

**Identifizierung und molekulare Charakterisierung
neuer CLIM und RLIM interagierender Proteine
aus *Mus musculus***

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors
der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Cenap Güngör
aus Hamburg

Hamburg, April 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. I. BACH
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. W. SCHÄFER
Tag der Disputation: 05. April 2013

Hamburg, den 21. März 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Für meine Familie(n)

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Cenap Güngör geb. am 29.03.1977 erkläre an Eides statt, gegenüber der Universität Hamburg, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Zuhilfenahme ausschließlich der im Literaturverzeichnis genannten Quellen angefertigt wurde.

In Kenntnis der Strafbarkeit einer falschen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung, habe ich mich noch keinem Promotionsverfahren unterzogen und die Dissertation nicht in der gleichen oder einer anderen Fassung einer anderen Fakultät oder einem Prüfungsausschuss an einer anderen in- oder ausländischen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt.

Hamburg, den 14.01.2013

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2004 bis Juli 2008 unter Anleitung von Prof. Ingolf Bach im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg und in der *Medical School* der *University of Massachusetts*, USA durchgeführt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Proteasomal selection of multiprotein complexes recruited by LIM homeodomain transcription factors

Cenap Güngör, Naoko Ishigaki, Hong Ma, Alexander Drung, Heather P. Ostendorff, Michael Bossenz, Catherina G. Becker, Thomas Becker, Ingolf Bach

PNAS 2007, September 18; 38 (15000–15005)

Regulation of Estrogen-Dependent Transcription by the LIM Cofactors CLIM and RLIM in Breast Cancer

Steven A Johnsen, Cenap Güngör^{*}, Tanja Prenzel, Sabine Riethdorf, Lutz Riethdorf, Naoko Taniguchi-Ishigaki, Thomas Rau, Baris Tursun, J. David Furlow, Guido Sauter, Martin Scheffner, Klaus Pantel, Frank Gannon, Ingolf Bach

Cancer Research 2009, Jan 1;69(1) (128-36)

^{*}Ko-Erstautorenschaft

Gutachter:

Prof. Dr. Ingolf Bach

Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Tag der Prüfung:

05. April 2013

Zusammenfassung	1.
I. Einleitung	3.
I.1 Die Regulation der Transkription	3.
I.2 Das Ubiquitin Proteasom System (UPS)	4.
I.2.1 Enzyme der Ubiquitin-Kaskade.....	6.
I.2.2 Das 26S-Proteasom.....	9.
I.2.3 Physiologische Funktionen der Ubiquitinierung in der Zelle.....	11.
I.3 LIM-Proteine	13.
I.3.1 Nukleäre LIM-Proteine.....	15.
I.4 CLIM-Kofaktoren	17.
I.5 RLIM, ein weiterer Kofaktor des LIM-Systems	20.
I.6 Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren	21.
I.6.1 Die Steroid-Rezeptoren ER α und ER β	24.
I.6.2 Die proteasomale Kontrolle der ER α gesteuerten Transkription.....	26.
I.7 Kofaktoren der ERα vermittelten Transkription	28.
I.7.1 Koaktivatoren der ER α vermittelten Transkription.....	28.
I.7.2 Korepressoren der ER α vermittelten Transkription.....	29.
I.7.3 ER α -regulierte Zielgene.....	30.
I.8 ERα und Brustkrebsentstehung	31.
I.9 Zielsetzung der Arbeit	32.
II. Material & Methoden	34.
II.1 Material	34.
II.1.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen.....	34.
II.1.2 Vektoren.....	34.
II.1.3 Lösungen und Medien.....	35.
II.1.4 Verwendete Zelllinien.....	35.
II.1.5 Zellkulturmedien.....	36.
II.1.6 Bakterienstämme.....	36.
II.1.7 DNA-Oligonukleotide.....	36.
II.1.8 Doppelsträngige RNA-Oligonukleotide.....	37.
II.1.9 Antikörper.....	37.
II.1.9.1 Primäre Antikörper.....	37.
II.1.9.2 Sekundäre Antikörper und HRP-Protein A.....	38.
II.2 Methoden	38.
II.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	38.
II.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	38.
II.2.1.1.1 Plasmid Präparation im kleinen Maßstab.....	38.
II.2.1.1.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab.....	39.
II.2.1.2 Phenol-/Chloroform-Extraktion.....	39.
II.2.1.3 Ethanol-fällung.....	39.
II.2.1.4 Isolierung von RNA aus Säugerzellen.....	39.
II.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40.
II.2.1.6 <i>Real Time</i> PCR.....	40.
II.2.1.7 <i>In vitro</i> Mutagenese PCR.....	41.
II.2.1.8 Klonierung von PCR Fragmenten.....	41.
II.2.1.9 Elektrophorese von DNA Fragmenten.....	42.

Inhaltsverzeichnis

II.2.1.10	Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	42.
II.2.1.11	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen.....	42.
II.2.1.12	Restriktionsverdau.....	43.
II.2.1.13	Präparation von Vektoren.....	43.
II.2.1.14	Dephosphorylierungen von 5'-Enden.....	43.
II.2.1.15	Ligation von DNA Fragmenten mit Vektoren.....	43.
II.2.1.16	Sequenzierung von DNA.....	43.
II.2.1.17	Herstellung kompetenter Bakterien.....	44.
II.2.1.18	Transformation von Bakterienzellen.....	44.
II.2.1.19	Verwendung doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide.....	44.
II.2.2	Proteinbiochemische Arbeiten.....	45.
II.2.2.1	Expression von Proteinen in Bakterien.....	45.
II.2.2.2	Aufreinigung von rekombinanten His-Tag Fusionsproteinen.....	45.
II.2.2.3	Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen.....	46.
II.2.2.4	Aufreinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen.....	46.
II.2.2.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	47.
II.2.2.6	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE).....	47.
II.2.2.7	Färbung von SDS PAGE-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau.....	47.
II.2.2.8	Western Blot.....	47.
II.2.2.8.1	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen.....	47.
II.2.2.8.2	Ponceaurot-Färbung der Nitrozellulosemembran.....	48.
II.2.2.8.3	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen.....	48.
II.2.2.9	Analyse von Protein-Protein Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen.....	48.
II.2.2.10	Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen <i>in vitro</i>	49.
II.2.2.11	<i>In vitro</i> -Ubiquitinierungen.....	49.
II.2.2.12	Immunpräzipitation.....	50.
II.2.2.13	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	50.
II.2.3	Methoden der Zellkultur.....	51.
II.2.3.1	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen RLIM.....	51.
II.2.3.2	Kultivierung von Säugerzellen.....	53.
II.2.3.3	Lagerung von Säugerzellen.....	53.
II.2.3.4	Transfektion von MCF7 Zellen mit Lipofectamine® 2000.....	53.
II.2.3.5	Transfektion mit Polyethanolimin (PEI).....	53.
II.2.3.6	Transfektionen mit Calciumphosphat.....	54.
II.2.3.7	Retrovirale Infektionen von MCF7 und α T3 Zellen.....	54.
II.2.3.8	Immunzytochemische Detektion von Proteinen in Säugerzellen.....	54.
II.2.3.9	Applikation der Proteasom-Inhibitoren MG132 und Lactacystin.....	55.
II.2.3.10	Applikation mit 17 β Östradiol.....	55.
II.2.3.11	Luziferase Reportergerne Experimente.....	56.
II.2.4	Arbeiten mit Gewebeschnitten.....	56.
II.2.4.1	Kryoschnitte von Maus-Gewebe.....	56.
II.2.4.2	Vibratomschnitte von Maus-Gewebe.....	56.
II.2.4.3	Immunhistochemie von Kryoschnitten.....	57.
II.2.5	Primerliste.....	57.

III. Ergebnisse Teil 1.....	58.
III.I.1 Die Rolle von CLIM Kofaktoren in LIM-HD-Multiproteinkomplexen.....	58.
III.I.1.1 CLIM-Kofaktoren stabilisieren LIM-HD-Transkriptionsfaktoren.....	58.
III.I.2 Eine definierte Abfolge von Protein-Interaktionen bestimmt die Stabilisierung von LIM-HD-Multiproteinkomplexen.....	63.
III.I.2.1 Eine Kaskade von Kofaktoren stabilisiert LIM-HD-Proteine.....	64.
III.I.2.2 SSDP1 hemmt die Interaktion von RLIM mit der LCCD-Domäne von CLIM.....	69.
III.I.2.3 SSDP1 inhibiert eine RLIM-CLIM Interaktion und reguliert die Expression von Lhx3 Zielgenen <i>in vivo</i>	71.
III. Ergebnisse Teil 2.....	75.
III.II.1 Expression von RLIM und CLIM2 im Brustgewebe von Mäusen.....	75.
III.II.1.1 Das Expressionsprofil von RLIM und CLIM2 im Brustepithel und während der Brustdrüsen-Entwicklung in Mäusen.....	76.
III.II.1.2 Die Expression von CLIM2 im Mammakarzinom von 1335 Patientinnen.....	77.
III.II.1.3 RLIM und CLIM2 sind mit ER α in Östrogen-abhängigen MCF7 Brustkrebszellen kolokalisiert.....	83.
III.II.2 CLIM2 und RLIM interagieren mit ERα <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>.....	84.
III.II.2.1 <i>In vivo</i> Interaktion von CLIM2 und RLIM mit ER α	84.
III.II.2.2 <i>In vitro</i> Interaktion von CLIM2 und RLIM mit ER α	84.
III.II.2.2.1 CLIM2 interagiert mit ER α <i>in vitro</i>	84.
III.II.2.2.2 <i>In vitro</i> Identifizierung der Interaktionsdomäne von CLIM2 mit ER α	86.
III.II.2.2.3 <i>In vitro</i> Identifizierung der Interaktionsdomäne von ER α mit CLIM2.....	88.
III.II.2.3 RLIM interagiert mit ER α <i>in vitro</i>	89.
III.II.2.3.1 <i>In vitro</i> Identifizierung der Interaktionsdomäne von RLIM mit ER α	90.
III.II.2.3.2 <i>In vitro</i> Identifizierung der Interaktionsdomäne von ER α mit RLIM.....	92.
III.II.2.4 RLIM ubiquitiniert ER α <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	93.
III.II.3 Die funktionelle Rolle von RLIM und CLIM2 in der ERα vermittelten Transkription von Zielgenen.....	95.
III.II.3.1 Eine Überexpression von RLIM führt zu einer verstärkten Transaktivierung des Reportergens in ER α positiven MCF7 Zellen.....	95.
III.II.3.2 Die verstärkte RLIM vermittelte Transaktivierung ist RINGfinger abhängig.....	99.
III.II.3.3 Eine Überexpression von CLIM2 führt zu einer Repression des Reportergens in ER α positiven MCF7 Zellen.....	100.
III.II.3.4 CLIM2 vermittelt die Repression von ER α gesteuerten Zielgenen <i>in vivo</i>	103.
III.II.3.5 RLIM vermittelt die Aktivierung von ER α gesteuerten Zielgenen <i>in vivo</i>	105.
III.II.3.6 Die Rekrutierung von RLIM und CLIM2 zu den ER α Zielgen-Promotoren des pS2-, WISP2- und Cathepsin D-Gens.....	107.

Inhaltsverzeichnis

III.II.4	CDK9 interagiert mit RLIM und CLIM2 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	110.
III.II.4.1	RLIM ist mit CDK9 in Östrogen-abhängigen MCF7 Brustkrebszellen kolokalisiert.....	111.
IV.	Diskussion.....	113.
IV.1	Die Rolle von CLIM-Proteinen im LIM-HD-Transkriptionsnetzwerk.....	113.
IV.2	Die LIM-Domäne stellt eine Instabilitätsdomäne dar.....	117.
IV.3	Die CLIM-LCCD Domäne und ihre Funktion.....	121.
IV.4	Die Rolle von SSDP1 im LIM-HD-Transkriptionsnetzwerk.....	122.
IV.5	Die Expression von RLIM und CLIM2 in Brustzellen.....	126.
IV.6	Die Expression von CLIM2-Proteinen im Mammakarzinom.....	128.
IV.7	RLIM und CLIM2: neue Interaktionspartner von ER α in Brustkrebszellen.....	131.
IV.8	Die funktionelle Rolle von RLIM und CLIM2 in der ER α vermittelten Transkription von Zielgenen.....	132.
IV.9	ER α , ein neues <i>in vivo</i> Zielprotein von RLIM?.....	137.
IV.10	Die Rolle von CDK9 in Östrogen-abhängiger Transkription in Brustkrebszellen.....	141.
	Schlusswort.....	144.
V.	Anhang.....	145.
V.1	Abkürzungsverzeichnis.....	145.
VI.	Literaturverzeichnis.....	148.
	Danksagung.....	168.

Zusammenfassung

Die Familie der LIM-Proteine ist eine große und sehr diverse zytoplasmatische und nukleäre Gruppe von Proteinen, deren gemeinsames Merkmal eine oder mehrere LIM-Domänen darstellen. LIM-Proteine sind beteiligt an der Ausbildung von Zellidentität, Zelldifferenzierung und der Kontrolle von Zellwachstum. Allen gemeinsam ist die LIM-Domäne, eine Doppel-Zink-*finger* Struktur die für Protein-Protein Interaktionen von Bedeutung ist. LIM-Proteine sind an der Formation von Multiprotein-Komplexen beteiligt. Nukleäre Vertreter der LIM-Proteine sind die LIM-Homöodomänen (LIM-HD) Transkriptionsfaktoren und deren Kofaktor Familien, die CLIM-Proteine und LIM-*only* (LMO) Proteine. Hierbei modulieren CLIM-Proteine als Adaptoren, mittels Interaktion und Ausbildung eines tetrameren Protein-Komplexes mit LIM-HD Proteinen, die Genexpression. Hierbei wird vor allem die Organogenese und Entwicklung bestimmter Hirn-Strukturen gesteuert. Die Regulation der Transkription ist ein hoch komplexer Prozess, bei dem viele Proteine am Zielgenpromotor koordiniert wechselwirken. Um ein Gleichgewicht dieser Multiprotein-Komplexe zu erreichen, werden die Konzentrationen von entscheidenden Proteinen durch Ubiquitin-abhängige proteasomale Degradation kontrolliert.

Das Ubiquitin Proteasom System ist für eine zeitlich koordinierte Degradation von kovalent Ubiquitin-markierten Ziel-Proteinen verantwortlich. Als ein großer Protein-Komplex erkennt und prozessiert das 26S-Proteasom Polyubiquitin-markierte Proteine zu Peptiden und kleineren Fragmenten. Die selektive Ubiquitinierung von Ziel-Proteinen wird durch Ubiquitin-Ligasen vermittelt. Die Ubiquitin-Ligase RLIM markiert CLIM-Proteine zum Abbau und reguliert durch dessen Proteolyse die Expression von Zielgenen der LIM-HD Proteine. Als Kofaktoren der Transkription, spielen CLIM-Proteine eine entscheidende Rolle für die Aktivität der LIM-HD Transkriptionsfaktoren. Viele weitere Transkriptionsfaktoren werden ebenfalls proteasomal reguliert. Der hormonabhängige Transkriptionsfaktor Östrogen-Rezeptor α (ER α) wird nach Ligandenbindung und Genaktivierung proteasomal degradiert. Erst die Rekrutierung des 26S-Proteasoms führt zu einer ordnungsmäßig durchgeführten Expression von ER α Zielgenen.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollten vorerst neue Interaktionspartner von CLIM-Proteinen näher analysiert werden. Es sollten vor allem molekulare Mechanismen der Assemblierung und Dynamik von LIM-HD-Multiprotein-Komplexen aufgeklärt werden. Weiterhin sollte ein direkter Einfluss der Formation von Multiprotein-Komplexen auf die Regulation der Genexpression untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass die Rekrutierung von SSDP1 (*single strand DNA binding protein 1*) zu LIM-HD-Zielgenpromotoren, einen wichtigen

Einfluss auf die Genexpression hat. Über direkte Interaktion mit CLIM-Proteinen, moduliert SSDP1 die Stabilität des gesamten LIM-HD-CLIM-SSDP1-Komplexes, mittels Protektion von CLIM- und LIM-HD-Proteinen vor proteasomalem Abbau durch das 26S-Proteasom. Es konnte aufgezeigt werden, dass das Proteasom koordiniert in die Genexpression von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren entscheidend eingreift.

In einem weiteren Projekt sollte eingehend analysiert werden, ob die Ubiquitin-Ligase RLIM und CLIM2-Kofaktor Proteine in ER α vermittelter Transkription in Brustkrebszellen, involviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl RLIM als auch CLIM2-Proteine eine neue Gruppe von Kofaktoren in der Regulation der Expression von ER α Zielgenen darstellen. Hierbei konnte das CLIM2-Protein als Korepressor und RLIM als Koaktivator der Transkription identifiziert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CLIM2 und RLIM mit ER α interagieren und die Transkription individuell modulieren. Durch den Einsatz eines *Tissue*-Microarrays (TMA) mit einem Patientenkollektiv von ca. 1400 Brustkrebspatientinnen, wurde ein möglicher Zusammenhang der ER α -Expression, als ein prognostischer Marker für Brustkrebs, mit der Expression von CLIM2-Proteinen untersucht.

I. Einleitung

Der menschliche Körper besteht aus ca. 100 Billionen Zellen. Jede einzelne Zelle muss hierbei die Aktivität und Menge seiner Proteine genau regulieren und kontrollieren, um auf gegebene (äußere) Bedingungen mit definierten zellulären Programmen antworten zu können. Für die Proliferation, Differenzierung oder Apoptose einer jeden Zelle, ist somit das Vorhandensein eines bestimmten Protein-Repertoires unerlässlich. Dazu werden eine Vielzahl von externen Einflüssen sowie inter- und intrazelluläre Signale von der Zelle durch Rezeptoren registriert und durch die fein miteinander abgestimmten Aktivitäten von verschiedenen Signaltransduktionswegen verarbeitet. Essentiell ist hier vor allem die Kontrolle und Regulation der Genexpression. Aufgrund einer Aktivierung oder Repression verschiedener Gene, reagiert die Zelle auf die Signale und setzt sie in eine Zellantwort um. Eine Fehlregulation oder Ungleichgewicht in den Signalprozessen bzw. der Genexpression, kann während der embryonalen Entwicklung schwerwiegende Folgen haben oder Krankheiten wie Krebs verursachen. Hervorgerufen werden diese Fehlregulationen insbesondere durch Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Auch posttranslationale Modifikationen spielen eine wichtige Rolle für eine intrazelluläre Protein-Aktivität und -Konzentration. Hierbei werden bestimmte Aminosäuren des Proteins mit spezifischen Signalen markiert. Bei diesen Markierungen handelt es sich in der Regel um kovalente Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung.

I.1 Die Regulation der Transkription

Das größere eukaryotische Genom verlangt im Vergleich zu dem der Prokaryoten, einen höheren Grad an struktureller Organisation. Die große DNA-Menge verleiht den Eukaryoten Fähigkeiten, die die Prokaryoten nicht besitzen und stellt zusätzliche Anforderungen an Replikation und Genexpression. Eukaryotische Zellen sind in bemerkenswertem Umfang in der Lage, Gene selektiv zu exprimieren. So benötigen die verschiedenen Zelltypen eines mehrzelligen Organismus als auch seine unterschiedlichen Entwicklungsstadien, eine selektive Expression von einem in jeder Zelle identischen Genrepertoire. Diese Selektivität unterliegt hierbei sehr umfangreichen und fein abgestimmten Regulationsmechanismen.

Den größten und umfangreichsten Anteil an der Regulation der Genexpression hat die Initiation der Transkription, wobei vielfältige DNA-Protein-Wechselwirkungen eine zentrale Rolle spielen. Essentiell für die Transkription eines Gens sind regulatorische DNA-Elemente, die sich etwa 100 Basenpaare 5'-stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt befinden. Zu

diesen Elementen gehören die TATA-Box, die GC-Box und die CAAT-Box, welche gemeinsam den Promotor eines Gens bilden. Durch diese Promotor-Elemente wird eine ordnungsgemäße Positionierung und Aktivierung des RNA-Polymerase II Komplexes gewährleistet. Weiter stromaufwärts gelegene cis-aktive Sequenzen werden als Enhancer (Atchison, 1988; Kolovos *et al.*, 2012) oder Silencer (Linzer, 1985; Kolovos *et al.*, 2012) bezeichnet, je nachdem, ob die an sie bindenden Faktoren gewebe- und entwicklungsspezifisch, hormon- oder signalabhängig sein können oder die Transkriptionsrate erhöhen oder erniedrigen. Diese cis-aktiven Elemente können sich, unabhängig von ihrer Orientierung, mehrere Kilobasen stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt entfernt befinden und die Transkription beeinflussen.

Transkriptionsfaktoren und ihre sequenzspezifische Bindung an regulatorische Elemente der DNA, steuern die Genexpression und regulieren darüber wichtige Ereignisse, wie Zellentwicklung, -differenzierung und -wachstum. Sie können entweder aktivierend oder inhibierend auf die Transkription bestimmter Gene einwirken (Lewin *et al.*, 1997; Ryan und Rosenfeld, 1997; Gilbert *et al.*, 2000; Biggin, 2011).

Neben einer DNA-Bindedomäne, mit denen sie sequenzspezifisch bestimmte DNA-Abschnitte binden können, enthalten Transkriptionsfaktoren einen Abschnitt mit transaktivierender Funktion (Transaktivierungs-Domäne). Mit der Transaktivierungs-Domäne sind sie in der Lage die Transkription durch Interaktion mit Proteinen, welche die RNA-Polymerase binden, wie z.B. TF_{II}B oder TF_{II}E (Sauer *et al.*, 1995; Gilbert, 2000; Amoutzias *et al.*, 2008) zu aktivieren bzw. zu inhibieren. Diese Domänen sind in der Regel gut abgrenzbaren Abschnitten in der Proteinsequenz zuzuordnen. Die DNA bindenden Domänen sind im Laufe der Evolution besonders stark konserviert und weisen somit auf eine einheitliche molekulare Basis in z.B. Mensch, Hefe oder Fruchtfliege hin. DNA bindende Domänen erlauben eine Einteilung in verschiedene Gruppen. Hierzu gehören beispielsweise die Zink-*finger*-Protein-, die basische Helix-*Loop*-Helix (bHLH)-Protein-, die Leucinzipper-, die POU Protein- und die Homöodomänen-Familie.

1.2 Das Ubiquitin Proteasom System (UPS)

Ubiquitin, als kovalente Modifikation, ist von entscheidender Bedeutung bei der Regulation zellulärer Proteinkonzentrationen. Bei dieser selektiven Degradation von Proteinen in eukaryotischen Zellen, wird das Substrat-Protein durch kovalente Bindungen von mehreren Ubiquitin-Molekülen markiert und anschließend hochkomplexen Proteolyse-Maschinen, den so genannten Proteasomen, zugeführt. Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren, hat eine

Molekülmasse von 8,5 kDa und wird als Fusionsprotein synthetisiert (Özkaynak *et al.*, 1984; Komander *et al.*, 2012). Es ist innerhalb von eukaryotischen Spezies hoch konserviert. Nach hydrolytischer Spaltung durch Ubiquitin-spezifische C-terminale Hydrolasen (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*, UCH) liegt es nativ als globuläres Protein vor, welches als funktionelle Reste vor allem diverse Lysine und zwei C-terminale Glycin-Reste beinhaltet. Dieses Glycin-Motiv ist für die spätere Konjugation des Ubiquitins an Ziel-Proteine essentiell. Die konjugierende Enzymkaskade setzt sich aus einem Ubiquitin aktivierenden E1-Enzym, einem konjugierenden E2-Enzym und einem verknüpfenden E3-Enzym zusammen (Abb. I.1) (Hershko und Ciechanover, 1992; Joazeiro *et al.*, 2000; Pickart, 2001; Weissman, 2001; Schulman *et al.*, 2009; Komander *et al.*, 2012).

Das E1-Enzym katalysiert unter ATP-Hydrolyse zunächst die Bildung eines Ubiquitin-adenylats (Haas und Rose, 1982; Schulman *et al.*, 2009). Im Anschluß daran wird bei gleichzeitiger Freisetzung des AMP, das Ubiquitin auf die Thiolgruppe des konservierten Cystein-Restes im aktiven Zentrum des E1-Enzyms übertragen (McGrath *et al.*, 1991; Schulman und Harper, 2009). Dabei entsteht zwischen dem Cystein (E1-Enzym) und dem Glycin (G76-Ubiquitin) eine energiereiche Thioesterbindung. Das so aktivierte Ubiquitin wird durch Transesterifizierung vom E1-Enzym auf eines der vielen E2-Enzyme (*ubiquitin conjugating enzyme*, UBC) übertragen (Hershko *et al.*, 1996; Komander *et al.*, 2012).

Die E2-Enzyme übertragen das Ubiquitin direkt oder mit Hilfe einer Ubiquitin-E3-Ligase (E3-Enzym) auf ein Substrat. Die Konjugation endet mit der Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem G76 und der Σ -Aminogruppe eines Lysins im Substrat (Weissman *et al.*, 2001; Schulman *et al.*, 2009). Ubiquitin-E3-Ligasen vermitteln hierbei die Spezifität der Substrat-Ubiquitinierung. Ein Protein kann an einem oder mehreren Lysinresten durch ein Ubiquitin-Molekül (Monoubiquitinierung), durch eine Kette von Ubiquitin-Molekülen (Polyubiquitinierung) oder durch eine Kombination von beiden Ubiquitinierungsarten modifiziert werden (Pickart *et al.*, 2001; Weissman *et al.*, 2001; Schulman und Harper, 2009). Monoubiquitinierungen können zu Modifikationen in der Protein-Funktion, -Lokalisierung oder Protein-Protein Interaktionen führen, während polyubiquitinierte Substrat-Proteine in der Regel vom Proteasom spezifisch erkannt und zu kleineren Peptiden abgebaut werden (Abb. I.1).

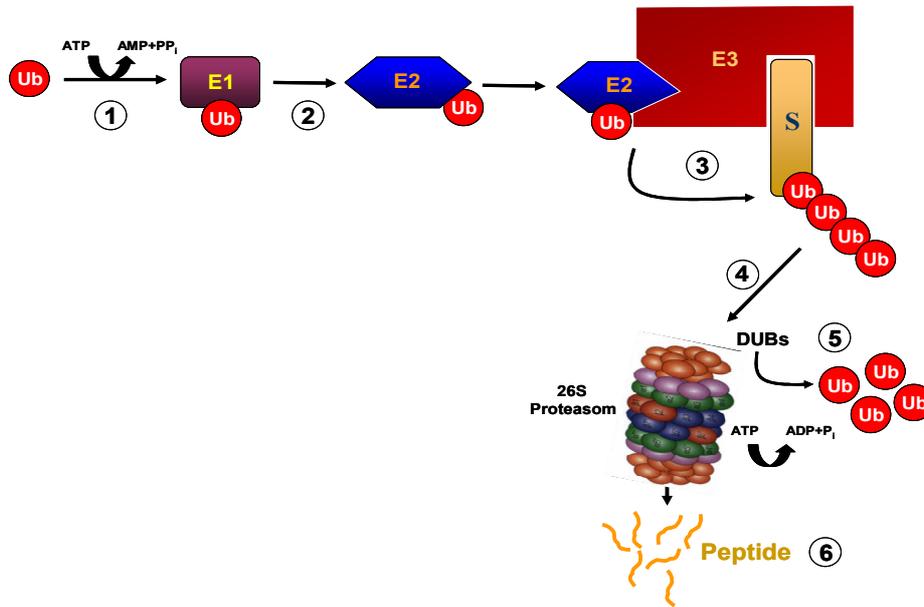


Abbildung I.1 Das Ubiquitin Proteasom System.

Ubiquitin wird durch das Ubiquitin aktivierende E1-Enzym ATP-abhängig aktiviert (1) und anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende E2-Enzym übertragen (2). In den meisten Fällen bindet der E2-Enzym/Ubiquitin-Komplex und das Substrat-Protein (S) spezifisch an eine bestimmte Ubiquitin E3-Ligase, wodurch Ubiquitin auf das Substrat-Protein übertragen wird (3). Durch die sukzessive Konjugation von Ubiquitin-Molekülen entstehen Polyubiquitin-Ketten, die das Substrat-Protein für den Abbau durch das Proteasom markieren (4). Während das wieder verwendbare Ubiquitin durch de-ubiquitinierende Enzyme (DUB's) freigesetzt wird (5), kommt es zur Prozessierung des Substrates zu kurzen Peptiden (6).

