

**Charakterisierung der Expression
des Transkriptionsfaktors
PLZF "*promyelocytic leukemia zinc finger*"
in humanen uterinen Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jasmin Fahnenstich
aus Duisburg

Hamburg
2002

Die vorliegende Arbeit wurde am "Institut für Hormon und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg" durchgeführt.

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. R. Ivell
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. L. Renwrantz

1.	Zusammenfassung	4
2.	Einleitung	7
2.1	Der menschliche Uterus	7
2.1.1	Aufbau.....	7
2.1.2	Der Uterus im Menstruations-Zyklus.....	8
2.1.3	Schwangerschaft und Geburt.....	10
2.2	Hämatopoese	11
2.3	Das PLZF-Gen und sein Protein	13
2.3.1	Akute promyeloische Leukämie (APL).....	13
2.3.2	Struktur.....	15
2.3.3	Expression.....	16
2.3.4	Funktion.....	17
2.4	Nukleäre Hormonrezeptoren	20
2.4.1	Allgemeines.....	20
2.4.2	Der Progesteronrezeptor.....	22
2.4.2.1	Struktur.....	22
2.4.2.2	Expression.....	22
2.4.2.3	Funktion.....	23
2.4.3	Der Glukokortikoidrezeptor.....	24
2.4.3.1	Struktur.....	24
2.4.3.2	Expression.....	25
2.4.3.3	Funktion.....	25
2.5	Ziel der Arbeit	28
3.	Material und Methoden	30
3.1	Zellkultur	30
3.1.1	Isolierung und Kultivierung von Primärzellen aus uterinem Gewebe.....	30
3.1.1.1	Präparation endometrialer Stromazellen (ESZ).....	30
3.1.1.2	Präparation myometrialer glatter Muskelzellen (MMZ).....	31
3.1.2	Kultivierung von Zelllinien.....	33
3.1.2.1	KG-1.....	33
3.1.2.2	HL-60.....	33
3.1.2.3	Jurkat, E6.1.....	33
3.1.2.4	T47D.....	34
3.1.2.5	SKUT-1B.....	34
3.1.3	Stimulierung der Zellkulturen.....	34
3.2	Bakterien	35
3.2.1	Transformation und Aufzucht von Bakterien.....	35
3.2.2	Plasmid-Minipräparation.....	36
3.2.3	Plasmid-Maxipräparation.....	36
3.3	Molekularbiologische Methoden	36
3.3.1	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	37
3.3.2	RNA-Isolierung.....	37
3.3.3	Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA.....	37
3.3.4	Northern Blot-Analyse.....	37
3.3.4.1	Probenvorbereitung.....	38
3.3.4.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.3.4.3	Kapillartransfer von RNA auf Nylon-Membranen.....	38
3.3.4.4	Herstellung und Markierung der Sonden.....	38
3.3.4.5	Hybridisierung und Detektion.....	39
3.3.5	cDNA-Synthese/Reverse Transkription.....	40

3.3.6	RT-PCR; Southern Blot	40
3.3.6.1	RT-PCR (<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)	41
3.3.6.2	Agarose-Gelelektrophorese und Transfer	43
3.3.6.3	Markierung der Oligonukleotid-Sonden	44
3.3.6.4	Hybridisierung und Detektion	45
3.3.6.5	Strippen eines Southern Blotes	47
3.3.7	Quantitative <i>real time</i> -PCR	47
3.3.8	5'-RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)	48
3.3.9	Sequenzierung von DNA	49
3.3.10	Klonierung der PLZF-Promotorkonstrukte	50
3.3.11	Transiente Transfektion	51
3.3.11.1	Transfektion von adhärenenten Zellen	52
3.3.11.2	Transfektion von Suspensionszellen	53
3.3.11.3	Luziferase-Assay	53
3.3.12	Immunfluoreszenz	54
3.4	Methoden zur Identifizierung von PLZF-Zielgenen	54
3.4.1	Klonierung der VP22-Fusionskonstrukte	55
3.4.2	<i>In vitro</i> -Transkription/Translation (IVTT)	57
3.4.2.1	IVTT-Reaktion	57
3.4.2.2	Probenvorbereitung	58
3.4.2.3	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	58
3.4.2.4	Fixierung	59
3.4.3	Expression der VP22-Fusionsproteine in Bakterien	60
4.	Ergebnisse	61
4.1	Kultivierung von ESZ und MMZ	61
4.2	Expression von PLZF	62
4.2.1	Nachweis von PLZF-mRNA im Northern Blot	62
4.2.2	Nachweis von PLZF-mRNA durch RT-PCR	64
4.2.2.1	Versuchsaufbau	64
4.2.2.2	PLZF wird in ESZ und MMZ steroidabhängig exprimiert	65
4.2.2.3	Die PLZF-Expression wird gleichermaßen von Steroiden und ihren synthetischen Derivaten induziert	67
4.2.2.4	Wirkung von Steroidrezeptorantagonisten auf die PLZF-Expression nach Behandlung mit DEX und P	67
4.2.2.5	Wirkung von RA auf die PLZF-Expression unter Behandlung mit DEX oder P	68
4.2.2.6	Zeit- und Dosisabhängigkeit der Induktion der PLZF-Expression durch DEX und P	69
4.2.2.7	PLZF-Expression in KG-1- und T47D-Zellen	71
4.2.3	Nachweis von endogenem PLZF-Protein in MMZ durch Immunfluoreszenz	72
4.3	Expression von GR und PR in verschiedenen Zelltypen	73
4.4	Expression des GR in DEX-behandelten MMZ	74
4.5	Mögliche Zielgene von PLZF	74
4.5.1	Expression von ZyklinA2, IL-3R α , CRH und POMC in DEX-behandelten MMZ	75
4.5.2	Expression von HOXA10 und HOXA11 in DEX- und P-behandelten MMZ	76
4.6	Transkriptionsstartbestimmung des PLZF-Gens	77
4.6.1	Computergestützte Transkriptionsstart- und Promotor-Bestimmung	77
4.6.2	5'-RACE	78
4.7	Klonierung des PLZF-Promotors	79
4.8	Transfektionsstudien des PLZF-Promotorbereiches	80
4.8.1	Einfluss von GR auf die PLZF-Promotoraktivität	81

4.8.2	Einfluss von GR und C/EBP β auf die PLZF-Promotoraktivität	82
4.8.3	Einfluss von GR, HOXA10 und STAT5 auf die Promotoraktivität.....	84
4.9	PLZF-Zielgensuche	85
4.9.1	VP22-Fusionskonstrukte	86
4.9.1.1	Klonierung	86
4.9.1.2	<i>In vitro</i> -Transkription/Translation (IVTT)	87
4.9.2	Bakterielle VP22-Fusionsprotein-Expression	88
5.	<i>Diskussion</i>	91
5.1	Endogene Expression von PLZF.....	92
5.2	PLZF-Promotorstudien	96
5.3	PLZF-Zielgensuche	100
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	104
7.	<i>Anhang</i>	113
8.	<i>Danksagung</i>	117
9.	<i>Lebenslauf</i>.....	118

1. Zusammenfassung

Die Entwicklung eines Organismus und seiner Organe ist bestimmt von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod, um die optimale Funktionalität des Systems zu gewährleisten. An diesen grundlegenden Vorgängen sind unzählige Faktoren beteiligt, welche durch ein abgestimmtes Zusammenspiel den reibungslosen Ablauf des Lebens ermöglichen.

Kann jedoch ein Faktor durch Veränderung seiner Regulierung oder Funktion nicht mehr die ihm zustehenden Aufgaben erfüllen, so gerät das abgestimmte Zusammenspiel aus der wichtigen Balance.

Das *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF)-Protein ist solch ein Faktor. Der Transkriptionsfaktor PLZF gehört aufgrund seiner neun Zinkfinger des C₂-H₂-Typs zur Familie der *Krüppel*-ähnlichen Zinkfingerproteine und wurde zunächst in seiner Eigenschaft als Fusionspartner des Retinolsäurerezeptors α (RAR α) in der akuten promyeloischen Leukämie (APL) entdeckt. Diese reziproke balancierte Translokation t(11;17)(q23;q21) zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren führt zu zwei Fusionsproteinen, die beide für die Ausprägung des APL-Vollbildes verantwortlich sind und eine Differenzierungsblockade myeloischer Zellen im Promyelozyten-Stadium der Hämatopoese auslösen. Dies erfolgt aufgrund der aberranten Wirkung der Fusionsproteine. Das Fusionsprotein PLZF/RAR α enthält die transkriptionell reprimierend wirkenden BTB/POZ und RD2-Domänen des PLZF-Proteins, aber die für RAR α -Zielgene spezifische DNA-Bindungsdomäne (DBD) und steht unter der Kontrolle des bisher unbekanntem PLZF-Promotors. Das Fusionsprotein RAR α /PLZF hingegen enthält eine transkriptionell aktivatorisch wirkende Domäne des RAR α -Proteins, aber die für PLZF-Zielgene spezifische DBD und steht unter der Kontrolle des RAR α -Promotors. Dies bewirkt die pathologischen Auswirkungen in der APL; die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen, die Hämatopoese, wird gestört. Im Gegensatz zu anderen Leukämien des APL-Typs ist die Leukämie, die aufgrund der Fusion von PLZF und RAR α entsteht, nicht durch Retinolsäure (RA) therapierbar. Daher besteht dringender Bedarf, die Regulierung der PLZF-Expression zu charakterisieren und die PLZF-Zielgene zu identifizieren.

Nicht nur in der Hämatopoese, in der z.B. aufgrund der RA-induzierten Monozyten-differenzierung die PLZF-Expression abnimmt, spielen Zellwachstum und -differenzierung eine wichtige Rolle.

Besonders im Uterus und in der Brustdrüse sind diese Mechanismen unter dem Einfluss von Steroiden wie Östradiol, Progesteron und Glukokortikoiden von großer Bedeutung. Östradiol und Progesteron sind vor allem an der Implantation durch Bereitstellung eines geeigneten

differenzierten, dezidualisierten Endometriums und an der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft durch Förderung des uterinen Wachstums und Unterdrückung myometrialer Kontraktionen beteiligt. Außerdem dienen diese Steroide der Entwicklung duktaler Strukturen und alveolärer Lobuli in der Brustdrüse. Glukokortikoide besitzen nicht nur immunsupprimierende und antiinflammatorische Wirkungen, sie nehmen auch Einfluss auf physiologische Prozesse sowie Zellwachstum und -differenzierung. Sie spielen eine Rolle in der Unterstützung uteriner Kontraktionen zur Erleichterung der Geburt, sind an der Kontrolle der Brustdrüsenentwicklung und Milchproteinsynthese beteiligt, nehmen Einfluss auf die Lungenreifung im Fötus und können den Osteoblasten-Zellzyklus in der G₁-/S-Phase blockieren. Die Wege der Steroidwirkung in ihren Zielgeweben sind bis heute nicht sehr gut aufgeklärt. Aufgrund der wichtigen Funktionen, die Steroide ausüben, ist es von großem Interesse Ziele der Steroidwirkung zu identifizieren.

Im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung wurde von Dr. Norbert Walther das bovine Homolog des PLZF in einer Rinderovar-cDNA-Bank auf der Suche nach Zinkfingerproteinen identifiziert und seine steroidabhängige Expression im bovinen Endometrium nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die PLZF-Expression in kultivierten humanen endometrialen Stromazellen (ESZ), humanen myometrialen glatten Muskelzellen (MMZ) und in T47D-Zellen, einer Brustkrebszelllinie, mit Hilfe von Northern Blot und/oder RT-PCR-Analyse und Southern Blot nachgewiesen werden. Dabei war in allen drei Fällen die Induktion, vermittelt durch das Glukokortikoid Dexamethason (DEX), viel stärker als durch Progesteron (P). Die potente Induktion der PLZF-Expression erfolgte schon innerhalb von 2-3 Stunden und hielt mindestens 72 Stunden an. In der hämatopoetischen Zelllinie KG-1 war keine Änderung der basal hohen PLZF-Expression zu verzeichnen, was auf eine zelltypspezifische Induktion schließen lässt. Nicht nur die Expression der PLZF-mRNA konnte in primären uterinen Zellen nachgewiesen werden, sondern es konnte auch erstmals das endogene Protein nach DEX-Behandlung in MMZ mittels Immunfluoreszenz in der charakteristischen punktuellen Ansammlung im Zellkern dargestellt werden. Die Vermittlung der Glukokortikoidwirkung scheint über den Glukokortikoidrezeptor (GR) zu verlaufen, da der GR-/PR-Antagonist RU486 die starke Induktion der PLZF-Expression durch DEX nahezu vollständig unterband.

Der bisher unbekannte Start der PLZF-Transkription wurde für MMZ und KG-1-Zellen bestimmt, und verschieden lange 5'-flankierende Bereiche des PLZF-Promotors (zwischen 0,6 kb und 4,1 kb) wurden kloniert. In Transfektionsexperimenten konnte daraufhin keine Induktion dieser Promotorbereiche durch DEX und den GR nachgewiesen werden. Weiterführende

Experimente müssen nun beweisen, ob die für die Induktion relevanten Glukokortikoid-responsiven Elemente (GREs) außerhalb der getesteten Promotorregion liegen, ob es sich bei der starken Induktionswirkung von DEX auf die PLZF-Expression um nichtgenomische Steroidwirkungen oder um Protein/Protein-Wechselwirkungen des GR mit anderen Faktoren handelt. Eine mögliche Protein/Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie STAT5 und HOXA10 konnte in einem Transfektionsexperiment nicht gezeigt werden.

Um die Frage nach der Relevanz von PLZF in Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsvorgängen hämatopoetischer und uteriner Zellen aus dem Bereich der Spekulation zu bewegen, ist es wichtig die Zielgene des Transkriptionsfaktors PLZF zu identifizieren. Bisher konnten nur ZyklinA2, ein wichtiger Faktor der Zellzyklusmaschinerie, und IL3-R α , die Untereinheit eines an der Hämatopoese beteiligten Zytokinrezeptors, als Ziel der PLZF-Wirkung identifiziert werden. In dieser Arbeit konnte kein eindeutiger Hinweis erhalten werden, dass PLZF die Expression einer der beiden Faktoren in uterinen Zellen beeinflusst, genausowenig wie die Expression der Transkriptionsfaktoren HOXA10 und HOXA11.

Eine gute Möglichkeit, PLZF-Zielgene im Uterus zu identifizieren, ist die Methode des cDNA-*Microarray*. Dafür ist es notwendig, das PLZF-Protein effizient in die Zellkerne von ESZ und MMZ zu schleusen und das unter dem PLZF-Einfluss entstehende Expressionsprofil im cDNA-*Microarray* mit dem von unbehandelten Zellen zu vergleichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden VP22-PLZF-Fusionsproteine bakteriell exprimiert, die aufgrund ihrer viralen VP22-Domäne in der Lage sein sollen, in den Zellkern einer Säugetierzelle zu translozieren. In einem Fusionsprotein liegt PLZF als Wildtypform mit seinen Repressordomänen vor, in dem anderen Fusionsprotein ist eine virale VP16-Aktivierungsdomäne der DBD von PLZF vorangeschaltet. Diese VP22-Fusionsproteine werden zur Zeit mit Hilfe von Transfektions- und Immunfluoreszenzexperimenten auf ihre Funktionalität getestet und können danach ESZ und MMZ appliziert werden. Mit Hilfe der sich ergebenden Expressionsprofile sollte es möglich werden, PLZF-Zielgene zu identifizieren und die Funktion von PLZF im Uterus näher zu charakterisieren.

2. Einleitung

Die Entwicklung eines menschlichen Organismus und seiner Organe von einfachen Grundstrukturen zu einem komplexen System basiert auf einem abgestimmten Zusammenspiel von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod.

Diese grundlegenden und essenziellen Vorgänge nehmen Einfluss auf die Funktionalität des Systems und sind daher einer strengen Regulierung unterworfen.

2.1 Der menschliche Uterus

2.1.1 Aufbau

Der Uterus ist in die Bereiche Fundus, Korpus und Zervix untergliedert (Abb. 2.1). Strukturell werden drei Schichten unterschieden: das Endometrium, das Myometrium und die Serosa (Abb. 2.1). Die innere Auskleidung des Uterus, das Endometrium, dient der Einnistung des Embryos. Dieser Vorgang wird auch Implantation genannt. Der größte Strukturanteil des Uterus ist das Myometrium, dessen glatte Muskelzellen die uterinen Kontraktionen bewirken. Die Serosa umkleidet das Myometrium und grenzt den Uterus von der Bauchhöhle ab (*Carr 1998; Grainger 1998*).

Der menschliche Uterus erfüllt zwei Funktionen. Zum einen dient er dem Embryo als Ort der Entwicklung, in dem der Embryo während der Schwangerschaft mit Nährstoffen versorgt wird. Zum anderen bewirkt der Uterus die Austreibung des Fötus während der Geburt und besitzt daher einen sehr großen Anteil an glatter Muskulatur.

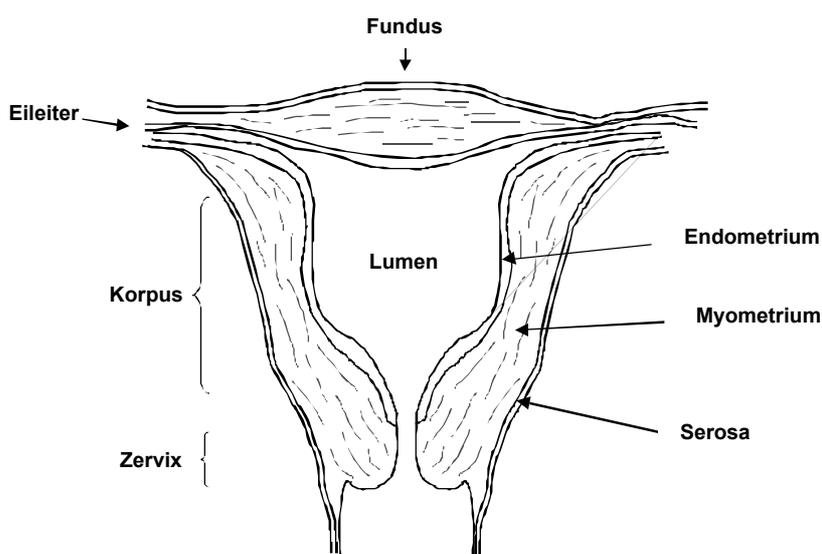


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des menschlichen Uterus.

2.1.2 Der Uterus im Menstruations-Zyklus

Beim Menschen erstreckt sich die Phase der weiblichen Reproduktionsfähigkeit von der Pubertät bis zur Menopause. Während dieser Periode durchläuft der menschliche Uterus 400-500 aufeinanderfolgende Zyklen. Jeder Zyklus, der ca. 28 Tage dauert, ist in drei Phasen unterteilt: die proliferative Phase, die sekretorische Phase und die Menstruations-Phase (Abb. 2.2).

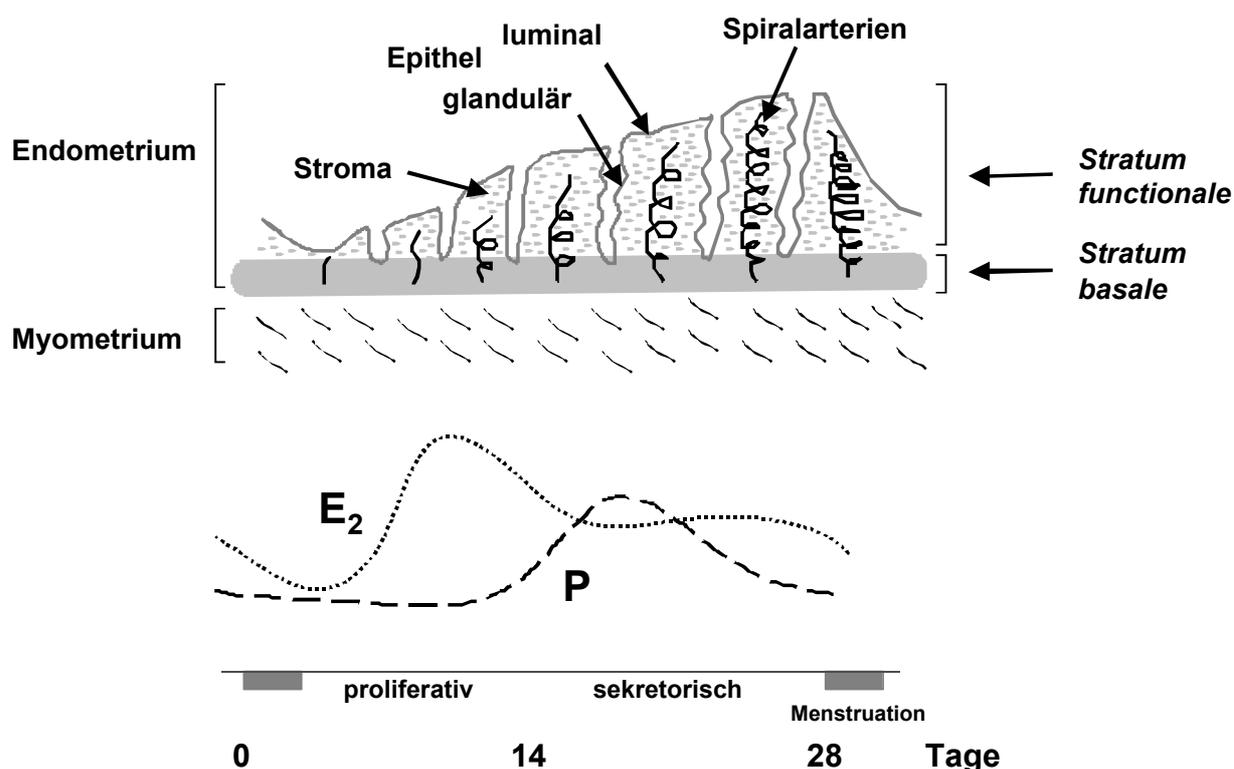


Abbildung 2.2: Der menschliche Menstruations-Zyklus.

Die obere Hälfte der Abbildung zeigt einen schematischen Querschnitt des Endometriums und Myometriums während des Monatszyklus. Im unteren Teil sind die Veränderungen im Plasmaspiegel von Östradiol (E_2) und Progesteron dargestellt.

Der äußeren muskulären Schicht, dem Myometrium, liegt eine innere Schicht auf, das Endometrium. Das Endometrium untergliedert sich in das äußere, dünnere *Stratum basale* und das innere, dickere *Stratum functionale*. Das Endometrium besteht zu einem großen Teil aus endometrialen stromalen Zellen (ESZ) und wird zum Lumen gerichtet von einer luminalen Epithelzellschicht bedeckt. Auch das glanduläre Kompartiment wird von Epithelzellen gebildet, die mesodermalen Ursprungs sind. Das Endometrium der basalen Schicht wird von geraden Arterien versorgt, wohingegen die Arterien im *Stratum functionale* gewunden und spiralförmig sind (Abb. 2.2). Zwischen den verschiedenen Bestandteilen des Endometriums, also Epithel,

Stroma, Blutgefäßzellen, aber auch Zellen des Immunsystems, bestehen komplexe parakrine Mechanismen, welche die koordinierte Entwicklung und Differenzierung des Endometriums innerhalb des Zyklus und der Schwangerschaft beeinflussen. Das Endometrium sowie das Myometrium sind Zielgewebe von Östrogen und Progesteron. Beide Steroide üben ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren aus, an die sie mit hoher Affinität binden (Näheres zu nukleären Hormonrezeptoren siehe Kapitel 2.4).

Während zu Beginn des uterinen Zyklus ein Follikel im Ovar heranreift, stimuliert ovariell gebildetes Östrogen die schnelle Proliferation des Endometriums und die Expression des Östrogenrezeptors. Aber auch die Expression des Progesteronrezeptors (PR), als eine Voraussetzung der späteren Progesteronwirkung, wird verstärkt. Das *Stratum functionale* verdickt sich und Drüsen und Blutgefäße des Gewebes wachsen. Zu diesem Zeitpunkt wird das Endometrium als "proliferativ" bezeichnet.

Um den 14. Tag des Zyklus erfolgt der Eisprung (Ovulation). Nach der Ovulation stimuliert Progesteron, welches vom Gelbkörper (*Corpus luteum*) sezerniert wird, die Umwandlung bzw. Differenzierung des östrogen-beeinflussten Endometriums in das "sekretorische Endometrium". Die Drüsensekretion steigt und die Spiralarterien des Endometriums wachsen und verzweigen sich. Man spricht nun vom Endometrium der sekretorischen Phase. Das sekretorische Endometrium erreicht seine maximale Entwicklung um den 19.-22. Tag des Zyklus. Zu dieser Zeit ist die uterine Einnistung einer sich entwickelnden Blastozyste möglich. In der Nähe der Blutgefäße beginnt ab dem 23. Tag des Zyklus unter dem Einfluss des Progesterons die Ausdifferenzierung der ESZ. Dieser Dezidualisierungsprozess breitet sich über das gesamte sublinale Endometrium aus und führt im Falle einer Schwangerschaft zur Bildung der Dezidua. Die zuvor länglichen, fibroblastenartigen Stromazellen entwickeln sich zu vergrößerten, runderen, dezidualisierten Zellen. Das Endometrium verändert sich nicht nur morphologisch, sondern produziert auch deziduaspezifische Sekretprodukte wie z.B. das Prolaktin und Komponenten der extrazellulären Matrix (Telgmann & Gellersen 1998).

Falls keine Befruchtung stattfindet, bildet sich das *Corpus luteum* zurück (Luteolyse), die Östrogen- und Progesteronsekretion fällt ab und dem sekretorischen Endometrium wird somit die hormonelle Unterstützung entzogen. Durch die inadäquate Hormonversorgung folgt die Degeneration des *Stratum functionale*. Dies beginnt durch lokale Freisetzung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$, welches ein Zusammenziehen der Spiralarterien bewirkt und die Nekrotisierung des *Stratum functionale* zur Folge hat. In der Menstruations-Phase wird das nekrotische Endometrium im Bereich des *Stratum basale* abgelöst und durch Kontraktion des Myometriums abgestoßen (Leidenberger 1998; Porterfield 2001).

2.1.3 Schwangerschaft und Geburt

Die Einnistung der Blastozyste erfolgt in das dafür vorbereitete Endometrium (siehe Kapitel 2.1.2) und wird von komplexen Vorgängen kontrolliert, in denen das Ovar und die Blastozyste Steroide, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine sezernieren. Zum Zeitpunkt der Implantation ist ein hoher Spiegel an Progesteron vorhanden, der die Ruhigstellung des Myometriums gewährleistet. Die Verhinderung starker Uteruskontraktionen ist auch während der Schwangerschaft für deren Aufrechterhaltung essenziell und wird ebenfalls durch einen hohen Progesteronspiegel erreicht. Zwar kontrahiert sich der Uterus auch während der Schwangerschaft, jedoch unkoordiniert und mit geringer Amplitude. Bei der Geburt erfolgen die Kontraktionen hingegen koordiniert und mit hoher Amplitude. Während der Schwangerschaft wirkt Progesteron vor allem auf die Regulation verschiedener Enzyme wie z.B. die COX-2 (*cyclooxygenase*) und PGDH (Prostaglandin-Dehydrogenase). Diese Enzyme sind für die Herstellung bzw. den Abbau vasokonstriktorischer und vasodilatatorischer Prostaglandine (PGF_{2α} und PGE₂), welche die Uteruskontraktionen maßgeblich beeinflussen, zuständig und ihre Expression wird zum Ende der Schwangerschaft durch Östrogeneinfluss reguliert.

Die Einleitung der Geburt ist ein komplexer Vorgang, dessen exakter Mechanismus bisher noch nicht gut untersucht ist. Wichtige Einflüsse gehen von Östrogen, dessen Konzentration im Blut kurz vor der Geburt ansteigt, sowie von Progesteron aus. Durch Veränderung der Progesteronwirkung (möglicherweise über ein verändertes Verhältnis der beiden Progesteronrezeptor-Isoformen PR-A und PR-B; siehe auch Kapitel 2.4.2) und einen Östrogenanstieg wird die Oxytozin-Rezeptor-Expression erhöht und führt über Oxytozin-Einfluss im Endometrium zu einer erhöhten Prostaglandin-Konzentration, welche auf das Myometrium einen parakrinen Effekt ausübt und zu Uteruskontraktionen führt. Auch Prostaglandine selbst können die Oxytozin-Rezeptor-Expression im Endometrium und Myometrium erhöhen, ferner die Bildung von Prostaglandin-Rezeptoren im Myometrium anregen und so ihre eigene Wirkung verstärken. Zusätzlich zur Uteruskontraktion bewirkt Oxytozin eine zervikale Erweichung, was die Geburt erleichtert. Durch den Entzug der Progesteronwirkung am Ende der Schwangerschaft wird zudem eine inflammatorische Kaskade über Interleukin-6, -8, -12 und andere Zytokine gestartet, was ebenfalls in einer Erhöhung der Uteruskontraktilität, zervikalen Erweichung und Membran-Ruptur endet. Eine Initiierung der Geburt durch fötale Glukokortikoide ist bisher nur bei Schafen beschrieben worden (*Challis & Lye 1994*), eine abschließende detaillierte Klärung der Initiierung beim Menschen steht noch aus.

2.2 Hämatopoese

Alle reifen Blutzellen entstehen aus einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellpopulation. Diese Population enthält hämatopoetische Stammzellen und determinierte hämatopoetische Vorläuferzellen, die sich in reife Blutzellen entwickeln. Der Mechanismus, der diesem Prozess zugrunde liegt, ist noch nicht sicher geklärt.

Das konventionelle Model der Hämatopoese beruht auf der Annahme, dass hämatopoetische Stammzellen in zwei verschiedene Vorläuferzellpopulationen reifen: die lymphoiden Vorläufer, welche T- und B-Zellen produzieren und die myeloiden Vorläufer, welche die übrigen Blutzellen generieren (*Hewison et al 2001*).

Ein neueres Model der Hämatopoese besagt, dass aus hämatopoetischen Stammzellen pluripotente Vorläuferzellen entstehen, welche die Kapazität besitzen, alle differenzierten hämatopoetischen Zellen zu generieren.

In beiden Modellen ist das Zellschicksal von spezifischen Faktoren abhängig. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie das Thrombopoietin, Erythropoietin, Granulozyten- und Makrophagenkoloniestimulierender Faktor (G-CSF, M-CSF), Granulozyten-/Makrophagenkoloniestimulierender Faktor (GM-CSF) und Interleukin-3 (IL-3) spielen eine große Rolle in der Determinierung des Zelltyps. Durch diese Wachstumsfaktoren wird die Entwicklung kolonieformierender Zellen, welche die Vorläufer reifer Blutzellen darstellen, bewirkt (*Hewison et al 2001*).

Verschiedene weitere Faktoren, insbesondere Transkriptionsfaktoren, sind an der Regulierung der Hämatopoese beteiligt. Dazu gehören die Retinolsäure-Rezeptoren α , β , γ (RAR α , β , γ), welche die biologischen Effekte der all-*trans* Retinolsäure (RA) durch ligandenabhängige Aktivierung vermitteln. RAR binden als Heterodimere mit RXR (*retinoid X receptor*; siehe Kapitel 2.4.1) an regulatorische Elemente der DNA mittels ihrer Zinkfinger-Domäne. Die Inhibierung von RAR α stoppt z.B. die Granulozyten-Differenzierung im Promyelozyten-Stadium (*Friedman 2002*).

Ein weiterer Faktor ist HOXA10, ein Homeobox-Protein, dessen möglicher Einfluss auf die Hämatopoese aus seiner erhöhten Expression in CD34⁺-Zellen sowie in myeloiden Zelllinien und aus seiner Fähigkeit zur Modulation der p21^{WAF1/CIP1}-Expression in myeloiden Zelllinien abgeleitet wird (*Friedman 2002*).

Auch das Hormon Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) zeigt einen Einfluss auf die Zellproliferation myeloider Zellen. Es inhibiert die Proliferation durch Stimulierung der Expression von p21,

welches für den folgenden Zellzyklus-Arrest verantwortlich ist. Somit wird eine Monozyten-Differenzierung ermöglicht (*Liu et al 1996*).

Eine sehr wichtige Rolle in der Hämatopoese spielen der Zellzyklus und dessen Regulatoren (Abb. 2.3). Die Regulatoren bewirken, dass die Stammzellen ruhen, die Vorläuferzellen replizieren und ein Austritt aus dem Zellzyklus zugunsten der Differenzierung erfolgen kann. Der Zellzyklus ist eine Abfolge distinkter Vorgänge, welche in verschiedene Phasen unterteilt werden. In jeder dieser Phasen kann bis zu einem bestimmten Kontrollpunkt in die Zellzyklusaktivität eingegriffen werden. Ist dieser bestimmte Punkt überschritten, wird eine Phase bis zur Vollendung durchlaufen.

Das G₁/S-Zellzyklusstadium ist eine sehr kritische Periode für Zellen, um den Wachstumsarrest oder die Proliferierung festzulegen. Zu diesem Zeitpunkt reagieren die Zellen responsiv auf Zytokine. Während die Zellen von der G₀- über die G₁- zur S-Phase fortschreiten, werden Komplexe aktiviert, die aus einem Zyklin-Protein und einer zyklinabhängigen Kinase (*cyclin dependent kinase*, CDK) zusammengesetzt sind. In der frühen G₁-Phase handelt es sich dabei um ZyklinD/CDK4 oder CDK6 und in der späten G₁-Phase um ZyklinE/CDK2. Diese aktiven Komplexe bewirken eine Phosphorylierung des Retinoblastoma (Rb)-Proteins und somit eine Ablösung dieses phosphorylierten Proteins von dem Transkriptionsfaktor E2F-1, welcher nun die Aktivierung von Genen induziert, deren Produkte in der S-Phase erforderlich sind. Der Aktivität von Zyklinen und CDKs kann durch CDK-Inhibitoren (CDKIs) entgegengewirkt werden. Zu den CDKIs gehören die INK4a-Klasse (p15, p16, p18, p19), welche die CDK4 und CDK6 inhibieren, und die KIP/CIP-Familie (p21, p27, p57), welche verschiedene Zykline und CDKs inhibiert, aber die stärkste Inhibition auf CDK2-Komplexe ausübt (*Steinman 2002*).

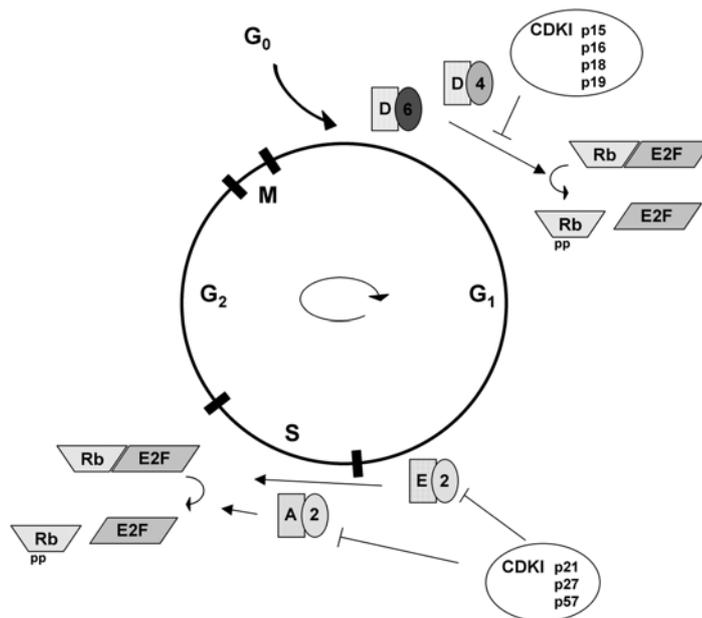


Abbildung 2.3: Der eukaryontische Zellzyklus und seine Kontrolle.

G₀, Ruhephase; G₁, Vorbereitung auf die DNA-Synthese; S, DNA-Synthese; G₂, Vorbereitung auf die Mitose; M, Mitose/Zellteilung. CDKs (Ovale), Phosphorylierung (p), Retinoblastoma-Protein (Rb), Zykline (Rechtecke). Modifiziert nach *Steinman 2002*.

2.3 Das PLZF-Gen und sein Protein

2.3.1 Akute promyeloische Leukämie (APL)

In akuten Leukämien ist der Weg der Differenzierung unterbrochen. Bei der akuten promyeloischen Leukämie (APL) handelt es sich um einen M3-Subtyp der akuten myeloischen Leukämie (AML), bestimmt nach der FAB (Französisch-Amerikanisch-Britischen)-Klassifikation. Die APL ist morphologisch durch eine Expansion und abnorme Akkumulation leukämischer Zellen im Knochenmark und peripheren Blut charakterisiert, die im promyeloischen Stadium der Myelopoese stehengeblieben sind (*Bennett et al 1976; Sainty et al 2000*). In der AML stellt die APL 10% der *de novo* Fälle bei Erwachsenen dar (*Lin et al 1999*). Die APL ist mit einer reziproken und balancierten Translokation assoziiert, die das RAR α -Gen (RARA) auf Chromosom 17 an bisher fünf bekannte Gene transloziert. In 98% aller APL-Fälle handelt es sich dabei um das PML (*promyelocytic leukemia*)-Gen auf Chromosom 15q22 (*Melnick & Licht 1999*). Zusätzlich zu der PML/RARA-Translokation konnten vier weitere, strukturell nicht verwandte Partnergene identifiziert werden: das PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*)-Gen auf Chromosom 11q23 (Abb. 2.4), das NPM (*nucleophosmin*)-Gen auf

2.3.2 Struktur

Das PLZF-Gen, auch als *Zfp145* bezeichnet, wurde erstmals in der APL identifiziert, in der es in einer reziproken Translokation in Fusion mit dem RARA-Gen vorliegt (*Chen et al 1993*).

Die genomische Sequenz und Struktur des Wildtyp-PLZF-Gens wurde in einer neueren Studie aufgeklärt (*Zhang et al 1999*). Die komplette genomische DNA-Sequenz von PLZF umfasst 201 kb (GenBank: AF060568) und enthält 6 Exons und 5 Introns (*Zhang et al 1999*).

Das PLZF-Transkript konnte mit einer Länge von ca. 8 kb in einigen Geweben wie z.B. im humanen Ovar und in muriner Milz, der Lunge und dem Herzen nachgewiesen werden. Der Transkriptnachweis fällt dabei generell sehr schwach aus, mit Ausnahme der PLZF-mRNA im murinen Herzen (*Chen et al 1993; Reid et al 1995*). Das 8 kb Transkript setzt sich aus einer mit 6 kb ungewöhnlich langen 5'-UTR, einer ca. 2 kb langen kodierenden Region und einer ca. 100 bp langen 3'-UTR zusammen (Abb.2.5). Bisher sind bei dem PLZF-Transkript vier alternative Spleißvorgänge bekannt, welche alle im Exon 1 stattfinden und zu fünf PLZF-Isoformen führen können (alternative Spleißformen; AS I bis I+IV) (Abb. 2.5). Während die Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Signale an den Exon-/Intron-Grenzen für die AS I in Exon 1 und für die anderen Exons klassisch aufgebaut sind (5'-Donor-gt, 3'-Akzeptor-ag), sind die AS II, III, IV in Exon 1 mit atypischen Spleißstellen assoziiert (*Zhang et al 1999*).

Der Transkriptionsstart konnte bisher nicht identifiziert werden.

