</i> -Analyse mittels RT-PCR	51
3.1.2 INSL3-Protein-Analyse mittels Immunhistochemie	53
3.2 <i>Ins/3</i> -Gen-Promotor der Ratte	55
3.2.1 Klonierung und Sequenzierung des <i>Ins/3</i> -Genlokus	56
3.2.2 Herstellung von Deletionskonstrukten vom Ratten- <i>Ins/3</i> -Promotor durch PCR	57
3.3 Bestimmung der Progesteron-Konzentration mittels ELISA	59
3.4 Funktionalität des Ratten Promotors	60
3.4.1 Aktivierungsfähigkeit der <i>Ins/3</i> -Gen-Promoterkonstrukte in transienten Transfektionen	60
3.4.2 „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA)	63
3.4.2.1 Kompetitionsexperiment mit Bindungssequenzen für den Transkriptionsfaktor SF-1	64
3.4.2.2 Kompetitionsexperiment zur Überprüfung möglicher SF-1- Bindungsstellen	65
3.4.2.3 Immunologische Charakterisierung der Protein-DNA-Komplexe	66
3.5 Stimulation der MA-10 Zellen mit Dexamethason	67
4 Diskussion	69-74
5 Zusammenfassung	75
6 Anhang	76
6.1 Abkürzungen	76
6.2 Glossar	78
6.3 Literaturverzeichnis	80
6.4 Danksagung	86
6.5 Lebenslauf	87
6.6 Erklärung	88

Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der INSL3 Transkription zu verstehen, weil die Höhe der Insl3-Expression mit einer intakten Leydigzell Funktion korreliert. Hier wurde das für dieses Hormon kodierende Gen als Marker zur Untersuchung der Leydigzelldifferenzierung verwendet. Die Analyse bzw. Entdeckung Leydigzell-spezifischer Marker könnte möglicherweise die Ursachen von Leydigzell-abhängigen Pathologien, Alterungsprozessen und Ursachen der Infertilität des Mannes aufdecken. Über die Analyse der Insl3- Promotorregion sollte die Transkriptionsregulation des Insl3-Gen näher beleuchtet werden. Obwohl einige Studien über die Expression von mRNA und Immunreaktivität im Ratten-Hoden gemacht wurden sind, hat es bis heute keine systematische Studie der Ratten Insl3 Genexpression in den Leydig Zellen des Hodens gegeben. In Anbetracht der Wichtigkeit von Insl3 als einem „sentinal-Marker“ für pränatale xenobiotische Wirkungen, die im Ratten-Modell zum Kryptorchismus führen (Emmen *et al.*, 2000; Nef *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2004), und in Anbetracht seines zunehmenden Gebrauchs als Marker des Leydigzell-Differenzierungsstatus (Balvers *et al.*, 1998; Gnessi *et al.*, 2000; Paust *et al.*, 2002), wurde die vorliegende Studie durchgeführt, um die Regulierung des Ratten-Insl3-Gens und des immunreaktiven Proteins im Hoden zu untersuchen.

1 Einleitung

1.1 Männliche Subfertilität - Ein Problem des 20. Jahrhunderts?

Für den Menschen war seit jeher, die Fähigkeit zur Fortpflanzung nicht nur eine biologische Notwendigkeit, sondern auch ein existentielles Bedürfnis.

In vielen Gesellschaften wird die unfruchtbare Frau noch immer als minderwertig betrachtet, und Kinderlosigkeit kann nach wie vor ein bewusster oder unbewusster Grund für eine Trennung sein. Der psychosoziale Effekt für das Paar ist mitunter gravierend: Sie fühlen sich von ihrer Umwelt ausgegrenzt und sind oft nicht in der Lage, über ihr Problem zu sprechen. Bei kinderlosen Paaren besteht ein größeres Abhängigkeitsverhältnis vom Partner, und das Unvermögen, sich fortzupflanzen, kann ein Gefühl von Stress (Wright *et al.*, 1989), Hilflosigkeit oder „genetischem Tod“ erzeugen (Houghton und Houghton, 1984).

Die Unfähigkeit des Mannes, Kinder zu zeugen, hatte lange Zeit eine untergeordnete gesellschaftliche Bedeutung. Obwohl in vielen traditionellen Gesellschaftsformen ein kinderloses Paar mit dem Verlust eines gewissen Ansehens rechnen muss, ist es die Frau, die den Status verliert. Dieses Phänomen ist rein gesellschaftlicher Natur, denn in Wirklichkeit ist die Beteiligung des Mannes an der Unfähigkeit eines Paares sich fortzupflanzen bei spontanem Schwangerschaftswunsch mit etwa 66% zu bemessen (Bhasin *et al.*, 1994).

Trotz des enormen Fortschrittes im Verständnis der humanen Reproduktionsphysiologie können die Ursachen von männlicher Subfertilität nicht immer identifiziert werden. Eine Untersuchung der World Health Organization (WHO) bei 6000 nicht-zeugungsfähigen Männern im Alter von 31-32 Jahren ergibt die in **Tab. 1.1-1** gezeigte Zusammenfassung: Über 70% der in der Studie einbezogenen Männer werden als „idiopathisch subfertil“ klassifiziert. „Idiopathisch“ bedeutet in diesem Zusammenhang nichts anderes, als dass die meisten Faktoren, die zu einer Veränderung von Spermienanzahl, -aussehen, -motilität oder -Genotyp führen, gänzlich unbekannt sind. Die WHO-Studie ist als „Schnappschuss“ zu verstehen, da nur die Ergebnisse eines sehr kleinen Zeitraumes erfasst wurden. Möchte man die Gründe reduzierter männlicher Fertilität beschreiben, so

sollte man diese auch im Kontext der historischen Veränderung sehen, da dies möglicherweise externe Einflüsse als Faktoren aufzeigt.

Diagnose	% Anteil
Idiopathisch ohne Phänotyp	48.8
Varicocele	12.6
Idiopath. Oligozoospermie	11.2
Infektion akzessorischer Drüsen	6.9
Idiopath. Teratozoospermie	5.9
Idiopath. Asthenozoospermie	3.9
Abnormes Seminalplasma	3.5
Immunologische Faktoren	3.0
Kongenitale Abnormalitäten	1.7
Systemische Ursachen	1.4
Sexuell inadequat	1.3
Obstruktive Azoospermie	0.9
Idiopathische Nekrospermie	0.8
ejakulatorisch inadequat	0.7
Hyperprolactinaemie	0.6
iatrogene Faktoren	0.6
abnormer Karyotyp	0.5
partielle Obstruktion	0.1
retrograde Ejakulation	0.1

Tab. 1.1-1: Untersuchung der WHO über die Verteilung der verschiedenen Ursachen der männlichen Infertilität (WHO, 1987). Die Anteile der einzelnen diagnostizierten Ursachen der Infertilität sind in Prozenten angegeben.

Vergleicht man den Mann mit den männlichen Vertretern der verschiedenen Tierarten, so erscheint dieser nicht voll funktionsfähig. Dies fängt schon bei den Keimzellen an. Die Anzahl der Spermatiden im Verhältnis zur Anzahl der Sertolizellen bezeichnet man als „spermatogenetische Effizienz“. Bei Männern beträgt diese im Vergleich zu Affen oder Ratten etwa ein Viertel. Betrachten wir die Spermien im Ejakulat, sind nach den relativ strengen Kriterien der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) etwa 4-7% der Spermien morphologisch und kinetisch intakt. Bei Laborratten liegt dieser Wert bei 70-80%. Benutzt man den Hamster-Oozyten-Penetrations-Test (HOP-Test), der auf der Eigenart der Hamster-Eizelle beruht, auch von humanen Spermien penetriert werden zu können, so zeigen sich bei 15% der „guten“ Spermien Chromosomenanomalien (Brandriff *et al.*,

1985). Die Anzahl der kleineren Mutationen wird jedoch auf das Doppelte geschätzt. Bei Tieren liegt diese Ziffer nur bei etwa 1-2 %. Anhand dieser Daten ist man verführt, den Mann an sich schon als „subfertil“ zu bezeichnen. Es wundert also nicht, dass zusätzliche endogene oder exogene Störfaktoren einen großen Einfluß auf die weitere Reduktion der Fertilität ausüben können.

Störfaktoren, die in eingeschränkter Fertilität resultieren, sind

- genetische Ursachen: Es finden sich zum Beispiel chromosomale Aberrationen wie das Klinefelter-Syndrom und chromosomale Translokationen (Chandley, 1995) sowie genetische Defekte, die zu einschneidenden Veränderungen in der männlichen Geschlechtsdetermination und -differenzierung führen (Ramkissoo und Goodfellow, 1996). Andere genetische Defekte mit definierter männlicher Geschlechtszuordnung führen zu Symptomen wie Virilisierung und beeinträchtigter pubertärer Entwicklung (Meschede & Horst, 1997). Hierzu gehören Y-chromosomale Mikrodeletionen, die sich in einer Inaktivierung von Genen wie z.B. *DAZ* (*deleted in azoospermia*), einem RNA-bindenden Protein, äußern (Reijo *et al.*, 1995). Auch Punktmutationen, wie die Ala189Val Aminosäuretransition im FSH-Rezeptor, resultieren in verminderter Spermatogenese (Tapanainen *et al.*, 1998). Kryptorchismus ist verbunden mit eingeschränkter Spermatogenese, wobei die Ausmaße dieser Einschränkung sich von einem kompletten „*Sertoli-cell-only*“-Muster bis zu einer nur leichten Reduktion der Keimzellanzahl manifestieren können (Giwerzman *et al.*, 1989). Testikulärer Krebs ist auch mit einem erhöhten Risiko einer eingeschränkten Spermatogenese verbunden. In einer Studie mit Biopsien des kontralateralen Hodens bei Männern mit unilateralem testikulären Krebs konnte in 25% aller Fälle eine eingeschränkte Spermatogenese identifiziert werden (Berthelsen und Skakkebaek, 1983). Hoden-Krebs hat seinen Ursprung in *carcinoma-in-situ* Zellen, die sogar bei adulten Männern fötale Antigene exprimieren und oftmals fötalen Ursprungs sind (Skakkebaek *et al.*, 1987).
- evolutive Gründe: In letzter Zeit gibt es immer mehr Indizien dafür, dass zahlreiche Gene, die eine wichtige reproduktive Funktion haben können, während der Evolution bereits auf der Stufe der anthropoiden Affen (Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan) oder bei den Hominiden eine progressive Inaktivierung erfahren haben. Dies geschieht z.B. durch Leserasterverschiebungen oder größere Insertionen. Beispiele hierfür sind das Endozepin-ähnliche Peptid (ELP), welches eine wichtige Rolle im Fettsäuretransport der Keimzellen spielt (Ivell *et al.*, 2000), oder das Spermien-Oberflächenprotein Fertilin- α , welches zur Spermium/Oozyten-Interaktion beiträgt (Jury *et al.*, 1998).

- äußere Faktoren: In den letzten 15 Jahren konnten mehrere Umweltgifte identifiziert werden, die einen drastischen Einfluß auf die testikuläre Funktion ausüben. Besonders Pestizide spielen hier eine wesentliche Rolle: Das o,p'-Isomer des DDT (mit etwa 15% Anteil bei der Synthese) bindet an den Östrogen-Rezeptor und induziert somit östrogene Effekte (Sharpe, 1995), während das Hauptabbauprodukt p,p'-DDE an den Androgen-Rezeptor bindet und diesen blockiert (Kelce *et al.*, 1995). Es kommt somit zu einer „Demaskulinisierung“ durch diese Xenoöstrogene. Auch anorganische Substanzen wie Schwermetalle (Blei, Cadmium, Quecksilber) haben einen negativen Effekt auf die Spermatogenese (Caflisch, 1994; Connel, 1976; Shen und Sangiah, 1995). Einen sehr starken Einfluß auf das Seminalplasma hat die Konzentration von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Superoxid-Anionen (O_2^-). Diese sind für eine Aktivierung der Spermien zwar notwendig, andererseits ist die Spermienmembran aber besonders anfällig für eine Lipidoxidation (Aitken und Fisher, 1994). Chemische Syntheseprodukte haben also mitunter einen dramatischen Effekt, denn aus Daten der Literatur lässt sich schließen, dass der menschliche Hoden anfälliger für toxische Substanzen oder Schädigung durch ionisierende Strahlung ist als der anderer Spezies, wobei das reproduktive System seine stärkste Suszeptibilität während der Entwicklung zeigt. So führt die Röntgenbestrahlung schwangerer Nagerweibchen zu einer völligen Elimination der fötalen Keimzellen, ohne jedoch den Fötus oder die Mutter selbst zu beeinflussen (Mandl, 1966; Palayoor und Batra, 1969). Infektionen können ein weiterer Grund für männliche Infertilität sein: Chronische Infektionen mit *Chlamydia trachomatis*, die asymptomatisch ablaufen, sind diesbezüglich ein wichtiger Faktor (Greendale *et al.*, 1993).

Gehen wir also davon aus, dass sich der physiologische Zustand des humanen Hodens in den letzten 50 Jahren drastisch verschlechtert hat, so lässt sich anhand dieser doch sehr kurzen Zeitspanne vermuten, dass hier nicht nur genetische Ursachen zu suchen sind, sondern wahrscheinlich auch eine Reaktion auf allgemeine Umweltbedingungen zugrunde liegt. Das beste Modell für diese Annahme ist die Sekte der nordamerikanischen Hutterer, die erwiesenermaßen fertilsten Bevölkerungsgruppe. Die Hutterer leben abgeschieden in kleinen Gemeinden auf dem Land und sind somit nicht dem sozioökonomischen und physiologischen Stress der Zivilisation unterworfen. Zwischen 1946 und 1950 war die durchschnittliche Geburtsrate der Frauen 8.06 Kinder/Frau, wobei nur etwa 3% aller Frauen kinderlos waren (Eaton und Mayer, 1953).

Bis heute hat sich dieser Wert kaum geändert; in starkem Gegensatz zu den „zivilisierten“ Gegenden der westlicher Welt. So liegt in Kanada die Fertilitätsrate seit 1972 unter dem „Ersatzwert“ von 2.1 (Wadhera, 1989). Natürlich hat die Einführung oraler Kontrazeptiva einen großen Beitrag zur Senkung der Geburtsrate geleistet, aber gleichzeitig hat der Anteil erfolgreicher Schwangerschaften bei einem partnerschaftlichen Kinderwunsch in den letzten Jahrzehnten auf signifikante Weise abgenommen. Man kann daher sagen, dass es im Zusammenhang mit unserer modernen Lebensweise offensichtlich zu einer zunehmenden Subfertilität unserer ganzen Spezies kommt. Da beim Mann, wie bereits erwähnt, in mehr als 70% aller Fälle keine Ursachen für diese Subfertilität gefunden werden können, sollte dies Anlass genug sein, die Grundlagenforschung in dieser Hinsicht zu intensivieren.

1.2 Die Morphologie der Leydigzelle

Der Hoden ist in zwei verschiedene Kompartimente unterteilt: einen intratubulären (innerhalb der Samenkanälchen) und einen intertubulären (zwischen den Samenkanälchen). Die *Tubuli seminiferi* beinhalten die verschiedenen Keimzell-Reifungsstadien, die in Richtung Zentrum zunehmend differenzieren. Die Keimzellen werden dabei von den Sertolizellen, die diese umschließen, unterstützt. Die reifen Spermatozoen werden schließlich in das Innere der Kanäle abgegeben und gelangen von dort in den Nebenhoden, wo weitere Reifungsprozesse stattfinden.

Zwischen den *Tubuli* im Hoden befindet sich das lockere Bindegewebe des Interstitiums, das reich an Blut- und Lymphgefäßen ist. Eine Besonderheit dieses Gewebes ist das Vorhandensein eines sehr speziellen interstitiellen Zelltyps, der Leydigzellen. Diese liegen in der Nähe von Blutgefäßen (Leeson, 1963; Schulze, 1984), was die wichtige endokrine Funktion reflektiert (**Abb. 1.2-1**), und stellen bei den meisten Spezies etwa 2-3% der gesamten testikulären Zellzahl dar.

Andere Zellen, die sich im Interstitium befinden, sind Fibroblasten und Blutzellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten und Mastzellen. Makrophagen stellen hierbei mit Abstand den häufigsten Zelltyp dar, wobei ein Makrophage auf etwa vier Leydigzellen kommt (Bergh, 1987). Außer der Fähigkeit, degenerierende Leydigzellen zu phagozytieren (Morris *et al.*, 1986), besitzen diese durch Interaktion mit den Leydigzellen eine wichtige immunendokrine Funktion (Wang *et al.*, 1994; Radburn *et al.*, 1993; Hedger *et al.*, 1990). Auch darf die Rolle der Makrophagen bei der Leydigzell-Differenzierung nicht vernachlässigt werden: Makrophagen stimulieren die Proliferation

präpubertärer Leydigzellen durch Sekretion von IL-1 β (Khan *et al.*, 1992a) und TGF- α (Khan *et al.*, 1992b).

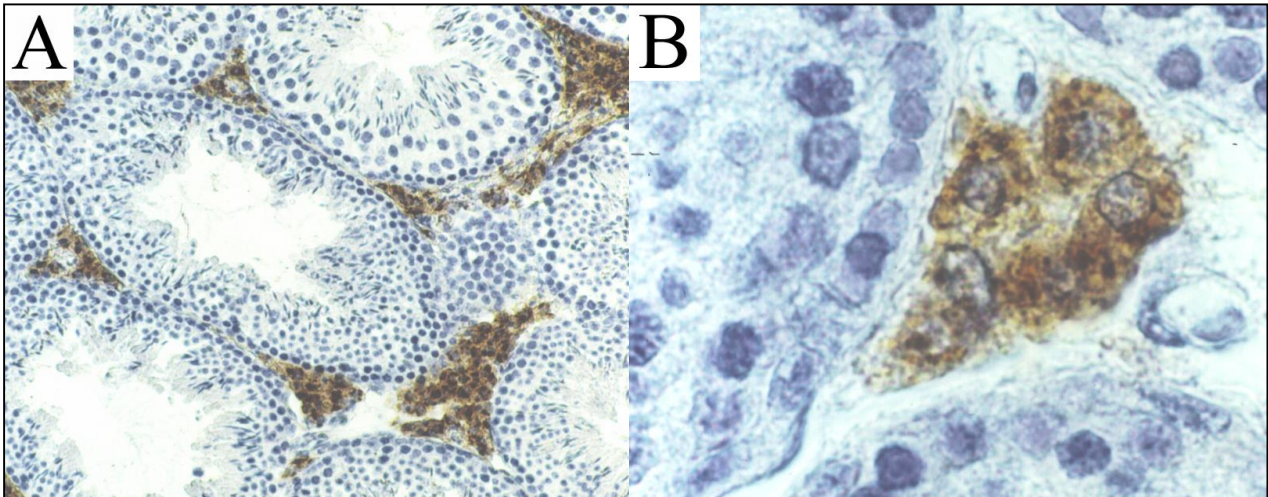


Abb. 1.2-1: Leydigzellen im Maushoden-Querschnitt nach immunhistochemischer Färbung mittels eines Anti-INSL3-Antikörpers (Balvers *et al.*, 1998). Vergrößerungen: **A:** $\times 200$, **B:** $\times 1000$.

1.3 Die Rolle der Leydigzelle bei der hormonellen Steuerung

Die Leydigzelle synthetisiert Steroidhormone, wobei die Synthese der Kontrolle durch Gonadotropine unterliegt. Das Hauptprodukt ist Testosteron, von Leydigzell-Tumoren können jedoch auch beträchtliche Mengen an Progesteron, das ein Testosteron-Vorläufer ist, oder Östrogen synthetisiert werden (Perez *et al.*, 1980).

Die Steroidogenese von Testosteron in den Leydigzellen vollzieht sich auf zwei verschiedenen enzymatischen Wegen, nachdem Cholesterin vom P450_{scc}-System in den Mitochondrien zu Pregnenolon umgewandelt wurde. Die Benutzung des jeweiligen Signalweges ist speziesabhängig und verbunden mit der relativen Substrataffinität des P450-17 α Enzyms (Zytochrom P450-17 α -Hydroxylase). Die Syntheseleistung der Leydigzelle ist recht beachtlich: etwa 2 Milligramm Testosteron pro Gramm Leydigzellen beim Mann am Tag.

Der Δ^4 -Syntheseweg (Pregnenolon $\rightarrow$ Progesteron $\rightarrow$ Androstendion $\rightarrow$ Testosteron) wurde als erstes in der Ratte entdeckt und spielt hier auch die größte Rolle (Slaunwhite und Samuels, 1956). Im Gegensatz dazu wird beim Hund hauptsächlich der Δ^5 -Syntheseweg (Pregnenolon $\rightarrow$ Hydroxypregnenolon $\rightarrow$ Dehydroepiandrosteron $\rightarrow$ Androstendion $\rightarrow$ Testosteron) benutzt (Ibayashi *et al.*, 1965). Der Δ^5 -Syntheseweg wird weiterhin von Kaninchen, Schweinen, Menschen und höheren Primaten eingeschlagen (Hall *et al.*, 1964; Booth, 1975; Hammar & Petersson, 1986; Preslock & Steinberger, 1977), bei der Maus dominiert der Δ^4 -Syntheseweg vor der Pubertät, beim adulten Tier jedoch scheint auch der Δ^5 -Syntheseweg eine Rolle bei der Testosteron-Produktion zu spielen (Sheffield und O'Shaughnessy, 1988).

Die Umwandlung von Testosteron in sein 5α -reduziertes Produkt, Dihydrotestosteron (DHT), ein wesentlich stärkeres Androgen als Testosteron, erfolgt in den Zielgeweben. Im Hoden ist 5α -Reduktaseaktivität jedoch sowohl in den Leydigzellen (O'Shaughnessy und Murphy, 1991) als auch in den Sertolizellen bzw. Spermatozyten zu finden (Dorrington und Fritz, 1975).

1.3.1 LH als gonadotroper Stimulus der Testosteron-Synthese

Der wichtigste Stimulus für die Biosynthese des Testosterons in den Leydigzellen ist das gonadotrope Hormon LH (luteinisierendes Hormon). Dieses wird von gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens nach Bindung des pulsatil sezernierten Gonadotropin-freisetzenden Hormons (GnRH), eines Decapeptids, synthetisiert und interagiert auf der Oberfläche der Leydigzellen mit den LH-Rezeptoren. Der LH-Rezeptor gehört zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Siebentransmembran-Rezeptoren (Dufau, 1988). Als Reaktion auf diesen Stimulus reagiert die Leydigzelle auf zwei verschiedene Arten: mit einem akuten Effekt, der innerhalb von wenigen Minuten abläuft, und einem langsameren, über mehrere Stunden verlaufenden Effekt. Die langsamen Effekte beinhalten die Mechanismen zur Steigerung der Transkription und Translation von steroidogenen Enzymen.

Die Expression von LH ist jedoch nicht nur auf die Hypophyse beschränkt. Auch der Hoden selber stellt kleinere, parakrin wirkende Mengen von LH her (Zhang *et al.*, 1995). Orte der Synthese sind in diesem Fall die Spermatozyten der Stufen 2-10.

1.3.2 Herkunft des Cholesterols für die Steroidsynthese

Markierungsstudien haben aufgeklärt, dass bei Ratten die Leydigzellen das Cholesterol nur zu etwa 38-43% als Lipoprotein aus dem Plasma beziehen (Morris und Chaikoff, 1959). Aus diesem Ergebnis kann jedoch nicht abgeleitet werden, daß Leydigzellen nur minimal abhängig sind von den Lipoproteinen im Plasma, denn gerade bei diesem Zelltyp sind im Vergleich zu anderen Zellen des Hodens die meisten Rezeptoren gefunden worden, die plasmaständige HDL (high density lipoproteins) oder VLDL (very low density lipoproteins) erkennen (Christensen und Mason, 1965). Interessanterweise befinden sich die Rezeptoren für LDL (low density lipoproteins) nur auf fötalen Leydigzellen (Brown et al., 1979). Die Untersuchung der Effekte der einzelnen Formen der Lipoproteine auf kultivierte Leydigzellen zeigten, dass bei Kurzzeit-Inkubationen weder LDL noch HDL eine Auswirkung auf die Testosteron-Biosynthese hat (Azhar und Menon, 1982). Bei längeren Inkubationen oder nach desensitivierenden Mengen von hCG, also Mengen, die zur Internalisierung des LH-Rezeptors führen (3.5 nmol/l Blut), ist jedoch durchaus ein Anstieg der steroidalen Produktion zu verzeichnen (Quinn et al., 1981). Wie bei vielen physiologischen Prozessen gibt es auch bei der Steroidaktivierung durch Lipoproteine Spezies-Unterschiede: Bei Ratten ist HDL der stärkste Agonist, während bei der Maus-Leydigzelllinie MA10 oder beim Schwein LDL diese Rolle übernimmt (Bergh, 1987; Freeman und Ascoli, 1982).

1.3.3 Die Rolle des Transkriptionsfaktors SF-1

Einer der wichtigsten transkriptionellen Regulatoren im reproduktiven System ist SF-1. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit wichtiger Beteiligung auf allen drei Stufen der endokrinen Hierarchie (Hypothalamus, Hypophyse, Gonaden). Die Gene zahlreicher steroidogener Enzyme werden von ihm reguliert, beispielsweise alle drei Enzyme des Cholesterol Side-Chain-Cleavage (CSCC)-Komplexes (Rice et al., 1991). Zudem konnte gezeigt werden, dass die gonadale und adrenale Entwicklung während der Embryogenese von SF-1 abhängig ist (Luo et al., 1994): SF1-knockout-Mäuse haben nur weibliche äußere Genitalien und sterben eine Woche nach der Geburt aufgrund ihres Kortikosteroid-Mangels. SF-1 kann zum ersten Mal am Tag 9 *postcoitum* in den urogenitalen Furchen detektiert werden (Ikeda et al., 1994) und zu späteren Zeitpunkten dann in den Leydigzellen.

1.4 Der Insulin-ähnliche Faktor 3 (INSL3)

Der Insulin-ähnliche Faktor 3 (INSL3) ist ein relativ neues Mitglied der Insulin/IGF/Relaxin-Familie. INSL3 wird auch als Ley-IL oder Relaxin-ähnlicher Faktor (RLF) bezeichnet. Mittlerweile wurden die cDNAs einiger Spezies kloniert. Die Sequenzvergleiche aus Schwein (Adham *et al.*, 1993), Maus (Pusch *et al.*, 1996), Mensch (Burkhardt *et al.*, 1994; Ivell *et al.*, 1997), Rind (Bathgate *et al.*, 1996), Schaf (Roche *et al.*, 1996), Ziege (Hombach-Klonisch *et al.*, 1999), Hirsch (Hombach-Klonisch *et al.*, 2000), Weißbüschelaffe (Zarreh-Hoshyari-Khah *et al.*, 1999) und Ratte (Spiess *et al.*, 1999) zeigen, dass die Variabilität, wie bei dem Verwandten Relaxin, zwischen den Spezies relativ hoch ist. Ähnlich dem Relaxin hat Insl3 eine Drei-Domänen-Struktur, bestehend aus einem Signalpeptid, gefolgt von einem B-Peptid, dem konnektiven C-Peptid und anschließend dem A-Peptid. Die drei Disulfidbrücken sitzen an der gleichen Stelle wie beim Relaxin, so dass von einer ähnlichen Struktur ausgegangen werden kann.