Ubiquitin verfügt über 7 konservierte Lysinreste ($K^{6,11,27,29,33,48,63}$), welche potentiell weitere Ubiquitin-Moleküle binden können. Für die Lysinreste, K^{11} , K^{29} , K^{48} und K^{63} konnte bereits eine *in vivo* Ubiquitin-Interaktion nachgewiesen werden (Hicke, 2001; Weissman *et al.*, 2001, Komander *et al.*, 2012). Polyubiquitinierungen von Substraten als Markierung für eine Protein-Degradation entstehen anhand einer Verkettung der unterschiedlichen Lysine K^{11} , K^{29} , K^{48} und K^{63} des Ubiquitins. Ein proteasomaler Abbau zu kleineren Peptiden (5-20 Aminosäuren) durch das Proteasom, verlangt allerdings eine Mindestanzahl von vier Ubiquitin-Molekülen, die entweder über das K^{29} oder K^{48} verkettet sind. Die regulierenden Signale die zwischen Mono- und Polyubiquitinierung unterscheiden, sind noch weitgehend unbekannt.

I.2.1 Enzyme der Ubiquitin-Kaskade

Für den aktivierenden Schritt in der Ubiquitinierung, ist als E1-Enzym das in verschiedenen Organismen hoch konserviert vorliegende Uba1 (*ubiquitin activating 1*) als erstes identifiziert worden (Haas und Rose, 1982; Haas *et al.*, 1982). Uba1 wurde zunächst aus Weizen kloniert

(Hatfield *et al.*, 1990) und kurz darauf auch in der Hefe identifiziert (McGrath *et al.*, 1991). Homologe des Uba1 sind in allen untersuchten eukaryotischen Spezies vorhanden und lebenswichtig. Mittlerweile sind insgesamt 8 humane E1-Enzyme mit der Fähigkeit Ubiquitin zu aktivieren identifiziert (Schulman *et al.*, 2009). Des Weiteren stellt die Inhibition von E1-Enzymen ein neues Ziel in der Bekämpfung maligner Erkrankungen dar (Xu *et al.*, 2012).

Ein charakteristisches Merkmal der E2-Enzyme ist die Ubiquitin-konjugierende Domäne (UBC-Domäne), in der das aktive Zentrum mit dem Akzeptor-Cystein lokalisiert ist. Die E2-Enzyme bilden eine große und hoch konservierte Protein-Familie (Hochstrasser, 1996; Matuschewski *et al.*, 1996; Schulman, 2011; Wenzel *et al.*, 2011). In *S. cerevisiae* konnten 11 verschiedene E2-Enzyme identifiziert werden, die spezifisch an den zahlreichen Funktionen der Ubiquitinierung beteiligt sind (Pickart, 2001). Je nach Vorhandensein weiterer Domänen, werden die E2-Enzyme in mehrere Gruppen unterteilt. Hierbei werden auch E2-Enzyme unterschieden, welche die Fähigkeit besitzen das Ubiquitin direkt und ohne Vermittlung von E3-Enzymen, auf das Substrat zu übertragen (Jentsch *et al.*, 1987; Schulman, 2011; Wenzel *et al.*, 2011).

An der Regulation der Ubiquitinierung hat jedoch das E3-Enzym einen erheblichen Anteil. Damit eine Ubiquitin-E3-Ligase spezifisch binden kann, muss das auf einem Sequenz und/oder Strukturmotiv basierende Signal im Protein zugänglich vorliegen. Daraus folgt, dass die E3-Ligasen in der Ubiquitinierung die Träger der Substrat-Spezifität sind (Laney und Hochstrasser, 1999; Pickart, 2001). Häufig ist das Ubiquitinierungssignal eine Abfolge weniger Aminosäuren (AS) in der Primärsequenz des Substrats (Pickart, 2001; Komander *et al.*, 2012).

Eines der ersten Ubiquitinierungssignale wurde in mitotischen Cyclinen und Substraten des APC-Komplexes (*anaphase-promoting-complex*) entdeckt und als *destruction box* bezeichnet (Glotzer *et al.*, 1991; Deshaies, 1999; Koepp *et al.*, 1999; Page und Hieter, 1999; Schulman und Harper, 2009). In Bindungsstudien wurde gezeigt, dass sowohl die Aminosäuren der Primärsequenz (Glotzer *et al.*, 1991; Yamano *et al.*, 1998) als auch die Konformation der Signalsequenz, die Affinität zwischen Substrat und E3-Ligase beeinflussen (Laney und Hochstrasser, 1999). Der Konformationseinfluss konnte anhand der Strukturdaten verschiedener Ubiquitinierungssignale bestätigt werden [*destruction box*, (Jiang und Basavappa, 1999; Yamanaka *et al.*, 2000)].

Die bislang bekannten Ubiquitin-E3-Ligasen gehören zu zwei Protein-Familien: den HECT-E3-Ligasen (*homologous to E6-AP carboxy terminus*, HECT) oder den RINGfinger-E3-Ligasen (*really interesting new gene*, RING) (Chhangani *et al.*, 2012). Die E3-Ligasen mit

HECT-Domäne besitzen C-terminal eine ca. 350 AS große Domäne mit konserviertem Cystein-Rest, welcher mit Ubiquitin einen Thioester bildet, bevor das Ubiquitin mit dem Akzeptor-Lysin im Substrat verknüpft wird (Huibregtse *et al.*, 1995; Metzger *et al.*, 2012). Die E3-Ligasen mit RINGfinger-Struktur bilden keinen Thioester mit Ubiquitin, sind jedoch für die Interaktion zwischen Substrat und E2-Ubiquitin-Intermediat essentiell (Deshaies, 1999; Lorick *et al.*, 1999; Metzger *et al.*, 2012). Die RING-Domäne umfasst ca. 50-70 AS mit mehreren Cystein- und Histidin-Resten, deren Abstand die Bindung von zwei Zink-Ionen ermöglicht und so zu einer charakteristischen globulären Konformation führt (Borden, 2000). Durch die spezifische Erkennung und Bindung des Substrat-Proteins sowie des E2-Ubiquitin-Komplexes, ermöglichen sie die direkte Übertragung des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Ziel-Protein (Abb. I.2.B). Des Weiteren besitzen RINGfinger E3-Enzyme auch die Fähigkeit zur Auto-Ubiquitinierung, wodurch sie sich selbst zum proteasomalen Abbau markieren können (Metzger *et al.*, 2012). U-Box Proteine hingegen koordinieren eine RING-ähnliche Struktur, ohne die Fähigkeit Zink-Ionen zu binden.

Eine weitere Klasse von Ubiquitin-Ligasen bilden die multimeren RINGfinger Ubiquitin-Ligasen wie z.B. SCF (*Skp1-Cullin-F-box protein*) (Abb. I.2.C) oder der APC-Komplex. SCF ist ein Multiprotein-Komplex, der durch spezialisierte Untereinheiten zur Bindung des E2-Ubiquitin-Konjugats und des Substrat-Proteins gekennzeichnet ist. Die Rekrutierung des Ubiquitin-beladenen E2-Enzyms wird durch das RINGfinger Protein ROC (*regulator of cullins*) ermöglicht, welches mit Cullin-Proteinen (CUL) assoziiert ist (Ohta *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001; Vodermaier *et al.*, 2004; Choo *et al.*, 2012). Die Substrat-Bindung an SCF wird durch F-Box-Proteine (Namensgebung durch das erste F-Box-Protein Cyclin F) ermöglicht, die ihrerseits über das SKP1-Protein (*S-phase-kinase-associated protein 1*) mit der CUL1-Untereinheit assoziiert sind (Zheng *et al.*, 2002; Choo *et al.*, 2012). SCF-Ubiquitin-Ligasen können F-Box-Proteine mit unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten enthalten, so dass eine Vielzahl von verschiedenen Ziel-Proteinen ubiquitiniert werden kann. Als eine reversible Bindung kann Ubiquitin erneut von de-ubiquinierenden Enzymen (DUB's) prozessiert werden (Burrows *et al.*, 2012). In der Hefe sind 19 Ubiquitin-Proteasen bekannt, in Säugerzellen wesentlich mehr. Diese werden in zwei Klassen spezifischer Cystein-Proteasen unterteilt. Die Klasse der C-terminalen Hydrolasen (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*, UCH) prozessieren das als Fusionsprotein exprimierte Ubiquitin (Lee *et al.*, 2011). Die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (*ubiquitin specific proteases*, UBP) spalten die Isopeptidbindungen der Poly-Ubiquitin-Ketten und ubiquitiniertes Substrate (Wilkinson, 2000; Lee *et al.*, 2011).

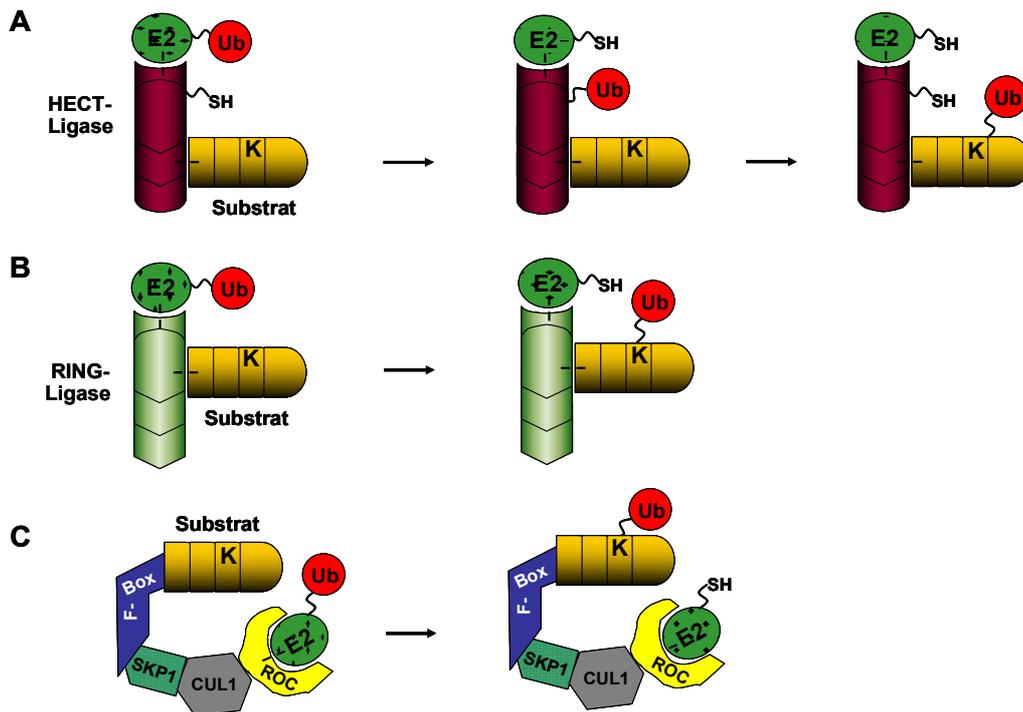


Abbildung I.2 HECT- und RINGfinger Ubiquitin-Ligasen.

A. HECT Ubiquitin-Ligasen sind monomere Proteine, die spezifisch mit dem Substrat-Protein und dem Ubiquitin-beladenem E2-Enzym interagieren können. Die HECT-Domäne verfügt über einen konservierten Cystein-Rest, der durch das E2 mit Ubiquitin beladen wird und dieses auf das gebundene Substrat überträgt. **B.** Monomere RINGfinger Ubiquitin-Ligasen binden ebenfalls spezifisch das Substrat-Protein und den E2-Ubiquitin-Komplex. Im Gegensatz zu HECT-E3 Ligasen gehen RING-E3 Ligasen keine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein, sondern vermitteln direkt die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat. **C.** Multimere RINGfinger Ubiquitin-Ligasen wie das SCF (SKP1-CUL1-F-Box-Protein) binden das Substrat-Protein über ein F-Box-Protein, welches über die Proteine SKP1 (*S-phase-kinase-associated protein 1*) und CUL1 mit ROC (*regulator of cullins*) assoziiert ist. Letzteres besitzt das RINGfinger-Motiv zur Bindung des Ubiquitin-beladenen E2-Enzyms (modifiziert aus Pickart, 2004).

I.2.2 Das 26S-Proteasom

Unkontrollierter Proteinabbau würde unweigerlich zur Zerstörung der Zelle führen. Um dies zu verhindern, ist eine stringente Auswahl der Proteine notwendig. In eukaryotischen Zellen haben sich im Laufe der Evolution zwei proteolytische Systeme, das Endosom-Lysosom System und das Ubiquitin-Proteasom System, ausgebildet, die diese Selektivität auf unterschiedliche Weise gewährleisten. Im Endosom-Lysosom System wird die Proteolyse auf abgeschlossene Zellorganellen, den Lysosomen, beschränkt. Lysosome besitzen die höchste Konzentration an proteolytischen Enzymen innerhalb einer Zelle und sind Abbauorte für extrazelluläre Proteine und Proteine der Plasmamembran, die spezifisch über Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. Der Abbau zytoplasmatischer Proteine durch lysosomale Proteasen erfolgt durch Autophagozytose (Knop *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 2012). Daneben

sind Lysosomen auch für den selektiven Abbau eines geringen Prozentsatzes intrazellulärer Proteine, die ein spezifisches Degradationssignal in ihrer Aminosäuresequenz enthalten, verantwortlich (Cuervo und Dice, 1997). Das Ubiquitin-Proteasom System hingegen ist für eine Ubiquitin-abhängige Degradation von Proteinen im eukaryotischen Zytoplasma (Rock *et al.*, 1994), Nukleus (Hershko und Ciechanover, 1998) und endoplasmatischem Retikulum (Plempner und Wolf, 1999) verantwortlich. Ubiquitin-markierte Proteine werden in einem ATP-abhängigen Mechanismus in kleine Peptide und freies Ubiquitin prozessiert (Komander *et al.*, 2012). Das 26S-Proteasom, ein ~2,5 MDa großer Protein-Komplex, besteht aus dem 20S Proteasom, das die proteolytisch aktiven Untereinheiten enthält und dem 19S regulatorischen Komplex, der in Anwesenheit von ATP an ein oder beiden Enden des 20S Proteasoms bindet (Abb. I.3) (Tanaka *et al.*, 2012). Die ~700 kDa großen 20S Proteasomen bestehen aus 7 verschiedenen α - und 7 verschiedenen β -Untereinheiten. Der Komplex ist aus vier heptameren Ringen (α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7) aufgebaut. Die beiden äußeren Ringe des Enzym-Komplexes werden aus den 7 α -Untereinheiten gebildet und die zwei inneren Ringe sind aus den 7 β -Untereinheiten (Kopp *et al.*, 1993; Lupas *et al.*, 1993; Groll *et al.*, 2011) zusammengesetzt. 20S Proteasome können Peptide und entfaltete Proteine hydrolysieren, sind alleine aber nicht zum Abbau gefalteter Proteine befähigt (Pickering *et al.*, 2012).

Die Auswahl und Vorbereitung der Proteine für den Abbau geschieht demnach also durch die regulatorischen 19S Komplexe. Der regulatorische 19S Komplex, auch *Lid* (Deckel) genannt, ist für eine spezifische Erkennung des zum Abbau bestimmten Substrats unerlässlich. Die wichtigsten Komponenten des *Lid*-Komplexes sind 6 homologe ATPasen, welche an der Entfaltung des Substrates und dessen Translokation in den 20S Partikel beteiligt sind (Pickart, 2004; Tanaka *et al.*, 2012). Des Weiteren zeigt der 19S Komplex eine Isopeptidaseaktivität (Lam *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 2011), durch welche die Ubiquitine der Abbausignale abgespalten werden können.

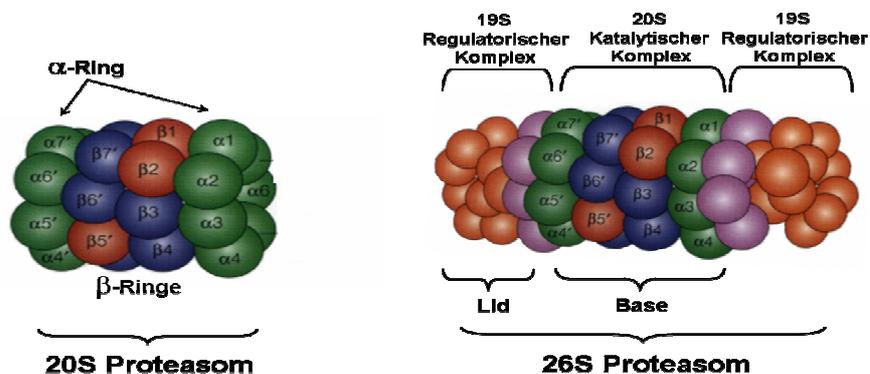


Abbildung I.3 3D-Modell vom Aufbau eines 26S-Proteasoms.

Links. 3D-Modell des katalytischen Komplexes, das 20S Proteasom. In grün dargestellt sind die 7 α -Untereinheiten, in blau und rot die 7 verschiedenen β -Untereinheiten, wobei die Ringstruktur (Pfeile) der zusammen gelagerten α - bzw. β - Untereinheiten und die Gesamtform des Komplexes veranschaulicht werden. Rot hervorgehobene β -Untereinheiten ($\beta_1, \beta_2, \beta_5$) weisen eine katalytische Aktivität auf. **Rechts.** 3D-Modell des gesamten Komplexes, das 26S-Proteasom. Im Zentrum dargestellt sind die α - und β -Ringe des 20S Kern-Komplexes (Base). Die 19S Regulatoren (*Lid*) bestehen aus 2 Sub-Komplexen. *Orange:* die 9 nicht-ATPase-Untereinheiten des „Lid“-Sub-Komplexes, der für die Substratbindung von Bedeutung ist. *Violett:* abgebildet sind die Triple-A (AAA-) ATPase-Untereinheiten, welche mit weiteren Proteinen den „Base“-Sub-Komplex formieren. Deutlich wird die Symmetrie des Komplexes aus 19S- und 20S- zum 26S-Proteasom (modifiziert aus Kloetzel, 2001).

Isolierte 26S-Proteasomen aus *Drosophila* (Walz *et al.*, 1998), *Xenopus* (Peters *et al.*, 1993), Rattenleber (Yoshimura *et al.*, 1993) und Spinat (Fujinami *et al.*, 1994) sehen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen ähnlich aus. Die Gesamtlänge der 26S-Proteasomen beträgt ungefähr 45 nm, ihre Breite 20 nm. Die an den Seiten des zylinderförmigen 20S Proteasoms assoziierten regulatorischen 19S Komplexe sind asymmetrische Komplexe, deren Form an die Köpfe chinesischer Drachen erinnern („*Chinese dragon head motif*“) (Beal *et al.*, 1998).

I.2.3 Physiologische Funktionen der Ubiquitinierung in der Zelle

Das Proteasom-System ist in der proteolytischen Degradierung von Regulatoren oder Ziel-Proteinen maßgeblich involviert und ist somit für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase essentiell. Die Aktivität(en) oder Stabilität vieler Proteine werden über den Abbau des Proteins reguliert. Anfänglich wurde vermutet, dass das Proteasom als eine Art zelluläre „Müllabfuhr“ tätig ist. Die Wissenschaft der letzten zwei Dekaden zeigte jedoch, dass die Proteindegradation über den proteasomalen Abbauweg gerade bei den kurzlebigen Proteinen aus Zellzyklus, Zellwachstum und Zelldifferenzierung eine bedeutende Rolle spielt. Die Ubiquitin vermittelte Proteolyse ist außerdem für den Abbau geschädigter oder mutierter Proteine verantwortlich, wie sie unter Stressbedingungen wie Hitzeschock oder Sauerstoffmangel entstehen (Finley *et al.*, 1987; Grune *et al.*, 2003). Der selektive Abbau falsch gefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum wird durch so genannte ERAD-Prozesse (*ER associated degradation*) eingeleitet und ins Zytoplasma zur Eliminierung dirigiert (Sommer und Wolf, 1997; Goder, 2012). Neben einer vollständigen Proteolyse, spielt das Proteasom auch eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von Proteinen. So wurde beispielsweise für den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) beschrieben, dass eine Prozessierung des inaktiv synthetisierten Vorläuferproteins (p105), zu einer 50 kDa aktiven Form führt (Lin *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2012). Ein vollständiger Abbau des p105-Vorläuferproteins wird hierbei durch eine N-terminale, hochstabile *Rel homology domain*

verhindert (Lin und Kobayashi, 2003; Kanarek *et al.*, 2012). Außerdem ist das Proteasom in der Prozessierung viraler Antigene und daher für eine Abwehr viraler Infektionen sehr wichtig (Jonathan *et al.*, 1999; Stoltze *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2011). In eukaryotischen Organismen werden beispielsweise Zellteilungen von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) strengstens reguliert. Durch eine Bindung von entsprechenden Cyclinen (Aktivatoren), kommt es zu einem zeitlich koordinierten Abbau (Zavrski *et al.*, 2005).

Andere Forschungsergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Genexpression und dem Proteasom hin. In Eukaryoten ist die Genexpression ein streng kontrollierter Prozess. Transkriptionsfaktoren, als kurzlebige Proteine, könnten bei einem Überschuss letale Folgen für eine Zelle haben (Hochstrasser und Kornitzer, 1998; Liu *et al.*, 2012). Indem das Proteasom den Umsatz dieser Transkriptionsfaktoren und anderer an der Transkription beteiligter Proteine (Kofaktoren) durch zeitgenaue Degradation kontrolliert (Lipford *et al.*, 2003; Geng *et al.*, 2012), spielt es eine wichtige Rolle für die Transkription (Reid *et al.*, 2003; Geng *et al.*, 2012). So werden die Transkriptionsfaktoren p53 oder Östrogen-Rezeptor α (ER α) vollständig durch das Proteasom abgebaut. Durch eine Polyubiquitinierung, vermittelt durch die E3-RING-Ligase Mdm2 (*Murine double-minute protein 2*), kommt es zum Abbau von p53. Somit wird die Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase und die Apoptose der Zellen durch p53-Aktivität verhindert, was im Falle von DNA-Schädigung verheerende Folgen hat (Hilt, 2004). Für den ligandenabhängigen ER α wurde gezeigt, dass eine Polyubiquitinierung für die Transaktivierung von Zielgenen von entscheidender Bedeutung ist (Nawaz *et al.*, 2003).

Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren kann allerdings auch indirekt auf Grundlage eines Abbaus von Kofaktoren erfolgen. Die beiden homologen CLIM1/Ldb2- und CLIM2/NLI/Ldb1-Proteine sind Bestandteile von Multiprotein-Komplexen, die verschiedene Transkriptionsfaktoren wie LIM-Homöodomänen-, bHLH-, GATA-, und Otx-Transkriptionsfaktoren enthalten können. Sie bilden Homodimere, was für ihre Funktion als positive Koregulatoren vor allem für LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD) äußerst wichtig ist (Agulnick *et al.*, 1996; Jurata *et al.*, 1996, 1997; Bach *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Narkis *et al.*, 2012). In diesem System konnte für die RINGfinger Ubiquitin-Ligase RLIM eine Funktion als negativer Regulator der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren aufgezeigt werden (Bach *et al.*, 1999). Der Mechanismus des negativen Einflusses von RLIM wurde verstanden, nachdem dem RLIM-Protein eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität zugewiesen werden konnte. So war es möglich die CLIM Kofaktoren als Substrat-Proteine zu identifizieren, die von RLIM für den proteasomalen

Abbau markiert werden, wodurch wiederum die von CLIM vermittelte Aktivität der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren verringert wird (Ostendorff *et al.*, 2002). Diese vielfältigen Funktionen des Proteasoms bestätigen demnach ein großes Interesse an der Entwicklung neuer Proteasom-Hemmer als Therapieoption für die Behandlung maligner Erkrankungen oder chronischer Entzündungen (Mujtaba *et al.*, 2011). So konnte bereits gezeigt werden, dass maligne Zellen sensibler auf eine Proteasomhemmung reagieren als normale Zellen. Die spezifische Hemmung seiner proteolytischen Aktivitäten ruft eine Vielzahl wünschenswerter, therapeutisch relevanter Effekte hervor. Beispielsweise führt die Inhibition des Apoptose einleitenden Proteins Bcl-2, zu einer längeren Lebensdauer der Zellen (Patingre und Levine, 2006). Weiterhin wird der Abbau von I κ B, des natürlichen zellulären Inhibitors des Transkriptionsfaktors NF κ B, unterbunden, wodurch verhindert wird das NF κ B in den Zellkern translokiert und dort zahlreiche Gene aktiviert, welche für die Vermehrung und Anheftung von Krebszellen wichtig sind (Lin und Kobayashi, 2003). Das einzige bisher zugelassene Arzneimittel ist der Proteasomhemmer Velcade[®] (oder Bortezomib); eine vielversprechende Substanzklasse, die sich wahrscheinlich in den nächsten Jahren zu einer neuen Säule der Tumorthherapie entwickeln wird.

1.3 LIM-Proteine

Die Familie der LIM-Proteine ist eine große und sehr diverse Gruppe von Proteinen, deren gemeinsames Merkmal eine oder mehrere LIM-Domänen darstellen. LIM-Proteine sind beteiligt an der Ausbildung von Zellidentität, Zelldifferenzierung und der Kontrolle von Zellwachstum (Dawid *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2012; Järvinen *et al.*, 2012). Der Name bezieht sich auf die drei zuerst entdeckten und für LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD-Proteine) kodierenden Gene **Lin11**, **Isl1** und **Mec-3**. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass LIM-Proteine sowohl in Hefe als auch in tierischen und pflanzlichen Organismen vorkommen (Liebhaber *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2007).

LIM-Domänen sind Doppel-Zink-*finger*-Strukturen, welche zwar strukturell dem Zink-*finger* vom GATA-Typ (Perez-Alvarado *et al.*, 1994) ähnlich sind, binden jedoch im Gegensatz zu diesen keine DNA, sondern sind als Protein-Protein Interaktionsdomäne bekannt (Schmeichel und Beckerle, 1994; Bach *et al.*, 2000). Der so genannte Zink-*finger* erhielt seinen Namen, da dieses Protein über zwei Histidin- und zwei Cysteinreste tetraedrisch koordiniert, einen Komplex mit einem zentralen Zinkatom bildet und dadurch räumlich eine fingerähnliche Form erhält (Sanchez-Garcia und Rabbits, 1994; Dawid *et al.*, 1998; Kadmas und Beckerle, 2004). Sie ist eine Cystein-reiche Region aus zwei Zink-*finger*, die durch einen Abstand von 2

Aminosäuren getrennt ist $(xxCxxCx_{17-19}Hxx CxxCxxCx_{16-20}Cxx[D/H/C]x)$ (Freyd *et al.*, 1990; Dawid *et al.*, 1995; Jurata und Gill, 1997). Der Mensch besitzt mindestens 135 identifizierte LIM-kodierende Sequenzen, die auf insgesamt 58 Gene verteilt sind (Kadrmaz und Beckerle, 2004). Neben LIM-Domänen können LIM-Proteine noch andere funktionelle Domänen enthalten.

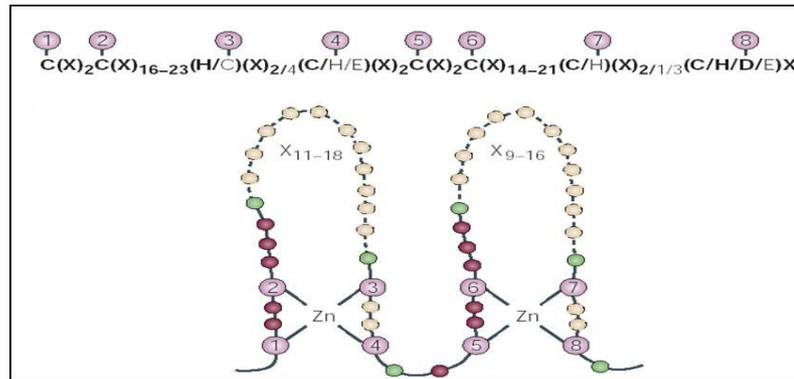


Abbildung I.4 Die LIM-Domäne.

Dargestellt ist die Doppel-Zink-finger-Struktur wie sie für LIM-Domänen beschrieben ist. Die 8 konservierten Zink-Ionen-bindenden Aminosäuren sind hervorgehoben (1-8). X steht für jede beliebige Aminosäure. Die Topologie einer LIM-Domäne durch die Koordination zweier Zink-Ionen, ist ein Tandem von zwei Zink-finger. Grüne Markierung deutet auf aliphatische Aminosäuren hin die semi-konserviert sind, während dunkelrot markierte Aminosäuren, invariante Positionen haben aber nicht konserviert sind. Gelb markiert sind nicht konservierte Positionen, die in ihrer Zahl variabel sind. (Aus Kadrmaz und Beckerle, 2004.)