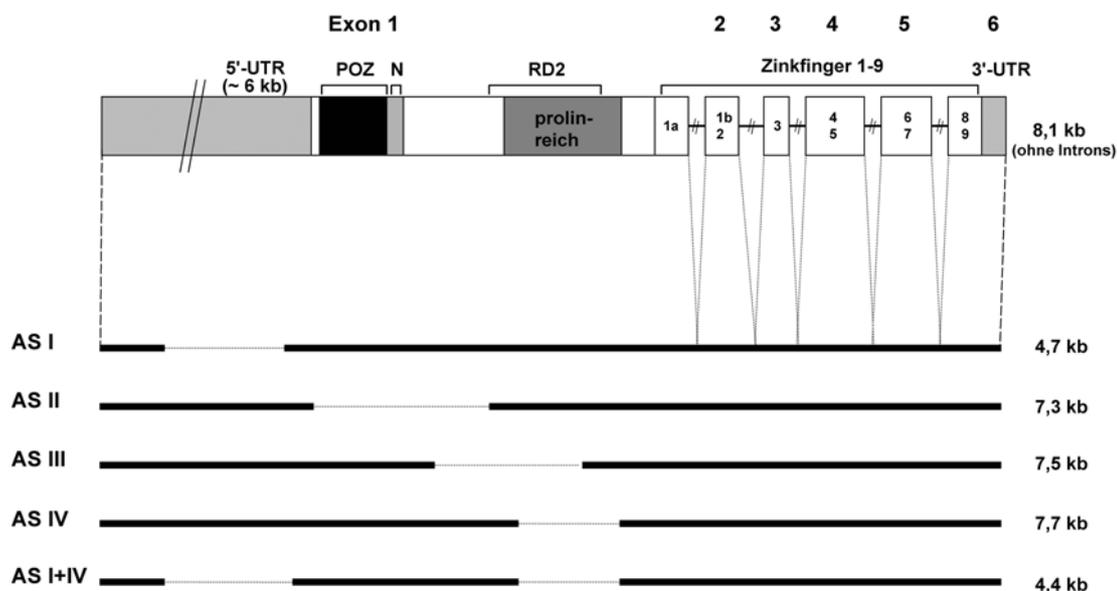


Abbildung 2.5: Die genomische Struktur von PLZF, seine alternativen Spleißformen und funktionellen Domänen.

Die bisher bekannten alternativen Spleißstellen befinden sich alle im Exon 1. Die funktionellen Domänen des Proteins (siehe Text) sind hier im Schema zum besseren Verständnis der Bedeutung der Spleißvarianten eingezeichnet.

PLZF kodiert für ein 673 Aminosäuren großes Protein mit einem erwarteten Molekulargewicht von 74 kDa. In Polyacrylamidgelen migriert das Protein mit einem Molekulargewicht von 80 bis 90 kDa (*Melnick & Licht 1999*). Bei PLZF handelt sich ferner um ein Phosphoprotein, das an Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden kann. *In vitro* wurde dies durch ZyklinB/cdc2 gezeigt (*Ball et al 1999*).

Das PLZF-Protein (siehe auch Abb. 2.4) enthält N-terminal zwischen Aminosäure 1 und 120 eine BTB/POZ (*bric-a-brac/tramtrack/broad complex, poxvirus and zinc finger*)-Domäne und von Aminosäure 200 bis 300 eine Repressor-Domäne (RD2) (*Li et al 1997*), die sich mit einer prolinreichen Domäne überschneidet (Abb. 2.5). C-terminal befindet sich eine DNA-Bindedomäne mit neun Zinkfingern des C₂-H₂-Typs, welcher charakteristisch für die Mitglieder der Familie der *Krüppel*-ähnlichen Zinkfingerproteine ist.

2.3.3 Expression

Während der Mausentwicklung wird PLZF in einem zeitlich und räumlich definierten Muster exprimiert. Die PLZF-Expression erscheint zuerst im anterioren Neuroepithel am Tag E7,5 (das entspricht 7,5 Tage nach Koitus und dem Auftreten eines Vaginalplaques) und breitet sich dann bis zum Tag E10 über das gesamte Neuroektoderm aus. Ein Einfluss auf die frühe neuroepitheliale Differenzierung sowie auf die Etablierung spezifischer Regionen im Vorderhirn wie z.B. im Hypothalamus kann vermutet werden (*Avantaggiato et al 1995*).

Im Rautenhirn korreliert eine segmentgebundene PLZF-Expression mit der Entwicklung der Rhombomere. Von Tag E9 an beginnt ein geordnetes Sinken der PLZF-Expression im Zentrum der Rhombomere, so dass einen Tag später erhöhte PLZF-mRNA- und PLZF-Proteinmengen nur noch in den die Rhombomere umgebenden Zellen zu finden sind. Auch das PLZF-Homolog des Huhns zeigt ein ähnliches segmentales Expressionsmuster im Rautenhirn. Aus dem hohen Grad der evolutiven Konservierung zwischen dem PLZF-Expressionsmuster während der Säugetier- und Vögel-ZNS-Entwicklung kann für PLZF eine wichtige Rolle in der Segmentierung des Vertebratenrautenhirns vermutet werden (*Cook et al 1995*). Ferner ist in der Maus die PLZF-Expression in den Extremitätenknospen nachzuweisen, genau dort, wo auch HOX-Gene an der Entwicklung beteiligt sind (*Cook et al 1995*). Gezieltes Ausschalten des PLZF-Gens enthüllte eine wichtige Rolle von PLZF in der Regulation von HOX-Genen und der Vermittlung von Extremitäten- und Axialskelett-Aufbau (*Barna et al 2000*). PLZF^{-/-}-Mäuse zeigen muskelskeletale Extremitätendefekte sowie eine gestörte Spermatogenese (*Barna et al 2000*;

Melnick & Licht 1999). Auch eine verringerte Expression des Bmp7 (*bone morphogenetic protein 7*)-Gens, welches die Zellproliferation und den programmierten Zelltod (Apoptose) in den sich entwickelnden Extremitäten kontrolliert und möglicherweise als Vermittler der PLZF-Wirkung dient, konnte festgestellt werden. In den Extremitätenknospen der PLZF^{-/-}-Mäuse zeigte sich eine erhöhte Proliferations- und gesenkte Apoptoserate, was die Annahme unterstützt, dass PLZF als Wachstumsunterdrücker agiert (siehe auch Kapitel 2.3.4) (*Barna et al 2000*). Interessanterweise entwickeln PLZF^{-/-}-Mäuse jedoch keine Leukämie oder Tumore. Dies kann an einem kompensatorischen Effekt eines anderen Transkriptionsfaktors liegen oder auch daran, dass in APL aufgrund der Fusionsproteine möglicherweise eine deregulierte Expression der PLZF-Zielgene vorliegt (*Barna et al 2000; Zelent et al 2001*).

PLZF-mRNA wird in undifferenzierten myeloiden Zelllinien und in geringerer Menge in stärker differenzierten promyeloischen und monozytischen Zelllinien (NB4, HL-60, KG-1) sowie in peripheren mononukleären Blutzellen exprimiert (*Chen et al 1993; Reid et al 1995*). Die PLZF-Expression wird während der RA-induzierten Differenzierung von NB4 und HL-60 Zellen gesenkt (*Chen et al 1993*), die Zellen der embryonalen Zelllinie P19 hingegen beginnen nach RA-Behandlung unter Erhöhung der PLZF-Expression zu differenzieren (*Cook et al 1995*).

Bisher konnte das PLZF-Protein im Menschen nur in CD34⁺-Vorläufern im Knochenmark in hohen Mengen und in Zelllinien, denen ein PLZF-Expressionsvektor zutransfiziert worden war, durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. PLZF liegt dort in spezifischen punktuellen Ansammlungen im Kern vor (*Reid et al 1995*). Die nukleäre Lokalisierung wird durch die BTB/POZ-Domäne vermittelt (*Dong et al 1996*). Aus dem PLZF-Expressionsmuster in hämatopoetischen Zellen scheint also eine wichtige Rolle für das Fortbestehen bzw. Überleben von hämatopoetischen Stammzellen oder Vorläuferzellen ableitbar und ein Einfluss von PLZF während der Differenzierung durch eine abnehmende PLZF-Expression in differenzierenden hämatopoetischen Zellen erklärbar.

2.3.4 Funktion

PLZF ist in der Lage, das Zellwachstum zu unterdrücken. Die Überexprimierung von PLZF in 32Dcl3-Zellen (eine murine IL-3-abhängige myeloide Zelllinie) hat einen starken wachstumshemmenden Effekt mit Akkumulation der Zellen in der G₁-Phase und eine erhöhte Apoptoserate zur Folge (*Shaknovich et al 1998*). Die myeloide Differenzierung der 32Dcl3-Zellen in Antwort auf G-CSF und GM-CSF wird verhindert. Die Vermutung, dass PLZF ein wichtiger Regulator des Zellwachstums, der Differenzierung und Apoptose ist, wird noch durch

eine weitere Beobachtung unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass PLZF an den ZyklinA2-Promotor binden und den Promotor reprimieren kann und dass eine durch PLZF ausgelöste Wachstumsunterdrückung durch verstärkte ZyklinA2-Expression überwunden werden kann (Yeyati et al 1999). PLZF scheint das Zellwachstum zu inhibieren, indem es die Expression eines Zellzyklusregulators und vielleicht weiterer Regulatoren verändert.

Eine weitere Verknüpfung von PLZF zu Differenzierungsvorgängen verläuft über den Interleukin-3-Rezeptor (IL-3R). IL-3, dessen Wirkung über IL-3R vermittelt wird, ist entscheidend in der frühen Phase der Zelldifferenzierung an der Hämatopoese beteiligt (Mangi & Newland 1999). Durch Überexprimierung von PLZF wird die Expression der α -Untereinheit des IL-3R reduziert und in 32Dcl3-Zellen, welche IL-3-abhängig sind, erfolgt ein Zellzyklus-Arrest (Ball et al 1999).

Durch verschiedene Versuchsansätze konnte eine Konsensussequenz für die Bindung von PLZF an DNA erschlossen werden; diese Sequenz (GTACT/AGTAC) wird von den 4 C-terminal gelegenen Zinkfingern erkannt (Ball et al 1999; Li et al 1997; Sitterlin et al 1997). Die N-terminalen Zinkfinger, so wird vermutet, sind nicht an der DNA-Bindung beteiligt, sondern beeinflussen möglicherweise Protein/Protein-Wechselwirkungen (Zelent et al 2001).

Nicht nur durch transkriptionelle Reprimierung über Bindung an DNA kann PLZF wirken. In einer neuen Arbeit konnte gezeigt werden, dass PLZF über die BTB/POZ-Domäne direkt mit dem Vitamin D₃-Rezeptor (VDR) interagiert und dessen Wirkung behindert (Ward et al 2001). Es ist bekannt, dass durch Vitamin D₃ hämatopoetische Zellen in Monozyten oder Makrophagen ausdifferenzieren und dies unter anderem durch Induzierung der p21^{WAF1/CIP1}-Expression mittels VDR erfolgt (Liu et al 1996). p21^{WAF1/CIP1} wirkt, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, als CDK-Inhibitor und bewirkt einen Zellzyklus-Arrest. Die Überexpression von PLZF hebt die durch VDR mögliche Aktivierung des p21^{WAF1/CIP1}-Promotors in einer monozytischen Zelllinie auf und zeigt so einen möglichen Einfluss von PLZF auf die Regulierung der durch Vitamin D₃-induzierten Monozytendifferenzierung in hämatopoetischen Zellen (Ward et al 2001).

Struktur- und Funktionsanalyse haben gezeigt, dass PLZF als sequenzspezifischer transkriptioneller Repressor wirkt und diese Aktivität über die BTB/POZ-Domäne und die RD2 vermittelt wird (Li et al 1997; Melnick et al 2000a; Melnick et al 2002). Die BTB/POZ-Domäne ist in der Lage Korepressoren wie SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptors*), NCoR (*nuclear receptor co-repressor*), Sin3A und HDAC1 (*histone deacetylase I*) zu rekrutieren und mit diesem Komplex zu interagieren (in Abb. 2.6 anhand des onkogenen PLZF/RAR α verdeutlicht). Die RD2 hingegen bindet das ETO (*Eight-Twenty One*)-Protein (Melnick et al 2000b), welches wie die BTB/POZ-Domäne in der Lage ist Korepressoren zu

binden. Somit wird ein Multiprotein-Komplex gebildet, der nukleosomale Modifikationen vornehmen und transkriptionelle Repressorfunktion ausüben kann (*Breems-de Ridder et al 2000; Melnick et al 2000b*). Die BTB/POZ-Domäne selbst kann nicht an ETO binden, stabilisiert jedoch die Bindung von ETO an die Korepressoren (*Melnick et al 2000b*).

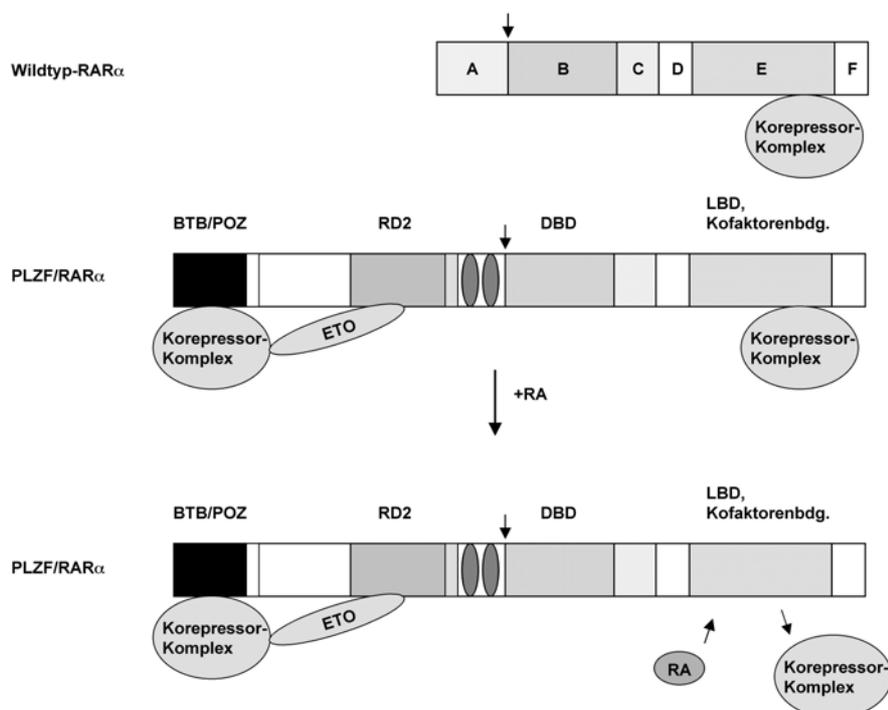


Abbildung 2.6: Interaktionen von Wildtyp-RAR α und onkogenem PLZF/RAR α mit Korepressoren.

In der Abwesenheit von RA sind RAR α und das Fusionsprotein PLZF/RAR α an responsive Elemente gebunden und mit Korepressor-Komplexen assoziiert. Der Korepressor-Komplex beinhaltet die bisher bekannten Proteine NCoR, SMRT, Sin3a und HDAC1 (siehe Text). Dieser Komplex unterdrückt die basale Transkription. Physiologische Konzentrationen von RA (10^{-9} - 10^{-8} M) ermöglichen die Dissoziation des Komplexes vom RAR α -Anteil, jedoch nicht vom PLZF-Anteil. Die RA-vermittelte Differenzierung bleibt somit aus und APL kann entstehen. Auch pharmakologische Konzentrationen von RA (10^{-7} - 10^{-6} M) wirken dort nicht. RAR α -Domänen siehe Abb. 2.4.

Dieser Mechanismus der transkriptionellen Repression (in Abb. 2.6 zusammengestellt) erklärt auch, dass APL-Patienten mit PLZF/RARA-Translokation nicht auf eine RA-Therapie ansprechen. Im PLZF/RAR α -Fusionsprotein befinden sich zwei Regionen, die mit dem Korepressor-Komplex, bestehend aus NCoR, SMRT, Sin3A und HDAC1, interagieren können. Zum einen handelt es sich dabei um die BTB/POZ-Domäne im N-terminalen PLZF-Anteil und zum anderen bindet der Komplex im C-terminalen RAR α -Bereich. Diese C-terminal gelegene Region ist RA-sensitiv, so dass bei hohen pharmakologischen Dosen von RA nur dort die

Korepressoren durch Koaktivatoren ersetzt werden. Diejenigen Korepressoren, welche an die BTB/POZ-Domäne gebunden sind, bleiben durch RA unberührt und können weiterhin die Transkription unterdrücken. Somit ist keine Einleitung der Differenzierung durch RA möglich. Die APL-Form, bei der PML und RAR α fusioniert vorliegen, ist hingegen durch RA therapierbar, da im PML-Anteil keine Korepressoren binden können und im RAR α -Bereich die Bindung, wie zuvor beschrieben, RA-sensitiv ist (*Breems-de Ridder et al 2000*). Der Umstand, dass die APL mit den PLZF-Fusionen nicht therapierbar ist, kann auch von anderer Seite betrachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Wildtyp-PLZF und das RAR α /PLZF die gleichen DNA-Sequenzen binden können. PLZF reprimiert Gentranskription, RAR α /PLZF hingegen aktiviert sie, da es die RAR α -Aktivierungsdomäne beinhaltet. PLZF wirkt als Unterdrücker des Zellwachstums, was durch die negative Wirkung auf die ZyklinA2-Expression (siehe oben im Text) zu erklären ist. RAR α /PLZF hingegen aktiviert die ZyklinA2-Expression und verstärkt das Zellwachstum. In der APL mit t(11; 17)(q23; q21) entsteht die RA- und Chemotherapieresistenz aus der Anwesenheit zweier Onkogene. PLZF/RAR α blockiert die differenzierungsinduzierende Wirkung von RA, während RAR α /PLZF möglicherweise Zellzyklusregulatoren aktiviert und somit den antiproliferativen Effekt von RA blockiert. Die Anwesenheit beider Fusionsgene führt also zu einer starken, aggressiven und undifferenzierbaren Form der Leukämie (*Zelent et al 2001*).

2.4 Nukleäre Hormonrezeptoren

2.4.1 Allgemeines

Nukleäre Rezeptoren sind ligandeninduzierbare Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Zielgenen, die im Metabolismus, in der Entwicklung und Reproduktion involviert sind, spezifisch regulieren. Die Hauptfunktion nukleärer Rezeptoren ist die Vermittlung der transkriptionellen Antwort auf Hormone in deren Zielzellen. Zu den Hormonen gehören z.B. Sexualsteroiden (Progestine, Östrogene, Androgene), adrenale Steroide (Glukokortikoide, Mineralokortikoide), Vitamin D₃ sowie Schilddrüsen- und retinoide Hormone. Bisher konnten über 100 nukleäre Rezeptoren identifiziert werden, welche zusammen als Nukleäre-Rezeptor-Superfamilie bezeichnet werden. Innerhalb dieser Superfamilie wurden mehrere Unterfamilien klassifiziert, von denen hier zwei genannt werden. Zur Unterfamilie Typ I (klassische oder steroidale Familie genannt) gehören Rezeptoren für Progestine (PR), Östrogene (ER), Androgen (AR), Glukokortikoide (GR) und Mineralokortikoide (MR), wohingegen die Unterfamilie des

Typs II die Rezeptoren für Schilddrüsenhormon (TR), all-*trans* Retinolsäure (RAR), 9-*cis* Retinolsäure (RXR) und Vitamin D₃ (VDR) beinhaltet (McKenna et al 1999).

Die oben genannten nukleären Rezeptoren variieren in der Anzahl ihrer Aminosäuren, besitzen jedoch einige vergleichbare Strukturmerkmale. Jeder dieser intrazellularen Rezeptoren beinhaltet eine DNA-Bindungsdomäne von 66-68 Aminosäuren, welche einen hohen Grad an Homologie zwischen den Familienmitglieder aufzeigt. Die DNA-Bindungsdomäne enthält zwei Zinkfinger, die je aus einer Schleife mit integriertem Zn²⁺-Ion bestehen und für die Reaktion mit der DNA verantwortlich sind. Auch die ligandenbindende Domäne zeigt Homologien zwischen den Rezeptoren, im Gegensatz zu den variablen Regionen, die nur eine sehr geringe Homologie aufweisen, wie z.B. die N-terminale Aktivierungsdomäne (Jensen 1991).

Neben den zuvor genannten strukturellen Gemeinsamkeiten zeigen die nukleären Rezeptoren typspezifische Eigenschaften. Typ I-Rezeptoren werden, in Abwesenheit eines Liganden, unaktiviert in Assoziierung mit Hitzeschockproteinen zurückgehalten und können so die Transkription am Promotor ihrer Zielgene nicht beeinflussen. Die Typ II-Rezeptoren hingegen können an die DNA in Abwesenheit des Liganden binden und üben so häufig einen reprimierenden Effekt auf die Aktivität der Zielgenpromotoren aus (siehe RAR α , Abb. 2.6). Dies wird häufig als *Silencing* (Ruhigstellung) bezeichnet. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Rezeptor-Unterfamilien liegt in der DNA-Bindung. Nachdem ein Ligand an einen Typ I-Rezeptor gebunden hat, dissoziiert der Rezeptor von den Hitzeschockproteinen ab und transloziert in den Zellkern. Dort interagiert der Rezeptor mit der DNA an einer Stelle im Promotor, die als hormonresponsives Element (HRE) bezeichnet wird. Dieses Element beinhaltet eine palindromische (zwei gegenläufige Motive) Sequenz von zwölf Nukleotiden, die durch drei beliebige Basenpaare (*spacer* genannt) in je sechs Nukleotide große Hälften getrennt sind. Interessanterweise ist die DNA-Konsensussequenz für ein glukokortikoid-responsives Element (GRE) auch erforderlich für die Regulation der Transkription durch Progesteron, Androgen und Mineralokortikoide. Die Typ I-Rezeptoren binden an ein HRE als Homodimere. Im Gegensatz dazu binden Typ II-Rezeptoren meist über Heterodimerisierung mit RXR konstitutiv an ihr HRE, das jedoch aus zwei direkten Sequenzwiederholungen in verschiedenen Abständen besteht (Martinez & Wahli 1991; McKenna et al 1999).

2.4.2 Der Progesteronrezeptor

2.4.2.1 Struktur

Der Progesteronrezeptor, PR, existiert in zwei Isoformen, PR-A und PR-B, die beide von einem Gen kodiert werden, aber unter der Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert werden (Abb. 2.7). Bei PR-B handelt es sich um die vollständige und bei PR-A um eine N-terminal trunkeerte Isoform (*Graham & Clarke 1997*).

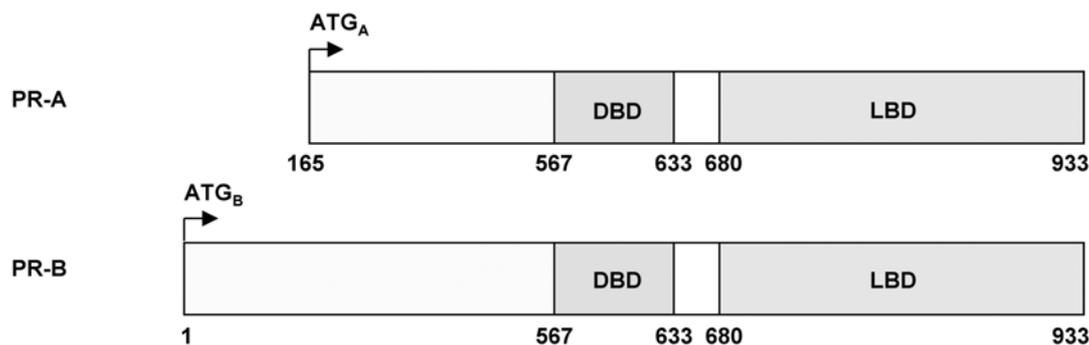


Abbildung 2.7: Humane PR-A- und PR-B-Proteine.

Die PR-A und PR-B-Proteine werden von einem Gen kodiert, aber liegen unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren. Die Pfeile zeigen die unterschiedlichen Translationsstartstellen für PR-A und PR-B. DBD: DNA-Bindungsdomäne; LBD: Liganden-Bindungsdomäne (Nach *Graham & Clarke 1997*).

2.4.2.2 Expression

PR-Expression konnte in Geweben, die als progesteron-responsiv bekannt sind, beschrieben werden. Zu den Geweben gehören z.B. der Uterus (Endometrium und Myometrium) und das Ovar (luteinisierende und präovulatorische Granulosazellen und der Gelbkörper). Auch im Gehirn, der Hypophyse und im ventromedialen Hypothalamus konnte eine PR-Expression gezeigt werden. Die PR-Expression verläuft unter der Kontrolle von Östrogen, welches die PR-Expression erhöht und unter der Kontrolle von Progesteron, welches die PR-Expression in den meisten Zielgeweben verringert. So ist z.B. in der zweiten Hälfte des weiblichen Zyklus, wenn die Konzentration von Progesteron im Serum ansteigt, ein Sinken der PR-Menge im Uterus zu verzeichnen. Dies verläuft jedoch nicht in allen Zelltypen in gleicher Weise. Denn in der mittleren und späten Lutealphase nimmt die PR-Expression im luminalen und glandulären Epithel drastisch ab, wohingegen die PR-Expression in endometrialen Stromazellen sowie myometrialen Zellen unverändert hoch bleibt, trotz gestiegenem zirkulierendem Progesteron und abwesendem ER (*Graham & Clarke 1997*). Zu beachten ist das Verhältnis der PR-A- zur PR-B-

Expression, welches im Endometrium während des Zyklus in einem komplexen räumlichen und zeitlichen Muster verläuft (*Mote et al 2000*).

2.4.2.3 Funktion

Der Progesteronrezeptor vermittelt die Wirkung des Steroidhormons Progesteron, welches eine Schlüsselrolle in der komplexen Regulation der weiblichen Reproduktionsfunktion einnimmt. Die wichtigsten physiologischen Bedeutungen des Progesterons bei Säugetieren sind folgende:

- 1) Im Uterus und Ovar: Entlassung der reifen Oozyte aus dem Ovar, Ermöglichung der Implantation und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft durch Förderung des uterinen Wachstums und Unterdrückung myometrialer Kontraktionen.
- 2) In der Brustdrüse: Entwicklung alveolärer Lobuli als Vorbereitung auf die Milchsekretion und Unterdrückung der Milchproteinsynthese vor der Geburt.
- 3) Im Gehirn: Vermittlung von Signalen, die für das Sexualverhalten erforderlich sind (*Graham & Clarke 1997*).

Dass diese Effekte tatsächlich mit der über den PR vermittelten Progesteronwirkung zusammenhängen, konnte durch die Untersuchung eines Mausmodells, das eine Nullmutation des PR-Gens trägt, bestimmt werden. Die weiblichen adulten Mäuse zeigten Defekte in allen Reproduktionsgeweben und in den oben genannten physiologischen Abläufen (*Lydon et al 1995*).

Bei dem Ablauf der Progesteronwirkung kann man zwischen dem direkten Weg, bei dem ligandengebundener PR direkt an den Promotor der Zielgene bindet, und den indirekten Auswirkungen der Progesteronregulation über Zwischenschritte unterscheiden.

Beide PR-Isoformen binden Progesteron und interagieren mit PREs (Progesteron-responsives Element), sind jedoch funktionell verschieden. Sie scheinen promotor- und zellspezifisch zu wirken. Während angenommen wird, dass PR-B als transkriptioneller Aktivator und PR-A, die trunkierte Isoform, als Repressor wirkt, scheinen auch vertauschte Rollen im Zusammenhang mit Protein/Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren denkbar (*Beato & Klug 2000; Christian et al 2002*).

Die Wege der Progesteronwirkung in Zielgeweben sind bis heute nicht sehr gut aufgeklärt. In Anbetracht der eminent wichtigen Rolle von Progesteron und somit auch des Rezeptors in der normalen weiblichen Entwicklung und Reproduktion, aber auch in diversen Erkrankungen, ist

eine Untersuchung der Wirkungsweise von Progesteron, die z.B. über mögliche Vermittlerfaktoren verläuft, von großer Bedeutung.

2.4.3 Der Glukokortikoidrezeptor

2.4.3.1 Struktur

Die meisten der bekannten physiologischen Effekte von Glukokortikoiden werden durch ein intrazelluläres Protein, den GR, vermittelt (Näheres zu nukleären Rezeptoren siehe Kapitel 2.4.1). Dieser ligandenabhängige Transkriptionsfaktor zeigt die typischen Strukturmerkmale der nukleären Rezeptor-Superfamilie (Abb 2.8).

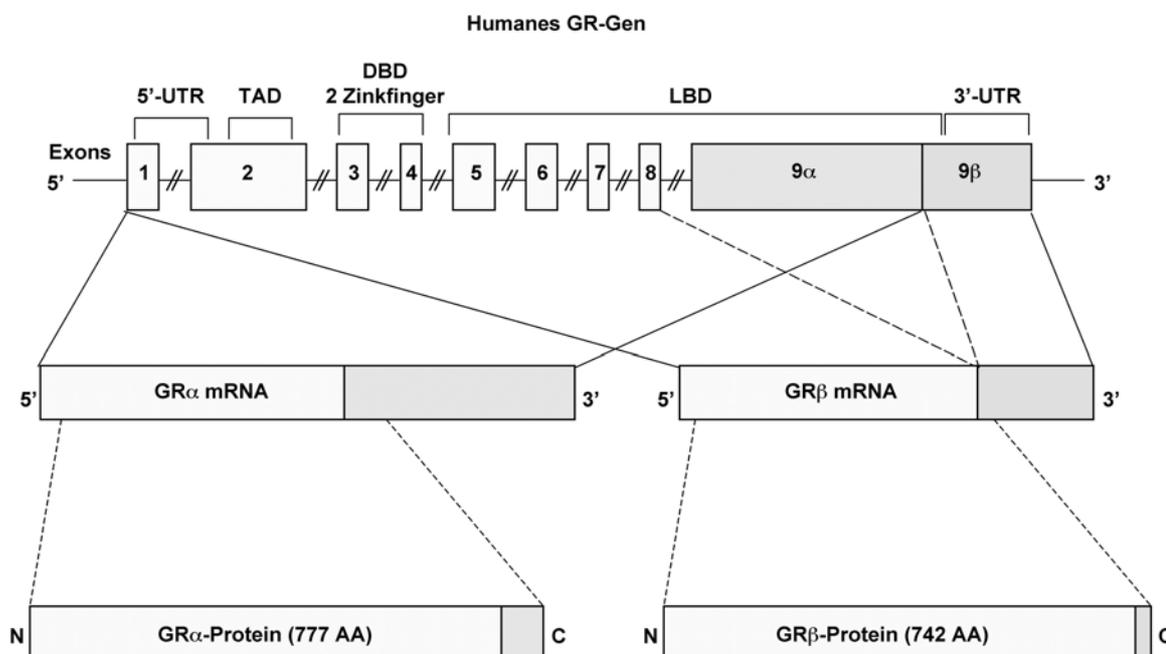


Abbildung 2.8: Schematische Organisation des humanen GR-Gens und GR- α - und GR- β -mRNA und -Protein.

Durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts entstehen zwei mRNA- und Proteinisoformen, GR α und GR β . Eine LBD und Transaktivierungsdomänen (TAD) sind bisher nur für GR α beschrieben worden (nach *Bamberger et al 1996; Oakley & Cidlowski 2001*).

Durch alternatives Spleißen von Exon 9 entstehen die mRNA- und Proteinisoformen GR α und GR β , welche von einem Gen kodiert werden. Beide Isoformen sind bis auf einen kurzen C-terminalen Bereich strukturell identisch. N-terminal liegt eine Transaktivierungsdomäne (TAD), weitere in der Mitte und C-terminal (nicht in Abb. 2.8 eingezeichnet). Die DNA-

Bindungsdomäne befindet sich zwischen den ersten beiden TADs. C-terminal liegt die große LBD, welche in GR β verkürzt ist, was dazu führt, dass der GR β nicht durch Glukokortikoide aktivierbar ist. Die LBD wird von der Dimerisierungs und Protein-Interaktionsdomäne überschritten (nicht in Abb. 2.8 eingezeichnet) (*Bamberger et al 1996*).

2.4.3.2 Expression

Übereinstimmend mit den vielfältigen Wirkungen von Glukokortikoiden wird das GR α - und GR β -Protein in nahezu allen Zellen und Geweben exprimiert. Dabei zeigt der GR α eine höhere Expressionsrate als der GR β , was jedoch zelltypspezifisch variieren kann (*Oakley & Cidlowski 2001*). Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist es von Interesse hervorzuheben, dass kürzlich die Expression des GR in stromalen Zellen des menschlichen Endometriums gezeigt werden konnte. Eine Rolle von Glukokortikoiden im Endometrium bleibt jedoch spekulativ (*Bamberger et al 2001*).

2.4.3.3 Funktion

Der GR vermittelt die Wirkung glukokortikaler Steroide wie z.B. von Hydrokortison oder dem synthetischen Derivat Dexamethason. Glukokortikoide werden von der Nebenniere unter dem regulatorischen Einfluss von ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) produziert und über die HPA (*hypothalamic-pituitary-adrenal*)-Achse kontrolliert. Glukokortikoide vermitteln eine Vielzahl an Wirkungen im Bereich des Metabolismus, der Kardiovaskularisierung, des Immunsystems und des Verhaltens (*Bamberger et al 1996*).

Eine positive Genregulation der Zielgene verläuft über GR α , der als ligandengebundenes Homodimer an ein GRE bindet und die Transkription über Aktivierung der basalen Transkriptionsmaschinerie stimuliert. Die Verbindung von Rezeptor mit dem Präinitiationskomplex erfolgt über verschiedene Kofaktoren wie z.B. SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), GRIP 1 (*GR interacting protein 1*) und CBP (*cAMP responsive element binding protein*) (*Oakley & Cidlowski 2001*). GR α kann nicht nur selbst über die Bindung an DNA transkriptionell aktivieren, sondern auch über Protein/Protein-Interaktionen auf die Transkription wirken. So agiert ligandengebundener GR α z.B. als transkriptioneller Koaktivator für STAT5 und verstärkt STAT5-abhängige Transkription. Umgekehrt jedoch verringert STAT5 die Glukokortikoid-Antwort in einem GRE-haltigen Promotor (*Stöcklin et al 1996*).

Nicht nur positive, sondern auch negative Genregulation wird über GR α vermittelt. Eine negative Regulation durch Glukokortikoide kann erreicht werden, wenn GR α mit einem DNA-Bereich interagiert, der negatives GRE (nGRE) genannt wird. Die transkriptionelle

Reprimierung wird hervorgerufen, wenn ein für die Expression eines Gens essenzieller positiv agierender Transkriptionsfaktor durch Interaktion mit dem benachbarten nGRE und GR α von seinem responsiven Element im Zielgenpromotor verdrängt wird oder dort nicht binden kann (Oakley & Cidlowski 2001).

Überdies kann GR α Genexpression auch durch Protein/Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren reprimieren. Zum Beispiel kann der ligandengebundene Rezeptor physikalisch mit c-Fos und c-Jun, Komponenten des AP-1 (*activator protein-1*) Transkriptionsfaktors, interagieren und die Expression des AP-1-responsiven Kollagenase-Gens inhibieren (Jonat et al 1990; Schüle et al 1990). Diese Assoziierung unterbindet die DNA-Bindung von c-Jun Homodimeren, jedoch nicht von c-Fos/c-Jun-Heterodimeren *in vitro* und *in vivo*. Daher ist zu vermuten, dass GR α , gebunden an AP-1, die Fähigkeit von AP-1 stört positiv auf die basale Transkriptionsmaschinerie zu wirken (König et al 1992).

Auch auf die transkriptionelle Regulation durch NF- κ B (*nuclear factor κ B*), einen Aktivator vieler Gene der Immunabwehr, nimmt GR α über Protein/Protein-Interaktion Einfluss. Aktivierter GR α reguliert die Transkription vieler NF- κ B-responsiver Gene, indem der Rezeptor mit NF- κ B einen Komplex bildet und so dessen Bindung an ein NF- κ B-RE verhindert.

Viele Gene, die für Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle und Enzyme der Synthese inflammatorischer Mediatoren kodieren, werden durch NF- κ B und AP-1 aktiviert. Der repressorische Einfluss von GR α auf diese Gene über Protein/Protein-Interaktionen mit NF- κ B und AP-1 scheint ein wichtiger Mechanismus der anti-inflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden zu sein (Oakley & Cidlowski 2001).

Mit Hilfe eines Mausmodells, in dem der GR durch eine gezielte Punktmutation nicht in der Lage ist zu dimerisieren und GRE-abhängig zu transaktivieren, war es möglich festzustellen, dass die meisten anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Funktionen von Glukokortikoiden *in vivo* in Abwesenheit der DNA-Bindungsfähigkeit des GRs ausgeübt werden können (Reichardt et al 1998; Reichardt et al 2001b). Erklärt werden kann dies durch die zuvor beschriebenen Protein/Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B.

Auch der reziproke Weg, nämlich die Antagonisierung der transkriptionellen Aktivität des GR α mittels AP-1 und NF- κ B, konnte beschrieben werden (Almawi & Melemedjian 2002; Pfahl 1993). Bei dem Vorgang verhindert AP-1 durch physikalische Interaktion mit GR α nicht dessen GRE-Bindung, sondern wahrscheinlich dessen Verbindung zur basalen Transkriptionsmaschinerie und eine folgende Aktivierung (Reik et al 1994). Eine verstärkte

Aktivität von AP-1 und NF- κ B kann somit zu Glukokortikoidresistenz z.B. bei Asthma führen und wirkt der anti-inflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden entgegen.

Neben den Interaktionen von GR α mit AP-1 und NF- κ B kann auch die Interaktion mit GR β dazu führen, dass glukokortikoid-responsive Promotoren nicht durch GR α aktiviert werden. GR β kann aufgrund der verkürzten LBD keine Glukokortikoide binden und nicht eigenständig glukokortikoid-responsive Gene aktivieren oder reprimieren. GR β ist jedoch in der Lage, mit GR α physikalisch zu assoziieren und spezifisch an GREs zu binden, so dass ein Wettstreit der GR-Isoformen um die GRE-Bindung oder eine Formierung transkriptionell unfähiger GR α /GR β -Heterodimere zu dem dominant-negativen Effekt auf die GR α -Wirkung führen kann (*Oakley & Cidlowski 2001*).

Glukokortikale Wirkung ist nicht nur auf Immunsuppression und Entzündungshemmung beschränkt. Es konnten in verschiedenen physiologischen Prozessen wie etwa Entwicklung und Differenzierung glukokortikale Einflüsse festgestellt werden. Zum Beispiel liegen im Myometrium der Ratte GR und 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD), welche inaktive Glukokortikoide zu aktiven konvertiert, kolokalisiert vor und verstärken möglicherweise die lokale Glukokortikoid-Wirkung zur Erleichterung der Geburt (*Burton et al 1996*). Dies könnte unter anderem auf den inhibitorischen Einfluss von Glukokortikoiden auf die Synthese des Prostaglandins Prostazyklin (PGI₂) und die Expression des Parathormonverwandten Proteins (*parathyroid hormone-related protein*; PTHrP) zurückzuführen sein (*Casey et al 1985; Paspaliaris et al 1995; Richardson et al 1986*). PGI₂ und PTHrP sind, neben anderen Faktoren, für die Ruhigstellung des Uterus während der Schwangerschaft zuständig. Ferner spielen Glukokortikoide eine wichtige Rolle in der Brustdrüse, an deren Entwicklung und Milchproteinsynthese sie beteiligt sind (*Reichardt et al 2001a*). Außerdem sind Glukokortikoide an der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt, wie in GR-defizienten Mäusen gezeigt wurde. GR^{-/-}-Mäuse sterben kurz nach der Geburt an respiratorischem Versagen, das durch eine unzureichende Entwicklung und Reifung der Lunge hervorgerufen wird (*Cole et al 1995*).