Neue Untersuchungen zur Beziehung zwischen Struktur und Funktion von INSL3 (Rosengren *et al.*, 2006) haben gezeigt, dass die Aminosäuren 11 bis 27 der B-Kette von INSL3 für die Bindung an INSL3-Rezeptor, LGR8 (leucine-rich G-protein-coupled receptor 8) notwendig sind. Dabei spielt die Aminosäure TrpB27, von der wir aus der neuen Studie wissen, dass sie im Schwanz der B-Kette außerhalb der Helix liegt, eine besondere Rolle (Büllesbach *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu sind die Aminosäuren, die für die Bindung von H2 Relaxin an Relaxin-Rezeptor, LGR7 (leucine-rich G-protein-coupled receptor 7) verantwortlich sind, Bestandteil eines RXXXRXXI Motivs in der Helix der B-Kette (Büllesbach *et al.*, 2005). Daher ist es anzunehmen, dass die Bindung von INSL3 an LGR8 auch auf zusätzlichen Aminosäuren in der Helix der B-Kette beruht. Die Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in INSL3 sind HisB12, ArgB16 und ValB19. Man kann annehmen, dass diese die wahrscheinlichsten Kandidaten für weitere Determinanten der Bioaktivität von INSL3 sind. In der hier präsentierten Struktur liegen die Seitenketten dieser Aminosäuren in der Tat auf einer Seite der Helix der B-Kette.

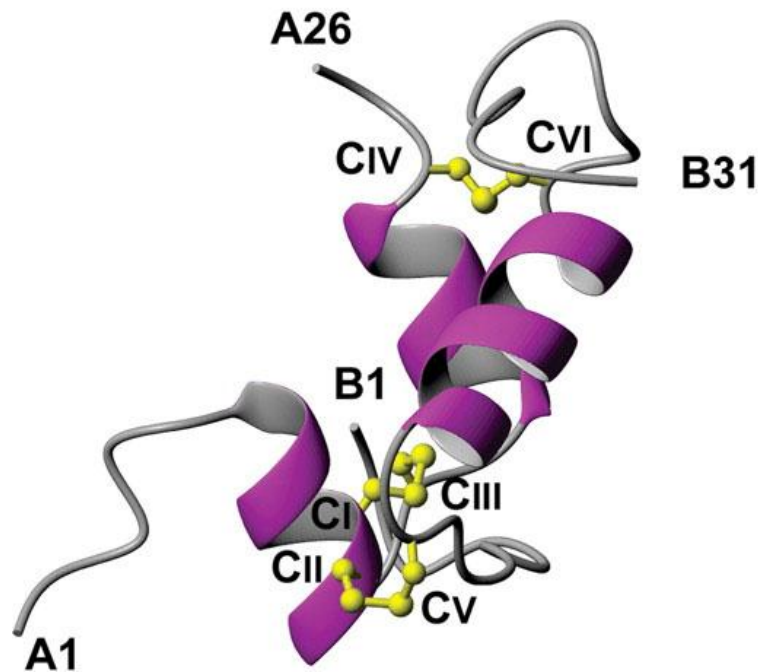


Abb. 1.4-1: Dreidimensionale Struktur des menschlichen INSL3 (Rosengren *et al.*, 2006). Anfang und Ende der A- und B-Kette sind mit A1 und A26, bzw. B1 und B31 bezeichnet. Die Cysteine, die die Disulfidbrücken bilden, sind mit C1 bis CVI bezeichnet, die Disulfidbrücken selbst sind in gelb dargestellt.

Das *Ins13*-Gen besteht aus zwei Exons und einem Intron, dessen Länge bei den jeweiligen Spezies unterschiedlich ist, und in einem Bereich von 1.2-4.2 kb liegt. Der Promotor ist relativ klein, so dass bei transfizierten BLT-1-Zellen (eine Leydig-Zelllinie) 700 bp eines Promotorkonstrukts für eine hohe Transkription des Reportergens ausreichen (Koskimies *et al.*, 1997). Bis jetzt sind für die Regulation der Transkription des *Ins13*-Gens drei Faktoren charakterisiert worden, die notwendig sind: der in vielen steroidogenen Prozessen beteiligte Transkriptionsfaktor SF-1 (Koskimies *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998), sein Gegenspieler DAX-1, der die Bindung von SF-1 an den *Ins13*-Promotor verhindert (Koskimies *et al.*, unveröffentlicht) und testikuläres Östrogen, welches *in vivo* die *Ins13*-Expression herunterregelt (Emmen *et al.*, 2000).

Eine weitere interessante Eigenschaft des *INSL3*-Gens ist seine Fähigkeit des differentiellen Spleißens. Diese Eigenschaft ist jedoch bis jetzt nur bei einigen wenigen Spezies beobachtet worden, beispielsweise bei dem Weißbüschelaffen *Callithrix jacchus* (Zarreh-Hoshyari-Khah *et al.*, 1999). Sie beruht auf der Gegenwart eines zusätzlichen Exons 1A, welches sich innerhalb des bei anderen Spezies entsprechenden Intron 1 befindet. Das Spleißen resultiert in einer Verschiebung des Leserasters mit der

Konsequenz eines neu eingeführten Stopkodons. Das resultierende Protein, welches bis jetzt jedoch noch nicht mit einem Antikörper nachgewiesen werden konnte, würde aus dem B-Peptid, einem Teil des C-Peptids und einem neuen C-Terminus bestehen. Da die Sequenz von Exon 1A jedoch bei anderen Spezies keine Entsprechung findet, ist eine funktionelle Bedeutung zweifelhaft. Auch bei der Maus wurde kürzlich eine kleinere Spleißvariante entdeckt (Baker und O'Shaughnessy, unveröffentlicht), bestehend aus dem Anfang des B-Peptids, der distalen Region des C-Peptids und dem A-Peptid. Auch hier konnte bis jetzt kein funktionelles Protein nachgewiesen werden.

Die Expression des INSL3 beim Mann oder männlichen Tier beschränkt sich auf testikulärer Seite auf die Leydigzellen, in denen eine sehr hohe Menge des Transkriptes und auch des Proteins nachgewiesen werden kann (Burkhart *et al.*, 1994; Pusch *et al.*, 1996). Bei Frauen oder weiblichen Tieren kann INSL3 im Ovar, speziell in den Thekazellen der großen antralen Follikel, und im *Corpus luteum* des Zyklus und der Schwangerschaft sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detektiert werden (Bathgate *et al.*, 1996; Balvers *et al.*, 1998; Bathgate *et al.*, 1999; Bamberger *et al.*, 1999). Zusätzlich konnten entweder Transkripte oder Immunreaktivität im Gehirn, in der Schilddrüse, in der Plazenta und auch in den *Tubuli seminiferi* des Hamsters (Balvers und Ivell, unveröffentlicht) nachgewiesen werden, wobei die Transkriptmenge in diesen Geweben jedoch gering ist (Bathgate *et al.*, 1996; Klonisch *et al.*, unveröffentlicht).

Welche physiologischen Effekte übt INSL3 aus? Verschiedene Beobachtungen schreiben diesem Protein eine nicht unbedeutende Rolle in der männlichen und weiblichen Physiologie zu. So deutet die starke und ausschließliche Expression in den testikulären Leydigzellen auf eine wichtige Rolle in der männlichen Reproduktionsphysiologie hin. Hinzu kommt, dass zirkulierendes INSL3-Protein hauptsächlich bei postpubertären Männern zu messen ist, bei Jungen und Frauen jedoch etwa 10-fach niedriger liegt (Büllesbach *et al.*, 1999). Ferner wird es relativ stark bei Wiederkäuern exprimiert, welche kein Relaxin synthetisieren, so dass INSL3 hier möglicherweise eine Ersatzfunktion für Relaxin ausübt (Bathgate *et al.*, 1996). Den stärksten Hinweis auf seine Funktion gaben jedoch die Beobachtungen, dass *Insl3-knockout*-Mäuse kryptorchid sind (Zimmermann *et al.*, 1999; Nef und Parada, 1999), mit der Konsequenz, dass die Männchen infertil sind. Die undifferenzierten Gonaden des frühen Embryos werden von zwei Ligamenten gehalten: Das „craniale suspensorische Ligament“ (CSL) auf der dorsalen Seite und der Vorläufer des Gubernakulums auf der ventralen Seite. Normalerweise führt beim Wildtyp die fötale Testosteron-Synthese zur Regression des CSL, und die Ausbildung des

Gubernakulums führt zum transabdominalen Dezensus der Gonaden zur inguinalen Region. In der *knockout*-Maus bleibt das Gubernakulum jedoch unterentwickelt und die Gonaden wandern nur bis zur peritonealen Höhle. Ist zusätzlich der Androgen-Rezeptor inaktiviert, verbleiben die Gonaden jedoch durch das gut ausgebildete CSL an ihrer ursprünglichen perirenalen Position. Diese zwei Vorgänge sind also möglicherweise unabhängig voneinander reguliert.

Kryptorchismus beim Menschen ist relativ weit verbreitet: Etwa 1-2% aller männlichen Babys zeigen diesen Phänotyp. Es stellt sich nach den Ergebnissen der *Insl3-knockout*-Mäuse die zwingende Frage, inwieweit Insl3 hier eine Rolle spielt. Eine neue Studie stellt einen Zusammenhang zwischen Östrogen-wirkenden Umweltsubstanzen und Kryptorchismus her. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung schwangerer Mäuse-Weibchen mit Diethylstilböstrol, 17 α - oder 17 β -Östradiol die Insl3-Expression in den embryonalen Leydigzellen herabsetzt und somit eine molekulare Basis für Östrogen-induzierten Kryptorchismus darstellen könnte (Nef *et al.*, 2000). Zwei unabhängige Studien an humanen Kryptorchiden (Koskimies *et al.*, 2000; Krausz *et al.*, 2000) konnten keinen Zusammenhang finden zwischen Kryptorchismus und einem recht häufigen INSL3-Polymorphismus mit einer Ala/Thr-Aminosäuresubstitution. Es muss jedoch erwähnt werden, dass beide Studien zufällig ausgewählte Kryptorchide einbezogen, so dass andere Faktoren, wie z.B. Störungen des Östrogenhaushalts, hier eine Rolle gespielt haben könnten (Hutson und Donahoe, 1986). Eine Untersuchung von familiärem Kryptorchismus könnte hier eventuell eindeutiger Ergebnisse liefern. Davon unabhängig sind für die beschriebenen Untersuchungen verschiedene Erklärungen möglich: humaner Kryptorchismus könnte aus einem veränderten Transkriptionsmuster resultieren, so dass die INSL3-Menge und nicht etwa ein Polymorphismus ausschlaggebend sind. Diese Ergebnisse könnten jedoch auch ein Indiz dafür sein, dass beim Menschen INSL3 als reifes Protein ohne konnektives C-Peptid vorliegt, denn dort liegen die beobachteten Mutationen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das C-Peptid überhaupt keinen Einfluß auf die Funktion von INSL3 ausübt.

Im erwachsenen Nagetier kann Insl3 eine anti-apoptotische-Wirkung auf Samenzellen ausüben (Kawamura *et al.*, 2004). In der erwachsenen Frau, bei der Konzentration des zirkulierenden INSL3 sehr niedrig ist, scheint die lokale Expression des INSL3 im Eierstock mit der Selektion und Erhaltung des Follikels verbunden zu sein. (Spaniel-Borowski *et al.*, 2001; Irving-Rodgers *et al.*, 2002).

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstamm

Als Bakterienstamm wurde verwendet:

Escherichia coli DH5 alpha

Genotyp: *thi-1, end A1, gyr A96(Na1'), sup E44, rec A1, hsd R17 (rk-, mk-), rel A1, Δ (lacIZYA- arg F) U169, deok (φ80dlacZΔlacZ) M15*

2.2 Verwendete Primer

Alle DNA-Primer sind in 5' → 3'-Orientierung angegeben:

name	Sequent	Spezies	Gen	Verwendung
rRLFEx-1s	tgccaccatgcacgcactgc	Ratte	<i>InsI3</i>	RT-PCR
rRLF-3'	agggaggaggtgggcacaggtcat	Ratte	<i>InsI3</i>	RT-PCR
rJAK3-X23	tca(g/c)gagctcatg(a/c)agctgtgctgg	Ratte	<i>InsI3</i>	Genomische PCR
Props 1	taatgcctcgagctcggctgctgctgctgtt	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
Props 2	taatgcctcgagtggacacacagcccctgac	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
Props 3	taatgcctcgagcttgctgttttaaatgttggggg	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
Props 4	taatgcctcgagttttcactgctagcaagactgtc	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
Props 5	taatgcctcgagcgtcttcagcctcagtttc	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
Props 6	taatgcctcgagttaaataagtaccccaggc	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
Props 7	taatgcctcgagccagtaggaagcagagctatg	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
Propr 1	ttcgtcgaggggtggcaggaggcagcg	Ratte	<i>InsI3</i>	PCR promoter
mRLFss-SacI	ccgagctctggggagcgggctcctggcac	maus	<i>InsI3</i>	PCR promoter
mRLFaa-BglII	gaagatctcatggtggcaggaggcagtgggcaggg	maus	<i>InsI3</i>	PCR promoter
rSF-1A-s	tgacccctccaaggcccat	Ratte	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
rSF-1A-as	tgacatgggccttgagggg	Ratte	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
rSF-1B-s	tgaccctgaccgtgacct	Ratte	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
rSF-1B-as	tgacaggtcacggtcagg	Ratte	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
rSF-1C-s	ccaagcttgaggacttcagggtccca	Ratte	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
rSF-1C-as	tgaccttgggaccctgaagtcctc	Ratte	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
mSF-1A-s	tgaccccgccaaggcccat	maus	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
mSF-1A-as	tgacatgggccttggcggg	maus	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
mSF-1B-s	tgaccctgaccgtgactc	maus	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
mSF-1B-as	tgacgagtcacggtcagg	maus	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
mSF-1C-s	ccaagcttgaggacttcaaggtcccaag	maus	<i>InsI3</i>	EMSA DSO
mSF-1C-as	tgaccttgggaccttgaagtcctc	maus	<i>InsI3</i>	EMSA DSO

2.3 Verwendete Vektoren

pGEM-T Easy Cloning System

Der pGEM-T Easy-Vektor (Promega) ist ein erprobtes System für die Klonierung von PCR-Produkten. Dieser Vektor wurde durch Spaltung des pGEM-5Zf(+) Vektors mit *Eco* RV und Addition von 3'-terminalen Thymidinen an beiden Enden präpariert (T-Vektor). Die effiziente Ligation von PCR-Produkten erfolgt über eine Anlagerung ihrer 3'-Deoxyadenosinreste an die T-Überhänge des Plasmides.

Der pGEM-T-Vektor hat einen f1 Replikationsursprung sowie T7- und SP6-RNA Polymerase Promotoren, die eine multiple Klonierungsstelle flankieren. Inserts können mittels *Eco* RI herausgeschnitten werden. Die Selektion geschieht über Ampicillin-Resistenz und die Unterbrechung der kodierenden für rekombinante Plasmide erfolgt für das α -Peptid der β -Galactosidase („Blau-Weiß-Selektion“).

pGL3-Luciferasevektoren

Alle pGL3 Vektoren (Promega) haben eine Luciferase-cDNA als ein Reporter-Gen, bezeichnet durch Luc+. Deshalb kann die transkriptionale Aktivität eines Promotors oder Enhancers subkloniert in einem pGL3 Vektor als enzymatische Aktivität der produzierten Luciferase gemessen werden. Die Selektion der Plasmide geschieht über Ampicillin-Resistenz.

.

p3T (MoBiTec)

Hierbei handelt es sich um einen zum Klonieren von 206 bp großen PCR-Produkten verwendeten Plasmid-Vektor mit vielfachen T-Überhängen. Um die Klonierungseffizienz zu steigern, wurde mit Hilfe einer „*Pfl* MI“ Schnittstelle ein drei dT-Überhang produziert. Nach der Polyadenylierung durch Terminal Deoxynucleotidyl Transferase und nach vielfacher dA-Erweiterung kann das PCR-Fragment mit sehr hoher Effizienz in den Vektor ligiert werden.

Die Selektion dieses Vektors geschieht über Ampicillin-Resistenz und die Unterbrechung der kodierenden Region für das α -Peptid der β -Galactosidase („Blau-Weiß-Selektion“).

2.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Theorie:

Die RNAs spielen eine zentrale Rolle bei der molekularbiologischen Detektion der Gene, da sie über Transkription und Lokalisation in den verschiedenen Geweben Auskunft geben können. Neben ribosomaler RNA existieren in den Zellen viele Messenger-RNAs, die einen direkten Ausdruck der Aktivität und Spezifität des Gewebes vermitteln. Die isolierte Gesamt-RNA ist Ausgangsmaterial für *Northern-Blot*, RNase Protection Assay (RPA), Herstellung der cDNA-Bibliotheken und RT-PCR. RNAs werden leicht durch kontaminierende RNasen abgebaut. Durch den Einsatz von Guanidinium-Isothiocyanat (GITC) bei der RNA-Präparation können die RNasen denaturiert werden.

Material:

- RNA-Clean™ (AGS)
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% Ethanol
- DEPC-Wasser
- UltraTurrax™ (Janke & Kunkel)

Methode:

Die langfristige Lagerung der Gewebeteile erfolgte bei -80°C.

Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe einer Flüssig-Extraktionsmethode (RNA-Clean™, AGS), die eine Modifikation der Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987) darstellt.

2 ml RNA-Clean™-Lösung wurden zu je 100 mg Gewebe gegeben. Bei adhären Zellen wurde pro konfluenter T25-Zellkulturflasche ($4\text{-}5 \times 10^6$ Zellen) 1 ml RNA-Clean™ zugegeben, durch Schwenken über den Flaschenboden verteilt und die lysierten Zellen abgeschabt.

Die Gewebe-Aliquots wurden zur Aufbereitung in Alufolie gewickelt und erneut in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach grober mechanischer Zerkleinerung wurde das Material gewogen und mit RNA-Clean™ versetzt. Die Suspension wurde in 15 ml Nunc-Tubes mit einem UltraTurrax™ homogenisiert. Nach Zugabe von 0,2 Volumen Chloroform und heftigem Schütteln wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 10 Minuten

bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von einem Volumen (bezogen auf das RNA-Clean™) Isopropanol und heftigem Schütteln wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 10 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Das *Pellet* wurde zweimal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen (10 min, 12000 g, 4°C), kurz an der Luft getrocknet und dann in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

2.5 cDNA-Synthese

Theorie:

Der Erststrang der cDNA wird aus mRNA in Gegenwart von Nukleotiden, dem entsprechenden Reaktionspuffer und durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert, wenn geeignete Matrizen- und *Primer*-Moleküle vorliegen.

Material:

- Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (200 U/µl; GibcoBRL)
- Oligo-d(T)₁₈₋₂₅-*Primer* (500 ng/µl; Sigma)
- 5x Erststrang-Puffer (GibcoBRL)
- 10x Erststrang-Puffer (durch Lyophilisierung des 5x Erststrang-Puffers und Rekonstitution in einem halben Volumen Wasser hergestellt)
- 0.1 M DTT (GibcoBRL)
- dNTP-Mix (Genecraft)
- RNaseOUT™
- 5 M Betain (Sigma)
- 2 M Trehalose (Sigma)
- Mineralöl (Sigma)

Methode:

5 µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl Oligo-d(T)₁₈₋₂₅-*Primern* versetzt, mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt, für 10 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5x Erststrang-Puffer, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl RNaseOUT™ und 1 µl Superscript™ II™ wurde die cDNA-Synthese bei 42°C für 60 min in einem Thermoblock durchgeführt. Um Evaporation zu verhindern, wurde der Ansatz mit

Mineralöl überschichtet. Nach der cDNA-Synthese wurde der Ansatz mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

Bei der alternativen Methode für hocheffiziente cDNA-Synthese mit Betain und Trehalose wurden 1.5 µl Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo-d(T)-*Primern* und 12 µl Betain auf 70°C für 5 min erhitzt und dann für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl 10x Erststrangpuffer, 1.5 µl 1 M DTT, 1.5 µl dNTP-Mix, 9 µl Trehalose und 1 µl Superscript™ RT wurde der Ansatz gut durchmischt, und bei 40°C für 30 min und dann bei 60°C für 60 min in einem Thermoblock inkubiert. Um Evaporation zu verhindern, wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet. Nach der cDNA-Synthese wurde der Ansatz mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

2.6 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Theorie:

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein hocheffizientes Verfahren, um definierte Abschnitte der DNA-Moleküle *in vitro* zu vervielfältigen. Die Verlängerung der Startnukleotide (*Primer*) erfolgt nach deren Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Strang durch die hitzebeständigen DNA-Polymerasen (z.B: *Taq*-, *Tth*-, *Pfu*- oder Vent™-Polymerase). Die optimale enzymatische Aktivität dieser Polymerasen liegt bei 72°C. Die Länge der DNA-Kopien werden durch den Ansatz der 5'- und 3'-*Primer* kontrolliert. Da sich die Syntheseprodukte wieder mit den *Primer* hybridisieren lassen, kann ein spezifischer DNA-Abschnitt durch Wiederholung des PCR-Vorgangs (Denaturierung, *Primer*bindung und Elongation) sehr schnell exponentiell angereichert werden. Verschiedene Faktoren bestimmen den Erfolg der PCR-Reaktion:

Magnesium-Konzentration: Die Polymerasen benötigt die zweiwertigen Magnesium-Ionen als Kofaktor. Die benötigte Konzentration ist individuell vom DNA-Template abhängig.

Annealing-Temperatur: Die optimale Hybridisierungstemperatur ist von der Länge und dem G/C-Gehalt der gewählten *Primer* abhängig. Es gibt verschiedene Algorithmen zur Berechnung der Schmelztemperatur eines *Primers*, eine einfaches Verfahren ist die Anwendung der Formel: $T_m = \Sigma G/C \times 4^\circ\text{C} + \Sigma A/T \times 2^\circ\text{C}$.

Elongationszeit: Je nach Länge des DNA-Moleküles braucht die DNA-Polymerase eine

bestimmte Zeit für die Elongation. Die Zeitauswahl ist ein wichtiger Parameter für das Gelingen der PCR. Die *Taq*-Polymerase ist in der Lage, etwa 1000 Nukleotide pro Minute einzubauen.

Die oben genannten Kriterien werden bei jeder Standardanwendung berücksichtigt. Je nach Problemstellung existieren zahlreiche Abwandlungen von dem Grundprinzip der PCR, die ständig vielfältiger werden. *Hot start/touch down*-PCR ist eine häufige Anwendung. Durch diese methodische Abwandlung wird das Template erst dem bereits auf 85°C erhitzten Ansatz zugesetzt, um Nebenprodukte zu vermeiden (*hot start*). Die Spezifität der PCR wird erhöht, indem die Hybridisierungstemperatur relativ hoch gewählt wird und dann in 2°C-Schritten bis auf einen stabilen Endwert reduziert wird (*touch down*).

Material:

- Taq* DNA-Polymerase (Genecraft; 5U/μl)
- 10x *Taq*-Puffer
- 50x Advantage™ Klen-*Taq*-Polymerase (Clontech)
- 10x Advantage™ Reaktionspuffer (Clontech)
- dNTP-Mix (Genecraft)
- Mineralöl (Sigma)
- 5 M Betain (Sigma)
- Thermocycler* (MWG Biotech)

2.6.1 PCR mit cDNA

Methode:

Alle PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 50 μl durchgeführt. Folgender Ansatz wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß zusammenpipettiert:

10x Reaktionspuffer	5	μl
dNTP-Mix (10 mM)	1	μl
5'- <i>Primer</i> (100 ng/μl)	1	μl
3'- <i>Primer</i> (100 ng/μl)	1	μl
DNA-Template (Menge variiert)	x	μl
H ₂ O	y	μl

Die Ansätze wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet und in den auf 95°C vorgeheizten PCR-Block gestellt. Nach Zugabe von 1 µl *Taq*-Polymerase (0,3 U/µl) wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C 5 min; 2 x (95 °C 1 min/ 61°C 45 sec/ 72°C 1 min)

2 x (95 °C 1 min/ 59°C 45 sec/ 72°C 1 min)

2 x (95 °C 1 min/ 57°C 45 sec/ 72°C 1 min)

2 x (95 °C 1 min/ 55°C 45 sec/ 72°C 1 min)

30 x (95 °C 1 min/ 53°C 45 sec/ 72°C 1 min); 72 °C 3 min; 10°C ∞.

Aliquots der PCR-Produkte (5-15 µl) wurden auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.6.2 PCR mit genomischer DNA

Als Alternative bei unzureichenden Amplifizierungen wurde auch hier 5 M Betain eingesetzt oder das Advantage™-System (Clontech) benutzt. Dieses beinhaltet einen Mix aus der *Taq*- und der *Pfu*-Polymerase, was bei manchen PCRs für die Amplifizierungseffizienz von Vorteil ist.

2.6.2.1 PCR mit genomischer DNA der Ratte

Wurde eine PCR mit genomischer DNA durchgeführt, so wurde diese mit 50 ng Ratten genomischer DNA als Template und Primer Paar rJAK3-X23 und rRLF-3' wie in **Kapitel 2.6.1** beschrieben, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C 5 min; 30x (95°C 30 sec/ 58°C 30 sec/ 72°C 3 min); 72°C 30 min; 10°C ∞.

2.6.2.2 PCR mit genomischer DNA der Maus

Wie in **Kapitel 2.8.1** beschrieben, wurde die PCR mit 50 ng Maus genomischer DNA als Template und Primer Paar mRLF ss-SacI und mRLF as-BglII unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C 5 min; 2 x (95°C 1 min / 75°C 30 sec/ 72°C 1 min)
2 x (95°C 1 min / 73°C 30 sec/ 72°C 1 min)
4 x (95°C 1 min / 71°C 30 sec/ 72°C 1 min)
4 x (95°C 1 min / 69°C 30 sec/ 72°C 1 min)
4 x (95°C 1 min / 67°C 30 sec/ 72°C 1 min)
30x (95°C 1 min / 65°C 30 sec/ 72°C 1 min); 72°C 10 min; 10°C ∞.

2.6.3 Herstellung von Rattenpromotor-Deletionskonstrukten durch PCR

Die 5' nicht kodierende Region des Ratten InsI3 Gens, das im letzten Intron des Jak3 Gens liegt, hat 3 Bindungsstellen für SF-1.