Aufgrund der hohen Diversität der Proteine ist es schwierig sie zu klassifizieren. Es gibt unterschiedliche Modelle, die sich entweder an der Sequenzhomologie der LIM-Domänen, der Gesamtstruktur oder an anderen in den Proteinen vorhandenen funktionellen Domänen orientieren. Im Wesentlichen gibt es vier verschiedene Typen von LIM-Domänen (A-D). Dazu kommen wenige Ausnahmen, die in diesem Modell nicht unterzubringen sind (Dawid *et al.*, 1995). LIM-Proteine werden in drei Gruppen unterteilt (Dawid *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2007). LIM-Proteine der Gruppe 1 enthalten LIM-Domänen des A- oder B-Typs, die als Tandem-Wiederholungen vorkommen (Dawid *et al.*, 1998). Hierzu zählen LIM-HD-Proteine, nukleäre LIM-only-Proteine (LMOs) und LIM-Kinasen (LIMKs). Mit Ausnahme der LIMKs befinden sich diese Proteine primär im Zellkern.

Bei LIM-Proteinen der Gruppe 2 handelt es sich um vorwiegend zytoplasmatische Proteine, die außer LIM-Domänen, keine anderen funktionellen Domänen aufweisen. Die LIM-Domänen dieser Klasse gehören zum Typ C (Dawid *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2007).

Die dritte Gruppe von LIM-Proteinen ist am wenigsten homogen und umfasst meist Proteine mit LIM-Domänen des D-Typs. Auch die Proteine dieser Gruppe sind vorwiegend zytoplasmatisch.

I.3.1 Nukleäre LIM-Proteine

LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren enthalten neben den beiden LIM-Domänen, die familientypische DNA bindende Homöodomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Die tandemartig wiederholten LIM-Domänen liegen im N-terminalen Teil der Proteine, während die Transaktivierungsdomäne C-terminal lokalisiert ist. Ein gemeinsames Merkmal aller LIM-HD-Proteine (Hox-, POU-, Pax und LIM-), ist die hochkonservierte und etwa 60 Aminosäuren lange Homöo-Box. Sie beinhaltet ein so genanntes Helix-*turn*-Helix-Motiv, in dem Helix 1 und Helix 2 antiparallel angeordnet sind, während die dritte Helix dazwischen liegt und an die große Furche der DNA bindet. Zusätzlich kommt es durch den N-terminal vor der ersten Helix gelegenen Teil, zu einer Bindung der kleinen Furche der DNA.

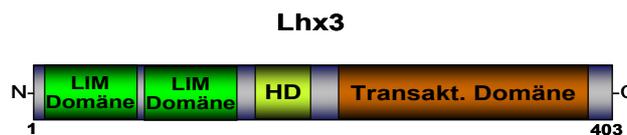


Abbildung I.5 Der LIM-HD-Transkriptionsfaktor Lhx3

Hervorgehoben sind Protein-Domänen farblich: Ziffern weisen auf jeweilige Aminosäuren hin. N-terminal zwei LIM-Domänen (Grün) gefolgt von der Homöodomäne (HD) zur DNA-Bindung (Gelb), C-terminal die Transaktivierungs-Domäne (Braun).

LIM-HD-Transkriptionsfaktoren spielen eine fundamentale Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, wie z.B. der Organogenese und der neuronalen Entwicklung (Hobert und Westphal, 2000; Bach, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass sie z.B. in der axonalen Projektion von Neuronen eine übergeordnete Rolle spielen, aber auch die Differenzierung einzelner Neuronenpopulationen (z.B. Motoneurone und V2 Interneurone) aus neuronalen Stammzellen spezifisch steuern (Sharma *et al.*, 1998; Kania *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2011; Hoekstra *et al.*, 2013). Des Weiteren sind LIM-HD-Transkriptionsfaktoren auch an der Entwicklung der Hypophyse (z.B. Lhx3), des pankreatischen Mesenchyms sowie der *Islet*-Zellen (z.B. Isl1 und Isl2) und an der Erythropoese beteiligt (Pfaff *et al.*, 1996; Ahlgren, 1997; Porter *et al.*, 1997). Lhx3^{-/-} *knockout* Mäuse fehlen beispielsweise sowohl Vorder- als auch Intermediärlappen der Hypophyse und weisen somit enorme Störungen der Hirnstammfunktionen auf. Sie sterben entweder bereits bei Geburt oder spätestens 24 Stunden danach (Sheng *et al.*, 1996). In Lhx2^{-/-} *knockout* Mäusen kommt es zu Frontalhirndefekten,

dem Fehlen von Augen, einer gestörten Erythropoese und einer embryonalen Lethargie (Porter *et al.*, 1997).

Weiterhin können LIM-HD-Proteine in ihrem Expressionsmuster während der Embryogenese räumlich und zeitlich überlappen. Für die Aktivität der LIM-HD-Proteine ist eine Interaktion mittels LIM-Domäne und den nukleären Adaptor-Proteinen der CLIM/Ldb-Familie von entscheidender Bedeutung. CLIM-Proteine werden daher ausführlicher im nächsten Kapitel eingeleitet.

LMO-Proteine (LIM *only*-) sind die kleinsten LIM-Proteine und bestehen vorwiegend aus zwei tandemartig angeordneten LIM-Domänen (Jurata und Gill, 1998; Matthews *et al.*, 2013). Neben den zwei LIM-Domänen besitzen sie keine weiteren funktionellen Domänen. Obwohl sie vorwiegend im Kern lokalisiert sind, können sie nicht direkt DNA binden. Mittels der LIM-Domäne vermitteln sie ihre modulatorische und regulierende Aktivität als molekulare Adaptoren auf spezifischen Zielgenpromotoren (Jurata und Gill, 1998; Matthews *et al.*, 2013). LMO-Proteine (LMO1-4) sind maßgeblich am Aufbau von Protein-Komplexen beteiligt, indem sie andere Proteine oder Faktoren rekrutieren, binden und am Komplexaufbau teilnehmen lassen (Lee und Young, 2000). LMO-Proteine sind während der Embryogenese von entwicklungsbiologischer Bedeutung. So ist beispielsweise LMO2 essentiell für die embryonale Erythropoese (Rabbitts, 1998). Es konnte für LMO2 gezeigt werden, dass es gemeinsam im Komplex mit CLIM2/Ldb1 fähig ist, in hämatopoetischen Stammzellen synchron die Transkriptionsfaktoren TAL1, E2A und GATA1 zu binden, wodurch die spezifische Genexpression für die Hämatopoese aktiviert wird (Cantor und Orkin, 2001; Kadrmas und Beckerle, 2004). LMO2^{-/-} *knockout* Mäuse sind embryonal letal, da keine reifen Erythrozyten entwickelt werden können (Warren *et al.*, 1994).

LMO-Proteine wurden außerdem als Onkogene identifiziert (Rabbitts, 1998; Bach, 2000; Lee und Pfaff, 2001; Matthews *et al.*, 2013). Die Gene von LMO1 und LMO2 wurden erstmalig aufgrund ihres Vorkommens in chromosomalen Translokationsbruchstellen bei Patienten mit T-Zell-Leukämie entdeckt. Diese Translokationen führen zu einer stark erhöhten Expression von LMO1 und LMO2 im Thymus und in T-Zellen, also in Geweben in denen beide LMO-Proteine normalerweise nur in geringen Mengen exprimiert werden.

Eine Überexpression von LMO1 oder LMO2 im Thymus von transgenen Tieren führt darüber hinaus zu einer Transformation der T-Zellen (Larson *et al.*, 1995; Larson *et al.*, 1996). Zusätzlich konnten die LIM-Proteine LMO3 und LMO4 identifiziert werden. LMO3 ist beispielsweise in Neuroblastom-Zellen stark exprimiert (Aoyama *et al.*, 2005). Für LMO4 konnte gezeigt werden, dass es in Brustkrebszellen häufig überexprimiert ist und diese

Überexpression zur Inhibition der Differenzierung von Brustepithelzellen führt (Visvader *et al.*, 2001). So scheint es, dass es in allen Fällen einer Deregulation der Expression von LMO-Proteinen, zu einer Tumorgenese kommt (Matthews *et al.*, 2013).

I.4 CLIM Kofaktoren

Die CLIM-Kofaktorfamilie (*cofactors of LIM-HD-proteins*) besteht in Säugern aus CLIM1/Ldb2 und CLIM2/NLI/Ldb1 (Agulnick *et al.*, 1996; Jurata *et al.*, 1996; Bach *et al.*, 1997; Kiefer *et al.*, 2011). Beide Proteine sind zu 75% homolog und während die CLIM2-mRNA ubiquitär exprimiert wird, findet man eine CLIM1-mRNA Expression vorwiegend neuronal und in der Lunge (Bach *et al.*, 1997). Des Weiteren erkennt unser eigens generierter und polyklonale CLIM-Antikörper beide Moleküle. Zur Vereinfachung werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit für Projekt I, beide Moleküle als CLIM-Proteine bezeichnet. In Projekt II, welches sich mit der Analyse und Funktion der CLIM Kofaktoren in Brustkrebs beschäftigt, konnte lediglich eine CLIM2-mRNA Expression detektiert werden, so dass in Projekt II ausschließlich von CLIM2 gesprochen wird. Diese nukleäre Proteinfamilie ist von *Drosophila* (CLIM-Homolog CHIP) bis zum Menschen hoch konserviert und ubiquitär exprimiert. CLIM-Proteine sind Bestandteile von Multiprotein-Komplexen, die neben LIM-HD- auch bHLH- GATA- oder Otx-Transkriptionsfaktoren enthalten können (Bach *et al.*, 1997; Wadman *et al.*, 1997; Kiefer *et al.*, 2011). Mittels einer N-terminalen Dimerisierungsdomäne bilden CLIM-Proteine Homodimere (Jurata *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2013). Die C-terminale LIM-Interaktionsdomäne (LID) befähigt sie zur Bindung von LIM-Domänen (beispielsweise von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren) und zur Bildung eines tetrameren Komplexes aus je zwei CLIM- und LIM-HD-Proteinen (Abb. I.6). Hierbei bewirken CLIM-Proteine eine positive Koregulation in der von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren eingeleiteten Genexpression (Bach *et al.*, 2000; Wilkinson-White *et al.*, 2011). Diese Positivität wird dadurch erklärt, dass durch die Ausbildung eines Homöodomänen-Tandems, *Enhancer*- und Promoter-Elemente von DNA-Sequenzen gleichzeitig gebunden werden und somit die Transkription erfolgreich eingeleitet werden kann (Sharma *et al.*, 1998; Thaler *et al.*, 2002; Wilkinson-White *et al.*, 2011). Viele *Enhancer*- und Promotor-Elemente eines Genes liegen nicht selten einige 100 Kilobasen voneinander entfernt. Daher spielt die Formation von DNA gebundenen Multiprotein-Komplexen eine wichtige Rolle in der koordinierten Durchführung der Genexpression. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass das LIM-HD-Protein Apterous durch die Deletion der LIM-Domäne seine Funktionalität verliert, was zu einer gestörten dorso-ventralen

Entwicklung der Flügel führt. Wurde aber die LIM-Domäne von Apterous durch die Dimerisierungsdomäne von CHIP (CLIM-Homolog) ersetzt, so entwickelten sich die Flügel normal (Fernandez-Funez *et al.*, 1998; Milan und Cohen 1999; van Meyel *et al.*, 1999; Bronstein *et al.*, 2010). Diese Beobachtung zeigt, dass die Funktion von CLIM als Kofaktor der LIM-HD-Proteine auf der Fähigkeit zur Dimerisierung beruht (siehe Abb. I.6).

Außerdem scheint die Menge an vorhandenen CLIM-Proteinen wichtig für die Aktivität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren zu sein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dominant-negativer CLIM-Proteine, denen die Dimerisierungsdomäne fehlt, in Zebrafischen zu ähnlich gravierenden Phänotypen führt, wie sie in *Lhx2^{-/-} knockout* Mäusen beobachtet werden konnten. Diese beinhalteten Augendefekte bis hin zum fast vollständigen Verlust von Augen, Defekte in der Entwicklung der Grenzstruktur zwischen Stamm- und Hinterhirn und Defekte in der Entwicklung bestimmter Neurone (Porter *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2002). Die *CLIM2^{-/-} knockout* Maus zeigte allerdings ein weitaus größeres Spektrum an Phänotypen. Sie ist ab dem Embryonaltag 9,5-10,5 nicht mehr lebensfähig. So führt eine Deletion des CLIM2 Gens zu enormen Fehlentwicklungen während der Gastrulation. Es zeigten sich verschiedenste embryonale Entwicklungsstörungen, wie etwa das Fehlen des Herzens und bestimmter Kopf-Strukturen, sowie der Verlust von einigen Mesoderm abstammenden Strukturen. Weiterhin konnte in erythroiden Zellen der *CLIM2^{-/-} knockout* Mäuse keine Hämatopoese vorgefunden werden (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Dieses breite Spektrum an Phänotypen ist vermutlich auf eine Fehlregulation von diversen CLIM-bindenden Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass das Vorhandensein von CLIM Kofaktoren im Komplex mit Lhx3, eine synergistische Genaktivität auf dem α -GSU-Promotor (Hypophysen-Hormon; α *Glycoprotein-subunit*) bewirkt, während es zu einer inhibitorischen Wirkung im Komplex mit Lmx1 auf dem Insulin-Promoter kommt (Bach *et al.*, 1997; Jurata und Gill, 1997). Andere Forschungsergebnisse zeigten, dass CLIM-Proteine, im Komplex mit LMO2, in hämatopoetischen Stammzellen synchron die Transkriptionsfaktoren TAL1, E2A und GATA1 binden, wodurch die spezifische Genexpression durch eine Formation von Multiprotein-Komplexen für die Hämatopoese aktiviert wird (Cantor und Orkin, 2001; Kadrmas und Beckerle, 2004). Auch scheinen CLIM-Proteine für die Ausbildung reifer Erythrozyten während der Embryogenese unabdinglich zu sein (Li *et al.*, 2010).

Als Adaptoren in Multiprotein-Komplexen spielen CLIM-Proteine eine wichtige Rolle in der Transkription. So konnte parallel zu dieser Arbeit, CDK9 (*cyclin dependent kinase*) als neuer *in vivo* Interaktionspartner identifiziert werden. Es wird vermutet, dass in erythroiden

Vorläuferzellen der CLIM2-CDK9-Komplex an der Aufrechterhaltung der Zellen im proliferierenden Stadium beteiligt ist (Meier *et al.*, 2006). Für CDK9 ist bisher bekannt, dass es die Aktivität der RNA-Polymerase II mittels Phosphorylierung der C-terminalen Domäne reguliert (Marshall *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997), im Zell-Zyklus beteiligt ist (Bettencourt-Dias *et al.*, 2004) und ausserdem die Monoubiquitinierung von Histon 2B begünstigt (Karpiuk *et al.*, 2012). Ein weiterer neuer und wenig charakterisierte Interaktionspartner von CLIM-Proteinen, ist SSDP1 (*single strand DNA binding protein 1*) (Chen *et al.*, 2002). Als ein Koaktivator von CLIM-Proteinen scheint SSDP1 während der embryonalen Entwicklung in *Xenopus* oder *Drosophila* von entscheidender Bedeutung zu sein (van Meyel *et al.*, 2003; Bronstein *et al.*, 2010). Im Vorwege dieser Arbeit konnte, sowohl in unserem Labor als auch in anderen Arbeitsgruppen, SSDP1 als neuer Interaktionspartner von CLIM2 identifiziert werden (Chen *et al.*, 2002, van Meyel *et al.*, 2003). Hierbei interagiert die N-terminale LUFSDomäne (*LUG/LUH, Flo8, single-strand DNA-binding protein*) von SSDP1 mit der LCCDDomäne von CLIM-Proteinen (Abb. I.6).

Es zeigte sich, dass SSDP1 als ein weiteres Mitglied des LIM-HD Transkriptionsnetzwerkes, eine wichtige Rolle spielt und SSDP1^{-/-} *knockout* Mäuse zu gleichen gravierenden Phänotypen führen, wie sie bereits für CLIM2^{-/-} *knockout* Mäuse beschrieben worden sind. Auch hier zeigten sich enorme embryonale Entwicklungsstörungen, welche ebenfalls zur frühen Letalität führen. Verbunden ist diese Letalität mit einer abnormen Entwicklung von Kopfstrukturen (Enkhmandakh *et al.*, 2006).

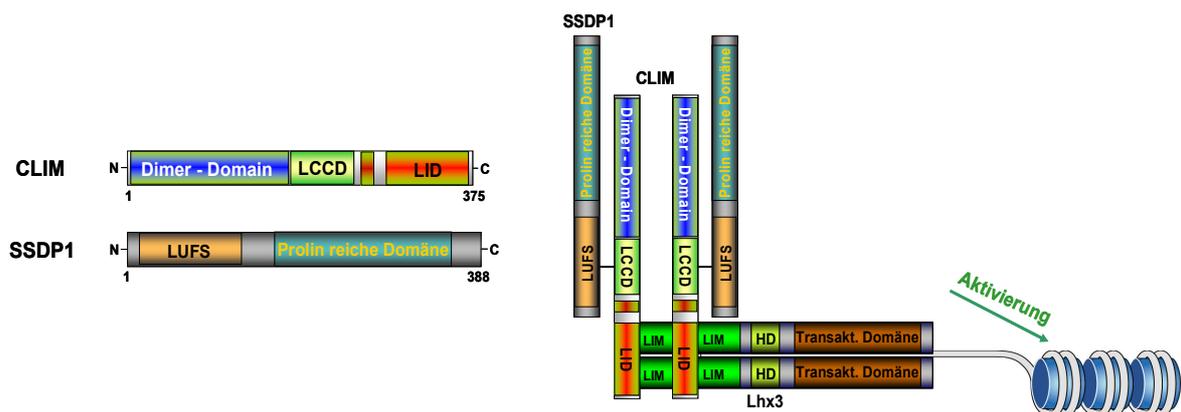


Abbildung I.6. Die Formation von Multiprotein-Komplexen mittels CLIM-Proteine.

Links. Dargestellt sind die Protein-Domänen von CLIM- und SSDP1-Proteinen. Ziffern weisen auf jeweilige Aminosäuren hin. CLIM: N-terminal die Dimer(isierungs)-Domäne (Blau), gefolgt von der LCCD-Domäne (*Ldb/Chip conserved domain*) (Gelb), und der C-terminalen LIM-Interaktions-Domäne (LID) (Rot). SSDP1: N-terminal die LUFSDomäne (Orange), gefolgt von der Prolin-reichen-Domäne (PRD; *proline-rich-domain*) (Blau). **Rechts.** Dargestellt ist ein Modell für die CLIM vermittelte Formation von Multiprotein-Komplexen auf DNA. Bildung eines tetrameren Komplexes aus je zwei CLIM-Proteinen und je zwei LIM-HD-Transkriptionsfaktoren. Hierbei interagiert die LID-Domäne von CLIM mit der LIM-Domäne von LIM-HD-Proteinen.

Erst die Interaktion von SSDP1 mit CLIM, führt zur Transaktivierung der Genexpression. Hierbei interagiert die LUF5-Domäne von SSDP1 mit der LCCD-Domäne von CLIM.

1.5 RLIM, ein weiterer Kofaktor des LIM-Systems

Ein weiterer Kofaktor des LIM-Systems ist das Protein RLIM (*RINGfinger LIM-domain binding protein*). In Maus und Mensch kodiert das X-chromosomale Rnf12 Gen für das 600 Aminosäuren große RLIM Protein. Das murine RLIM zeichnet sich durch eine C-terminale RINGfinger-Domäne aus, in der zwei Zinkatome von je vier Aminosäureresten koordiniert werden. Für das RINGfinger-Motiv (40-60 AS) wurde folgende Konsensus-Sequenz mit 8 Zn²⁺-bindenden Resten ermittelt: CX₂CX₉₋₃₉C₁₋₃HX₂₋₃C/HX₂CX₄₋₄₈CX₂C (Freemont, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000; Budhidarmo *et al.*, 2012). Befindet sich, wie im Falle von RLIM, an der fünften Zink-bindenden Position ein Histidin-Rest anstelle eines Cystein-Restes, so handelt es sich um ein so genanntes RING-H₂-Motiv. Als eine weitere wichtige Komponente des LIM-Systems, konnte RLIM auf der Grundlage einer Interaktion mit Lhx3 identifiziert werden. Darüber hinaus bindet es ebenfalls nukleäre LMO-Proteine sowie den Kofaktor CLIM. Zu zytoplasmatischen LIM-Proteinen zeigt es allerdings nur eine sehr schwache bis gar keine Affinität (Bach *et al.*, 1999). Durch weitere Analysen stellte sich heraus, dass sowohl das mRNA- als auch das Protein-Expressionsmuster von RLIM, dem von CLIM fast identisch sind. Beide sind stark in Geweben wie Gehirn oder Neuralrohr exprimiert. (Bach *et al.*, 1999; Ostendorff *et al.*, 2006). Des Weiteren sind in diesen Geweben LIM-HD-Proteine an der Entwicklung bestimmter Strukturen, wie z.B. den Motorneuronen des Neuralrohres, beteiligt. So konnten durch *in vivo* Experimente in Hühnerembryonen, weitere Aufschlüsse über die Funktion von RLIM gegeben werden. Eine Überexpression von RLIM führte zu Defekten in der Flügelentwicklung der Embryonen. Dieser Phänotyp entsprach dem, wie er bis dahin für eine Überexpression von dominant-negativen CLIM-Proteinen oder einer Inhibierung von Lhx2 beobachtet worden ist. Diese Ergebnisse deuteten auf eine *in vivo* Funktion von RLIM als negativer Regulator von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren hin. Eine transiente Kotransfektion mit den LIM-HD-Transkriptionsfaktoren Lhx2 oder Lhx3, mündete in eine Inhibition der Transaktivierung von Zielgenen. Die Rekrutierung der Histondeacetylase HDAC2/Sin3A zum Transkriptionsfaktor-Komplex mittels RLIM, schien eine mögliche Ursache dieser Inhibition zu sein (Bach *et al.*, 1999).

Die Entdeckung unseres Labors von RLIM als Ubiquitin-Ligase, ermöglichte die Einsicht in einen weiteren inhibitorischen Mechanismus im LIM-HD-Proteinnetzwerk. Neben der Fähigkeit zur Autoubiquitinierung (Selbst-Ubiquitinierung), ist RLIM auch in der Lage die Polyubiquitinierung von CLIM-Proteinen *in vitro* und *in vivo* zu vermitteln und diese somit für den proteasomalen Abbau zu markieren. CLIM Kofaktoren sind für die Aktivität der LIM-

HD-Proteine besonders wichtig. Durch den Abbau von CLIM Kofaktoren, entfaltet RLIM seine Funktion als negativer Regulator der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren (Ostendorff *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte RLIM in unserer Arbeitsgruppe erst kürzlich als unerlässlich für den Vorgang der X-chromosomalen Inaktivierung während der Maus-Embryogenese identifiziert werden (Shin *et al.*, 2010). Ausserdem steuert RLIM die Differenzierung von alveolären Epithelzellen und somit die Milchproduktion in der Brustdrüse von schwangeren Mäusen (Jiao *et al.*, 2012).

I.6 Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren

Die nukleären Rezeptoren bilden eine Superfamilie von Transkriptionsfaktoren, die für Entwicklung, Differenzierung und Homöostase eine wichtige Rolle spielen (Evans, 1988; Gronemeyer und Laudet, 1995; Mangelsdorf und Evans, 1995; Norman *et al.*, 2004). Viele dieser Proteine sind ligandenabhängige und aktivierbare Transkriptionsfaktoren deren Hauptaufgabe es ist, spezifisch die Transkription von Zielgenen zu regulieren, in dem sie an spezifische Erkennungssequenzen in deren Promotorbereich, so genannte *Response Elements*, binden (McEwan *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2012). Dieses kann als Monomer, meist aber als Hetero- oder Homodimer erfolgen. Nukleäre Rezeptoren bilden somit die direkte Verbindung zwischen extrazellulären hormonellen Signalwegen und transkriptionellen Antworten.

Mittlerweile repräsentiert die Familie der ligandenabhängigen Steroid-Rezeptoren, die größte bekannte Gruppe der Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten (Chang *et al.*, 1988; Becker-Andre *et al.*, 1993; Norman *et al.*, 2004). Bisher wurden weit über 300 verschiedene nukleäre Rezeptoren identifiziert (Auwerx *et al.*, 1999; Norman *et al.*, 2004). Sie lassen sich nach der internationalen Nomenklatur in drei evolutionär und funktionell unterschiedliche Hauptgruppen unterteilen. Die Typ I-Rezeptoren (Steroid-Rezeptoren) beinhalten die Rezeptoren für die „klassischen Steroide“ wie den Östrogen-, Progesteron-, Androgen-, Glukokortikoid- und Mineralkortikoid-Rezeptor. Zu Typ II-Rezeptoren (Nicht-Steroid-Rezeptoren) gehören der Schilddrüsenhormon-Rezeptor (TR), der all-trans-Retinsäure-Rezeptor (RAR), der 9-cis-Retinsäure-Rezeptor (RXR) und der Vitamin-D₃-Rezeptor (VDR). Eine dritte Gruppe wird von den so genannten Waisen-Rezeptoren (*Orphan*-Rezeptoren) gebildet, für die entweder kein Ligand existiert oder bislang noch keiner identifiziert werden konnte (Enmark und Gustafsson, 1996; McKenna *et al.*, 1999). Für einige dieser Rezeptoren konnte jedoch später ein spezifischer Ligand identifiziert werden. So sind beispielsweise die Liganden für den Benzoat-X-Rezeptor (BXR) (Blumberg und Evans, 1998), den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) (Kozak *et al.*, 1996) und den humanen Pregnan-Rezeptor (PAR) (Bertilsson

et al., 1998) mittlerweile bekannt. Hierbei bilden die Rezeptoren der Klasse I größtenteils Homodimere, während die der Klasse II sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können. Entgegen früherer Vorstellungen, dass die Steroid-Rezeptoren im Zytoplasma lokalisiert sind, haben immunhistochemische Untersuchungen gezeigt, dass beispielsweise Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Die unbesetzten Rezeptoren werden von Hitzeschock-Proteinen stabilisiert und sind locker mit dem Nukleus assoziiert (Chrousos *et al.*, 1984; Norman *et al.*, 2004).

Aufgrund von Sequenzhomologien und funktionalen Analysen konnte gezeigt werden, dass allen Mitgliedern der nukleären Superfamilie eine modulare Struktur gemeinsam ist, welche sich in 5 verschiedene Domänen bzw. Regionen unterteilen lässt (Abb. I.7) (Krust *et al.*, 1986; Khan *et al.*, 2012). Eine variable N-terminale A/B Domäne, eine DNA-Bindungsdomäne (C), eine Scharnierregion (D), eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (E), gefolgt von einer wenig konservierten Domäne (F). Diesen Domänen lassen sich bestimmte Funktionen der Rezeptoren zuweisen:



Abbildung I.7 Schematischer Aufbau der Superfamilie der nukleären Rezeptoren am Beispiel von ER α .

Alle Mitglieder der Superfamilie der nukleären Rezeptoren besitzen eine ähnliche Domänen-Struktur, bestehend aus einer Transaktivierungsdomäne (A/B), einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) (C), einer Scharnierdomäne (*Hinge*) und Kernlokalisierungssignal (NLS) (D), einer Ligandenbindungsdomäne (LBD) (E) und einer wenig konservierten Domäne (F).

Die N-terminale A/B-Domäne (AF1) ist jener Proteinbereich der nukleären Rezeptoren, welcher die größte Variabilität aufweist. Sie ist in der Regel für eine Transaktivierung von hormonregulierten Genen durch Interaktion mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und für die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren verantwortlich (Giguere *et al.*, 1986; Tora *et al.*, 1989; Khan *et al.*, 2012). Rezeptor-Isoformen, welche den gleichen Liganden binden, unterscheiden sich oft nur in diesem Bereich. Dennoch können solche Isoformen oftmals unterschiedliche Gene aktivieren (Keightley, 1998; Kumar *et al.*, 2010).

Die darauf folgende Domäne C oder DNA-Bindungsdomäne ist für die spezifische Interaktion mit dem jeweiligen *Response Element* verantwortlich. Sie ist die am höchsten konservierte

Region und beinhaltet zwei Typ II-Zink-*finger*, welche für die DNA Bindung essentiell sind (Luisi *et al.*, 1991; Gronemeyer und Moras, 1995). Die variable Domäne D bildet, als Scharnierregion, die Verbindung zwischen der DNA-Bindungsdomäne und der Ligandenbindungsdomäne. Sie ist für die nukleäre Lokalisation des Rezeptors verantwortlich. Meist enthält sie eine spezifische Sequenz, das so genannte Kernlokalisierungssignal, welche einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren enthält und vom zellulären Kerntransportsystem erkannt wird.