Glukokortikoide üben vielfältige bedeutende Wirkungen im gesamten menschlichen Organismus aus. Noch längst nicht sind alle glukokortikoid-abhängigen Signalwege charakterisiert, so dass die Identifizierung von Genen, welche in die Glukokortikoid-Antwort involviert sind, die Möglichkeit bietet, das komplexe Netzwerk der Glukokortikoidwirkung besser zu verstehen. Im Zusammenhang mit immunsuppressiven und entzündungshemmenden Effekten könnte dies dazu beitragen, spezifische therapeutische Ansätze zu entwickeln.

2.5 Ziel der Arbeit

Progesteron spielt in der normalen weiblichen Entwicklung und Reproduktion eine wichtige Rolle. Die Wege der Progesteronwirkung sind jedoch bis heute nicht sehr gut aufgeklärt und die Ermittlung direkter Ziele wünschenswert.

Auf der Suche nach Transkriptionsfaktoren, die Zinkfinger motive ähnlich denen im *Krüppel*-Entwicklungs gen von *Drosophila* enthalten, wurde eine cDNA-Bank aus bovinem Ovar von Dr. Norbert Walther, IHF, untersucht. Es konnte ein Gen kloniert werden, das das bovine Homolog von PLZF darstellt. Eine Beteiligung des Wildtyp-PLZF an Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsvorgängen wird vermutet. In anschließenden Versuchen wurde eine zyklusabhängige bPLZF-Expression im bovinen Endometrium festgestellt, was als Hinweis auf eine mögliche Progesteronabhängigkeit gewertet wurde.

Aufgrund der vielfältigen Wirkungen von Steroiden u.a. auf die Proliferation und Differenzierung im menschlichen Uterus sowie aufgrund der Bedeutung von Steroiden für die Schwangerschaft und Geburt bot sich an, die Funktion von PLZF als möglichem Empfänger und Vermittler steroidaler Wirkung in diesem Gewebe zu untersuchen.

Nicht nur für das bessere Verständnis der Abläufe im menschlichen Uterus ist eine Aufklärung der PLZF-Regulierung und -Funktion notwendig, sondern auch für die weitere Aufklärung der APL.

Das PLZF-Gen liegt in der APL mit dem RARA-Gen als Fusion vor. Beide aus dieser balancierten reziproken Translokation entstehenden Fusionsproteine (PLZF/RAR α und RAR α /PLZF) sind in Proliferations- und Differenzierungsvorgängen involviert und entscheidend für die Ausprägung des APL-Vollbildes. Das PLZF/RAR α -Protein wird unter der Kontrolle des PLZF-Promotors exprimiert, das RAR α /PLZF-Protein reguliert die Zielgene von PLZF (Abb. 2.9). Beide Vorgänge ermöglichen die APL-Erkrankung, da durch den fremden RAR α -Anteil die natürliche PLZF-Funktion nicht möglich ist. Um die Mechanismen der betroffenen Proliferations- und Differenzierungsvorgänge aufzuklären und vielleicht eine Möglichkeit des therapeutischen Eingreifens zu entwickeln, ist es von großer Bedeutung, die Regulation der Expression des Wildtyp-PLZF, über die nahezu nichts bekannt ist, zu entschlüsseln und die Zielgene dieses Transkriptionsfaktors zu identifizieren, um Aufschluss über seine Funktion zu erhalten .

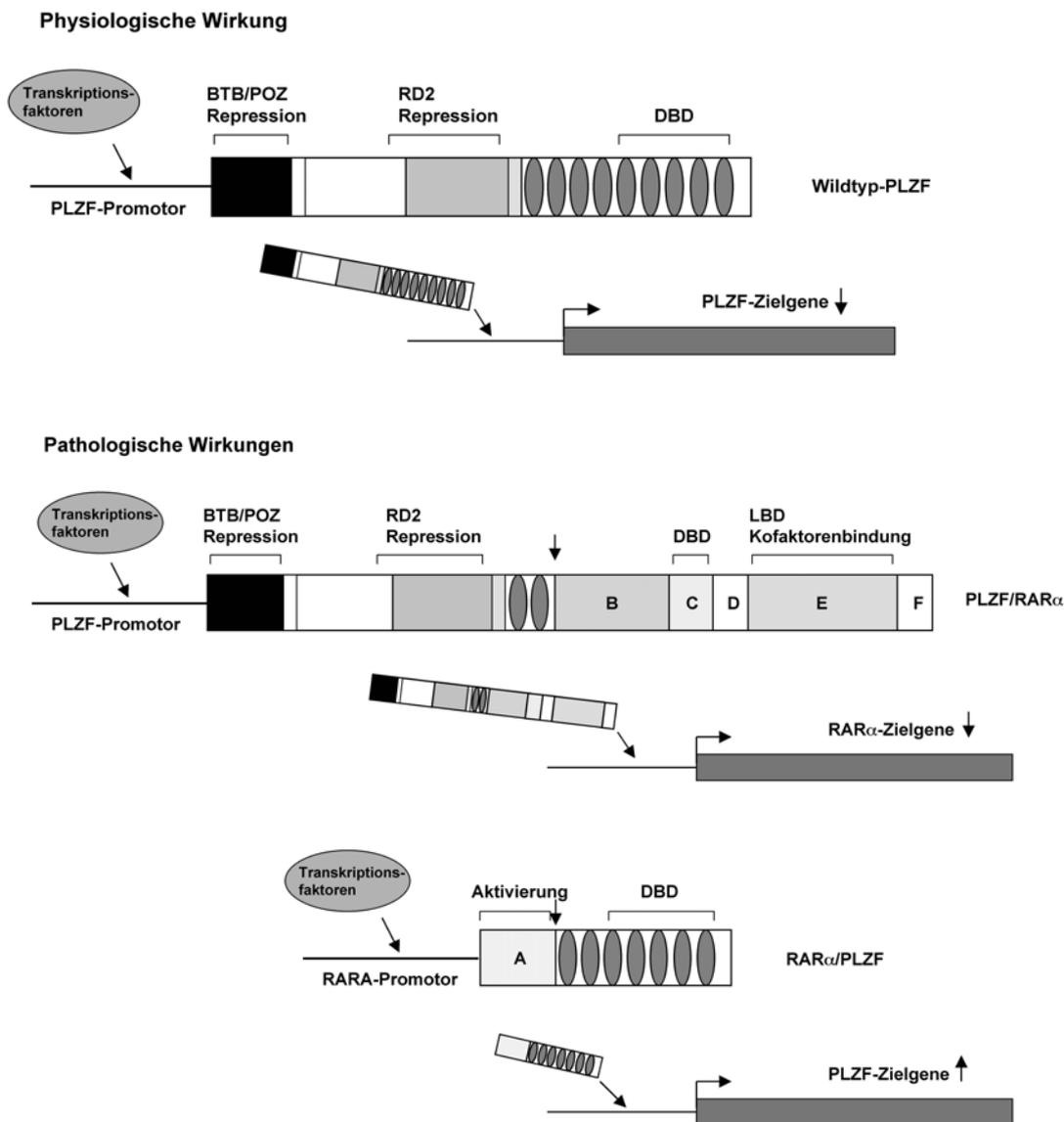


Abbildung 2.9: Physiologische und pathologische Wirkungen von Wildtyp-PLZF bzw. PLZF/RAR α - und RAR α /PLZF-Fusionsproteinen.

PLZF- und RAR α -Domänen siehe Details Abbildung 2.4.

Die Untersuchung der hormonellen Regulation der PLZF-Expression erforderte die Bestimmung der Transkriptionsstartstelle und Klonierung des bisher unbekannt Promotors. Überdies sollten mögliche regulative Elemente im Promotor erkannt und charakterisiert werden. Um die physiologische Relevanz von PLZF im menschlichen Uterus zu klären, ist die Identifizierung von Zielgenen unerlässlich. Diesem Ziel sollte mit Hilfe dieser Arbeit ein Stück näher gerückt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden sterile Kunststoffartikel von den Firmen Falcon, Greiner, NUNC und Sarstedt bezogen sowie sterile Lösungen und Medien verwendet. Alle Zellen wurden in Brutschränken (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

3.1.1 Isolierung und Kultivierung von Primärzellen aus uterinem Gewebe

Zur Gewinnung von Primärzellen wurde uterines Gewebe aus Hysterektomien verwendet. Die Operationen wurden aufgrund von Senkungsbeschwerden oder der Diagnose "Uterus myomatosus" an prämenopausalen Frauen im ELIM-Krankenhaus, Hamburg vorgenommen. Die Verwendung solcher Gewebeproben wurde von der örtlichen Ethik-Kommission genehmigt.

3.1.1.1 Präparation endometrialer Stromazellen (ESZ)

Reagenzien:

Verdauulösung für Endometrium:

- 10 ml DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose) (Bio Whittaker)
- 10 ml Ham's F-12 (Sigma)
- 1 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10000 µg/ml) (Gibco BRL)
- 1 ml Amphotericin B (250 µg/ml) (Gibco BRL)
- 1 ml DNase I (2000 Kunitz-U/ml) (Roche)
- 1 ml Kollagenase Typ V (10 mg/ml) (Worthington)

Basalmedium für ESZ:

DMEM o. Phenolrot (4,5 g/l Glukose) (Bio Whittaker): Ham's F-12 (Sigma),

Verhältnis 1:2

- | | |
|--------------------------------------------|---------------------------|
| DCC-FCS (siehe Kapitel 3.1.3) | (f.c. 10 %) |
| L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies) | (f.c. 2 mM) |
| Penicillin (Gibco BRL Life Technologies) | (f.c. 100 IU/ml) |
| Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies) | (f.c. 100 µg/ml) |
| Insulin (Sigma) | (f.c. 1 µg/ml) |
| 17β-Östradiol (Sigma) | (f.c. 10 ⁻⁹ M) |

Das Endometrium wurde mit einem Skalpell vom Myometrium abgetrennt und in der Verdauung solange im Brutschrank inkubiert, bis sich die ESZ von den Drüsen ablösten. Während des Verdauens wurde die Suspension durch Schwenken oder Pipettieren gemischt und somit verhindert, dass die Zellen sich absetzen. Nach dem Verdau wurde die Zellsuspension mit Basalmedium in einem Verhältnis von 1:2 vermischt, um den Verdau zu stoppen. Es wurden ca. 1×10^6 Zellen auf T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt und im Brutschrank inkubiert, bis sich die ESZ innerhalb von 45 min bis 2 Stunden anhefteten. Das Medium wurde nun entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Am Tag nach der Präparation wurden die Zellen mit PBS (Gibco BRL Life Technologies) gewaschen und das Medium gewechselt. Dies erfolgte alle zwei Tage. Durch die Präparationsmethode war eine Verunreinigung der ESZ mit Epithelzellen möglich. Diese hefteten sich zwar zunächst an, lösten sich jedoch nach spätestens einer Woche vom Boden der Zellkulturflasche ab und konnten abgewaschen werden. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma) vom Flaschenboden abgelöst und im Verhältnis 1:4 passagiert. Die Primärzellen der ersten Passage wurden im Folgenden für RNA-Extraktion und transiente Transfektionen verwendet.

3.1.1.2 Präparation myometrialer glatter Muskelzellen (MMZ)

Reagenzien:

Verdauung für Myometrium:

- 20 ml Ham's F-12 (Sigma)
- 1 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10000 µg/ml) (Gibco BRL)
- 1 ml Amphotericin B (250 µg/ml) (Gibco BRL)
- 1 ml DNase I (2000 Kunitz-U/ml) (Roche)
- 1 ml Kollagenase Typ II (20 mg/ml) (Worthington)

Basalmedium für MMZ:

DMEM o. Phenolrot (4,5 g/l Glukose) (Bio Whittaker): Ham's F-12 (Sigma),

Verhältnis 1:2

- | | |
|--------------------------------------------|------------------|
| FCS (Gibco BRL Life Technologies) | (f.c. 10%) |
| L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies) | (f.c. 2 mM) |
| Penicillin (Gibco BRL Life Technologies) | (f.c. 100 IU/ml) |
| Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies) | (f.c. 100 µg/ml) |

Percollgradient (20 ml):

HBSS (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 33,3%)
NaCl (Merck)	(f.c. 0,6%)
Percoll-400 (Pharmacia)	(f.c. 60%)

Das Myometrium wurde in kleine Stücke zerschnitten und in einer Verdauung über Nacht (maximal 14 Stunden) im Brutschrank inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde resuspendiert und durch einen autoklavierten Nylonstrumpf filtriert. Das Filtrat wurde mit Versene-EDTA (10%; Bio Whittaker) versetzt, auf 50 ml mit Basalmedium aufgefüllt und die Suspension bei 3400 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml Ham's F-12 aufgenommen und auf einen Percollgradienten geschichtet. Dieser Ansatz wurde für 20 min ohne Bremse bei 3400 g zentrifugiert und danach die MMZ, die sich zwischen der Percollschicht und dem Medium angesammelt haben, entnommen. Die MMZ wurden nun vier Mal gewaschen, indem sie in Ham's F-12 resuspendiert und bei 3400 g für 10 min zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das Zellpellet in Basalmedium aufgenommen und die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:2 mit Trypanblaulösung (0,5%; Roche) vermischt und die lebenden Zellen gezählt. Die toten Zellen sind von den lebenden unterscheidbar, da sie über ihre schadhafte Zellmembran den Farbstoff aufnehmen und somit blau erscheinen. Lebende Zellen hingegen sind unter dem Mikroskop hell leuchtend. Die MMZ wurden mit einer Zellzahl von $2,4 \times 10^6$ Zellen pro T75-Zellkulturflasche ausgesät. Am Tag nach der Präparation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium zugesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma) vom Flaschenboden abgelöst und im Verhältnis 1:4 passagiert. Die Primärzellen der ersten Passage wurden im Folgenden für RNA-Extraktion und transiente Transfektionen verwendet.

3.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden aus Aliquots (5×10^6 Zellen in Kulturmedium + 10% DMSO), die in Flüssigstickstoff lagerten, herangezogen.

3.1.2.1 KG-1

Die KG-1-Zelllinie entstammt dem Knochenmark eines Patienten mit myelogener Leukämie (ECACC Nr. 86111306; *European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, Grossbritannien). Die Zellen wachsen in Suspension und wurden alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:3 subkultiviert.

Kulturmedium für KG-1 Zellen:

IMDM (Gibco BRL Life Technologies)	
FCS (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 20%)
L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 2 mM)
Penicillin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 IU/ml)
Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 µg/ml)

3.1.2.2 HL-60

Die HL-60-Zelllinie entstammt Zellen aus einem Patienten mit promyeloischer Leukämie (ECACC Nr. 85011431). Die Zellen wachsen in Suspension und wurden alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:5 subkultiviert.

Kulturmedium für HL-60-Zellen:

IMDM (Gibco BRL Life Technologies)	
FCS (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 10%)
L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 2 mM)
Penicillin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 IU/ml)
Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 µg/ml)

3.1.2.3 Jurkat, E6.1

Die Jurkat-Zelllinie entstammt humanen leukämischen T-Zelllymphoblasten (ECACC Nr. 88042803). Die Zellen wachsen in Suspension und wurden alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:20 subkultiviert.

Kulturmedium für Jurkat-Zellen:

entspricht dem Kulturmedium für HL-60 Zellen (siehe 3.1.2.2)

3.1.2.4 T47D

Die T47D-Zelllinie entstammt einem humanen Brustductalkarzinom (ECACC Nr. 85102201), wächst adhärent und wurde alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:10 passagiert.

Kulturmedium für T47D-Zellen:

DMEM o. Phenolrot (4,5 g/l Glukose) (Bio Whittaker): Ham's F-12 (Sigma),

Verhältnis 1:2

FCS (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 10%)
L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 2 mM)
Penicillin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 IU/ml)
Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 µg/ml)
Insulin (Sigma)	(f.c. 7 µg/ml)

3.1.2.5 SKUT-1B

Die SKUT-1B-Zelllinie entstammt humanen uterinen Sarkomzellen (ATCC Nr. HTB-114; *American Type Culture Collection*, Rockville, USA), wächst adhärent und wurde alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:5 passagiert.

Kulturmedium für SKUT-1B-Zellen:

DMEM o. Phenolrot (4,5g/l Glukose) (Bio Whittaker): Ham's F-12 (Sigma),

Verhältnis 1:2

FCS (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 10%)
L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 2 mM)
Penicillin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 IU/ml)
Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies)	(f.c. 100 µg/ml)

3.1.3 Stimulierung der Zellkulturen

Zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Substanzen, wie z.B. von Steroiden, auf die Genexpression wurden kultivierte Zellen vor der RNA-Isolierung (siehe 3.3.2) sowie nach Transfektion (siehe 3.3.11) mit Substanzen in verschiedenen Konzentrationen und für unterschiedlich lange Zeit inkubiert. Für die Behandlung war es notwendig, die Zellen in

Kulturmedium, das mit steroidfreiem FCS (DCC-FCS) versetzt wurde, zu halten. Für die Herstellung von steroidfreiem FCS wurde FCS mit dextranbeschichteter Aktivkohle (*dextran coated charcoal*, DCC) unter Schütteln für eine Stunde bei 55°C inkubiert. Die Aktivkohle und die daran gebundenen Steroide konnten danach durch Zentrifugation und Sterilfiltration durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße entfernt werden.

Im Folgenden werden die Substanzen unter Angabe der Endkonzentrationen aufgelistet. Abweichungen zu diesen Endkonzentrationen werden im jeweiligen Kapitel gesondert vermerkt.

all- <i>trans</i> Retinolsäure (RA) (Sigma)	2 µM
Dexamethason (DEX) (Sigma)	250 nM
Hydrocortison (HC) (Sigma)	250 nM
Medroxyprogesteronazetat (MPA) (Sigma)	250 nM
Progesteron (P) (ICN)	250 nM
Mifepriston (RU486) (Schering AG, Berlin)	250 nM
Onapriston (ZK98299) (Schering AG, Berlin)	250 nM

3.2 Bakterien

3.2.1 Transformation und Aufzucht von Bakterien

Reagenzien:

LB-Medium (Luria Bertani-Medium):

NaCl (Merck)	(f.c. 1%)
Trypton (Difco Laboratories)	(f.c. 1%)
Hefe-Extrakt (Difco Laboratories)	(f.c. 0,5%)

LB-Agar:

Agar (Difco Laboratories)	(f.c. 1,5%)
in LB-Medium	

Für die Bakterien-Zellkultur wurden sterile Kunststoffartikel von den Firmen Falcon, Greiner, NUNC und Sarstedt bezogen sowie sterile Lösungen und Medien verwendet. Die Transformation bzw. Aufzucht von Bakterien mit einem Plasmid erfolgte, wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen, nach einem Standardprotokoll (*Sambrook et al 1989*). Die Bakterien

wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C bzw. im Schüttler (Biometra) bei 210 Upm über Nacht kultiviert. Die Selektion erfolgte über Zugabe des entsprechenden Antibiotikums Ampicillin oder Kanamycin (f.c. 100 µg/ml) zum LB-Medium oder zur LB-Agarplatte.

3.2.2 Plasmid-Minipräparation

Die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte zur Analyse von Klonierungsprodukten unter Verwendung eines Plasmid-Minipräparationskit (QIAprep 8 Miniprep Kit, QIAGEN). Für die Präparation wurden 2 ml einer Übernachtskultur eingesetzt und die Plasmid-DNA nach dem Protokoll des Herstellers präpariert. Im Anschluss erfolgte eine Analyse mittels Restriktionsverdau (siehe Kapitel 3.3) oder Sequenzierung (siehe 3.3.9). Die Lagerung der Plasmid-Minipräparationen erfolgte bei 4°C.

3.2.3 Plasmid-Maxipräparation

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte u.a. für die Verwendung in Transfektionen (siehe 3.3.11) und Restriktionsverdaus (siehe 3.3). Es wurde ein Plasmid-Maxipräparationskit (JetStar, Genomed) verwendet, nach dessen Protokoll die Präparation mit 200 ml einer Übernachtskultur durchgeführt wurde. Die Lagerung der Plasmid-Maxipräparationen erfolgte bei 4°C oder -20°C.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden der Molekularbiologie wurden nach allgemeinen Protokollen (*Sambrook et al 1989*) durchgeführt. Zu den Methoden zählen u.a. die Agarose-Gelelektrophorese, die RNA/DNA-Aufreinigung durch Phenol/Chloroform, der Restriktionsverdau von DNA und die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren. Die verwendeten Enzyme wurden von AGS/Hybaid, Gibco BRL Life Technologies, New England Biolabs, Stratagene und TaKaRa bezogen und die DNA-Längenstandards von AGS/Hybaid, Gibco BRL Life Technologies und Promega.

3.3.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA aus einem Agarosegel aufzureinigen, wurde die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe von Glasmilch des GeneClean[®] Kits (BIO 101) konnte die DNA nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt werden. Die Glasmilch-Methode ist zusätzlich geeignet, DNA-Fragmente über 200 bp Länge aus wässrigen Lösungen zu extrahieren.

3.3.2 RNA-Isolierung

Reagenzien:

peqGOLD RNAPure[™]-Lösung (Peqlab)

TE-Puffer pH 7,5: Tris pH 7,5 (ICN) (f.c. 10 mM)

EDTA (Merck) (f.c. 1 mM)

Aus kultivierten Zellen wurde mittels Guanidinium-Isothiozyanat-Phenol (peqGOLD RNAPure[™]; Peqlab) und der Phenol/Chloroform-Methode Gesamt-RNA isoliert und mit Isopropanol (Merck) gefällt. Guanidinium-Isothiozyanat ist ein Detergenz, das fähig ist, Zellen zu lysieren und zugleich RNasen und sonstige Enzyme zu inaktivieren. Das Vorgehen bei der RNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das RNA-Pellet wurde in TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

In einem Spektrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia) wurden die Extinktionen der Gesamt-RNA bei 260 nm und 280 nm ermittelt und die Konzentration bestimmt (eine optische Dichte OD_{260} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml). Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} dient als Messwert der Reinheit. Befindet sich der Quotient zwischen 1.9 und 2.1, beinhaltet die RNA einen geringen Proteinanteil. Die Lagerung der Gesamt-RNA erfolgte bei -20°C.

3.3.4 Northern Blot-Analyse

Generell ist für das Arbeiten mit RNA eine hohe Sauberkeit unabdingbar, um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu vermeiden. Daher wurden sterile Materialien wie z.B.

autoklaviertes doppelt destilliertes Wasser verwendet und/oder die Geräte mit RNaseZap® (Ambion) behandelt.

Reagenzien:

NorthernMax™ Kit (Ambion)

Strip-EZ™ RNA Kit (Ambion)

BrightStar™ Psoralen-Biotin Kit (Ambion)

BrightStar™ BioDetect™ Kit (Ambion)

3.3.4.1 Probenvorbereitung

Es wurden je 50 µg Gesamt-RNA und ein psoralen-biotinmarkierter RNA-Molekulargewichtsmarker (0,24-9,49 kb; Gibco BRL Life Technologies) (Markierung siehe Kapitel 3.3.4.4) verwendet und gemäß den Angaben des Herstellers (NorthernMax™, Ambion) für die Gelbeladung vorbereitet.

3.3.4.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Um mögliche Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und ihre Neubildung zu verhindern, enthielt der Ladepuffer der Proben Formamid/Formaldehyd, ebenso wie das 1%ige Agarosegel. Die Herstellung des Gels erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers (NorthernMax™, Ambion). Nach dem Beladen des Gels mit den vorbereiteten Proben (siehe 3.3.4.1) wurde für 20 Minuten eine Spannung von 100 V angelegt, um die Proben in das Gel einlaufen zu lassen. Danach wurde die Spannung für einen Übernachtslauf auf 28 V gesenkt.

3.3.4.3 Kapillartransfer von RNA auf Nylon-Membranen

Nach der Elektrophorese wurde die RNA mittels eines Kapillartransfers (Vorgehen laut Protokoll des Herstellers; NorthernMax™, Ambion) auf eine Nylon⁺-Membran (Roche) geblottet. Die Fixierung der RNA auf die Membran erfolgte durch UV-Licht mit 300 mJoule/cm² (Stratalinker 1800, Stratagene). Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.3.4.4 Herstellung und Markierung der Sonden

Die Synthese der cRNA-Sonden und deren nicht-radioaktive Markierung wurde mit Hilfe zweier Kits (Strip-EZ™ RNA und BrightStar™ Psoralen-Biotin, Ambion) nach den vom Hersteller empfohlenen Vorgehensweisen durchgeführt.

Für die Herstellung der Sonde zum Nachweis von PLZF wurde ein Plasmid konstruiert, das die gesamte proteinkodierende Region von PLZF enthält (Position -65 bis +2056 relativ zum Start-ATG). Hierzu wurde mittels RT-PCR (siehe 3.3.6.1) an ESZ-RNA mit Oligonukleotiden (Tab. 3.1), die 5' eine *Hind*III- und 3' eine *Xba*I-Schnittstelle anfügen, ein PCR-Produkt amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den genannten Enzymen geschnitten und in einen adäquat geschnittenen pGEM-3Zf(+)-Vektor (Promega) kloniert. Das neue Plasmid wurde pGEM-PLZF(2.1) benannt und mit *Apa*I linearisiert, um mit einer T7-RNA-Polymerase eine 1,5 kb lange cRNA-Sonde herzustellen, die komplementär zu der 3'-Region der PLZF-mRNA ist und die Bereiche umfasst, die für die prolinreiche Domäne sowie die neun Zinkfinger kodieren. Für die Herstellung der Sonde zum Nachweis von Zyklophilin als Kontrolle wurde ein Plasmid (pGEM-4) verwendet, das 400 bp der Ratten-Zyklophilin-cDNA beinhaltet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. G.E. DiMattia, London Regional Cancer Center, London, Ontario). Dieses Plasmid wurde am 5'-Ende des Inserts mit *Eco*RI linearisiert, um dann mit einer T7-RNA-Polymerase eine ca. 400 nt große cRNA-Sonde herzustellen. Die nicht-radioaktive Markierung der PLZF- und Zyklophilin-Sonde sowie des RNA-Molekulargewichtsmarkers erfolgte durch kovalente Bindung von Psoralen-Biotin (Ambion) an die cRNA. Die Lagerung der markierten Sonden und des Markers erfolgte in Aliquots bei -20°C.

Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz
5'- <i>Hind</i> III	<i>sense</i> : 5'-CAGGA <u>AAGCTT</u> ACCCAGCCCCGC-3' <u>Schnittstelle</u> <i>Mismatch</i>
3'- <i>Xba</i> I	<i>antisense</i> : 5'-gctc <u>TAGA</u> CCTTCCTTCATCTCAC-3' Überhang (klein), <u>Schnittstelle</u> <i>Mismatch</i>

Tabelle 3.1: Zur Herstellung der PLZF-Sonde verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen.

3.3.4.5 Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung des RNA-Blots wurde unter Berücksichtigung der Anweisungen des Herstellers (NorthernMax™, Ambion) in ULTRAhyb Hybridisierungspuffer durchgeführt. Die Endkonzentration für die markierte PLZF-cRNA-Sonde lag bei 0,2 nM und für die markierte Zyklophilin-cRNA-Sonde bei 0,14 nM. Die simultane Hybridisierung des RNA-Blots mit der PLZF- und Zyklophilin-cRNA-Sonde erfolgte in einer Glasröhre im Hybridisierungssofen (HB-1D Hybridizer, Techne) bei 65°C für 16 Stunden.

Das Waschen des hybridisierten Blots (NorthernMax™, Ambion) sowie die Detektion der PLZF- und Zyklophilinsignale (BrightStar™ BioDetect™, Ambion) wurden mit den Lösungen und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bei der Detektion wurden die Waschschritte gemäss Protokoll verlängert.

Nach der Detektion wurde der Blot in eine Filmkassette gelegt, mit einem Röntgenfilm (Fuji RX, Fuji) bedeckt und bis zur Filmentwicklung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.5 cDNA-Synthese/Reverse Transkription

Reagenzien:

TE-Puffer (mit geringer EDTA-Konz.):	Tris (ICN)	(f.c. 10 mM)
	EDTA (Merck)	(f.c. 0,1 mM)

Als reverse Transkription bezeichnet man die Umschreibung von RNA zu cDNA. Diese Erststrang-cDNA wurde aus 5 µg Gesamt-RNA mit dem *Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand* Kit (Amersham Biosciences) nach dem Protokoll des Herstellers und mit Hilfe der Superscript™ RT II und Oligo(dT)-Oligonukleotiden (beides von Gibco BRL Life Technologies) synthetisiert. Dabei wurde die Gesamt-RNA zusammen mit 0,5 µg Oligonukleotid für 10 min bei 70°C erhitzt, danach auf Eis gestellt und mit Erststrang-Puffer, 10 mM DTT, 0,5 mM (d)-NTPs (Pharmacia) und 20 U Ribonuklease Inhibitor (RNasin, HPRI, TaKaRa) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 min auf 42°C erwärmt, 200 U Superscript™ RT II zugegeben und für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70°C wurde der Ansatz mit TE-Puffer (mit geringer EDTA-Konzentration) auf 100 µl aufgefüllt.

3.3.6 RT-PCR; Southern Blot

Zum Nachweis der Genexpression in Zellen wurde nicht nur die Methode des Northern Blot verwendet, sondern auch die sensitivere Methode der RT-PCR, an die sich eine Southern Hybridisierung mit nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotiden zur Verstärkung des Signals anschloss. Der Versuchsablauf folgte dem allgemeinen Protokoll nach *Sambrook et al 1989*. Abweichungen und Ergänzungen werden im Folgenden aufgelistet.

3.3.6.1 RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*)

Die PCR dient dazu, mittels zweier Oligonukleotide definierte DNA-Bereiche mit Hilfe einer hitzetoleranten *Taq*-DNA-Polymerase zu amplifizieren. Das Prinzip dabei ist, dass die neu synthetisierten DNA-Stränge wieder als Vorlage für die anschließende Synthese fungieren. Zu Beginn einer PCR werden die DNA-Doppelstränge bei 95°C zu Einzelsträngen denaturiert. Während des Abkühlens folgt dann die Anlagerung der Oligonukleotide an die passenden komplementären DNA-Sequenzen (Tab. 3.2A, B). Mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase findet die Elongationsreaktion statt, in der die Polymerase die Neusynthese des komplementären Stranges katalysiert. Diese Reaktion findet bei 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-DNA-Polymerase, statt. Die RT-PCR wird an cDNA durchgeführt, die aus Gesamt-RNA synthetisiert wurde (siehe 3.3.5). Zur Vorbereitung der PCR wird ein Reagenzien-Gemisch (s.u.) hergestellt, das aus allen für eine PCR essenziellen Substraten besteht. Dieses Gemisch wird mit cDNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl vermischt und durchläuft in einem Biometra T1 Cyler mit Deckelheizung (Biometra) ein PCR-Programm.

20 µl-PCR-Reaktionsansatz:	DNA-Polymerase-Puffer (Promega)	(f.c. 1x)
	dNTP (Pharmacia)	(f.c. 200 µM)
	Solution Q (QIAGEN)	(f.c. 1x)
	<i>sense</i> und <i>antisense</i> Oligonukleotid (MWG)	(f.c. je 200 nM)
	Biotherm- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Genecraft)	(1 U)
	cDNA	1 µl
	ddH ₂ O	(ad 20 µl)

Zu amplifizierende cDNA	Oligonukleotid-Sequenz	PCR-Produktlänge	PCR-Programm
GAPDH (Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)	<i>sense</i> : 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3' <i>antisense</i> : 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'	287 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 30 sek 3. 50°C für 30 sek 4. 72°C für 30 sek 5. 2.-4. 25 Zyklen 6. 72°C für 10 min
PLZF	<i>sense</i> : 5'-CAGGAAGCTTACCCAGCCCCGC-3' <i>antisense</i> : 5'-GCTGAACAGCTCCCTCTGGATGAAG-3'	1236 bp volle Länge oder AS I 867 bp AS IV 687 bp AS III 495 bp AS II	<i>touchdown</i> : 1. 95°C für 5 min 2. 95°C für 15 sek 3. 72/69/66/63°C für 40 sek 4. 72°C für 60 sek 5. 2.-4. 3 Zyklen je Anlagerung 6. 95°C für 15 sek 7. 60°C für 40 sek 8. 72°C für 60 sek 9. 6.-8. 30 Zyklen 10. 72°C für 5 min
ZyclinA2	<i>sense</i> : 5'-CCCCAGAAGTAGCAGAGTTTGTG-3' <i>antisense</i> : 5'-CATGCTGTGGTGCTTTGAGGTAGG-3'	400 bp	1. 95°C für 4 min 2. 94°C für 15 sek 3. 56°C für 30 sek 4. 72°C für 90 sek 5. 2.-4. 30 Zyklen 6. 72°C für 10 min
Glukokortikoid-Rezeptor	<i>sense</i> ¹ : 5'-TGGAGATCATATAGACAATCA-3' <i>antisense</i> ¹ : 5'-AACCTCTACAGGACAAACTG-3'	590 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 45 sek 3. 64°C für 45 sek 4. 72°C für 60 sek 5. 2.-4. 30 Zyklen 6. 72°C für 10 min
Progesteron-Rezeptor (B-Form)	<i>sense</i> : 5'-GCCACATTCAACACCCACTTTCTC-3' <i>antisense</i> : 5'-GCCTCCAGCACCCCTTGAGC-3'	411 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 45 sek 3. 52°C für 45 sek 4. 72°C für 60 sek 5. 2.-4. 30 Zyklen 6. 72°C für 10 min
Progesteron-Rezeptor (A/B-Form)	<i>sense</i> : 5'-AAGTGGTCTAAATCATTGCCA-3' <i>antisense</i> : 5'-AAGAAGTTTTGTAAGTTGATAGAA-3'	441 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 45 sek 3. 50°C für 45 sek 4. 72°C für 60 sek 5. 2.-4. 30 Zyklen 6. 72°C für 10 min

Tabelle 3.2 A: Für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide, ihre Sequenzen (mittels *primer select* von DNASTar ermittelt), die Größe des erhaltenen PCR-Fragmentes und das zugehörige PCR-Programm. ¹Hurley et al 1991.

Zu amplifizierende cDNA	Oligonukleotid-Sequenz	PCR-Produktlänge	PCR-Programm
IL-3R α (Interleukin-3 Rezeptor α)	<i>sense</i> ¹ : 5'-GCAAAGGCTCAGCAGTTGAC-3' <i>antisense</i> ¹ : 5'-GATACGTGTTCCCTGAGCATC-3'	389 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 45 sek 3. 64°C für 45 sek 4. 72°C für 60 sek 5. 2.-4. 30 Zyklen 6. 72°C für 10 min
CRH (corticotropin- releasing hormone)	<i>sense</i> ² : 5'-CACCCCTCAGCCCTTGGATTTTC-3' <i>antisense</i> ² : 5'-GCCCTGGCCATTCCAAGAC-3'	413 bp	siehe <i>touchdown</i> - Programm bei PLZF Abweichung hier: 72°C für 45 sek
POMC (<i>proopio-</i> <i>melanocortin</i>)	<i>sense</i> ² : 5'-GAGGGCAAGCGCTCCTACTCC-3' <i>antisense</i> ² : 5'-GGGCCCTCGTCCTTCTTCTC-3'	261 bp	siehe <i>touchdown</i> - Programm bei PLZF Abweichung hier: 72°C für 45 sek
HOXA10 (<i>homeobox A10</i>)	<i>sense</i> : 5'-CAATTCCAAAGGTGAAAACGCAG-3' <i>antisense</i> : 5'-GTCGCCTGGAGATTCATCAGGAAA-3'	289 bp	siehe <i>touchdown</i> - Programm bei PLZF Abweichung hier: 72°C für 45 sek
HOXA11 (<i>homeobox A11</i>)	<i>sense</i> : 5'-GCAACTTCAAGTTCGGACAGCG-3' <i>antisense</i> : 5'-CAATTCCAGCCGCTGGAGTCTTAG-3'	400 bp	siehe <i>touchdown</i> - Programm bei PLZF Abweichung hier: 72°C für 45 sek

Tabelle 3.2 B: Für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide, ihre Sequenzen (mittels *primer select* von DNASTAR ermittelt), die Größe des erhaltenen PCR-Fragmentes und das zugehörige PCR-Programm.¹Kosugi et al 1995, ²Slominski et al 1995.

3.3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese und Transfer

Reagenzien:

Denaturierungs-Puffer:	NaCl (Merck)	(f.c. 1,5 M)
	NaOH (Merck)	(f.c. 0,5 M)
Neutralisierungs-Puffer:	NaCl (Merck)	(f.c. 1,5 M)
	Tris (ICN)	(f.c. 0,5 M)
Transfer-Puffer (20x SSC):	NaCl (Merck)	(f.c. 0,15 M)
	Na ₃ Zitrat x 2 H ₂ O (Merck)	(f.c. 15 mM)

Der gesamte Reaktionsansatz einer RT-PCR (siehe 3.3.6.1) mit den darin enthaltenen Fragmenten wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem das Gel fotografiert und zurechtgeschnitten worden war, wurde es für jeweils 30 min in Denaturierungs-Puffer und danach in Neutralisierungs-Puffer auf einem Schüttler inkubiert. Zwischendurch wurde es kurz in ddH₂O gespült.

Die DNA wurde nun mittels Kapillartransfer über Nacht aus dem Gel auf eine Nylon⁺-Membran (Roche) geblottet. Als Transfer-Puffer diente 20x SSC.

3.3.6.3 Markierung der Oligonukleotid-Sonden

Die nicht-radioaktive Markierung der Oligonukleotide (Tab. 3.3) wurde mit Hilfe der terminalen Deoxynukleotidyltransferase (TdT) (NEB, *New England Biolabs*) durchgeführt. Die TdT ist eine Polymerase, welche die Addierung von Deoxynukleotiden (hier Digoxigenin-11-dUTP) an das 3'-Hydroxylende von DNA-Molekülen (hier Oligonukleotide) katalysiert.