Zuerst wurde durch eine PCR mit genomischer DNA, wie in **Kapitel 2.6.2.1** beschrieben, das InsI3 Gen der Ratte isoliert. Für die Herstellung von Rattenpromotor-Deletionskonstrukten wurde eine PCR mit dem Ratten InsI3 Gen und den Primern ProPs1- ProPs7 als forward Primer und Propr1 als reverse Primer, wie in **Kapitel 2.6.1** beschrieben, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C 5 min; 2 x (95°C 30 sec/ 67°C 30 sec/ 72°C 1 min)
2 x (95°C 30 sec/ 65°C 30 sec/ 72°C 1 min)
2 x (95°C 30 sec/ 63°C 30 sec/ 72°C 1 min)
2 x (95°C 30 sec/ 61°C 30 sec/ 72°C 1 min)
30x (95°C 30 sec/ 59°C 30 sec/ 72°C 1 min); 72 °C 5 min; 10°C ∞.

2.6.4 Colony-PCR

Für die *Colony*-PCR wurde nach Eintauchen einer sterilen Pipettenspitze in eine Bakterienkolonie, die Spitze in einem Eppendorf-Gefäß mit 10 µl Wasser mehrmals durchgespült. Der Ansatz wurde für 5 min auf 95°C erhitzt und ein 2 µl Aliquot hiervon in einen fertig angesetzten *hot start*-PCR-Ansatz (bei 95°C) überführt.

2.7 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Theorie:

Diese Methode basiert auf der Wanderung der DNA im elektrischen Feld durch ein Agarosegel zur Anode. Abhängig von der Größe der DNA wandern die Moleküle unterschiedlich schnell und werden so im Gel aufgetrennt. Diese Technik wird häufig sowohl für die Identifizierung von DNA-Fragmenten (analytisch) als auch zur Aufreinigung und Isolierung der DNA (präparativ) eingesetzt. Die Nukleinsäuren werden durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Material:

- 10x TBE
- 50x TAE:
- 10x Ladepuffer
- Ethidiumbromid (10 mg/ml in Wasser; Roth)
- DNA-Längenstandards: 100bp-Leiter (1 µg/µl; Gibco BRL)
1kb-Leiter (1 µg/µl; Gibco BRL)
- Agarose „*Elektrophoresis Grade*“ (Gibco BRL)
- Elektrophoresekammer und Zubehör (MWG Biotech)

Methode:

Die Agarose wurde in der benötigten Konzentration (0.8-2%) in 0.5x TBE oder 1x TAE in der Mikrowelle erhitzt, abgekühlt und mit Ethidiumbromid (10 µg/100 ml Gelvolumen) vermischt. Das Gel wurde in einen Gelträger gegossen, der Kamm eingesetzt und bei Raumtemperatur 30 min abgekühlt. Die analytische Nukleinsäurelösung wurde mit

1/10 Volumen des Ladepuffers versehen und bei 100 V aufgetrennt. Zur Ermittlung der Fragmentlängen wurden geeignete Längenstandards parallel aufgetragen. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und fotografiert.

2.8 Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Gel

Theorie:

DNA-Fragmente können aus einem Agarose-Gel isoliert werden, indem die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silica-Matrix gebunden wird. Agarose-Reste können gewaschen werden. Mit einem Niedrigsalzpuffer wird die DNA von der Matrix eluiert.

Material:

-Qiaex™ II-Kit (Qiagen)

Methode:

Bei Bedarf wurde die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem TAE-Gel mit Hilfe des Qiaex™ II-Kits durchgeführt. Zuerst wurden die Nukleinsäuren unter UV-Licht mit einem sterilen Skapell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einem dreifachen Volumen an Puffer 1 aufgenommen. Die Glasmatrix aus dem Kit wurde intensiv resuspendiert, 10 µl davon wurden dem Gelstückchen zugesetzt und bei 55°C 10 min inkubiert, wobei das Gel sich auflöste und die DNA an die Glasmatrix adsorbierte. Nach der Zentrifugation (30 s, 16000 g) wurde der Überstand verworfen und die an die Matrix gebundenen Nukleinsäuren einmal mit 500 µl Puffer 1 und zweimal mit je 500 µl Puffer 2 gewaschen. Anschließend wurde die Matrix 30 min bei RT luftgetrocknet und die DNA in 20 µl Wasser unter Schütteln eluiert (10 min, 55°C). Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt.

2.9 Restriktionsverdau von DNA

Theorie:

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die spezifische Muster (Sequenzen) auf einem doppelsträngigen DNA-Molekül erkennen, und die DNA an dieser Stelle

spalten. Die meisten Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen. Durch die hydrolytische Spaltung der beiden DNA-Stränge entstehen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder versetzte 5´- bzw. 3´-überstehende Enden (*sticky ends*). Das 5´-Ende der DNA trägt dabei immer eine Phosphatgruppe, das 3´-Ende eine Hydroxylgruppe. Die durch Restriktion entstandenen DNA-Fragmente können für eine Ligation und zur Herstellung einer Sonde verwendet werden.

Material:

- Diverse Restriktionsenzyme und -puffer (New England Biolabs)
- Thermoblock (Heraeus)

Methode:

Es wurden entweder *Insert*-tragende Plasmide, doppelsträngige DNA-Fragmente oder genomische DNA wie folgt eingesetzt:

	Analytische Spaltung	Präparative Spaltung
DNA	ca. 500 ng	ca. 5-20 µg
H ₂ O	x µl	x µl
10x Puffer	2 µl	10 µl
Enzym (10-20 U/µl)	0,5 µl	10 µl
Σ	20 µl	100 µl

Analytische Spaltungen wurden für 1 h, präparative Spaltungen ü.N. meist bei 37°C inkubiert.

2.10 Ligation von DNA

Theorie:

Die Bildung einer kovalenten Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5´-Phosphatgruppe und einer freien 3´-Hydroxylgruppe zweier DNA-Moleküle wird als Ligation bezeichnet. DNA-Ligationen haben *in vivo* eine wichtige Bedeutung bei der DNA-Replikation und -Reparatur. *In vitro* werden verschiedene DNA-Fragmente durch die Ligation zu größeren Molekülen verknüpft. Die T4-DNA-Ligase ligiert sowohl

überlappende Enden (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*). Durch diese Technik ist man in der Lage ein fremdes, lineares DNA-Fragment mit einem linearisierten Vektor zu ligieren, wodurch ein neues rekombinantes Plasmid entsteht.

Material:

- 5x Ligase-Puffer (GibcoBRL)
- T4-DNA-Ligase (1 U/μl; GibcoBRL)

Methode:

Die Ligationen wurden in einem 10 μl Reaktionansatz durchgeführt:

Vektor-DNA (10 ng/μl)	1	μl
Fremd-DNA	x	μl
Ligase-Puffer (5x)	2	μl
T4-DNA-Ligase	1	μl
H ₂ O	x	μl
Σ	10	μl

Das molare Verhältnis von Vektor zum DNA-Fragment war 1:3, wenn die beiden zu ligierenden DNA überlappende Enden besaßen. Für blunt end-Ligationen wurde das DNA-Fragment in einem größeren Überschuß eingesetzt (1:10), sowohl bei pGEM-T Easy als auch bei pGL3 wurden die Ligationen bei 4°C ü.N. durchgeführt.

2.11 Herstellung von kompetenten Bakterien

Theorie:

Die meisten Methoden für die Transformation, d.h. für die Einführung von Fremd-DNA in Bakterien, basieren auf der Beobachtung, dass Bakterien, die zuerst mit eiskalter CaCl₂-Lösung behandelt und danach kurz erhitzt werden, mit Fremd-DNA transfiziert werden können (die Bakterien sind „kompetent“ gemacht worden). In dieser Arbeit wurde eine Ein-Schritt-Methode für die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen angewendet.

Material:

- LB-Medium
- LB-Antibiotikum-Platten
- TSS
- E.coli* DH5 α

Methode:

E.coli DH5 α wurden bei 37°C im Schüttelinkubator in LB-Medium bis zur frühen exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0.3-0.4$) gehalten und anschließend pelletiert (Heraeuszentrifuge, 1000 g, 4°C, 10 min). Das *Pellet* wurde im Originalvolumen TSS resuspendiert, für die Lagerung in 100 μ l Aliquots unmittelbar in einem Trockeneis/Ethanolbad schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz wurde durch Transformation eines Aliquots mit 100 pg DNA-Plasmid bestimmt und sollte bei 10^7-10^8 Transformanden/ μ g Plasmid-DNA liegen.

2.12 Transformation und Ausplattieren der Bakterien

Theorie:

Bei der Transformation handelt es sich um die Einführung fremder Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Diese Technik wird eingesetzt, um größere Mengen einer gewünschten DNA zu gewinnen. Diese in der Molekularbiologie zentrale Technik wird immer dann eingesetzt, wenn von einer bestimmten DNA größere Mengen benötigt werden. Aufgrund der Eigenschaften des Plasmids werden in den Wirtszellen viele Kopien davon hergestellt. Erfolgreich transformierte Bakterien können aufgrund einer Antibiotika-Resistenz selektiert werden, die ihnen über das Plasmid vermittelt wird.

Material:

- Kompetente *E.coli*-Zellen
- LB-Medium
- LB-Antibiotikum-Platten (mit 100 μ g Ampicillin/ml Agar)
- Brutschrank (Heraeus)
- Schüttelinkubator (Heraeus)

- Ampicillin (100 mg/ml; Sigma)
- 0.5 M IPTG (Sigma)
- 10% (w/v) X-Gal (Sigma) in DMSO
- 0.5 M β -Mercaptoethanol (Invitrogen)

Methode:

Die kompetenten Zellen (100 μ l Aliquots) wurden auf Eis aufgetaut und sofort mit 0.5 μ l β -Mercaptoethanol gemischt. Jeweils 5 μ l der Ligationsansätze wurden vorsichtig zusammenpipettiert und mit der Pipette vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock von 30-45 sec bei 42°C; danach wurden die Zellen für 1-2 min abgekühlt. Nach Zugabe von 400 μ l SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C und 225 rpm in den Schüttelinkubator gestellt, um die vorliegende Antibiotika-Resistenz zu exprimieren. Durch Zentrifugation wurde das Volumen des Ansatzes auf 1/3 eingeeengt und anschließend auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Wenn eine Blau/Weiß-Selektion notwendig war, so wurden auf einer Agarplatte ($\varnothing$ 90 mm) vorher 20 μ l 10% X-Gal und 20 μ l 0,5 M IPTG ausgestrichen. Eine Inkubation bei 37°C erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die rekombinanten Kolonien (weiße Kolonien) aufgenommen und in 6 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Ampicillin 100 μ g/ml) bei 37°C, 225 rpm im Schüttelinkubator für 12 h bis zu einer $OD_{600} = 1$ inkubiert.

2.13 Plasmid-Präparationen

Theorie:

Durch das Antibiotikum werden plasmidtragende Bakterienkolonien selektiert und im LB/Ampicillin-Medium vermehrt. Die Plasmid-DNA wird über eine alkalische Lyse aus den Bakterien isoliert. Je nach Kulturvolumen wird von Minipräparationen (3 ml), Midipräparationen (100 ml) oder Maxipräparationen (500 ml) gesprochen. Durch Abtrennung der bakteriellen Endotoxine während der Plasmidpräparation wird die Transfektion in sensitive eukaryotische Zellen deutlich verbessert.

2.13.1 Plasmid-Minipräparation

Material:

- Bakterienkulturen
- Lösung 1, 2 und 3
- TE-Puffer
- RNase A (20mg/ml; Roche)
- Chloroform
- 100% Ethanol
- 80% Ethanol
- NucleoSpinTM-Kit

Methode:

3 ml LB/Ampicillin-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation der Übernachtskultur wurde das *Pellet* in 100 µl Lösung 1 + RNase A resuspendiert (1 min, 16000 g, 4°C). Die RNase A in Lösung 1 baut die bakterielle RNA ab. Anschließend wurde 200 µl Lösung 2 zugesetzt und 2 min inkubiert. Die Lösung 2 bewirkt eine alkalische Lyse der Bakterien sowie eine alkalische Denaturierung der DNA. Außerdem denaturiert das enthaltene SDS die Membrankomponenten. Danach wurde der Ansatz mit 150 µl Lösung 3 und 200 µl Chloroform versetzt und vermischt. Die saure Lösung 3 denaturiert die bakteriellen Proteine sowie die mit Membrankomponenten assoziierte genomische DNA, die durch Zentrifugation eine Interphase bilden. Außerdem wird die Plasmid-DNA durch Lösung 3 renaturiert. Nach der Zentrifugation (16000 g, RT, 5 min) wurde der plasmidhaltige Überstand in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit zwei Volumen 100% Ethanol versetzt und gut gemischt. Die Plasmid-DNA fiel in dem Ethanol als Kaliumsalz aus. Sie wurde abzentrifugiert (16000 g, 4°C, 5 min), mit 80% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und danach in 50 µl Wasser aufgenommen. Die Qualität der erhaltenen Plasmid-DNA reicht aus für Restriktionsspaltungen und PCR-Analysen. Sollte eine Fluoreszenz-Sequenzierung durchgeführt werden, so wurde die isolierte Plasmid-DNA mit dem NucleoSpinTM-Kit (Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers weiter aufgereinigt.

2.13.2 Endotoxin-freie Plasmid-Maxipräparation

Material:

- QIAGEN Endofree Plasmid Kits
- Bakterienkulturen
- Chloroform
- 100% Ethanol
- 70% Ethanol
- Isopropanol

Methode:

Eine Minikultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und 8 h bei 37°C geschüttelt. Einer 100 ml Kultur (LB/Ampicillin-Medium) wurde 250 µl der Vorkultur zugesetzt und ü.N. inkubiert. Die Bakterien wurden in einer Tischzentrifuge (6000 g, 15 min, 4°C) pelletiert, in 10 ml Lösung P1 resuspendiert, in 10 ml Lösung P2 lysiert, 5 min inkubiert und mit 10 ml gekühlter Lösung P3 neutralisiert. Danach wurde das Lysat in eine QIAfilter Cartridge überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde es in ein 50 ml Röhrchen filtriert und es wurden 2.5 ml Lösung ER zugesetzt. Die Plasmidlösung wurde 30 min auf Eis inkubiert und auf die Säule gegeben, welche zuvor mit 10 ml Lösung QBT äquilibriert wurde. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Lösung QC gewaschen. Dann wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Lösung QN von der Säule eluiert. Um eventuelles Säulenmaterial von der DNA-Lösung zu entfernen, wurden ihr einmal 10 ml Chloroform zugesetzt, gut gemischt und 2 min bei RT zentrifugiert (4000 g). Die DNA aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 0.7x Volumen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (4000 g, 4°C, 30 min). Nach dem Waschen des DNA-Pellets mit 5 ml 70% Ethanol wurde die DNA luftgetrocknet und in 500 µl Wasser aufgenommen. Die Ausbeute und Reinheit wurden photometrisch bestimmt.

2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Theorie:

Die Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Wellen im UV-Bereich. Die Absorption der RNA, DNA und der freien Nukleotide hat ihr Maximum bei 260 nm, während die Aminosäuren mit ihren aromatischen Resten bei 280 nm maximal absorbieren. Die Quotienten der Werte von 260 nm und 280 nm sind ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren (DNA: 1.8-2.0; RNA: 2.0-2.2). Eine reine, doppelsträngige DNA-Lösung hat mit $OD_{260}=1$ eine Konzentration von 50 µg/ml, eine einzelsträngige RNA-Lösung 40 µg/ml und eine Oligonukleotid-Lösung 33 µg/ml.

Material:

-Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia)

Methode:

Die konzentrierte Nukleinsäure wurde mit Wasser 1:200 bzw. 1:500 verdünnt. Die Konzentration der Ausgangslösung wurde aus der Absorption bei λ_{260} und λ_{280} unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Art der Nukleinsäure berechnet.

2.15 DNA-Sequenzierung

Theorie:

Das hier beschriebene Verfahren beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden, einzelsträngigen Templates. Das Ausgangsmaterial kann dabei auch in Form doppelsträngiger Plasmid-DNA aus Mini- oder Maxipräparationen vorliegen, deren Stränge vor der eigentlichen Sequenzreaktion denaturiert werden. In den meisten gebräuchlichen Vektoren befinden sich, beidseitig die „multiple cloning site“ (MCS) flankierend, kurze Sequenzen, an die über komplementäre Basenpaarung fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide als Primer binden können. Dabei handelt es sich in der Regel um gängige Primer, z.B. T7, T3, SP6 und Universal-Primer. In allen Sequenzreaktionen, die den gleichen Primer benutzen, werden durch eine DNA-Polymerase also Moleküle synthetisiert, die das gleiche 5'-Ende besitzen. Für jede

Sequenzreaktion werden vier Reaktionsgemische angesetzt, in denen sich alle vier dNTPs befinden. In jedem der vier Gemische befindet sich darüber hinaus jeweils zusätzlich eines der vier ddNTPs; diesen Verbindungen fehlt nicht nur die 2'-, sondern auch die 3'-Hydroxygruppe, so daß jeder Einbau durch die DNA-Polymerase zu einem Kettenabbruch führt. In jedem Ansatz befindet sich somit nach der Reaktion eine Population von DNA-Molekülen, die fluoreszenzmarkiert sind und ein identisches 5'-Ende haben, sich aber in der Länge bis zum jeweils basenspezifischen 3'-Ende hin unterscheiden. Auf einem denaturierenden Gel können die Reaktionsprodukte, nebeneinander aufgetragen, nach ihrer Größe aufgetrennt und durch Laseranregung detektiert werden.

Material:

- SequiTherm Excel™ II (Epicentre Technologies)
- 10% APS
- 100% Ethanol
- 10% Deconex
- 10x HTBE
- Sequagel XR (National Diagnostics)
- Sequagel Complete (National Diagnostics)
- Formamid (GibcoBRL)
- LI-COR 4000 Sequenzierer (MWG Biotech)
- BaseImager IR™-Software (MWG Biotech)
- IRD800-markierte Sequenzierprimer (MWG Biotech)

Methode:

Sequenzierung

Folgende Komponenten wurden in einem 0.5 ml Eppendorf-Gefäß gut durchmischt (Premix):

3.5x SequiTherm Excel™ II-Puffer	7.2	µl
fluoreszenzmarkierter <i>Primer</i> (1 pmolar)	1	µl
Betain (5 M)	2.8	µl
Plasmid-DNA (70 ng pro kb)	3	µl
SequiTherm Excel II DNA-Polymerase	1	µl

In vier 0.5 ml Eppendorf-Gefäßen (A, C, G, T beschriftet) wurden jeweils 2 µl SequiTherm Excel II™-LC Terminations-Mix A, C, G, T vorgelegt. Diesen wurde jeweils 4 µl des Premix zugegeben, gut durchmischt, mit Mineralöl überschichtet und in folgendem Programm auf einem *Thermocycler* gefahren:

95°C	5 min	
95°C	30 sec	} 35 Zyklen
50°C	20 sec	
70°C	1 min	
72°C	10 min	
Pause 20°C		

Nach Zugabe von 3 µl Stop/Loading-Puffer zu jeder Reaktion wurden die Proben eingefroren. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proben für 5 min bei 70°C denaturiert.

Gelplatten vorbereiten

Die Gelplatten wurden mit 10% Deconex und einer Bürste gereinigt. Anschließend wurden sie mit Leitungswasser und dann mit 100% Ethanol gespült und mit fusselfreien Kimwipe™-Tüchern trockenpoliert. Der Zusammenbau der Gelplatten erfolgte nach Angaben des Herstellers (MWG Biotech).

Gießen des Sequenzgels

In einem 100 ml Becherglas wurden angesetzt:

24 ml	Sequagel XR
6 ml	Sequagel Complete
3 ml	Formamid
300 µl	APS (10%)

Die Komponenten wurden durch Schwenken gut durchmischt, das Gel zwischen zwei 41 cm-Glasplatten nach Angaben des Hersteller gegossen und 1 h lang polymerisiert.

Gellauf

Der LI-COR wurde gestartet und die Glasplatten mit dem polymerisierten Gel eingehängt. Es wurde ein halbstündiger Vorlauf mit folgenden Parametern gestartet:

1600 V / 35 mA / 40 W / 51°C / 25 Frames / Motor Speed 3.

Nachdem das Gel die eingestellte Temperatur erreicht hatte, wurde die Optik des Gerätes nach Herstellerangaben kalibriert. Es wurden 1.3 µl der Sequenzierproben aufgetragen und mit den o.g. Parametern ü.N. der Gellauf durchgeführt.

Die Auswertung des Elektropherogramms (*base calling*) erfolgte mit der Baselmager IR™-Software.

2.16 Zellkultur

2.16.1 Kultur

Die Zellen wurden in handelsüblichen Zellkulturflaschen oder 6- oder 12 well Platten bei 37°C in einer Kohlendioxid-haltigen Atmosphäre (5% CO₂) inkubiert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit einer 0,5% Trypsinlösung vom Schalenboden abgelöst und in geringerer Zellzahl in neuem Medium angesetzt (sog. Passage). Wo nötig, wurden Passagen mit fester Zellzahl durchgeführt, dazu wurden Aliquots suspendierter Zellen in einer Neubauer-Kammer ausgezählt.

2.16.2 Lagerung bei -80°C

Zur Lagerung wurden Zellsuspensionen in Kulturmedium mit 10% v/v DMSO und 20% FCS v/v versetzt und schonend gefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.16.3 Zelllinien

- R2C: Ratten Tumor Leydig Zellen

R2C Zellen (ATCC CCL-97) wurden in HAM's F10 kultiviert, 15% v/v Pferdeserum (HS), 2,5% v/v fötales Kälberserum (FCS), 2% v/v L-Glutamin (200mM), sowie 1% v/v Penicillin/Streptomycin (500µg/ml;5000IU/ml) wurden zugesetzt.

- MA-10: Maus Tumor Leydig Zellen

MA-10 Zellen (Ascoli, 1981) wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 4,5 g/l Dextrose) / HAM's F12 Medium (1:1) mit 7,5% v/v Pferdeserum (HS), 2,5% v/v FCS, 1% v/v L-Glutamin (200mM), und 2% v/v Penicillin/Streptomycin (500µg/ml;5000IU/ml) kultiviert.

- COS-7: Affen Nieren Zellen

COS-7 Zellen (ATCC CRL-1651) wurden in DMEM/HAM's F12 Medium (1:1) kultiviert, 10% v/v FCS, 1% v/v L-Glutamin (200mM), sowie 1% v/v Penicillin/Streptomycin (500µg/ml;5000IU/ml) wurden zugesetzt.

- CHO: Hamster Eierstock Zellen

CHO Zellen (ATCC 85050302) wurden in DMEM/HAM's F12 Medium (1:1) mit 5% v/v FCS, 1% v/v L-Glutamin (200mM), und 0,5% v/v Penicillin/Streptomycin (500µg/ml;5000IU/ml) kultiviert.

2.17 Bestimmung der Progesteron-Konzentration mittels ELISA

Theorie:

Bei dem Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) handelt es sich um einen kompetitiven Doppelantikörper-Enzymimmunoassay mit Solid-Phase-Technik. Die immunologische Reaktion findet überwiegend an den mit Goat-Anti-Rabbit-Antikörpern beschichteten Wells der Immuno-Module statt. Der Testablauf lässt sich in drei Schritte unterteilen:

1. Reaktionsschritt (Assay-Inkubation)

Bei diesem Schritt konkurrieren das Progesteron aus der Probe und ein Progesteron-Biotin-Derivat (Tracer) um die Bindung an den zugesetzten Progesteron-Antikörper. Die entstehenden Progesteron- und Progesteron-Biotin-Antikörperkomplexe werden gleichzeitig über den zweiten Antikörper (Goat-Anti-Rabbit) an die Wells gebunden.

2. Reaktionsschritt (HRP-Streptavidin-Inkubation)

Im zweiten Reaktionsschritt wird an Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP-Strep.) zugegeben, die dann selektiv nur von dem biotinhaltigen Immunkomplex (über das Streptavidin) gebunden wird.

3. Reaktionsschritt (HRP-Substrat-Inkubation)

Die über den Immunkomplex an die Wells gebundene HRP setzt das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff um, der nach H_2SO_4 -Zugabe eine gelbe Farbe aufweist. Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an die Wells gebundene Enzymmenge und damit umgekehrt proportional zur gesuchten Progesteron-Konzentration.

Material:

E-FBS-Puffer:	0,1	M	Na_3PO_4 , PH7,0
(bei 4°C)	0,15	M	NaCl
	0,0005	M	EDTA
	0,2 %	(w/v)	BSA
	0,01%	(v/v)	Thimerosal
Substratpuffer:	4,8	M	Na-Acetat
	0,24	M	Citronensäure, Lagerung: bei RT
HRP-Substratlösung:	25 ml		H_2O (RT)
	500 µl		Substratpuffer (s.o.)
	500 µl		H_2O (0,2%, s.u.)
	500 µl	0,5%	TMB (s.u.), TMB-Lösung

unter Mischen

zugeben, die Mischung wird im Dunkeln bei RT
maximal für 2 h gelagert.

Waschpuffer: 0,02% (v/v) Tween 20 in H₂O
0,5% (w/v) NaCl; Lagerung bei 4°C

Progesteron-Antiserum 1:50.000 in E-NAP-Puffer + 0.0005 % Metanilgelb; bei
4°C

Progesteron-11 α - Biotin (Tracer) 40 fMol/ml in E-NAP-Puffer + 0.0005 % Bromphenolblau;
bei 4°C

Progesteron-Standards:

Stockstandard: Lyophilisat, Lagerung bei 4°C

Stocklösung (B) 3.402 μ g/ml in E-PBS-Puffer,
Ein lyophilisiertes Aliquot in exakt definiertem Volumen
H₂O rüclösen. (das exakte Volumen ist den Angaben
auf dem Karton der jeweiligen Charge zu entnehmen.);
Haltbarkeit bei 4°C mehr als 3 Monate

HRP-Streptavidin Lösung: 167 μ g/ml in E-PBS-Puffer; 100 μ l Aliquots; Lagerung bei
4°C

H₂O₂, 0,2 % (v/v) in H₂O: Lagerung bei RT und in Dunkelheit

TMB, 0,5 % (v/v) in DMSO, Lagerung bei RT und in Dunkelheit

2M H₂SO₄ Lagerung bei RT

Immuno-Module: (Nunc); mit Goat-anti-Rabbit- γ -Globulin beschichtet.

Rahmen und Deckel: (Nunc)

Methode:

Zuerst wurden verschiedene Verdünnungen der Proben hergestellt. Bei Messung von Progesteron in Zellkulturen und Medien bietet es sich an, die Standards im gleichen Kulturmedium (+ 0.01 % Thimerosal) anzusetzen. Sowohl der Standard als auch die Proben wurden mit dem E-NAP-Puffer verdünnt. Die Reaktionen wurden nach dem folgenden Pipettierschema durchgeführt:

Pipettierschema:

Position	Probe	E-NAP-Puffer	Medium	Standard	Probe	Prog.-Biotin	Anti-körper
		μl	μl	μl	μl	μl	μl
A 1/2	NSB	100	50	-	-	50	-
B 1/2	Bo	-	-	50		50	100
C 1/2	0.14 ng/ml	-	-	50	-	50	100
D 1/2	0.42 ng/ml	-	-	50	-	50	100
E 1/2	1.26 ng/ml	-	-	50	-	50	100
F 1/2	3.78 ng/ml	-	-	50	-	50	100
G 1/2	11.34 ng/ml	-	-	50	-	50	100
H 1/2	34.02 ng/ml	-	-	50	-	50	100
A 3/4	Probe	-	-	-	50	50	100

Assayinkubation: Je nach Anzahl der Proben wurden die benötigten Immuno-Module auf einen Rahmen gesteckt und mit 375 μl E-NAP-Puffer für 2 min bei RT inkubiert. Die Wells wurden durch Dekantieren entleert und die Platte mehrmals auf Zellstoff kräftig ausgeklopft.