Der Ligandenbindungsdomäne (LBD) E sind in der Regel vier Hauptfunktion zuweisbar: (i) Ligandenbindung; (ii) Aktivierung der Transkription; (iii) Dimerisierung; (iiii) Bindung von Hitze-Schock-Proteinen. Zusätzlich können bei einigen Kern-Rezeptoren, Korepressoren an die E-Domäne binden. Im C-terminalen Bereich ist die ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion AF-2 lokalisiert (Green und Chambon, 1988; Gronemeyer, 1991; Khan *et al.*, 2012). Eine konservierte amphiphatische α -Helix bildet die Kern-Struktur dieser Domäne, die für die liganden-abhängige Interaktion von Koaktivatoren mit der LBD verantwortlich ist (Danielian *et al.*, 1992, Barretino *et al.*, 1994). Über diese Kofaktoren wird die Transkriptionsaktivierung vermittelt. Durch Kristallisationsstudien des nicht ligandengebundenen RXR α und des all-trans Retinsäure gebundenen RAR γ , konnte die Struktur der E-Domäne aufgeklärt werden (Bourguet *et al.*, 1995; Renaud *et al.*, 1995). Sie besteht aus 12 Helices, wobei die Kernstruktur der AF-2 Domäne in Helix 12 liegt, die beim nicht ligandengebundenem Rezeptor von der kompakten Struktur wegzeigt. Der Prozess der Ligandenbindung und Transaktivierung läuft wahrscheinlich folgendermaßen ab: Der Ligand bindet über elektrostatische Wechselwirkungen die Ligandenbindungstasche. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert, die zur Umlagerung der Helix 12 in eine Position führt, was einem Zuklappen des Deckels auf die ligandengebundene Tasche entspricht. Durch diese Konformationsänderung entsteht eine neue Rezeptoroberfläche, die zu einer Rekrutierung und Bindung von Koaktivatoren führt (Wurtz *et al.*, 1996; Osz *et al.*, 2012). Der Sequenzvergleich mit einer Reihe weiterer Mitglieder der Superfamilie der nukleären Rezeptoren, lässt auf eine sehr ähnliche Struktur der Ligandenbindungsdomänen schließen. Die C-terminale F Domäne ist sehr variabel, scheint aber für eine Erhaltung der Rezeptor-Konformation unabdingbar zu sein und fördert außerdem eine effektive Transkriptionsaktivierung (Williams *et al.*, 2009).

I.6.1 Die Steroid-Rezeptoren ER α und ER β

Zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört der im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit stehende ER α bzw. Östrogen-Rezeptor α . Bereits 1968 wurde die Existenz eines Östrogen-bindenden Proteins und eine Genregulation durch hormonelle Kontrolle vermutet (Jensen *et al.*, 1968). Es dauerte allerdings weitere zwei Dekaden bis die Klonierung des dazugehörigen Gens, ER α , vollendet war (Green *et al.*, 1985). Die 1785 Nukleotide der cDNA korrespondieren einem Polypeptid von 595 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 66,2 kDa. Das humane Gen ist auf Chromosom 6 (6q25.1) lokalisiert (Menasce *et al.*, 1993). Weitere 10 Jahre später konnte ein weiterer Rezeptor identifiziert werden, welcher dem ER α sehr ähnlich ist, der ER β -Rezeptor (Mosselman *et al.*, 1996). Das Gen des ER β ist auf Chromosom 14 (14q22-q24) lokalisiert und besteht aus einem Polypeptid von 530 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 59,2 kDa (Enmark *et al.*, 1997). Beide Gene bestehen, wie alle Steroid-Rezeptoren, aus acht Exons. Die beiden Östrogen-Rezeptoren haben allerdings eine Sonderstellung unter den Steroid-Rezeptoren, da sie von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Varianten anderer Steroid-Rezeptoren entstehen durch alternative Transkription/Translation des gleichen Gens (Keightley, 1998; Kumar *et al.*, 2010). Als Östrogen-abhängiger Transkriptionsfaktor stimuliert ER α die Transkription von Zielgenen, welche so genannte *Estrogen Response Elements* (ERE) enthalten. Das Konsensus-ERE ist ein 15 basenpaar großes invertiertes palindromisches Element mit der Konsensussequenz 5`-AGGTCT-XXX-TGACCT-3`. Östrogen, als Ligand, zirkuliert entweder frei im Blut oder ist an Plasma-Carrier wie z.B. *sex hormone binding globulin* (SHBG) gebunden (ca. 95%). Hierbei kann das ungebundene hydrophobe Östrogen vermutlich frei durch Kapillarwand und Zellmembran von Zielzellen diffundieren und gelangt mittels Diffusion über die Kernporen in den Zellkern. Sowohl der ligandengebundene Östrogen-Rezeptor, als auch der freie Östrogen-Rezeptor sind im Zellkern lokalisiert. Solange der Östrogen-Rezeptor keinen Liganden gebunden hat, ist er an einen *Heat shock protein 90* (Hsp90) Chaperonin-Komplex gebunden (Pratt und Toft, 1997). Der Hsp-Komplex dient vermutlich der Stabilisierung der Rezeptorstruktur und dem Schutz vor proteasomalen Abbau. Erst die Bindung von Östrogen an die Ligandenbindungsdomäne, führt zu einer intramolekularen Konformationsänderung, welche die Freisetzung des Hsp-Komplexes bewirkt und somit eine Dimerisierung des Östrogen-Rezeptors ermöglicht (Pike *et al.*, 2000). Der so aktivierte Östrogen-Rezeptor kann sowohl Homo- als auch Heterodimere von ER α und ER β bilden. Anschließend kann der Rezeptordimer an das ERE-Element im

Promotorbereich Östrogen-regulierter Gene zyklisch binden. Der Rezeptor kann hierbei entweder selbst als Transkriptionsfaktor wirken und/oder andere Transkriptionsfaktoren zum Zielgenpromotor rekrutieren, welche ihrerseits die Transkription initiieren (Klinge, 2000) (Abb. I.8). Die Regulation der Transkription durch $ER\alpha$ ist ein hoch komplexer Vorgang bei dem zahlreiche Proteine am Promotor wechselwirken (Metivier *et al.*, 2003). Wenn der dimerisierte Östrogen-Rezeptor ein ERE-Element gebunden hat, interagiert er mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und weiteren anderen Proteinen. Zusätzlich werden, initiiert durch die Konformationsänderung, Kofaktoren wie z.B. Chromatin modifizierende Proteine rekrutiert, welche die $ER\alpha$ vermittelte Transkriptionsaktivierung verstärken. Es wird vermutet, dass der Östrogen-Rezeptor und seine Kofaktoren die Bindung der basalen Transkriptionsfaktoren stabilisieren und dadurch den Aufbau eines Initiations-Komplexes für die Transkription fördern (Metivier *et al.*, 2003). Ist der Initiations-Komplex vollständig aufgebaut, wird die RNA-Polymerase II zum Startpunkt rekrutiert und die Transkription eingeleitet. Der Initiations-Komplex besteht aus den Transkriptionsfaktoren $TF_{II}A$, $TF_{II}B$, $TF_{II}D$, $TF_{II}E$, $TF_{II}F$ und $TF_{II}H$ (Roeder, 1996; Greenblatt, 1997). Hierbei stellen diese, bis auf Ausnahme von $TF_{II}H$, Multiprotein-Komplexe dar (Lee und Young, 2000). Der Protein-Komplex $TF_{II}H$, bestehend aus CDK7 (*cyclin dependent kinase*) und pTEFb (*positive transcription elongation factor b* (CDK9 und CyclinT1), spielt eine wichtige Rolle in der Serin 2 und Serin 5 Phosphorylierung der Heptapeptid Sequenzwiederholung der C-terminalen Domäne von RNA-Polymerase II und geht mit dessen Aktivierung einher (Shilatifard *et al.*, 2003). $TF_{II}D$ besteht aus dem „TATA-box binding protein“ (TBP) und mindestens 8 weiteren so genannten TAFs (*tightly associated factors*) mit einem Molekulargewicht von 18 bis 250 kDa (Verijzer und Tjian, 1996; Bieniossek *et al.*, 2013). $ER\alpha$ interagiert direkt mit $TF_{II}B$ (Ing *et al.*, 1992) und mit TBP, wobei die Interaktion sowohl mit AF1 als auch mit AF2 erfolgt (Sadovsky *et al.*, 1995). Außerdem interagiert die Ligandenbindungsdomäne von $ER\alpha$ ligandenabhängig mit $TAF_{II}30$. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Interaktionen Voraussetzung für die $ER\alpha$ vermittelte Transkriptionsaktivierung ist (Jacq *et al.*, 1994; Metivier *et al.*, 2003). Eine vergleichbare Interaktion konnte auch mit $TAF_{II}28$ nachgewiesen werden (May *et al.*, 1996).

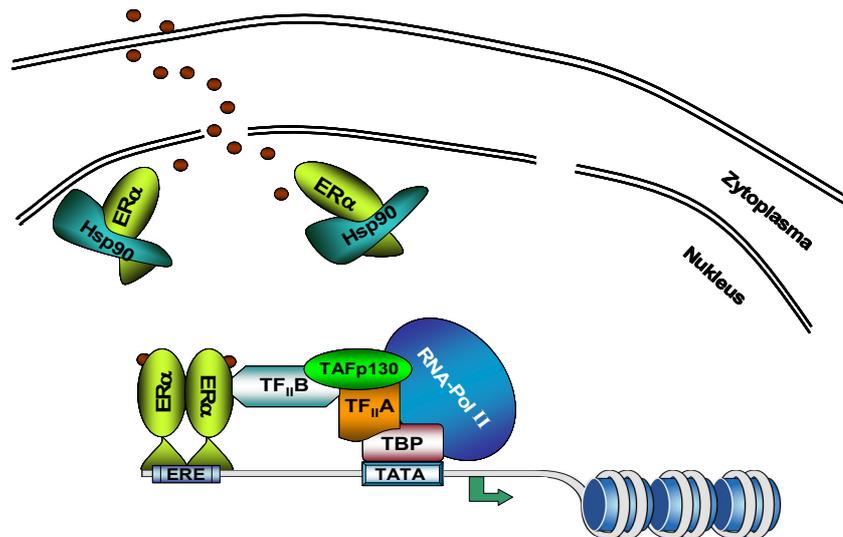


Abbildung I.8 Regulation der Genexpression durch ER α .

Das Steroid-Hormon Östrogen wird an der Zellmembran von Transportproteinen abgekoppelt und gelangt entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle. Der Transkriptionsfaktor ER α ist im Kern lokalisiert und kommt in seiner inaktiven Form gebunden an verschiedene Chaperone vor, wie z.B. das Hitzeschock-Protein Hsp90. Der Rezeptor ist in seiner Hormonbindungskonformation im Komplex stabilisiert aus dem er spontan abgelöst wird. Der freie Rezeptor kann dann Östrogen in einer hydrophoben Tasche der LBD binden. Durch die Konformationsänderung der Helix 12 in der LBD kommt es schließlich zur Initialisierung der Aktivierungsfunktion AF-2 und der Rezeptor bindet als Homodimer an DNA-Sequenzen, den *estrogen responsive elements* (ERE) in Zielgenpromotoren. Unterstützt wird die Initiierung der Transkription durch die Einleitung von Acetylierungs-Vorgängen an Histonen und durch die Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparates.

I.6.2 Die proteasomale Kontrolle der ER α gesteuerten Transkription

Das Ubiquitin Proteasom System (UP) greift in die Kontrolle der Konzentration bestimmter Ziel-Proteine nicht nur direkt durch deren Proteolyse ein, sondern reguliert vielfältig auch die Genexpression und damit die Proteinsynthese durch Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Geng *et al.*, 2012). Zunehmende Forschungsergebnisse sprechen für eine umfassendere Rolle des UP-Systems in der Transkriptionskontrolle, die weit über die reine Kontrolle frei diffundierender Transkriptionsfaktoren hinausgeht. Zusammengefasst erfolgt eine Ubiquitin vermittelte Regulation der Transkription durch folgende Mechanismen: (i) Durch die Regulation der intrazellulären Lokalisation; (ii) Durch Regulation der Aktivität; (iii) und durch Regulation der zellulären Konzentrationen von Transkriptionsfaktoren und deren Koaktivatoren (Aberle *et al.*, 1997; Hoppe *et al.*, 2000; Ostendorff *et al.*, 2002; Geng *et al.*, 2012). Für den Transkriptionsfaktor ER α konnte eine Ubiquitin-abhängige Degradation durch das Proteasom nachgewiesen werden (Nawaz *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2012). Als verantwortliche E3-Ubiquitin-Ligase konnte sowohl BRCA1 (Eakin *et al.*, 2007) als auch

CHIP (Zhang *et al.*, 2011) identifiziert werden. Aber auch für viele weitere Mitglieder der nukleären Rezeptoren bzw. Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Glukokortikoid- (GR), Progesteron- (PR), Androgen- (AR), Thyroid- (TR), oder Mineralkortikoid Rezeptor (MR), konnte eine Ubiquitin-abhängige Degradation nachgewiesen werden (Nawaz und O'Malley, 2004; Anbalagan *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die erfolgreiche Initiation der Transkription mit einer Ubiquitin vermittelten Proteolyse von ER α einhergeht. So führt eine Inhibition des Proteasoms zu einer vollständigen Blockierung von ER α vermittelter Transkription. Es wird diskutiert, dass es zu einer Fehlrekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie kommt. Nicht zuletzt deswegen, weil Vertreter des UP-Systems in RNA-Polymerase II Repressor-Komplexen identifiziert worden sind. Auch konnte gezeigt werden, dass die RNA-Polymerase II ebenfalls ein Ziel-Protein des UP-Systems ist und Proteolyse vermittelte Steuerungsprozesse für die Freisetzung der RNA-Polymerase II von Initiations-Komplexen eine wichtige Rolle einnehmen (Imhof und McDonnell, 1996). Hierdurch kommt es zu einer determinierten Abschaltung der gesamten Maschinerie sowie zu einer Klärung von Promotor-Komplexen nach Abschluß von Transkriptionsereignissen. Somit steht die Anzahl der Kopiendurchgänge unter einer streng vom UP-System kontrollierten und vermittelten Proteolyse (Lipford und Deshaies, 2003). Andere Ergebnisse haben eine periodische Assoziation von Proteasomen an bestimmten Promotorregionen beschrieben (Hilt, 2004).

Transkriptionelle Vorgänge gehen mit einer Vielzahl von komplexen und strukturierten Protein-Interaktionen einher. Hierbei ist es von großer Bedeutung, dass in der Zelle ein Gleichgewicht dieser Proteine vorliegt. So können Kofaktoren von ER α bei einer Assemblierung des Initiations-Komplexes mitwirken oder weitere nachgelagerte Transkriptionsschritte beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Koaktivatoren die Elongationsrate der RNA-Polymerase II beeinflussen (Yankulov *et al.*, 1994) und mehrere Zyklen der Transkription durch Unterstützung einer Re-initiation stimulieren können (Zawel *et al.*, 1995; Yudkovsky *et al.*, 2000). Erst seit geraumer Zeit diskutiert man eine Korrelation von Ubiquitinierung bzw. proteasomalen Abbau von Kofaktoren und ihrer Fähigkeit zur Stimulation der Genexpression (Lipford und Deshaies, 2003; Muratani und Tansey, 2003; Metivier *et al.*, 2003; Geng *et al.*, 2012). Hierbei fällt auf, dass die Aktivierungsdomäne vieler Aktivatoren mit Sequenzen überlappt, welche Ubiquitinierungssignale darstellen (Salghetti *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Proteasom vermittelten Degradation von Aktivatoren, mit ihrer Potenz zur Genaktivierung korreliert (Lipford *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen gaben Aufschlüsse, dass diese Modifikation eine

Rekrutierung von Faktoren unterstützt, welche wiederum die Effizienz der Transkriptions-Elongation positiv beeinflussen (Kurosu und Peterlin, 2004; Geng *et al.*, 2012).

Auch nicht-proteolytische Ubiquitinierungsereignisse werden mit aktiven Transkriptionsvorgängen in Verbindung gebracht. So spielen Monoubiquitinierungen von Histon H2A und H2B eine wichtige Rolle in der Genregulation. Hier wird vor allem die Chromatinstruktur so verändert, dass die Promotor-DNA der Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht wird. (Jentsch *et al.*, 1987; Prenzel *et al.*, 2011).

I.7 Kofaktoren der ER α vermittelten Transkription

Die Komplexität und spezifische Abstimmung von Transkriptionsvorgängen bedarf eines gezielten und geordneten Aufbaus von Multiprotein-Komplexen auf Zielgenpromotoren. Die Aktivität von ER α vermitteln hierbei hauptsächlich Koregulatoren (Robyr *et al.*, 2000; Geng *et al.*, 2012). Mittels Promotoranalysen am Östrogen-induzierbaren pS2 Zielgenpromotor konnte gezeigt werden, dass mehr als 30 weitere Proteine an dessen Transkription teilnehmen (Metivier *et al.*, 2003). Interaktionen haben oft erhebliche Konsequenzen auf die ER α vermittelte Transkription. Bezüglich ihres Einflusses unterscheidet man zwischen Korepressoren und Koaktivatoren. In den letzten Jahren sind eine große Anzahl neuer Kofaktoren identifiziert und charakterisiert worden (Klinge, 2000; Geng *et al.*, 2012). Generell hängt die Rekrutierung der Kofaktoren von der Konformation der Kern-Rezeptoren ab.

I.7.1 Koaktivatoren der ER α vermittelten Transkription

Koaktivatoren sind per Definition Proteine, die direkt mit dem Steroid-Rezeptor interagieren und dadurch die Transkription verstärken (Horwitz *et al.*, 1996). Diese werden zum Teil auch als *receptor associated proteins* (RAPs) oder *receptor interacting proteins* (RIPs) bezeichnet, obwohl nicht alle Proteine die mit ER α interagieren auch als Koaktivatoren wirken. Eine direkte Interaktion setzt ein bis mehrere so genannte *nuclear receptor interaction domain(s)* (NID) voraus (Hu und Lazar, 1999; Kumar und Perdew, 1999; Osz *et al.*, 2012). Mittels Verwendung von Deletionsmutanten, konnte die Aminosäureabfolge LXX(L,I,V)L als NID identifiziert werden, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann und eine amphipathische α -Helix bildet (Shiau *et al.*, 1998). Dieses LXXLL-Motiv interagiert nach der Hormon-Bindung mit der hydrophoben Spalte der Ligandenbindungsdomäne von ER α (Shiau *et al.*, 1998). Koaktivatoren können die Transkription von Steroid-regulierten Genen auf verschiedene Weise beeinflussen. Zum einen integrieren sie den Transaktivierungs-Komplex

in die basale Transkriptionsmaschinerie und können so spezifisch die Transaktivierung durch Steroid-Rezeptoren verstärken und zum anderen weitere Transkriptionsfaktoren in die basale Transkriptionsmaschinerie mit einbeziehen. Koaktivatoren besitzen oftmals eine Histonacetyl-Transferase (HAT) Aktivität, welche die Bindung der Histone modifiziert, lokales Chromatin auflockert und somit die Transaktivierung durch ER α ermöglicht wird (Osz *et al.*, 2012). Als Chromatin modifizierende Proteine sind die p160 Koaktivatoren mit Histonacetyl-Transferase-Aktivität wie z.B. SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), GCN5 oder p300/CBP mit ATP-abhängiger Helikase-Aktivität (Hirschhorn *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2008) oder PRMT1 und SET7 mit Methylase-Aktivität (Wang *et al.*, 2001; Subramanian *et al.*, 2008) beschrieben.

Die HAT Domäne von SRC-1 befindet sich in der C-terminalen Region und ist spezifisch für die Histone H3 und H4 (Spencer *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 2008). Die Acetylierung dieser Histone führt zu einer Auflockerung des Chromatins und zum koordinierten Aufbau des Initiations-Komplexes. SRC-1 interagiert hormonabhängig mit den Steroid-Rezeptoren aber auch mit anderen Transkriptionsfaktoren wie c-Fos oder c-Jun (Li *et al.*, 1998) und den basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TF_{II}D (Ikeda *et al.*, 1999; Metivier *et al.*, 2003). Es wird daher vermutet, dass SRC-1 als Brücke dient, um den ER α -ERE-Komplex mit dem RNA-Polymerase II Initiations-Komplex zu verbinden (Takeshita *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2008).

I.7.2 Korepressoren der ER α vermittelten Transkription

Während die Gruppe der Koaktivatoren relativ gut erforscht ist, liegen verhältnismäßig wenige Forschungsergebnisse von Kern-Rezeptor Korepressoren vor. Allerdings ist eine kleine Gruppe von Proteinen wie *silencing mediator for retinoic and thyroid receptors* (SMRT) oder *nuclear receptor corepressor* (NCoR) aufgrund ihrer Fähigkeit einer direkten Bindung mit Kern-Rezeptoren identifiziert worden (Chen und Evans, 1995; Hörlein *et al.*, 1995; Sande und Privalsky, 1996). Hierbei interagieren SMRT und NCoR ebenfalls über das LXXLL-Motiv mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α (Wu *et al.*, 2006; Peterson *et al.*, 2007). Sie besitzen eine Repressordomäne, deren Aktivität durch die Rekrutierung von Sin3 bzw. Histondeacetylasen (HDAC) vermittelt wird (Green *et al.*, 2007). Dieser NCoR/Sin3/HDAC-Komplex enthält zusätzlich eine Reihe weiterer Proteine. Im Gegensatz zu Koaktivatoren vermitteln Korepressoren, durch Assoziation und Aktivierung von Histondeacetylasen, eine Hypoacetylierung der Histone die wiederum zu einer kompakten und transkriptionell reprimierten Form der DNA führt (Heinzel *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997;

Wolf *et al.*, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass andere Kern-Rezeptoren, wie etwa der Thyroidhormon-Rezeptor, in Abwesenheit des Liganden aktiv die Transkription durch Rekrutierung von NCoR/Sin3/HDAC-Komplexen inhibiert (Brent, 2012). Erst die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, zur Dissoziation des Rezeptor-Repressor-Komplexes und zur Rekrutierung von RNA-Polymerase II sowie weiteren Koaktivatoren und somit zum Aufbau des Transkriptions-Initiations-Komplexes (Mangelsdorf und Evans, 1995). Ebenfalls konnte für ER α gezeigt werden, dass eine durch Antagonistenbindung (Tamoxifen) induzierte Konformationsänderung des Rezeptors, zu einer verstärkten Rekrutierung von Korepressoren und einer Fehlrekrutierung von Koaktivatoren führt. So führt diese Konformationsänderung zu einer Maskierung der Transaktivierungsdomäne und zur aktiven Repression der Transkription. Andere Arbeiten zeigen jedoch, dass die erfolgreiche Transkription von ER α Zielgenen mit einer Rekrutierung von Korepressor-Komplexen einhergeht (Metivier *et al.*, 2003).

1.7.3 ER α -regulierte Zielgene

Zu den Östrogen-regulierten Genen gehört eine große Vielfalt, von denen viele noch unbekannte Funktionen mit unbekannter Relevanz haben. Beispiele für bekannte Gene sind pS2, CathepsinD, Progesteron-Rezeptor, Interleukin-4- Rezeptor, Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) oder *insulin-like growth factor* (IGF), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. EGF-Rezeptor), Proto-Onkogene (c-myc, c-fos/c-jun) und Zellzyklus-regulierende Proteine (z.B. CyclinD1) (Rochefort *et al.*, 1990; Weisz *et al.*, 1993; Rochefort, 1995; Leitman *et al.*, 2010). Im Allgemeinen führen Östrogene zu einer Hochregulation Zellzyklus-fördernder Faktoren, wie Proto-Onkogene und CyclinD1. Die beobachteten mitogenen Effekte von östrogenen Verbindungen sind offensichtlich darauf zurückzuführen. Die Beobachtung, dass Östrogen-regulierte Gene in Brustkrebszellen häufig überexprimiert werden, unterstützt die Auffassung, dass die Aktivierung von ER α ein kritischer Schritt in der Tumorprogression ist. Die Genregulation ist allerdings abhängig vom zellulären Kontext. Dies wird deutlich an den gewebeabhängigen Induktionen/Hemmungen von spezifischen Genen (Oursler, 1998; Carlberg *et al.*, 2010). Im Herz führen Östrogene zu positiven Wirkungen, indem sie verschiedene Gene wie z.B. NO-Synthase und Myosin induzieren (Pelzer *et al.*, 1996; Tiyerili *et al.*, 2012). Hier hat die NO-Synthase vor allem vasoprotektive und anti-atherosklerotische Funktionen.

In Knochen führen Östrogene zur Differenzierung und gesteigerten Zellproliferation von Osteoblasten, die abhängig ist von der Knochenmatrix-Protein-Synthese (z.B. Kollagen,

Alkalische Phosphatase) und von Wachstumsfaktoren (*transforming growth factor* β , TGF β ; *insulin-like growth factor*, IGF). Diese Zellproliferation mündet in eine gesteigerte Knochenfestigkeit (Oursler, 1998; Kousteni *et al.*, 2007).

I.8 ER α und Brustkrebsentstehung

In Deutschland stellt Brustkrebs bzw. das Mammakarzinom mit rund 72.000 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste Krebserkrankung der Frau dar (Krebsregister Deutschland, 2009). Statistiken zeigen, dass jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Diese Zahl entspricht ca. 30% aller jährlichen Malignomerkrankungen (DeSantis *et al.*, 2011). Das Mammakarzinom ist eine komplexe (genetische) Erkrankung der weiblichen und auch sehr selten der männlichen Brustdrüse, welche durch Akkumulation mehrerer molekularer Veränderungen charakterisiert ist, aber auch durch verschiedene Umweltfaktoren entstehen kann (Bertucci *et al.*, 2002; Zugmaier *et al.*, 2003). Die Summe molekularer Veränderungen wie beispielsweise Mutationen, chromosomale Instabilität oder epigenetische Ereignisse (z.B. DNA-Methylierung) sind allen Neoplasien gemeinsam und beeinträchtigen die Funktion der Zellen, hinsichtlich Wachstum und Apoptose, erheblich (Børresen-Dale, 2003). Insbesondere beeinflussen Mutationen die Krebsentstehung, wobei diskutiert wird, dass mindestens vier bis fünf Mutationen für eine maligne Transformation notwendig sind. Diese genetischen Veränderungen betreffen hauptsächlich zwei unterschiedliche Genklassen, welche als Onkogene und Tumorsuppressoren bezeichnet werden. Dabei werden die Onkogene aktiviert und die Tumorsuppressor-Gene inaktiviert. Üblicherweise aktivieren Onkogene die Zellproliferation, während die Tumorsuppressor-Gene als Inhibitoren zellulärer Proliferation wirken (Cho und Vogelstein, 1992; Walerych *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Kaida *et al.*, 2012).

Trotz der Vielzahl genetischer Faktoren entsteht Brustkrebs zum überwiegenden Teil durch Umweltfaktoren, wobei die eigentlichen Entstehungsursachen noch weitestgehend ungeklärt sind. Dazu gehören neben Lebensalter, Zeitpunkt der Menarche und Erstgeburt, auch Herkunftsland, familiäre Disposition, Ernährung (erhöhter Alkoholkonsum) sowie der Östrogenspiegel (Zugmeier *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2006).

Zur Behandlung des Mammakarzinoms gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Therapieansätze. Hier unterscheidet man zwischen invasivem Eingriff, also der chirurgischen Entfernung des Tumors, sowie einer medikamentösen Therapie. Nicht-invasive Therapieformen können beispielsweise Strahlentherapie, Chemotherapie oder Hormonersatztherapie sein.

Es zeigte sich, dass der Östrogen-Rezeptor- und Progesteron-Rezeptor-Status wichtige prädiktive Marker hinsichtlich einer endokrinen Therapie sind. Der Nachweis der Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren im Gewebe erfolgt mit Hilfe eines Enzym-immuno-assays oder einer immunhistochemischen Bestimmung. Meist wird die immunhistochemische Methode verwendet. In Deutschland hat sich der *Immunoreactive-Score* (IRS) durchgesetzt (Remmele und Stegner, 1987; Beck *et al.*, 1994). Hierbei werden Werte für Färbeintensitäten (0-3) vergeben.

Ein weiterer häufig verwendeter Marker für Brustkrebs ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (EGFR). EGFR ist ein wichtiger prognostischer Faktor in Brusttumoren mit variabler Expression, der negativ mit der ER α -Expression korreliert (Bucci *et al.*, 1997; Walker und Dearing, 1999; Ferraro *et al.*, 2013). Mit p53 erweitert sich die Liste von potentiellen Markern. Wildtyp p53 spielt eine zentrale Rolle bei der Zellzyklusarretierung, der DNA-Reparatur sowie bei apoptotischen Vorgängen. Oftmals reicht jedoch ein Marker für eine sichere Prognose nicht aus. Daher zielen neuere Konzepte auf die Entwicklung molekularer Therapieansätze, wobei die Wirkung neuer Substanzen auf molekulare Mechanismen (Signaltransduktionswege, proteasomaler Abbau) ausgedehnt wird (Byford *et al.*, 2007; Biersack *et al.*, 2012).