Reaktionsansatz:	Oligonukleotid (MWG)	(f.c. 1,5 µM)
	CoCl ₂ (NEB)	(f.c. 0,25 mM)
	NEB-Puffer 4 (NEB)	(f.c. 1x)
	Digoxigenin-11-dUTP (Roche)	(f.c. 3 µM)
	TdT (NEB)	(20 U)
	ddH ₂ O	(ad 20 µl)

Der Reaktionsansatz wurde für 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die verlängerten Oligonukleotide mit dem gleichen Volumen einer 5 M Natrium-Azetat-Lösung (pH 5,2), vier Volumen 100%igem Ethanol und 20 µg Glykogen (als inertem Träger) präzipitiert. Die Oligonukleotide wurden mittels Zentrifugation (11 000 g, 20 min, 4°C) pelletiert und in 20 µl TE-Puffer pH 8 aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Interne Oligonukleotid-Sonde für das zu amplifizierende cDNA-Fragment von	Oligonukleotid-Sequenz
GAPDH	<i>sense</i> : 5'-TCGTCATGGGTGTGAACCATG-3'
PLZF	<i>antisense</i> (#1): <i>erkennt AS I, II, III, IV</i> 5'-CATGAGGCTTTCTTTCCTTCTG-3' <i>sense</i> (#2): <i>erkennt AS I, III, IV</i> 5'-TACTGTGCAAGGCCACCAGA-3' <i>sense</i> (#3): <i>erkennt AS I, II, III</i> 5'-GCTGTCTCCATGGACTTCAGCACC-3'
ZyklinA2	<i>antisense</i> : 5'-CAAACCTTAATTCTCCCAAAAACAT-3'
Glukokortikoid-Rezeptor	<i>antisense</i> : 5'-GTGTTTACATTGGTCGTACATGCAGGGTAG-3'
Progesteron-Rezeptor (B-Form)	<i>sense</i> : 5'-GACCTCGGACACCTTGCCTGAAGTTTC-3'
Progesteron-Rezeptor (A/B-Form)	<i>antisense</i> : 5'-GGTAAGGCATAATGAATAGAATGATGATTC-3'
IL-3R α	<i>antisense</i> ¹ : 5'-GAAGAGGATCCACGTGGAGA-3'

Tabelle 3.3: Digoxigenin-markierte Oligonukleotide für Southern Blot-Hybridisierungen.

¹Kosugi et al 1995.

3.3.6.4 Hybridisierung und Detektion

Reagenzien:

Prähybridisierungslösung:	Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2	(f.c. 0,25 M)
	SDS (Amersham Biosciences)	(f.c. 20%)
	EDTA (Merck)	(f.c. 1 mM)
	Blockierungsreagenz (Roche)	(f.c. 0,5%)

Hybridisierungslösung:	Prähybridisierungslösung (s.o.)
	Dig-markierte Oligonukleotide (siehe 3.3.6.3)

Wasch-Puffer, pH 7,5:	Maleinsäure (Merck)	(f.c. 0,1 M)
	NaCl (Merck)	(f.c. 0,15 M)
	Tween 20 (ICN)	(f.c. 0,3%)

Blockierungs-Puffer:	Wasch-Puffer, pH 7,5 (siehe vorherige Seite)	
	Blockierungsreagenz (Roche)	(f.c. 0,5%)
Konjugat-Puffer:	Blockierungs-Puffer (s.o.)	
	Anti-Dig-AP (Roche)	(f.c. 1:20 000)
Detektions-Puffer:	NaCl (Merck)	(f.c. 0,1 M)
	Tris (ICN)	(f.c. 0,1 M)
CDP-Star:	Detektions-Puffer (s.o.)	
	CDP-Star (NEB)	(f.c. 1:1 000)

Die Membran wurde für eine Stunde in Prähybridisierungslösung prähybridisiert, und anschließend über Nacht in Hybridisierungslösung (inklusive 3 pmol/ml digoxigenin-markierte Oligonukleotide) inkubiert. Beide Vorgänge erfolgten in einer Glasröhre im Hybridisierungssofen (HB-1D Hybridizer, Techne) bei 45°C.

Die Membran wurde anschließend für 2x 10 min bei RT und für 1x 30 min bei 45°C mit 1x SSC/5% SDS gewaschen.

Die Detektion erfolgte nach mehreren Wasch- und Blockierungsschritten:

Wasch-Puffer	1x 5 min
Blockierungs-Puffer	1x 60 min
Konjugat-Puffer	1x 30 min
Wasch-Puffer	4x 5 min
Detektions-Puffer	1x 5 min
CDP-Star	1x 5 min

Nach dem letzten Detektionsschritt musste der Blot abtropfen und wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt. In einer Filmkassette, mit einem Röntgenfilm (Fuji RX, Fuji) bedeckt, wurde der Blot bis zur Filmentwicklung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.6.5 Strippen eines Southern Blotes

Reagenzien:

<i>Stripping</i> -Lösung:	Tris pH, 7,5 (ICN)	(f.c. 2 mM)
	EDTA (Merck)	(f.c. 1 mM)
	SDS (Amersham Biosciences)	(f.c. 0,1%)

Um einen Southern Blot ein weiteres Mal mit digoxigenin-markierten Oligonukleotiden hybridisieren zu können, mussten die schon hybridisierten Oligonukleotide entfernt werden. Dazu wurde der Blot in einer *Stripping*-Lösung für 15 min bei 65°C geschwenkt und danach kurz mit 1x SSC/5% SDS gespült.

3.3.7 Quantitative *real time*-PCR

Um die relativen Verhältnisse der Genexpression zwischen verschiedenen cDNA-Proben zu ermitteln, eignet sich die Methode der *real time*-PCR. Ein µl cDNA (siehe 3.3.5) wurde in die PCR-Reaktion unter Verwendung des LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) in einem *LightCycler-Instrument* (Roche) eingesetzt. Das experimentelle Protokoll zur Erstellung der externen Standardkurven und Untersuchung der Proben folgte den Empfehlungen des Herstellers mit geringen Modifikationen bei der Amplifizierung der Ziel-cDNA.

Abweichungen:

Zieltemperatur [°C]/ Inkubationszeit [sek]/ Fluoreszenzmessung

95/10/*none*, 56/10/*none*, 72/25/*none*, 85/5/*single*

Zu amplifizierende cDNA	Oligonukleotid-Sequenz	PCR-Produktlänge
GAPDH	<i>sense</i> : 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3' <i>antisense</i> : 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'	287 bp
PLZF	<i>sense</i> : 5'-TTCCTGGATAGTTTGCGGCTGAGA-3' <i>antisense</i> : 5'-CCGTGTGGCTGGGGAAGGTG-3'	273 bp

Tabelle 3.4: Für die *real time*-PCR verwendeten Oligonukleotide, ihre Sequenzen und die Größe der erhaltenen PCR-Fragmente.

Die Standardkurven für GAPDH und PLZF wurden aus einer Verdünnungsreihe durch *real time*-PCR hergestellt, indem mit obigen Oligonukleotiden GAPDH- und PLZF-Fragmente mittels PCR hergestellt, die Konzentration ermittelt und die Fragmente in Zehnerschritten im Bereich von 300 pg/μl bis 30 ag/μl verdünnt wurden. In folgenden *real time*-PCRs wurden beide Oligonukleotidpaare je cDNA und zwei Verdünnungen aus der Verdünnungsreihe verwendet. Dies erfolgte, um die erhaltenen relativen Werte für GAPDH und PLZF anhand der Standardkurve zu extrapolieren. Für die Normalisierung wurden dann die extrapolierten relativen PLZF-Werte durch die extrapolierten GAPDH-Werte der gleichen cDNA geteilt. Um die relativen Unterschiede der mRNA-Menge zwischen den zu vergleichenden Proben zu erhalten, wurde der Wert der Kontrolle als "eins" gesetzt und die relativen Expressionshöhen der anderen Proben in Relation zur Kontrolle ermittelt.

3.3.8 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)

Die Bestimmung des wahren 5'-Endes eines Genes ist von Bedeutung für Untersuchungen der Struktur und Expression dieses Genes und kann über die Methode des 5'-RACE erfolgen. Hierzu wurde der 5'/3'-RACE-Kit (Roche) verwendet und die Empfehlungen des Herstellers beachtet. Zuerst erfolgte an 2 μg KG-1- und MMZ-Gesamt-RNA die Erststrang-cDNA-Synthese unter Verwendung eines für den 5'-untranslatierten Bereich von PLZF spezifischen Oligonukleotides (SP1, *specific primer*, Tab. 3.5). Die Erststrang-cDNA wurde mittels des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) aufgereinigt und durch terminale Transferase an deren 3'-Ende mit einem homopolymeren A-Schwanz versehen. Die so verlängerte cDNA wurde daraufhin in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen mit *Taq*-DNA-Polymerase (Promega) amplifiziert. In der ersten PCR wurde ein Oligo(dT)-Ankeroligonukleotid (Roche), welches komplementär zum A-Schwanz ist und einen nicht sequenzspezifischen Bereich enthält, sowie ein sequenzspezifisches Oligonukleotid (SP2, Tab. 3.5) verwendet. In der zweiten PCR (um die Amplifizierungsrate seltener RNAs zu erhöhen) wurde ein Ankeroligonukleotid (Roche), welches komplementär zum nicht sequenzspezifischen Bereich des Oligo(dT)-Ankeroligonukleotides ist, sowie ein weiteres sequenzspezifisches Oligonukleotid (SP3, Tab. 3.5), welches weiter 5' liegt als SP2, verwendet. Die erhaltenen 5'-RACE-Produkte wurden auf 2%ige Agarosegele aufgetragen, mit Hilfe des *QIAEX II Gel Extraction Kits* (QIAGEN) aufgereinigt, in einen pGEM[®]-T-Vektor (Promega) kloniert und die Sequenz durch automatische Sequenzierung (siehe 3.3.9) ermittelt.

Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz
SP1	<i>antisense</i> : 5'-GCAGTAGCAGGAGAAGCACAC-3'
SP2	<i>antisense</i> : 5'-CACAATCCTCTATGGCCCTGGC-3'
SP3	<i>antisense</i> : 5'-CTCCCTTGCTTCATAAACGCTG-3'

Tabelle 3.5: Für das 5'-RACE verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen.

3.3.9 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (*Sanger et al 1977*) ermöglicht die direkte Identifizierung der DNA-Sequenz und somit eine Überprüfung z.B. klonierter DNA-Fragmente. Diese Methode wurde so abgewandelt, dass eine Fluoreszenzmarkierung anstelle einer radioaktiven Markierung möglich ist (*McBride et al 1989*). Dabei wurde die DNA am 3'-Ende durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Dye-Terminatoren) in der Sequenzierreaktion markiert. Der Sequenzierreaktions-Ansatz beinhaltet BigDye (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer), eine Lösung, die alle für die Synthese und Markierung der DNA benötigten Substanzen enthielt, und durchlief in einem Biometra T1 Cyler (Biometra) ein PCR-Programm (siehe folgende Seite). Nach der Sequenzierreaktion wurde die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen 100%igen Ethanol und Natrium-Azetat pH 5,2 (f.c. 90 mM) gefällt und getrocknet. Die automatische Sequenzierung erfolgte bei Prof. Richter, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universitäts-Krankenhaus Hamburg-Eppendorf.

Sequenzierreaktion-Ansatz:	DNA	(500 ng)
	Oligonukleotid	(f.c. 750 nM)
	BigDye	(f.c. 10%)
	HT-Puffer (PE Biosystems)	(f.c. 0,75x)
	ddH ₂ O	(ad 20 µl)

Sequenzier-Programm:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94°C für 2 min 2. 96°C für 30 sek 3. 50 °C für 15 sek 4. 60 °C für 4 min 5. Schritt 2-4 für 25 Zyklen 6. 4 °C
----------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.3.10 Klonierung der PLZF-Promotorkonstrukte

Für die Klonierung des Promotors wurden unterschiedlich lange Fragmente des 5'-flankierenden Bereiches von PLZF durch PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Die Fragmente umspannen Bereiche zwischen 600 bp und 4000 bp, die alle das gleiche 3'-Ende besitzen, welches den durch 5'-RACE ermittelten Transkriptionsstart beinhaltet. Für die Amplifizierung (siehe unten) in einem *Gradient Cycler* (Biometra) wurde eine DNA-Polymerasenmischung (*Expand 20 kb^{Plus}* PCR System, Roche) verwendet, die besonders für die Amplifizierung langer Fragmente geeignet ist und eine Korrekturlesefähigkeit besitzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind PLZF-sequenzspezifisch (Tab. 3.6).

PCR-Reaktion:	<i>Expand</i> PCR-Puffer (Roche)	(f.c. 1x)
	dNTP (Pharmacia)	(f.c. je 500 µM)
	Betain	(f.c. 750 mM)
	<i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Oligonukleotid (MWG)	(f.c. je 400 nM)
	<i>Expand</i> -DNA-Polymerasenmischung (Roche)	(2,6 U)
	ddH ₂ O	(ad 50 µl)
	menschl. genomische DNA (Roche)	(240 ng)

PCR-Programm:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94°C für 2 min 2. 94°C für 15 sek 3. 50 °C für 1 min 4. 68 °C für 5 min 5. Schritt 2-4 für 30 Zyklen 6. 8 °C
---------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

PLZF-spezifische Oligonukleotid-Sequenz	PCR-Produktlänge <i>sense/antisense</i>
<i>antisense (Position -5772/-5750) :</i> 5'-AAAATCTCCCTTGCTTCATAAAC-3'	siehe <i>sense</i> -Oligonukleotide
<i>sense (Position -6368/-6347) :</i> 5'-ATGGGTAAAGAGGGAGATGAGG-3'	618 bp
<i>sense (Position -6888/-6865) :</i> 5'-TCTGAGGGAGGAGGAAAAGTGTA-3'	1138 bp
<i>sense (Position -7935/-7912) :</i> 5'-GTGGGGTGGGGGATGAGGGATGAT-3'	2186 bp
<i>sense (Position -9825/-9802) :</i> 5'-AGATATAAGGCAGATGGTGGTAAA-3'	4075 bp

Tabelle 3.6: Für die PLZF-Promotorklonierung verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen.

Positionen relativ zum Start-ATG.

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des *Crystal Violet Gel System*, welches Bestandteil des TOPO[®]-XL-PCR *Cloning Kits* (Invitrogen) ist, nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in den pCR[®]-XL-TOPO[®] Vektor kloniert. Die Orientierung der *Inserts* im Vektor wurde mittels gerichteter PCR (ein Oligonukleotid befindet sich im Vektor, das andere im *Insert*) und Restriktionsverdau festgestellt und Plasmide mit einer 3'-5'-Insertorientierung ausgewählt. Das Insert wurde daraufhin mit *EcoRV/SpeI* aus dem Vektor herausgeschnitten und in einen mit *Ecl136II/NheI* geschnittenen pGL3-Basic Vektor subkloniert. Alle inserierten Fragmente wurden mittels Sequenzierung (siehe 3.3.9) überprüft.

3.3.11 Transiente Transfektion

Transfektion, d.h. Einführung von DNA in eukaryontische Zellen, ist eine Methode, um biologische Mechanismen wie z.B. die Regulation von Genexpression über die Promotoraktivität zu untersuchen. Dabei wird exogene DNA vorübergehend (transient) Teil der Zell-DNA. Je nach Fragestellung werden bei einer Transfektion Reportergenkonstrukte, welche Promotorsequenzen stromaufwärts eines Luziferasegens (Reportergen) enthalten, sowie Expressionskonstrukte, in denen ein Gen (z.B. ein Transkriptionsfaktor) unter der Kontrolle eines viralen Promotors stark

exprimiert wird, in die Zelle gebracht. Die Promotoraktivität des Reportervektors wird von verschiedenen Faktoren, etwa kotransfizierten Transkriptionsfaktoren oder -modulatoren, Stimulierung der Zellen durch Hormone und auch endogen bereitgestellten Proteinen, beeinflusst. Das Luziferase-Reportergen wird transkribiert und translatiert, so dass die Aktivität des geernteten Enzyms in einem Luziferase-Assay gemessen werden kann. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Genexpression bzw. Aktivierung des Promotors.

Verwendete Plasmide

Expressionskonstrukte (von Frau Dr. B. Gellersen, IHF, zur Verfügung gestellt):

pcDNA/LAP: Menschliche LAP-cDNA kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor.

pcDNA/LIP: Menschliche LIP-cDNA kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor.

pcDNA/GR α : Menschliche GR α -cDNA kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor.

pRC/HOXA10: Menschliche HOXA10-cDNA kloniert in den pRc/CMV-Expressionsvektor.

pcDNA/STAT5A 1*6: Murine STAT 5A-cDNA (konstitutiv aktiv) kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (Dr. M. Christian/Dr. J. Brosens, London, Großbritannien).

Reporterkonstrukte:

pGRE/-32/luc3: Ein glukokortikoid-responsives Element, kloniert vor einem Minimalpromotor des dezidualen Prolaktins im pGL3-Basic-Vektor, der ein Luziferasereportergen enthält (*Greenland et al 2000*).

PLZF-Promotorkonstrukte (siehe Kapitel 3.3.10).

3.3.11.1 Transfektion von adhärenen Zellen

Die Transfektion adhärenen Zellen wie ESZ, MMZ und SKUT-1B erfolgte mit Hilfe der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode. Es wurde das *ProFection™ Mammalian Transfection System Calcium Phosphate* (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden in Triplikaten mit einer Dichte von $0,5-1 \times 10^5$ Zellen pro 24-well-Platte in Medium mit DCC-FCS ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde 3-4 Stunden vor der Transfektion gewechselt. Eine Ausnahme bildeten die SKUT-1B Zellen, die auf Poly-D-Lysin-beschichteten (Vorgehen nach Angaben des Herstellers, Roche) 24-well-Platten für die Transfektion kultiviert wurden und erst bei dem Mediumwechsel vor der Transfektion Medium mit DCC-FCS erhielten. Für die Transfektion wurden maximal 1 μ g des Reportergenkonstruktes mit dem längsten Insert oder äquimolare Mengen der Konstrukte mit kürzerem Insert oder 0,05 μ g bzw. 0,2 μ g jedes Expressionsvektors verwendet. Die Kontrollen

erhielten äquimolare Mengen von leerem Expressionsvektor, und der Gesamt-DNA-Gehalt aller Ansätze wurde durch Zugabe des promotorlosen Plasmides p0GH (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA) angeglichen. Nach der Transfektion inkubierten die Zellen für 20 Std im Brutschrank. Anschließend wurde das Kalziumphosphat durch einen Mediumwechsel entfernt und je nach Versuchsansatz die transfizierten Zellen mit DEX (250 nM) behandelt und für weitere 24 Std bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte die Messung der Luziferaseaktivität in einem Assay (siehe 3.3.11.3).

3.3.11.2 Transfektion von Suspensionszellen

Die Transfektion von Suspensionszellen wie z.B. Jurkat-Zellen erfolgte mittels Elektroporation mit einem Easyject Plus[®] Elektroporator (PepLab). Jurkat-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion und den ganzen Versuch hindurch in Medium mit DCC-FCS umgesetzt bzw. kultiviert. Für die Transfektion von zwei Triplikaten (s.u.) wurden höchstens 2,25 µg des längsten Reportergenkonstruktes oder eine äquimolare Menge der kleineren Konstrukte und 0,83 µg jedes Expressionsvektors eingesetzt. Auch für die Elektroporation wurde der Gesamt-DNA-Gehalt durch Zugabe von p0GH in allen Ansätzen (Endvolumen von 31,5 µl je Ansatz) angeglichen. Für die Elektroporation von zwei Triplikaten wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen/175 µl zusammen mit der DNA in eine 2 mm Küvette (PepLab) gegeben, in die Elektroporatorschiene gestellt und einem Puls von 126 V und 2550 µF ausgesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden sofort mit 2,4 ml frischem Medium versetzt, in einer Konzentration von $5,8 \times 10^5$ Zellen pro 24er *well* ausplattiert und für 20 Std bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen je nach Versuchsansatz mit DEX (250 nM) behandelt und für weitere 24 Std bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte die Messung der Luziferaseaktivität in einem Assay (siehe 3.3.11.3).

3.3.11.3 Luziferase-Assay

Das Prinzip des Luziferase-Assays ist die Oxidation des Substrates Luziferin durch das Enzym Luziferase und die Messung des dabei emittierten Lichtes bei 560 nm. Die ermittelte Lichtemission dient als Maß für die Promotoraktivität und wird als relative Lichteinheit (RLE) dargestellt. Die Durchführung des Assays erfolgte mit dem Luciferase Assay System (Promega). Adhärente Zellen wurden in den 24er-Platten zweimal mit PBS gewaschen und danach mit 100 µl 1x *Passive-Lysis*-Puffer für 20 min auf einem Schüttler (Biometra) inkubiert. Das Lysat wurde geerntet, kurz gemischt und die Zellbestandteile durch 2-minütige Zentrifugation bei 11 000 g pelletiert. Suspensionszellen hingegen wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zweimal mit PBS gewaschen (es schlossen sich jeweils eine Zentrifugation bei 940 g für 3 min

an) und anschließend das Pellet mit 100 µl 1x *Passive-Lysis*-Puffer versetzt, in dem es für 10 sek auf einem Vortexer gemischt wurde.

Für die Messung wurden 20 µl des Zellextraktes mit 50 µl Luziferase-Substrat-Reagenz in einem Kunststoffröhrchen durch Schwenken gemischt und die Lumineszenz in einem Luminometer (LB 9501, Berthold) ermittelt.

3.3.12 Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von PLZF in uterinem Gewebe wurden kultivierte Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS 5 min mit Methanol fixiert. Nach der Fixierung folgten drei Waschschritte mit PBS und eine 10-minütige Inkubation (zum Blockieren) mit Ziegen Serum (NGS, *normal goat serum*)/0,01% Thimerosal (beides Sigma) bei RT auf einem Schüttler (Biometra). Danach wurde das Serum entfernt und auf die Zellen eine 1:50 Verdünnung des 1. Antikörpers (monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen PLZF, Ab-1, Oncogene) in PBS gegeben und für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert. Kontrollen erhielten keinen 1. Antikörper, sondern nur NGS. Der 1. Antikörper wurde danach durch 3x 5-minütiges Waschen mit PBS (1:10 verdünnt mit ddH₂O) entfernt und die Zellen mit Cy3TM-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/2% NGS für mindestens eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der überschüssige 2. Antikörper durch 3x 5-minütiges Waschen mit PBS (1:10 verdünnt mit ddH₂O) von den Zellen abgewaschen und die Zellen in PBS bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Visualisierung erfolgte durch ein Fluoreszenzmikroskop mit einem DM 510-Filter (Nikon Epiphot, Düsseldorf).

3.4 Methoden zur Identifizierung von PLZF-Zielgenen

Die DNA-*Microarray*-Technik ist eine sehr gute Methode zur Untersuchung von Genexpression z.B. beim Vergleich verschiedener Zelltypen, Entwicklungsstadien oder der Antworten auf bestimmte Stimuli (*Brown & Botstein 1999; Duggan et al 1999*). Zur Zielgen-Identifizierung eines Transkriptionsfaktors gibt es die Möglichkeit, diesen Faktor in Zellen hoch zu exprimieren, die RNA der Zellen zu extrahieren und daraufhin im DNA-*Microarray* zu untersuchen, welche Gene in ihrer Expression verändert wurden. Um einen Transkriptionsfaktor, z.B. PLZF, effizient in Zellen zu schleusen, kann man sich der *Voyager*TM-Technologie (Invitrogen) bedienen, deren Prinzip auf den Fähigkeiten eines viralen Proteins, des VP22-Proteins, beruhen (*Elliott & O'Hare 1997*). Das VP22-Protein besitzt Translokationsfähigkeiten, d.h. es wird sehr schnell

(innerhalb von 20 Minuten) in den Nukleus von Säugetierzellen importiert, nachdem es den Zellen appliziert wurde. Fusioniert man das VP22-Protein mit dem zu untersuchenden Transkriptionsfaktor, exprimiert das Fusionsprotein bakteriell und reinigt es auf, so erhält man die Möglichkeit, den Transkriptionsfaktor hocheffizient in Zellen einzuschleusen und seine Wirkung auf die Genexpression zu untersuchen.

3.4.1 Klonierung der VP22-Fusionskonstrukte

Für die Zielgen-Identifizierung des Transkriptionsfaktors PLZF mit Hilfe der *Voyager*TM-Technologie mussten zunächst zwei VP22/PLZF-Fusionskonstrukte hergestellt werden. Das eine Fusionskonstrukt sollte die komplette kodierende Region des PLZF-Genes enthalten, das zweite Konstrukt nur die für die DNA-Bindung notwendigen Zinkfinger mit einer vorgeschalteten VP16-Transaktivierungsdomäne. Die Klonierung erfolgte unter Verwendung des *Voyager*TM *Protein Production Kit* (Invitrogen).

Zunächst wurde der pCR[®]T7/VP22-1 Vektor modifiziert, indem das c-myc-Epitop durch ein FLAG-Epitop, welches im Protein mit Hilfe eines Antikörpers detektierbar ist, ersetzt wurde. Dies erfolgte durch Restriktion des Vektors mit *BstBI/AgeI* und anschließender Ligation mit hybridisierten Oligonukleotiden (siehe Tab. 3.7), welche das FLAG-Epitop beinhalteten. Der Vektor wurde pCR[®]T7/VP22-FLAG benannt. Das Klonierungsprinzip ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Die in diesen Vektor zu klonierenden Sequenzen wurden mittels PCR unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefähigkeit hergestellt. Als Vorlage wurden Plasmide, welche den kodierenden Bereich von PLZF bzw. die VP16-Transaktivierungsdomäne und die neun Zinkfinger beinhalten, verwendet.

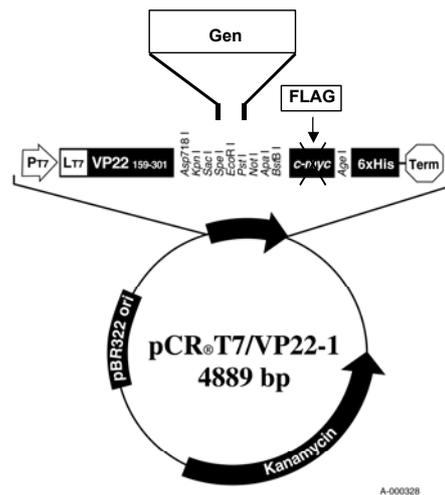


Abbildung 3.1: Klonierungsstrategie zum Erhalt von VP22-Fusionskonstrukten.

PCR-Reaktionen für:

PLZF (volle Länge): *Pfu*-Puffer (Promega) (f.c. 1x)
 dNTP (Pharmacia) (f.c. je 300 µM)
 Solution Q (QIAGEN) (f.c. 1x)
sense und *antisense* Oligonukleotid (MWG) (f.c. je 500 nM)
Pfu-DNA-Polymerase (Promega) (5 U)
 ddH₂O (ad 50 µl)
 Plasmid PLZF (volle Länge) (50 ng)

VP16/9 Zinkfinger: *ProofStart* PCR-Puffer (QIAGEN) (f.c. 1x)
 dNTP (Pharmacia) (f.c. je 300 µM)
 Solution Q (QIAGEN) (f.c. 1x)
sense und *antisense* Oligonukleotid (MWG) (f.c. je 500 nM)
ProofStart DNA-Polymerase (QIAGEN) (2,5 U)
 ddH₂O (ad 50 µl)
 Plasmid VP16/9 Zinkfinger (100 ng)

Sequenz	Oligonukleotid-Sequenz	PCR-Produkt	PCR-Programm
FLAG-Epitop	<i>sense</i> : 5'-CGACTACAAAGACGATGACGACAAAT-3' <i>antisense</i> : 5'-CCGGATTTGTCGTCATCGTCTTTGTAAT-3'	/	/
PLZF (volle Länge)	<i>sense</i> : 5'-catat <u>ACTAGTGATCTGACAAAAATGGGC</u> -3' <i>antisense</i> : 5'-cata <u>GCGGCCGC</u> CATAGCACAGGTAGAGG-3' Überhang, <u>Schnittstellen</u> (<i>Spe</i> I <i>sense</i> , <i>Not</i> I <i>antisense</i>)	2,1 kb	1. 95°C für 5 min 2. 94°C für 30 sek 3. 60°C für 1 min 4. 72°C für 3 min 5. 2.-4. 35 Zyklen 6. 72°C für 10 min 7. 8°C
VP16/9 Zinkfinger	<i>sense</i> : 5'-catat <u>ACTAGITCCCAGCAGCCAGATCAAT</u> -3' <i>antisense</i> : 5'-catat <u>GCGGCCGC</u> CATAGCACAGGTAGAGG-3' Überhang, <u>Schnittstellen</u> (<i>Spe</i> I <i>sense</i> , <i>Not</i> I <i>antisense</i>)	1,3 kb	1. 95°C für 5 min 2. 94°C für 30 sek 3. 60°C für 1 min 4. 72°C für 3 min 5. 2.-4. 35 Zyklen 6. 72°C für 10 min 7. 8°C

Tabelle 3.7: Für die Klonierung der VP22-Fusionskonstrukte verwendete Oligonukleotide, ihre Sequenzen, die Größe des amplifizierten PCR-Fragmentes und das zugehörige PCR-Programm.

Da die *sense*-Oligonukleotide eine Schnittstelle für *Spe*I und das *antisense*-Oligonukleotid eine Schnittstelle für *Not*I beinhalten (Tab. 3.7), ist es möglich, die PCR-Produkte sowie den pCR[®]T7/VP22-FLAG Vektor mit diesen Restriktionsenzymen zu schneiden und die entstandenen Inserts mit dem Vektor zu ligieren. Alle inserierten Fragmente wurden mittels Sequenzierung (siehe 3.3.9) überprüft. Die klonierten VP22-Fusionskonstrukte wurden pCR[®]T7/VP22-PLZF-FLAG und pCR[®]T7/VP22-VP16/9ZF-FLAG genannt.

3.4.2 *In vitro*-Transkription/Translation (IVTT)

Um zu überprüfen, ob mit Hilfe der klonierten VP22-Fusionskonstrukte (siehe 3.4.1) jeweils nur ein komplettes Protein gebildet werden kann und keine vorzeitige Translationstermination eintritt, wurden die Proteine in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert und anschließend auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.4.2.1 IVTT-Reaktion

Vor dem Ansetzen der IVTT-Reaktion wurden die VP22-Fusionskonstrukte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung gereinigt und in ddH₂O zu einer Konzentration von 0,5 µg/µl aufgenommen. Für die *in vitro*-Synthese der Fusionsproteine wurde das TNT[®] *Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega) und ³⁵S-Methionin (Amersham Biosciences) verwendet. Die Hauptkomponente ist das Retikulozytenlysat, das viele für eine erfolgreiche eukaryontische Transkription/Translation benötigten Substanzen wie z.B.

Aminosäuren beisteuert. Des Weiteren sind Nukleotide und eine T7-RNA-Polymerase enthalten, welche die Transkription an einem Expressionsplasmid mit T7-Promotor bewirkt. Der Reaktionsansatz (s.u.) wurde für 75 min bei 30°C im Heizblock (Eppendorf) inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

IVTT-Reaktion:	Retikulozytenlysat (Promega)	(f.c. 80%)
	³⁵ S-Methionin (Amersham Biosciences)	(10 µCi)
	ddH ₂ O (Promega)	(ad 25 µl)
	VP22-Fusionskonstrukt	(500 ng)

3.4.2.2 Probenvorbereitung

Reagenzien:

Ladepuffer (Rittenhouse-Marcus <i>Gel Juice</i>):	Tris pH 6,8 (ICN)	(f.c. 62,5 mM)
	Imidazol pH 6,8 (Sigma)	(f.c. 62,5 mM)
	SDS (USB)	(f.c. 5%)
	Glyzerin (Gibco)	(f.c. 20%)
	β-Mercaptoethanol (Serva)	(f.c. 2,5%)
	Bromphenolblau (Serva)	(f.c. 0,0025%)

Vor der Beladung des Gels wurden die IVTT-Reaktionen (siehe 3.4.2.1) im Verhältnis von 1:4 mit Ladepuffer versetzt, der ¹⁴C-Rainbow-Marker (Amersham CFA 756) und der Benchmark-Marker (Gibco) im Verhältnis von 1:2. Die Proben, mit Ausnahme des Benchmark, wurden bei 95°C für 5 min im Heizblock (Eppendorf) inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt, abzentrifugiert und bei RT bis zur Gelbeladung (siehe 3.4.2.3) aufbewahrt.

3.4.2.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Reagenzien und Gele:

Trenngel:	Tris/HCl, pH 8,9 (ICN)	(f.c. 380 mM)
	SDS (USB)	(f.c. 0,1%)
	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (Serva)	(f.c. 27%)
	APS (ICN)	(f.c. 0,03%)
	TEMED (Serva)	(f.c. 0,07%)
	ddH ₂ O	(ad 7,5 ml)

Sammelgel:	Tris/HCl, pH 6,8 (ICN)	(f.c. 80 mM)
	Imidazol, pH 6,8 (Sigma)	(f.c. 80 mM)
	SDS (USB)	(f.c. 0,09%)
	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (Serva)	(f.c. 13,6%)
	APS (ICN)	(f.c. 0,09%)
	TEMED (Serva)	(f.c. 0,09%)
	ddH ₂ O	(ad 5,5 ml)
Laufpuffer:	Tris (ICN)	(f.c. 50 mM)
	Glyzin (ICN)	(f.c. 380 mM)
	SDS (USB)	(f.c. 0,1%)

Um die in der IVTT-Reaktion hergestellten Proteine elektrophoretisch aufzutrennen, wurden die Ansätze auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Gele bestanden aus zwei Teilen, einem Sammelgel, um die Proteine am gleichen Ausgangspunkt zu sammeln, und dem Trenngel, dessen Prozentigkeit sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine richtet. Hier wurde ein 8%iges Trenngel und das vertikale Elektrophorese Mini-Protean II System (Biorad) verwendet.

Es wurden 10 µl IVTT/Ladepuffer und je 20 µl Marker/Ladepuffer auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Die Proben liefen bei 80 V durch das Sammelgel bis zum Beginn des Trenngels ein, und die Auftrennung erfolgte bei 150 V für 45 min im Trenngel unter Verwendung von adäquatem Laufpuffer (nach Rittenhouse-Marcus).

3.4.2.4 Fixierung

Reagenzien:

Fixierlösung: Essigsäure (Merck) (f.c. 10%)
Methanol (Merck) (f.c. 25%)

Um Proteine im SDS-Polyacrylamidgel zu fixieren, wurde das Gel für 15 min in einer Fixierlösung geschwenkt und kurz mit ddH₂O gespült. Anschließend wurde das Gel auf 3 mm Whatmanpapier gelegt und in einem Gelrockner getrocknet. In einer Filmkassette, mit einem Röntgenfilm (Fuji RX, Fuji) bedeckt, wurde das getrocknete Gel bis zur Filmentwicklung bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.3 Expression der VP22-Fusionsproteine in Bakterien

Mit Hilfe des *Voyager™ Protein Production Kits* (Invitrogen) ist es möglich, klonierte VP22-Fusionskonstrukte (siehe 3.4.1) in *E. coli* zu transformieren, nach IPTG-Induktion zu exprimieren und anschließend aufzureinigen. Die Expression erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4. Ergebnisse

4.1 Kultivierung von ESZ und MMZ

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der PLZF-Expression in uterinem Gewebe. Hierfür wurden primäre Zellkulturen von humanen endometrialen Stromazellen (ESZ) und myometrialen glatten Muskelzellen (MMZ) angelegt (siehe 3.1.1). Um eine Vergleichbarkeit der anschließenden Versuche zu gewährleisten, wurden die Zellen nur einmal passagiert und ab einer Konfluenz von 80% in Versuche eingesetzt. Beide Zelltypen besitzen eine spindelförmige längliche Morphologie (Abb. 4.1 A, C), wobei die ESZ diese Form nur in der proliferativen Phase besitzen (Abb. 4.1 A). Während der späten sekretorischen Phase hingegen erfolgt die Dezidualisierung, welche durch Behandlung mit 8-Br-cAMP induziert werden kann. Die ESZ differenzieren dann zu einem polygonalen, dickeren Phänotyp (Abb. 4.1 B).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ESZ und MMZ mit verschiedenen hohen Konzentrationen und über unterschiedlich lange Zeiträume mit verschiedenen Steroiden und anderen Substanzen behandelt. Das Erscheinungsbild der Zellen *in vitro* wurde dadurch aber nicht beeinflusst.

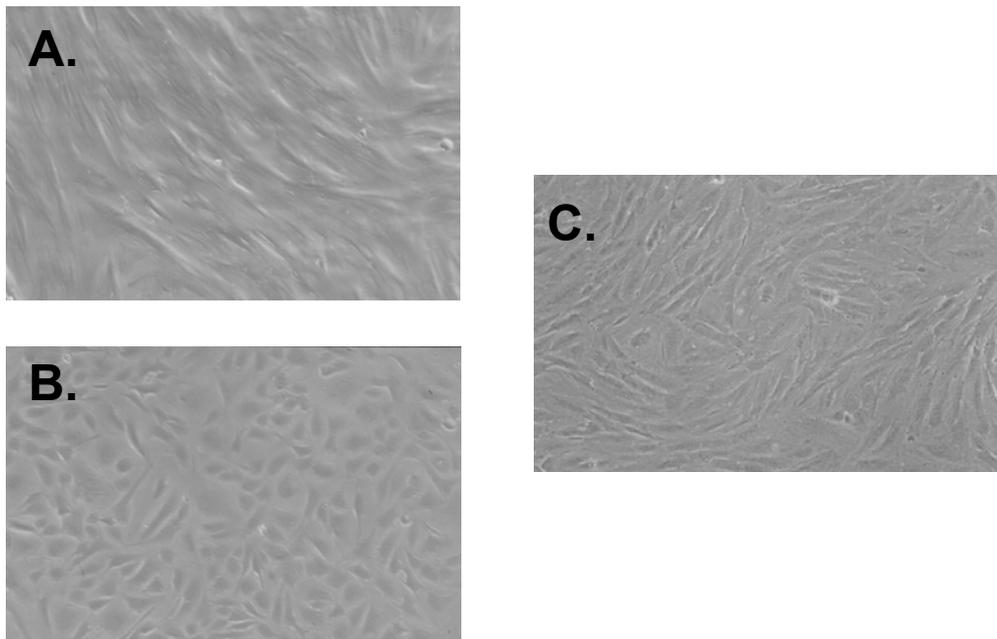


Abbildung 4.1: Phasenkontrastaufnahmen von primären humanen endometrialen Stromazellen (ESZ) (A, B) und myometrialen glatten Muskelzellen (MMZ) (C) *in vitro*.

Die ESZ sind unbehandelt (A) bzw. 9 Tage mit 8-Br-cAMP (500 μ M) behandelt (B). Die MMZ sind unbehandelt und wurden 12 Tage nach der Präparation fotografiert (C). Vergrößerung 80 x.

4.2 Expression von PLZF

4.2.1 Nachweis von PLZF-mRNA im Northern Blot

Um die endogene Expression von PLZF und den möglichen Einfluss darauf durch nukleäre Hormonrezeptoren zu untersuchen, wurden die primären ESZ und MMZ sowie die Zelllinie KG-1, welche eine basal hohe PLZF-Expression besitzt und als Kontrolle dient, mit RA und den Steroiden DEX und P für 4 bis 48 Stunden behandelt. Nach Extraktion der Gesamt-RNA aus den behandelten Zellen wurden Northern Blots angefertigt, die simultan mit einer nicht-radioaktivmarkierten cRNA-Sonde gegen PLZF, die den 3'-Bereich des Gens umfasst (Abb. 4.2) und mit einer cRNA-Sonde gegen das Haushaltsgen Zyklophilin hybridisiert wurden (Abb. 4.3 A-C).