Die Assayplatte wurde mit Assaykomponenten wie folgt beschichtet und 2 Stunden bei RT und anschließend 30 min bei 4-6°C in einer H₂O-gesättigten Kammer in Dunkelheit ohne Schütteln inkubiert.

HRP-Streptavidin-Inkubation: Kurz vor Beendigung der Assay-Inkubation wurde die HRP-Streptavidinlösung mit kaltem E-PBS-Puffer angesetzt und bis zur Verwendung kalt gehalten. Die Assayplatte wurde entleert und mehrmals auf Zellstoff kräftig ausgeklopft.

Pro Well wurden 200µl frische HRP-Streptavidinlösung zügig hineinpipettiert und 30 min inkubiert (4°C, Dunkelheit).

Waschschritt: Die Assayplatte wurde entleert und mehrmals auf Zellstoff ausgeklopft. Pro Well wurde 400 µl kalter Waschpuffer pipettiert und 1 min stehen gelassen. Dann wurde die Assayplatte wieder entleert und auf Zellstoff kräftig ausgeklopft. Dieser Waschvorgang wurde 3x in wechselnder Pipettierrichtung wiederholt, bevor die Platten bei RT für 5 min temperiert wurden.

Substratinkubation: Nach zügigem Pipettieren von 250 µl HRP-Substanzlösung pro Well wurde die Platte für 40 min bei RT in in H₂O-gesättigter Kammer, im Dunkeln inkubiert, wobei ein blauer Farbumschlag zu beobachten ist.

Reaktionsstop und OD-Messung: Die Reaktion wurde nach Zugabe von 50 µl H₂SO₄ /Well gestoppt, wobei die blaue Farbe zu gelber Farbe umgewandelt wird. Die Intensität der gelben Farbe wird bei 450 nm gemessen. Nach Messung der OD wurden die Platten über die Software „EasyFIT“ ausgewertet. Zunächst wurde von der Software der Wert für die unspezifische Bindung (NSB) von allen Messwerten abgezogen ($OD_{(B)} - OD_{(NSB)}$). Im nächsten Schritt wurden diese Extentionswerte der Standards (linear) gegen die Konzentration dieser Standards (log) als Graph aufgetragen. Dann wurde durch „EasyFIT“ eine sigmoidale Ausgleichskurve, berechnet nach einer 4-Parameter-Formel, durch die Punkte gelegt. Die Konzentration der Proben konnte so durch das Programm über die OD-Werte der Proben an der Standardkurve errechnet werden. Für weitere Auswertungen wurde auf das Programm „Prism“ zurückgegriffen. Zunächst wurde der Wert $\%B/B_0$ jeder Probe über die OD mit Hilfe folgender Formel errechnet:

$$\%B/B_0 = \frac{OD_{(B)} - OD_{(NSB)}}{B_0} \times 100$$

wobei $B_0 = OD_{(Nullstandard)} - OD_{(NSB)}$ ist und B eine beliebige Probe bezeichnet.

„Prism“ stellte ähnlich wie „EasyFIT“ einen Graph der $\%B/B_0$ -Werte der Standards gegen ihre Konzentration auf. Auch hier wurde über eine 4-Parameter-Formel eine sigmoidale Ausgleichskurve errechnet.

2.18 Transfektion

Theorie:

Die Methode, Donor-DNA von außen in Rezipientenzellen zu bringen, nennt man Transfektion. Durch verschiedene chemische (DEAE-Dextran, Calciumphosphat, künstliche Liposomen) oder physikalische Verfahren (direkte Mikroinjektion, Elektroporation) wird DNA in die Zelle übertragen. Im Allgemeinen wird ein Promotor oder eine Enhancer-Sequenz an das 5'Ende eines Reportergens in einem Reporter-Gen-Expression-Vektor subkloniert und in die eukaryotischen Zellen transfiziert. Die Transkription des Reporter-Gen ist direkt abhängig von der Aktivierungsfähigkeit des Promotors oder Enhancers und ist in Korrelation zu der Menge von Reporter-mRNA, der Protein-Expression und der enzymatischer Aktivität des Reporter-Proteins.

2.18.1 Transfektion mittels Liposomen

Durch ihre Ähnlichkeit mit zellulären Membranen sind Liposomen besonders gut geeignet, schlecht membrangängige Stoffe wie z.B. DNA-Moleküle in Zielzellen einzuschleusen (Felgner *et al.*, 1987). Wegen ihrer vergleichsweise hohen Effizienz wurde diese Methode zur transienten Transfektion von MA-10 Zellen, R2C Zellen, CHO Zellen und COS-7 Zellen eingesetzt.

Material:

- LipofectAMIN 2000 (Invitrogen)
- Medium (Gibco)
- PBS (Gibco)
- 5x Passive Lysis Puffer (Promega)

Methode:

Die Transfektion wurde mit LipofectAMINE 2000-Reagens (Invitrogen) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. 2×10^5 Zellen/ Well der zu transfizierenden Zellart wurden in einer 12-Well-Platte mit 1ml Medium angesetzt. Je 6µg Promotor-Luciferase Konstrukt, 1µg SF-1 Expressions-Vektor, und 1µg Beta-Galactosidase Expressions-Vektor als Kontrolle für die Transfektionseffizienz in 100 µl Medium (ohne

Serum und Penicillin/Streptomycin) wurde in einem Eppendorf-Röhrchen mit 10 µl LipofectAMINE 2000-Reagenz in 100 µl Medium (ohne Serum und Penicillin/Streptomycin) versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde mit 800 µl Medium (ohne Serum und Penicillin/Streptomycin) auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und auf eine mit Medium (ohne Serum und Penicillin/Streptomycin) gewaschene Zellkultur pipettiert. Nach sechsstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Transfektionslösung von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Kulturmedium über Nacht inkubiert.

Im Fall der Stimulation mit Dexamethason wurde den Zellen nach dem Absaugen der Transfektionslösung 10^{-7} M Dexamethason (Firma: Sigma, # D4902) oder Kontrollvehikel zugesetzt und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, je 200 µl Passive Lysis Buffer / Well zugesetzt, bei Raumtemperatur 15 min geschüttelt und anschließend abgekratzt. Das Lysat wurde in Eppendorf- Tubes transferiert und 10 sek bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Tube transferiert.

2.19 „Reporter gene assays“

2.19.1 Luciferase-Messung

Theorie:

Alle pGL3 Vektoren enthalten Luciferase-cDNA als Reporter-Gen, bezeichnet durch Luc+. Deshalb kann transkriptionelle Aktivität eines Promoters oder Enhancers subkloniert in einen pGL3 Vektor als enzymatische Aktivität von Luciferase gemessen werden.

Bei der katalytischen Oxidation des Luciferins durch Luciferase wird Luciferyl-Koenzym A als Zwischenprodukt gebildet. Beim Zerfall des Zwischenproduktes kommt es zur Aussendung von Photonen. Die Umsatzrate der Lumineszenzreaktion kann im Luminometer gemessen werden.

Material:

- | | |
|--|------------------------|
| -Luciferase reporter gene assay system | (Promega) |
| -Luminometer Tube | (55476, Sarstedt) |
| -Luminometer | (Lumat 9501, Bertrand) |

Methode:

20 µl des Lysats wurde zu 100 µl Luciferase Assay Reagent (Promega) in einem Luminometer-Tube pipettiert. Sofort danach wurde die Lichtemission der Reaktion 10 sec im Luminometer gemessen.

2.19.2 β -Galactosidase-Messung

Theorie:

pCMV-lacZ, das in die Zellen kotransfiziert wird, ist ein Reporter-Vektor für cDNA von β -Galactosidase-Gen (lacZ). Er wird als Positiv-Kontrolle für die Transfektionseffizienz bei den Säuger-Zellen benutzt. Abgesehen von der bekannten Spaltung des X-gal Moleküls ist die β -Galactosidase fähig bei neutralem pH, das Galacton™-Substrat zu deglycosylieren.

Material:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------|
| -Tropix Galacto-Light™ assay system | (PE Biosystems) |
| -Luminometer Tube | (55476, Sarstedt) |
| -Luminometer | (Lumat 9501, Bertrand) |

Methode:

Zuerst wurde 2 µl des Zelllysats in Luminometer Tube mit 200 µl 1:100 verdünntem Galacton™ –Substrat eine Stunde bei RT inkubiert. Dann wurde 300 µl von Light Emission Accelerator pro Röhrchen zugegeben. Sofort danach wurde die Licht-Emission für 5 sec im Luminometer gemessen.

2.20 „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA)

Theorie:

Die Methode des EMSA wird zur Untersuchung der Bindung von Kernproteinen spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt. Erforderlich ist zum einen die Gewinnung löslicher Kernproteine aus Zellkernen oder gereinigten Transkriptionsfaktoren, zum anderen die radioaktive Markierung einer DNA-Sequenz (durch Restriktionsverdau

gewonnene Promotorabschnitte oder synthetische doppelsträngige Oligonukleotide). Die Kernproteine und das radioaktiv markierte Promotorfragment werden miteinander inkubiert und auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Wird eine DNA-Sequenz vom Kernprotein spezifisch gebunden, verringert sich die Wandergeschwindigkeit des Komplexes im Gel im Vergleich zur Wandergeschwindigkeit der ungebundenen DNA. Es entstehen verschiedene DNA- Banden, welche sich mittels Autoradiographie auf einem Röntgenfilm dokumentieren lassen.

Material:

-Acrylamid 40%:	National Diagnostics
-Ammoniumpersulfat (APS):	Gibco BRL
-Tetramethylethyldiamin (DMEM):	Sigma
-Ficoll:	Sigma
-Dithiothreitol (DTT):	Gibco BRL
-Polydeoxyadenylic- Thymidilic Acid (dAdT):	Sigma
-MgCl ₂	Sigma
-BSA:	Biolabs
-„steroidogenic factor-1 (SF-1)“	in vitro translatiert (Kap. 2.20.2)
-Spannungsquelle:	Pharmacia
-Geltrockner SGD 2080:	Savant
-Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor:	Amersham
-Röntgenfilm Biomax:	Kodak

Lösungen

- Bindungspuffer:	10 mM	Hepes, pH 8
	0,5 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
- Puffer R	2,5 µl	10 x Bindungspuffer
	2,5 µl	5% BSA
	3,5 µl	87% Glycerol

	1 µl	25 mM EDTA, pH 8
	0,5 µl	50 mM DTT
-TBE Puffer	0,45 M	Tris-Borat
	10 mM	EDTA, pH 8,3

Methode:

2µl Kernprotein-Extrakt oder *in vitro* Translationsansatz wurden mit 10 µl Puffer R, 5 µl Ficoll (20 %), 1 µl Polydeoxyadenylic- Thymidilic Acid (1 µg/µl), 0,25 µl 1 M MgCl₂ versetzt und ad 23 µl mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die entsprechende Menge markiertes DNA-Fragment (2µl/Reaktion) hinzugefügt wurde. Es folgten 30 min weiterer Inkubation bei Raumtemperatur, der Ansatz wurde auf ein 4 %iges Polyacrylamidgel in 0,5 x TBE- Puffer geladen und die Komplexe bei 220 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf Whatman-Papier übertragen, 1 bis 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet und über Nacht auf Röntgenfilm exponiert. Zur Charakterisierung der vorhandenen Kernproteine wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Spezifisch bindende, nicht markierte doppelsträngige Oligonukleotide mit bekannter Sequenz fungierten als Konkurrenten zu den markierten Promotorfragmenten. Entsprach die Sequenz der Oligonukleotide der Bindungsstelle eines vorhandenen Bindungsproteins, konnte das markierte DNA-Fragment nicht mehr gebunden werden. Dadurch wurde die diesem Proteinkomplex entsprechende Bande im Autoradiogramm kompetiert.

2.20.1 Herstellung von Kernproteinen aus Zellen

Zur Gewinnung der löslichen Kernproteine werden nach der Methode von Andrews und Faller (1991) zunächst die Zellmembranen, dann die Kernmembranen lysiert.

Material:

- 75 cm² Nunc Kultur Flasche von Zellen (MAO-10 oder R2C Zelllinien)
- Phosphate buffered Saline (PBS)

Puffer A: 10 mM Hepes- KOH pH 7,9
1,5 mM MgCl₂
10 mM KCl
0,5 mM DTT
0,2 mM PMSF

Puffer C: 10 mM Hepes- KOH pH 7,9
24% Glycerol
420 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA
0,5 mM DTT
0,2 mM PMSF

Methode:

Nach Erreichen einer Zellzahl zwischen 5×10^5 und 10^7 pro Kulturflasche wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Tube transferiert, und die Zellen durch zehnstündige Zentrifugation bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 sec. Vortexen wurde 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 20 bis 100 µl Puffer C resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand (Zellkernproteine) aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.20.2 In vitro-Translation des klonierten Transkriptions-Faktors SF-1

Es wurde das TnT-System (Promega) verwendet, das durch die Verwendung prokaryontischer RNA-Polymerasen und eines eukaryotischen Proteinsynthesystems die Transkription und Translation von Plasmid-DNA in einem Reaktionsansatz erlaubt:

Material:

Rabbit reticulocyte lysate	(Promega)
TnT Puffer	(Promega)
T7 RNA polymerase	(1U/μl Promega)
amino acid mix minus Methionine	
amino acid mix minus Leucine	
HPRI (Human Placenta Ribonuclease inhibitor)	(40U/μl Promega)
Plasmid-DNA (SF-1 Expressionsvektor)	(Stedronsky <i>et al.</i> , 2002)

Methode:

Die Reaktion wurde nach folgendem Pipettierschema auf Eis angesetzt:

TNT-Reaktion:	25μl	Rabbit reticulocyte lysate
	2μl	TnT Puffer
	1μl	T7 RNA polymerase
	1μl	amino acid mix minus Methionine
	1μl	amino acid mix minus Leucine
	1μl	HPRI ribonuclease inhibitor
	1μl	Plasmid-DNA (=1μg)
	ad 50 μl	Wasser

Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 30°C inkubiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.20.3 Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Es wurden DNA-Sequenzen mit den SF-1 Bindungstellen SF-1 A, B, und C, sowohl von der Ratte als auch von der Maus, als Oligonukleotide synthetisiert (**Kapitel 2.2**) und zu Doppelsträngen hybridisiert.

Material:

Sense Oligonuklotid	(Metabion)
Antisense Oligonuklotid	(Metabion)
NaCl	(Sigma)

Methode:

Für die Hybridisierung wurden je 20µg der Oligonuklotide eingesetzt. Die Reaktion wurde nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Sense Oligonuklotide (zB. rSF-1A-s)	20µg
Antisense Oligonuklotid (zB. rSF-1A-as)	20µg
NaCl	180 mM
Wasser	ad 40µl

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 96°C inkubiert. Dann wurde der Reaktionsansatz ü.N. im Heizblock bis 37°C gekühlt.

2.20.4 Radioaktive Endmarkierung von DNA-Fragmenten

Theorie:

5'-Überhänge doppelsträngiger DNA-Fragmente können mit dem Klenow-Enzym in Anwesenheit von radioaktiv markiertem [α -³²P]-dCTP aufgefüllt und damit markiert werden.

Material:

- 1 mM dATP, dGTP, dTTP
- 10x NEB2 Puffer
- [α -³²P]dCTP (Amersham Redivue; 3000 Ci/mmol)
- Klenow-Enzym (2 U/µl; Roche Mannheim)
- NickTM Column Sephadex G-50 (Pharmacia)

Methode:

Als spezifische DNA-Bindungssequenz wurden entweder Ins13-Promotorfragmente, (206 bp, PCR Produkt mit Primerpaar Props3 /Propr1 für den Ratten- und Primerpaar mRLFss-SacI/mRLFaa-BglII für den Maus Promotor) (**Kapitel 2.6.2.2 und 2.6.3**) oder doppelsträngige Oligonukleotide mit SF-1 Bindungsstellen (**Kapitel 2.20.2**) verwendet. Als Kontrolle wurde Human Oxytocin Hormon Response Element (hOT-HRE) aus dem menschlichen Oxytocin-Promotor, das eine gut charakterisierte SF-1 Bindungsstelle besitzt, verwendet (Stedronsky *et al.*, 2002).

10 ng DNA-Fragmente wurden mit 2 µl dNTP's, 1 µl Klenow-Enzym, 2 µl NEB2 Puffer, 1,5 µl [α -³²P]dCTP und doppelt destiliertem Wasser ad 20 µl versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl EDTA gestoppt. Es wurde eine Aufreinigung der markierten Sonde mit einer Sephadex-Säule vorgenommen, wobei das nicht eingebaute [α -³²P]dCTP schneller von der Säule eluiert wird (Gelfiltration). Zuerst wurde die Sephadex Säule mit 3 ml TE-Puffer äquilibriert und anschließend die radioaktive Sonde auf die Gelmatrix aufgetragen. Dann wurden 2x 400 µl TE-Puffer über die Säule gegeben, die zweite Fraktion (markierte Sonde) gesammelt und 2 µl der Fraktion im Beta-Szintillationszähler gemessen. Die spezifische Aktivität lag meistens in einem Bereich von 2×10^6 - 9×10^6 cpm/pmol.

2.21 Immunhistochemie

Theorie:

Bei der Immunhistochemie wurden die gesuchten Proteine mit Antikörpern spezifisch und direkt auf Gewebeschnitten nachgewiesen. Es wurde eine enzymatische Farbreaktion verwendet, die darauf beruht, dass die Präparate nach der Inkubation mit dem spezifischen Antiserum, mit einem sekundären Biotin-markierten Antikörper und danach mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin inkubiert werden. Durch Zugabe eines Substrates erfolgte eine Farbreaktion, so dass positive Zellen im mikroskopischen Bild gefärbt erscheinen.

Material:

Für die Schnittpräparate wurden ausschließlich Paraffinschnitte eingesetzt, die wie für die *in situ*-Hybridisierung beschrieben, präpariert wurden.

-Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6)

Methode:

Es wurde wie folgt vorgegangen:

Vorgang	Lösung	Temperatur	Dauer	Anmerkung
Entparaffinieren	Xylol	20°C	10 min	2x
	Ethanol 96%	20°C	5 min	
	Ethanol 70%	20°C	5 min	
Unterdrückung endogener Peroxidaseaktivität	3% H ₂ O ₂	20°C	45 min	
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	2x
Blockieren	10% Kaninchenserum in Tris-Puffer + Aurion BSA-C (0.5%)	20°C	60 min	
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	3x
primärer Antikörper spezifischer erster Anti- körper in 1% Kaninchen- serum in Tris-Puffer		4°C	ü.N.	
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	
sekundärer Antikörper	Biotin-markiertes Anti-Ratte IgG aus Kaninchen 1:500 in 0.5% Kaninchenserum in Tris-Puffer	20°C	60 min	
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	3x
PAP-Komplex	Peroxidase-Antiperoxidase Aus Ratte in 0.5% Kanin- chenserum in Tris-Puffer	20°C	60 min	
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	3x

sekundärer Antikörper	Biotin-markiertes Anti-Ratte IgG aus Kaninchen 1:500 in 0.5% Kaninchenserum in Tris-Puffer			
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	3x
PAP-Komplex	Peroxidase-Antiperoxidase Aus Ratte in 0.5% Kaninchenserum in Tris-Puffer	20°C	60 min	
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	3x
ABC-Komplex	2 Tropfen Lösung A (Streptavidin) + 2 Tropfen Lösung B (biotinylierte HRP) in 10 ml Tris-Puffer	20°C	60 min	
Waschen	Tris-Puffer	20°C	10 min	3x
DAB-Substratlösung	1 Tablette auf RT bringen, in 10 ml Tris-Puffer aufnehmen, sterilfiltrieren, dann + 80 µl H ₂ O ₂	20°C	30 min	abstoppen in Wasser
AEC-Substratlösung	2 ml NaAc (0.1 M, pH 5.2) + 1 Tropfen AEC, mischen, + 1 Tropfen H ₂ O ₂	20°C	30 min	abstoppen in Wasser
Hämatoxylin-Färbung	Hämatoxylin	25°C	1 min	Färbung der Zellkerne
Eindeckeln in Faramount™				

Da die für den spezifischen Antikörper die optimale Antikörperkonzentration (minimale Hintergrundreaktion bei maximaler Signalstärke) bei jedem Gewebe neu bestimmt werden muss, wurden in der Regel mehrere Verdünnungen parallel untersucht (1:50 / 1:100 / 1:200 / 1:500 / 1:1000).

2.22 Liste der verwendeten Lösungen

LB Medium/Liter

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	auf 1 l
pH auf 7.0 einstellen, autoklavieren.	
Für Agar-Platten 15 g Agar hinzugeben	

10x PBS/Liter

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	26.8 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
H ₂ O	auf 800 ml
pH auf 7.4 einstellen, dann mit H ₂ O	
auf 1 l auffüllen, autoklavieren.	

50x TAE/Liter

Tris-Base	2 M
Eisessig	57.1 ml
EDTA	0.1 M
H ₂ O	auf 1 l
pH auf 8.5 einstellen, autoklavieren.	

10x TBE/Liter

Tris-Base	0.89 M
Borsäure	0.89 M
EDTA	20 mM
autoklavieren.	

10x HTBE/Liter

Tris-HCl	1.34 M
Bosäure	1.34 M
EDTA	20 mM

TE

Tris-HCl, pH 7.0	10 mM
EDTA	1 mM

Denaturierungslösung

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

Neutralisierungslösung

NaCl	1.5 M
Tris-Base, pH 7.2	0.5 M
EDTA	1 mM

T4 Polynukleotidkinase-Puffer (10x)

Tris-HCl, pH 7.6	700 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	50 mM

dNTP-Mix

dATP, dTTP, dCTP, dGTP	je 10 mM
---------------------------	----------

Plasmid-Miniprep

Lösung 1

Tris-Base, pH 8.0	25 mM
Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	1 mg/ml

Lösung 2

NaOH	0.2 M
SDS (w/v)	1 %

Lösung 3

Kaliumacetat	3 M
Eisessig	11.5 %

EndoFree Plasmid-Maxiprep

Lösung P1

Tris-Base, pH 8.0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	1 mg/ml

Lösung P2

NaOH	0.2 M
SDS (w/v)	1 %

Lösung P3

Kaliumacetat	3.1 M
--------------	-------

Lösung ER

Zusammensetzung von QIAGEN nicht veröffentlicht

Lösung QBT

NaCl	0.75 M
MOPS	0.5 M
Isopropanol	15%
Triton X-100	0.15%

Lösung QC

NaCl	1.0 M
MOPS	0.5 M
Isopropanol	15%

Lösung QN

NaCl	1.6 M
MOPS	0.5 M
Isopropanol	15%

10x Ladepuffer

Glycerin	50%
Bromphenolblau	0.25%
Xylencyanol	0.25%

20x MOPS

MOPS pH 7.0	0.2 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

TSS

PEG-8000	10% (w/v)
DMSO	5% (w/v)
MgSO ₄	50 mM
in LB-Medium, pH 6.5	

5x Ligase-Puffer

Tris-HCl, pH 7.6	250 mM
MgCl ₂	50 mM
ATP	5 mM
DTT	5 mM
PEG-8000 25% (w/v)	7.5 g

10x Taq-PCR-Puffer

Tris-Base, pH 8.75	0.2 M
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 M
MgSO ₄	20 mM
Triton X-100	1%
BSA	1 mg/ml

2.23 Firmenverzeichnis

AGS, Heidelberg
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Beckman, München
Clontech, San Diego, USA
Dako, Hamburg
Dianova, Hamburg
Eastman Kodak, Braunschweig
Fluka, Deisenhofen
Fuji, Düsseldorf
Genomed, Bethesda, USA
GibcoBRL, Eggenstein
Graph Pad Inc. San Diego, CA
Heraeus, Karlsruhe
Invitrogen, Leek, Niederlande
Macherey-Nagel, Düren
Merck, Darmstadt
Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
MWG, Ebersberg
New England Biolabs, Schwalbach

Qiagen, Hilden
Roche, Mannheim
Roth, Karlsruhe
Sarstaedt, Nürnberg
Schott, Wertheim
Sigma, Deisenhofen
Stratagene, Heidelberg

3 Ergebnisse

3.1 Expression des INSL3-Proteins im Hoden der Ratte

3.1.1 *Ins/3*-Analyse mittels RT-PCR

Um sehr geringe Mengen des *Ins/3*-Transkripts zu erfassen, wurde die RT-PCR-Technik angewendet. Gesamt-RNAs wurden aus verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien der Ratte isoliert (**Kap. 2.4**) und in einzelsträngige cDNAs umgeschrieben (**Kap. 2.5**). Anschließend wurden in der RT-PCR einzelsträngige cDNAs als Template und die Ratten-spezifische Primer-Kombination rRLFEX1-1s und rRLF-3' (**Kap. 2.2**) eingesetzt. Die Primer für diese PCR waren so ausgewählt, dass der Bereich beider Exons mit der Region der Spleißstelle amplifiziert wurde. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1x (95°C 5 min.), 2x (95° 1min , 61° 45 sec, 72° 3 min)
2x (95° 1 min, 59° 45 sec, 72° 3 min)
2x (95° 1 min, 57° 45 sec, 72° 3 min)
2x (95° 1 min, 55° 45 sec, 72° 3 min)
30x (95° 1 min, 53° 45 sec, 72° 3 min), 1x (72°C 1h), 25°

Die RT-PCR Analyse zeigte neben dem erwarteten PCR-Produkt (596 bp) überraschenderweise ein zweites, längeres Produkt (662 bp).