I.9 Zielsetzung der Arbeit

Es war bereits bekannt, dass CLIM Kofaktoren im LIM-HD-Transkriptionsnetzwerk als positive Koregulatoren tätig sind. Weiterhin wurde spekuliert, dass CLIM2-Kofaktoren eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs spielen (Visvader *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007), da eine CLIM2-Überexpression die Differenzierung von Brustepithelzellen hemmt und hohe CLIM2 Expressionsraten in Zelllinien vorgefunden wurden, die aus verschiedenen Brusttumorgeweben etabliert waren. Ziel dieser Arbeit war es die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die diese Befunde erklären. Dieses Ziel sollte durch zwei experimentelle Ansätze erreicht werden.

Projekt 1 sollte sich mit der Funktion und Regulation von CLIM-Proteinen in LIM-HD-Multiprotein-Komplexen beschäftigen. Hierzu sollten vorab, mittels *Yeast-two-Hybrid*, neue Interaktionspartner für CLIM Kofaktoren identifiziert und die Auswirkungen dieser Interaktion für das LIM-HD Proteinnetzwerk funktionell analysiert werden. Darüber hinaus sollten molekulare Mechanismen *in vitro* und *in vivo* analysiert werden, die eine CLIM-Positivität im LIM-HD Proteinnetzwerk erklären könnten. Für *in vivo* Experimente sollte das

Zebrafisch-System und für *in vitro* Experimente das Zellkultur-System (α T3-Mauszelllinie) zum Einsatz kommen.

Projekt 2 sollte sich mit der Untersuchung der Rolle von CLIM2-Kofaktoren während der Entstehung von Brustkrebs auseinandersetzen. Hierfür sollten mittels *Tissue-Microarray* (TMA), Expressionsanalysen von CLIM2-Proteinen in einer hohen Anzahl von gut charakterisierten humanen Brusttumoren durchgeführt werden, um Aufschlüsse über mögliche Funktionen in der Brustkrebsentstehung zu erhalten. Außerdem sollte RLIM in diese Untersuchungen mit einbezogen werden. Signifikante Korrelationen mit der Expression anderer Proteine sollten funktionell untersucht werden. Experimentell sollte hier das Maus- und Zellkultur-System (Humane Brustkrebszelllinien; HEK-293T Zellen) zum Einsatz kommen.

II. Material & Methoden

II.1 Material

II.1.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen

Laborchemikalien und molekularbiologische Reagenzien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem, Amersham Pharmacia, Boston Biochemicals, Calbiochem, Clontech, Gibco-BRL Life Technologies, Greiner, Invitrogen, MBI Fermentas, Merck, Polysciences, Qiagen, Roth, Schleicher & Schüll, Sakura, Torrance, Sigma, Stratagene, Vector-Alexis und Whatman bezogen.

Spezielle Chemikalien und Hilfsmittel von anderen Produzenten sind im folgenden aufgeführt:

Biomax MR und X-Omat Blue XB-1	Eastman Kodak Comp., USA
Hyperfilm TM ECL	Amersham-Pharmacia, GB
L- ³⁵ S-Methionin	Amersham-Pharmacia, GB
Milchpulver (fettfrei)	Albertsons, USA
17 β Östradiol	Sigma, München
Säulen zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	Millipore GmbH, Schwalbach
Zellkulturschalen und Pipetten	Nunc GmbH, Wiesbaden, Eppendorf, Hamburg

II.1.2 Vektoren

pCR 2.1 TOPO-TA:	Klonierungsvektor (Invitrogen)
pCS2:	eukaryotischer Expressionsvektor mit Cytomegalovirus-Promotor (CMV) (Roth <i>et al.</i> , 1991)
pCS2+MT:	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter, N-terminal 6xMyc als Fusions-Protein (Roth <i>et al.</i> , 1991)
pGADT7	eukaryotischer Expressionsvektor mit T7 Promoter, N-terminale Galaktose- Aktivierungs Domäne; Fusions-Protein (Invitrogen, Karlsruhe)
pGEX-KGK, pGEX-AHK:	bakterieller Expressionsvektor mit C-terminale Glutathion-S-Transferase (GST) als Fusions-Protein (M.G. Rosenfeld, San Diego, USA)

pEGFP-C3:

eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter, N-terminale GFP-Fusion (Clontech, Palo Alto, USA)

II.1.3 Lösungen und Medien

Alle Lösungen und Medien wurden mit Wasser, das durch ein Milli-Q-System (Millipore, Schwalbach) aufgereinigt wurde, hergestellt. Die pH-Werte wurden mittels Zugabe von NaOH, KOH oder HCL eingestellt. Zur Sterilisation wurden die Lösungen 20 min bei 121°C autoklaviert.

DNA-Probenpuffer (6x)	40% Sucrose; 0,25% O-Bromphenolblau; 0.25% Xylen-Cyanolblau
Laemmli Probenpuffer (3x)	360 mM Tris-HCl (pH 6,8); 6% SDS; 30% Glycerol; 5% β -Mercaptoethanol; 0.05% O-Bromphenolblau
Laemmli Stop Puffer (2x)	62,5 mM Tris-HCl; (pH 6,8); 2% SDS; 10% Glycerol; 100 mM DTT; 0,001% Bromphenolblau
LB(Luria-Broth)-Medium	10 g/L Bacto-Trypton; 5 g/L Bacto-Hefeextrakt; 10 g/L NaCl
NETN-Puffer	0,5% NP 40; 20 mM Tris (pH 8,0); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% Glycerol ; frisch dazugeben 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche)
PBS-Puffer	0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 3,2 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4
PBT	PBS und 0,1% Triton X-100
PBST	PBS und 0,1% Tween 20
SDS PAGE Lauf-Puffer	25 mM Tris-HCL; 190 mM Glycerol; 0,1% SDS (pH 8,3)
TBE-Puffer	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; (pH 8,3)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
Western Blot Transfer-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0); 380 mM Glycin; 0,1% SDS

II.1.4 Verwendete Zelllinien

MCF7

Humane Brustkrebszellen; Östrogen-Rezeptor α und β positiv

HEK-293T-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen; SV Antigen fehlt (Pierce, Rockford, USA)

 α T3-Zellen

Gonadotrope Tumorzelllinie etabliert aus der Maus Hypophyse.

II.1.5 Zellkulturmedien

Für MCF7:	500 ml	HAM's F12 (Gibco-BRL)
	55 ml	Fötale Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 65°C für 30 min; (Gibco-BRL)
	5,5 ml	Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin; 10000µg/ml Streptomycin, Gibco-BRL)
	500 ml	DMEM Phenolrotfrei (Sigma)
	55 ml	Dextran behandeltes (hormonfreies) Kälberserum (Sigma)
	5,5 ml	Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin; 10000µg/ml Streptomycin, Gibco-BRL)
Für HEK-293T:	500 ml	DMEM (Gibco-BRL)
	55 ml	Fötale Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 65°C für 30 min; (Gibco-BRL)
	5,5 ml	Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin; 10000µg/ml Streptomycin, Gibco-BRL)
Für αT3:	500 ml	DMEM (Gibco-BRL)
	55 ml	Fötale Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 65°C für 30 min; (Gibco-BRL)
	5,5 ml	Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin; 10000µg/ml Streptomycin, Gibco-BRL)

II.1.6 Bakterienstämme

Escherichia coli für Klonierungsexperimente:

DH5α: F-*gyrA96*(NaI^{r}) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* ($r_{\text{K}}^{-} m_{\text{K}}^{+}$) *glnV44 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169 [Φ 80d Δ (*lacZ*)M15] (Fermentas Life Sciences; Woodcock *et al.*, 1989)

DH5αIQ: *endA1 hsdR17* ($r_{\text{K}}^{-}, m_{\text{K}}^{+}$), *supE44, thi-1, -, recA1, gyrA96, relA1, 80* Δ *lacZ*M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169/ F' , *proAB, lacIq, lacZ* M15, Tn5(KmR) (Gibco BRL, Karlsruhe)

Escherichia coli für die Expression rekombinanter Proteine:

BL21 (DE3): *hsdS_B* ($r_{\text{B}}^{-} m_{\text{B}}^{-}$) *gal dcm* (λ *cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1*) (New England Biolabs; Studier und Mofatt, 1986)

BL21 Codon Plus (De3)-RIL *strain*^a: BF^{-} *ompT hsdS* ($r_{\text{B}}^{-} m_{\text{B}}^{-}$) *dcm* + Tet^{r} *gal* λ (DE3) *endA Hte argU ileY leuW Cam^r*] (Stratagene)

II.1.7 DNA-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firma Metabion (Martinsried) und Invitrogen bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in sterilem ddH₂O resuspendiert und auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/µl eingestellt.

II.1.8 Doppelsträngige RNA-Oligonukleotide

Für RNAi-Experimente wurden doppelsträngige RNA-Oligonukleotide mit der Bezeichnung *stealth*-siRNA[®] von der Firma Invitrogen bezogen. Andere wurden von Qiagen bezogen.

siRNA humanRLIM^{Alexa488 gekoppelt}

Sense Sequenz: AAGAAGCTTTCATCAATTTG

Antisense Sequenz: CAAUUGAUGAAAGCUUCTT

stealth siRNA-646 humanCLIM2

Sense Sequenz: CAACTCCCATGTATCCGCCTACATA

Antisense Sequenz: UAUGUAGGCGGAUACAUGGGAGUUG

stealth siRNA-862 humanCLIM2

Sense Sequenz: GATATACCATTGGCCGGACCCTGAT

Antisense Sequenz: AUCAGGGUCCGGCCAAUGGUAUAUC

stealth siRNA-1174 humanCLIM2

Sense Sequenz: CCCAGATGTTGGATCAGCTCTCCAA

Antisense Sequenz: UUGGAGAGCUGAUCCAACAUCUGGG

II.1.9 Antikörper

II.1.9.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
β-Tubulin	polyklonal. Kaninchen	1:1000	Covance
HA.11	monoklonal. Maus	1:1000	BAbCO
CLIM	polyklonal. Kaninchen	1:3000	Ostendorff, 2002
Aktin	polyklonal. Kaninchen	1:1000	Santa Cruz (sc-789)
CDK9	polyklonal. Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
c-myc	polyklonal. Kaninchen, monoklonal. Maus	1:3000	Sigma
Östrogen-Rezeptor α	polyklonal. Kaninchen monoklonal. Maus	1:1000	Santa Cruz
GST	polyklonal. Ziege	1:3000	Sigma
RLIM	polyklonal. Meerschweinchen	1:5000	Ostendorff, 2002
RLIM	polyklonal. Kaninchen	1:2000	Ostendorff, 2002
SSDP1	polyklonal. Kaninchen	1:1000	Abnova

II.1.9.2 Sekundäre Antikörper und HRP-Protein A

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa488-anti-Kaninchen	polyklonal. Ziege	1:1000	MoBiTec
Alexa488-anti Meerschweinchen	polyklonal. Ziege	1:1000	Vector-Alexis
Alexa546-anti-Meerschweinchen	polyklonal. Ziege	1:1000	Invitrogen
Alexa633-anti-Kaninchen	polyklonal. Ziege	1:1000	Invitrogen
Cy3-anti-Kaninchen	polyklonal. Ziege	1:1000	Jackson Laboratories
Cy3-anti-Maus	polyklonal. Ziege	1:1000	Dianova
HRP-Protein A	polyklonal. Ziege	1:5000	Bio-Rad
HRP-anti-Kaninchen	polyklonal. Ziege	1:2000	Covance
HRP-anti-Meerschweinchen	polyklonal. Ziege	1:2000	Covance

II.2 Methoden

II.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

II.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* mittels alkalischer Lyse

II.2.1.1.1 Plasmid Präparation im kleinen Maßstab

Hierzu wurden 3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien für 2 Minuten (min) bei 14.000 Umdrehungen pro Minute (Upm; Eppendorf Tischzentrifuge, 5417) pelletiert. Das Pellet wurde danach in 50 µl Lösung I (50 mM Tris-HCL, pH 8.0; 10 mM EDTA; 50 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterien erfolgte mittels Zugabe von 100 µl Lösung II (200 nM NaOH; 1% SDS). Die Lösung wurde ca. fünfmal geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Neutralisation der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, pH 5). Um eine vollständige Proteinfällung zu gewährleisten, wurden die Reaktionen gut vermischt und für 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Der Plasmid DNA enthaltene Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 fachem Volumen absoluten Ethanol (EtOH) gefällt. Die ausgefallene Plasmid DNA wurde für 20 min bei 14.000 Upm pelletiert und mit 70% EtOH von vorhandenen Salzen befreit. Das Pellet wurde für 15 min bei RT getrocknet und mit 50 µl ddH₂O in Lösung gebracht. Zur weiteren Analyse wurden 5 µl mit Restriktionsenzymen verdaut und 1 µl in einer Sequenzierreaktionen eingesetzt.

II.2.1.1.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab

Um eine höhere Transfektionseffizienz in der Zellkultur zu gewährleisten, wurden Plasmidpräparationen mit den „Maxi“ Präparations-Systemen der Firmen Invitrogen und Qiagen durchgeführt. Hierfür wurden Bakterien einer 200 ml Übernachtskultur für 10 min bei 8000 Upm pelletiert (Beckman J2-21 M/E Zentrifuge, JA 10-Rotor). Die Plasmide wurden anschließend gemäß Herstellerangaben isoliert.

II.2.1.2 Phenol-/Chloroform-Extraktion

Eine klassische Methode um DNA von Verunreinigungen wie z.B. Proteinen zu befreien, ist die Phenol-Chloroform-Extraktion. Phenol dissoziiert Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten, während Chloroform Proteine denaturiert und die Phasentrennung erleichtert. Hierfür wurden DNA-haltige Lösungen mit dem gleichen Volumen eines wassergesättigten Phenol-/Chloroform-Gemisches (1:1; w/v) versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung bei 14000 Upm für 10 min zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je einem Volumen Chloroform die restliche Phenollösung entfernt und bei 14000 Upm für 5 min zentrifugiert. Die obere DNA-enhaltende Phase wurde abgenommen und die DNA anschließend mittels Ethanol ausgefällt.

II.2.1.3 Ethanolfällung

Nukleinsäuren können durch Zugabe von 2,5 Volumen 96%igem Ethanol gefällt werden, da auf diese Weise den Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen wird (Sambrook *et al.*, 1989). Die Zugabe von monovalenten Kationen, hier Na^+ , auf eine 0,3 M Endkonzentration als Acetat, ändert selektiv die Löslichkeit der DNA und erhöht dadurch die Effizienz der Ethanolfällung. Durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,4) und 2,5 Volumen Ethanol, wurde die DNA 30 min bei -80°C gefällt. Danach wurde das Präzipitat für 10 min bei 14000 Upm abzentrifugiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem gewählten kleinen Volumen 1x TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen.

II.2.1.4 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde mit dem RNeasy-System (Qiagen) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die in RNase freiem Wasser gelöste RNA wurde anschließend quantifiziert und bei -80°C gelagert.

II.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis *et al.*, 1986). Hierzu wird eine doppelsträngige DNA (Template-DNA) denaturiert und an den entstehenden komplementären DNA-Einzelsträngen zwei Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNA) flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den entsprechenden Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Durch Wiederholen eines ca. dreißigfachen Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung von Primern und davon ausgehender Komplementärstrangsynthese, erreicht man eine Vermehrung des DNA-Fragments zwischen den Primern. Standardmäßig wurden in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, ein 50 µl Reaktionsansatz angesetzt. Im Allgemeinen enthielt ein 50 µl Ansatz 1-20 ng Plasmid-DNA oder 0,2-2 ng genomische DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 0,8% NP-40), 2 µl 50 mM MgCl₂, 50 pmol jedes Primers, 5 µl 2 mM dNTP-Mix sowie 2,5 U *Taq*-Polymerase (Gibco-BRL) und wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Zur Durchführung der Reaktion wurde ein PTC-2000 Pelztier Thermal Cycler (MJ Research) benutzt. Der Ansatz wurde für 1 min bei 94°C inkubiert und durchlief dann 25-40 Zyklen aus Denaturierung (94°C, 1 min), Hybridisierung (bei geeigneter Temperatur und Dauer) und Polymerasereaktion (72°C und geeignete Dauer). Die Hybridisierungstemperatur der Primer war abhängig vom GC- und AT-Gehalt der Oligonukleotide. Die Dauer der Polymerasereaktion richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Als Abschluß der PCR wurde der Ansatz für 5 min bei 72°C inkubiert und auf RT gekühlt.

II.2.1.6 Real Time PCR

Zur Quantifizierung von Genexpressionsänderungen auf Transkriptionsebene, wurden *Real Time*-RT-PCR Analysen durchgeführt. Als Matrize für die Kontroll-PCR (36B4) diente unverdünnte cDNA, für die jeweilige Gen-Amplifikation diente im Verhältnis 1:10 verdünnte cDNA. Das Endvolumen der PCR betrug 25 µl, welche neben der zu analysierenden cDNA, 12,5 µl PCR-Reagenz-Mischung (SYBR Green Supermix, Bio-Rad) sowie 5 pmol von Sinn- und Gegensinn Primern beinhalteten. Die PCR-Reagenz-Mischung enthielt 2x PCR-Puffer, dNTPs sowie die *Taq*-Polymerase. Die PCR wurde im iCycler der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren hierbei vergleichbar mit denen der konventionellen PCR. Aus den Amplifikationskurven wurde derjenige Zyklus („Threshold Cycle“ C_T) ermittelt, nach dem die Amplifikation des PCR-Produktes in die exponentielle

Phase übergang. Mittels der C_T -Werte wurden anschließend die relativen Expressionsunterschiede X zweier Proben auf 36B4 normalisiert.

II.2.1.7 *In vitro* Mutagenese PCR

Die *in vitro* Mutagenese erfolgte nach dem Protokoll des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene). Das Einführen von Punktmutationen erfolgte über eine PCR mit zwei Mutagenese-Primern, die an der entsprechenden Position nicht komplementär zur WT Sequenz sind. Als Template der Mutagenese-PCR wurde der Vektor pCS2-CLIM2 verwendet. Nach Anlagerung der Mutagenese-Primer an die komplementäre Sequenz im Vektor, enthält nun jeder neu synthetisierte Strang die gewünschten Punktmutationen. Hierbei enthielt jeder Primer insgesamt 3 Punktmutationen. Der Ansatz wurde für 1 min bei 94°C inkubiert und durchlief dann achtzehnmal einen Zyklus aus Denaturierung (94°C, 1 min), Hybridisierung (60°C, 45 sek) und Polymerasereaktion (68°C, 2 min). Nach der Mutagenese-PCR wurde die Probe mit 1 µl des Restriktionsenzym *Dpn* I verdaut, um die nicht mutierten Ursprungsplasmide aus der Probe zu entfernen. Die Restriktionsendonuklease *Dpn* I schneidet ausschließlich methylierte DNA und somit nur Plasmide, die von Bakterien synthetisiert worden sind und nicht die durch PCR neu synthetisierten. Dieser Ansatz wurde eine Minute zentrifugiert und dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe in *E. coli* transformiert. Von den Kolonien wurden Mini-Präparation angefertigt. Die gewonnene mutierte DNA wurde anschließend zur Sequenz-Analyse geschickt.

II.2.1.8 Klonierung von PCR Fragmenten

Amplifizierte PCR Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend, wie unten beschrieben, isoliert. Die PCR-Primer wurden so entwickelt, dass sie endständige Schnittstellen für Restriktionsenzyme aufweisen. Die PCR-Produkte konnten anschließend, nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen, über Gelelektrophorese getrennt und isoliert werden und in einer Ligation mit einem Vektor, der mit den selbigen Enzymen behandelt worden war, eingesetzt werden. Da Enzyme lineare DNA Fragmente mit endständigen Restriktionsstellen häufig nicht effizient schneiden, wurde alternativ der TOPO TA *Cloning Kit* von Invitrogen verwendet (nach Angaben des Herstellers). Hier kloniert man das PCR Fragment in den pCR2.1-TOPO-Vektor, um anschließend eine leichtere Restriktion zu erreichen. Die *Taq*-Polymerase hängt einzelne Desoxyadenosinreste an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Der linearisierte vorliegende TOPO-Vektor besitzt überhängende 3'-Thymidinreste, was einerseits eine effiziente Ligation von PCR Produkten erlaubt,

andererseits eine Re-Ligation von Vektor-DNA verhindert. Nach der Transformation und Vermehrung des Vektors in optimierten *E.coli*-Bakterien, konnten aus diesem Subklonierungs-Vektor die DNA Fragmente herausgeschnitten und in andere Vektoren umklontiert werden.

II.2.1.9 Elektrophorese von DNA Fragmenten

DNA Moleküle wurden mittels Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TBE gelöst (aufkochen) und Ethidiumbromid hinzugefügt (0,05 µl/ml). Die Konzentration der Agarose wurde entsprechend der Größe der DNA-Moleküle eingestellt (0,8-2%). Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und bei etwa 10 V/cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA ist aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Spannung beeinflusst. Je höher die gewählte Agarosekonzentration, desto geringer ist die Porengröße und damit die Wanderungsgeschwindigkeit. Kleinere DNA Fragmente (bis 300 bp) wurden daher bei höheren Agarosekonzentrationen aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die durch interkaliertes Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden photographisch dokumentiert (UV-Gel Dokumentationssystem, Herolab, Wiesloch).

II.2.1.10 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese, wurde das erwünschte DNA-Fragment unter UV-Licht herausgeschnitten und mittels Zentrifugation durch Gel-Extraktions-Säulen (Milli-Pore), nach Angaben des Herstellers, aus der Agarose eluiert.

II.2.1.11 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden photometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Ultrospec 3000, Pharmacia). Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA das Absorptionsmaximum. Ein gemessener Wert von 1 OD₂₆₀ entspricht etwa 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, sowie 20 µg/ml für einzelsträngige DNA und 40 µg/ml für RNA.

II.2.1.12 Restriktionsverdau

Restriktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Jedem Ansatz wurde der vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlene Puffer zugefügt. Die Reaktionen wurden in der Regel mit 1-2 U Enzym/µg DNA verdaut und für 1 Stunde (h) bis über Nacht, bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) oder durch enzyspezifische Hitzeinaktivierung (im Fall nachfolgender Manipulation der DNA mit weiteren Enzymen) gestoppt.

II.2.1.13 Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearer Vektor-DNA, wurde der jeweilige Vektor mit einem oder einer Kombination von Restriktionsenzymen geschnitten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Reaktion, wurde ein Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel geladen. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung des DNA-Gel-Extraktions-Kits (Genomics) isoliert. Zur Verhinderung einer Re-Ligation der Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert worden war, wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

II.2.1.14 Dephosphorylierungen von 5'-Enden

Eine Re-Ligation von Vektoren kann durch die Entfernung der Phosphatgruppen am 5'-Ende mit Hilfe von alkalischen Phosphatasen verhindert werden. Nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase (1 U/ml; Roche) und 10x alkalischer Phosphatase-Puffer, wurde bei 37°C die betreffende DNA für 1 h inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung der Phosphatase bei 85°C für 15 min. Zur DNA-Reinigung, wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung durchgeführt. Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in ddH₂O aufgenommen.

II.2.1.15 Ligation von DNA Fragmenten mit Vektoren

Für die Ligation von DNA Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Roche) benutzt. Standardmäßig wurde ein molares Vektor / Insert Verhältnis von 1 zu 3 benutzt. Die Ligation erfolgte üblicherweise mit 1 µL T4-DNA-Ligase (1.5 U/µl) bei 16°C über Nacht, alternativ wurde die Reaktion auch für 3-5 h bei RT durchgeführt. Die Ligationen wurden in einem möglichst kleinen Volumen (maximal 15 µl) vorgenommen. Teile des Ligationsansatzes (4-15 µl) wurden in kompetente Bakterien-Zellen des *E.coli*-Stammes DH5α transformiert.

II.2.1.16 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem ABI Prism 377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer,

Rodgau-Jügesheim) unter Verwendung des *ABI-Prism-Dye-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kits* (Perkin Elmer) und Standard-Primern nach Angaben des Herstellers von der Sequenz Service-Einheit des ZMNH und bei Macrogen, Korea, durchgeführt. Verwendet wurden Ansätze, die ca. 0,6-0,75 µg DNA und 10 pmol Primer enthielten.

II.2.1.17 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einer Glycerinkultur des *E.coli*-Stammes DH5α, wurden ca. 10 µl auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C im Brutschrank, wurde eine einzelne Kolonie zum Animpfen einer 5 ml Vorkultur benutzt, die wiederum über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 150 ml LB-Medium, welches 10 mM CaCl₂ enthielt, mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakterien-suspension eine OD₆₀₀ von 0,45-0,5 erreicht hat. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 5000 Upm 5 min zentrifugiert (Zentrifuge J2-21 M/E Rotor JA10 oder JA 14, Beckmann). Nach Dekantieren des Überstands, wurde das Sediment in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 30 min unter gelegentlichem Rühren auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5-10 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Minifuge RF, Haereus). Das Sediment wurde in 10 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ mit 15% Glycerin resuspendiert und über Nacht im 4°C-Raum auf Eis inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension auf Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

II.2.1.18 Transformation von Bakterienzellen

Die kompetenten Bakterienzellen wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA (1-25 ng), wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für 60-90 Sekunden (sec) ein Hitzeschock bei 42°C. Der Ansatz wurde sofort wieder auf Eis abgekühlt und dort für 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml LB-Medium ohne Antibiotika, wurden die Zellen 45 min bei 37°C geschüttelt, um ihnen die Gelegenheit zur Expression der neu erworbenen Antibiotikaresistenzgene zu geben. Die Bakterien wurden dann auf antibiotikahaltige LB-Platten (0.1 mg/ml Ampicillin oder 0.1 mg/ml Kanamycin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

II.2.1.19 Verwendung doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide

Doppelsträngige RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen in lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden in RNase-freiem Wasser resuspendiert und auf eine Arbeitskonzentration von 20 pmol/µl eingestellt. Die Durchführung der Transfektionen von

Säugetierzellen mit den RNA-Oligonukleotiden wird in Abschnitt II.2.3.4 beschrieben.

II.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten

II.2.2.1 Expression von Proteinen in Bakterien

Proteine wurden in dem *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert. Für GST-Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase) wurden die Vektoren pGEX-KGK, pGEX-KG und pGEX-AHK verwendet. Die Zellen wurden mit den gewünschten Expressionskonstrukten transformiert, auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine 20 ml Vorkultur aus einem kultivierten Klon in antibiotikahaltiges LB-Medium inkubiert. Ungefähr 3-5 ml der Vorkultur wurden in 200 ml frisches antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben und die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,25-0,3 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) schüttelnd bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Wachstumsphase, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Suspension wurde weitere 3-5 h (kleinere Proteine) bei 37°C und alternativ über Nacht bei der Expression größerer Proteine (z.B RLIM) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei RT und 6000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, JA-10 Rotor, Beckmann) und einer alkalischen Lyse bei 4°C unterzogen.

II.2.2.2 Aufreinigung von rekombinanten His-Tag Fusionsproteinen

Um His-Tag gekoppelte Proteine (6 C-terminal angehängte Histidine, die in diesem Vektor an das gewünschte Protein fusioniert werden) aus dem gesamten Bakterienlysat aufzureinigen, wurden Ni²⁺-NTA-Agarose-Beads verwendet (Qiagen). Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die erhaltenen Bakteriensedimente (Abschnitt II.2.2.1), wurden in kaltem PBS resuspendiert, in Falkongefäße überführt und erneut zentrifugiert (4500 Upm, 10 min). Nach Dekantieren des Überstandes, wurden die Zellen in 10 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,9; 0,1 M KCl; 1% Triton X-100; 12,5 mM MgCl₂; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin) resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung mit Ultraschall beschallt (dreimal 30 sec mit 60 Watt) und das Lysat durch Zentrifugation in einer Beckmann Zentrifuge (9500 Upm, 30 min, Rotor JA-20) von Zellresten gereinigt. Der Überstand enthält die Fraktion löslicher Proteine. Bei unlöslichen oder schwer löslichen Proteinen, wurde das Pellet in 8 M Harnstoff aufgenommen und über Nacht bei RT langsam geschüttelt. Nach 15 min Zentrifugation bei 9500 Upm, wurde der Überstand als unlösliche Fraktion aufgehoben. Die Fraktion löslicher Proteine, wurde mit der nach Angaben des Herstellers equilibrierten Ni²⁺-NTA-Agarose, 2-4 h unter ständiger Rotation inkubiert. Bei dem Auftreten eines starken

Hintergrundes, wurde dem Ansatz in diesem Schritt 10 mM Imidazol hinzugefügt. Die Ni²⁺-NTA-Agarose, die nun die His-Tag-Proteine gebunden hatte, wurde zweimal mit Waschpuffer (50 mM Tris, pH 7,9; 300 mM NaCl, 10% Glycerol; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin) gewaschen und anschließend wurden die rekombinanten Proteine mit 2 ml Elutionspuffer (Waschpuffer mit 500 mM Imidazol) von der Ni²⁺-NTA-Agarose eluiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen der Proteine, sowie Aliquots der Zwischenschritte, wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE) (siehe II.2.2.6) und Coomassie-Färbung analysiert.