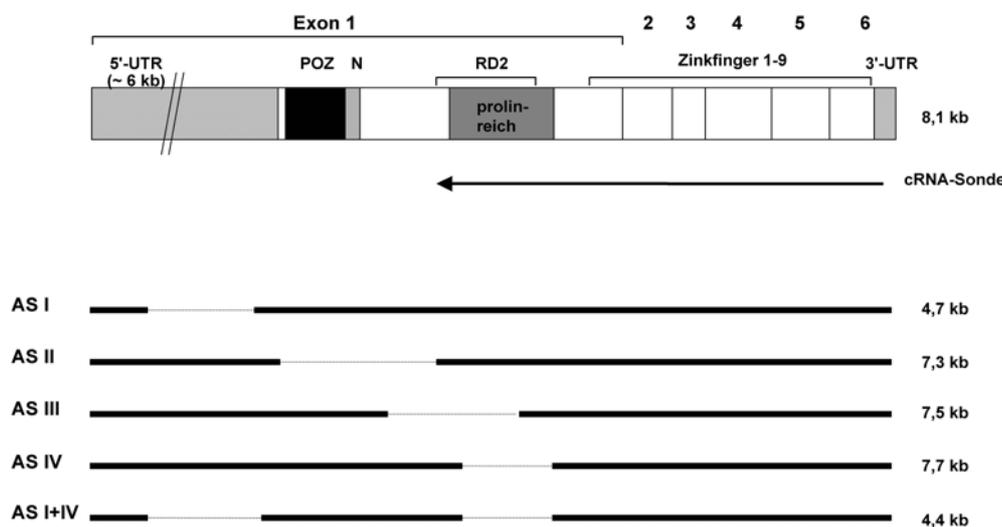


Abbildung 4.2: Struktur und Länge der PLZF-mRNA und der alternativen Spleißvarianten (AS I-IV).

Die humane PLZF-mRNA kodiert für eine N-terminale Repressordomäne (POZ), eine prolinreiche Region, eine überlappende zweite Repressordomäne (RD2), neun Zinkfinger und beinhaltet eine ungewöhnlich lange 5'-UTR. Die in der Northernhybridisierung eingesetzte PLZF-cRNA-Sonde ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Bei der hier etablierten nicht-radioaktiven Northern Technik wurden cRNA-Sonden eingesetzt, da sie eine höhere Sensitivität gegenüber cDNA-Sonden besitzen. Der Einsatz von 0,2 nM PLZF-cRNA-Sonde und 0,14 nM Zyklophilin-cRNA-Sonde ergab folgende gute Resultate. In allen Versuchen wurde ein ca. 8 kb großes PLZF-Transkript in KG-1-Zellen nachgewiesen. Auch in uterinen Primärzellen konnte die 8 kb PLZF mRNA nachgewiesen werden, jedoch in ESZ nur nach 48-stündiger DEX-Behandlung und in MMZ nach 24-stündiger DEX-Behandlung (Abb. 4.3 A, B). In den behandelten KG-1-Zellen hingegen war die Menge an PLZF-Transkript unabhängig von der Behandlung hoch, jedoch konnte nach 24-stündiger DEX-Behandlung eine

Abnahme der PLZF-Transkriptmenge gezeigt werden (Abb. 4.3 C). Dies scheint jedoch durch eine leichte Degradation der RNA begründet zu sein. Zwei weitere, schwächere Banden bei ca. 2 kb und 5 kb konnten in allen Spuren nachgewiesen werden. Dabei kann es sich bei der ca. 5 kb Bande um eine Kreuzhybridisierung der Sonden mit der auf gleicher Höhe befindlichen 28S-RNA handeln. Bei der kleineren Bande von ca. 2 kb handelt es sich wahrscheinlich um die 18S-RNA. Der Nachweis von Zyklophilin erfolgte in allen Northern Blots als Kontrolle, um zu belegen, dass die gleiche Menge Gesamt-RNA in jede Spur des Gels geladen worden war und um somit einen Vergleich der nachgewiesenen PLZF-Transkripte zu ermöglichen. In allen Versuchen konnte die gleiche Menge an Zyklophilin mRNA bei ca. 1 kb detektiert werden.

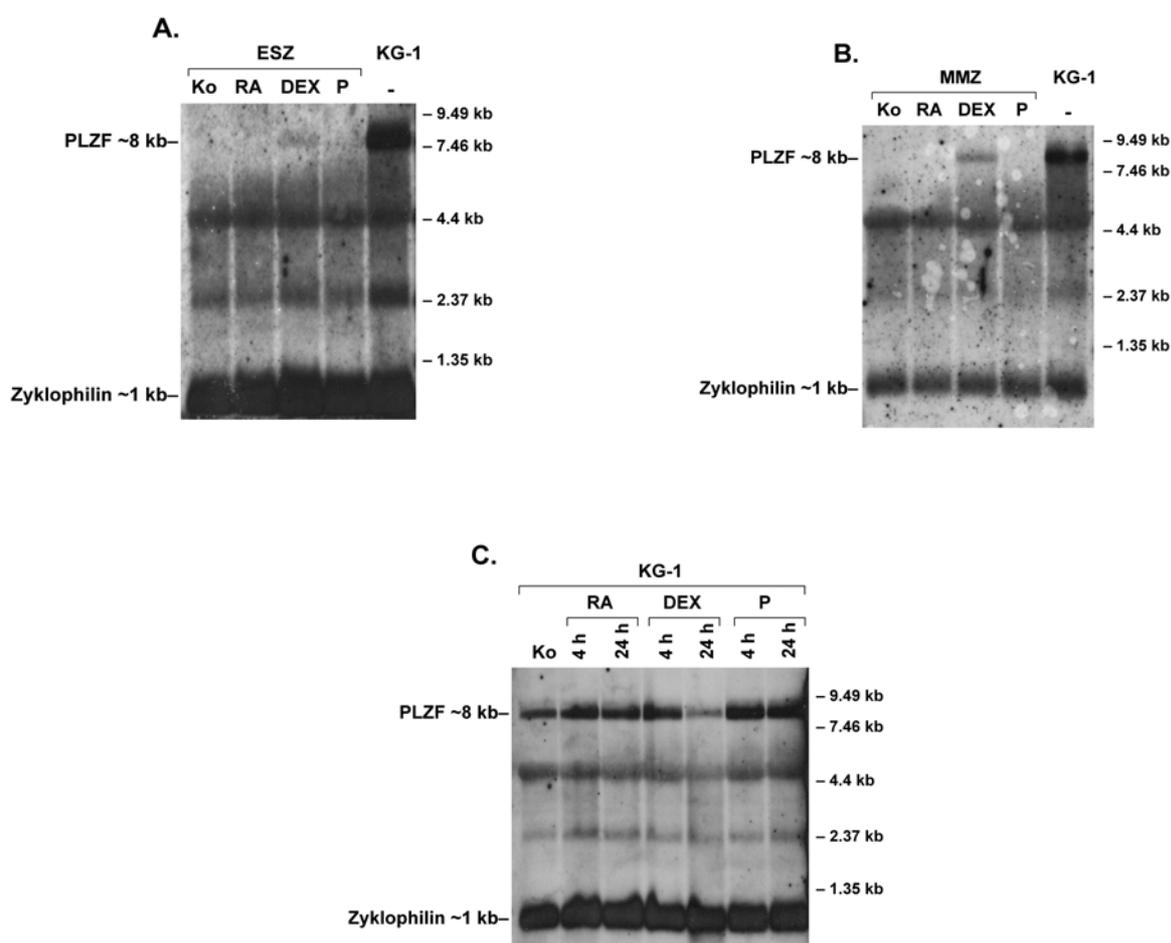


Abbildung 4.3: PLZF-Expression in humanen endometrialen Stromazellen (ESZ), myometrialen glatten Muskelzellen (MMZ) und in der Zelllinie KG-1.

In die Northern Blot-Analyse wurden 50 µg Gesamt-RNA von ESZ (A), MMZ (B) und KG-1 (C) eingesetzt. Die Zellen wurden zuvor mit 2 µM RA und je 250 nM DEX oder P für 48 bzw. 24 Stunden (ESZ bzw. MMZ) und für 4 und 24 Stunden (KG-1) behandelt. Die Kontrollen (Ko) erhielten ein Vehikel, d.h. nur eine äquivalente Menge des Lösungsmittels ohne Steroid. Die Blots wurden simultan mit den biotinylierten cRNA-Sonden für PLZF und Zyklophilin hybridisiert. Der RNA-Marker ist in kb angegeben.

4.2.2 Nachweis von PLZF-mRNA durch RT-PCR

4.2.2.1 Versuchsaufbau

Aufgrund der geringen Sensitivität des Northern Blots zum Nachweis von PLZF und weil es mit dieser Methode nicht möglich war, die bekannten alternativen PLZF-Spleißformen (AS I-IV) zu identifizieren, wurden die folgenden Untersuchungen der PLZF-Expression mit Hilfe der RT-PCR Analyse und anschließendem Southern Blot zur Verstärkung des Signales durchgeführt. Der bei der RT-PCR amplifizierte PLZF-Bereich umspannte 1236 bp des Exon 1, enthält 5' einige Basenpaare der 5'-UTR und reicht 3' über die BTB/POZ, RD2 und prolinreiche Domänen hinaus bis kurz vor den ersten der neun Zinkfinger (Abb. 4.4). In dieser Region liegen zusätzlich zu dem Transkript, das die komplette Exon 1-Sequenz enthält, drei bekannte Spleißvarianten (AS II-IV). Die alternativen Spleißformen I und I+IV sind mit Hilfe dieser RT-PCR nicht unterscheidbar von der kompletten Hauptform bzw. von AS IV. Sie standen jedoch auch nicht im Mittelpunkt des Interesses, da bei ihnen ein 3,4 kb großer Bereich fehlt, der sich in der 5'-UTR, der nichtkodierenden Region, befindet. Für die nicht-radioaktive Detektion der amplifizierten RT-PCR-Produkte wurden digoxigenin-markierte spezifische Oligonukleotide verwendet (Abb. 4.4), die es ermöglichen sollten, die unterschiedlichen Spleißvarianten nachzuweisen.

Die RT-PCR wurde an cDNA durchgeführt, welche mittels reverser Transkription hergestellt worden war. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), dessen Nachweis über Amplifikation eines 287 bp großen Fragmentes erfolgte.

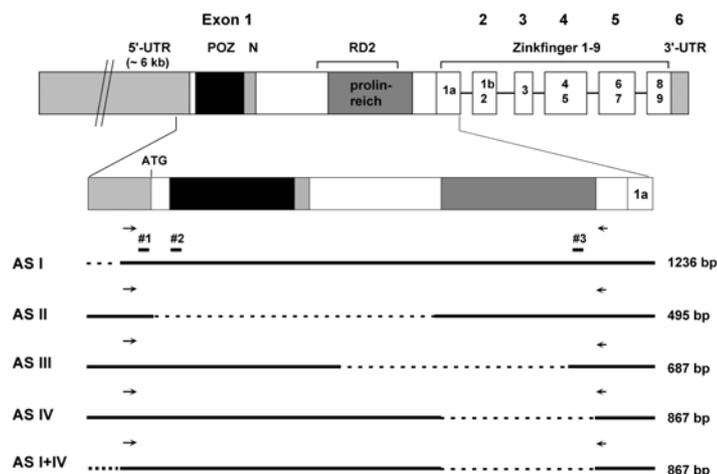


Abbildung 4.4: Struktur der PLZF-mRNA und der alternativen Spleißvarianten (AS I bis IV).

Die Region von Exon 1, welche mehrere alternative Spleißstellen beinhaltet, ist vergrößert dargestellt. Die Anlagerungsregionen der PCR-Oligonukleotide (Pfeile) und der digoxigenin-markierten Oligonukleotide (kleine schwarze Balken, #1-3), welche für die RT-PCR-Analyse und Southern-Hybridisierung verwendet wurden, sind eingezeichnet sowie die Größen der PCR-Produkte je Spleißvariante angegeben.

4.2.2.2 PLZF wird in ESZ und MMZ steroidabhängig exprimiert

Um die endogene Expression von PLZF und einen möglichen Einfluss durch nukleäre Hormonrezeptoren mit Hilfe von RT-PCR zu untersuchen, wurden primäre ESZ und MMZ einer Patientin mit RA und den Steroiden DEX und P für 24 Stunden behandelt. Die aus den Zellen extrahierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in die RT-PCR eingesetzt. Bei der RNA, die aus MMZ gewonnen wurde, handelte es sich um RNA der gleichen Präparation, die schon in einem Northern Blot analysiert worden war (siehe Abb. 4.3 B). Zur Kontrolle wurde cDNA der Zelllinien KG-1 und HL-60, welche eine hohe basale PLZF-Expression besitzen, und cDNA von Jurkat-Zellen in die RT-PCR eingesetzt, an die sich ein Southern Blot mit digoxigenin-markiertem Oligonukleotid (#1) anschloss. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zum Northern Blot mit Hilfe der RT-PCR in allen Zellen, behandelt und unbehandelt, ein Signal nachweisbar war. Die PLZF-Expression in ESZ und MMZ war nach Behandlung mit DEX und P erhöht; die Erhöhung fiel in beiden Zelltypen nach DEX-Behandlung jedoch stärker aus als nach P-Behandlung (Abb. 4.5 oben #1). Hinzu kam, dass beide Stimulationen, also DEX und P-Behandlung, die PLZF-Expression in MMZ stärker erhöhten als in ESZ. Nach der Behandlung mit RA konnte nur ein schwaches Signal detektiert werden, in unbehandelten Zellen war die PLZF-Expression sehr schwach. Das stärkste Signal besaß eine Größe von 1236 bp und repräsentierte somit die PLZF-Variante, welche das komplette Exon 1 beinhaltet. Nach der Hybridisierung mit digoxigenin-markiertem Oligonukleotid (#1) wurde jedoch nicht nur die 1236 bp-Bande nachgewiesen, sondern es wurden auch Banden, die keiner der bisher bekannten Spleißvarianten zugeordnet werden konnten, detektiert (Abb. 4.5 oben #1). Auch durch nachfolgende Hybridisierungen mit digoxigenin-markierten Oligonukleotiden (#2, #3) (Abb. 4.4), die jeweils eine andere Kombination der Spleißvarianten detektieren sollten, war nur der eindeutige Nachweis der 1236 bp langen Variante möglich (Abb. 4.5 Mitte und unten).

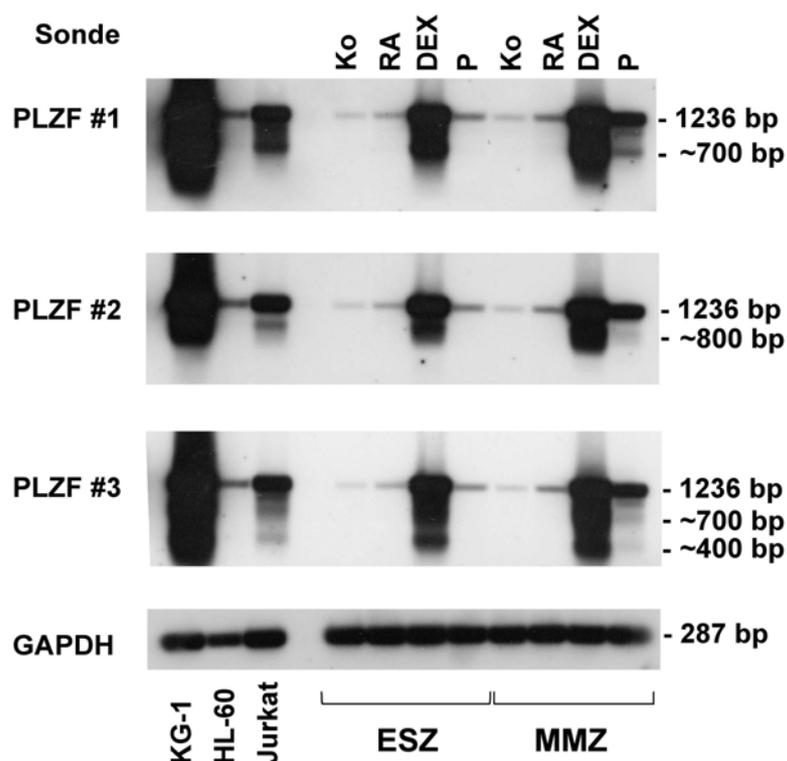


Abbildung 4.5: PLZF-Expression in ESZ und MMZ nach DEX- und P-Behandlung.

ESZ und MMZ wurden für 24 Stunden mit 2 μ M RA und je 250 nM DEX oder P (f.c.) behandelt. Die extrahierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die PLZF- bzw. GAPDH-Expression durch RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für PLZF bzw. GAPDH und Southern Blot-Analyse mit digoxigenin-markierten Oligonukleotiden (siehe Abb. 4.4) nachgewiesen. KG-1-, HL-60- und Jurkat-Zellen wurden ebenfalls untersucht und dienten als Vergleich.

Zur Klärung der unbekanntenen Banden aus der RT-PCR-Analyse wurde die PCR-Reaktion wiederholt, die PCR aufgereinigt und komplett in den pGEM-T[®]-Vektor (Promega) kloniert. Die Sequenzierung der klonierten Fragmente ergab, dass nur die Variante, die das gesamte Exon 1 beinhaltet, und die Variante IV in dem PCR-Ansatz vorlagen. Es könnte sich dabei natürlich auch um die AS I und I+IV handeln, da die PCR nur den kodierenden Bereich umfasst (siehe Kapitel 4.2.2.1). Die Variante IV konnte jedoch nicht mittels RT-PCR-Analyse detektiert werden (siehe Abb. 4.5). Es konnte keine neue Spleißvariante ermittelt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden zum Nachweis von PLZF mittels RT-PCR und Southern Blot dennoch die Blots mit allen drei digoxigenin-markierten Oligonukleotiden (#1-3) hybridisiert, jedoch nur die prominente 1236 bp-Bande nach Hybridisierung mit Sonde #1 in den Abbildungen dargestellt, da schwächeren Nebenbanden sich nicht zuordnen ließen und möglicherweise Artefakte sind. Auf die Darstellung der weiteren zwei Hybridisierungen (mit Oligonukleotid #2 und #3) wurde im Folgenden verzichtet. Sie bestätigten jeweils das Vorkommen und die Regulation der PLZF-Expression.

4.2.2.3 Die PLZF-Expression wird gleichermaßen von Steroiden und ihren synthetischen Derivaten induziert

Um zu überprüfen, ob die nach DEX-Behandlung im Gegensatz zur P-Behandlung erhöhte PLZF-Expression eine Folge der synthetischen Herkunft des Glukokortikoides war, wurden MMZ für 6 Stunden mit 250 nM Endkonzentration Hydrokortison (HC) und P sowie deren synthetischen Derivaten DEX und Medroxyprogesteronazetat (MPA) behandelt. Die RT-PCR-Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied in der Stimulationsfähigkeit zwischen den Steroiden und ihren synthetischen Analoga (Abb. 4.6).

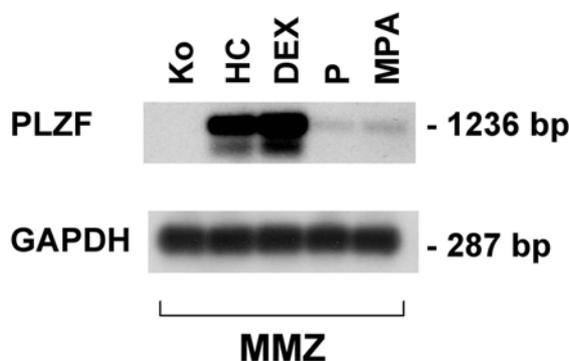


Abbildung 4.6: PLZF-Expression wird in MMZ gleichermaßen von Steroiden und ihren synthetischen Derivaten induziert.

Die MMZ wurden für 6 Stunden mit je 250 nM HC, DEX, P und MPA behandelt und die extrahierte RNA in eine RT-PCR mit anschließender Southern Blot-Hybridisierung eingesetzt.

4.2.2.4 Wirkung von Steroidrezeptorantagonisten auf die PLZF-Expression nach Behandlung mit DEX und P

Der Effekt von Steroiden auf die Transkription von Zielgenen wird durch nukleäre Hormonrezeptoren vermittelt. Um zu bestimmen, ob die Effekte, die DEX und P auf die PLZF-Expression ausüben, durch die zugehörigen Rezeptoren, den Glukokortikoidrezeptor (GR) und Progesteronrezeptor (PR), vermittelt werden, wurden MMZ mit DEX und P sowie mit den Antagonisten Mifepriston (RU486) und Onapriston (ZK98.299) alleine oder in Kombination behandelt. Die Behandlungsdauer betrug 24 Stunden mit einer Steroid- und/oder Antagonisten-Endkonzentration von 250 nM. Bei RU486 und ZK98.299 handelt es sich um GR-/PR-Antagonisten. ZK98.299 übt jedoch eine viel geringere antiglukokortikale Wirkung aus als RU486 (*Chwalisz et al 2000*). Mittels RT-PCR und Southern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die durch DEX ausgelöste starke Induktion der PLZF-Expression durch RU486

sehr stark inhibiert wird, nicht jedoch durch Zugabe von ZK98.299 (Abb. 4.7 A). Die durch P ausgelöste geringere Steigung der PLZF-Expression wird offenbar leicht durch beide Antagonisten reduziert. Diese Resultate ließen sich mittels *real time*-PCR bestätigen (Abb. 4.7 B).

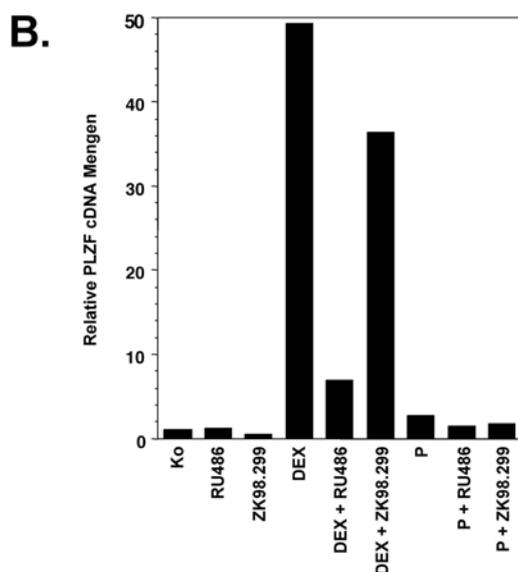
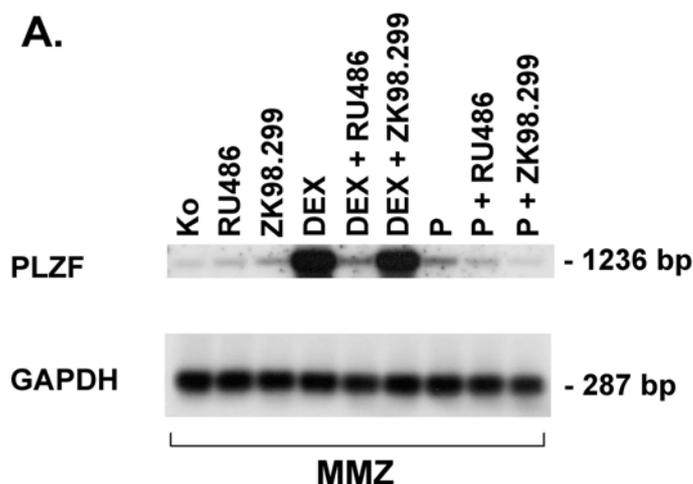


Abbildung 4.7: Modulation der DEX- und P-induzierten PLZF-Expression durch Antagonisten in MMZ.

PCR-Analysen von MMZ, die mit 250 nM DEX oder P sowie Steroidrezeptor-antagonisten (RU486 und ZK98.299), alleine oder in Kombination, behandelt wurden. A, RT-PCR-Analyse gefolgt von Southern Blot-Hybridisierung mit #1-Sonde (siehe Abb. 4.4). B, *Real time*-PCR-Analyse. Die PLZF-cDNA-Menge wurde mit GAPDH normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt.

4.2.2.5 Wirkung von RA auf die PLZF-Expression unter Behandlung mit DEX oder P

Es ist bekannt, dass die RA-induzierte Differenzierung von HL-60- und NB4-Zellen mit einem Rückgang der PLZF-Expression einher geht (*Chen et al 1993*). Daher war es von Interesse zu überprüfen, ob RA die durch DEX- oder P-Behandlung erhöhte PLZF-Expression modulieren kann. MMZ wurden für 24 Stunden mit 250 nM DEX oder P sowie 2 μ M RA, jeweils alleine und in Kombination, behandelt. RT-PCR- und Southern Blot-Analyse ergaben, dass RA einen schwachen repressiven Effekt auf den basalen wie auch den steroidinduzierten PLZF-

Transkriptspiegel besitzt (Abb. 4.8 A). Diese Resultate konnten mit Hilfe der *real time*-PCR bestätigt werden (Abb. 4.8 B).

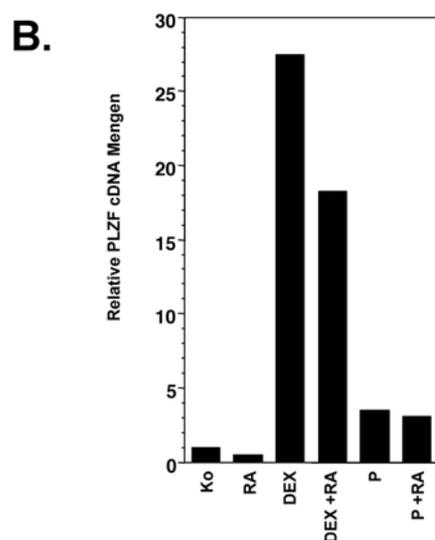
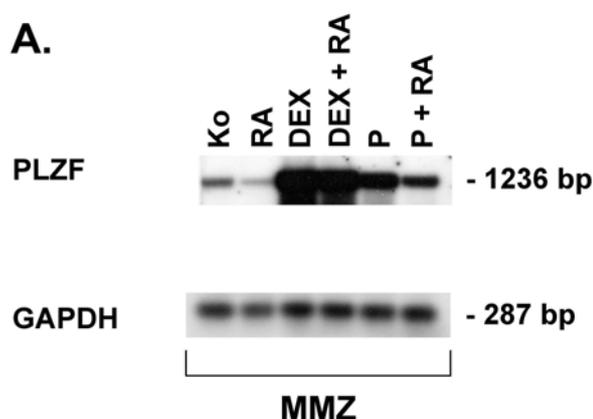


Abbildung 4.8: Modulierung der DEX- und P-induzierten PLZF-Expression durch RA in MMZ.

PCR-Analysen von MMZ, die mit 250 nM DEX oder P sowie mit 2 μ M RA, alleine oder in Kombination, für 24 Stunden behandelt wurden. A, RT-PCR-Analyse gefolgt von Southern Blot-Hybridisierung mit #1-Sonde (siehe Abb. 4.4). B, *Real time*-PCR-Analyse. Die PLZF-cDNA-Menge wurde mit GAPDH normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt.

4.2.2.6 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Induktion der PLZF-Expression durch DEX und P

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PLZF-mRNA durch DEX und P aufreguliert wird, wurde die Zeit- und Dosisabhängigkeit dieses Vorganges untersucht. Um den Expressionsbeginn nach Steroidzugabe zu bestimmen, wurden ESZ und MMZ mit 250 nM DEX für 15 Minuten bis 4 Stunden behandelt. Nach RT-PCR und Southern Blot Analyse zeigte sich eine schnelle Induktion der PLZF-Expression innerhalb von 2 Stunden in ESZ (Abb. 4.9 A) und 3 Stunden in MMZ (Abb. 4.9 B).

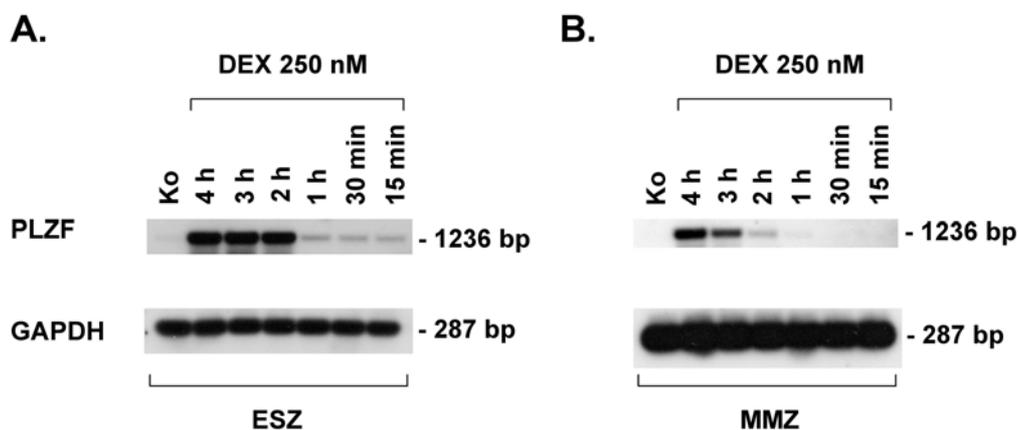


Abbildung 4.9: Zeitabhängige Induktion der PLZF-Expression durch DEX in ESZ (A) und MMZ (B).

Die Zellen wurden in der angegebenen Weise behandelt und einer RT-PCR-Analyse mit anschließender Southern Blot-Hybridisierung mit #1-Sonde (siehe Abb. 4.4) unterzogen.

Ein längerer Zeitverlauf zwischen 4 und 72 Stunden wurde für die Behandlung mit 250 nM DEX (Abb. 4.10 A) oder P (Abb. 4.10 B) in MMZ beobachtet. Die PLZF-Expression erreichte bei beiden Stimulationen innerhalb 4 Stunden ihren Maximalwert und blieb bis zu 72 Stunden unverändert hoch.

Zur Bestimmung der DEX- und P-Dosisabhängigkeit wurden MMZ mit 1 pM, 1 nM und 1 μ M DEX bzw. P für 4 bzw. 24 Stunden behandelt. Es zeigte sich, dass erst nach Zugabe der höchsten Dosis beider Steroide eine deutliche Induktion der PLZF-Expression auftrat (Abb. 4.10 A+B).

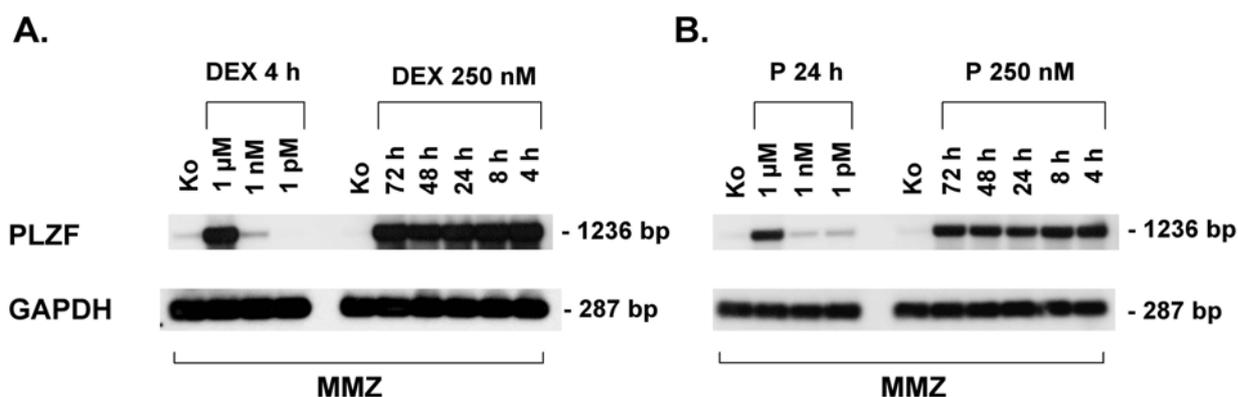


Abbildung 4.10: Dosis- und zeitabhängige Induktion der PLZF-Expression in MMZ.

Die RT-PCR-Analyse mit anschließender Southern Blot-Hybridisierung mit #1-Sonde (siehe Abb. 4.4) wurde an MMZ, die in angegebener Weise behandelt worden waren, durchgeführt.

4.2.2.7 PLZF-Expression in KG-1- und T47D-Zellen

Bisher konnte eine steroidabhängige PLZF-Expression in ESZ und MMZ nachgewiesen werden. Es sollte weiter geklärt werden, ob PLZF auch in anderen Zelltypen steroidabhängig exprimiert wird. Für die Stimulationsversuche wurden myelogene Leukämiezellen der Linie KG-1 verwendet, die PLZF basal hoch exprimieren (*Chen et al 1993*), und es wurden T47D-Brustkrebszellen eingesetzt, die endogen PR stark exprimieren und häufig als Modell zur Erforschung von Progestinwirkungen in Brustzellen dienen (*Nordeen et al 1989*). Die KG-1-Zellen wurden für 4 und 24 Stunden mit 2 μ M RA und 250 nM DEX oder P behandelt, den T47D-Zellen wurde für 2, 4 und 24 Stunden 250 nM DEX oder P zugesetzt. RT-PCR- und Southern Blot-Analysen bestätigten den hohen basalen Spiegel an PLZF-Transkripten in KG-1 Zellen, ließen jedoch keine Regulation der Expression nach Zugabe von RA und den Steroiden erkennen (Abb. 4.11 A). Die im Northern Blot gezeigte Abnahme der PLZF-Transkriptmenge nach 24stündiger DEX-Behandlung (siehe Abb. 4.3 C) kann mittels RT-PCR nicht bestätigt werden. In T47D-Zellen konnte eine hohe PLZF-Expression auch schon in der Kontrolle detektiert werden. Die Expression wurde durch DEX- und P-Zugabe zwischen 2 und 24 Stunden Behandlungsdauer zeitunabhängig in nahezu gleicher Höhe verstärkt, wobei auch hier die Induktion durch DEX gegenüber der durch P größer war (Abb. 4.11 B).

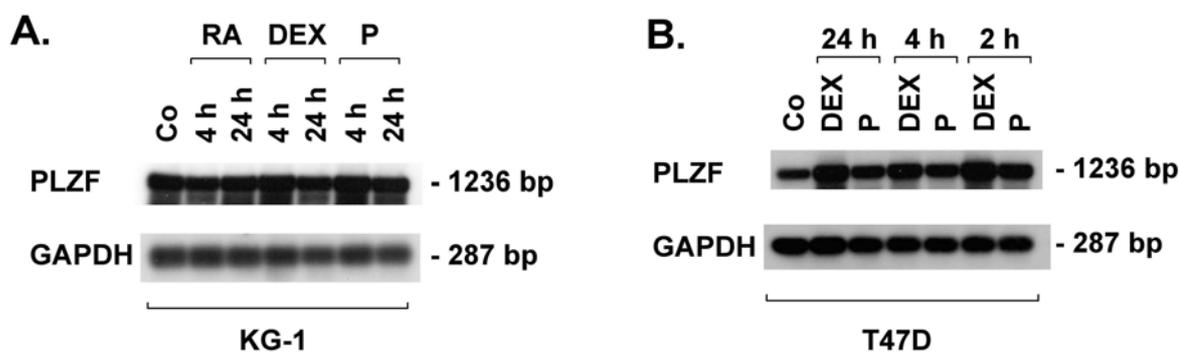


Abbildung 4.11: Regulierung der PLZF-Expression in KG-1- (A) und T47D- (B) Zelllinien.

RT-PCR-Analyse mit anschließender Southern Blot-Hybridisierung mit #1-Sonde (siehe Abb. 4.4). A, KG-1 wurden mit RA, DEX und P für 4 und 24 Stunden behandelt. B, T47D wurden mit DEX oder P für 2, 4 und 24 Stunden behandelt.

4.2.3 Nachweis von endogenem PLZF-Protein in MMZ durch Immunfluoreszenz

Um die Lokalisierung des PLZF-Proteins unter Einfluss von DEX in MMZ zu bestimmen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit DEX behandelt und Kontrollen unbehandelt belassen. Es erfolgte eine Fixierung der Zellen durch Methanol und eine anschließende Detektion des PLZF-Proteins durch einen monoklonalen PLZF-Antikörper und einen Cy3-markierten zweiten Antikörper über Immunfluoreszenz. In den DEX-behandelten Zellen ist eine charakteristische Verteilung von endogenem PLZF im Zellkern zu beobachten (Abb. 4.12 rechts). Diese Verteilung erfolgt in kleinen punktuellen Ansammlungen, die typisch für das PLZF-Protein, aber auch für das PLZF-RAR α -Fusionsprotein sind, wie in anderen Zellsystemen durch Transfektion von PLZF-Expressionsplasmiden gezeigt worden ist (Dong *et al* 1996; Reid *et al* 1995). Die Aggregation mehrerer PLZF-Proteine erfolgt im Zellkern über die BTB/POZ-Domäne. Im Gegensatz zu den DEX-behandelten Zellen ist in den unbehandelten Zellen mit geringen Ausnahmen keine punktuelle Ansammlung detektierbar und nur eine schwache Hintergrundfärbung sichtbar (Abb. 4.12 links).

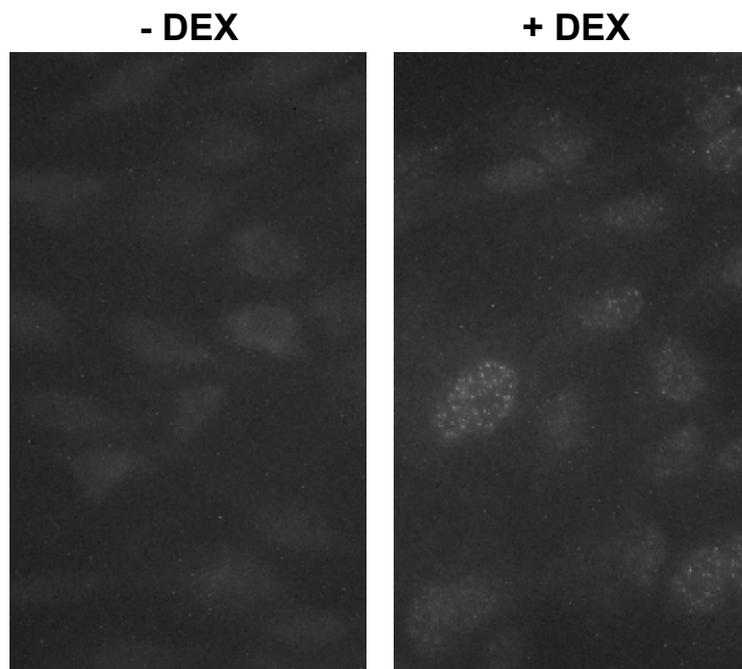


Abbildung 4.12: Zelluläre Lokalisierung von PLZF in punktuellen Ansammlungen in MMZ.

MMZ wurden für 24 Stunden mit 250 nM DEX behandelt (rechts) oder unbehandelt belassen (links). Danach schloss sich eine indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalem PLZF-Antikörper und Cy3-markiertem zweiten Antikörper an. Vergrößerung: 560x.

4.3 Expression von GR und PR in verschiedenen Zelltypen

Wie zuvor gezeigt (siehe Kapitel 4.2), wird PLZF in ESZ, MMZ und T47D-Zellen steroidabhängig exprimiert, im Gegensatz zur Expression in KG-1-Zellen. An der Wirkung von Steroiden sind maßgeblich nukleäre Hormonrezeptoren beteiligt. Es ist jedoch beschrieben worden, dass T47D-Zellen keinen GR besitzen (Nordeen *et al* 1989). Um die Expression von GR und PR in den hier verwendeten Zelltypen darzulegen, wurde von unbehandelten Zellen GesamtrNA extrahiert und die daraus hergestellte cDNA in eine RT-PCR und Southern Blot-Analyse eingesetzt. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die spezifisch für PR-B und für die Ligandenbindungsdomänen von GR und PR sind. Die Amplifizierung der PR-LBD war notwendig, um PR-A-Expression in Zellen, die möglicherweise nicht PR-B exprimieren, nachweisen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass PR sehr stark in T47D-Zellen exprimiert wird (Abb. 4.13). In ESZ und MMZ war die Expression deutlich geringer und in den hämatopoetischen Zelllinien KG-1, HL-60 und Jurkat waren PR-Transkripte kaum oder überhaupt nicht vorhanden. Im Gegensatz dazu war der GR in allen Zelltypen stark exprimiert, mit Ausnahme der HL-60 Zelllinie, die jedoch auch eine sehr geringe Menge an GAPDH-mRNA aufwies (Abb. 4.13). Unerwarteterweise konnte hier die GR-Expression in T47D-Zellen nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu den oben erwähnten Daten der Arbeitsgruppe um Steven Nordeen.