Für eine weitere Charakterisierung wurden beide RT-PCR Produkte in den pGEM-T Easy-Vektor kloniert und sequenziert. Nach der Sequenzierung wurde das unbekannte PCR-Produkt als die cDNA einer *Ins/3*-Spleißvariante identifiziert. In (**Abb. 3.1-1**) sind die Sequenzen der *Ins/3*-cDNA und der cDNA der *Ins/3*-Spleißvariante gegenübergestellt. Beide *Ins/3*-Transkripte besitzen das gleiche Startkodon, aber unterschiedliche Stopkodons. Das *Ins/3*-Transkript der alternativen Spleißvariante weist 100%ige Homologie in den DNA-Sequenzen des Signalpeptids und der B-Domäne des *Ins/3*-Transkripts auf und kodiert dann für eine neue C-terminale Sequenz von 13 Aminosäuren (**Abb. 3.1-1**).

```

tgctcctgccaccATGCACGCACTGCTGCTACTGCTGCTCCTGGCTCTAGGGTCCGCGCTGCGCTCCCCGAGCCCCGGAGGCGCGC Insl3cDNA
|||||
tgctcctgccaccATGCACGCACTGCTGCTACTGCTGCTCCTGGCTCTAGGGTCCGCGCTGCGCTCCCCGAGCCCCGGAGGCGCGC Spleiß
M H A L L L L L L L A L G S A L R S P Q P P E A R
M H A L L L L L L L A L G S A L R S P Q P P E A R
<-----Signal-Peptid-----> <-----

GCCAAGCTCTGTGGTCACCACCTGGTGCGTGCGCTGGTGCGGGGTGTGCGGTGGCCCGCTTGGTCACCCGAGGCCACGCAGCCTGTGGA Insl3cDNA
|||||
GCCAAGCTCTGTGGTCACCACCTGGTGCGTGCGCTGGTGCGGGGTGTGCGGTGGCCCGCTTGGTCACCCGAGGCCACGCAGCCTGTGGA Spleiß
A K L C G H H L V R A L V R V C G G P R W S P E A T Q P V D
A K L C G H H L V R A L V R V C G G P R W S P E A T Q P V D
-----B-Peptid-----> <-----
↓
CACCCGCGACC-----GGGAGCTGCTGC Insl3cDNA
|||||
CACCCGCGACCGTGAGTGGGGACAGGCGGGGCGGATGGATACGCATGGATAATCAAGTAGGAAGACGCTGGCATAGTGGGAGCTGCTGC Spleiß
T R D - - - - - R E L L
T R D R E W G Q A G R M D T H G * - - - - -
-----C-Peptid-----

AGTGGCTGGAGCAACGACATCTCCTGCACGCGCTCGTGCCGATGCGGATCCCGCGCTAGACCCGGACCCGCGCTGGACCCGCAGCTT Insl3cDNA
|||||
AGTGGCTGGAGCAACGACATCTCCTGCACGCGCTCGTGCCGATGCGGATCCCGCGCTAGACCCGGACCCGCGCTGGACCCGCAGCTT Spleiß
Q W L E Q R H L L H A L V A D A D P A L D P D P A L D P Q L
- - - - -
-----C-Peptid-----

CCTCACCAGGCTTCTCAGCGCCAGCGCCGAGTGTGGCCACCAACGCTGTGCACCGCTGCTGTCTCACTGGCTGCACCCAGCAAGACCT Insl3cDNA
|||||
CCTCACCAGGCTTCTCAGCGCCAGCGCCGAGTGTGGCCACCAACGCTGTGCACCGCTGCTGTCTCACTGGCTGCACCCAGCAAGACCT Spleiß
P H Q A S Q R Q R R S V A T N A V H R C C L T G C T Q Q D L
- - - - -
-----> <-----

TTTGGGTCTGTGTCCCACTGAaggattgtagggtcaggtggtgtgtgtcaattattccccacctacagctgtgccaatgaaacaccc Insl3cDNA
|||||
TTTGGGTCTGTGTCCCACTGAaggattgtagggtcaggtggtgtgtgtcaattattccccacctacagctgtgccaatgaaacaccc Spleiß
L G L C P H *
- - - - -
----A-Peptid----->

ccggattgccttggaggatccctagttattcatagatcccagaaaccaaggaccacaggtcctgtccccaggaggagcccatcatgacc Insl3cDNA
|||||
ccggattgccttggaggatccctagttattcatagatcccagaaaccaaggaccacaggtcctgtccccaggaggagcccatcatgacc Spleiß

tgtgccacctcctccctgtgggcaaa-cagtctaaataaaaaagcaacttga-poly(A) Insl3cDNA
|||||
tgtgccacctcctccctgtgggcaaa-cagtctaaataaaaaagcaacttga-poly(A) Spleiß

```

Abb. 3.1-1: Sequenz-Vergleich zwischen der Ratten *Insl3*-cDNA und der Spleißvariante. Gezeigt sind die 5'- und die 3'-nicht translatierte Region (UTR, Kleinbuchstaben), das offene Leseraster (ORF, Großbuchstaben), der Exon1/Exon2-Übergang (Pfeil), das Polyadenylierungs-Signal in der 3'-UTR (unterstrichen), die Translation in Aminosäuresequenzen mit der Angabe der einzelnen Abschnitte (Signalpeptid, B-Peptid, C-Peptid, A-Peptid) und die Stopkodons (Sterne). Die Rezeptorbindungsdomäne ist durch einen Rahmen markiert. Homologe Basen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet.

Anscheinend ist die Expression der Spleißvariante im Ratten-Hoden immer deutlich niedriger als die des regulären Produkts (**Abb. 3.1-2**). Wie frühere Studien mit Hilfe von Northern-Hybridisierung auf *InsI3*-Transkripten von Mäusen (Balvers *et al.*, 1998) und Ratten (Pusch *et al.*, 1996) zeigten, hat die beobachtete niedrigere Konzentration von beiden Produkten am Tag 10 wahrscheinlich mit dem Übergang von der fötalen Leydig-Zell-Population zu der postpuberalen reifen Leydig-Zell-Population zu tun. Anscheinend bleibt das Verhältnis der Mengen der beiden Transkripte bei der Hoden-Entwicklung aber immer gleich.

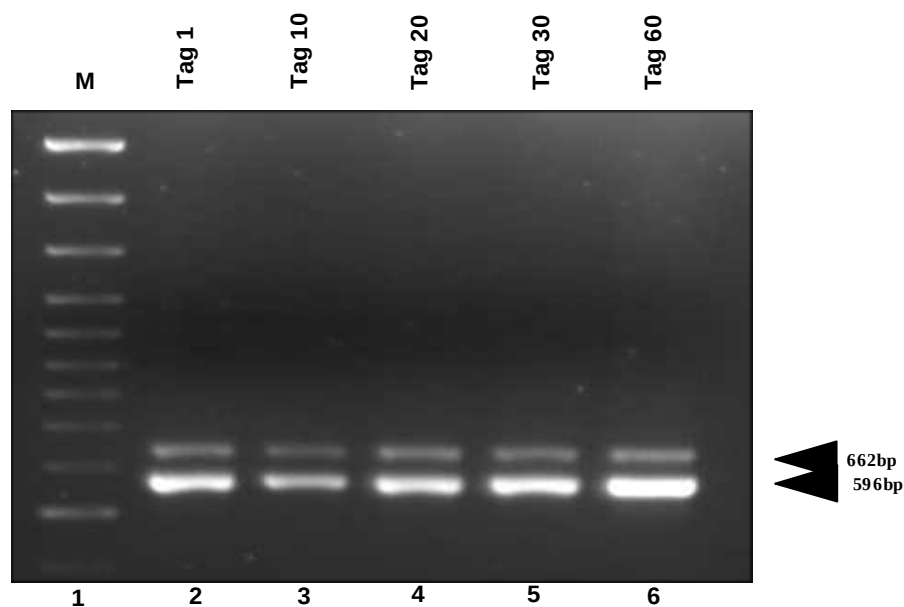


Abb. 3.1-2: Die RT-PCR-Analyse der Ratten *InsI3*-Transkripte in der RNA des ganzen Hodens aus verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien. *InsI3*-spezifische RT-PCR Produkte aus mRNA verschiedener postnataler Entwicklungsstadien der Ratte (**Tag 1** bis **Tag 60**) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Das 596bp PCR Produkt repräsentiert das funktionelle Transkript, das 662bp PCR Produkt die Spleiß-Variante. **M:** Größenmarker (100 bp-Leiter)

3.1.2 INSL3-Protein-Analyse mittels Immunhistochemie

Um das *InsI3*-Expressionsmuster in den Hoden von Wildtyp-Ratten auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Schnitte aus verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien mit dem in Ratten hergestellten Antikörper R63 immunhistochemisch untersucht. Nur Leydigzellen, nicht aber andere Zell-Typen des Hodens, ließen sich anfärben. Der

Expressionsort für das gebildete Protein war eindeutig auf die Leydig-Zellen im Interstitium ab Tag 25 beschränkt. Zu den perinatalen Zeitpunkten (Tag 1 und Tag 5) waren im Gegensatz zur InsI3-mRNA keine Signale in allen testikulären Kompartimenten detektierbar (**Abb. 3.1-3**).

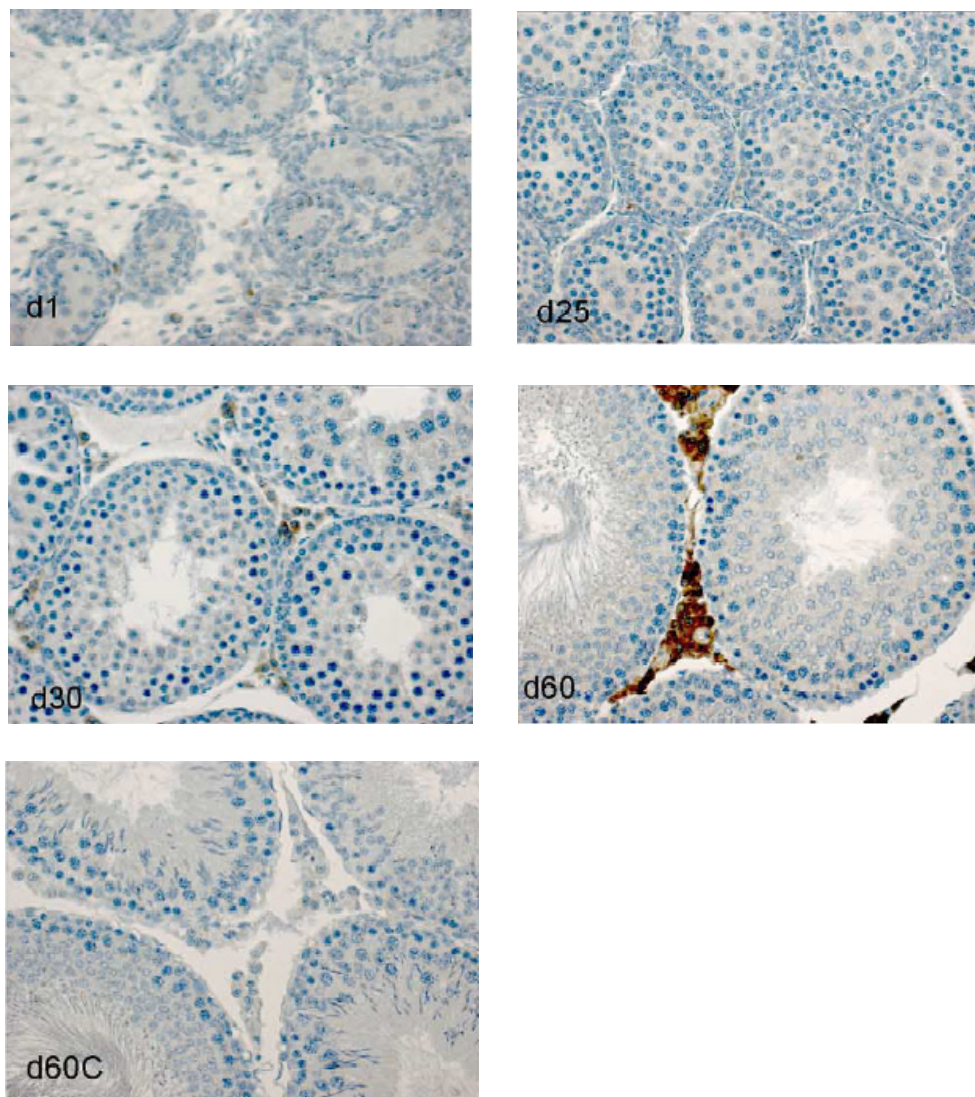


Abb. 3.1-3: Immunhistochemie auf INSL3-Epitope im Hoden von Wildtyp-Ratten aus verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien. INSL3-Epitope wurden in Hodenquerschnitten aus verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien (**d1**: Tag 1, **d25**: Tag 25, **d30**: Tag 30, **d60**: Tag 60) der Ratte mit dem Antikörper R63 nachgewiesen. **d60C**: Mit Präimmunserum versetzte Kontrolle. Vergrößerung $\times 200$.

Die genomische Organisation des Ratten-*InsI3* ist, analog zum Maus- und Rind-*InsI3*-Gen, mit dem JAK3-Genloкус verbunden, denn das letzte Intron des JAK3-Gens beinhaltet die Region des Promotorbereichs des *InsI3*-Gens. Eine genauere Betrachtung dieses Sequenzabschnittes zeigte eine recht hohe Homologie zwischen der Ratten- und der Maus-Sequenz, hier finden sich auch putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für SF-1 (Koskimies *et al.*, 1997; Spiess *et al.*, 1999) (**Abb. 3.2-1**).

Abb. 3.2-1: Sequenz-Vergleich zwischen den Promotorregionen des Ratten- und Maus- *InsI3*-Gens. Dargestellt sind die zwischen Ratten- und Maus-*InsI3*-Promotor homologen Regionen (senkrechte Striche), die Entfernung vom Startkodon ATG (Nummerierung rechts) und die Lage putativer Bindungsstellen (unterstrichen) für die Transkriptionsfaktoren Activating Protein 1 (AP-1), c-Jun Onkogen (c-Jun), T cell factor/lymphoid enhancer binding factor (TEF/LEF-1), Steroidogenic factor 1 (SF-1), Hematopoietic transcription factor GATA-1 (GATA-1), Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells (NF-κB), Stimulating protein 1 (Sp1) und T3 thyroid hormone receptor α (T3Rα). Die für die Transkription des Gens erforderliche TATA-Box ist mit einem Rahmen gekennzeichnet. Die Identifizierung putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen erfolgte mit dem Programm AliBaba 2.1 (www.witi.cs.uni-magdeburg.de/~grabe/alibaba2/webbaba3.cgi).

3. Ergebnisse 55

sondern nur durch das Programm Dialign2 gefunden. Außer der TATA-Box und der ersten SF-1 Bindungsstelle sind keine Bindungsstellen direkt konserviert. Die Bindungsstelle für TCF/LEF-1 (involviert im Wnt-Signalübertragungsweg) ist auch nicht direkt konserviert, befindet sich aber in einer Region mit hoher Konservierung. Allerdings liegt diese kleine Region in beiden Promotoren an völlig unterschiedlichen Stellen (**Abb. 3.2-2**).

A)

TCF/LEF-1(+)

Humaner *Ins13*-Promotor -2359 CAACCTCAGATTCCCTCCTTGAAAA**CAA**AGCTATAA
 Ratten *Ins13*-Promotor -357 CAGCCTCAGTTTCCCTCTTT**G**ACAAAACCAAGTCATAA
 style="text-align: right;">TCF/LEF-1(-)

B)

Humaner *Ins13*-Promotor -1961 ATTCTCCTGCCTCAGC
 Ratten *Ins13*-Promotor -269 ATTCTCCTGCCTCAGC

C)

SF-1

Humaner *Ins13*-Promotor -188 ---GACTCGTTGCCAGTGCTCCCTCTGGGAGAAGTACATC**caagg**ccc
 Ratten *Ins13*-Promotor -183**gggc**GGCTCCTGGCACAGTGCTGCACCTGGGAGAGGGACTT**Cagggt**ccc
Sp1SF-1

Humaner *Ins13*-Promotor -163 tggccctgggAGAAAGGCTCTGGCACTAACCCACCCTTGACCTttttcc
 Ratten *Ins13*-Promotor -154 aagctggac-ACACAGCCCCT**GACCGTGAC**CTGAGCCTCGACCTcctcgg
* SF-1

SF-1

Humaner *Ins13*-Promotor -113 tgggcggctcgaagaatgttctgtcccttCTC**CAAG**GCCcagcTGGG
 Ratten *Ins13*-Promotor -105 tgctgctcgtcgtgtcc-----CTC**CAAG**GCCCa-----TGGG
SF-1Sp1

TATA-Box

Humaner *Ins13*-Promotor -63 ACGGCCCAGGCGCCT**TATAA**GGGGGTCCcgcgttgccccgg-----
 Ratten *Ins13*-Promotor -50 CGGCGCAAGGCGGCT**TATAA**GGAGCGTCCttaccgctgcctcctgccacc
TATA-Box

Abb. 3.2-2: Sequenz-Vergleich zwischen den *Ins13*-Promotorregionen von Ratte und Mensch. Die *Ins13*-Promotorbereiche von Ratte und Mensch wurden mit Hilfe des Programms Dialign2 (Morgenstern, 1999) verglichen. Bereiche mit signifikanter Sequenzhomologie sind aufgelistet, die Kernsequenzen der homologen Regionen sind durch Großbuchstaben markiert. Die Abstände zum Startkodon sind durch die Nummerierung links gekennzeichnet. Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren T cell factor/lymphoid enhancer binding factor (TEF/LEF-1), Stimulating protein 1 (Sp1) und Steroidogenic factor 1 (SF-1) (gefunden mit der Genomatix Matinspector Software (Cartharius *et al.*, 2005)) sind eingetragen, die Kernsequenzen dieser Bindungsstellen sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Die mit dem Stern (*) gekennzeichnete SF-1 Bindungsstelle kommt nur bei der Ratte vor und wird von Matinspector nicht als Bindungsstelle definiert.

3.2.1 Klonierung und Sequenzierung des *InsI3*-Genlokus

Für die Klonierung der kodierenden *InsI3*-Region wurde der *InsI3*-Genlokus (Promoter + kodierende Region) aus der genomischen DNA der Ratte mittels PCR mit Hilfe der Primer-Kombination rJAK3-X23 und rRLF-3' (**Kap. 2.2**) amplifiziert (**Kap. 2.6.2.1**). Der Reaktionsansatz wurde elektrophoretisch aufgetrennt und das Produkt in Form eines Agaroseblöckchens herausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionkits Qiaex eluiert (**Kap. 2.8**). Die so gewonnene DNA wurde in den Vektor pGEM-Teasy hineinligiert (**Kap. 2.10**). Dieser Vektor war *EcoRI*-geschnitten und mit Hilfe von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert worden, um eine Selbstligation zu verhindern. Die Ligationreaktion wurde von dem Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Die Transformation der Ligationsprodukte erfolgte in *E. coli* DH5 alpha (**Kap. 2.12**). Es wurden Einzelklone isoliert, sowie Plasmid-DNA präpariert (**Kap. 2.13**) und sequenziert (**Kap. 2.15**), wodurch die Nukleotidsequenz des *InsI3*-Genlokus überprüft wurde.

3.2.2 Herstellung von Deletionskonstrukten vom Ratten-*InsI3*-Promotor durch PCR

Die 5'- nicht kodierende Region des Ratten-*InsI3*-Gens, das im letzten Intron des JAK3-Gens lokalisiert ist, hat 3 Bindungsstellen für SF-1.

Zuerst wurde durch eine PCR mit genomischer DNA, wie in (**Kap. 2.6.2.1**) beschrieben, das *InsI3*-Gen der Ratte amplifiziert. Für die Herstellung von Ratten-Promotor-Deletionskonstrukten wurde eine PCR mit dem amplifizierten Ratten *InsI3*-Gen und Primer ProPs1-ProPs7 als 5'-Primer und Propr1 als 3'-Primer, wie in (**Kap. 2.6.1**) beschrieben, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C 5 min; 2 x (95 °C 30 sec / 67°C 30 sec / 72°C 1 min)
2 x (95 °C 30 sec / 65°C 30 sec / 72°C 1 min)
2 x (95 °C 30 sec / 65°C 30 sec / 72°C 1 min)
2 x (95 °C 30 sec / 65°C 30 sec / 72°C 1 min)
30 x (95 °C 30 sec / 65°C 30 sec/ 72°C 1 min); 72 °C 5 min; 10°C ∞.

Hierbei enthielten die Primer jeweils eine Restriktionsschnittstelle für *XhoI*. Diese Schnittstelle kommt nicht in der kodierenden Region des *InsI3*-Promotors vor. Die Möglichkeit, das PCR-Produkt an den Enden mit *XhoI* spalten zu können, war für die Ligation des Inserts in den Transfervektor nützlich. In **Abb. 3.2.2-1** ist dies schematisch dargestellt.

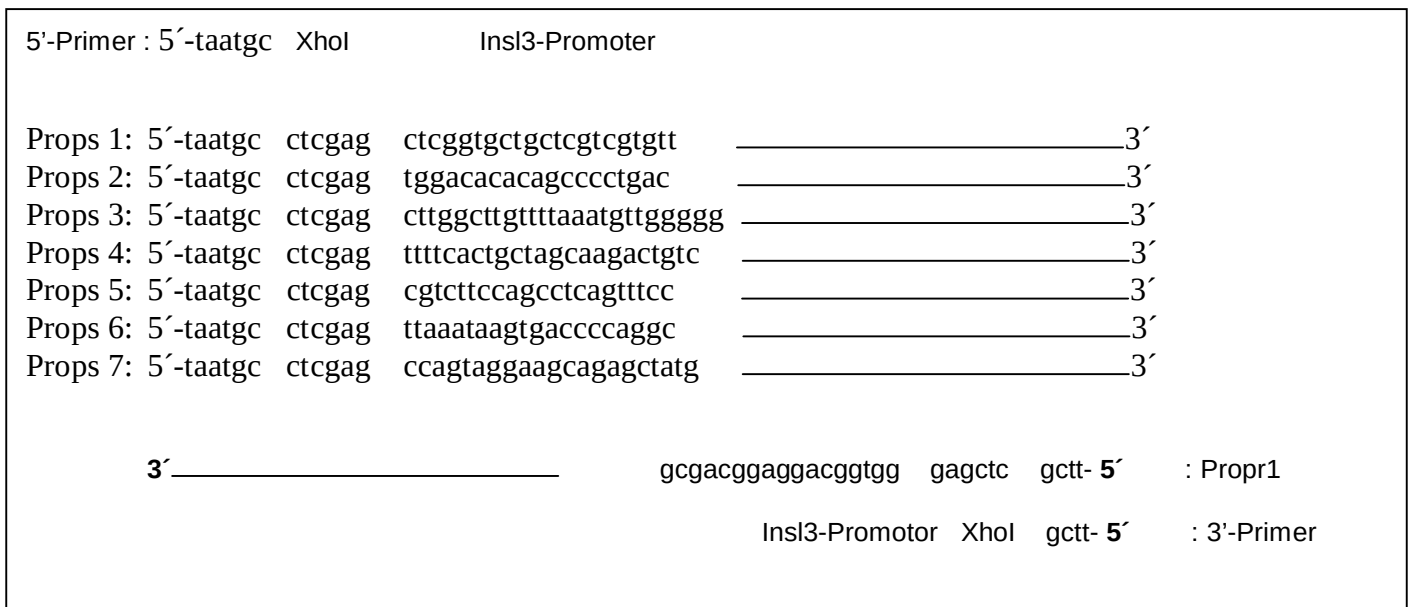


Abb. 3.2.2-1: Amplifikation verschieden langer Bereiche des *InsI3*-Promotors zur Herstellung von Deletionskonstrukten durch Insertion in den Reportervektor pGL3-Luciferase. Die 5'- und 3'-Primer für die Amplifikation der *InsI3*-Promotor-Regionen wurden so konstruiert, dass sie jeweils mit ihrem 3'-Ende zur *InsI3*-Promotor-Sequenz komplementär waren, jedoch an ihrem 5'-Ende *XhoI*-Schnittstellen enthielten, mit Hilfe derer sie später in den Reportervektor eingefügt werden konnten.

Die PCR-Fragmente wurden aus dem Gel eluiert, in den pGEM-T-Easy-Vektor kloniert und anschließend sequenziert, um einen eventuell falschen Nukleotideinbau während der PCR-Reaktion auszuschließen. Danach wurden sowohl die Plasmide mit den *InsI3*-Promotor-Inserts als auch der Reportervektor pGL3-Luciferase mit dem Restriktionsenzym *XhoI* behandelt. Aliquots der anschließenden Ligationen (**Kap. 2.10**) wurden in *E.coli* DH5 alpha (**Kap. 2.12**) transfiziert, die Plasmid-DNA präpariert (**Kap. 2.13**) und sequenziert (**Kap.2.15**), wodurch die Orientierung der *InsI3*-Promotor-Konstrukte überprüft wurde.

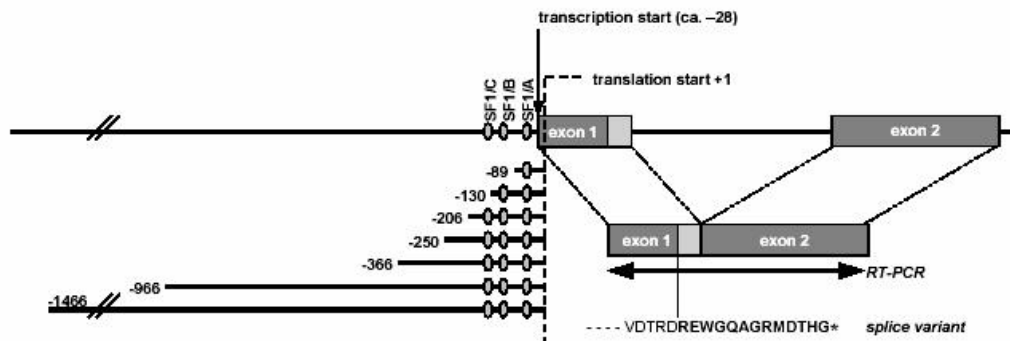


Abb. 3.2.2-2: Schematische Organisation des Ratten-*InsI3*-Gens. Im rechten Teil der Abbildung ist die Exon/Intron-Struktur des Ratten-*InsI3*-Gens sowie die mRNA und das C-terminale Ende der translatierten Aminosäuresequenz der Spleißvariante (splice variant) dargestellt. Der zur Charakterisierung der mRNA amplifizierte Bereich (RT-PCR) ist durch den Doppelpfeil gekennzeichnet. Im linken Teil der Abbildung sind die relativen Positionen der Promotor-Deletionen (Abstände zum Translationsstart) und die darin enthaltenen putativen SF-1 Bindungsstellen (Ovale) dargestellt.

Als Kontrolle wurde das -188bp Fragment des *InsI3*-Gens der Maus (Koskimies et al., 2002) durch eine PCR aus der genomischen DNA der Maus mit Hilfe der Primer-Kombination mRLFss-SacI and mRLFaa-BglII (Tabelle 1) (**Kap. 2.2**) amplifiziert.

3.3 Bestimmung der Progesteron-Konzentration mittels ELISA

Um zu zeigen, dass die Fähigkeit der Zellen zur Steroid- Produktion vorhanden war, wurde ein Progesteron-ELISA (Enzyme-linked immuno-sorbent assay) durchgeführt. Der Test mit R2C-Zellen zeigte, dass in dieser Zelllinie Progesteron in hoher Menge produziert wird. Die Progesteron-Produktion ist abhängig von der Expression von endogenem SF-1. In Transfektionsexperimenten (s.u.) wurde allerdings eine Steigerung der *InsI3*-Promotoraktivität durch Kotransfektion von SF-1 festgestellt. Da in diesen Experimenten sehr große Menge Promotor-DNA transfiziert wurden, war die Menge an endogenem SF-1, die zur Stimulation der Progesteron-Produktion genügte, offensichtlich nicht ausreichend für die volle Stimulation des transfizierten Promotors.