II.2.2.3 Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Glutathion-Agarose (Sigma) aus dem Bakterienlysat gereinigt. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensedimente der exprimierten GST-Proteine, wurden in Lysispuffer (50 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,6; 10% Glycerol; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 mM DTT) resuspendiert und in ein 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Proben wurden dreimal 30 sec in 45 sec Intervallen mit 60 Watt beschallt und anschließend 30 min bei 9500 Upm in einer Beckmann Zentrifuge (Rotor JA-20) zentrifugiert. Zum Überstand wurden 500 µl Glutathion-Agarose (nach Angaben des Herstellers equilibriert) pipettiert. Überstand und Glutathion-Agarose, wurden 3-4 h bei ständiger Rotation inkubiert. Das durch die anschließende Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, Haereus-Zentrifuge) erhaltene Sediment, wurde dreimal 5-10 min mit ca. 5 ml Lysispuffer gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten, wurde wie beschrieben zentrifugiert, der Lysispuffer dekantiert und neuer Lysispuffer zugegeben. Anschließend wurden die GST-Proteine mit Elutionspuffer (Lysispuffer mit 10-25 mM Glutathion) unter ständiger Rotation 1 h bis über Nacht, von der Glutathion-Agarose eluiert. Mittels SDS PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels, wurden die Proben analysiert.

II.2.2.4 Aufreinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Zellextrakte zur Gewinnung der Proteine, wurden aus MCF7 Zellen hergestellt. Dafür wurden, wenn nicht anders angegeben, Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 3 oder 10 cm für MCF7 Kulturen verwendet. Alle Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen. Die Zellen wurden zweimal mit 2-5 ml PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig abgesaugt worden war, wurden je nach Zellkultur und Zelldichte 200 µl bis 500 µl NETN-Puffer dazugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst.

In Suspension wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellextrakte 15 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert.

II.2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration, wurde mit der Methode nach Bradford durchgeführt. Es wurde Bradford-Reagenz (Roti-Quant) der Firma Roth verwendet. Je 500 µl Reagenz, wurden mit 2 ml Zellextrakt versetzt und gemischt. Zusätzlich wurde eine Eichreihe aus 200 µl Bradford-Reagenz mit 1-10 µg BSA pipettiert. Je 200 µl der Lösungen (Doppelbestimmung), wurden in eine Mikrotiter-Platte mit 96 Kavitäten pipettiert. Die Proteinkonzentration konnte nach einer Extinktionsmessung bei 595 nm mit Hilfe der erstellten Eichgerade berechnet werden.

II.2.2.6 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. 8-15%ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook *et al.*, 1989) wurden hierfür verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel in 3x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15-50 mA. Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtstandards (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas; Dual Color, Bio-Rad), wurden zur Bestimmung der Proteingrößen verwendet. Zur Visualisierung wurden die Proteine im Gel entweder mit Coomassie angefärbt (siehe II.2.2.7), oder auf Nitrozellulose transferiert und im Western Blot-Verfahren analysiert (siehe II.2.2.8). Im Fall radioaktiver Proteine, wurde das Gel getrocknet und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert.

II.2.2.7 Färbung von SDS PAGE-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau

Nach der Gelelektrophorese, wurden die Gele 60 min in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure) gefärbt und anschließend mit Entfärberlösung (70% Methanol; 7% Essigsäure) inkubiert und getrocknet (Model 583, Bio-Rad).

II.2.2.8 Western Blot

II.2.2.8.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer von Proteinen nach Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot), erfolgte nach Herstellerangaben entweder nach einer *Semi-Dry-Transfer-Methode* in einer Graphitblot-Apparatur (Phase, Lübeck) mit

Transferpuffer (50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycerin, 0.1% SDS, 20% Methanol) bei 1 mA/cm² für 60-120 min, oder nach einer Tank-Blot-Methode mittels einer Blot-Apperatur (Amersham Pharmacia) im Transferpuffer bei 30-50 mA für 2 h bei RT.

II.2.2.8.2 Ponceaurot-Färbung der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembran mit den immobilisierten Proteinen, wurde nach Herstellerangaben kurz in Ponceaurot (Ponceau S, Appllichem) geschwenkt, um zu überprüfen, ob der Transfer gleichmäßig erfolgt war. Die Ponceaurot-Färbung wurde durch mehrmaliges Schwenken in ddH₂O und PBST entfernt. Danach folgte der immunologische Nachweis mit spezifischen Antikörpern.

II.2.2.8.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der Western Blot wurde nach dem Proteintransfer in einer Blockierungslösung (PBS; 3% fettfreies Milchpulver) für 1 h inkubiert und die freie Proteinbindungskapazität der Membran dadurch abgesättigt. Nach dem Blockieren, wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper (primär Antikörper) in Blockierungslösung mit entsprechender Verdünnung für mindestens 1 h bei RT bis über Nacht bei 4°C, inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran zweimal mit PBST für 1 und 10 min bei RT und zweimal mit PBS für 1 und 10 min bei RT gewaschen. Daraufhin wurde der Western Blot mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Protein A bzw. Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-Kaninchen- oder anti-Meerschweinchen-IgG's für mindestens 60 min inkubiert. Die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte nach erneutem Waschen (wie oben) und anschließenden Inkubation mit dem ECL- (*Enhanced Chemiluminescence*) Reagenz nach Angaben des Herstellers (Amersham Bioscience). Die Lumineszenz der Protein-Antikörper-Komplexe wurde auf entsprechende ECL-Röntgenfilme (Hyperfilm-ECL, Amersham Biosciences) übertragen.

II.2.2.9 Analyse von Protein-Protein Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen

Um Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen, wurden GST-Interaktionsexperimente durchgeführt. Die GST-Proteine (Abschnitt II.2.2.3) wurden zu diesem Zweck nicht von der Glutathion-Agarose eluiert. Zuerst wurden die GST Proteine mit PPI-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,9; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,02% NP-40; 10% Glycerol) äquibriert, mit 1 mg/ml BSA versetzt und in 50% GST-Protein-Agarose / 50% PPI-Puffer-Mix aufgenommen. Für die Negativkontrolle (GST allein), wurde das GST-Peptid

mit dem Glutathion-Agarose-Mix auf 50 µl Volumen gebracht. Die Proteinmengen wurden vorher mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten Gels angeglichen. Im Interaktionsexperiment, wurden 50 µl GST-Protein-Mix (bzw. GST-Peptid) mit 10 µl TNT-Protein (siehe unten) und 5 µl PPI-Puffer vermischt. Die Proteine wurden 3-4 h bei 4°C unter ständiger und leichter Bewegung inkubiert, um ihnen die Gelegenheit zum Binden zu geben. Anschließend wurde dreimal für 10 min mit 500 µl PPI-Puffer bei 4°C gewaschen. Nach Abpipettieren des überschüssigen PPI-Puffers, wurde den Proben 10 µl 3x Laemmli-Puffer zugefügt, 5 min aufgekocht und der gesamte Ansatz über eine SDS PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurde eine Spur mit 2 µl TNT Protein geladen. Um sicherzugehen, dass vergleichbare Mengen der verschiedenen GST-Proteine geladen worden waren, wurde das SDS-Gel kurz mit Coomassie gefärbt, entfärbt und anschließend getrocknet, bevor ein Film (Biomax-MR) aufgelegt wurde.

II.2.2.10 Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen *in vitro*

Um radioaktiv markierte Proteine *in vitro* herzustellen, wurde der TNT-*in vitro*-Translations-Kit von Promega verwendet. In dieser Methode werden Transkription und Translation gekoppelt. Die Reaktionen wurden entweder in RRL (*rabbit reticulocyte lysate*, Promega) oder in WG (*wheat germ extract*, Promega) durchgeführt. Es wurden jeweils 25 µl RRL bzw. WG, 1 µg Plasmid-DNA, 1 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin, 2 µl L-[³⁵S] Methionin, 2 µl Puffer, 1 µl Polymerase sowie 18 µl ddH₂O gemischt und der Ansatz für 90 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Ein Aliquot von 2 µl der fertigen Proben, wurde über SDS PAGE aufgetrennt, getrocknet und anschließend auf einen Film (Biomax-MR oder X-Omat Blue XB-1) exponiert. Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtstandards (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas; Dual Color Marker, Bio-Rad) wurden zur Bestimmung und Überprüfung der Proteingrößen verwendet.

II.2.2.11 *In vitro*-Ubiquitinierungen

Für RLIM-abhängige *in vitro*-Ubiquitinierungen, wurde als Substrat 2-5 µl ³⁵S-markiertes TNT-Protein in Gegenwart von GST-RLIM, 50 ng E1 Enzym (Biotrend), 50 ng bakteriell exprimiertem E2 Enzym (His-UbcH5b), 4 µg Ubiquitin (Sigma), 2 mM DTT, 4 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl und 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) für 2 h bei 30°C in einem 50 µl Ansatz inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 50 µl 2x Laemmli gestoppt, 5 min gekocht und über SDS PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden 30 min in 40% Methanol mit 10% Essigsäure fixiert und anschließend 15 min in *Amplify* Lösung (Amersham Pharmacia) inkubiert. Nach Trocknung des Gels, wurde über Nacht ein Kodak Biomax Film exponiert.

II.2.2.12 Immunpräzipitation

Für den Nachweis von Protein-Interaktionen in Zellen, wurden Koimmunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden MCF7 Zellextrakte zunächst 1 h mit Protein A-gekoppelten Sepharose-Kügelchen, die zuvor in NETN-Lösung äquilibriert wurden, bei 4°C drehend inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen durch 1-2 min Zentrifugation bei 2000 Upm sedimentiert. Die Überstände wurden abgenommen und 1 h mit 5-10 µl spezifischen Antikörpern bzw. Prä-Immunsereum, oder unspezifischen IgGs als Negativ-Kontrolle, bei 4°C drehend inkubiert. Nach Zugabe von frischen Sepharose-Kügelchen, wurde 4 h weiter bei 4°C drehend inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen durch 1-2 min Zentrifugation bei 2000 Upm sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Sepharose-Kügelchen wurden dann dreimal mit NETN-Puffer gewaschen und schließlich in 3x Laemmli-Puffer aufgenommen, um 5 min bei 100°C aufgeköcht zu werden. Danach wurden die Sepharose-Kügelchen durch 1 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 Upm) sedimentiert und verworfen. Der Nachweis von Interaktionspartnern erfolgte durch Analyse des Überstandes mittels SDS PAGE und darauf folgender Western Blot-Detektion mit spezifischen Antikörpern.

II.2.2.13 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zum „*Crosslinking*“ von Proteinen und DNA, wurden MCF7 Zellen zweimal mit vorgewärmten PBS (37°C) gewaschen und dann bei 37°C mit 1% Formaldehyd/PBS im Brutschrank für 5 min inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, dann abgeschabt und erneut zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Dazwischen, wie auch bei den folgenden Zentrifugationsschritten, wurden sie für 5 min bei 2000 rpm im HB4-Rotor abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in hypotonen RSB-Puffer (10 mM Tris pH 8,3 mM MgCl₂, 10 mM Natriumbisulfit, 5 ml Puffer pro 4 Platten à 25 mm Durchmesser) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert, mit einem Dounce-Homogenisator mechanisch aufgeschlossen (12 Stöße) und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation erhält man das Nukleoprotein im Pellet, das zweimal mit RSB-Puffer und einmal mit SNSB-Puffer (1 M NaCl; 10 mM Tris pH 7,4; 0,1% NP-40; 1 mM EDTA; 10 mM Natriumbisulfit) gewaschen und anschließend in 3 ml NSB-Puffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA; 10 mM Natriumbisulfit) aufgenommen wurde. Nukleoprotein, freie DNA und freie Proteine wurden mit einem dreistufigen Cäsiumchloridgradienten (1,75; 1,5; 1,3 mg/ml CsCl) durch Ultrazentrifugation bei 37000 g aufgetrennt. Danach wurde das gereinigte Nukleoprotein für 1 h gegen 1 Liter TE/ 1 M NaCl/ 10 mM Natriumbisulfit, 3 h

gegen 3 Liter TE/ 10 mM Natriumbisulfit und 1 h gegen 1 Liter frischen TE/ 10 mM Natriumbisulfit dialysiert. Nach der Dialyse erfolgte eine Sonifikation (zehnmal 10 Impulse, Stufe 5) und die DNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch bei OD 260 bestimmt. Ungefähr 10 µg DNA wurden dann mit 10 U *Micrococcal Nuclease* in TE mit 3 mM CaCl₂ und 10 mM Natriumbisulfit für 15 min bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt, die Proben abzentrifugiert und der Überstand für die Chromatin-Immünpräzipitation eingesetzt. Diese erfolgte mit 10 µg der jeweiligen Antikörper in 1x NET-Puffer (50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% NP-40) bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Immunkomplexe an Protein A-Sepharose-*Beads* gekoppelt und dazu mit 50 µl 50%iger NET-Lösung für 2 h bei RT gerollt. Um die präzipitierten Proteine im Western Blot zu untersuchen, wurden die *Beads* fünfmal mit RIPA (50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1% NP40; 0,5% Natriumdeoxycholat; 0,1% SDS), einmal mit LiCl-Waschpuffer (10 mM Tris pH 8; 250 mM LiCl₂; 0,5% NP40; 0,5% Natriumdeoxycholat; 1 mM EDTA), dreimal mit TE gewaschen und anschließend mit 2% SDS, für 30 min bei 37°C eluiert. Zur späteren Präparation der DNA erfolgte ein stringenteres Waschen: achtmal mit RIPA, dreimal mit LiCl-Waschpuffer und fünfmal mit TE. Eluiert wurde hier mit 1% SDS in TE-Puffer in 2 Schritten à 150 µl, die vereinigt worden. Um die *Crosslinks* zu revertieren, wurden sowohl die Immünpräzipitate als auch Input und Überstand, in 2% SDS (bzw. 1% SDS für spätere DNA Präparation) für 3 h bei 65°C inkubiert. Die Western Blot-Proben wurden anschließend gefällt und die Proteinpellets in 2% SDS aufgenommen, mit Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS PAGE und Western Blot untersucht. Die DNA-Proben wurden mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion und einer Ethanol-Fällung aufgereinigt, die DNA Pellets getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

II.2.3 Methoden der Zellkultur

II.2.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen RLIM

Es wurde ein spezifisch RLIM erkennender monoklonaler Antikörper hergestellt. Als Antigen diente hierzu ein N-terminales GST-Fusionsprotein des murinen RLIM-Proteins. Dieses Fusionsprotein wurde zunächst in Bakterien exprimiert und anschließend als GST-Protein aufgereinigt (Abschnitt II.2.2.3). Die Proteinmenge wurde auf einem SDS PAGE-Gel anhand einer BSA-Eichreihe ermittelt. Die Proteine wurden C57BL6-Mäusen intramuskulär injiziert. Pro Injektion wurden 150 µg des Proteins verwendet. Dieses wurde 1:1 mit Freund's *Complete Adjuvants* (Sigma) durch Sonifizierung vermischt und den Tieren intramuskulär injiziert. Nach 14 Tagen wurden den C57BL6-Mäusen die Darmbein-Lymphknoten (*iliaci medialis*)

entnommen und aus diesen antikörperproduzierende B-Zellen isoliert. Da B-Zellen in Kultur nur für ca. 7-8 Tage kultivierbar sind, wurden diese mit Myeloma Zellen (Krebszellen, SP2), in einem Verhältnis von 5:1, fusioniert. Dieser Prozess wurde durch eine Polyethylenglycol (PEG) vermittelte Behandlung gefördert. Myelomazellen haben den Vorteil, dass sie für unbegrenzte Zeit kultivierbar sind, während B-Zellen den Vorteil haben unbegrenzt RLIM erkennende, also monoklonale, Antikörper produzieren zu können. Bereits nach 24 h konnten die ersten fusionierten Zellen, auch Hybridome genannt, identifiziert werden. Um fusionierte von nicht fusionierten Zellen zu trennen, wurde das HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-Selektionsmedium (Hybridoma-SFM, Gibco) ausgewählt. Nur erfolgreich fusionierte Zellen sind in der Lage in diesem Medium zu überleben. Durch eine sogenannte Klonierung, wurden anschließend die nach 5-7 Tagen entstandenen Hybridoma Kolonien auf 96-Kavitäten Schalen vereinzelt und erneut für 3-5 Tage kultiviert. Zur genauen Bestimmung der Spezifität jedes Hybridomaklons, wurde das Medium jeder einzelnen Kolonie abgenommen. Getestet wurde ihre Spezifität zunächst in einem ELISA Verfahren (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Als Antigen wurde das bereits zur Immunisierung der Mäuse verwendete GST-RLIM Fusionsprotein verwendet, welches an eine 96-Kavitäten Schale gebunden wurde. Um Antigen-Antikörper Komplexe zu bilden, wurden 50 µl des Hybridoma-Zellkultur Mediums in die antigenpräsentierenden Kavitäten pipettiert. Nach einer 60 min Inkubation bei Raumtemperatur, wurde dreimal mit TBS-T Puffer (100 mM Tris-HCL pH 7,5; 1 M NaCl, 1% Tween20) gewaschen. Zur Detektion dieser Komplexe, wurde das alkalische Phosphatase System (Sigma) verwendet. Hierfür wurde ein gegen Maus gerichteter zweiter Antikörper, gekoppelt an die alkalische Phosphatase, verwendet. Dieser bindet nun an die vorhandenen Antigen-Antikörper Komplexe. Nach einer erneuten Inkubation bei RT für 30 min, wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Mit Hilfe eines Chromogens (*p*-Nitrophenylphosphat), wurde die Farbreaktion ausgelöst. Da die alkalische Phosphatase den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat abspaltet, entsteht *p*-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens, hier RLIM, in der Probe. Diese so identifizierten spezifisch RLIM erkennenden Antikörper, wurden anschließend weiteren immunologischen Nachweisverfahren unterzogen. Die Hybridoma Zellen wurden für eine Langzeitaufbewahrung bei -80°C gelagert.

II.2.3.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die verwendeten MCF7 Zellen wurden in HAM's F12 *High Glucose* Medium, HEK-293T und α T3-Zellen in DMEM. Alle Zelllinien wurden in Gegenwart von 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für hormonfreie Untersuchungen wurden MCF-7-Zellen für mindestens 24 h in DMEM (Phenolrotfrei) und in Gegenwart von 10% hormonfreiem Kälberserum mit denselben Zusätzen und unter denselben Bedingungen gehalten. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen 1:10 verdünnt bzw. passagiert. Zum Ablösen der Zellen von der Schale, wurde Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco-BRL) verwendet.

II.2.3.3 Lagerung von Säugerzellen

Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin-EDTA von den Schalen gelöst, in FCS/Medium/DMSO (5:4:1) aufgenommen und in Aliquots von 1 ml auf Einfrierröhrchen verteilt. Diese wurden in einer Styroporkiste langsam auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

II.2.3.4 Transfektion von MCF7 Zellen mit Lipofectamine® 2000

MCF7 Zellkulturen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers mit Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) transfiziert. Das Medium der Zellen wurde vor der Transfektion abgenommen und durch das serumfreie Medium Opti-MEM® I (Invitrogen) ersetzt. Plasmid-DNA und siRNA wurden, wie auch das Lipofectamine® 2000, ebenfalls in Opti-MEM® I vorbereitet. Für Zellen in 24-Kavitäten-Platten, wurden pro Kavität 0,8 µg DNA bzw. 40 pmol siRNA mit jeweils 2 µl Lipofectamine® 2000 in insgesamt 100 µl Opti-MEM® I eingesetzt. Für Kulturen in 3 cm Schalen, wurden jeweils 4 µg DNA bzw. 200 pmol siRNA mit 8 µl Lipofectamine® 2000 in insgesamt 500 µl Opti-MEM® I verwendet. Nach der Zugabe des Transfektionsmixes, wurden die Kulturen für 1 h bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Kulturschalen mit frischem und vorgewärmtem Medium ersetzt.

II.2.3.5 Transfektion mit Polyethanolimin (PEI)

HEK-293T-Zellen wurden auf 10 cm Schalen ausgesät und wachsen gelassen, bis eine Konfluenz von 60-70% erreicht war. Etwa 1 h vor der Transfektion, wurde das gesamte Medium (10 ml) abgesaugt und durch 5 ml neues Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz für eine Schale enthielt 10 µg DNA und 240 µl PBS. In einem anderen Gefäß wurden 40 µl

des organischen Makromoleküls PEI (10 mM) mit 240 µl PBS vermischt, dieses Gemisch zum Transfektionsansatz gegeben und 10 sec gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT, wurden die Ansätze langsam und vorsichtig auf die einzelnen Platten pipettiert. Nach einer 4-5-stündigen Inkubation der Platten bei 37°C, wurde das Medium abgesaugt und 10 ml neues Medium dazugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und Zellextrakte hergestellt.

II.2.3.6 Transfektionen mit Calciumphosphat

HEK-293T-Zellen wurden entweder in 6- oder 10 cm Schalen ausgesät bis eine Konfluenz von 50-60% erreicht war. Ungefähr 30 min vor der Transfektion, wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht. Es wurden 7,5-15 µg DNA mit vorgelegten 450 µl TE (0,1x Labor TE Puffer) vermischt und mit 50 µl CaCl₂ (2,3 M) ca. zehnmal resuspendiert. Parallel wurde in ein 15 ml Schraubdeckel-Gefäß, 500 µl HBP Puffer (5 M NaCl; 0,5 M HEPES pH 7,1; 0,15 M Na₂HPO₄) pipettiert und anschließend die DNA-Calcium Komplexe tröpfchenweise in den HBP Puffer pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die jeweiligen Ansätze vorsichtig auf die Zellkulturplatten pipettiert. Nach 12 h wurden die Schalen mit PBS gewaschen und in neuem Zellkulturmedium aufgenommen.

II.2.3.7 Retrovirale Infektionen von MCF7 und αT3 Zellen

Um eine effiziente Herunterregulierung von Transkripten bzw. endogenen Proteinen zu erreichen, wurde das retrovirale Infektions System genutzt. Für die Synthese der Viren, wurden HEK-293T-Zellen verwendet. Hierzu wurden mit der Calciumphosphat-Methode (Abschnitt II.2.3.6) je 7,5 µg vom pEcoPac Vektor und dem jeweiligen Genexpressions-Vektor transfiziert. Nach 12 h wurde das Medium erneuert und für weitere 24 h inkubiert. Dann konnte das Medium mit den enthaltenen Viren abgenommen werden. Einen Tag zuvor wurden MCF7 oder αT3 Zellen auf 6 cm Schalen ausgesät und diese mit 2 ml Viren und 1 ml frischem Medium versetzt. Um die Infektionseffizienz zu steigern, wurde zusätzlich 3 µl Polybrene (Sigma) in die Schalen pipettiert. Je nach Versuch, wurden die Zellen über einen Zeitraum von bis zu 72 h infiziert.

II.2.3.8 Immunzytochemische Detektion von Proteinen in Säugerzellen

Um transfizierte oder endogene Proteine in Säugerzellen nachzuweisen, wurden immunzytochemische Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten ausgesät, in welche zuvor sterile Glasplättchen gelegt worden waren. So wuchsen die Zellen auf den Glasplättchen. Haben die Zellen eine

Konfluenz von 50-60% erreicht, so wurde, gegebenenfalls wie in Abschnitt II.2.3.4 beschrieben transfiziert.

Nach 24 h, oder bei nicht transfizierten Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90%, wurden die Zellen 20 min bei 4°C in 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 5 min in 0,5% PBST inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten in PBS, wurden die Zellen 1 h in einer Blockierlösung (PBST + 1% BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Nach Blockierung wurden die Zellen mit einem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, welcher zuvor in PBS + 0,1% BSA verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4°C, oder bei RT für mindestens 1 h. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS, wurde ein Fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper (in PBST + 0,1% BSA) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 h im Dunkeln, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Mitunter wurde dem PBS 1:1000 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) zugegeben. Dieses bewirkt eine Zellkerngegenfärbung, die mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. So ist es später möglich vitale und intakte Zellen auszumachen. Es folgten zwei weitere Waschschrritte mit ddH₂O. Anschließend wurden die Glasplättchen mit den Zellen auf Objektträger gebracht. Hierzu wurde Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) verwendet. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Färbung der Zellen wurde mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (Leica DM IRBE, Heidelberg) mit Scanner (Leica TCS SPII) dokumentiert.

II.2.3.9 Applikation der Proteasom-Inhibitoren MG132 und Lactacystin

Um die Proteasom-Aktivität in den Zellen zu inaktivieren, wurden MCF7 Zellkulturen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 oder Lactacystin (Boston Biochemicals) behandelt, welches ungehindert in Zellen diffundieren kann. Dafür wurde MG132 oder Lactacystin (10 mg/ml in EtOH) zum Medium mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzugefügt. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit von 1-8 h geerntet bzw. für immunzytochemische Untersuchungen fixiert.

II.2.3.10 Applikation mit 17β Östradiol

Um in Brustkrebszellen den Öströgen Rezeptor α zu aktivieren, wurde hormonfreiem Zellkulturmedium, 17β Östradiol (Sigma) zugefügt. Je nach Versuchsansatz wurde eine Endkonzentration von 1-10 µM eingesetzt.

II.2.3.11 Luziferase Reporter-Experimente

Zur Messung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, können Reporter-Gen-Assays verwendet werden. Dabei wird die Expression von sogenannten Reporter-Genen gemessen, die von Promotoren mit artifiziellen oder natürlichen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor getrieben werden. Die Transkriptionsrate des Reporter-Genes wird umso höher, je aktiver der Transkriptionsfaktor ist. Die Leuchtkafer-Luziferase ist ein sehr sensibles Enzym. Es katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luziferin unter Emission von Licht. Unter Substratsättigung ist die Enzymaktivität proportional zur gebildeten Enzymmenge und somit zur Aktivität des Transkriptionsfaktors. Gemessen wurde die Aktivität bzw. Wirkung von ER α auf das so genannte „*estrogen response elements*“ (ERE). Das Einsetzen des Kontrollvektors pRL-TK, welcher die Renilla-Luziferase exprimiert, diente als interne Transfektionskontrolle und minimiert experimentelle Variabilitäten. Der Luziferase-Assay wurde mit dem Dual-Luziferase Reporter-Assay System (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen aktiv lysiert, für 20 min bei 10.000 Upm zentrifugiert und vom gewonnenen Lysat, 30 μ l für luminometrische Messungen eingesetzt. Die Messung erfolgte mit einem Luminometer (TD-20/20, Turner-Design). Von allen Werten der transfizierten Zellen, wurde der Wert der unbehandelten Zellen subtrahiert und die Luziferase-Aktivität als Verhältnis von Renilla-Luziferase-Aktivität dargestellt.

II.2.4 Arbeiten mit Gewebeschnitten

II.2.4.1 Kryoschnitte von Maus-Gewebe

Mausembryonen bzw. entsprechende Gewebe adulter Mäuse, wurden in 4% PFA in PBS (pH 7,4) mindestens 1,5 h bei 4°C leicht schwenkend fixiert. Anschließend wurden die Mäuse/Gewebe in PBS gewaschen und über Nacht in 30% (w/v) Sucrose enthaltendem PBS, bis zum Absinken, inkubiert. Abgesunkene Mäuse/Gewebe, wurden in *Tissue-Tec*[®] (Sakura) O.C.T. (*optimal cutting temperature compound*) eingebettet und bei -80°C eingefroren. Die gefrorenen Embryonen wurden, nach Bedarf, mit dem Kryostat in 10 μ m dicke Gewebestücke geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden anschließend bei -80°C eingelagert oder für immunhistochemische Untersuchungen weiterverwendet.

II.2.4.2 Vibratomschnitte von Maus-Gewebe

Mausembryonen bzw. entsprechende Gewebe, wurden in 4% PFA in PBS (pH 7,4) über Nacht leicht schwenkend fixiert. Anschließend wurden sie durch folgende Alkoholreihe geführt: 10% EtoH, 20% EtoH, 40% EtoH, 60% EtoH, 80% EtoH, 96% EtoH. Fixierte

Embryonen/Gewebe können im absoluten Ethanol bei -20°C gelagert werden. Für immunhistochemische Untersuchungen, wurden sie dann in umgekehrter Reihenfolge wieder durch die Alkoholreihe geführt. Die Inkubationszeit betrug 20 min pro Ethanolkonzentration. Im Anschluss wurden die Embryonen/Gewebe nach dem Waschen mit PBS in 6% Agarose eingebettet. Nach Erhärten der Agarose, wurden die Embryonen mit einem Vibratom (Leica) in einem PBS-Bad geschnitten. Die Schnittdicken betragen $40\text{-}60\ \mu\text{M}$ und repräsentierten dadurch mehrere Zellschichten des Gewebes. Die Gewebeschnitte wurden sofort für die darauf folgenden Untersuchungen weiterverwendet.