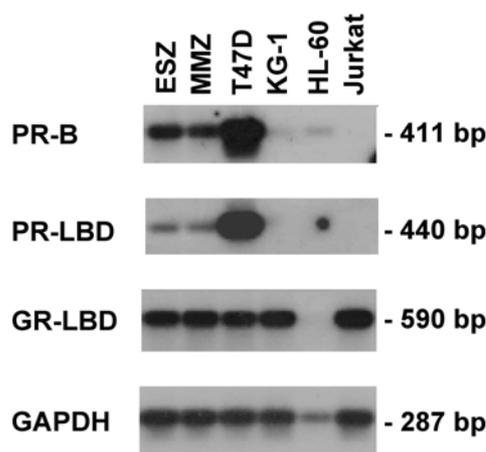


Abbildung 4.13: Expression von PR-A, -B und GR in ESZ, MMZ und T47D-, KG-1-, HL-60- und Jurkat-Zelllinien.

Für die RT-PCR-Analyse wurden Oligonukleotide verwendet, die jeweils ein spezifisches Fragment der N-terminal gelegenen Region von PR-B (PR-B) amplifizieren, sowie ein dem PR-A und PR-B gemeinsames Fragment in der LBD (PR-LBD) und eines der LBD des GR (GR-LBD). Der Southern Blot der PCR-Produkte wurde mit digoxigenin-markierten internen Sonden hybridisiert.

4.4 Expression des GR in DEX-behandelten MMZ

Es ist bekannt, dass die Expression des GR α unter dem Einfluss von Glukokortikoiden in verschiedenen Zellen reduziert wird (Burnstein & Cidlowski 1992). Um dies in MMZ zu untersuchen, wurde mittels spezifischer RT-PCR und Southern Blot die cDNA analysiert, welche auch schon für die Expressionsstudien von PLZF nach DEX-Behandlung verwendet worden war (siehe Kapitel 4.2.2.6). Es konnte eine geringe Abnahme der GR α -Expression nach 4-stündiger Inkubation mit nur 1 pM DEX und nach ca. 24-stündiger Inkubation mit 250 nM DEX nachgewiesen werden (Abb. 4.14).

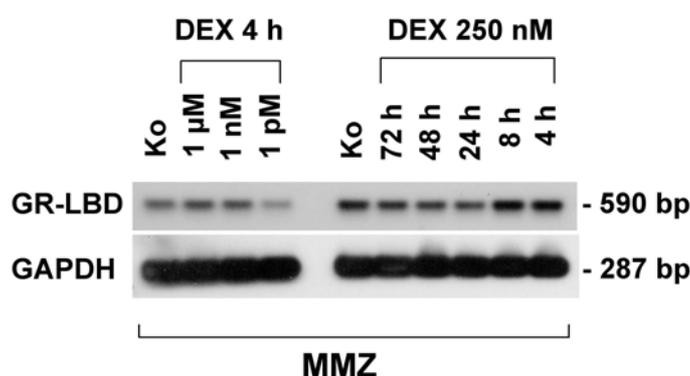


Abbildung 4.14: GR-Expression in DEX-behandelten MMZ.

Für die RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, um eine Region in der LBD des GR nachzuweisen.

4.5 Mögliche Zielgene von PLZF

Derzeit sind nur zwei mögliche Zielgene des Transkriptionsfaktors PLZF bekannt. Bisher konnte durch PLZF-Überexpression ein wachstumsinhibierender Effekt auf die murine myeloide Zelllinie 32Dcl3, auf murine Fibroblasten der Linie NIH3T3 und die humane Leukämiezelllinie NB4 durch Herunterregulierung des Zellzyklusgens ZyklinA2 nachgewiesen werden (Yeyati *et al* 1999). Außerdem wird in der murinen 32Dcl3-Zelllinie die Expression der α Untereinheit des Interleukin-3 Rezeptors (IL-3R α) durch PLZF-Überexpression reduziert (Ball *et al* 1999). Ferner wird über HOX-Gene als Zielgene von PLZF spekuliert (Barna *et al* 2000). Da, wie zuvor in dieser Arbeit gezeigt, die PLZF-Expression durch Glukokortikoide erhöht und PLZF als transkriptioneller Repressor beschrieben wird (Ball *et al* 1999), ist ein PLZF-Einfluss auf die Expression bekannter glukokortikoidresponsiver Gene denkbar. Als klassische glukokortikoid-

responsive Gene gelten Proopiomelanokortin (*proopiomelanocortin*, POMC) und Kortikotropin-freisetzendes Hormon (*corticotrophin releasing hormone*, CRH), deren Expression in vielen Geweben durch Glukokortikoide reprimiert wird. Um einen Einfluss von PLZF auf mögliche Zielgene in unserem Zellsystem zu untersuchen, wurden RT-PCR-Analysen mit genspezifischen Oligonukleotiden an cDNAs durchgeführt, die aus DEX- bzw. P-behandelten MMZ stammen und somit eine erhöhte PLZF-Expression aufweisen (siehe Kapitel 4.2.2.6). Die Dex- bzw. P-Behandlung erfolgte für 4 bis 72 Stunden mit einer Endkonzentration von 250 nM und für 4 Stunden mit unterschiedlichen DEX- bzw. P-Konzentrationen (1 pM, 1 nM und 1 µM).

4.5.1 Expression von ZyklinA2, IL-3R α , CRH und POMC in DEX-behandelten MMZ

Durch die Behandlung von MMZ mit DEX in verschiedenen hohen Konzentrationen und für unterschiedlich lange Intervalle lässt sich eine Dosis- und Zeitabhängigkeit der PLZF-Expression in MMZ nachweisen (siehe Kapitel 4.2.2.6). Obwohl nach Zugabe von 1 µM DEX für 4 Stunden eine erhöhte PLZF-Expression zu sehen war, konnte keine Änderung der ZyklinA2-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Nach dem Zeitverlauf von 4-72 Stunden mit DEX-Behandlung war in Anwesenheit einer konstant erhöhten PLZF-Expression die ZyklinA2-Expression im Vergleich zur Kontrolle zunächst unverändert hoch, nahm jedoch innerhalb von 48 bis 72 Stunden ganz leicht ab (Abb. 4.15).

Ein ähnlicher Versuch wurde für die Expression der IL-3R α -Untereinheit in MMZ durchgeführt. Zusätzlich zu der cDNA DEX-behandelter MMZ wurde die cDNA von KG-1-Zellen, die PLZF basal hoch exprimieren, als Kontrolle für die RT-PCR-Analyse mit anschließendem Southern Blot eingesetzt. Es zeigte sich eine schwache IL-3R α -Expression in KG-1-Zellen und eine kaum detektierbare Expression in den DEX-behandelten MMZ, so dass auf eine Abbildung des Southern Blots verzichtet wird. Auch die CRH-Expression ist in den DEX-behandelten MMZ nicht nachweisbar. Die hohe POMC-Expression ist in MMZ durch verschiedene Konzentrationen und Behandlungsperioden von DEX nicht beeinflussbar (Abb. 4.15).

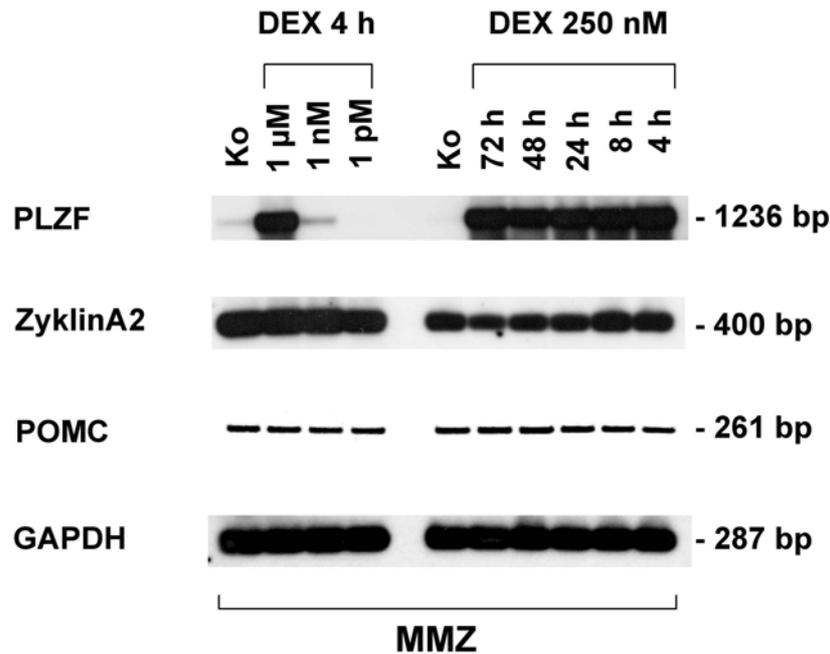


Abbildung 4.15: Expression von PLZF, ZyklinA2 und POMC in DEX-behandelten MMZ.

RT-PCR-Analysen aller oben genannter Gene erfolgten mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide an MMZ cDNA (siehe Kapitel 4.2.2.6). Die anschließende Southern Blot-Hybridisierung wurde mit digoxigeninmarkierten internen Oligonukleotid-Sonden von PLZF (#1), ZyklinA2 und GAPDH durchgeführt. Zum Nachweis der POMC-Expression erfolgte nur eine RT-PCR.

4.5.2 Expression von HOXA10 und HOXA11 in DEX- und P-behandelten MMZ

Eine neuere Studie über PLZF-defiziente Mäuse zeigte den starken Einfluss von PLZF u.a. auf das Axialskelett, und es wurde eine Verbindung zur Regulation der HOX-Genexpression nahegelegt (*Barna et al 2000*). Weitere Studien haben gezeigt, dass die Expression von HOXA10 und HOXA11 wichtig für die Entwicklung des weiblichen Reproduktionstraktes ist (*Taylor et al 1997*). Daher schien eine Verbindung der PLZF- und HOX-Genexpression im Uterus möglich. Es wurde eine RT-PCR-Analyse mit HOXA10- und HOXA11-spezifischen Oligonukleotiden an cDNA durchgeführt. Die cDNA wurde aus einem DEX- und P-Dosis- und Zeitverlaufsexperiment an MMZ gewonnen (siehe Kapitel 4.2.2.6). Es konnte durch die unterschiedlich hohen Konzentrationen von DEX bzw. P keine Veränderung der HOXA10- und HOXA11-Expression gezeigt werden (Abb. 4.16 A+B). Auch nach 4-72 Stunden P-Behandlung war in Anwesenheit einer erhöhten PLZF-Expression die HOXA10- sowie HOXA11-Expression in MMZ unverändert hoch (Abb. 4.16 B), wohingegen nach 4 Stunden DEX-Behandlung die Expression der HOX-Gene sehr leicht reduziert wurde, dann aber innerhalb von 72 Stunden bis auf den Ausgangswert wieder anstieg (Abb. 4.16 A).

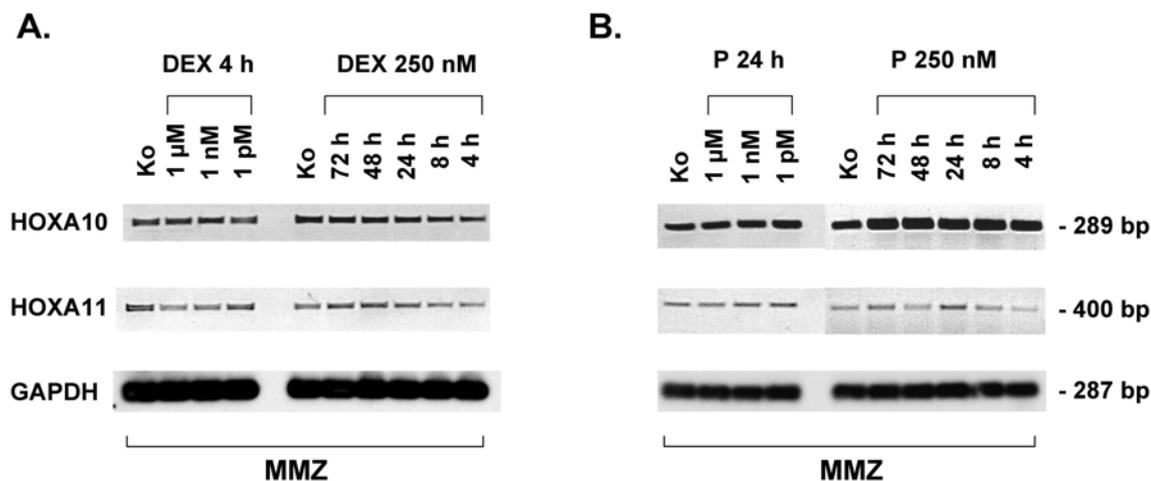


Abbildung 4.16: Expression von HOXA10 und HOXA11 in DEX- (A) und P-behandelten (B) MMZ.

RT-PCR-Analysen aller oben genannter Gene erfolgte mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide an MMZ cDNA (siehe Kapitel 4.2.2.6).

4.6 Transkriptionsstartbestimmung des PLZF-Gens

Die RNA eines Gens wird durch den Vorgang der Transkription gebildet. Dabei sollte der Start der RNA-Synthese genau am Anfang eines Gens auf der DNA beginnen. Der Punkt, an dem die RNA-Synthese beginnt, wird als Transkriptionsstart bezeichnet. Die RNA-Polymerase bindet bevorzugt an DNA-Regionen, die vor diesem Transkriptionsstart liegen und bestimmte Erkennungs- und Bindungssequenzen aufweisen. Diese Region bezeichnet man als Promotor.

Um die Regulation einer Genexpression näher zu untersuchen, ist die Identifizierung des Transkriptionsstartes und des Promotors erforderlich. Von PLZF ist sowohl der Transkriptionsstart als auch der Promotor bisher unbekannt, und es sollte Ziel dieser Arbeit sein, beide Elemente zu charakterisieren.

4.6.1 Computergestützte Transkriptionsstart- und Promotor-Bestimmung

Im Zuge dieser Arbeit konnte durch Northern Blot-Analyse das PLZF-Transkript mit einer Größe von ca. 8 kb in humanen ESZ, MMZ und KG-1-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb 4.3). Man geht davon aus, dass die Transkriptgröße aus der ca. 2 kb langen kodierenden Region, wenigen Basenpaaren der 3'-UTR und einer ungefähr 6 kb langen 5'-UTR resultiert (Zhang *et al* 1999). Der PLZF-Transkriptionsstart und -Promotorbereich ist bisher nicht bestimmt worden, jedoch konnten unter Einsatz von speziellen Computerprogrammen und -anwendungen anhand der PLZF-DNA-Sequenz (Genbank-Zugang: AF060568) mögliche

Transkriptionsstartstellen und Promotorbereiche mit einem TATA-Box Element vorhergesagt werden (*Zhang et al 1999*, und eigene Daten). Aber nur eine der ermittelten möglichen Transkriptionsstartstellen inklusive TATA-Box lag an einer Stelle in der Sequenz, die zusammen mit dem bekannten 3'-Ende einen Bereich von ungefähr 8 kb umspannt. Bei der Länge dieses Bereiches handelt es sich exakt um die Größe des nachgewiesenen PLZF-Transkriptes. Der vorhergesagte Transkriptionsstart befand sich an der Position -5979 relativ zur Translationsstartstelle.

4.6.2 5'-RACE

Um die vorhergesagte Transkriptionsstartstelle (siehe Kapitel 4.6.1) experimentell zu bestätigen, wurde ein 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) durchgeführt. Hierzu wurde ein 5'-RACE Kit (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet (siehe Kapitel 3.3.8). Die Erststrangsynthese erfolgte nicht wie sonst üblich durch ein Oligo(dT)-Oligonukleotid, da eine schlechte Amplifizierungseffizienz der cDNA aufgrund der 8 kb Gesamtlänge zu erwarten war. Die Erststrangsynthese erfolgte parallel an Gesamt-RNA aus KG-1-Zellen und MMZ unter Verwendung eines sequenzspezifischen Oligonukleotides, das ungefähr 400 bp stromabwärts der vorhergesagten Transkriptionsstartstelle liegt. Die anschließenden beiden PCR-Reaktionen mit KG-1-cDNA erfolgten nach Angaben des Herstellers mit einer TaqPolymerase von Promega, und es konnte ein 150 bp großes Fragment in den pGEM-T[®]-Vektor kloniert werden. Für die MMZ-cDNA musste das PCR-Programm optimiert werden, um eine distinkte Bande zu erhalten. Nach Einsatz von Biotherm TaqPolymerase (Genecraft) und einem modifizierten PCR-Programm (s.u.), konnte ein ungefähr 110 bp großes Fragment amplifiziert und kloniert werden.

PCR-Programm für MMZ-cDNA:

1. 94°C für 2 min
2. 94°C für 15 sek
3. 58°C für 30 sek
4. 72 °C für 1 min
5. 2.-4. 35 Zyklen
6. 72 °C für 7 min

Die aus der KG-1- und MMZ-cDNA klonierten Fragmente wurden sequenziert, und es konnten für KG-1 zwei unabhängige Klone und für MMZ fünf unabhängige Klone mit dem vermutlichen

5'-Ende des PLZF-Transkriptes identifiziert werden. Der Transkriptionsstart des PLZF-Gens konnte somit in KG-1 Zellen an der Position -5858 und in MMZ an Position -5801 relativ zum Translationsstart festgelegt werden (Abb. 4.17).



Abbildung 4.17: Bestimmung der Transkriptionsstartstelle des PLZF-Gens.

Das 5'-RACE wurde mit KG-1- und MMZ-RNA durchgeführt. Die Erststrangsynthese erfolgte mit Hilfe des sequenzspezifischen Oligonukleotides SP1, die anschließenden PCRs mit Oligonukleotiden SP2 und SP3.

4.7 Klonierung des PLZF-Promotors

Die genomische Struktur des PLZF-Gens, das sich auf dem langen Arm des Chromosom 11 an der Stelle 11q23 befindet, ist weitgehend aufgeklärt (*Zhang et al 1999*) und die Gen-Sequenz sowie der 5'-Bereich in der Genbank verfügbar (Zugang: AF060568). Es ist bisher jedoch nicht gelungen, den PLZF-Promotor zu klonieren und seinen Einfluss auf die Regulation der PLZF-Expression zu untersuchen. Dies war ein Ziel dieser Arbeit.

Die 5'-flankierende Region des PLZF-Gens war im Rahmen dieser Arbeit durch ein 5'-RACE identifiziert worden (siehe Kapitel 4.6.2). Daraufhin konnten mit Hilfe einer PCR-Strategie aus genomischer DNA vier verschieden lange Bereiche (zwischen 0,6 und 4,1 kb) der möglichen Promotorregion des PLZF-Gens amplifiziert und in pGL3-Basic kloniert werden (Abb. 4.18). Durch diese Verknüpfung von möglichen Promotorbereichen mit einem Reportergen, hier das Luziferase-Gen, ist eine Untersuchung ihrer Bedeutung für die Transkription in einer transienten Transfektion möglich. Das Vorgehen der Klonierung wurde in Kapitel 3.3.10 beschrieben. Die vier klonierten Promotorkonstrukte wurden durch automatische Sequenzierung überprüft. Dabei zeigte sich, im Vergleich zur veröffentlichten genomischen Sequenz von PLZF, in allen vier Sequenzen ein Nukleotidaustausch von G zu T an der Position -6054 relativ zum Start-ATG. Dies lässt auf einen Polymorphismus in der genomischen DNA, aus der die Fragmente amplifiziert worden sind, schließen. Da sich der Nukleotidaustausch im Bereich der 5'-UTR

befindet und somit voraussichtlich keine z.B. für die Transkriptionsinitiation wichtigen Elemente betrifft, wurde diese Mutation nicht weiter verfolgt.

In dem klonierten PLZF-Promotorbereich konnten mit Hilfe von Computerprogrammen wie das TFSEARCH-Programm (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) oder die AliBaba 2.1-Software (<http://wwwiti.cs.uni-magdeburg.de/~grabe/alibaba2>) und das TRANSFAC-System (<http://transfac.gbf.de>) mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt werden. Eine Auswahl der für diese Arbeit interessanten Bindungsstellen wie GR und C/EBP β ist in Abbildung 4.18 aufgeführt.

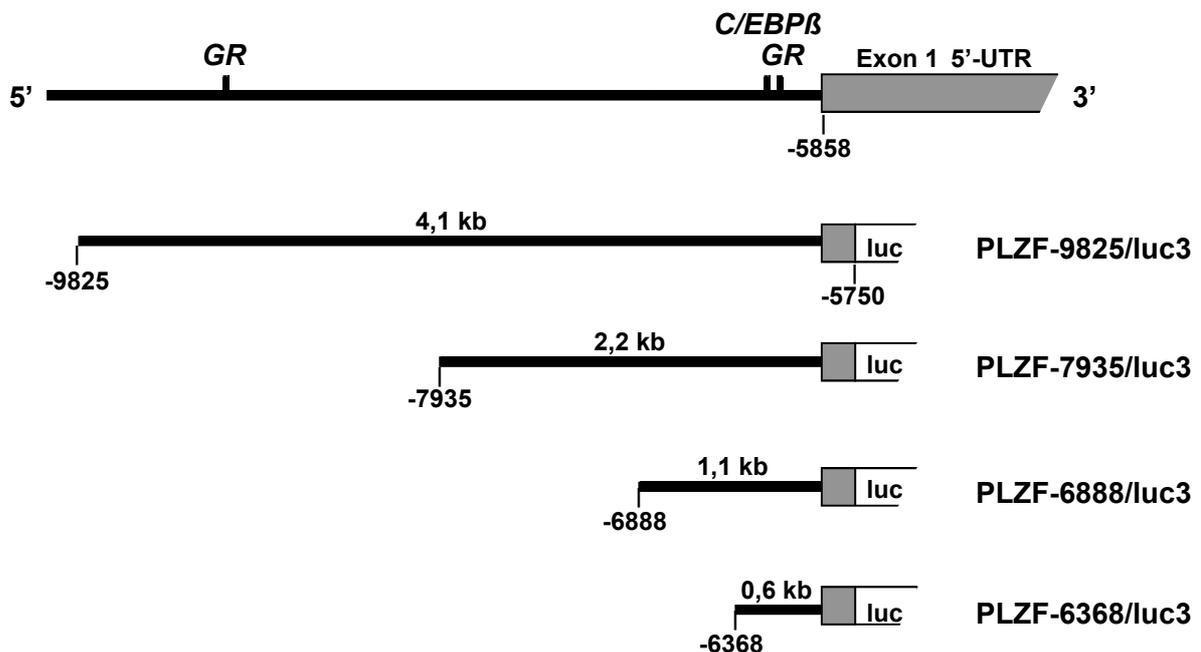


Abbildung 4.18: Struktur der PLZF-Promotorkonstrukte.

Verschieden lange 5'-flankierende Regionen von PLZF (schwarze Linien) und ein Stück von Exon 1 (grauer Kasten), das sich 3' von der Transkriptionsstartstelle erstreckt, wurden in pGL3-Basic vor ein Luziferase-Reportergen (luc) kloniert. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf Basenpaare relativ zum Start-ATG. Computergestützt lokalisierte Bindungsstellen für GR und C/EBP β sind eingezeichnet.

4.8 Transfektionsstudien des PLZF-Promotorbereiches

Um die Bedeutung des möglichen PLZF-Promotorbereiches für die Expression des Gens zu untersuchen, wurden Teile des Promotors vor ein Reportergen kloniert (Abb. 4.18). Mittels transienter Transfektion wurden diese Promotorkonstrukte in kultivierten Zellen übertragen. Für Jurkat-Zellen eignete sich dazu am besten die Methode der Elektroporation, für die adhärenenten Zellen wurde die Methode der Kalziumphosphat-Präzipitation gewählt (siehe Kapitel 3.3.11).

4.8.1 Einfluss von GR auf die PLZF-Promotoraktivität

Aufgrund der im Northern Blot und in RT-PCR-Analysen identifizierten Induktion der PLZF-Expression durch DEX (Abb. 4.3-4.10) sollte zunächst der Einfluss von DEX auf den möglichen PLZF-Promotor bestimmt werden. Hierzu wurden ESZ mit den vier Promotorkonstrukten (PLZF-6368/luc3, PLZF-6888/luc3, PLZF-7935/luc3 und PLZF-9825/luc3) transfiziert und einem Expressionskonstrukt für GR α (pcDNA/GR α) kotransfiziert sowie eine DEX-Behandlung durchgeführt. Als Kontrollen dient der pGL3-Basic-Vektoren, in dem ein GR-responsives Element vor einem Minimalpromotor liegt (GRE-32wt/luc3) (Abb. 4.19). Das Kontrollplasmid wurde nach Kotransfektion mit dem Transkriptionsfaktor GR α sehr stark induziert. Zusätzlich zur Kotransfektion mit GR α musste auch eine Stimulation mit DEX erfolgen, um die hohe Induktion zu erreichen. Bei den vier PLZF-Promotorkonstrukten hingegen war durch Kotransfektion des Rezeptorexpressionskonstruktes und anschließender Stimulation mit DEX keine Aktivierung des Reportergens möglich.

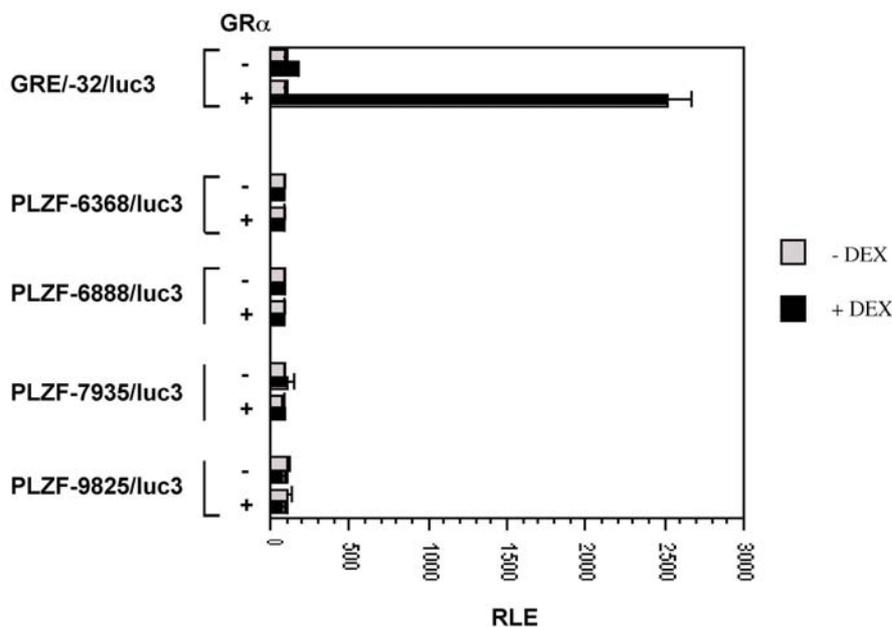


Abbildung 4.19: Transfektionsanalyse der PLZF-Promotorkonstrukte in ESZ.

ESZ wurden mit den vier PLZF-Promotorkonstrukten (siehe Abb. 4.18) unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert und ein Leervektor sowie ein Expressionsvektor für GR α kotransfiziert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 250 nM DEX behandelt oder unbehandelt belassen und danach die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen.

Der gleiche Versuchsansatz wie in ESZ wurde daraufhin in einem anderen Zellsystem, mit Jurkat-Zellen, durchgeführt, um Aufschluss über eine mögliche zelltypspezifische Regulation des PLZF-Promotors zu erhalten. Auch hier konnte im Vergleich zu den erfolgreichen Kontrollplasmidversuchen gezeigt werden, dass trotz Kotransfektion des Expressionskonstruktes für GR α und Behandlung mit DEX in keinem der vier Promotorkonstrukte die Transkription des Reportergens aktiviert wurde (Abb. 4.20). Die Anwesenheit von DEX war als Einfluss auf die Promotoraktivität unerheblich, es erfolgte keine ligandenabhängige Aktivierung der PLZF-Promotorkonstrukte.

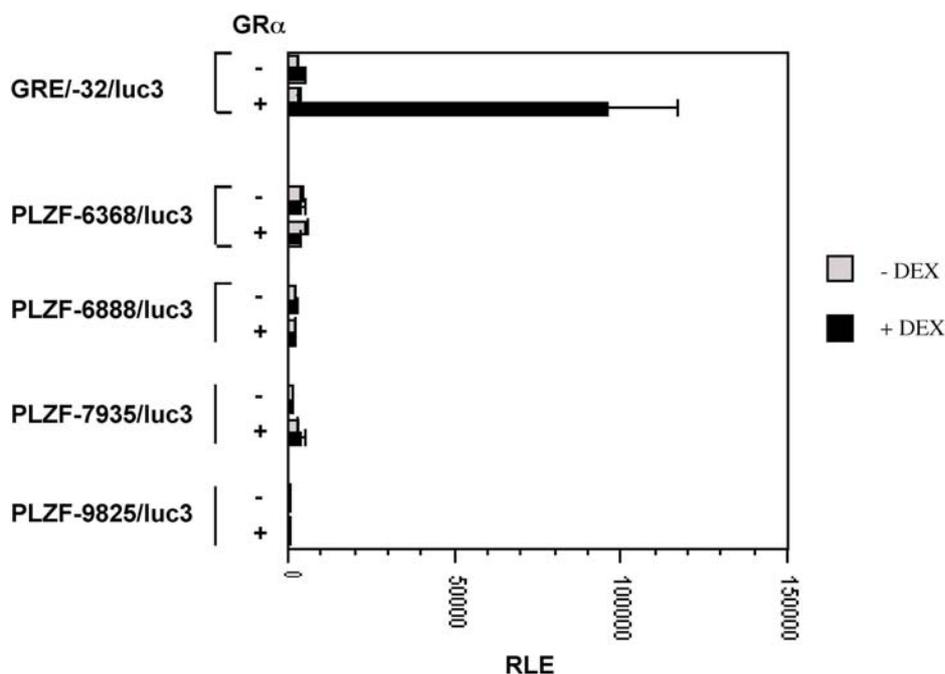


Abbildung 4.20: Transfektionsanalyse der PLZF-Promotorkonstrukte in Jurkat-Zellen.

Jurkat-Zellen wurden, analog zu der Transfektion in Abb. 4.19, mit den vier PLZF-Promotorkonstrukten (siehe Abb. 4.18) durch Elektroporation transfiziert und ein Leervektor bzw. ein Expressionsvektor für GR α kotransfiziert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 250 nM DEX behandelt oder unbehandelt belassen und danach die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen.

4.8.2 Einfluss von GR und C/EBP β auf die PLZF-Promotoraktivität

Bei der Analyse der klonierten Promotorfragmente wurden nicht nur mögliche Bindungsstellen für den Rezeptor bzw. Transkriptionsfaktor GR gefunden, sondern auch eine Bindungsstelle für

den Transkriptionsfaktor C/EBP β . Um zu überprüfen, ob dieser Faktor Einfluss auf die Regulation der PLZF-Expression ausübt, wurden MMZ mit dem Promotorkonstrukt transfiziert, welches einen 1,1 kb großen Promotorbereich mit den vorhergesagten GR- und C/EBP β -Bindungsstellen enthält (PLZF-6888/luc3). Zu diesem Konstrukt wurden Expressionsvektoren für GR α und für die aktivatorische Isoform von C/EBP β , LAP (*liver-enriched activatory protein*), und die inhibitorische Isoform, LIP (*liver-enriched inhibitory protein*), kotransfiziert (Abb. 4.21). Die Kontrolle wurde durch ein GR-responsives Element gestellt (GRE-32wt/luc3). Nach DEX-Behandlung und Luziferase-Assay konnte wie zuvor kein Einfluss von DEX auf die Expression des PLZF-Reportergens, vermittelt durch kotransfizierten GR, festgestellt werden. Durch die aktivatorische Isoform LAP hingegen war das Promotorkonstrukt leicht induzierbar, nicht aber durch den N-terminal trunkierten Repressor LIP (Abb. 4.21).

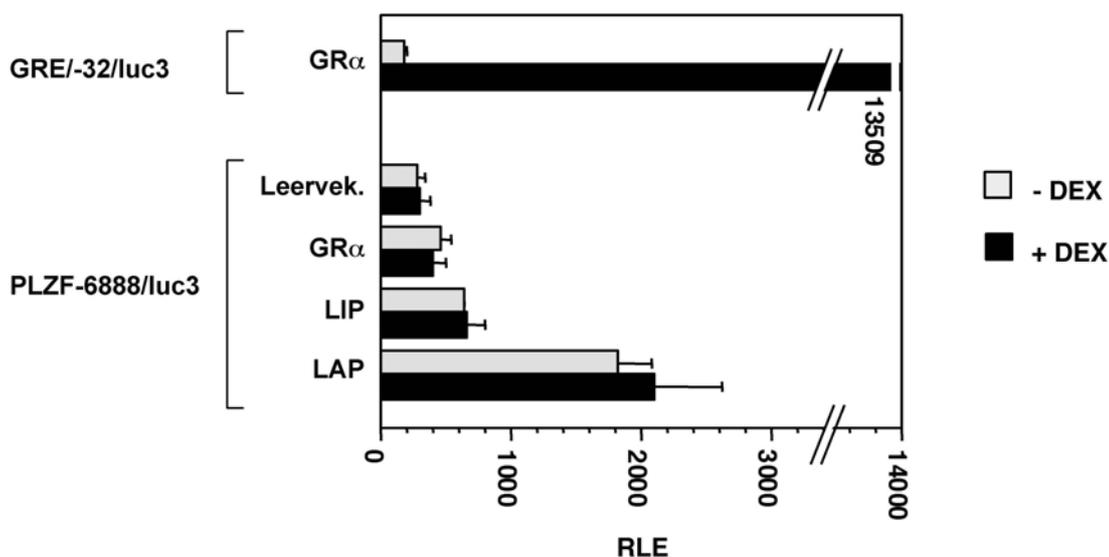


Abbildung 4.21: Induktion des PLZF-Promotors durch LAP.

MMZ wurden mit dem PLZF-Promotorkonstrukt, das 1,1 kb 5'-flankierenden Promotorbereich enthält (siehe Abb. 4.18, PLZF-6888/luc3) unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert und ein Leervektor sowie Expressionsvektoren für GR α bzw. C/EBP β (LAP und LIP) kotransfiziert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 250 nM DEX behandelt oder unbehandelt belassen und danach die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen.

4.8.3 Einfluss von GR, HOXA10 und STAT5 auf die Promotoraktivität

Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme von DEX auf die PLZF-Expression, vermittelt durch den GR, könnte darüber erfolgen, dass der GR nur an den Promotor bindet, wenn er von anderen Faktoren rekrutiert wird oder nur zusammen mit ihnen eine Wirkung ausübt. Eine solche kooperative Interaktion ist für GR und STAT5 beschrieben worden (*Cella et al 1998; Reichardt et al 2001a; Stöcklin et al 1996*). Für die Wirkung von STAT5A wurde beschrieben, dass GR als dessen Koaktivator die Transkription positiv beeinflussen kann (*Stöcklin et al 1996*). Ferner scheint für den Transkriptionsfaktor HOXA10 eine Rolle als Kofaktor von GR denkbar (M. Göttlicher, Karlsruhe; Vortrag "*Transcriptional crosstalk of the glucocorticoid receptor*" im Rahmen des 46. Symposiums der DGE-Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie in Göttingen, März 2002). Aus diesem Grund wurden zwei PLZF-Promotorkonstrukte mit 1,1 und 4,1 kb langen Promotorsequenzen (PLZF-6888/luc3 und PLZF-9825/luc3) in SKUT-1B-Zellen, eine Myosarkoma-Zelllinie, transfiziert. Zu diesen Konstrukten wurden Expressionsvektoren für GR α , HOXA10 und konstitutiv aktives STAT5A alleine und in Kombination kotransfiziert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit DEX.

Mittels Luziferase-Assay zeigte sich in der Kontrolle nach Kotransfektion mit GR α und DEX-Behandlung eine sehr starke ligandenabhängige Induktion des Reportergens, das unter der Kontrolle eines steroidresponsiven Elementes liegt (GRE-32wt/luc3) (Abb. 4.22). Eine ligandenabhängige Aktivierung beider PLZF-Promotorkonstrukte über GR α und/oder die anderen Faktoren konnte nicht erzielt werden.

Ligandenunabhängig konnte jedoch auf dem 1,1 kb Promotorbereich (PLZF-6888/luc3) durch GR α -Kotransfektion eine Verdoppelung der Induktion, die ohne GR α erzielt worden war, erreicht werden. Der gemessene RLE-Wert ist aber im Vergleich zur GRE-Positivkontrolle sehr gering. Auf dem gleichen Promotorbereich war durch die Kotransfektion von GR α und STAT5A hingegen eine ligandenunabhängige Reduzierung der Induktion zu verzeichnen. Diese beiden Modulationen der Induktion konnten nicht auf dem 4,1 kb Promotorbereich (PLZF-9825/luc3) erzielt werden.

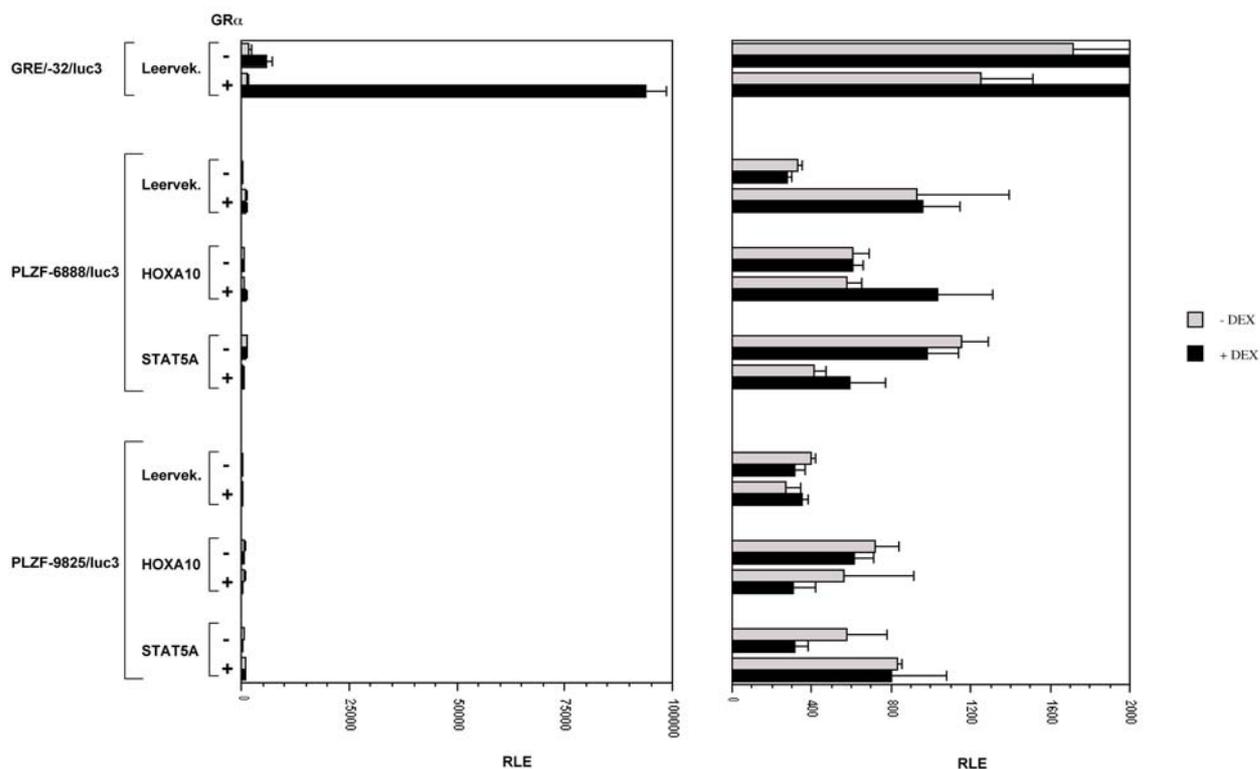


Abbildung 4.22: Untersuchung möglicher Modulatoren der PLZF-Expression im Transfektions-Assay.