3.4 Funktionalität des Ratten-InsI3-Promotors

3.4.1 Aktivierungsfähigkeit der InsI3-Gen-Promotorkonstrukte in transienten Transfektionen

Nachdem die Herstellung der Expressionsvektoren mit den *InsI3*-Gen-Promoterkonstrukten gelungen war, sollte die Funktionsfähigkeit der Promotorkonstrukte in eukaryoten Zellen untersucht werden. Dazu wurden zunächst die drei Promotorkonstrukte (-89, -366 und -1466-Luc) in MA-10 Zellen, R2C Zellen und COS-7 Zellen transfiziert, einmal ohne und einmal mit Kotransfektion des SF-1 Expressions-Vektors. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit einem Promotorkonstrukt eines SF-1-geregelten Gens, des Rinder-Oxytocin-Gens, transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Reporter-Gen-Expression durch Nachweis der spezifischen Reporter-Aktivität untersucht (Kap 4.18). Das Ergebnis zeigte, dass wegen der endogenen SF-1 Expression die Basalaktivität der *InsI3*-Gen-Promoterkonstrukte in den verschiedenen steroidogenen Leydig-Zelllinien höher ist als in der nicht-steroidogenen, also SF-1 negativen, COS-7 Zelllinie. Allerdings führt Überexpression von SF-1 in der COS-7 Zelllinie nicht zu einer Aktivierung des *InsI3*-Gens. Das deutet auf die Notwendigkeit anderer Faktoren von steroidogenen Zellen für die transkriptionelle Aktivität des SF-1 Faktors hin. Die erhöhte Basalaktivität in den steroidogenen, endogenes SF-1 exprimierenden Zelllinien R2C und MA-10 ist unterschiedlich in den beiden Linien und ebenfalls durch SF-1 Kotransfektion zu steigern (**Abb. 3.4-1**).

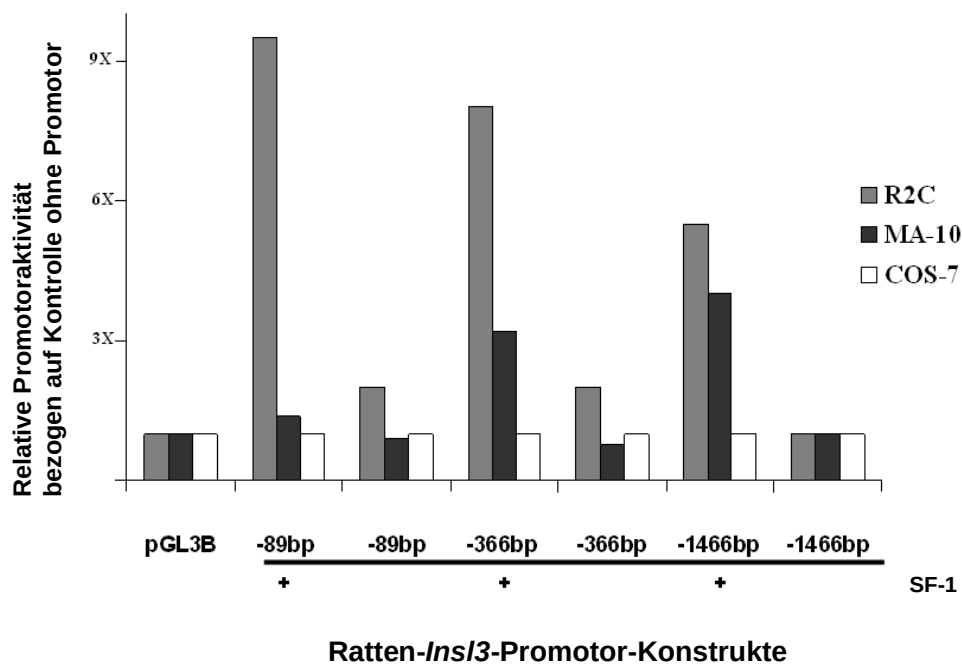


Abb. 3.4-1: Transfektions-Analyse der Ratten-*Ins/3*-Promotor-Deletions-Konstrukte. Ratten-*Ins/3*-Promotor-Deletions-Konstrukte mit 89 bp, 366 bp oder 1466 bp Promotorsequenzen wurden in R2C-Zellen (graue Säulen), MA-10-Zellen (schwarze Säulen) oder COS-7-Zellen (weiße Säulen) transfiziert und die exprimierte Aktivität des Reportergens Luciferase bestimmt. Kotransfektion mit dem SF-1 Expressionsvektor ist angezeigt (+). Als Kontrolle diente pGL3B, der Ausgangsvektor, der keinen Promotor enthält. Die Promotoraktivität ist als relative Steigerung gegenüber der Kontrolle dargestellt.

Die MA-10 Zellen (Ascoli, 1981) weisen in Vorversuchen im Vergleich zu R2C Zellen absolut höhere Promoteraktivitäten auf, sowohl mit als auch ohne Kotransfektion von SF-1. Deswegen wurden für die weiteren Transfektionsexperimente MA-10 Zellen verwendet. In diesen Zellen ist ein großer Teil der Leydigzell-spezifischen Signalübertreibungswege konserviert, außerdem wird in diesen Zellen das *Ins/3*-Gen endogen exprimiert (Balvers *et al.*, 1998).

Alle sieben Promotorkonstrukte der Ratte wurden in MA-10 Zellen einmal ohne SF-1 Expressions-Vektor und einmal mit SF-1 Expressions-Vektor transfiziert und die Reportergen-Aktivität untersucht. Unsere Daten zeigen, dass von den drei kurzen Promotor-Konstrukten, im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen mit dem Maus-*Ins/3*-Promotor (Koskimies *et al.*, 2002), bei der Ratte dasjenige Konstrukt (-130) mit zwei SF-1-Bindungsstellen am aktivsten war (Abb. 3.4-2).

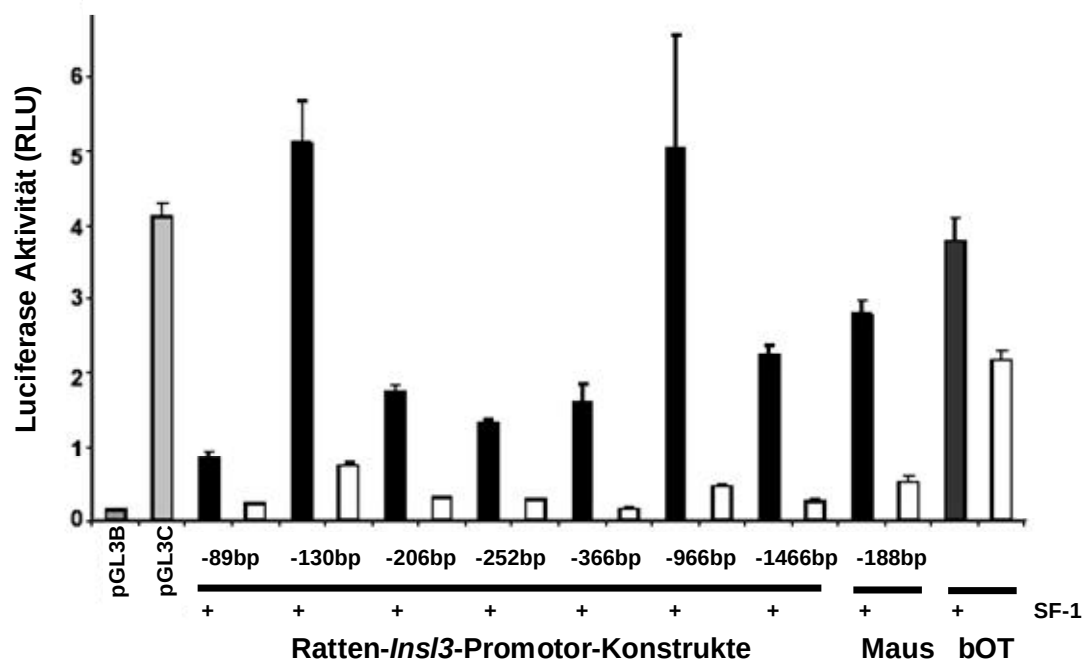


Abb. 3.4-2: Transfektions-Analyse der Ratten-*InsI3*- Promotor-Deletionskonstrukte in MA-10 Zellen. Ratten-*InsI3*-Promotor-Deletions-Konstrukte mit den angegebenen Längen von Promotorsequenzen wurden in MA-10-Zellen transfiziert und die exprimierte Aktivität des Reportergens Luciferase bestimmt. Kotransfektion mit dem SF-1 Expressionsvektor ist angezeigt (+). Als Kontrollen für die Transfektion dienten pGL3B (der Ausgangsvektor, der keinen Promoter enthält) und pGL3C (Kontrollvektor, der einen konstitutiven Viren-Promoter enthält). Der Maus *InsI3*-Promotor (mouse) und der Rinder-Oxytocin-Promotor (bOT) wurden zum Vergleich eingesetzt.

Auch ohne SF-1 Kotransfektion ist der Ratten-*InsI3*-Promoter in endogen SF-1 exprimierenden Zelllinien basal aktiv, aber nicht in dem Maße, in dem ein bekanntes SF-1-geregeltes Gen wie z.B. das Oxytocin-Gen aktiv ist.

3.4.2 „electrophoretic mobility shift assay” (EMSA)

Nachdem unsere Daten unterschiedliche Ergebnisse zu den beschriebenen Ergebnissen mit dem Maus-InsI3-Promotor zeigten, sollten die SF-1 Bindungsstellen und ihre Affinitäten zu SF-1 im Promotor der Ratte mit deren Affinität in der Maus im „electrophoretic mobility shift assay” (EMSA) verglichen werden.

Für EMSA-Untersuchungen, also die Untersuchung, ob Proteine aus nuklären Extrakten in der Lage sind, spezifische cis-Elemente in unseren Promotor-Sequenzen zu binden, wurden nukläre Extrakte von R2C und MA-10 Zellen, die endogenes SF-1 exprimieren, zusammen mit drei SF-1 Bindungs-Sequenzen (A, B und C) aus dem Maus und dem Ratten InsI3-Promotor inkubiert. BSA wurde als Kontrolle für unspezifische DNA-Protein-Interaktionen eingesetzt.

3.4.2.1 Konkurrenzexperiment mit Bindungssequenzen für den Transkriptionsfaktor SF-1

Für dieses EMSA-Experiment wurden als DNA-Sonden die drei SF-1 Bindungs-Sequenzen (A, B und C) aus dem Maus- und dem Ratten-InsI3-Promotor als doppelsträngige Oligonuklotide radioaktiv markiert. Proteinextrakte von MA-10 Zellen wurden mit gleichen Mengen an Sonde inkubiert. Spezifisch kompetiert wurde die Bindung mit einem SF-1 Konsensus-Oligonuklotid (**Abb. 3.4-3**).

Bei der Maus wurden alle drei Bindungssequenzen gebunden, wobei die distale C-Stelle die stärkste Bindung zeigt. In der Ratte wurden ebenfalls alle drei Bindungssequenzen gebunden, aber hier wurde die proximale A-Stelle am stärksten gebunden.

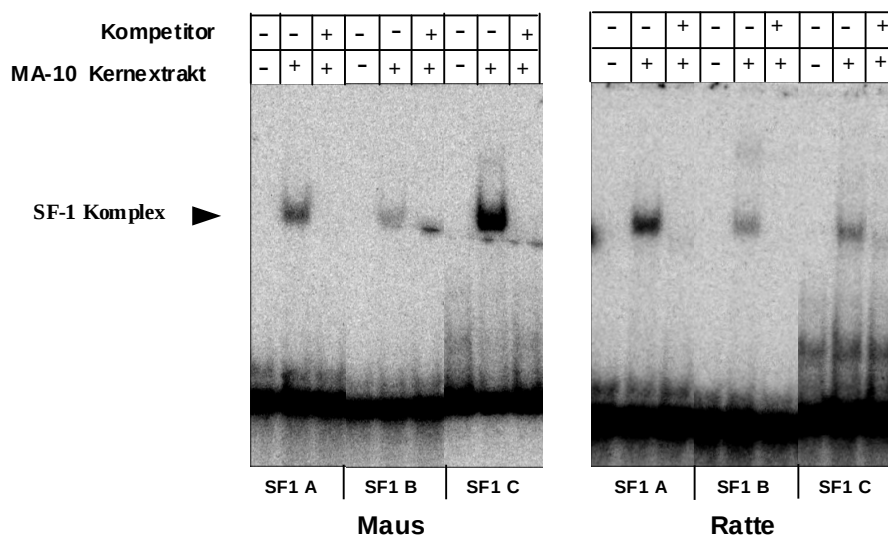


Abb. 3.4-3: „Electrophoretic-mobility shift assay“ (EMSA) Analyse der Bindung von Maus MA-10 Kernproteinen an die SF-1 Bindungsstellen aus dem *InsI3*-Promotor. Die drei individuellen putativen SF-1 Bindungsstellen (SF-1 A, SF-1 B und SF-1 C) aus dem *InsI3*-Promotor der Maus (linke Tafel) oder der Ratte (rechte Tafel) wurden als radioaktiv markierte Sonden in EMSA-Assays mit Kernextrakt aus MA-10-Zellen eingesetzt. Jede Tafel repräsentiert ein Experiment, wobei die Spuren des Autoradiogramms zum direkten Vergleich der drei Sonden neu zusammengefügt worden sind. Die Zugabe von Kernextrakt und/oder dem spezifischen Kompetitor (Oligonukleotid mit einer Konsensus-Bindungsstelle für SF-1) zu den einzelnen Bindungsreaktionen ist oberhalb der Gelspuren angezeigt (+). Der spezifische Komplex der Sonden mit SF-1 ist durch die Pfeilspitze markiert.

3.4.2.2 Konkurrenzexperiment zur Überprüfung möglicher SF-1-Bindungsstellen

In diesem EMSA wurden Kernextrakte aus Maus MA-10 und Ratten R2C Zellen jeweils mit zwei Promotorabschnitten von 206bp Länge aus den Ratten-*InsI3* und dem Maus-*InsI3* Promotor als Sonde inkubiert. Kompetiert wurde in beiden Fällen einmal mit ungelabeltem SF-1-Konsensus Oligonukleotid, der ungelabelten Gesamtsonde, sowie mit den jeweiligen Bindungssequenzen A bis C aus Maus und Ratte (**Abb. 3.4-4**).

Die Bindungsaffinität für SF-1 ist beim Ratten *InsI3*-Promotor schwächer als beim Maus *InsI3*-Promoter. Dieses Muster ist eine Qualität des Promotors, denn das Bindungsmuster ändert sich nicht in einem heterologen System (Ratten *InsI3*-Promotor mit Maus-Kernextrakten).

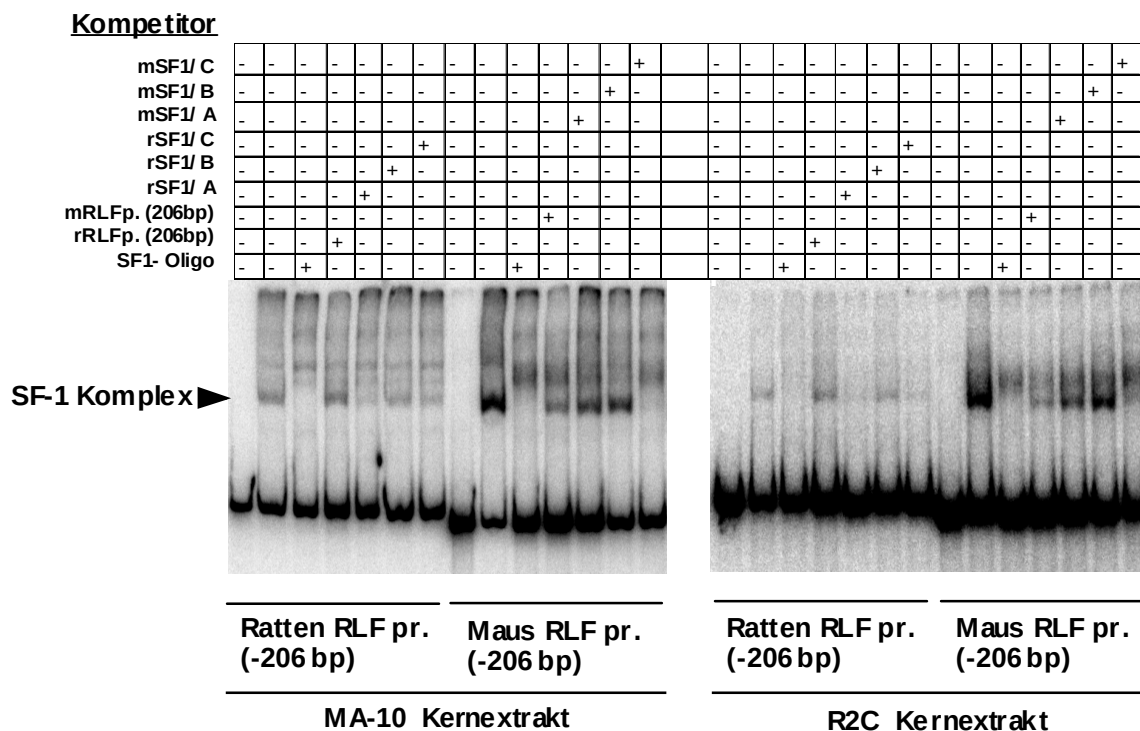


Abb. 3.4-4: „Electrophoretic-mobility shift assay“ (EMSA) Analyse von Maus MA-10-Kernextrakten und Ratten R2C-Kernextrakten. 206bp große proximale Promotor-Fragmente von den *InsI3* Genen der Ratte (Ratten RLF pr.) und der Maus (Maus RLF pr.) wurden als radioaktiv markierte Sonden in EMSA-Assays mit MA-10-Kernextrakt (linke Tafel) und R2C-Kernextrakt (rechte Tafel) eingesetzt. Doppelsträngige Oligonucleotide der einzelnen Maus- (mSF-1/A bis –C) oder Ratten-(rSF-1/A bis C) SF-1 Elemente, die 206bp große proximalen Promotor- Bereiche, sowie eine Konsensus-Bindungsstelle für SF-1 (SF1-Oligo) wurden als spezifische Kompetitoren verwendet. Die Zugabe von Kompetitoren zu den einzelnen Bindungsreaktionen ist oberhalb der Gelspuren angezeigt (+).

3.4.2.3 Immunologische Charakterisierung der Protein-DNA-Komplexe

Die Spezifität der Protein-Komplexe wurde durch Einsatz eines Antikörpers gegen SF-1 (bovines SF-1 Homolog Ad4BP, Morohashi *et al.*, 1992) bestätigt (**Abb. 3.4-5**).

Diese Kontroll-Untersuchung zeigt komplette Blockierung der Bildung des spezifischen Protein- DNA-Komplexes durch diesen spezifischen SF-1 Antikörper.

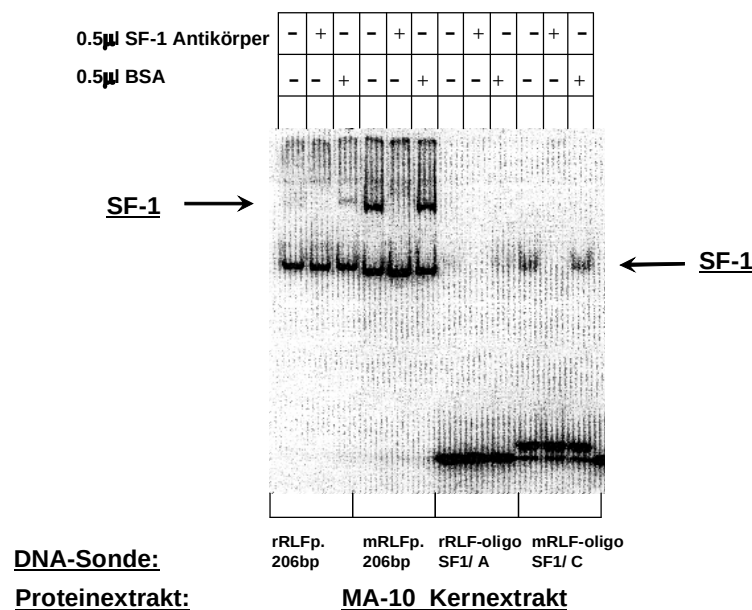


Abb. 3.4-5: Immunologische Charakterisierung der SF-1 Komplexe durch „Electrophoretic-mobility shift assay“ (EMSA) Analyse. Die 206bp großen proximalen Promotor- Fragmente aus dem Ratten- oder Maus-*Ins3*-Gen, das SF-1/C-Oligonukleotid von der Maus oder das Ratten-SF-1/A-Oligonukleotid aus den *Ins3*-Promotorsequenzen wurden als radioaktiv markierte Sonden verwendet Für die immunologische Charakterisierung des bindenden Kernproteins wurde 0,5µl SF-1 Antikörper sowie als Kontrolle BSA verwendet. Als Kompetitor wurde ein Konsensus SF-1-Element (SF-1-Oligo) verwendet. Die Zugaben zu den einzelnen Bindungsreaktionen ist oberhalb der Gelspuren angezeigt (+).

3.5 Stimulation der MA-10 Zellen mit Dexamethason

Vorhergehende Versuche ließen vermuten, dass das *Ins3*-Gen durch Glukokortikoide aufgeregelt werden könnte. Um diese Ergebnisse in dem hier verwendeten Zellkultur-System zu bestätigen, wurden nach dem Absaugen der Transfektionslösung den Zellen 10^{-7} M Dexamethason oder Kontrollvehikel zugesetzt und die Zellen über Nacht inkubiert. Entgegen den Erwartungen konnte keine Aufregelung der *Ins3*-Expression durch Dexamethason nachgewiesen werden (**Abb. 3.5-1**).

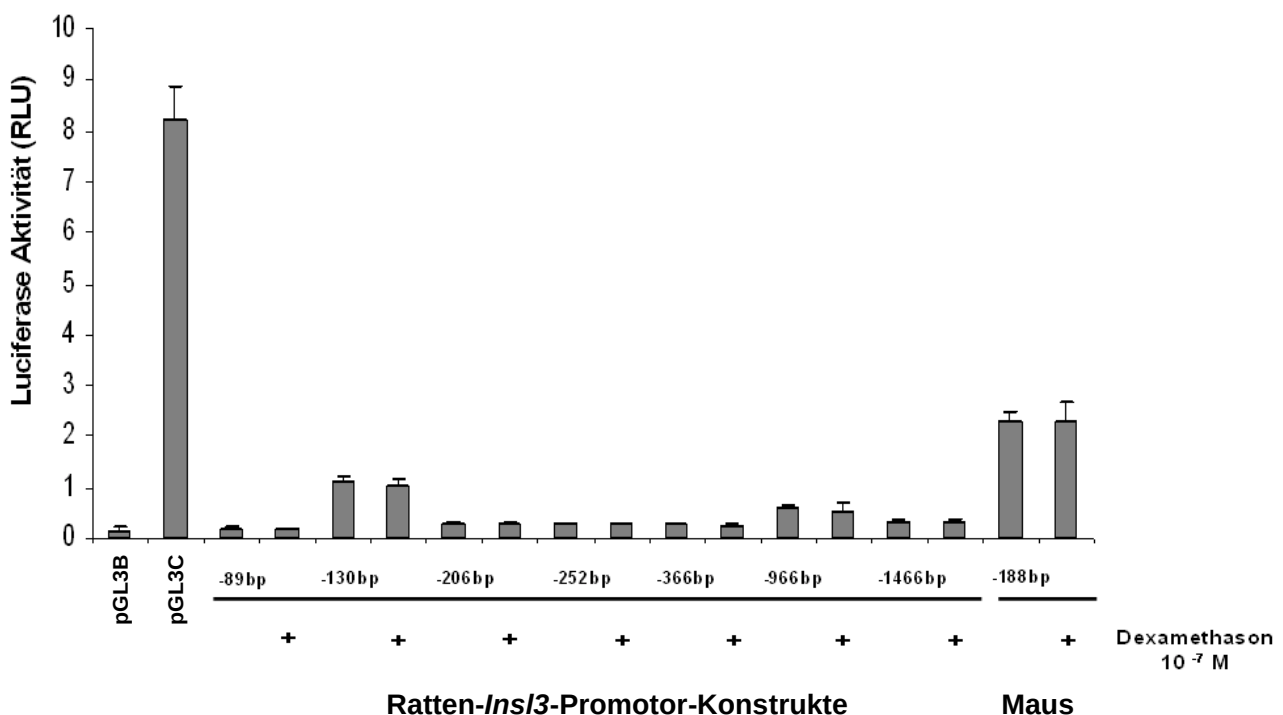


Abb. 3.5-1: Untersuchung der möglichen Wirkung von Dexamethason auf die Aktivität des Ratten-*Ins3*-Promotors. Ratten-*Ins3*-Promotor-Deletions-Konstrukte mit den angegebenen Längen von Promotorsequenzen wurden in MA-10-Zellen transfiziert und die exprimierte Aktivität des Reportergens Luciferase bestimmt. Als Kontrollen für die Transfektion dienten pGL3B (der Ausgangsvektor, der keinen Promoter enthält) und pGL3C (Kontrollvektor, der einen konstitutiven Viren-Promoter enthält). Der Maus-*Ins3*-Promotor (Maus) wurde zum Vergleich eingesetzt. Stimulation mit Dexamethason (10^{-7} M) ist angezeigt(+).

Des Weiteren wurde bei den unstimulierten und den mit Dexamethason stimulierten MA-10 Zellen die Expression von *Ins3* mittels RT-PCR (**Kap. 2-5**) untersucht. Nach der Stimulation mit Dexamethason wurde nur eine Bande in Höhe der *Ins3*-Spleißvariante mit

der Größe von 662bp, aber nicht die 596 bp Bande des normalen Transkripts nachgewiesen. (**Abb. 3.5-2**).