II.2.4.3 Immunhistochemie von Kryoschnitten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen, wurden die eingefrorenen Kryoschnitte aufgetaut und mit einem wasserabweisenden Stift umzirkelt. Das Gewebe wurde mit PBST und 10% Pferdeserum für 15 min bei RT permeabilisiert und gleichzeitig blockiert. Die primären Antikörper wurden in PBS + 1% Pferdeserum verdünnt und direkt nach der Entfernung des Blockierungs-Puffers auf das Gewebe gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C . Die primären Antikörper wurden abgenommen und das Gewebe dreimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper, welche ebenfalls in PBST und 1% Pferdeserum verdünnt waren (1:1000), für 2 h bei 4°C auf die Gewebe gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurde abschließend mit ddH_2O gewaschen und die Schnitte auf Objektträgern mit Vectashield Mounting Medium (Vector-Alexis) eingedeckelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Fluoreszenz-Signale wurden mit einem Scanner (Leica TCS SPII, Heidelberg), welcher an ein konfokales Lasermikroskop (Leica) angeschlossen war, dokumentiert.

II.2.5 Primerliste

Anwendung	Gen	Sequence
ChIP	CathepsinD	5'-TCCAGACATCCTCTCTGGAA-3'
ChIP	CathepsinD	5'-GGAGCGGAGGGTCCATTC-3'
qRT-PCR	36B4	5'-GATTGGCTACCCAAGTGTG-3'
qRT-PCR	36B4	5'-CAGGGGCAGCAGCCACAAA-3'
qRT-PCR	pS2 hnRNA For	5'-TTGAGAAGGAAGCTGGATGG -3'
qRT-PCR	pS2 hnRNA Rev	5'-ACCACAATTCTGTCTTTCACGG -3'
qRT-PCR	RLIM For	5'-AAATTAAAGAAGGCCACCA-3'
qRT-PCR	RLIM Rev	5'-GCTCTCCAAGATTGGTTTCC-3'
qRT-PCR	CLIM2 For	5'-ACACACCATATGGCAACCAA-3'
qRT-PCR	CLIM2 Rev	5'-GTGATGGTCAACATGGCATC-3'
Mutagenese	CLIM2 Δ LiL For	5'-CTACCTCCGAGCATGTGTGGCAGCAGAGCCCATGCAG-3'
Mutagenese	CLIM2 Δ LiL Rev	5'-CTGCATGGGCTCTGCTGCCACACATGCTCGGAGGTAG-3'

III. Ergebnisse Teil 1

III.I.1 Die Rolle von CLIM Kofaktoren in LIM-HD-Multiproteinkomplexen

Die LIM-Domäne besitzt sowohl positive als auch negative Funktionen für die Aktivität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren: Positive Funktionen wurden u.a. dadurch gezeigt, dass LIM-Domänen in LIM-HD-Transkriptionsfaktoren notwendig für die synergistische Aktivierung von Zielgenen mit anderen Transkriptionsfaktoren waren (Bach *et al.*, 1995). Negative Funktionen von LIM-Domänen wurden für Lhx1 gezeigt. Nur bei Deletion der LIM-Domäne, war Lhx1 bei Überexpression in *Xenopus* Embryonen in der Lage eine zweite Körperachse hervorzurufen (Taira *et al.*, 1994). Vor Beginn meiner Doktorarbeit wurde gezeigt, dass eine Interaktion der LIM-Domäne von LIM-HD-Proteinen mit der LIM-Domäne von CLIM Kofaktoren für die *in vivo* Aktivität der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung ist (Visvader *et al.*, 2003). Dies erklärte die positiven Funktionen der LIM-Domäne, obwohl die molekularen Mechanismen die diese positive Wirkung erklären könnten, unbekannt waren. Da CLIM mit hoher Affinität an LIM-Domänen bindet und LMO2 *in vitro* vor Ubiquitinierungen durch RLIM geschützt wird (Ostendorff *et al.*, 2002), stellten wir die Hypothese auf, dass eine Interaktion mit CLIM die Proteinstabilität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Diese Hypothese sollte in zwei verschiedenen, komplementären Modellsystemen getestet werden: i) Als Zellkultursystem sollte die Maus Hypophysen-Zelllinie α T3 verwendet werden. Diese Zelllinie hat den Vorteil, dass alle zu untersuchenden Proteine endogen exprimiert werden; ii) als ein weiteres Modellsystem sollte hier in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Becker (Edinburgh, England), das Zebrafischsystem zum Einsatz kommen. Dieses entwicklungsbiologisch relevante System erlaubt einen direkten Vergleich von Proteinstabilitäten *in vivo*. So bieten mRNA Injektionen in Zebrafisch-Embryonen (1-2 Zellstadium) die Möglichkeit eines direkten Vergleichs von spezifisch translatierten Überexpressionskonstrukten über einen bestimmten Zeitraum (Becker *et al.*, 2003).

III.I.1.1 CLIM Kofaktoren stabilisieren LIM-HD-Transkriptionsfaktoren

Proteasomale Regulation zellulärer Konzentrationen von Lhx3 und CLIM

Damit unsere Hypothese analysiert werden kann, müssen zunächst mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Um zu prüfen, ob der proteasomale Abbauweg an der Regulation zellulärer LIM-HD-Proteinkonzentrationen beteiligt ist, wurden α T3 Zellen kultiviert und die Effekte einer Inhibition der proteasomalen Aktivität auf die endogenen Lhx3-Proteinkonzentration analysiert. Dafür wurden die Zellkulturen mit ansteigenden Konzentration (1-8 μ M) des

Proteasom-Inhibitors Lactacystin für insgesamt 6 h inkubiert oder blieben unbehandelt und dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Proteinextrakte mittels SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren analysiert.

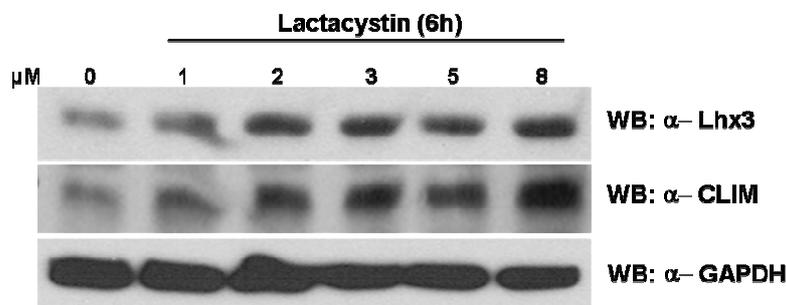


Abbildung III.I.1 Proteasomale Regulation von Lhx3 und CLIM-Proteinen in α T3 Zellen.

Western Blot-Analysen von Proteinlysaten Lactacystin behandelter α T3 Zellen. Die Zellkulturen wurden entweder für 6 h mit ansteigenden Lactacystin-Konzentrationen (1,2,3,5,8 μ M) behandelt oder blieben unbehandelt und dienten als Kontrolle (0 μ M). Anschließend wurden die Proteinlysate über SDS PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Verfahren auf Lhx3-Proteinkonzentrationen, mit spezifischen Antiserum aus Meerschweinchen, hin untersucht. Als Positiv-Kontrolle für proteasomalen Abbau, diente eine Detektion von CLIM-Proteinen mit Antiserum aus Kaninchen. In Lactacystin-behandelten Zellen ist die Akkumulation von Lhx3- und CLIM-Proteinen, durch Inhibition des Proteasoms, konzentrationsabhängig. Eine Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen GAPDH aus Maus, diente als Ladekontrolle.

Es konnte gezeigt werden, dass das LIM-HD-Protein Lhx3 und CLIM Kofaktoren in α T3-Zellen proteasomal reguliert werden. Die Inkubation mit einer Konzentration von 2 μ M Lactacystin, führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen, zu einem deutlichen Anstieg der Lhx3-Proteinkonzentrationen in Proteinextrakten der α T3 Zellkulturen. Bei einem Einsatz von 3-8 μ M Lactacystin nahm die Akkumulation der Lhx3-Proteine weiter zu. Somit war die Zunahme der Proteinkonzentrationen beider Proteine, die Folge einer konzentrationsabhängigen Inhibition des Proteasoms. Auch für CLIM Kofaktoren wurde eine deutliche Zunahme zellulärer Proteinkonzentrationen beobachtet. Die Konzentrationszunahme beider Proteine konnte durch Inhibition des Proteasoms mit einem weiteren Inhibitor, dem MG132, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat zeigt, dass die Proteinkonzentrationen der LIM Netzwerk Proteine Lhx3 und CLIM über den proteasomalen Abbauweg reguliert werden.

Um unsere Hypothese zu testen, sollte vorerst in Überexpressions-Experimenten untersucht werden, ob die Bindung von CLIM Kofaktoren einen direkten Einfluss auf die Proteininstabilität von LIM-HD-Proteinen hat. So wurde in α T3 Zellen ein dominant-negatives CLIM Protein (DN-CLIM; Abb. III.I.2A) überexprimiert, welches die LIM-Interaktionsdomäne enthält aber die Fähigkeit zur Dimerisierung verloren hat. Bei

Überexpression kompetiert DN-CLIM mit endogenem CLIM um die Bindung an LIM-Domänen und hemmt die Aktivität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren (Bach *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2002). Hierzu wurden α T3 Zellen mit einem Expressionskonstrukt für Myc-Epitop-markiertes DN-CLIM transient transfiziert und für weitere 30 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und sowohl RNA- als auch Proteinextrakte mit SDS PAGE, Western Blot-Verfahren und *Real Time* RT-PCR analysiert. Um zu überprüfen, ob ein gegebener Effekt dieser Überexpression entweder auf Ebene der Induktion des Lhx3 Gens oder auf dessen posttranslationalen Modifikationen beruht, sollte parallel zum Western Blot-Verfahren und Analyse der Proteinextrakte, mittels *Real Time* RT-PCR die relative mRNA-Menge des Lhx3 Gens quantitativ analysiert werden.

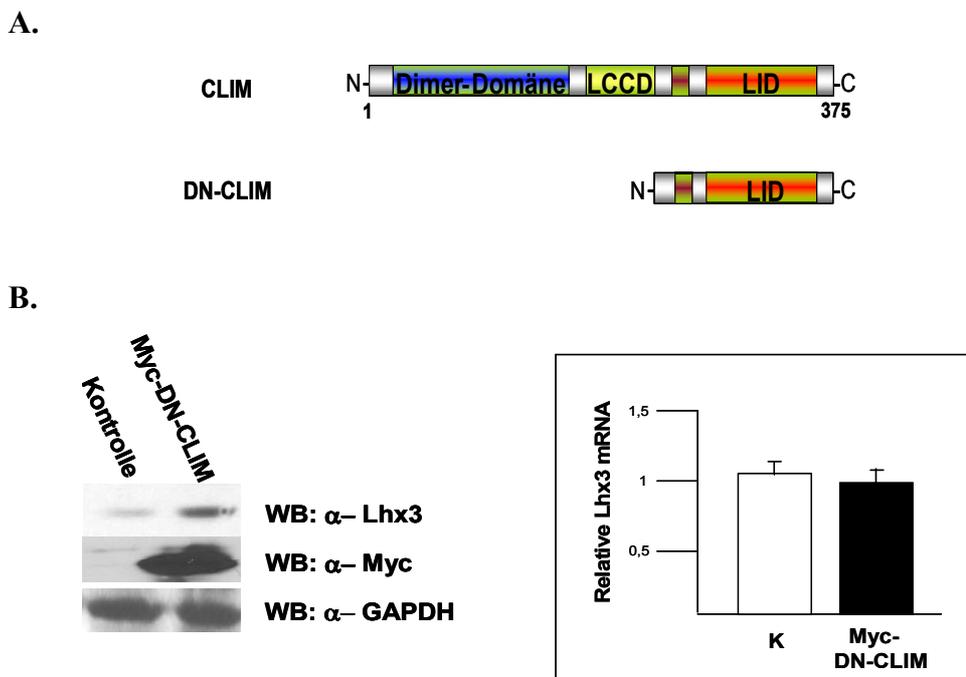


Abbildung III.I.2 Der Einfluss von DN-CLIM auf die Proteinkonzentration von Lhx3 in α T3 Zellen.

A. Dargestellt ist die in diesem Versuch verwendete CLIM-Deletionsmutante (DN-CLIM) und im Vergleich das Wildtyp CLIM-Protein. Hervorgehoben sind Protein-Domänen farblich: N-terminal die Dimer(isierungs)-Domäne (Blau), gefolgt von der LCCD-Domäne (*Ldb/Chip conserved domain*) (Gelb) und der C-terminalen LIM-Interaktions-Domäne (LID) (Rot). DN-CLIM: dominant-negatives CLIM-Protein; es fehlt die Dimerisierungsdomäne zur Kofaktor abhängigen Funktion und die LCCD-Domäne. **B. Links.** Western Blot-Analysen von Proteinextrakten überexprimierter α T3 Zellen. Mittels transients Transfektion, wurde entweder ein Leer-Konstrukt (Kontrolle) oder ein Expressionskonstrukt für Myc-DN-CLIM (Myc-Fusionsprotein) transfiziert. Der Western Blot wurde mit spezifischen Antiseren gegen Myc, Lhx3 und GAPDH (Ladekontrolle) hybridisiert. **Rechts.** Säulendiagramm der quantitativen *Real Time* RT-PCR zum Nachweis eines posttranslationalen Einflusses von Myc-DN-CLIM auf Lhx3, amplifiziert mit Lhx3-spezifischen Primern. Die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen wurden auf die relative Aktin mRNA Menge normiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von DN-CLIM zu einer Akkumulation von endogenem Lhx3-Protein führt, während die für Lhx3 kodierende mRNA nicht betroffen war. Weiterhin war diese Akkumulation abhängig von der LIM-Interaktionsdomäne (LID), da die Überexpression einer LID-Deletionsmutante von CLIM zu keiner Akkumulation von Lhx3 führte (Daten nicht gezeigt). Gleichbleibende GAPDH Proteinkonzentrationen zeigten an, dass DN-CLIM keinen allgemeinen Einfluss auf die Translation von mRNA hat. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die detektierten erhöhten Konzentrationen von zellulärem Lhx3-Protein, die Folge einer DN-CLIM-assoziierten Stabilisierung sind.

Eine weitere Voraussetzung für den Beweis unserer Hypothese war, dass LIM-Domänen in LIM-HD-Proteinen als Instabilitätsdomäne fungieren. Um dies zu untersuchen wurden mRNA Moleküle, welche für Lhx3 in voller Länge (Myc-Lhx3) oder LIM-Domänen-deletiertes Lhx3 (Myc-Lhx3 Δ LIM) kodieren, in Zebrafisch-Embryonen injiziert. Nach 5 oder 24 h post-Injektion (*hpf*; *hours postfertilization*) wurden Proteinkonzentrationen mittels Immunhistochemie und relative mRNA Konzentration mittels *Real Time* RT-PCR verifiziert.

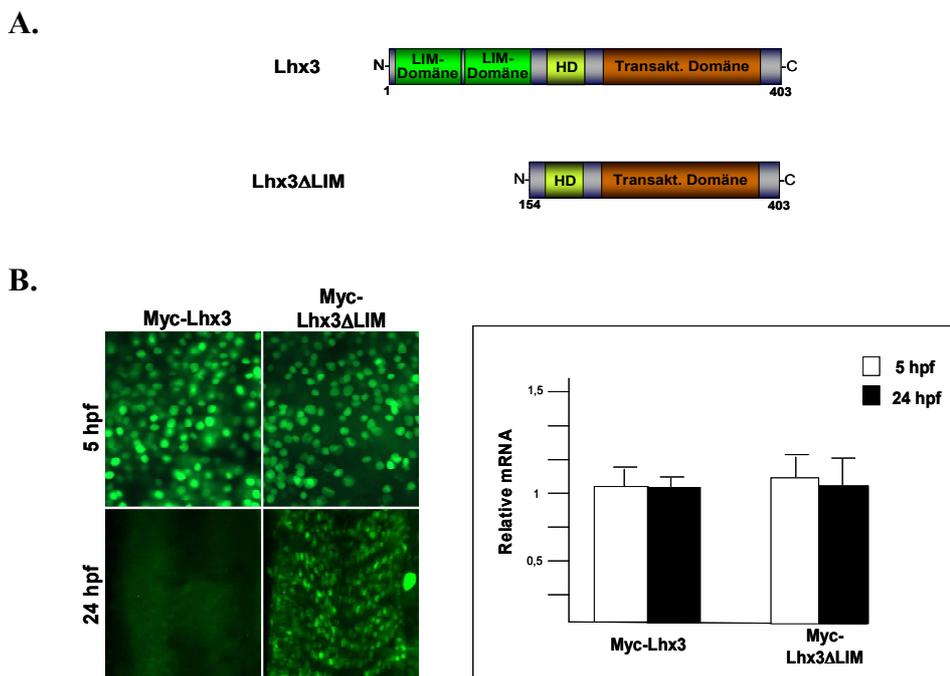


Abbildung III.1.3 Die LIM-Domäne stellt eine Instabilitätsdomäne in Zebrafisch-Embryonen dar.

A. Dargestellt sind die in diesem Versuch verwendeten Überexpressions-Konstrukte, kodierend für Lhx3 in voller Länge und das LIM-Domänen-deletierte Lhx3 Δ LIM. Ziffern weisen auf jeweilige Aminosäuren hin. N-terminal die zwei LIM-Domänen (Grün), gefolgt von der Homöodomäne (HD) zur DNA-Bindung und C-terminal die Transaktivierungs-Domäne (Braun). Lhx3-Proteine wurden als Myc-Fusionsproteine exprimiert; als Vektor diente pCS2-MT. **B.** *Links.* Immunhistochemische Färbung von Zebrafisch-Embryonen, injiziert mit mRNA kodierend für Myc-Lhx3 oder Myc-Lhx3 Δ LIM. Embryonen wurden nach 5 oder 24 *hpf* fixiert und mit einem spezifischen c-Myc Antikörper inkubiert. Die Überexpression beider Proteine kann bereits nach 5 *hpf* detektiert werden. Nach 24 *hpf* war Lhx3 Δ LIM weiterhin gut detektierbar, während Myc-Lhx3 kaum detektierbar gewesen ist. *Rechts.* Säulendiagramm der

quantitativen *Real Time* RT-PCR, als Nachweis gleichbleibender mRNA Konzentrationen. Eingesetzt wurden spezifische Primer zur Amplifikation des Myc-Epitops. Das Säulendiagramm zeigt vergleichbare relative mRNA Konzentrationen von Myc-Lhx3 und Myc-Lhx3 Δ LIM nach 5 und 24 *hpf*. Die Mittelwerte der mRNA Konzentrationen aus Dreifachbestimmungen wurden auf die relative Aktin-mRNA Menge normiert.

Während Myc-Lhx3 nach 24 h nicht mehr zu detektieren war, konnte Myc-Lhx3 Δ LIM weiterhin detektiert werden. Da die quantitativen *Real Time* RT-PCR Analysen vergleichbare mRNA Konzentrationen für Myc-Lhx und Myc-Lhx3 Δ LIM nachwiesen, zeigen diese Experimente, dass die Stabilitätsunterschiede beider Proteine nicht auf veränderten Genexpressionen beruhen. In ähnlichen Experimenten konnte durch die Verwendung eines Antiserums gegen einen weiteren LIM-HD-Transkriptionsfaktor, dem Isl1, die LIM-Domäne ebenfalls als Instabilitäts-Domäne identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Durch weitere Überexpressions-Experimente sollte der direkte Einfluss von DN-CLIM auf die Lhx3-Proteinstabilität im Zebrafisch-System untersucht werden. Hierzu wurde Myc-Lhx3 kodierende mRNA mit und ohne mRNA kodierend für DN-CLIM (keine Myc-Fusion) in Zebrafisch-Embryonen koinjiziert. Nach 5 und 24 *hpf* wurden vorliegende Proteinkonzentrationen immunhistochemisch analysiert.

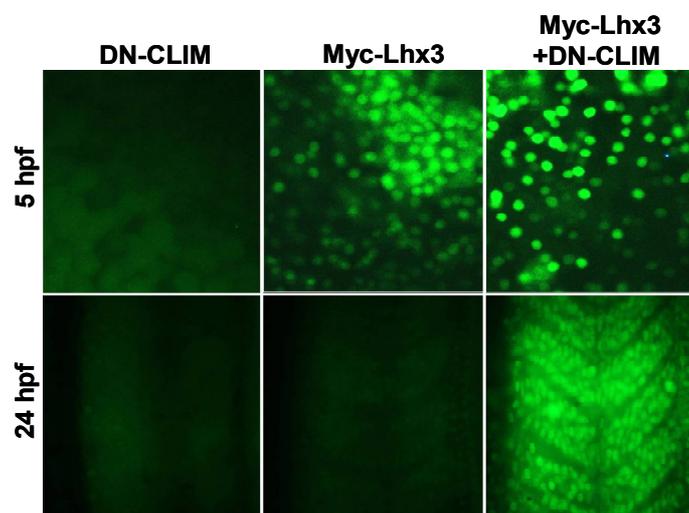


Abbildung III.I.4 DN-CLIM stabilisiert LIM-HD-Transkriptionsfaktoren in Zebrafisch-Embryonen.

Immunhistochemische Färbung von Zebrafisch-Embryonen, injiziert mit mRNA Molekülen, kodierend für DN-CLIM (keine Myc-Fusion), Lhx3 (Myc-Lhx3) oder koinjiziert mit Lhx3 (Myc-Lhx3) und DN-CLIM (keine Myc-Fusion). Zebrafisch-Embryonen wurden nach 5 oder 24 *hpf* fixiert und mit einem spezifisch c-Myc erkennenden Antikörper inkubiert. Nach 5 *hpf* kann nach Injektion des DN-CLIM Konstruktes als Negativkontrolle keine spezifische c-Myc-Antikörper-Detektion erfolgen (links). Die Überexpression des Myc-Lhx3 Konstruktes kann in Zellkernen spezifisch detektiert werden. Nach 24 *hpf* kann bei Injektion des Myc-Lhx3 Konstruktes erneut (siehe Abb. III.I.3B) keine Detektion erfolgen (Mitte). Im Falle einer Koinjektion beider Konstrukte, ist Myc-Lhx3 wieder detektierbar (Rechts).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von DN-CLIM zu einer Stabilisierung von überexprimiertem Myc-Lhx3 in Zebrafisch-Embryonen führt. Weitere Experimente mit einem anderen Vertreter der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, dem Isl1, konnten diesen stabilisierend wirkenden Effekt durch DN-CLIM bestätigen (Daten nicht gezeigt). Eine Verwendung von Überexpressions-Konstrukten die für Wildtyp CLIM (volle Länge) kodieren, zeigten gleiche Effekte wie sie bereits für DN-CLIM beobachtet worden waren (Daten nicht gezeigt).

III.I.2 Eine definierte Abfolge von Protein-Interaktionen bestimmt die Stabilisierung von LIM-HD-Multiproteinkomplexen

Es ist bereits von unserem Labor gezeigt worden, dass CLIM-Proteine proteasomal reguliert werden (Ostendorff *et al.*, 2002). Unter Verwendung des Zebrafisch-Systems sollten zunächst Protein-Domänen von CLIM Kofaktoren identifiziert werden, welche destabilisierend auf CLIM-Proteine wirken. Hierfür wurden mRNA Moleküle kodierend für Myc-DN-CLIM, Myc-CLIM Δ C und Wildtyp Myc-CLIM in Zebrafisch-Embryonen injiziert und überexprimiert. Nach 5 und 24 *hpf* wurden vorliegende Proteinkonzentrationen immunhistochemisch detektiert und parallel mRNA Konzentrationen mit Hilfe von quantitativer *Real Time* RT-PCR bestimmt.

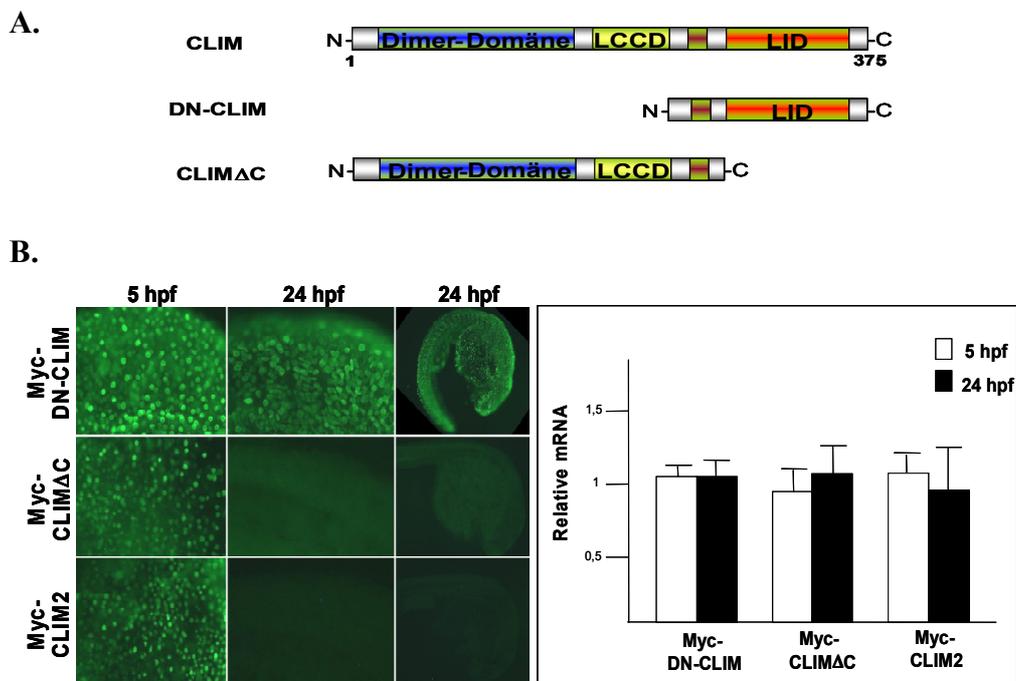


Abbildung III.I.5 N-terminale Proteinbereiche vermitteln die Destabilisierung von CLIM-Proteinen in Zebrafisch-Embryonen.

A. Dargestellt sind das Wildtyp CLIM-Protein und die in diesem Versuch verwendeten Deletionsmutanten. Hervorgehoben sind Protein-Domänen farblich: N-terminal die Dimer(isierungs)-Domäne (Blau), gefolgt von der LCCD-Domäne (*Ldb/Chip conserved domain*)

(Gelb), und der C-terminalen LIM-Interaktions-Domäne (LID) (Rot). DN-CLIM: dominant-negatives CLIM-Protein; es fehlt die Dimerisierungsdomäne und die LCCD-Domäne. CLIM Δ C: Es fehlt die C-terminale LIM-Interaktions-Domäne (LID) zur Bindung an LIM-Domänen. **B. Links.** Immunhistochemische Färbung von Zebrafisch-Embryonen, injiziert mit mRNA Molekülen, kodierend für DN-CLIM (Myc-Fusion), CLIM Δ C (Myc-Fusion) oder WT CLIM (Myc-Fusion). Embryonen wurden nach 5 oder 24 *hpf* fixiert und mit einem spezifischen c-Myc erkennenden Antikörper inkubiert. Nach 5 *hpf* kann im Falle einer Injektion aller mRNA Konstrukte eine spezifische Antikörper-Detektion in Zellkernen erfolgen. Nach 24 *hpf* ist nur bei Injektion des N-terminal deletierten CLIM Konstruktes (Myc-DN-CLIM) eine Kernfärbung detektierbar. Die injizierten mRNA Konstrukte Myc-CLIM Δ C und Myc-CLIM sind hingegen nicht mehr detektierbar. **Rechts.** Säulendiagramm der quantitativen *Real Time* RT-PCR als Nachweis gleichbleibender mRNA Konzentrationen. Eingesetzt wurden spezifische Primer zur Amplifikation des c-Myc-Epitops eines jeden mRNA Moleküls. Das Säulendiagramm zeigt eine nahezu gleich bleibende relative mRNA Konzentration von Myc-DN-CLIM, Myc-CLIM Δ C und Myc-CLIM nach 5 und 24 *hpf*. Die Mittelwerte der mRNA Konzentrationen aus Dreifachbestimmungen, wurden auf die relative Aktin-mRNA Menge normiert.

Mittels Zebrafisch-System konnten die N-terminalen 266 Aminosäuren von CLIM als instabiler Proteinbereich identifiziert werden. Während überexprimiertes Myc-DN-CLIM sowohl nach 5 *hpf* als auch nach 24 *hpf* detektierbar war, konnte über einen Zeitraum von 24 *hpf* weder Myc-CLIM Δ C noch Myc-CLIM detektiert werden.