SKUT-1B-Zellen wurden mit den PLZF-Promotorkonstrukten, die 1,1 kb und 4,1-kb 5'-flankierenden Promotorbereich enthalten (siehe Abb. 4.18, PLZF-6888/luc3 und PLZF-9825/luc3) unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert und ein Leervektor sowie Expressionsvektoren für GR α , HOXA10 und STAT5A (konstitutiv aktiv) kotransfiziert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 250 nM DEX behandelt oder unbehandelt belassen und danach die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der beiden obigen Grafiken, die das gleiche Transfektionsexperiment darstellen.

4.9 PLZF-Zielgensuche

In vorhergehenden Versuchen konnten einige Aspekte der Regulation der PLZF-Expression in uterinen Zellen geklärt werden. Die Frage nach möglichen Zielen der PLZF-Wirkung in diesen Zellen ist jedoch noch weitgehend unbeantwortet. Eine Möglichkeit Zielgene zu identifizieren ist die Methode des DNA-*Microarrays* (siehe Kapitel 3.4). Dafür ist es wichtig, die Menge des Faktors, dessen Zielgene man finden möchte, in den zu untersuchenden Zellen zu erhöhen. Die darauf folgend extrahierte Gesamt-RNA enthält u.a. Transkripte von Genen, die durch den Faktor hoch- oder herunterreguliert worden sind. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wird die cDNA als komplexe Sonde in einer Hybridisierungsreaktion verwendet. Die Hybridisierung erfolgt mit einem *Microarray*, der Sequenzen verschiedenster Gene beinhaltet, z.B. in Form von

Oligonukleotiden oder cDNA-Fragmenten. Verglichen wird das erhaltene Expressionsprofil mit den Ergebnissen aus einer Hybridisierung, die mit einer komplexen Sonde erfolgte, die aus unbehandelten Zellen generiert worden ist.

Wie zuvor in dieser Arbeit gezeigt, ist die PLZF-Expression durch Glukokortikoide stark induzierbar. Eine Behandlung von uterinen Zellen mit Glukokortikoiden zur Erhöhung des PLZF-Spiegels und somit erhöhter Regulation von PLZF-Zielgenen ist für die Untersuchung mittels DNA-*Microarray* jedoch ungeeignet. Der Grund hierfür ist, dass in einem hybridisierten *Array* nicht nur PLZF-regulierte Gene gefunden würden, sondern generell glukokortikoidregulierte Gene. Ebenso wenig ist es sinnvoll, nur das Wildtyp-PLZF in den uterinen Zellen zu erhöhen und die Auswirkungen zu untersuchen. Dies liegt an der PLZF-Repressor-Funktion und der möglichen Folge, dass die Auswirkung der Repression durch PLZF auf ein z.B. basal nicht sehr stark exprimiertes Gen im *Array* schlecht zu identifizieren ist. Daher ist es eher sinnvoll, die Menge eines Hybrid-Proteins zu erhöhen, das die DNA-Binde- und somit Zielgenerkennungsfähigkeit von PLZF, aber anstelle der repressorisch wirkenden BTB/POZ-Domäne eine aktivatorische Domäne besitzt. Um nun PLZF-Zielgene im DNA-*Microarray* zu identifizieren, sollte Wildtyp-PLZF und ein Fusionsprotein bestehend aus PLZF-DNA-Bindedomäne und einer viralen VP16-Aktivierungsdomäne in uterine Zellen gebracht werden. Dies sollte mit Hilfe der *Voyager*TM Technologie (Invitrogen) erfolgen, die in Kapitel 3.4 näher beschrieben ist. Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit des VP22-Proteins, in den Zellkern einer Zelle zu translozieren. Fusioniert man das VP22-Gen mit PLZF und dem Aktivator/PLZF-Hybrid, so können die bakteriell exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteine Zellen appliziert und in deren Zellkern importiert werden.

4.9.1 VP22-Fusionskonstrukte

4.9.1.1 Klonierung

Wie erwähnt, bedarf die bakterielle Expression der Fusionsproteine geeigneter VP22-Fusionskonstrukte. Zunächst wurde der pCR[®]T7/VP22-1-Vektor modifiziert, indem das c-myc-Epitop durch ein FLAG-Epitop ersetzt wurde, welches im Protein nur aus einer Abfolge von acht Aminosäuren besteht und mit Hilfe eines Antikörpers detektierbar ist. Das C-terminal gelegene HIS-Epitop, über dessen sechs aufeinanderfolgende Histidine das exprimierte Protein aufgereinigt werden kann, bleibt hingegen erhalten (Abb. 3.1 und 4.23). Die Durchführung der Klonierung der Fusionskonstrukte wurde in Kapitel 3.4.1 ausführlich beschrieben. Das Ergebnis sind zwei Fusionskonstrukte (Abb. 4.23). Bei pCR[®]T7/VP22-PLZF-FLAG ist das komplette

Wildtyp-PLZF im Leseraster dem VP22-Gen nachgeschaltet und im pCR[®]T7/VP22-VP16/9ZF-FLAG eine VP16-Aktivierungsdomäne zusammen mit den 9 PLZF-Zinkfingern. Beide VP22-Fusionskonstrukte wurden durch automatische Sequenzierung überprüft. Es konnten keine Mutationen festgestellt werden.

Als Kontrolle für spätere funktionelle Tests und für den kompletten Versuchsablauf bis zu diesen Tests dient das Fusionskonstrukt pCR[®]T7/VP22-LIP-FLAG. Es wurde durch Klonierung der inhibitorischen Isoform von C/EBP β , LIP, in den Vektor pCR[®]T7/VP22-FLAG erhalten (Abb. 4.23).

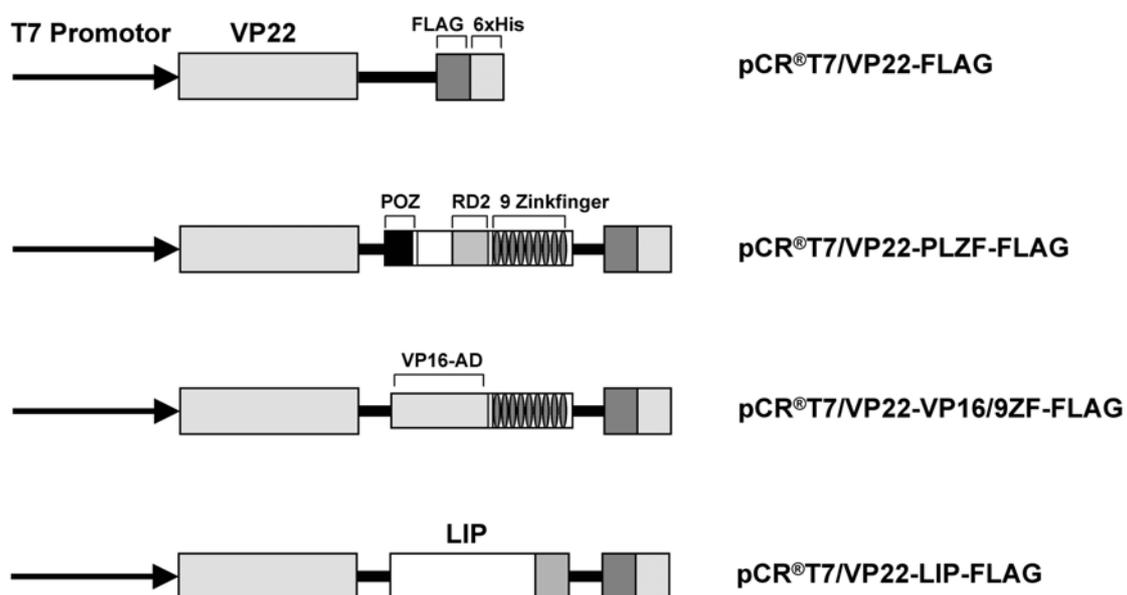


Abbildung 4.23: Struktur der VP22-Fusionskonstrukte.

Das komplette Wildtyp-PLZF, das die POZ-Domäne und die RD2 (beide sind für die transkriptionelle Repression verantwortlich) sowie die 9 Zinkfinger enthält, wurde im Leseraster hinter die VP22-Domäne kloniert (pCR[®]T7/VP22-PLZF-FLAG). Ebenso wurde hinter diese Domäne eine VP16-Aktivierungsdomäne (VP16-AD) und wiederum die 9 Zinkfinger kloniert (pCR[®]T7/VP22-VP16/9ZF-FLAG). Die Klonierung und der spätere Einsatz (siehe Kapitel 4.9.1.2 und 4.9.2) des pCR[®]T7/VP22-LIP-FLAG dient als Kontrolle der Proteinexpressionsstrategie.

4.9.1.2 *In vitro*-Transkription/Translation (IVTT)

Es musste geklärt werden, ob es nun möglich war mit Hilfe der klonierten VP22-Fusionskonstrukte pCR[®]T7/VP22-PLZF-FLAG und pCR[®]T7/VP22-VP16/9ZF-FLAG (siehe Abb. 4.23) Proteine zu bilden, welche die komplette VP22-Domäne, inserierte PLZF-Sequenz und FLAG- sowie HIS-Epitope enthalten und nicht aufgrund eines vorzeitigen Stop-Kodons trunziert werden. Dies erfolgte über die IVTT der VP22-Konstrukte. Bei dieser Methode, die in Kapitel 3.4.2 ausführlich beschrieben wurde, wurde ³⁵S-markiertes Methionin in das

synthetisierte Protein eingebaut, welches nach SDS-Polyacrylamid-gelelektrophoretischer Auftrennung autoradiografisch detektiert wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Proteine der oben genannten VP22-Fusionskonstrukte konnten in ihrer erwarteten, vollständigen Größe von ca. 102 kDa (pCR[®]T7/VP22-PLZF-FLAG) und 72 kDa (pCR[®]T7/VP22-VP16/9ZF-FLAG) nachgewiesen werden (Abb. 4.24). Auch von dem Fusionskonstrukt pCR[®]T7/VP22-LIP-FLAG konnte das gebildete Protein in der erwarteten, vollständigen Größe von ca. 41 kDa nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass von jedem Fusionskonstrukt nur ein einziges Protein gebildet wurde.

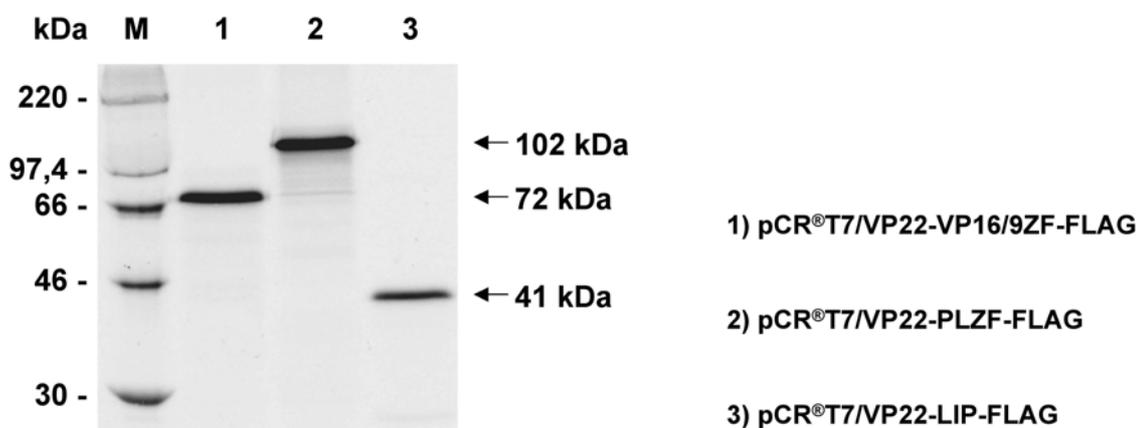


Abbildung 4.24: IVTT der VP22-Fusionskonstrukte.

Durch Einbau von ³⁵S-markiertem Methionin bei der *in vitro*-Translation konnten die hergestellten Proteine im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden.

4.9.2 Bakterielle VP22-Fusionsprotein-Expression

Laut Protokoll des Herstellers des *Voyager™ Protein Production Kits* (Invitrogen) erfolgt die Expression der VP22-Fusionskonstrukte nach Transformation in einen *E. coli*-Stamm (BL21(DE3) pLys *one shot*) und Induktion durch IPTG. Um den optimalen Zeitpunkt der höchsten Protein-Expression der zuvor beschriebenen VP22-Fusionskonstrukte nach Induktion zu ermitteln, wurde ein Pilot-Expressionsexperiment laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Fusionskonstrukte pCR[®]T7/VP22-PLZF-FLAG, pCR[®]T7/VP22-VP16/9ZF-FLAG, pCR[®]T7/VP22-LIP-FLAG und der Leervektor pCR[®]T7/VP22-FLAG wurden in oben genannte *E. coli* transformiert. Die Transformationsansätze jedes der vier Fusionskonstrukte wurden geteilt und jeweils ein Ansatz wurde mit IPTG behandelt. Beide Ansätze, behandelt und unbehandelt, wurden bei 37°C und 210 UpM im Schüttler inkubiert und es wurde aus beiden

Ansätzen nach IPTG-Behandlung stündlich eine Probe entnommen. Die nach 3 bis 5 Stunden gewonnenen Proteine wurden über SDS-PAGE (unter Verwendung von Fertiggelele CRITERION precast 4-15% Tris/HCl 1mm, Biorad) aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Bei den mit dem Leervektor pCR[®]T7/VP22-FLAG transformierten *E. coli* konnte nach IPTG-Behandlung zwischen 3 bis 5 Stunden eine gleich hohe Menge exprimiertes VP22-Protein bei ca. 22 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.25). Auch das 41 kDa VP22-LIP-FLAG Protein wurde in dieser Zeit sehr hoch exprimiert. Die beiden anderen Fusionsproteine, das ca. 102 kDa große VP22-PLZF-FLAG und 72 kDa große VP22-VP16/9ZF-FLAG Protein, wurden erst nach 5 Stunden leicht exprimiert. Bei ihnen war die Proteinmenge, die schon in den Bakterien als Präzipitat ausfällt und unlöslich in sogenannten *inclusion bodies* aggregiert vorlag, besonders hoch (Abb. 4.25).

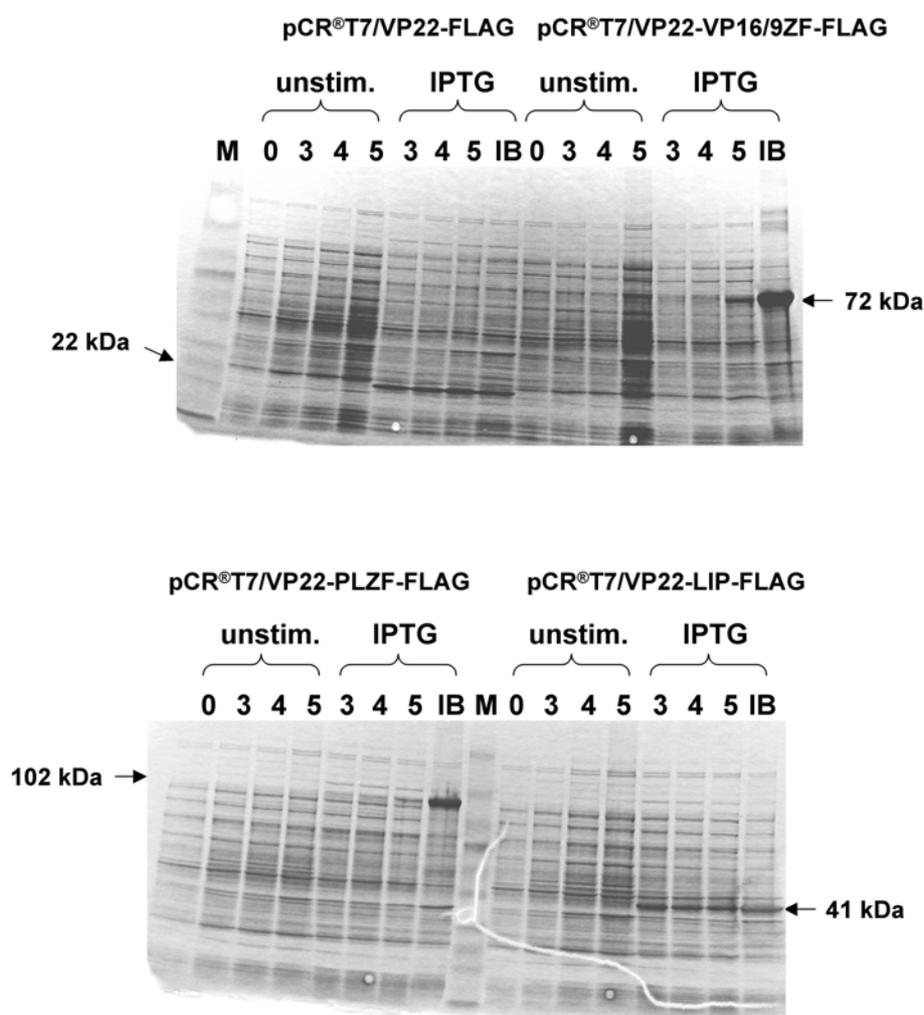


Abbildung 4.25: Pilot-Expressionsexperiment.

Die VP22-Fusionsproteine wurden nach der Transformation der Konstrukte in *E. coli* nur durch IPTG-Stimulation exprimiert. Oberhalb der Gelspuren sind die Inkubationszeiten in Stunden angegeben. IB=*inclusion bodies*, M=*Benchmark-Marker* (Gibco)

Nach Herstellung der VP22-Fusionskonstrukte und Etablierung der bakteriellen Proteinexpression ist es nun möglich, die Proteine über das C-terminal liegende HIS-Epitop aufzureinigen und verschiedenen funktionellen Tests zu unterziehen. Nach Absicherung der Funktionalität ist es möglich, das *Microarray*-Experiment durchzuführen. Diese weiterführenden Arbeiten sind zur Zeit Gegenstand der Forschung in meiner Arbeitsgruppe.

5. Diskussion

Wichtige physiologische Rollen von Progesteron im Säugetier sind die Etablierung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, die Förderung der Entwicklung alveolärer Lobuli in der Brustdrüse sowie die Unterdrückung der Milchproteinsynthese vor der Geburt (Näheres siehe Kapitel 2.4.2). Bisher sind jedoch nur wenige Gene bzw. Promotoren bekannt, auf die Progesteron eine direkte Wirkung über seinen Rezeptor, PR, ausübt.

Als Dr. Norbert Walther, IHF, die zyklusabhängige Expression von PLZF, einem Transkriptionsfaktor, im bovinen Endometrium in einem Versuch zeigte, konnte dies als Hinweis auf eine mögliche Progesteronabhängigkeit gewertet werden.

In Anbetracht der Relevanz des Progesteroneinflusses auf seine Zielgewebe wie z.B. auf den menschlichen Uterus ist eine Aufklärung der Regulation von PLZF als mögliches Ziel der Progesteronwirkung von Bedeutung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher folgende Frage beantwortet werden: Wird PLZF im humanen Uterus progesteronabhängig exprimiert und ist es an der steroidalen Signaltransduktion beteiligt?

Studien zur Expression und Funktion des Transkriptionsfaktors PLZF fokussierten sich bisher auf die fötale Entwicklung und Hämatopoese sowie überwiegend auf das Fusionsprotein PLZF-RAR α , welches bei einem geringen Prozentsatz von APL-Patienten vorliegt (Näheres siehe Kapitel 2.3) (*Avantaggiato et al 1995; Barna et al 2000; Chen et al 1993; Cook et al 1995; Rego & Pandolfi 2001; Reid et al 1995*). Es konnte gezeigt werden, dass beide Fusionsproteine, PLZF/RAR α und RAR α /PLZF, ausschlaggebend für die Ausprägung des APL-Vollbildes sind (*He et al 2000*), was die Notwendigkeit unterstreicht, nicht nur die Regulierung der PLZF-Expression zu untersuchen, sondern auch mögliche Zielgene zu identifizieren.

Über die Regulierung der PLZF-Expression und die Zielgene dieses Transkriptionsfaktors ist nahezu nichts bekannt. Nur das Sinken der PLZF-mRNA-Menge aufgrund RA-induzierter Differenzierung promyeloischer Zellen konnte bisher nachgewiesen werden (*Chen et al 1993*), sowie die Wirkung von PLZF als negativem Regulator der Zellzyklusprogression via Reduzierung der ZyklinA2-Expression und die Involvierung in Differenzierungsprozesse (*Yeyati et al 1999*).

5.1 Endogene Expression von PLZF

Um die PLZF-Expression zu untersuchen, wurden aus humanem Gewebe ESZ und MMZ gewonnen und kultiviert. Die primären Zellen wurden mit den Steroiden DEX und P und mit RA behandelt, um deren Einfluss auf die Expression näher zu untersuchen. Die parallelen Stimulationsversuche, ungeachtet der Steroidkonzentration und der Behandlungsdauer, wurden immer gleichzeitig beendet. Die Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt keinen Unterschied in der Konfluenz und keine offensichtliche Veränderung in ihrer Morphologie auf.

In einem Northern Blot konnte erstmals die volle ca. 8 kb lange PLZF-mRNA in ESZ und MMZ nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3 A, B). Mit dieser Methode konnte der Nachweis in DEX-behandelten Zellen erbracht werden, jedoch nicht in P- oder RA-behandelten oder unbehandelten Zellen. Zur näheren Charakterisierung wurde die PLZF-Expression mit der gegenüber dem Northern Blot sensitiveren RT-PCR-Analyse und zur Verstärkung des Signals mit Southern Blot-Hybridisierung nachgewiesen. Dadurch war es nicht nur möglich, die starke Induktion durch DEX, sondern auch eine, gleichwohl schwächere, Induktion durch P nachzuweisen sowie eine sehr schwache Expression in den RA-behandelten und Kontrollzellen (Vergleich Abb. 4.3 B mit Abb. 4.5). Ein weiterer Vorteil der RT-PCR-Analyse war die Möglichkeit, die Anwesenheit bekannter alternativer PLZF-Spleißformen in Exon 1 mit Hilfe verschiedener Sonden im Southern Blot zu untersuchen. Auf den Nachweis der AS I und AS I+IV wurde in dem RT-PCR-Versuchsansatz verzichtet, da bei diesen Isoformen eine ca. 3,4 kb lange Region in der 5'-UTR fehlt und dies keinen Einfluss auf den kodierenden Bereich ausübt. Die anderen alternativen Spleißformen hingegen sind von großem Interesse, da den daraus entstehenden PLZF-Proteinen wichtige funktionelle Domänen fehlen. Dem AS II-Protein fehlt z.B. die BTB/POZ-Domäne, welche unter anderem für die Reprimierung und Dimerisierung von PLZF verantwortlich ist. Bei dem AS III- und AS IV-Protein hingegen ist die RD2 und die prolinreiche Domäne nicht vollständig, so dass auch diesen Varianten eine für die Reprimierung wichtige Domäne fehlt. Mit Hilfe der RT-PCR-Analyse konnte im Rahmen dieser Arbeit ein 1236 bp großes Fragment der cDNA amplifiziert werden, welche die vollständige kodierende Region von Exon 1 enthält (siehe Abb. 4.5). Jedoch konnten keine der Spleißvarianten AS II bis IV nachgewiesen werden, sondern nur zusätzlich zu der 1236 bp-Bande einige unbekannte Banden zwischen ca. 400 bp und 800 bp (siehe Abb. 4.5). Die Klonierung solcher RT-PCR-Produkte sollte Aufschluss über die Sequenzen dieser Amplifikate und mögliche neue Spleißvarianten geben. Es konnte dabei nur das vollständige Amplifikat von 1236 bp bestätigt werden, aber auch der Nachweis der AS IV-Sequenz erbracht werden. Die unbekannt Banden blieben jedoch unidentifiziert. Dies bedarf weiterer Klärung.

Durch die Ergebnisse im Northern Blot, in der RT-PCR-Analyse und der RT-PCR-Klonierung lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Die Expression von PLZF in seiner vollen Länge ist aufgrund der 8 kb Bande im Northern Blot und des 1236 bp großen Fragmentes, nachgewiesen in der RT-PCR-Analyse und -Klonierung, als gesichert anzusehen. Dass es sich bei dem 1236 bp großen Fragment der RT-PCR-Untersuchungen auch zusätzlich um die AS I handeln könnte, ist hier nicht eindeutig auszuschließen, obwohl die AS I im Northern Blot nicht zu sehen. Dies kann darin begründet liegen, dass die Nachweisgrenze des Northern Blot nicht sehr hoch ist und diese Variante vielleicht nur in sehr geringer Menge exprimiert wird. Zudem ist auch die wahrscheinlich äußerst geringe Expression der AS IV und AS I+IV nicht eindeutig auszuschließen, da sie durch die RT-PCR-Klonierung identifiziert werden konnte. In allen Northern Blots mit ESZ-, MMZ- und KG-1-mRNA waren zwei zusätzliche Banden zu sehen, eine bei ca. 5kb, die andere bei ungefähr 2 kb (siehe Abb.4.3). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Kreuzhybridisierungen mit der 28S- bzw. 18S-RNA und nicht um alternative Spleißformen, da diese Banden in jedem Versuch die gleiche Intensität ohne Schwankungen besitzen.

In vorliegender Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass PLZF in humanen uterinen Zellen und der Brustkrebs-Zelllinie T47D exprimiert wird und einer steroidabhängigen Aufregulierung unterliegt. Bemerkenswerterweise wurde die Anzahl der PLZF-Transkripte in humanen ESZ, MMZ und T47D-Zellen durch GC stärker erhöht als durch P (siehe Abb. 4.5 und 4.11 B). Dieses Ergebnis konnte für T47D-Zellen in der neuesten Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Steven Nordeen Bestätigung finden (*Wan & Nordeen 2002*).

In einer neueren Arbeit von Bamberger et al. (*Bamberger et al 1999*) wurde demonstriert, dass MPA, ein synthetisches Progesteron-Derivat, an den GR bindet und genau wie DEX, ein synthetisches Glukokortikoid-Derivat, die Expression von humanem IL-2 in normalen humanen Lymphozyten induzieren kann. Um zu klären, ob die in dieser Arbeit erzielten Induktionen der PLZF-Expression vergleichbar zwischen synthetischem Derivat und natürlichem Steroid sind, wurde die Induzierbarkeit der PLZF-Expression durch die Glukokortikoide DEX (Derivat) und HC (natürlich) und die Progestine MPA (Derivat) und P (natürlich) in MMZ verglichen (siehe Abb. 4.6). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktionsfähigkeit der Derivate mit der Induktionsfähigkeit der natürlichen Steroide vergleichbar ist, also auch hier DEX und HC potenter sind als MPA und P.

Bisher konnte eine Regelung der PLZF-Expression nur in Antwort auf RA beschrieben werden. Es wurden dabei je nach Zelltyp unterschiedliche Ergebnisse erzielt. In neuronalen P19-Zellen wurde eine Erhöhung der PLZF-Transkriptmenge nachgewiesen (*Cook et al 1995*), wohingegen in HL-60- und NB4-Zellen eine Verringerung der Expression im Zuge der RA-induzierten Differenzierung erfolgt (*Chen et al 1993*). Auch in ESZ und MMZ spielt RA eine Rolle, in dem es die E₂-induzierte Proliferation der beiden Zelltypen inhibiert und zudem noch die Dezidualisierung von ESZ *in vitro* unterdrücken kann (*Boettger-Tong & Stancel 1995; Brar et al 1996*). Zum Beispiel gerade in der Schwangerschaft ist ein Zellwachstum der myometrialen Zellen für die uterine Ausdehnung unerlässlich (*Challis & Lye 1994*). Da in ESZ und MMZ kein Einfluss von RA auf die basal sehr niedrige PLZF-Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 4.5), stellte sich die Frage, ob RA Einfluss auf die durch DEX und P induzierte Expression ausübt. Durch RT-PCR-Analyse und *real time*-PCR konnte jedoch nur ein sehr geringer inhibitorischer Effekt von RA auf die DEX- und P-vermittelte PLZF-Expression gezeigt werden (siehe Abb. 4.8).

Obwohl PLZF in ESZ, MMZ und in T47D durch Steroide heraufreguliert wurde, konnte trotz gleichzeitiger Anwesenheit endogenen GRs, keine Änderung der PLZF-Expression in steroid-behandelten KG-1-Zellen festgestellt werden (siehe Abb. 4.11 A und Abb. 4.13). Dies deutet auf eine zelltypspezifische Kontrolle der PLZF-Expression durch Interaktion der Steroidrezeptoren mit zellspezifischen Kofaktoren hin (*McKenna et al 1999*).

Bisher ist das PLZF-Protein nur nach Transfektion von Wildtyp-PLZF oder PLZF-RAR α in Zelllinien in distinkten punktuellen Ansammlungen im Zellkern nachgewiesen worden (*Reid et al 1995*). In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch Immunfluoreszenz erstmalig die nukleäre Häufung von endogenem PLZF-Protein in distinkten punktuellen Ansammlungen in DEX-behandelten MMZ, also humanen Primärzellen, bestimmt werden (siehe Abb. 4.12). In unbehandelten Kontrollzellen konnte bis auf seltene Ausnahmen kein PLZF-Protein durch PLZF-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter PLZF-mRNA-Spiegel nach DEX-Behandlung auch einen erhöhten Protein-Spiegel nach sich zieht, welches die Relevanz der RT-PCR-Analysen bekräftigt.

Um zu überprüfen, ob die Glukokortikoid- und Progesteronwirkung auf PLZF über die klassischen Hormonrezeptoren, GR und PR, vermittelt wird, wurden MMZ mit den beiden Steroiden sowie Rezeptorantagonisten behandelt. Da der GR-/PR-Antagonist RU486 die DEX-

induzierte PLZF-Expression unterband, kann geschlossen werden, dass die Induktion der PLZF-Expression anscheinend durch den klassischen GR vermittelt wurde (siehe Abb. 4.7). Bei der Vermittlung der P-Wirkung auf die PLZF-Expression scheint der PR beteiligt zu sein, da auch die P-induzierte Expression durch die Antagonisten RU486 und ZK98.299 abgeschwächt werden konnte (siehe Abb. 4.7). Die Induktion nach P-Behandlung war jedoch nicht sehr hoch, so dass diese Aussage zunächst weiter abgesichert werden muss. Es bleibt zu erwähnen, dass für T47D/A1-2-Zellen (besitzen stabil transfizierten GR) in der Juni-2002-Ausgabe von "*Molecular Endocrinology*" gezeigt werden konnte, dass die Induktion der PLZF-Expression durch Glukokortikoide und Progestine via GR bzw. PR vermittelt wird (Wan & Nordeen 2002). Dies unterstützt die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse.

Zur Untermauerung der Hypothese, dass die steroidale Wirkung auf die PLZF-Expression über GR und PR vermittelt wird, wurde das Vorkommen der Rezeptoren in ESZ, MMZ und T47D-Zellen in einer RT-PCR-Analyse bestätigt (siehe Abb. 4.13). Überraschenderweise war die GR-Expression in T47D-Zellen aus unserem Labor entgegen der allgemeinen Annahme hoch. Über die Expression des GR und seine Affinität zu verschiedenen Liganden in T47D-Zellen herrscht jedoch bis heute keine einheitliche Meinung; dies war auch Anlass zur Herstellung einer T47D-Zelllinie, die stabil transfizierten GR beinhaltet (T47D/A1-2) (Nordeen et al 1989). Die hohe GR-Expression in unseren Zellen ist möglicherweise auf eine Veränderung des Expressionsprofils zurückzuführen, was bei Zelllinien, die länger in Kultur gehalten werden, ein bekanntes Phänomen darstellt. Die Zelllinie T47D wurde im Jahr 1979 von I. Keydar etabliert (Keydar et al 1979) und ist mittlerweile weltweit verbreitet, so dass die Möglichkeit der Entstehung von Sublinien in verschiedenen Labors besteht.

Die nahe verwandten Mitglieder der Nukleären-Hormonrezeptor-Familie, GR und PR, können an das gleiche hormonresponsive Element eines Zielpromotors binden und die Transkription aktivieren. In der Arbeitsgruppe um Steven Nordeen wurde in einem Affymetrix-Oligonukleotid-Array das Expressionsprofil nach Glukokortikoid- und Progestinbehandlung in T47D/A1-2-Zellen erstellt (Wan & Nordeen 2002). Dabei stellte sich heraus, dass die zwei Hormone die Expression einer sich überlappenden Auswahl an Genen regeln, von denen 31 Gene, wie z.B. G0S8 (Gq α Inhibitor), PLZF und RAR γ 1 differenziell geregelt werden. Aber wie können nun die so verschiedenen physiologischen Wirkungen (Näheres siehe Kapitel 2.4.2.3 und 2.4.3.3) und unterschiedlichen Zellantworten auf GCs und P entstehen? Die GR- und PR-spezifische Induktion von Zielgenen kann z.B. differenziell durch Interaktionen unterschiedlicher Rezeptordomänen mit Kofaktoren wie SMRT und NCoR erreicht werden, welche die transkriptionellen Fähigkeiten der beiden Rezeptoren unterschiedlich modifizieren (Song et al

2001). Ferner kann die flankierende und *spacer*-DNA von palindromischen responsiven Elementen zur Affinität und Spezifität der Rezeptorbindung beitragen, und somit können die Elemente von den Steroidrezeptoren verschieden stark bevorzugt werden (*Nelson et al 1999*). Interessanterweise sind die sehr nahe miteinander verwandten Rezeptoren in der Zelle unterschiedlich lokalisiert, was auf die Ligandenbindedomäne zurückzuführen ist. Während der unaktivierte GR sich im Zytoplasma befindet, ist der ligandenungebundene PR hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (*Wan et al 2001*). Die funktionellen Konsequenzen dieser differenziellen Lokalisierung sind bisher unbekannt. Kürzlich publizierte Daten beschreiben jedoch eine Interaktion des PR-Monomers mit der SH3-Domäne einer c-Src-Tyrosinkinase im Zytoplasma, was eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges zur Folge hat (*Boonyaratanakornkit et al 2001*). Diese Interaktion mit einem Signaltransduktionsmolekül, dessen Hauptvorkommen außerhalb des Nukleus ist, unterstreicht die Wichtigkeit der Rezeptor-Lokalisierung.

5.2 PLZF-Promotorstudien

Die Wirkung von Steroiden verläuft hauptsächlich über ligandenabhängige transkriptionelle Regulierung (siehe Kapitel 2.4) und kann Stunden bis Tage andauern.

In ESZ und MMZ erfolgte eine schnelle PLZF-Induktion in Antwort auf DEX innerhalb von 2-3 Stunden (siehe Abb. 4.9), und in Gegenwart der Steroide DEX und P hielt die Induktion in MMZ mindestens 72 Stunden an (siehe Abb. 4.10). Wie zuvor erwähnt ist diese lange Wirkungsdauer typisch für Steroide, jedoch ist auch der schnelle Steroidhormonrezeptor-Abbau bekannt. Ligandengebundener PR wird an einem einzigen Serinrest phosphoryliert, um für den proteasomalen Abbau markiert zu werden. Dieser erfolgt 6 Stunden nach P-Behandlung (*Lange et al 2000*). Da durch Versuche mit Rezeptorantagonisten (siehe Abb. 4.7) eine Vermittlung der Steroidwirkung auf PLZF vor allem über GR wahrscheinlich ist, sollte durch Analyse des PLZF-Promotors ein transkriptioneller Einfluss ebendieses Rezeptors untersucht werden.

Für die Klonierung des Promotors in einen geeigneten, ein Reportergen enthaltenen Vektor musste zunächst der bisher unbekannt Transkriptionsstart ermittelt werden. Dies wurde mit Hilfe eines 5'-RACE in MMZ- und KG-1-mRNA durchgeführt und ergab für MMZ einen Transkriptionsstart bei -5801 (Position relativ zum Start-Kodon) und für KG-1 bei -5858, nahe einem durch Computeranalysen ermittelten putativen Start bei -5979, in dessen Nähe ein möglicher TATA-Box-haltiger Promotor liegt (siehe Abb. 4.17). Bezogen auf die ermittelten

Transkriptionsstartpunkte und den hypothetischen Promotor wurden PLZF-Promotorkonstrukte von 0,6 bis 4,1 kb Länge kloniert (siehe Abb. 4.18) und in transiente Transfektionsexperimente eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in ESZ, MMZ und Jurkat-Zellen die transfizierten PLZF-Promotorkonstrukte, die den bis zu 4,1 kb langen 5'-flankierenden Bereich beinhalten, nicht durch DEX induzierbar waren, auch nicht nach Kotransfektion des GR (siehe Abb. 4.19-4.21). Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen können die für die Aktivierung des PLZF-Promotors notwendigen GREs außerhalb der in dieser Arbeit identifizierten und im Transfektions-Assay untersuchten Region liegen. Vielleicht bindet der GR auch nur an den PLZF-Promotor, wenn er durch andere Transkriptionsfaktoren, die im Transfektionsexperiment in den transfizierten Zellen limitiert vorlagen, dorthin rekrutiert wird. Eine solche, jedoch auf andere Gene transkriptionell inhibitorisch wirkende, Protein/Protein-Wechselwirkung des GR mit AP-1 und NF- κ B ist bereits bekannt (*Almawi & Melemedjian 2002; Pfahl 1993; Reik et al 1994*). Auch Protein/Protein-Interaktionen zwischen C/EBP β und dem GR und PR sind beschrieben worden (*Christian et al 2002; Nishio et al 1993*). Ein weiterer Grund, warum die PLZF-Promotorkonstrukte durch DEX und kotransfizierten GR nicht aktiviert werden konnten, könnte in den GREs, die durch computergestützte Analyse des Promotorbereiches ermittelt wurden, zu finden sein. Diese möglichen GREs bestehen nicht aus einer idealen palindromischen Sequenz (Näheres siehe Kapitel 2.4.1), sondern nur aus der Hälfte einer solchen Sequenz. Dies kann zu einer nichtoptimalen Affinität zu nur einem GR-Molekül eines aktivierten Rezeptordimers führen, da der erste Zinkfinger der DBD zwar an die DNA binden kann, der zweite Zinkfinger jedoch, neben der Vermittlung von Protein/Protein-Wechselwirkungen und GR-Dimerisierung, für die Erkennung des *spacer*-Bereiches verantwortlich ist (*Martinez & Wahli 1991*).