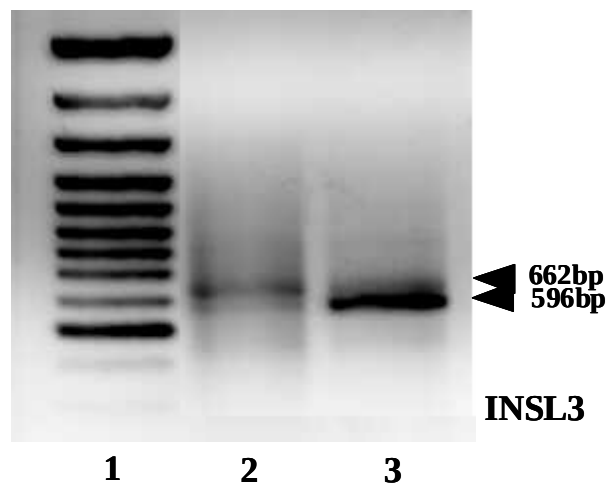


Abb. 3.5-2: RT-PCR-Analyse der Ratten *InsI3*-Transkripte in MA-10 Zellen mit und ohne Dexamethason-Stimulation. **Spur 1:** DNA-Marker (100 bp-Leiter), **Spur 2:** cDNA aus MA-10 Zellen nach der Stimulation mit Dexamethason, **Spur 3:** cDNA-Plasmid. Das 596bp PCR Produkt repräsentiert das funktionelle Transkript, das 662bp PCR Produkt repräsentiert die Spleiß-Variante. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der *Ins/3*-Transkription besser zu verstehen, weil eine hohe *Ins/3*-Expression mit einer intakten Leydigzellfunktion korreliert. Der Insulin-ähnliche Faktor 3 (*Ins/3*) ist ein relativ neues Mitglied der Insulin-IGF-Relaxin-Hormon- und Wachstumsfaktorfamilie. *Ins/3* wird auch als Ley-IL oder Relaxin-ähnlicher Faktor bezeichnet. Sowohl über die physiologische Wirkung als auch über die Regulation der Genexpression von *Ins/3* ist noch wenig bekannt. Eine wichtige Rolle für die Transkriptionsregulation im Hoden wird dem Transkriptionsfaktor „steroidogenic factor-1“ (SF-1) zugesprochen, welcher sich sowohl in allen steroidbildenden Geweben als auch in Hypophyse und Plazenta findet. Neben seiner Rolle als ein wichtiger Regulator der Steroidbiosynthese in Nebennierenrinde und Gonaden (Caron *et al.*, 1997; Juengel *et al.*, 1998; Lala *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1994; Parker, 1998), ist er auch an der Aufregung von Genen für Peptidhormone wie Oxytocin (Wehrenberg *et al.*, 1994; Walther, 1995; Kascheike *et al.*, 1997) oder der beta-Untereinheit des Luteinisierungshormons (Halvorson *et al.*, 1996; Keri und Nilson, 1996) beteiligt. Koskimies *et al.* (1997) und Zimmermann *et al.* (1997) identifizierten in der Promotor-Region des *Ins/3*-Gens der Maus per Computeranalyse Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SF-1. Zimmermann *et al.* (1998) zeigten, dass für die SF-1-vermittelte Stimulation der Transkription des murinen *Ins/3*-Gens drei SF-1-Bindungsstellen erforderlich sind. Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SF-1 und AP-1 wurden auch in der angenommenen Promotorregion des *Ins/3*-Gens der Ratte festgestellt (Spiess *et al.*, 1999).

Nach Isolierung und Sequenzierung des Ratten *Ins/3*-Promotorbereiches wurden die vorhandenen putativen SF-1 Transkriptionsfaktorbindungsstellen näher untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurden mittels RT-PCR von Gesamt-RNA aus verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien der Ratte cDNA umgeschrieben, durch PCR *Ins/3*-Sequenzen amplifiziert und diese sequenziert. Dabei wurde eine neue Spleiß-Variante nachgewiesen. Die cDNA der *Ins/3*-Spleißvariante weist im Vergleich zur normalen *Ins/3*-cDNA ein längeres Transkript mit einem um 66bp längeren Exon1 auf.

Wie bei der Maus ist das *Ins/3*-Gen auch bei der Ratte innerhalb des größeren *Jak3*-Gen lokalisiert (Koskimies *et al.*, 1997; Spiess *et al.*, 1999), d.h. dass der Promotor und das Exon1 des *Ins/3*-Gens im Intron des *Jak3*-Gens liegen. Das Exon2 des *Ins/3*-Gens findet

sich auch als Exon 23B in manchen Formen der *Jak3*-cDNA (Spiess *et al.*, 1999). Die *Jak3*-mRNA und die *InsI3*-mRNA entstehen also aus der Benutzung derselben Akzeptor-Spleißstelle. Obwohl das *InsI3*-Gen offensichtlich von einem unabhängigen Promotor transkribiert wird, werden bei der Wahl der mRNA-Stop-Stelle des *InsI3*- und *Jak3*-Gens verschiedene 3'-Polyadenylierungssignale innerhalb derselben 3'-UTR verwendet. Vielleicht wegen dieser Voraussetzung in diesem genomischen Gebiet, gibt es auch die Spleiß-Variante innerhalb der *InsI3* pre-mRNA. Die Spleiß-Variante der Ratte, die hier beschrieben ist, ist das Ergebnis alternativen Spleißens an der ersten Exon-Akzeptor-Stelle. Obwohl die Details der Spleiß-Ereignisse und die daraus resultierenden Folgen für die Translation verschieden sind, wird alternatives Spleißen an derselben Stelle auch bei Maus, Hund, Mensch und Weißbüschelaffe beobachtet (Ivell *et al.*, 2001).

Das alternative Spleißen führt zur Einführung zweier Stopkodons. Das resultierende Protein würde aus dem B-Peptid, einem kleiner Teil des C-Peptids und einem neuen C-Terminus bestehen. Die Struktur der *InsI3*-Spleißvariante weist neben dem Signalpeptid eine B-Kette auf, welche am C-Terminus um 13 Aminosäuren verlängert wurde. Von einer ähnlichen alternativen Spleißvariante wird bei dem verwandten Hormon RLX in der humanen Plazenta berichtet (Gunnarsen *et al.*, 1996). Auch hier beinhaltet das Produkt eine am C-Terminus verlängerte B-Kette. Es ist nicht bekannt, ob die Spleiß-Variante der Ratte wirklich ein Protein erzeugt, das eine biologische Bedeutung hat und ob das funktionell relevant sein kann. Es scheint jedoch, dass RLX- oder *INSL3*-Varianten mit solchen verlängerten B-Peptiden aufgrund des vorhandenen einheitlichen Motivs der Rezeptorbindungsstelle in der B-Kette mit RLX- oder *InsI3*-Rezeptoren interagieren können. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass ein chemisch synthetisches Peptid, basierend auf der Sequenz des Schaf-*INSL3*, einen antagonistischen Effekt am LGR8 Rezeptor für *INSL3* ausüben kann (Del Borgo *et al.*, 2004). Antikörper gegen eine ähnliche Variante des Weißbüschelaffen-*INSL3*-Proteins, konnten keine immunogenen Epitope für die neuartige Sequenz im Weißbüschelaffen-Hoden zu entdecken (Zarreh-Hoshyari-Khah *et al.*, 1999).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde aus einer genomischen Bibliothek bzw. genomischer DNA mittels einer Polymerasenkettenreaktion (PCR) der *InsI3*-Promotorbereich isoliert und zur Herstellung von Ratten-Promotor-Deletionskonstrukten verwendet.

Im dritten Teil der Arbeit wurde dann mittels Transfektionsanalyse die Funktionsfähigkeit der Promotorkonstrukte in Leydig-Zelllinien untersucht. Die in Vorversuchen getesteten MA-10 Zellen erwiesen sich im Vergleich zu R2C Zellen als besser geeignet, deswegen wurden MA-10 Zellen für die Transfektionsexperimente verwendet. Die Transfektion aller sieben Promotorkonstrukte der Ratte in MA-10 Zellen zeigten, dass von den drei kurzen Promotor-Konstrukten, im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen mit dem Maus-*InsI3*-Promotor (Koskimies *et al.*, 2002), bei der Ratte dasjenige Konstrukt (-130) mit zwei SF-1-Bindungsstellen am aktivsten war.

Im vierten Teil der Arbeit wurden die drei proximalen SF-1 Bindungsstellen durch einen „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) funktionell untersucht. Hierzu wurde der sich unmittelbar dem Transkriptionsstart anschließende Promotorbereich von 206 Basenpaaren jeweils von Ratte und Maus isoliert und in 3 Fragmente (SF-1 Bindungsstellen A, B, und C) zerlegt. Ein Kompetitionsexperiment mit dem 206 bp Promotor-Fragment von der Maus oder der Ratte wurde durchgeführt. Bei der Maus wurden alle drei Bindungssequenzen gebunden, wobei die distale C-Stelle die stärkste Bindung zeigt. In der Ratte wurden ebenfalls alle drei Bindungssequenzen gebunden, aber hier wurde die A-Stelle am stärksten gebunden. Zur weiteren Überprüfung möglicher SF-1 Bindungsstellen wurden die Kernextrakte aus Maus MA-10 und Ratten R2C Zellen an zwei Promotorabschnitte von 206 bp Länge aus den Ratten-*InsI3* und dem Maus-*InsI3*-Promotor als Sonden gebunden, mit ungelabelten SF-1-Konsensus-Oligonukleotid, der ungelabelten Gesamtsonde, sowie den jeweiligen Bindungssequenzen A bis C aus Maus und Ratte als spezifischen Kompetitoren. Die immunologische Charakterisierung der Komplexe zeigte die komplette Blockierung der Bildung des spezifischen Protein-DNA-Komplexes durch diesen spezifischen SF-1 Antikörper.

Die Bindungsaffinität für SF-1 ist beim Ratten *InsI3* Promotor schwächer als beim Maus *InsI3*-Promotor. Dieses Muster ist eine Qualität des Promotors und ändert sich nicht in einem heterologen System (Ratten *InsI3*-Promotor mit Maus-Kernextrakten). Möglicherweise wirken andere Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren synergistisch auf die Bindung von SF-1.

Der genaue Wirkmechanismus von SF-1 ist noch für kein Gen geklärt und, wie oben erwähnt, wird eine Modulierung seiner Funktion durch Kofaktoren, noch nicht identifizierte Liganden oder auch posttranslationale Modifikationen diskutiert (Sadovsky *et al.*, 1998).

Denn während SF-1 einerseits von der Mitte der Trächtigkeit an in allen Leydig- und Follikelzellen der Ratte identifiziert werden konnte (Majdic und Saunders, 1996), findet es sich zum Beispiel auch in großen Mengen in der Nebennierenrinde der Ratte, in der jedoch keinerlei *InsI3*-Expression stattfindet (Parker, 1998). Somit muss es weitere Faktoren geben, die die *InsI3*-Expression in manchen Geweben suprimieren, in anderen Geweben wie reifen Leydigzellen, Theka interna- und Lutealzellen hingegen aktivieren.

Es kann davon ausgegangen werden, dass SF-1 alleine nicht ausreichend für die Expression der Gene ist, sondern andere Faktoren und Kofaktoren benötigt, um die Expression zu aktivieren. SF-1 kann daher wahrscheinlich nur eine permissive Vermittlerrolle zugesprochen werden. So werden möglicherweise an den im *InsI3*-Promotorbereich identifizierten SF-1- Bindungsstellen Kofaktoren durch SF-1 rekrutiert, die die Expression des *InsI3*-Gens modulieren.

Es wurde gezeigt, dass eine breite Reihe von Effektoren, z.B Estradiol, in primären Zellen oder Zelllinien (Balvers *et al.*, 1998), einschließlich auch der R2C Zelllinie der Ratte (Sadeghian *et al.*, 2005), keinerlei Einfluss auf die *InsI3*-Gen-Transkription haben. Die Transkription des *InsI3*-Gens ist, mindestens hinsichtlich der Reihe von geprüften Effektoren, konstitutiv. Eine frühere Studie hatte gezeigt, dass auch Testosteron ohne Wirkung auf die *InsI3*-Transkription ist (Balvers *et al.*, 1998).

Da im Vorversuch Dexamethason einen Einfluss auf die Expression von *InsI3* in MA-10 Zellen zu haben schien, wurde im fünften Teil der Arbeit der Einfluss einer Zugabe von Dexamethason auf die Aktivität des *InsI3*-Promotors der Ratte in MA-10 Zellen überprüft. Das Ergebnis dieses Versuches zeigte, dass die Zugabe von Dexamethason zu keiner Änderung der Aktivität des *InsI3*-Promotors der Ratte führt. In den RT-PCR Experimenten wurde nach der Stimulation mit Dexamethason nur eine Bande in Höhe der *InsI3*-Spleißvariante, mit der Größe von 662 bp, nicht aber die 596 bp Bande des normalen Transkripts nachgewiesen. Dieses überraschende Ergebnis, dass die hormonelle Aktivierung der Transkription des *InsI3*-Gens in MA-10 Zellen zur Akkumulation eines aberranten Transkripts führt, ist hoch interessant, sollte aber in einem anderen Zellsystem, z.B. in primären Leydigzellkulturen, bestätigt und weiter untersucht werden. Da auch in Nagetieren Kryptorchidismus direkt mit der Expression des *InsI3*-Gens in fötalen Leydig Zellen verbunden ist, sind diese weiteren Untersuchungen des Einflusses von Dexamethason auf die *InsI3*-Gen-Expression und eine nähere Charakterisierung der

Ins/3-Spleißvariante der Ratte notwendig, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Dexamethason und Kryptorchidismus beim Menschen aufzuklären.

Verschiedene *in vivo* Studien weisen darauf hin, dass *Ins/3* oder seine mRNA ein ausgezeichneter Marker des reifen Leydigzellen-Phänotyps sind, und demzufolge *in vivo* als Differenzierungsmarker der Leydig-Zellen verwendet werden können. Immunoreaktives INSL3-Protein und *Ins/3*-mRNA steigen während der Pubertät in den Leydig Zellen der Maus an (Balvers *et al.*, 1998). In der hypogonadalen *hpg*-Maus, deren Hoden in einem prepuberalen Zustand sind, sind Leydig Zellen negativ für *Ins/3*-Genexpression, aber die *Ins/3*-Expression kann durch tägliche Einspritzungen von hCG und die daraus resultierende Differenzierung der Leydig Zellen zum erwachsenen Phänotyp bewirkt werden (Balvers *et al.*, 1998). Genau so ist die *Ins/3*-mRNA-Menge in den Hoden von Ratten, die sich von der EDS-abhängigen Leydigzell-Ablation erholen, erhöht (Spiess *et al.*, 1999).

In der jahreszeitabhängigen Fortpflanzung von Säugetieren, wie beim Hamster (Ivell *et al.*, 2003) oder beim Reh (Hombach-Klonisch *et al.*, 2004), werden die jahreszeitabhängige Abnahme der *Ins/3*-Expression der Leydigzellen mit der Wiederaufnahme von Steroidogenese des Hodens wieder erhöht. In neoplastischen Leydigzellen wird die INSL3-Produktion, auf Grund der höheren Proliferationsrate und deren Auswirkung auf die Differenzierung der Leydigzellen (Klonisch *et al.*, 1999), ebenso wie in den Leydigzellen von alten Ratten (Paust *et al.*, 2002), herunter geregelt. Schließlich gibt es auch indirekte Bestätigung beim Menschen: Wenn Männer mit hypogonadotropen Hypogonadismus für einen sehr kurzen Zeitraum (72-96h) mit hCG behandelt werden, gibt es keine Änderung in der niedrigen Konzentration des peripheren INSL3, obwohl der Testosteron-Spiegel zunimmt (Bay *et al.*, 2005). Dagegen nimmt in ähnlichen Patienten, die über 1 Monat mit hCG behandelt wurden, die Menge von peripherem INSL3 zu (Foresta *et al.*, 2004). Wahrscheinlich bewirkt in den Patienten mit langer hCG-Therapie hCG eine Differenzierung der Leydigzellen zu einem Phänotyp, der mehr dem erwachsenen Typus entspricht.

Es war ein interessanter Befund, dass Estradiol keine akute Wirkung auf die *Ins/3*-Expression in MA-10 Zellen hat (Sadeghian *et al.*, 2005), da die Behandlung von Mutter-Ratten mit Estrogen im dritten Trimenon zu einer drastischen Verminderung der fötalen *Ins/3*-mRNA im Hoden, und zu Kryptorchidismus führt (Emmen *et al.*, 2000). Dieser Zusammenhang bestätigt, dass die *Ins/3*-Expression indirekt durch die Störung der

fötalen Leydigzell-Differenzierung geregelt wird. In Nagetieren ist Kryptorchidismus direkt mit der Expression des *Ins/3*-Gens in fötalen Leydigzellen verbunden. Es wurde gezeigt, dass mit der Ablation des Gens in Mäusen die Wechselwirkung des fötalen Hormons mit dem INSL3-Rezeptor (LGR8) auf dem Gubernaculum und in der Folge die Senkung des Hodens vom Bauch zum Leistengebiet gestört wird (Nef und Parada, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999). So war es überraschend, dass in der Immunohistochemie in den fötalen Leydig Zellen von Tag 1 und Tag 5 bei Ratten, wenn *Ins/3*-mRNA exprimiert wird (Spiess *et al.*, 1999), kein INSL3-Protein beobachtet werden konnte. Es gibt drei mögliche Erklärungen dafür. Erstens kann Protein von den fötalen Leydigzellen durch den konstitutiven Sekretionsweg freigesetzt werden, sobald es synthetisiert wird. Eine andere Erklärung ist, dass der für die Immunhistochemie verwendete Antikörper, der gegen die rekombinante Pro-Form gerichtet ist, wahrscheinlich Epitope auf dem C-Peptid des INSL3 erkennt. Es kann sein, dass dieser Teil des Proteins entweder nicht zugänglich ist, oder in den metabolisch hoch aktiven fötalen Leydigzellen sehr schnell degradiert wird. Eine dritte, weniger wahrscheinliche, Erklärung besteht darin, dass INSL3 in Säugetieren außer in Mäusen für den Abstieg des Hodens gar nicht notwendig ist. Hinweise in diese Richtung gibt es in Studien am Menschen, wo gezeigt werden konnte, dass a) in der Immunohistochemie trotz eines gut charakterisierten Antikörpers gegen menschlichen INSL3 fötale Hoden vom zweiten und dritten Trimenon keine Signale zeigen (Ivell, Balvers und Jezek, unveröffentlicht), b) die Messung von INSL3 im Nabelschnurblut von kryptorchiden Jungen keine Übereinstimmung mit der Pathologie zeigt (Bay *et al.*, 2004), und c) die umfassende genetische Analyse von kryptorchiden Jungen keine offensichtlich begründenden Veränderungen gezeigt hat (Feng *et al.*, 2004). Um diesen Aspekt der INSL3-Physiologie zu klären, sind umfassendere Forschungsarbeiten erforderlich.

5 Zusammenfassung

Das *InsI3*-Gen wird zelltyp-spezifisch in differenzierten Leydigzellen exprimiert. Allerdings sind die Faktoren, die die Aufregelung dieses Gens bewirken, noch unbekannt. Zur Aufklärung der hormonellen Kontrolle der Expression des *InsI3*-Gens wurden Promotor-Studien, hier für die Ratte und von anderen Arbeitsgruppen für die Maus, durchgeführt. Ein relativ kurzer Promotor-Bereich von etwa 200 bp scheint für die *InsI3* Gen-Transkription ausreichend zu sein. Dieser Promotor-Bereich wird durch drei putative Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SF-1 charakterisiert. Kotransfektion dieses Transkriptions-Faktors ist für maximale Reporter-gen-Aktivität sogar in unstimulierten Zellen ausreichend. So ist dieses Gen verschieden von anderen spezifischen Leydigzell-Genen wie StAR, wo für die maximale Aktivität, die Stimulation der Zellen durch, zum Beispiel, cAMP notwendig ist. Diese Studie hat zwei Hauptergebnisse: Erstens sind die drei SF-1 Stellen im Ratten-Promotor weder zueinander, noch zu denjenigen an ähnlichen Positionen im Maus-Promotor gleichwertig. Während in der Ratte die mehr proximale SF-1 Bindungsstelle die höchste Bindungs-Affinität besitzt, ist es in der Maus die mehr distale SF-1 Bindungsstelle, die diese Eigenschaft hat. Zweitens ist offensichtlich SF-1 allein nicht ausreichend, um den *InsI3*-Promotor zu aktivieren. Andere spezifische Leydig-Zell Faktoren sind auch erforderlich, die in der nicht steroidogenen COS7 Zelllinie nicht vorhanden sind. Alle Ergebnisse verstärken den Eindruck, dass es nur in Leydig-Zellen des reifen Phänotyps eine hohe konstitutive Aktivierung des *InsI3*-Gens gibt und dass der Transkriptionsfaktor SF-1 als die Hauptplattform funktioniert, um andere Zell-spezifische Kofaktoren zu rekrutieren.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

A	Adenin
AA	Arachidonsäure (<i>arachidonic acid</i>)
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase (<i>adenylate cyclase</i>)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ad.	adult
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches (<i>cyclic</i>) Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cGMP	zyklisches (<i>cyclic</i>) Guanosin-3',5'-monophosphat
Ci	Curie
cpm	Zählereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
cRNA	komplementäre RNA (<i>complementary RNA</i>)
C-Terminus	C-Terminus
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's modified of Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase I	Desoxyribonuclease I
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DSO	doppelsträngiges Oligonukleotid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Ethylendimethansulfonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
f.c.	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyphosphat-Dehydrogenase
GC	Guanylatzyklase (<i>guanylate cyclase</i>)
GnRH	Gonadotropin-freisetzendes Hormon (<i>gonadotropin releasing hormone</i>)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
hCG	humanes Choriogonadotropin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfat
HPG-Achse	Hypothalamo-hypophysär-gonadale Achse (<i>hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i>)
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (<i>insulin growth factor</i>)
INSL3	Insulin-ähnlicher Faktor 3 (<i>insulin-like factor 3</i>)

IP ₃	Inositol-1,3,5,-triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-Galactopyranosid
kb	Kilobasen (RNA), Kilobasenpaare (DNA)
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertami
Ley-IL	Leydigzell-spezifischer Insulin-ähnlicher Faktor
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-R	LH-Rezeptor
M	Molar
MA-10	Maus-Leydig-Zelllinie
m	Masse
mCi	Millicurie
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minuten
μl	Mikroliter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	Stoffmenge
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OLB	Oligonukleotid-Markierungspuffer (<i>Oligo labeling buffer</i>)
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
pBS	Plasmid Bluescript
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
p.c.	<i>postcoitum</i>
PC	Computer (<i>personal computer</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Hydrogenanion-Exponent (<i>potentia hydrogenii</i>)
PK(A,C)	Proteinkinase A,C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylflorid
p.n.	<i>postnatum</i>
POL	Polymerase
Poly-A ⁺ RNA	polyadenylierte RNA
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RLF	Relaxin-ähnlicher Faktor (<i>relaxin-like factor</i>)
RLX	Relaxin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RLU	relative Licht-Einheit (<i>relative light unit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA in cDNA
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulphat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SF-1	steroidogener Faktor-1 (<i>steroidogenic factor-1</i>)
sog.	sogenannt(e)
StAR	<i>steroid acute regulatory protein</i>
T	Thymidin
T _M	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TdT	Terminale Deoxinukleotid-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
N-Terminus	Amino-Terminus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Masse/Volumen
(w/w)	Masse/Masse
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
Σ	Summe

6.2 Glossar

<i>annealing</i>	Anlagerung eines <i>Primers</i> an sein <i>Template</i> (engl.)
<i>antisense-Strang</i>	zu der mRNA komplementäre DNA-Strang (engl.)
<i>antisense-Primer</i>	der Sequenz des <i>antisense</i> -Stranges entsprechender <i>Primer</i> (engl.)
<i>Assay</i>	Test/Untersuchung (engl.)
<i>Beads</i>	Kügelchen (engl.)
<i>blotten</i>	Übertragen von DNA/RNA/Protein auf Membranen
<i>blunt ends</i>	nicht überhängende (glatte) Enden eines dsDNA-Fragmentes nach Restriktionsverdau oder PCR mit den entsprechenden Enzymen (engl.)
<i>Cluster</i>	Haufen (engl.)
<i>Colony</i>	Bakterienkolonie (engl.)
<i>Consensus</i>	Übereinstimmung (lat.)
<i>Contig</i>	die Angrenzung (engl.)
<i>Dezensus</i>	Senkung (lat.)
<i>Elongation</i>	Verlängerung von DNA mittels Polymerasen (lat.)
<i>EST</i>	ansequenzierte cDNAs, <i>expressed sequence tags</i> (engl.)
<i>heat shock-Proteine</i>	Proteine, welche andere Proteine in ihrer Konformation stabilisieren (engl.)
<i>Insert</i>	in einen Plasmidvektor einkloniertes dsDNA-Fragment (engl.)
<i>knock-out</i>	gezieltes Ausschalten eines Gens durch homologe Rekombination (engl.)
<i>mismatch</i>	ungepaarte Basen in einer doppelsträngigen DNA (engl.)
<i>nested</i>	versetzt, verschoben (engl.)
<i>Pellet</i>	Kügelchen (engl.), beim Zentrifugieren entstehende Ansammlung am Boden

<i>Primer</i>	Oligonukleotid, welches als Startermolekül für DNA-Polymerasen dient (engl.)
<i>sense-Strang</i>	der mRNA entsprechende DNA-Strang (engl.)
<i>sense-Primer</i>	der Sequenz des <i>sense</i> -Stranges entsprechender Primer (engl.)
<i>single copy gene</i>	Gen, welches im Genom in nur einer Kopie vorkommt (engl.)
<i>sticky ends</i>	überhängende Enden eines dsDNA-Fragmentes nach Restriktionsverdau (engl.)
<i>Template</i>	Matrizen-DNA (engl.)
<i>Thermocycler</i>	PCR-Machine (engl.)
Transkript	die mRNA eines umgeschriebenen Gens (lat.)
<i>touch down</i>	schrittweises Herabsetzen der Annealing-Temperatur bei der PCR (engl.)
Vortexer	Apparatur zum Durchmischen kleiner Reaktionsgefäße
<i>Well</i>	Vertiefung in einer Zellkultur- oder Mikrotiterplatte (engl.)