Es ist bekannt, dass in verschiedenen Zelltypen die Expression des GR negativ durch Glukokortikoide beeinflusst wird (*Burnstein & Cidlowski 1992*). Zur Absicherung, ob endogener GR α , welcher für die PLZF-Promotoraktivierung möglicherweise besonders geeignet ist, innerhalb der 24 Stunden DEX-Behandlung nach der Transfektion noch exprimiert wird, wurde die GR-Expression nach einem DEX-Zeitverlaufsexperiment in MMZ durch RT-PCR-Analyse nachgewiesen. Es konnte auch nach längerer Inkubation mit DEX, zwischen 4 und 24 Stunden, in MMZ eine gleichbleibend hohe GR-Expression beobachtet werden, erst nach 24 Stunden erfolgte eine leichte Abnahme (siehe Abb. 4.14).

Da, wie oben bereits erwähnt, kooperative Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren bekannt sind, wie z.B. die Koaktivatorfunktion von GR auf STAT5 (*Cella et al 1998; Stöcklin et al 1996*), oder Interaktionen vermutet werden wie zwischen GR und HOXA10 (M. Göttlicher,

Karlsruhe; Vortrag "*Transcriptional crosstalk of the glucocorticoid receptor*" im Rahmen des 46. Symposiums der DGE-Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie in Göttingen, März 2002), sollte ein Transfektionsexperiment mögliche Interaktionen dieser Transkriptionsfaktoren untersuchen. In Kotransfektionen von GR α und konstitutiv aktivem STAT5 sowie von GR α und HOXA10 wurde jedoch keine ligandenabhängige Aktivierung des PLZF-Promotors erzielt (siehe Abb. 4.22). Da in dem hier klonierten Promotorbereich durch Computeranalysen keine Bindungsstellen für STAT5 oder HOXA10 identifiziert worden sind, hätte die Interaktion der Proteine und die darauffolgende Induktion der PLZF-Expression über die DNA-Bindung an ein GRE stattfinden müssen. Dies scheint hier nicht der Fall zu sein.

Da C/EBP-Transkriptionsfaktoren an Differenzierungsvorgängen beteiligt sind (*Poli 1998*) und in einer neueren Studie eine Verbindung von der aktivatorischen Isoform von C/EBP β , LAP, zur Dezidualisierung, also der Differenzierung von ESZ, gezogen werden konnte (*Pohnke et al 1999*), war es von Interesse, einen möglichen Einfluss von C/EBP β auf den PLZF-Promotor in einem Transfektionsexperiment zu untersuchen. Durch die Transfektion von LAP zeigte sich im Gegensatz zum GR eine Induktion des Reportergenes über den PLZF-Promotor (siehe Abb. 4.21). Dieser Induktionsmechanismus in MMZ, vermittelt durch LAP, muss jedoch noch weiter untersucht werden, um gezielte Aussagen über seine mögliche Bedeutung bei der Proliferation oder Differenzierung machen zu können.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine transkriptionellen Einflüsse von GR auf den PLZF-Promotor nachgewiesen werden konnten, ist eine nichttranskriptionelle Wirkung von Glukokortikoiden nicht auszuschließen. In den letzten Jahren konnten signifikante Erkenntnisse über die Fähigkeit von Steroidhormonrezeptoren, nichtgenomisch zu wirken, gewonnen werden (*Falkenstein et al 2000; Hodel 2001; Koukouritaki et al 1996*). Diese nichtgenomischen Wirkungen erfolgen, wie oben schon erwähnt, über Protein-Protein-Interaktionen wie z.B. zwischen dem aktivierten GR-Monomer und AP-1 oder NF- κ B, was die Wirkung der Transkriptionsfaktoren gegenseitig antagonisiert und eine verringerte Transkriptionsrate ihrer Zielgene zur Folge hat (*Almawi & Melemedjian 2002; Tronche et al 1998*). Auch Interaktionen ligandengebundener GR oder PR mit zytosolischen Signalmolekülen können Einfluss auf die Transkription ausüben, ohne dass die Steroidrezeptoren selbst DNA binden müssen, da sie den MAPK-Signaltransduktionsweg modulieren können (*Boonyaratanakornkit et al 2001; Croxtall et al 2000; Migliaccio et al 1998*). Weitere nichtgenomische Wirkmechanismen ermöglichen z.B. durch Progesteron eine Veränderung der Membranfluidität und Unterstützung der Akrosomenreaktion in Spermien (*Revelli et al 1998*), während Glukokortikoide alternatives Spleißen, mRNA- sowie

Proteinstabilität beeinflussen können und durch direkte Bindung Kationenkanäle modulieren und somit einen Ca^{2+} -Einstrom auslösen können (Hodel 2001; Rosewicz et al 1994; Uchijima et al 1999). Mechanismen dieser Art verlaufen jedoch GR-unabhängig und kommen somit für die PLZF-Induktion nicht in Betracht, da diese, wie in dieser Arbeit gezeigt, durch den GR vermittelt wird (siehe Abb. 4.7).

Auch die Tatsache, dass relativ hohe Steroid-Konzentrationen (250 nM-1 μM), welche ein typisches Merkmal nichtgenomischer Steroidwirkung sind, für die sehr frühe Induktion der PLZF-Expression in ESZ und MMZ innerhalb von 2-3 Stunden erforderlich waren, kann hier nicht als ein Hinweis auf eine mögliche nichtgenomische Induktion gewertet werden, da auch dieser Mechanismus ohne Vermittlung des GR und sogar schon innerhalb von 15 Minuten erfolgt (Falkenstein et al 2000; Gold et al 2001).

Auch die außergewöhnlich lange 5'-UTR der PLZF mRNA lässt Freiraum für Spekulationen. Die 5'-UTR ist bis heute nicht funktionell charakterisiert worden, und eine Beteiligung an der Regulierung der PLZF-Expression daher nicht auszuschließen. Eine 5'-UTR kann posttranskriptionelle regulatorische Elemente beinhalten, wie z.B. Haarnadelstrukturen oder Regionen, an denen RNA/Protein-Interaktionen ablaufen. Diese Elemente können Einfluss auf die translationelle Kontrolle ausüben (Pesole et al 2001).

Im Fall der PLZF-Expression wären Auswirkungen nichtgenomischer Wirkungen des GR denkbar, die dann möglicherweise stromabwärts zur Induktion eines intermediären Transkriptionsfaktors führen, der schließlich an den PLZF-Promotor bindet und die Transkription aktiviert. Da jedoch die PLZF-Expression innerhalb von 2-3 Stunden in ESZ und MMZ beginnt, müsste es sich bei diesem Intermediator entweder um das Produkt eines sogenannten "frühen Gens" (*immediate early gene*) handeln, das innerhalb von 30 Minuten durch die transkriptionelle Wirkung des GRs aktiv vorliegt oder es müsste sich um ein durch den GR aktiviertes Mitglied eines Signaltransduktionsweges wie z.B. des MAPK-Weges handeln, an dessen Ende die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors steht. Gegen die Induktion eines intermediären Faktors sprechen kürzlich publizierte Daten, die eine gleichbleibend hohe Induktion der PLZF-Expression nach DEX- und Zykloheximidbehandlung von T47D/A1-2-Zellen präsentieren (Wan & Nordeen 2002). Dies spricht für eine direkte Vermittlung der Glukokortikoidwirkung ohne *de novo*-Proteinsynthese. Die Aufklärung möglicher nichtgenomischer Wirkungsmechanismen des GR auf die PLZF-Expression sollte in Zukunft Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

5.3 PLZF-Zielgensuche

In vorliegender Studie konnten erstmals Erkenntnisse über die Regelung der PLZF-Expression vor allem in uterinem Gewebe gewonnen werden. Ob diese auch auf das PLZF-RAR α -Hybrid in der APL übertragbar sind, bedarf weiterer Klärung. Es konnte hier jedoch gezeigt werden, dass in der myeloischen Zelllinie KG-1 die basal hohe PLZF-Expression nicht durch Steroide oder auch RA regulierbar zu sein scheint (siehe Abb. 4.11). Die Aufklärung der Regulierung im hämatopoetischen System wird somit bedeutend für die Entwicklung therapeutischer Ansätze, um Einfluss auf den Spiegel des PLZF-RAR α -Proteins zu erhalten, da in der t(11; 17) APL eine Therapie mit ATRA nicht erfolgreich ist und neue Konzepte fehlen.

Nicht nur die Regelung der Wildtyp-PLZF-Expression bedarf weiterer Aufklärung, auch die Charakterisierung der Zielgene und Funktion des Repressors PLZF ist unentbehrlich, sowohl in hämatopoetischen Zellen, um Hinweise auf die pathophysiologischen Mechanismen des Transkriptionsfaktors in der APL zu gewinnen mit dem Ziel Therapieansätze zu entwickeln, als auch in uterinem Gewebe.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in ESZ und MMZ eine differenzielle Regulierung der PLZF-Expression durch die Steroide Dexamethason und Progesteron gezeigt werden (siehe Abb. 4.5, 4.9 und 4.10). Da die PLZF-Expression durch DEX und P aufgeregelt wird und PLZF als transkriptioneller Repressor wirkt, eröffnet dies die Möglichkeit der Identifizierung von Zielen reprimierender steroidaler Wirkung im Uterus vermittelt durch PLZF.

PLZF scheint ein wichtiger Modulator von Differenzierungsvorgängen in verschiedenen Geweben und Zelltypen zu sein wie z.B. im Gehirn, in den Extremitätenanlagen oder den blutbildenden Zellen (*Avantaggiato et al 1995; Barna et al 2000; Chen et al 1993; Cook et al 1995*). Daher wird eine Aufklärung der PLZF-Zielgene sowohl in hämatopoetischen Zellen als auch in uterinem Gewebe unser Verständnis von Kontrollmechanismen der Differenzierung verbessern, deren Dysregulation bei der Entstehung z.B. von Tumoren eine erhebliche Rolle spielen kann.

Besonders im humanen Endometrium und Myometrium spielen Proliferations- und Differenzierungsprozesse eine bedeutende Rolle. Das Endometrium durchläuft während des Menstruationszyklus einen zyklischen Prozess bestehend aus Proliferation, Differenzierung und dem Absterben des Gewebes und steht dabei genau wie das Myometrium unter dem Einfluss der ovariellen Steroide E₂ und P (*Graham & Clarke 1997*). In der Schwangerschaft vergrößert sich mit dem Heranwachsen des Fötus auch das Myometrium und unterliegt einer Expansion durch Proliferation als auch durch Hypertrophie (*Challis & Lye 1994*).

Zahlreiche Gene werden durch Glukokortikoide und/oder Progestine im Uterus herunterreguliert wie z.B. das IL-8- und COX-2-Gen, welche durch beide Steroide im Endometrium reprimiert werden, sowie das HOXA10-Gen, das in MMZ der mittleren sekretorischen Phase des Zyklus durch Progesteron reprimiert wird (Baird 2000; Cermik et al 2001; Kelly et al 1994; Lee et al 1997; Read et al 1989). Besonders zwischen HOX-Genen und PLZF wird eine Verbindung vermutet, da sie an der Embryonalentwicklung der Maus gemeinsam beteiligt sind (Barna et al 2000).

Um den möglicherweise reprimierenden, über eine hohe PLZF-Expression vermittelten Einfluss von Glukokortikoiden und Progesteron auf die HOXA10- und HOXA11-Expression in MMZ zu untersuchen, wurden primäre MMZ über einen Zeitraum von 4 bis 72 Stunden mit DEX und P behandelt und HOXA10 sowie HOXA11 durch spezifische Oligonukleotide mit Hilfe einer RT-PCR nachgewiesen. Durch DEX war es möglich, die HOXA10- sowie HOXA11-Expression innerhalb von 4 Stunden in MMZ sehr leicht zu reduzieren, innerhalb von 72 Stunden nahm sie aber bis zum Ausgangswert wieder zu (siehe Abb. 4.16). Ob bei dieser schwachen Reprimierung der stark erhöhte PLZF-Spiegel eine Rolle spielt ist nicht auszuschließen, bedarf jedoch einer weiteren Klärung. Eine Reprimierung durch P konnte hier nicht nachgewiesen werden, obwohl beschrieben worden ist, dass HOXA10 in MMZ durch P heruntergeregelt werden kann (Cermik et al 2001).

Weitere negative Effekte, die durch Glukokortikoide vermittelt werden, konnten im Myometrium nachgewiesen werden. Dazu gehört z.B. die Senkung der Syntheserate für das Prostaglandin, Prostazyklin (PGI_2) als auch die Herunterregelung der Expression des Parathormon-verwandten Proteins (PTHrP; *parathyroid hormone-related protein*). Sowohl PGI_2 als auch PTHrP wirken positiv auf die Ruhigstellung des Uterus, was essenziell für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft ist (Paspaliaris et al 1995; Richardson et al 1986). Nahe dem Zeitpunkt der Geburt steigt die Kortisolkonzentration im Plasma der Mutter (Carr et al 1981). Es wird vermutet, dass diese Glukokortikoide nun im Myometrium die Prostaglandinbildung (es wird dort hauptsächlich PGI_2 gebildet) reduzieren können und so die durch PGI_2 -induzierte Ruhigstellung des Uterus aufheben. Hingegen ist die Prostaglandinbildung, welche hauptsächlich die für uterine Kontraktilität wichtigen Formen PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Amnion sowie der Dezidua bereitstellt, von Glukokortikoiden unbeeinflusst (Casey et al 1985; Richardson et al 1986).

Bisher sind nur zwei Kandidatenzielgene von PLZF bekannt. Es handelt sich dabei um *ZyklinA2*, eine wichtige Komponente der Zellzyklusmaschinerie, und um das Gen, welches für

die α -Untereinheit des IL-3R kodiert (Ball et al 1999; Yeyati et al 1999). Der IL-3R besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit und vermittelt den IL-3-Zytokineffekt durch Stimulierung der Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen (Kosugi et al 1995). In dieser Arbeit konnte keine Reprimierung der ZyklinA2- und IL-3R α -mRNA-Menge in DEX-behandelten MMZ innerhalb von 24 Stunden in der Anwesenheit von drastisch erhöhtem PLZF-mRNA-Spiegel nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.15). Die Expression von IL-3R α war in den Zellen außerordentlich gering, so dass eine Funktion von IL-3R α in diesem Zellsystem nicht zu erwarten ist und somit hier auch nicht IL-3R α als PLZF-Zielgen in Frage zu kommen scheint. Dass ein Ausbleiben der Reprimierung auf das Fehlen des PLZF-Proteins zurückzuführen ist kann ausgeschlossen werden, da innerhalb von 24 Stunden nicht nur die PLZF-mRNA nachweisbar ist, sondern auch das PLZF-Protein nach 24-stündiger DEX-Behandlung mit Hilfe von Immunfluoreszenz in MMZ dargestellt werden kann (siehe Abb. 4.12). Bei der ZyklinA2-Expression konnte erst nach 24 Stunden ein leichter Rückgang beobachtet werden. Ob dies auf den inhibitorischen Einfluss von PLZF auf die ZyklinA2-Expression zurückzuführen ist oder unabhängig von PLZF auf die Fähigkeit von Glukokortikoiden den Zellzyklus am G₁/S-Übergang zu stoppen, bedarf weiterer Klärung (Rogatsky et al 1997; Yeyati et al 1999).

Sowohl Glukokortikoide als auch PLZF sind in Prozesse der Differenzierung, Apoptose und der Zellzykluskontrolle involviert (Melnick & Licht 1999; Yeyati et al 1999). Besonders hervorzuheben ist die Fähigkeit von Glukokortikoiden, den G₁/S-Übergang in Osteoblasten und verschiedenen Zelllinien zu inhibieren, indem u.a. die Expression von Zyklinen und CDKs reduziert wird (Näheres zum Zellzyklus siehe Kapitel 2.2) (Rogatsky et al 1997; Smith et al 2000). Auch PLZF hat eine inhibierende Wirkung auf den G₁/S-Übergang sowie den Lauf durch die S-Phase, was in engem Zusammenhang mit seinem reprimierenden Effekt auf die ZyklinA2-Expression steht (Yeyati et al 1999).

Nicht nur das zuvor beschriebene Blockieren des Zellwachstums und somit die Möglichkeit zur Zelldifferenzierung ist durch PLZF denkbar, sondern auch ein positiver Einfluss auf das Zellwachstum. Es konnte gezeigt werden, dass der Vitamin-D₃-Rezeptor (VDR) die Vitamin-D₃-Wirkung auf die myeloische Differenzierung vermittelt, in dem er die Expression des CDKIs p21 aktiviert und somit einen Zellzyklusarrest und die folgende Differenzierung ermöglicht (Liu et al 1996). PLZF ist nun in der Lage, durch direkte physikalische Interaktion mit dem VDR dessen transkriptionelle Aktivität zu unterdrücken, das Zellwachstum zu ermöglichen und die Differenzierung zu verhindern. Dieser Mechanismus erscheint logisch, da z.B. in HL-60- und in NB4-Zellen eine RA-induzierte Zelldifferenzierung nur mit gleichzeitiger Abnahme der PLZF-

Expression einhergeht (*Chen et al 1993*). Interessanterweise wurde HOXA10 als ein Zielgen der VDR-Aufregulierung in der myeloischen Differenzierung identifiziert (*Rots et al 1998*). Ein Zusammenhang zwischen PLZF und seinem supprimierenden Einfluss auf HOXA10 wäre über diesen Weg also ebenfalls denkbar.

In dieser Arbeit konnte die starke glukokortikoid- und schwächere progesteron-vermittelte Aufregung der PLZF-Expression in verschiedenen nicht-hämatopoetischen Zelltypen (ESZ, MMZ, T47D) gezeigt werden. Die besondere Bedeutung von Proliferation und Differenzierung im menschlichen Uterus, aber auch in der Brustdrüse, welcher die Zelllinie T47D entstammt, sowie die oben genannten und bisher bekannten Einflüsse von PLZF auf den Zellzyklus und somit auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung, legen eine Verbindung der PLZF-Wirkung zur Entwicklung und Funktion des Uterus und der Brustdrüse nahe.

Durch die RT-PCR-Analysen war es nicht möglich, eindeutige Aussagen zur Zielgenfrage und Funktion von PLZF in uterinem Gewebe zu treffen. Zur Klärung dieser Frage bietet sich die Methode des cDNA-Microarrays an. Wie in Kapitel 3.4 und 4.9 beschrieben, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Voraussetzung für diesen Versuchsansatz bereitet. Es war möglich geeignete Vektoren herzustellen (siehe Abb. 4.23 und 4.24), mit denen das Wildtyp-PLZF-Protein und ein Fusionsprotein aus VP16-Aktivierungsdomäne und PLZF-DNA-Bindedomäne bakteriell exprimiert werden können (siehe Abb. 4.25). Mit diesen Proteinen werden zur Zeit funktionelle Tests durchgeführt, die belegen sollen, dass das Protein in den Zellkern transloziert und in der Lage ist, an ein responsives Element z.B. aus dem IL-3R α -Promotor zu binden (*Ball et al 1999*). Danach ist es möglich, die bakteriell gebildeten Proteine in kultivierte ESZ und MMZ zu transduzieren und durch einen Vergleich mit unbehandelten Zellen die PLZF-Wirkung anhand des jeweiligen Expressionsmusters im cDNA-Microarray zu bestimmen. Somit kann das Vergleichen von Expressionsprofilen zur Identifizierung von PLZF-Zielgenen und zur Klärung der PLZF-Funktion beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Almawi WY, Melemedjian OK (2002) Negative regulation of nuclear factor- κ B activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 28: 69-78
- Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Grégoire MJ, Berger R, Jonveaux P (1999) The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 8: 1741-1749
- Avantaggiato V, Pandolfi PP, Ruthardt M, Hawe N, Acampora D, Pelicci PG, Simeone A (1995) Developmental analysis of murine promyelocyte leukemia zinc finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J Neurosci* 15: 4927-4942
- Baird DT (2000) Mode of action of medical methods of abortion. *J Am Med Womens Assoc* 55: 121-126
- Ball HJ, Melnick A, Shaknovich R, Kohanski RA, Licht JD (1999) The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res* 27: 4106-4113
- Bamberger A-M, Milde-Langosch K, Löning T, Bamberger CM (2001) The glucocorticoid receptor is specifically expressed in the stromal compartment of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5071-5074
- Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Beil FU, Schulte HM (1999) Dissociative glucocorticoid activity of medroxyprogesterone acetate in normal human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4055-4061
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17: 245-261
- Barna M, Hawe N, Niswander L, Pandolfi PP (2000) Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet* 25: 166-172
- Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6: 225-236
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33: 451-458
- Boettger-Tong HL, Stancel GM (1995) Retinoic acid inhibits estrogen-induced uterine stromal and myometrial cell proliferation. *Endocrinology* 136: 2975-2983
- Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 8: 269-280
- Brar AK, Kessler CA, Meyer AJ, Cedars MI, Jikihara H (1996) Retinoic acid suppresses in-vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2: 185-193

- Breems-de Ridder MC, Löwenberg B, Jansen JH (2000) Retinoic acid receptor fusion proteins: friend or foe. *Mol Cell Endocrinol* 165: 1-6
- Brown PO, Botstein D (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21: 33-37
- Burnstein KL, Cidlowski JA (1992) The down side of glucocorticoid receptor regulation. *Mol Cell Endocrinol* 83: C1-C8
- Burton PJ, Dharmarajan AM, Hisheh S, Waddell BJ (1996) Induction of myometrial 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 messenger ribonucleic acid and protein expression late in rat pregnancy. *Endocrinology* 137: 5700-5706
- Carr BR (1998) Female Reproductive System, Humans. In: *Encyclopedia of Reproduction* (eds. Knobil E, Neill JD) Academic Press, Harcourt Brace & Company, San Diego, 205-214
- Carr BR, Parker CR, Jr., Madden JD, MacDonald PC, Porter JC (1981) Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 139: 416-422
- Casey ML, MacDonald PC, Mitchell MD (1985) Despite a massive increase in cortisol secretion in women during parturition, there is an equally massive increase in prostaglandin synthesis. A paradox? *J Clin Invest* 75: 1852-1857
- Cella N, Groner B, Hynes NE (1998) Characterization of Stat5 α and Stat5 β homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol* 18: 1783-1792
- Cermik D, Karaca M, Taylor HS (2001) HOXA10 expression is repressed by progesterone in the myometrium: differential tissue-specific regulation of HOX gene expression in the reproductive tract. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3387-3392
- Challis JRG, Lye SJ (1994) Parturition. In: *The Physiology of Reproduction* (eds. Knobil E, Neill JD) Raven Press, New York, 985-1032
- Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A (1993) Fusion between a novel *Krüppel*-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor- α locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* 12: 1161-1167
- Christian M, Pohnke Y, Kempf R, Gellersen B, Brosens JJ (2002) Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein β isoforms: Promoter-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 16: 141-154
- Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stumpp H, Elger W (2000) Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* 65: 741-751

- Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9: 1608-1621
- Cook M, Gould A, Brand N, Davies J, Strutt P, Shaknovich R, Licht J, Waxman S, Chen Z, Gluecksohn-Waelsch S, Krumlauf R, Zelent A (1995) Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2249-2253
- Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ (2000) Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 130: 289-298
- Dong S, Zhu J, Reid A, Strutt P, Guidez F, Zhong HJ, Wang ZY, Licht J, Waxman S, Chomienne C, Chen Z, Zelent A, Chen SJ (1996) Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor- α fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3624-3629
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10-14
- Elliott G, O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-233
- Falkenstein E, Norman AW, Wehling M (2000) Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2072-2075
- Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Möslin G, Mangold E, Propping P (2001) Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 48: 515-521
- Friedman AD (2002) Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21: 3377-3390
- Gold R, Buttgereit F, Toyka KV (2001) Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* 117: 1-8
- Graham JD, Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18: 502-519
- Grainger DA (1998) Uterus, Human. In: *Encyclopedia of Reproduction* (eds. Knobil E, Neill JD) Academic Press, Harcourt Brace & Company, San Diego, 942-950
- Greenland KJ, Jantke I, Jenatschke S, Bracken KE, Vinson C, Gellersen B (2000) The human NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase gene promoter is controlled by Ets and activating protein-1 transcription factors and progesterone. *Endocrinology* 141: 581-597

- He L, Bhaumik M, Tribioli C, Rego EM, Ivins S, Zelent A, Pandolfi PP (2000) Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell* 6: 1131-1141
- Hewison M, Gacad MA, Lemire J, Adams JS (2001) Vitamin D as a cytokine and hematopoietic factor. *Rev Endocr Metab Disord* 2: 217-227
- Hodel A (2001) Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 13: 216-220
- Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI, Chrousos GP (1991) Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 87: 680-686
- Jensen EV (1991) Overview of the Nuclear Receptor Family. In: *Nuclear Hormone Receptors. Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities* (ed. Parker MG) Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 1-14
- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62: 1189-1204
- Kelly RW, Illingworth P, Baldie G, Leask R, Brouwer S, Calder AA (1994) Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of the neutrophil in menstruation and parturition. *Hum Reprod* 9: 253-258
- Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ (1979) Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15: 659-670
- König H, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1992) Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J* 11: 2241-2246
- Kosugi H, Nakagawa Y, Hotta T, Saito H, Miyajima A, Arai K, Yokota T (1995) Structure of the gene encoding the α subunit of the human interleukin 3 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 360-367
- Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Margioris AN, Gravanis A, Stournaras C (1996) Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. *J Cell Biochem* 62: 251-261
- Lange CA, Shen T, Horwitz KB (2000) Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1032-1037
- Lee WS, Harder JA, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E (1997) Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat Med* 3: 1005-1008

- Leidenberger FA (1998) *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio
- Li JY, English MA, Ball HJ, Yeyati PL, Waxman S, Licht JD (1997) Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* 272: 22447-22455
- Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, Michaux JL, Wu Y, DeBlasio A, Miller WH, Jr., et al. (1995) Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood* 85: 1083-1094
- Lin RJ, Egan DA, Evans RM (1999) Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genet* 15: 179-184
- Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP (1996) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10: 142-153
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9: 2266-2278
- Mangi MH, Newland AC (1999) Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines Cell Mol Ther* 5: 87-95
- Martinez E, Wahli W (1991) Characterization of Hormone Response Elements. In: *Nuclear Hormone Receptors. Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities* (ed. Parker MG) Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 125-154
- McBride LJ, Koepf SM, Gibbs RA, Salser W, Mayrand PE, Hunkapiller MW, Kronick MN (1989) Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin Chem* 35: 2196-2201
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20: 321-344
- Melnick A, Ahmad KF, Arai S, Polinger A, Ball H, Borden KL, Carlile GW, Prive GG, Licht JD (2000a) In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. *Mol Cell Biol* 20: 6550-6567
- Melnick A, Carlile G, Ahmad KF, Kiang CL, Corcoran C, Bardwell V, Prive GG, Licht JD (2002) Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Mol Cell Biol* 22: 1804-1818
- Melnick A, Licht JD (1999) Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93: 3167-3215

- Melnick AM, Westendorf JJ, Polinger A, Carlile GW, Arai S, Ball HJ, Lutterbach B, Hiebert SW, Licht JD (2000b) The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 20: 2075-2086
- Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17: 2008-2018
- Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL (2000) Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Hum Reprod* 15 Suppl 3: 48-56
- Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchovsky N, Koop BF, Rennie PS (1999) Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol Endocrinol* 13: 2090-2107
- Nishio Y, Isshiki H, Kishimoto T, Akira S (1993) A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat α 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol* 13: 1854-1862
- Nordeen SK, Kuhnel B, Lawler-Heavner J, Barber DA, Edwards DP (1989) A quantitative comparison of dual control of a hormone response element by progestins and glucocorticoids in the same cell line. *Mol Endocrinol* 3: 1270-1278
- Oakley RH, Cidlowski JA (2001) The glucocorticoid receptor: expression, function, and regulation of glucocorticoid responsiveness. In: *Glucocorticoids* (eds. Goulding NJ, Flower RJ) Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, 55-80
- Paspaliaris V, Petersen DN, Thiede MA (1995) Steroid regulation of parathyroid hormone-related protein expression and action in the rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 259-265
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 276: 73-81
- Pfahl M (1993) Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* 14: 651-658
- Pohnke Y, Kempf R, Gellersen B (1999) CCAAT/enhancer-binding proteins are mediators in the protein kinase A-dependent activation of the decidual prolactin promoter. *J Biol Chem* 274: 24808-24818
- Poli V (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273: 29279-29282
- Porterfield SP (2001) *Endocrine Physiology*. Mosby, Inc., Harcourt Health Science Company, St. Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto

- Read LD, Greene GL, Katzenellenbogen BS (1989) Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in human breast cancer cell lines by sex steroid hormones, their antagonists, and growth factors. *Mol Endocrinol* 3: 295-304
- Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ (1996) The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 87: 882-886
- Rego EM, Pandolfi PP (2001) Analysis of the molecular genetics of acute promyelocytic leukemia in mouse models. *Semin Hematol* 38: 54-70
- Reichardt HM, Horsch K, Grone HJ, Kolbus A, Beug H, Hynes N, Schütz G (2001a) Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur J Endocrinol* 145: 519-527
- Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz G (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93: 531-541
- Reichardt HM, Tuckermann JP, Göttlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schütz G (2001b) Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 20: 7168-7173
- Reid A, Gould A, Brand N, Cook M, Strutt P, Li J, Licht J, Waxman S, Krumlauf R, Zelent A (1995) Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* 86: 4544-4552
- Reik A, Stewart AF, Schütz G (1994) Cross-talk modulation of signal transduction pathways: two mechanisms are involved in the control of tyrosine aminotransferase gene expression by phorbol esters. *Mol Endocrinol* 8: 490-497
- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J (1998) Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19: 3-17
- Richardson MR, Mitchell MD, MacDonald PC, Casey ML (1986) Glucocorticosteroid regulation of prostaglandin biosynthesis in human myometrial smooth muscle cells in monolayer culture. *J Steroid Biochem* 25: 521-526
- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ (1997) Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol Cell Biol* 17: 3181-3193
- Rosewicz S, Riecken EO, Kaiser A (1994) Transient stabilization of cholecystokinin A receptor mRNA by glucocorticoids in pancreatic AR42J cells. *Am J Physiol* 267: G772-G777
- Rots NY, Liu M, Anderson EC, Freedman LP (1998) A differential screen for ligand-regulated genes: identification of *HoxA10* as a target of vitamin D₃ induction in myeloid leukemic cells. *Mol Cell Biol* 18: 1911-1918

- Sainty D, Liso V, Cantu-Rajnoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Benattar L, Fenu S, Mancini M, Duchayne E, Mahon FX, Gutierrez N, Birg F, Biondi A, Grimwade D, Lafage-Pochitaloff M, Hagemeyer A, Flandrin G (2000) A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. Group Francais de Cytogenetique Hematologique, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies. *Blood* 96: 1287-1296
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
- Schüle R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM (1990) Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62: 1217-1226
- Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S, Melnick A, Lempert C, Waxman S, Zelent A, Licht JD (1998) The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol* 18: 5533-5545
- Sitterlin D, Tiollais P, Transy C (1997) The RAR α -PLZF chimera associated with Acute Promyelocytic Leukemia has retained a sequence-specific DNA-binding domain. *Oncogene* 14: 1067-1074
- Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE, Mihm M (1995) Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett* 374: 113-116
- Smith E, Redman RA, Logg CR, Coetzee GA, Kasahara N, Frenkel B (2000) Glucocorticoids inhibit developmental stage-specific osteoblast cell cycle. Dissociation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 from E2F4- p130 complexes. *J Biol Chem* 275: 19992-20001
- Song LN, Huse B, Rusconi S, Simons SS, Jr. (2001) Transactivation specificity of glucocorticoid *versus* progesterone receptors. Role of functionally different interactions of transcription factors with amino- and carboxyl-terminal receptor domains. *J Biol Chem* 276: 24806-24816
- Steinman RA (2002) Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* 21: 3403-3413
- Stöcklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383: 726-728
- Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P (1997) A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 57: 1338-1345
- Telgmann R, Gellersen B (1998) Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum Reprod Update* 4: 472-479

- Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G (1998) Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr Opin Genet Dev* 8: 532-538
- Uchijima Y, Takenaka A, Takahashi S, Noguchi T (1999) Dexamethasone stabilizes IGFBP-1 mRNA in primary cultures of rat hepatocytes. *Endocr J* 46: 471-476
- Wan Y, Coxe KK, Thackray VG, Housley PR, Nordeen SK (2001) Separable features of the ligand-binding domain determine the differential subcellular localization and ligand-binding specificity of glucocorticoid receptor and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 15: 17-31
- Wan Y, Nordeen SK (2002) Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 16: 1204-1214
- Ward JO, McConnell MJ, Carlile GW, Pandolfi PP, Licht JD, Freedman LP (2001) The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D₃ receptor. *Blood* 98: 3290-3300
- Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S (1997) Fusion of retinoic acid receptor α to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet* 17: 109-113
- Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, Nason-Burchenal K, Dmitrovsky E, Zelent A, Licht JD (1999) Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* 18: 925-934
- Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD (2001) Translocations of the *RAR α* gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20: 7186-7203
- Zhang T, Xiong H, Kan L, Zhang C, Jiao X, Fu G, Zhang Q, Lu L, Tong J, Gu B, Yu M, Liu J, Licht J, Waxman S, Zelent A, Chen E, Chen S (1999) Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11422-11427

7. Anhang

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
ag	Atogramm
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APL	Akute promyeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-responsives Element
AS	alternative Spleissvariante
b	bovin
bp	Basenpaar(e)
BTB/POZ	<i>bric-a-brac/tramtrack/broad complex, poxvirus and zinc finger</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CDKI	<i>cyclin dependent kinase inhibitor</i>
CRH	<i>corticotropin releasing hormone</i>
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCC	<i>dextrane coated charcoal</i>
DEX	Dexamethason
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
ESZ	endometriale Stromazellen
ETO	<i>Eight-Twenty One</i>

f.c.	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	Glukokortikoid-responsives Element
h	Stunde(n) (<i>hour(s)</i>)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salts</i>
HC	Hydrokortison (<i>hydrocortisone</i>)
HDAC	Histondeazetylase (<i>histone deacetylase</i>)
HRE	Hormon-responsives Element
HSD	Hydroxysteroid Dehydrogenase
IB	<i>inclusion bodies</i>
IL-3R α	Interleukin-3 Rezeptor α -Untereinheit
IMDM	<i>Iscove's Modification of Dulbecco's Medium</i>
IPTG	Isopropyl- β -thiogalacto-pyranosid
IVTT	<i>in vitro</i> -Transkription/Translation
kb	Kilobasenpaare
Ko	Kontrolle
l	Liter
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
M	molar
MMZ	myometriale glatte Muskelzellen
MPA	Medroxyprogesteronazetat
mM	millimolar
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
MPA	Medroxyprogesteronazetat
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
N-CoR	<i>nuclear receptor co-repressor</i>

nm	Nanometer
nt	Nukleotid
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
o.	ohne
OD	optische Dichte
P	Progesteron
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pg	Pikogramm
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zincfinger</i>
PG	Prostaglandin
POMC	<i>proopiomelanocortin hormone</i>
PR	Progesteron-Rezeptor
PRE	Progesteron-responsives Element
RA	all- <i>trans</i> Retinolsäure (<i>retinoic acid</i>)
RAR	Retinolsäure-Rezeptor (<i>retinoic acid receptor</i>)
RARA	Retinolsäure-Rezeptor α -Gen (<i>retinoic acid receptor α-gene</i>)
Rb	Retinoblastoma
RLE	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptors</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transkription</i>
s.u.	siehe unten
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (<i>Units</i>)
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region

UV	Ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin D ₃ Rezeptor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Glossar

<i>antisense</i> Oligonukleotid	Zu dem DNA-Sinnstrang komplementäre Sequenz
<i>insert</i>	DNA-Sequenz, welche in einem Vektor kloniert vorliegt
<i>mismatch</i>	Nukleotid-Fehlpaarung
<i>sense</i> Oligonukleotid	Dem DNA-Sinnstrang entsprechende Sequenz
<i>touchdown</i>	Schrittweise Herabsetzung der Oligonukleotid-anlagerungstemperatur in einer PCR
<i>well</i>	Vertiefung in einer Zellkulturplatte

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Leidenberger und Frau PD Dr. U. F. Habenicht möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Doktorarbeit am "Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg" durchzuführen.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Ivell und Herrn Prof. Dr. L. Renwranz für die Begutachtung der Dissertation aussprechen. Ebenso dankbar bin ich Herrn PD Dr. J. Olcese und Herrn Prof Dr. H. Schliemann für die freundliche Übernahme des Disputationsgutachtens.

Frau Dr. B. Gellersen danke ich sehr herzlich für die Vergabe des Themas sowie für die fachlich ausgezeichnete Betreuung und persönliche Unterstützung.

Andreas N., Anita N., Anja R., Beate H., Suse J., Tanja S.-M. und Yvonne P. danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und den Spaß bei der Arbeit in unserem Labor 1-30 und möchte besonders Rita Kempf für ihre Unterstützung und ihre zahlreichen Ratschläge während meiner Laborarbeit von Herzen danken.

Allen IHFlern danke ich für die freundliche Atmosphäre und die vielfältige Unterstützung, die mir im Laufe meiner Arbeit zuteil wurde. Hervorheben möchte ich jedoch die ausgezeichnete Bibliotheksarbeit von Petra Stegemann und Christoph Scholz und ich möchte Olaf Nagel danken, durch dessen Hilfe die Arbeit am Lightcycler sehr kurzweilig war.

Dr. S. Hartung, Dr. S. Jenatschke, T. Schneider-Merck und Dr. R. Telgmann danke ich sehr herzlich für die Durchsicht des Manuskriptes und ihre Bereitschaft, dies auch in arbeitsreicher Zeit oder im Urlaub anzugehen.

Herrn PD H.K. Pauli und Herrn Prof. Dr. Ch. Lindner sowie ihren Mitarbeitern im ELIM-Krankenhaus, Hamburg, gebührt mein Dank für die Bereitstellung des uterinen Gewebes.

An PKay: "Wir haben es zusammen geschafft! Es bleibt alles anders!"

Zu guter Letzt, aber mit besonderer Freude möchte ich meiner Familie danken, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit immer mit vollem Enthusiasmus und Liebe begleitet hat und mir ihr ganzes Vertrauen schenkt.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Jasmin Fahnenstich
 Geburtsjahr 1973
 Geburtsort Duisburg

Ausbildung

Grundschule 1979-1983 in Duisburg
 Gymnasium 1983-1992 in Duisburg
 Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

Studium der Biologie

Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
 April 1993 - März 1995
 Abschluss: Vordiplom

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn
 März 1995 - Juni 1998

Abschluss: Diplom-Biologin

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Immunbiologie, Zoologie, Physik

Thema der Diplomarbeit am Institut für Humangenetik:
 "Molekulargenetische Untersuchungen bei familiärer adenomatöser
 Polyposis (FAP): Darstellung von Keimbahnmutationen im APC-
 Gen", teilweise in (*Friedl et al 2001*) veröffentlicht

Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der
 Universität Hamburg

März 1999: Beginn der vorliegenden Arbeit

März 2001: Vortrag auf dem 45. Symposium der DGE (Deutsche
 Gesellschaft für Endokrinologie) in Magdeburg

Februar 2002: Poster auf dem Kongress "*Cell Signaling,
 Transcription and Translation as Therapeutic Targets*" in
 Luxemburg

März 2002: Poster auf dem 46. Symposium der DGE in Göttingen

Eingereichte Veröffentlichung:

*"Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF) Is a Glucocorticoid-
 and Progesterone-Regulated Transcription Factor in Human
 Endometrial Stromal Cells and Myometrial Smooth Muscle Cells"*