6.3 Literaturverzeichnis

- Adham, I.M.,** Burghardt, E., Benahmed, M., Engel, W.
Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells.
J Biol Chem (1993), **268**: 26668-26672.
- Aitken, J.,** Fisher, H.
Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk.
Bioassays (1994), **16**: 259-26.
- Andrews, N.C.,** Faller, D.V.
A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells.
Nucleic Acids Res (1991), **19**:2499.
- Ascoli, M.**
Regulation of gonadotropin receptors and gonadotropin responses in a clonal strain of Leydig tumor cells by epidermal growth factor.
J Biol Chem (1981), **256**:179-183.
- Azhar, S.,** Menon, K.M.
Receptor mediated gonadotropin action in gonadal tissues: relationship between blood cholesterol levels and gonadotropin stimulated steroidogenesis in isolated rat Leydig and luteal cells.
J Steroid Biochem (1982), **16**: 175-184.
- Balvers, M.,** Spiess, A.N., Domagalski, R., Hunt, N., Kilic, E., Mukhopadhyay, A.K., Hanks, E., Charlton, H.M., Ivell, R.
Relaxin-like factor expression as a marker of differentiation in the mouse testis and ovary
Endocrinology (1998), **139**: 2960-2970.
- Bamberger, A.M.,** Ivell, R., Balvers, M., Kelp, B., Bamberger, C.M., Riethdorf, L., Löning, T.
Relaxin-like factor (RLF): a new specific marker for Leydig cells in the ovary.
Int J Gynecol Pathol (1999), **18**: 163-168.
- Bathgate, R.,** Balvers, M., Hunt, N., Ivell, R.
Relaxin-like factor gene is highly expressed in the bovine ovary of the cycle and pregnancy: sequence and messenger ribonucleic acid analysis.
Biol Reprod (1996), **55**: 1452-1457.
- Bathgate, R.,** Moniac, N., Bartlick, B., Schumacher, M., Fields, M., Ivell, R.
Expression and regulation of relaxin-like factor gene transcripts in the bovine ovary: differentiation-dependent expression in theca cell cultures.
Biol Reprod (1999), **61**: 1090-1098.
- Bay, K.,** Hartung, S., Ivell, R., Schumacher, M., Jorgensen, N., Skakkebaek, N.E., Andersson, A.M.
InsI3 serum levels in 135 normal men and 82 men with testicular disorders: relation to semen quality and the LH- testosterone axis.
J Clin. Endocrinol Metab (2005), **90**: 3410-3418.
- Bay, K.,** Schumacher, M., Hartung, S., Jürgensen, D., Andersson, A. M., Main, K.M., Boisen, K., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., Ivell, R.
Relaxin-like factor (RLF)/ Insulin-like hormone 3 (InsI3) measured in newborn and 3- months-old normal and Cryptorchid boys.
Hormone Res (2004), **62**: (Suppl.2) P2-434.
- Bergh, A.**
Treatment with hCG increases the size of Leydig cells and testicular macrophages in unilaterally cryptorchid rats.
Int J Androl (1987), **10**: 765-772.
- Berthelsen, J.G.,** Skakkebaek N.E.
Gonadal function in men with testis cancer.
Fertil Steril (1983), **39**: 68-75.
- Bhasin, S.,** de Kretser, D.M., Baker H.W.G.
Pathophysiology and natural history of male infertility.
J Clin Endocrinol Metab (1994), **79**: 1525-1529,
- Booth, W.D.**
Changes with age in the occurrence of C19 steroids in the testis and submaxillary gland of the boar.
J Reprod Fertil (1975), **42**: 459-472.
- Brandriff, B.,** Gordon, L., Ashworth, L., Watchmaker, G., Moore, II D., Wyrobek, A.J., Carrano A.V.
Chromosomes of human sperm: Variability among normal individuals.
Hum Genet (1985), **70**: 18-24.
- Brown, M.S.,** Kovanen, P.T., Goldstein, J.L.
Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex.
Recent Prog Horm Res (1979), **35**: 215-257.
- Büllesbach, E.E.,** Rhodes, R., Rembisesa, B., Schwabe, C.
The Relaxin-like Factor is a hormone.
Endocrine (1999), **10**: 167-169,
- Büllesbach, E.E.,** Schwabe, C.
Tryptophan B27 in the relaxin-like factor (RLF) is crucial for RLF receptor-binding.
Biochemistry (1999), **38**: 3073-3078
- Büllesbach, E.E.,** Schwabe, C.
Specific, high affinity relaxin-like factor receptors.
J Biol Chem (1999), **274**: 22354-22358.
- Büllesbach, E. E.,** Schwabe, C.
The trap-like relaxin-binding site of the leucine-rich G-protein-coupled receptor 7.
J Biol Chem (2005), **280**, 14051–14056.
- Burkhardt, E.,** Adham, I.M., Hobohm, U., Murphy, D., Sander, C., Engel W.
A human cDNA coding for the Leydig insulin-like peptide (Ley-IL).
Hum Genet (1994), **94**: 91-94.
- Burkhardt, E.,** Adham, I.M., Brosig, B., Gastmann, A., Mattei, M.G., Engel, W.
Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (INSL3).
Genomics (1994), **20**:13-19.

Cafilisch, C.R.
Effect of orally administered cadmium on in situ pH, pCO₂, and bicarbonate concentration in rat testis and epididymis.
J Toxicol Environ Health (1994), **42**: 323-330.

Caron, K.M., Ikeda, Y., Soo, S.C., Stocco, D.M., Parker, K.L., Clark, B.J.
Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein.
Mol Endocrinol (1997), **11**: 138-147.

Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T.
MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.
Bioinformatics (2005), **21**, 2933-42.

Chandley, A.C.
The genetic basis of male infertility.
Reprod Med Rev (1995), **4**: 1-8.

Christensen, A.K., Mason, N.R.
Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testis to synthesize androgens from progesterone-4¹⁴C *in vitro*.
Endocrinology (1965), **76**: 646-656.

Connel, C.J.
A scanning electron microscope study of the interstitial tissue of the canine testis.
Anat Rec (1976), **185**: 389-402.

Del Borgo, M., Bathgate, R.A., Hughes, R.A., Wade, J.D.
A conformationally constrained INSL3 B-chasin analogue is a potent antagonist of INSL3.
Fourth International Conference on Relaxin and Related Peptides (2004), Jackson lake, WY, USA. Abstract 0-10

Dorrington, J.H., Fritz, I.R.
Cellular localization of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the seminiferous tubule.
Endocrinology (1975), **96**: 879-889.

Dufau, M.L.
Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell.
Annu Rev Physiol (1988), **50**: 483-508.

Eaton, J.W., Mayer, A.J.
The social biology of very high fertility among the Hutterites: the demography of a unique population.
Hum Biol (1953), **25**: 260-264.

Eigenbrot, C., Randal, M., Quan, C., Burnier, J., O'Connell, L., Rinderknecht, E., Kossiakoff, A.A.
X-Ray structure of human relaxin at 1.5 Angstroms: Comparison to insulin and implications for receptor binding determinants.
J Mol Biol (1991), **221**: 15-21.

Emmen, J.M., McLuskey, A., Adham, I.M., Engel, W., Verhoef-Post, M., Themmen, A.P., Grootegoed, J.A., Brinkmann, A.O.
Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism.
Endocrinology (2000), **141**: 846-9.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M.
Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
Proc Natl Acad Sci U S A (1987), **84**: 7413-7417.

Feng, S., Cortessis, V.K., Hwang, A., Hardy, B., Koh, C.J., Bogatcheva, N.V., AgoulNIK, A.I.
Mutation analysis of INSL3 and GREAT/LGR8 genes in familial cryptorchidism.
Urology (2004), **64**: 1032-1036.

Foresta, C., Betella, A., Vinanzi, C., Dabrilii, P., Merriggiola, M.C., Garolla, A., Ferlin, A.
Insulin-like factor 3: a novel circulating hormone of testis origin in humans.
J Clin Endocrinol Metab (2004), **89**: 5952-5958.

Freeman, D.A., Ascoli, M.
Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells.
J Biol Chem (1982), **257**: 14231-14238.

Giwerzman, A., Bruun, E., Frimodt-Møller, C., Skakkebaek, N.E.
Prevalence of carcinoma *in situ* and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism.
J Urol (1989), **142**: 998-1002.

Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L., Betsholtz, C.
Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice.
J Cell Biol (2000), **149**: 1019-1026.

Greendale, G.A., Haas, S.T., Holbrook, K., Walsh, B., Schachter, J., Phillips, R.S.
The relationship of *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility.
Am J Pub Health (1993), **83**: 996-1001.

Gunnersen, J.M., Fu, P., Roche, P.J., Tregear, G.W.
Expresion of human relaxin genes: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species.
Mol Cell Endocrinol (1996), **118**, 85-94.

Hall, P.F., Sozer, C.C., Eik-Nes, K.B.
Formation of dehydroepiandrosterone during *in vivo* and *in vitro* biosynthesis of testosterone by testicular tissue.
Endocrinology (1964), **74**: 35-43.

Halvorson, L.M., Kaiser, U.B., Chin, W.W.
Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1.
J Biol Chem (1996), **271**: 6645-6650.

Hammar, M., Petersson, F.
Testosterone production in vitro in human testicular tissue.
Andrologia (1986), **18**: 196-200.

Hedger, M.P., Qin, J., Robertson, D.M., de Krester, D.M.
Intragonadal regulation of immune system functions.
Reprod Fertil Dev (1990), **2**: 263-280.

Hombach-Klonisch, S., Tetens, F., Kauffold, J., Steger, K., Fischer, B., Klonisch, T.
Molecular cloning and localization of caprine relaxin-like factor (RLF) mRNA within the goat testis.
Mol Reprod Dev (1999), **53**: 135-41.

Hombach-Klonisch, S., Kauffold, J., Rautenberg, T., Steger, K., Tetens, F., Fischer, B., Klonisch, T. Relaxin-like factor (RLF) mRNA expression in the fallow deer. *Mol Cell Endocrinol* (2000), **159**: 147-158.

Hombach-Klonisch, S., Schon, J., Kehlen, A., Blottner, S., Klonisch, T. Seasonal expression of INSL3 and LGR8/Insl3 receptor transcripts indicate variable differentiation of leydig cells in the roe deer testis. *Biol Reprod* (2004), **71**: 1079-1087.

Houghton, D., Houghton, P., (1984). Coping with childlessness. George Allan and Unwin (London)

Hutson, J.M., Donahoe, P.K. The hormonal control of testicular descent. *Endocr Rev* (1986), **7**: 270-283.

Ibayashi, H., Nakamura, M., Ichikawa, T., Murakawa, S., Yoshida, K., Nakao, K., Okinaka, S. C₁₉ steroids in canine spermatic venous blood following gonadotrophin administration. *Endocrinology* (1965), **76**: 347-352.

Ikeda, Y., Shen, W.-H., Ingraham, H.A., Parker, K.L. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* (1994), **8**: 654-662.

Irving-Rodgers, H.F., Bathgate, R.A.D., Ivell, R., Domagalski, R., Rodgers, R. J. Dynamic changes in the expression of relaxin-like factor (Insl3), cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in bovine ovarian follicles during growth and atresia. *Biol Reprod* (2002), **66**: 934-943.

Ivell, R., Balvers, M., Domagalski, R., Ungefroren, H., Hunt, N., Schulze, W. Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol Hum Reprod* (1997), **3**: 459-466.

Ivell, R., Bathgate, R., Kimura, T., Parry, L. Molecular biology of the oxytocin receptor: a comparative approach. *Biochem Soc Trans* (1997), **25**: 1058-1066.

Ivell, R., Pusch, W., Balvers, M., Valentin, M., Walther, N., Weinbauer, G. Progressive inactivation of the haploid expressed gene for the sperm-specific endozepine-like peptide (ELP) through primate evolution. *Gene* (2000), **255**: 335-345.

Ivell, R., Tillmann, G., Wang, H., Nicol, M., Stewart, P.M., Bartlick, B., Walther, N., Mason, J.I., Morley, S.D. Acute regulation of the bovine gene for steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in ovarian theca and adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* (2000), **24**: 109-118.

Ivell, R., Zarreh-Hoshyari-Khah, M.R., Bathgate, R.A.D., Balvers, M., Baker, P.J., O'Shaughnessy, P.J. The relaxin-like factor (RLF): from gene to physiology. In: Tregear, G.W., Ivell, R., Bathgate, R.A.D., Wade J.D. (eds.), Proceedings of the 3rd International Conference on Relaxin & Related Peptides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands (2001), pp 327-336.

Ivell, R., Balvers, M., Anand, R.J.K., Paust, H.J., Mckinnell, C., Sharpe, R. Differentiation-dependent expression of 17 β -HSD type 10 in the rodent testis: effect of aging in leydig cells. *Endocrinology* (2003), **144**: 3130-3137.

Juengel, J.L., Larrick, T.L., Meberg, B.M., Niswender, G.D. Luteal expression of steroidogenic factor-1 mRNA during the estrous cycle and in response to luteotropic and luteolytic stimuli in ewes. *Endocrine* (1998), **9**: 227-232.

Jury, J.A., Frayne, J., Hall, L. Sequence analysis of a variety of primate fertilin alpha genes: evidence for non-functional genes in the gorilla and man. *Mol Reprod Dev* (1998), **51**: 92-97.

Kascheike, B., Ivell, R., Walther N. Alterations in the chromatin structure of the distal promoter region of the bovine oxytocin gene correlate with ovarian expression. *DNA Cell Biol* (1997), **16**: 1237-1248.

Kawamura, K., Kumagai, J., Sudo, S., Chun, S.Y., Pisarska, M., Morita, H., Toppari, J., Fu, P., Wade, J.D., Bathgate, R.A., Hsueh, A.J. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004), **101**: 7323-7328.

Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L.E., Kempainen, J.A., Wilson, E.M. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* (1995), **375**: 381-385.

Keri, R.A., Nilson, J.H. A Steroidogenic Factor-1 Binding Site Is Required for Activity of the Luteinizing Hormone Beta Subunit Promoter in Gonadotropes of Transgenic Mice. *J Biol Chem* (1996), **271**: 10782-10785.

Khan, S.A., Khan, S.J., Dorrington, J.H. Interleukin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in immature Leydig cells *in vitro*. *Endocrinology* (1992a), **131**: 1853-1857.

Khan, S.A., Teerds, K., Dorrington, J. Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. *Biol Reprod* (1992b), **46**: 335-341.

Klonisch, T., Ivell, R., Balvers, M., Kliesch, S., Fischer, B., Bergman, M., Steger, K. Expression of relaxin-like factor is down-regulated in human testicular Leydig cell neoplasia. *Mol Hum Reprod* (1999), **5**: 104-108.

Koskimies, P., Spiess, A.N., Lahti, P., Huhtaniemi, I., Ivell, R. The mouse relaxin-like factor gene and its promoter are located within the 3' region of the JAK3 genomic sequence. *FEBS Lett* (1997), **419**: 186-90.

Koskimies, P., Virtanen, H., Lindstrom, M., Kaleva, M., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., Toppari, J. A common polymorphism in the human relaxin-like factor (RLF) gene: no relationship with cryptorchidism. *Pediatr Res* (2000), **47**: 538-541.

Koskimies, P., Levallet, J., Sipila, P., Huhtaniemi, I., Poutanen, M. Murine relaxin-like factor promoter : functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1. *Endocrinology* (2002), **143**: 909-919.

Krausz, C., Quintana-Murci, L., Fellous, M., Siffroi, J.P., McElreavey, K.
Absence of mutations involving the INSL3 gene in human idiopathic cryptorchidism.
Mol Hum Reprod (2000), **6**: 298-302.

Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Baity, L.A., Meade, J.C., Parker, K.L.
A cell-specific nuclear receptor regulates the steroid hydroxylases.
Steroids (1995), **60**(1), 10-14.

Leeson, C.R.
Observations on the fine structure of rat interstitial tissue.
Acta Anat (1963), **52**: 43-48.

Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L.
A cell specific nuclear receptor is required for adrenal and gonadal development and for male sexual differentiation.
Cell (1994), **77**: 481-490.

Majdic, G., Saunders, P.T.
Differential patterns of expression of DAX-1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) in the fetal rat testis.
Endocrinology (1996), **137**: 3586-3589.

Mandl, A.M.
The population of germ cells in immature male rats following irradiation at birth.
Proc R Soc Lond B Biol Sci (1966), **165**: 103-135.

Meschede, N., Horst, J.
The molecular genetics of male infertility.
Mol Hum Reprod (1997), **3**: 419-430.

Morgenstern, B.
DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment.
Bioinformatics (1999), **15**: 211-218.

Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., Omura, T.
A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s.
J Biol Chem (1992), **267**: 17913-17939.

Morris, M.D., Chaikoff, I.L.
The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and the testes of rat: dietary versus endogenous contributions.
J Biol Chem (1959), **234**: 1095-1097.

Morris, I.D., Phillips, D.M., Bardin, C.W.
Ethylene dimethanesulfonate destroys Leydig cells in the rat testis.
Endocrinology (1986), **118**: 709-719.

Nef, S., Parada, L.F.
Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*.
Nat Genet (1999), **22**: 295-299.

Nef, S., Shipman, T., Parada, L.F.
A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism.
Dev Biol (2000), **224**: 354-361.

O'Shaughnessy, P.J.
Steroidogenic enzyme activity in the hypogonadal (*hpg*) mouse testis and effect of treatment with luteinizing hormone.
J Steroid Biochem Molec Biol (1991), **39**: 921-928.

O'Shaughnessy, P.J., Murphy, L.
Steroidogenic enzyme activity in the rat testis following Leydig cell destruction by ethylene-1,2-dimethanesulphonate and during subsequent Leydig cell regeneration.
J Endocrinol (1991), **131**: 451-457.

Palayoor, T., Batra, B.K.
Effects of maternal x-irradiation of mice on the germ cells of their progeny.
Indian J Exp Biol (1969), **7**: 89-92.

Parker, K.L.
The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function.
Mol Cell Endocrinol (1998), **145**: 15-20.

Paust, H.J., Wessels, J., Ivell, R., Mukhopadhyay, A.K.
The expression of the RLF/INSL3 gene is reduced in Leydig cells of the aging rat testis.
Exp Gerontol (2002), **37**: 1461-1467.

Perez, C., Novoa, J., Alcaniz, J., Salto, L., Barcelo, B.
Leydig cell tumour of the testis with gynaecomastia and elevated oestrogen, progesterone and prolactin levels: case report.
Clin Endocrinol (1980), **13**: 409-412.

Preslock, J.P., Steinberger, E.
Testicular steroidogenesis in the common marmoset, *Callithrix jacchus*.
Biol Reprod (1977), **17**: 289-293.

Pusch, W., Balvers, M., Ivell, R.
Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis.
Endocrinology (1996), **137**: 3009-3013.

Quinn, P.G., Dombrowsky, L.J., Chen, Y.D., Payne, A.H.
Serum lipoproteins increase testosterone production in hCG-desensitized Leydig cells.
Endocrinology (1981), **109**: 1790-1792.

Radburn, D.J., Coquelin, A., Reinhart, A.J., Hutson, J.C.
Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis.
J Reprod Immunol (1993), **24**: 139-151.

Ramkissoon, Y., Goodfellow P.
Early steps in mammalian sex determination.
Curr Opin Genet Devel (1996), **6**: 316-321.

Reijo, R., Lee, T.-Y., Dalo, P.
Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene.
Nature Genet (1995), **10**: 383-393.

Rice, D.A., Mouw, A.R., Bogerd, A.M., Parker, K.L.
A shared promotor element regulates the expression of three steroidogenic enzymes.
Mol Endocrinol (1991), **5**: 1552-1561.

Roche, P.J., Butkus, A., Wintour, E.M., Tregear, J.
Structure and expression of Leydig insulin-like peptide mRNA in the sheep.
Mol Cell Endocrinol (1996), **121**: 171-177.

Rosengren, K. J., Zhang, S., Lin, F., Daly, N. L., Scott, D.J., Hughes, R.A., Bathgate, R.A.D., Craik, D.J., Wade, J. D.
Solution Structure and Characterization of the LGR8 Receptor Binding Surface of Insulin-like Peptide 3.
J Bio Chem (2006), **281**: 28287–28295.

Sadeghian, H., Anand-Ivell, R., Balvers, M., Relan, V., Ivell, R.
Constitutive regulation of *Ins13* gene in rat Leydig cells.
Mol Cell Endocrinol (2005), **241**:10-20.

Sadovvsky, Y., Crawford, P.A.
Development and physiologie roles of the nuclear receptor steroidogenic factor-1 in the reproductive system.
J Soc Gynecol Investing (1998), **5**: 6-12.

Schulze, C.
Sertoli cells and Leydig cells in man.
Adv Anat Embryol Cell Biol (1984), **88**: 1-104.

Sharpe, R.
Another DDT connection.
Nature (1995), **375**: 538-539.

Sheffield, J.W., O'Shaughnessy, P.J.
Testicular steroid metabolism during development in the normal and hypogonadal mouse.
J Endocrinol (1988), **119**: 257-264.

Shen Y., Sangiah, S.
 Na^+ , K^+ -ATPase, glutathione, and hydroxyl free radicals in cadmium chloride-induced testicular toxicity in mice.
Arch Environ Contam Toxicol (1995), **29**: 174-189.

Skakkebaek, N.E., Berthelsen, J.E., Giwercman, A., Müller, J.
Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma.
Int J Androl (1987), **10**: 19-28.

Slaunwhite, W.R., Jr., Samuels, L.T.
Progesterone as a precursor of testicular androgens.
J Biol Chem (1956), **220**:341-352.

Spanel-Borowski, K., Schäfer, I., Zimmermann, S., Engel, W., Adham, I.M.
Increase in final stages of follicular atresia and premature decay of corpora lutea in *Ins13*-deficient mice.
Mol Reprod Dev (2001), **58**: 281-286.

Spiess, A.N., Balvers, M., Tena-Sempere, M., Hutaniemi, I., Parry, L., Ivell, R.
Structure and expression of the rat relaxin-like factor (RLF) gene.
Mol Reprod Dev (1999), **54**: 319-325.

Stedronsky, K., Telgmann, R., Tillmann, G., Walther, N., Ivell, R.
The affinity and activity of the multiple hormone response element in the proximal promoter of the human oxytocin gene.
J Neuroendocrinol (2002), **14**:472-485.

Tapanainen, J.S., Vaskivuo, T., Aittomäki, K., Huhtaniemi, I.T.
Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction.
Mol Cell Endocrinol (1998), **145**: 129-135.

Wadhera, S.
Trends in birth and fertility rates, Canada, 1921-1987.
Health Rep (1989), **1**: 211-223.

Walther, N., Wehrenberg, U., Kascheike, B., Jansen, M., Ivell, R.
Regulation of oxytocin expression in the bovine corpus luteum: Orphan receptors and the oxytocin promoter.
Adv Exp Med Biol (1995), **395**: 79-90.

Wang, J., Wreford, N.G.M., Lan, H.Y., Atkins, R., Hedger, M.P.
Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants.
Biol Reprod (1994), **51**: 551-556.

Wehrenberg, U., Ivell, R., Jansen, M., von Goedecke, S., Walther, N.
Two orphan receptors binding to a common site are involved in the regulation of the oxytocin gene in the bovine ovary.
Proc Natl Acad Sci USA (1994), **91**: 1440-1444.

WHO.
Infections, pregnancies, and infertility: Perspectives on prevention.
Fertility and Sterility (1987), **47**:964-968.

Wilson, V.S., Lambright, C., Furr, J., Ostby, J., Wood, C., Held, G., Gray, L.E.
Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced *Ins13* gene expression in the fetal rat testis.
Toxicol Lett (2004), **146**: 207-215.

Wright, J., Allard, M., Lecours, A., Sabourin, S.
Psychosocial distress and infertility: a review of controlled research.
Int J Fertil (1989), **34**: 126-142.

Zarreh-Hoshyari-Khah, M.R., Einspanier, A., Ivell, R.
Differential splicing and expression of the relaxin-like factor gene in reproductive tissues of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*).
Biol Reprod (1999), **60**: 445-453.

Zhang, F.P., Markkula, M., Toppari, J., Huhtaniemi, I.
Novel expression of luteinizing hormone subunit genes in the rat testis.
Endocrinology (1995), **136**: 2904-2912.

Zimmermann, S., Schottler, P., Engel, W., Adham, I.M.
Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development.
Mol Reprod Dev (1997), **47**: 30-38.

Zimmermann, S., Schwärzler, A., Buth, S., Engel, W., Adham, I.M.

Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1.

Mol Endocrinol (1998), **12**: 706-713.

Zimmermann, S., Steding, G., Emmen, J.M.A., Brinkmann, A.O., Nayernia, K., Holstein, A.F., Engel, W., Adham, I.M.

Targeted disruption of the *INSL3* gene causes bilateral cryptorchidism.

Mol Endocrinol (1999), **13**: 681-691.

6.4 Danksagung

Diese Arbeit wurde von September 2000 bis Februar 2003 am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF) der Universität Hamburg unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Richard Ivell erstellt. Sie wurde durch das Graduiertenkolleg 336 finanziert.

Prof. Dr. Richard Ivell gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, die zahlreichen und fruchtbaren Diskussionen und die Möglichkeit, die Ergebnisse zu präsentieren. Auch danke ich ihm für seine immerwährende Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Hans Joachim Seitz danke ich für die exzellenten Forschungsbedingungen, die geduldige Ermutigung und die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herrn PD. Dr. Norbert Walther vom Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF) der Universität Hamburg möchte ich ganz herzlich für die jahrelange praktische und theoretische Anleitung im Institut und für die Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. R. Zarreh-Hoshyari-Khah, Herrn Dr. R Telgmann, Herrn Dr. Andrej Spiess und Herrn Roger Domagalski verdanke ich die praktische Einarbeitung und die konstante Unterstützung während des experimentellen Teils meiner Arbeit. Frau Marga Balvers möchte ich für die Hilfestellung bei der Immunhistochemie danken. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ulrike Braun für die kritische Begutachtung meiner Interpretation der deutschen Grammatik.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für ihren Beistand und die tatkräftige Unterstützung.

Den vielen Tieren, die für meine Doktorarbeit das Leben lassen mussten, gebührt nicht nur mein Dank, sondern auch meine Traurigkeit.

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Helen Sadeghian
Adresse: Kiebitzreihe 31
22844 Norderstedt
Geburtsdatum: 30.10.1964
Geburtsort: Abhar / Iran
Familienstand: verheiratet
Kind: ein
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schul Ausbildung:

1970 - 1975 Grundschole Zandjan / Iran
1975 - 1978 Mittelschole Zandjan
1978 - 1982 Gymnasium Zandjan
1982 Abitur in der Fachrichtung Mathematik und Physik
1983 Abitur in der Fachrichtung Experimentelle Wissenschaften

Studium:

1983 - 1984 Vorbereitung auf die Aufnahmeprüfung für die Universität
Teheran / Iran
1984 - 1993 Studium der Humanmedizin
Universität Teheran
1990 - 1992 Promotion, Universität Teheran
Thema: Magenfrühkarzinom
01/1993 Doktor der Medizin
2000 - 2002 Aufbaustudium „Molekularbiologie“ an der Universität Hamburg

Berufliche Tätigkeiten:

09/1985 - 11/1987 Studentische Hilfskraft der Anatomie am medizinischen
Fachbereich der Universität Teheran
01/1990 - 12/1993 Dokumentation der Daten über Nieren-transplantation
Internationales Nierentransplantationszentrum, Heidelberg
Leitung: Professor Opelz
01/1993 - 01/1996 Ärztin für Allgemeinmedizin
Asia Krankenhaus, Teheran
09/1994 -10/1995 Ärztin für Allgemeinmedizin
Gesundheitszentrum, Nord-Teheran
02/1997 - 08/1997 Gastärztin
Neurochirurgische Klinik der medizinischen Hochschule
Hannover
09/2000 - 01/2003 Direktor : Professor Samii
Gastwissenschaftlerin
Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der
Universität Hamburg
Seit 02/2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Gynäkopathologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

Promotion:

1990 - 1992 Thema: Magenfrühkarzinom an der Universität Teheran
01/1993 Doktor der Medizin
09/2000 – 02/2003 Vorliegende Arbeit am Institut für Hormon- und
Fortpflanzungsforschung (IHF) an der Universität Hamburg im
Fachbereich Medizin

6.6 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Wesentliche Teile der vorgelegten Doktorarbeit sind im nachfolgenden Artikel veröffentlicht.

Helen Sadeghian, Ravinder Anand-Ivell, Marga Balvers, Vandana Relan und Richard Ivell
Constitutive regulation of the *Insl3* gene in rat Leydig cells
Mol.Cell.Endocrinol. (2005), 241:10-20

Helen Sadeghian

Hamburg, den 15. Sep. 2007