Es war bereits bekannt, dass der Kofaktor RLIM sowohl mit CLIM als auch CLIM Δ C *in vitro* und *in vivo* interagiert (Ostendorff *et al.*, 2002), während eine Interaktion mit dem DN-CLIM ausblieb. Als Ubiquitin-Ligase war RLIM weiterhin nicht in der Lage, DN-CLIM in *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen zu polyubiquitinieren, während CLIM und CLIM Δ C erfolgreich ubiquitiniert wurden (Daten nicht gezeigt). Daher steht dieses Ergebnis im Einklang damit, dass RLIM nicht mehr fähig ist, DN-CLIM *in vivo* zu ubiquitinieren und es somit dem proteasomalen Abbau zuzuführen.

Des Weiteren wiesen bereits veröffentlichte Daten unseres Labores (Ostendorff *et al.*, 2006) Hinweise auf, dass CLIM-Proteine während der Neuralrohr-Entwicklung in Vertebraten vor proteasomalen Abbau geschützt werden. Dies führte zu unserer Hypothese, dass weitere Proteine existieren müssten, welche in der Lage sind die N-terminale Domäne von CLIM-Proteinen zu binden, um diese vor proteasomalem Abbau zu protektieren.

III.I.2.1 Eine Kaskade von Kofaktoren stabilisiert LIM-HD-Proteine

Um Interaktionspartner zu identifizieren, welche fähig sind mittels Bindung an CLIM-Proteine diese zu stabilisieren, wurden von meinem Kollegen Baris Tursun *yeast two hybrid*-Experimente mit CLIM Δ C als Köderprotein durchgeführt. Hierbei konnte das SSDP1 Protein (*single strand dna binding protein 1*) als Bindungspartner identifiziert werden. SSDP1 war bereits als CLIM-interagierendes Protein beschrieben (Chen *et al.*, 2002; van Meyel *et al.*,

2003) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des CLIM/Lhx1 Komplexes (Nishioka *et al.*, 2005).

Folgende Myc-SSDP1 Fusionsproteine wurden generiert und auf ihren Einfluss auf CLIM und LIM-HD-Transkriptionsfaktoren hin untersucht: Myc-N-SSDP1 umfasst 97 N-terminale Aminosäuren und kodiert die CLIM-Interaktionsdomäne (van Meyel *et al.*, 2003). Myc-C-SSDP1 umfasst 260 C-terminale Aminosäuren und kodiert die *PRD*-Domäne (*proline rich domain*). Dieser Domäne konnte bislang eine CLIM unabhängige transkriptionelle Aktivität zugeschrieben werden (Wu *et al.*, 2005). Sowohl die Deletionsmutanten als auch Myc-SSDP1 (Wildtyp) wurden in α T3 Zellen mittels transients Transfektion überexprimiert und mögliche Auswirkungen auf endogene CLIM-Proteinkonzentrationen zunächst immunzytochemisch untersucht.

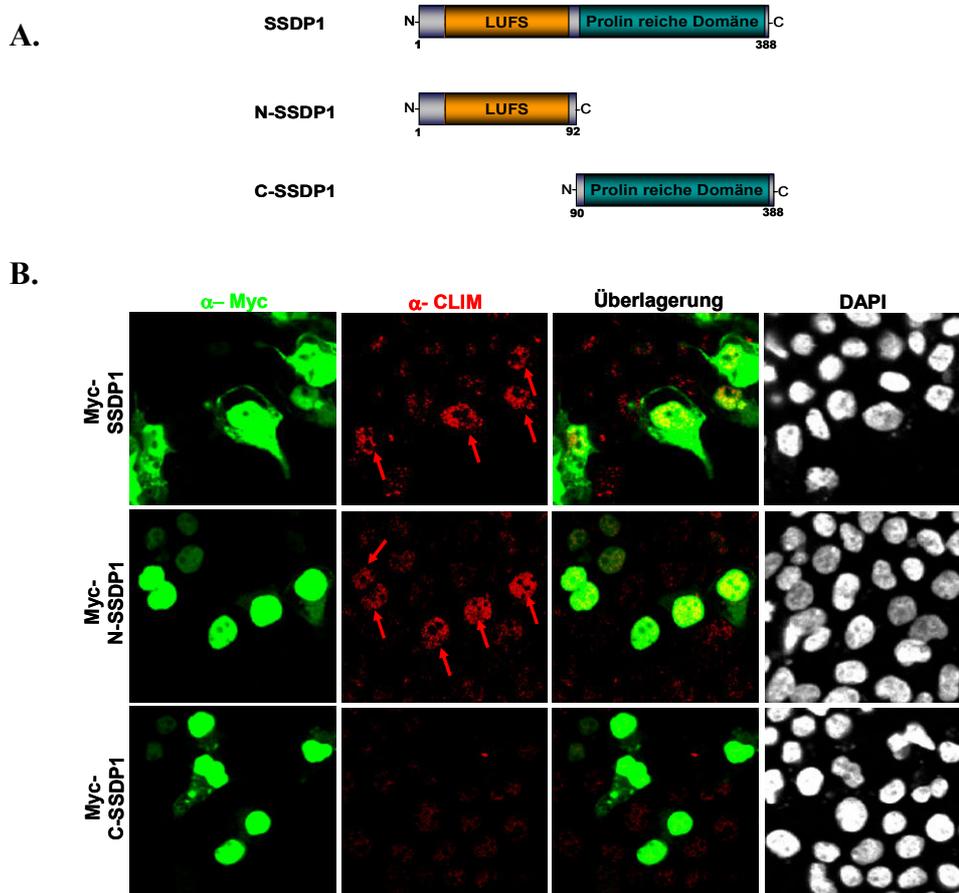


Abbildung III.1.6 SSDP1 stabilisiert CLIM-Proteine.

A. Dargestellt sind die in diesem Versuch verwendeten SSDP1 Konstrukte. Hervorgehoben sind Protein-Domänen farblich: Ziffern weisen auf jeweilige Aminosäuren hin. Die Deletionsmutante N-SSDP1 beinhaltet die LUFS-Domäne (Orange), welche mit der LCCD-Domäne von CLIM-Proteinen interagiert. Die Deletionsmutante C-SSDP1 beinhaltet die „Proline reiche Domäne“ (Türkis). Es fehlt die CLIM-Protein Interaktionsdomäne. Alle Konstrukte wurden an c-Myc fusioniert. **B.** Immunzytochemische Analyse von α T3 Zellen. Es wurden je 1 μ g der c-Myc Fusionskonstrukte SSDP1 (Myc-SSDP1), N-SSDP1 (Myc-N-SSDP1) und C-SSDP1 (Myc-C-SSDP1) transient transfiziert. Nach 24 h wurden diese fixiert und anschließend endogenes CLIM-

Protein (Rot) mit spezifischem Antiserum aus Kaninchen und überexprimierte SSDP1-Proteine (Grün) mit c-Myc-Epitop erkennendem Antikörper aus Maus detektiert. Die Fluoreszenzsignale der Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper, wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes dokumentiert. Als Marker für eine Kernfärbung diente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). In Myc-SSDP1 als auch Myc-N-SSDP1 überexprimierten Zellen, liegt eine erhöhte endogene CLIM-Proteinkonzentration vor (rote Pfeile). Im Falle einer Überexpression des Myc-C-SSDP1 Konstruktes ist dieser Effekt wieder aufgehoben.

Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigten, dass Überexpressionen von Wildtyp SSDP1 und N-SSDP1 zu erhöhten Proteinkonzentrationen von endogenem CLIM-Protein führten, während dieser Effekt bei Überexpressionen von C-SSDP1 nicht zu beobachten war. Dieser stabilisierend wirkende Effekt durch SSDP1 bzw. N-SSDP1 ist somit abhängig von der CLIM Interaktionsdomäne.

Um gleiche Effekte quantitativ bestimmen zu können, sollten Western Blot-Detektionen durchgeführt werden. Da die Effizienz der Transfektion von α T3 Zellen relativ niedrig war, wurden zunächst GFP-Fusionsproteine (*green fluorescent protein*) von Wildtyp SSDP1 und N-SSDP1 generiert und anschließend in α T3 Zellen transient transfiziert. Mittels *FACS* (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) war es dann möglich, erfolgreich transfizierte Zellen (GFP positive) von nicht-transfizierten (GFP negative) zu separieren. Um direkte Effekte von GFP-SSDP1 und GFP-N-SSDP1 auf endogene CLIM-Proteinkonzentrationen analysieren zu können, wurden die Zellen lysiert und sowohl RNA- als auch Proteinextrakte mittels *Real Time* RT-PCR und Western Blot-Verfahren untersucht. Als ein direkter Bindungspartner von CLIM-Proteinen, sollte der LIM-HD-Transkriptionsfaktor Lhx3 in diese Untersuchungen mit einbezogen werden.

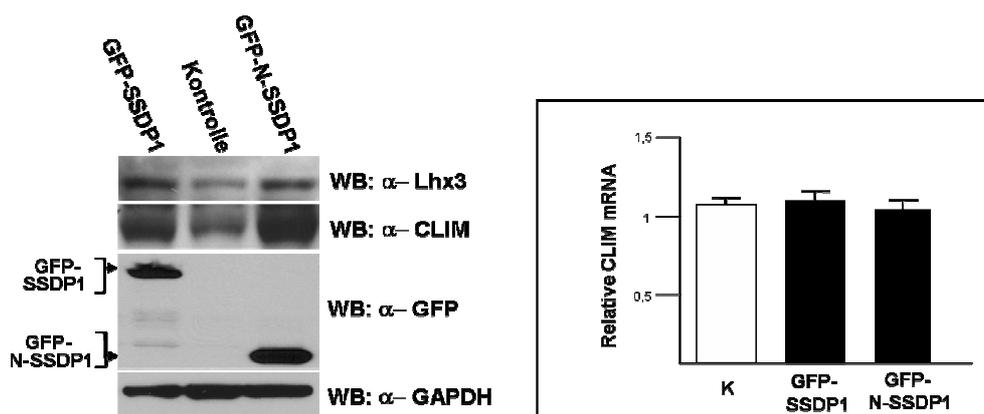


Abbildung III.I.7 Der Einfluss von SSDP1 auf die Proteinestabilität von CLIM und Lhx3 in α T3 Zellen.

Links. Western Blot-Analysen von Proteinextrakten überexprimierter und *FACS* sortierter α T3 Zellen. Es wurden α T3 Zellen mit den Konstrukten GFP-SSDP1 und GFP-N-SSDP1 transient transfiziert. Detektiert wurden spezifische SSDP1- und N-SSDP1-Überexpressionen mit GFP erkennendem Antiserum aus Maus. CLIM-Proteine wurden mit Antikörpern aus Kaninchen und Lhx3 mit Antikörpern aus Meerschweinchen detektiert. Nicht-transfizierte Zellen vom selben *sorting* dienten als Kontrolle. Als Ladekontrolle diente die Detektion mit GAPDH-Antikörpern

aus Maus. **Rechts.** Säulendiagramm der quantitativen *Real Time* RT-PCR als Nachweis gleich bleibender mRNA Konzentrationen. Eingesetzt wurden spezifische Primer zur Amplifikation des GFP-Epitops eines jeden mRNA Moleküls. Das Säulendiagramm zeigt eine nahezu gleich bleibende relative mRNA Konzentration von GFP-SSDP1 und GFP-N-SSDP1. Die Mittelwerte der mRNA Moleküle aus Dreifachbestimmungen, wurden auf die relative Aktin-mRNA normiert.

Der bereits im Rahmen von immunzytochemischen Untersuchungen identifizierte Einfluss von SSDP1 (siehe Abb. III.I.6B), konnte in Western Blot-Analysen bestätigt werden. Hier führten, im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle, Überexpressionen von GFP-SSDP1 und GFP-N-SSDP1 zu erhöhten endogenen CLIM-Proteinkonzentrationen. Darüber hinaus waren beide Konstrukte ebenfalls fähig endogene Lhx3-Proteinkonzentrationen durch Bindung an CLIM-Proteine, also indirekt, zu erhöhen. Verantwortlich für diesen Effekt ist die Interaktion der N-terminalen LUFs-Domäne von SSDP1 mit CLIM-Proteinen.

Mittels SSDP1 *knockdown* Experimente sollte die SSDP1 vermittelte Akkumulation von CLIM- und Lhx3-Proteinkonzentrationen bestätigt werden. Unter Verwendung von Retroviren, sollten daher α T3 Zellen mit spezifischen shRNA-Molekülen (*short hairpin* RNA) infiziert und die Translation endogener SSDP1-Proteine weitestgehend inhibiert werden. Nach erfolgreichem *knockdown*, sollten erneut CLIM- und Lhx3-Proteinkonzentrationen mittels Western Blot-Verfahren analysiert werden. Hierfür wurden drei Expressionskonstrukte mit unterschiedlichen Zielsequenzen verwendet (shSSDP1 1-3). Die retrovirale Infektion eines Leer-Vektors diente als Kontrolle.

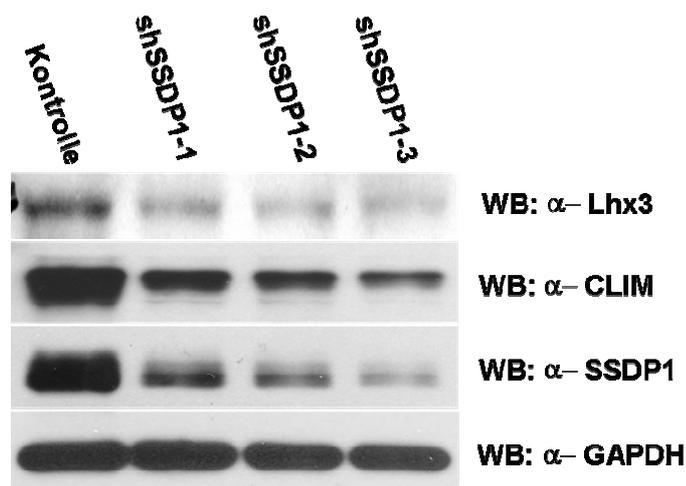


Abbildung III.I.8 Der Einfluss des SSDP1 *knockdown* auf CLIM- und Lhx3-Proteine.

Western Blot-Analysen von Proteinextrakten retroviral infizierter α T3 Zellen. Es wurden shSSDP1 Konstrukte (1-3) zusammen mit einem Virus-Verpackungs-Konstrukt in HEK-293T transient kotransfiziert. Nach 24 h wurde der Überstand des Zellkultur-Mediums abgenommen und auf α T3 enthaltene Zellkulturschalen verteilt und für weitere 48 h, in Gegenwart von Polybrene, inkubiert. Durch die Transduktion bzw. Infektion der Zellen mit shSSDP1-3, konnte der effektivste *knockdown* erzielt werden. Der SSDP1 *knockdown* führt, im Vergleich zur Kontrolle, zu verringerten endogenen CLIM- als auch Lhx3-Proteinkonzentrationen. Detektiert wurde ein spezifischer SSDP1 *knockdown* mit Antiserum aus Maus. CLIM-Proteine wurden mit

III | Ergebnisse

Antikörpern aus Kaninchen und Lhx3 mit Antikörpern aus Meerschweinchen detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion mit GAPDH-Antikörpern aus Maus.

Unter der Verwendung von *knockdown* Vektoren, resultiert eine spezifische SSDP1-Depletion in α T3 Zellen, in einer signifikant reduzierten Detektion von zellulären CLIM- und Lhx3-Proteinkonzentrationen, während in Kontroll-Transfektionen die Proteinkonzentrationen unverändert bleiben. Diese Ergebnisse weisen somit auf eine Kaskade von Protein-Interaktionen hin, die seitens von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren rekrutierte Multiproteinkomplexe stabilisieren. Um zu untersuchen, ob die SSDP1 vermittelte Akkumulation von CLIM- und Lhx3-Proteinkonzentrationen auf einen Schutz vor proteasomalem Abbau zurückzuführen sind, sollten mittels Überexpression GFP fusionierter SSDP1 Konstrukte und anschließender Inkubation mit dem Proteasominhibitor Lactacystin, erneut zelluläre CLIM- und Lhx3-Proteinkonzentrationen analysiert werden. So wurden α T3 Zellen mit einem GFP-N-SSDP1 Konstrukt (Abb. III.I.6A) transient transfiziert und nach 24 Stunden mit Lactacystin (0,2,8 μ M) für weitere 6 Stunden inkubiert. Nach folgender *FACS* Sortierung wurden GFP-N-SSDP1 positive α T3 Zellen von nicht transfizierten getrennt, Proteinlysate hergestellt und mittels Western Blot-Verfahren untersucht. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte α T3 Zellen.

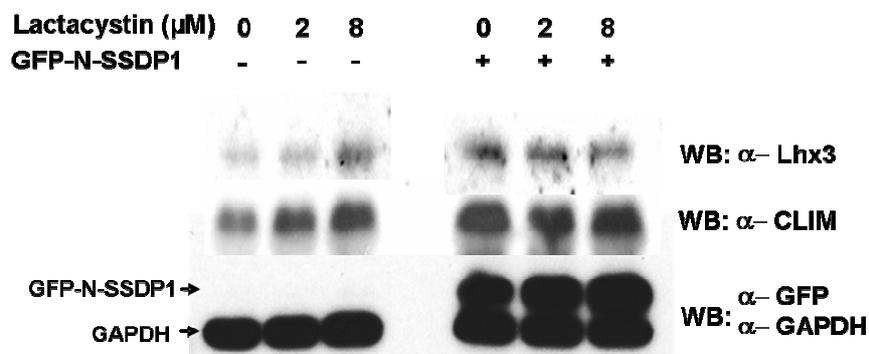


Abbildung III.I.9 Die SSDP1 vermittelte Stabilität von CLIM und Lhx3 ist Proteasom-abhängig.

Western Blot-Analysen von Proteinextrakten CLIM-überexprimierter, Lactacystin behandelter und *FACS* sortierter α T3 Zellen. Es wurde das Konstrukt GFP-N-SSDP1 transient transfiziert. Nicht-transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Behandlung der nicht-transfizierten GFP-N-SSDP1 Zellen mit ansteigenden Lactacystin Konzentrationen, weisen im Vergleich zu GFP-N-SSDP1 transfizierten Zellen, eine höhere Sensitivität von sowohl CLIM- als auch Lhx3-Proteinen gegenüber Lactacystin auf. Detektiert wurde eine spezifische GFP-N-SSDP1-Überexpression mit GFP erkennendem Antiserum aus Maus. CLIM-Proteine wurden mit Antikörpern aus Kaninchen und Lhx3 mit Antikörpern aus Meerschweinchen detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion mit GAPDH-Antikörpern aus Maus.

Es konnte gezeigt werden, dass der SSDP1 vermittelte Einfluss auf die Stabilitäten von CLIM- und Lhx3-Proteinen, proteasom-abhängig ist. So waren nicht-transfizierte α T3 Zellen

(Abb. III.I.9 links) sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Lactacystin, während in transfizierten Zellen die Sensitivität gegen Lactacystin aufgehoben war (Abb. III.I.9 rechts). Somit weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Interaktion von GFP-N-SSDP1 und CLIM-Proteinen, zu einem Schutz vor proteasomalem Abbau von CLIM-Proteinen *in vivo* führt. Die ansteigenden zellulären CLIM-Proteinkonzentrationen führen ebenfalls zu einem Anstieg zellulärer Lhx3-Proteine.

III.I.2.2 SSDP1 hemmt die Interaktion von RLIM mit der LCCD-Domäne von CLIM

Die LCCD-Domäne (*Ldb/Chip conserved domain*) beinhaltet einen 50 Aminosäuren großen Proteinbereich (201-250) in CLIM-Proteinen. Als SSDP1 Interaktionsdomäne konnte innerhalb der LCCD-Domäne ein 10 Aminosäuren kleiner Proteinbereich (214-223) identifiziert werden (van Meyel *et al.*, 2003).

Da die SSDP1-CLIM Interaktion zu erhöhten CLIM-Proteinkonzentrationen führt, sollte mittels Zebrafisch-System analysiert werden, welchen Einfluß die CLIM-LCCD-Domäne auf die Stabilität von CLIM-Proteinen *in vivo* hat. Um dies zu untersuchen, wurde vorerst eine c-Myc fusionierte Deletionsmutante der LCCD-Domäne hergestellt (CLIM-LCCD) und mittels mRNA Injektionen in Zebrafischen-Embryonen überexprimiert. Nach 5 oder 24 *hpf* wurden Proteinkonzentrationen mittels Immunhistochemie und relative mRNA Konzentration mittels *Real Time* RT-PCR verifiziert.

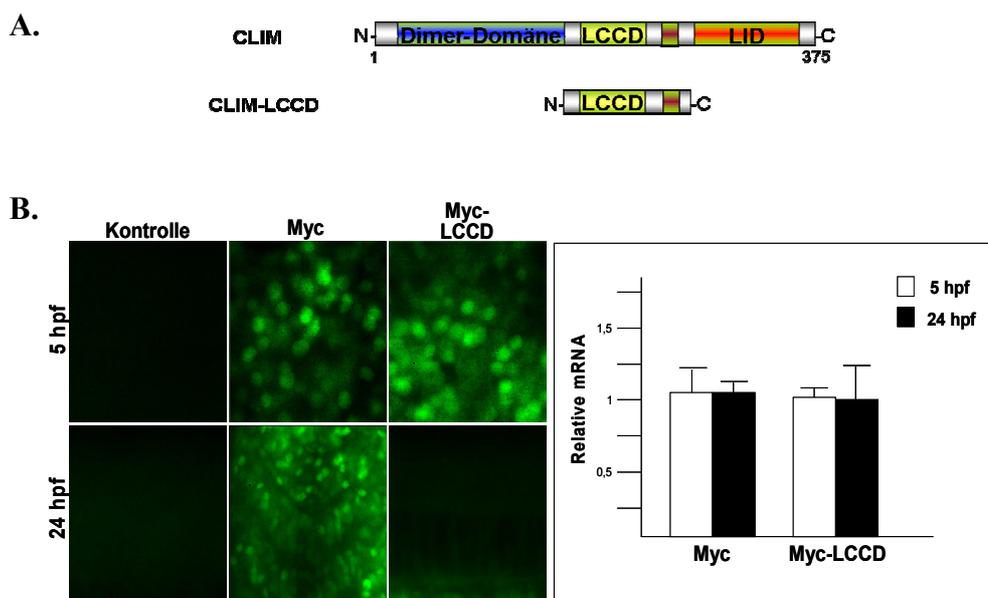


Abbildung III.I.10 Die CLIM-LCCD-Domäne stellt eine Instabilitätsdomäne in Zebrafisch-Embryonen dar.

A. Dargestellt ist die in diesem Versuch verwendete CLIM-Deletionsmutante CLIM-LCCD, im Vergleich zum Wildtyp CLIM-Protein, fusioniert an c-Myc. Hervorgehoben sind Protein-Domänen farblich: N-

terminal die Dimer(isierungs)-Domäne (Blau), gefolgt von der LCCD-Domäne (*Ldb/Chip conserved domain*) (Gelb), und der C-terminalen LIM-Interaktions-Domäne (LID) (Rot). CLIM-LCCD: Bis auf die LCCD-Domäne sind alle weiteren Domänen deletiert. **B. Links.** Immunhistochemische Färbung von Zebrafisch-Embryonen, injiziert mit mRNA Molekülen kodierend für die LCCD-Domäne (Myc-LCCD) von CLIM-Proteinen. Als Kontroll-Injektionen dienten mRNA Moleküle des Leer-Vektors pCS2-Myc (Myc) während nicht injizierte Embryonen als Negativ-Kontrolle dienten. Embryonen wurden nach 5 oder 24 *hpf* fixiert und mit einem spezifisch c-Myc erkennenden Antikörper inkubiert. Die Überexpression von Myc-LCCD kann bereits nach 5 *hpf* detektiert werden. Nach 24 *hpf* ist kein weiteres Myc-LCCD Molekül mehr nachweisbar, während die Überexpression von Myc (Leer-Vektor) zu beiden Zeitpunkten ähnlich detektierbar ist. **Rechts.** Säulendiagramm der quantitativen *Real Time* RT-PCR als Nachweis gleichbleibender mRNA Konzentrationen. Eingesetzt wurden spezifische Primer zur Amplifikation des c-Myc-Epitops eines jeden mRNA Moleküls. Das Säulendiagramm zeigt nahezu gleichbleibende relative mRNA Konzentrationen nach Injektion von Myc als Kontrolle, als auch von Myc-LCCD nach 5 und 24 *hpf*. Die Mittelwerte der mRNA Moleküle aus Dreifachbestimmungen, wurden auf die relative Aktin-mRNA normiert.

So konnte in der frühen Entwicklungsphase von Zebrafisch-Embryonen beobachtet werden, dass der Aminosäurenbereich 201-250 in CLIM-Proteinen, die LCCD-Domäne, für die Instabilität verantwortlich ist. Während das injizierte Myc-LCCD Konstrukt nach 24 h nicht mehr zu detektieren war, konnte das Kontroll-injizierte c-Myc Konstrukt in Zebrafisch-Embryonen weiterhin detektiert werden. So ist dies ein Hinweis darauf, dass die LCCD-Domäne von CLIM-Proteinen ausreicht um Instabilität zu vermitteln. Durch quantitative *Real Time* RT-PCR Analysen konnte weiterhin bewiesen werden, dass diese Stabilitätsunterschiede nicht auf veränderte Genexpressionen, sondern auf posttranslationale Modifikationen beruhen. In folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob neben SSDP1 ebenfalls RLIM fähig ist mit der LCCD-Domäne von CLIM-Proteinen zu interagieren. Der Kofaktor RLIM interagiert *in vitro* und *in vivo* mit CLIM- und CLIM Δ C-Proteinen, während eine Interaktion mit DN-CLIM-Proteinen ausbleibt (Ostendorff *et al.*, 2002). Daher sollte hier, mittels Durchführung von Immunpräzipitationen, eine potenzielle Interaktion von RLIM mit der CLIM-LCCD Domäne identifiziert werden. Um die potentielle Interaktionsdomäne von CLIM-Proteinen und RLIM *in vivo* zu untersuchen, wurden Lysate von transient transfizierten α T3 Zellen einer Koimmunpräzipitation unterzogen.

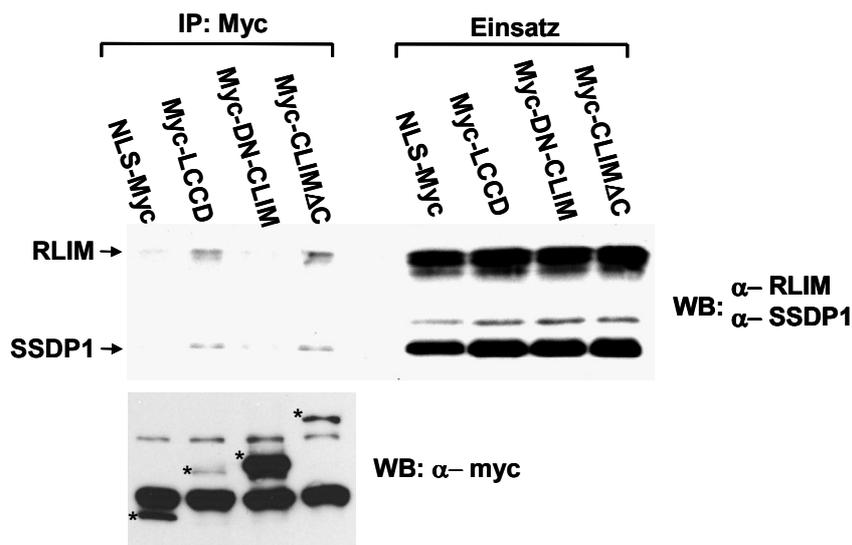


Abbildung III.I.11 Koimmunpräzipitation von RLIM und SSDP1 in Myc-LCCD und Myc-CLIM Δ C überexprimierten α T3 Zellen.

Western Blot-Analysen von Immunpräzipitationen. α T3 Zellen wurden mit verschiedenen Plasmid-DNA-Kombinationen, kodierend für Myc-LCCD, Myc-DN-CLIM, Myc-CLIM Δ C und c-Myc (NLS-Myc) transfiziert. Mit den Zelllysaten der transfizierten Zellen wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. *oben links*. Eine Präzipitation mit c-Myc-Antikörpern (α -Myc), führt nur in Anwesenheit von c-Myc-fusionierter LCCD-Domäne und CLIM Δ C zu einer Kopräzipitation von RLIM und SSDP1. *oben rechts*. Gezeigt ist der Einsatz an Gesamtprotein von RLIM und SSDP1. *unten*. Nachweis für erfolgreiche Transfektionen und Expression aller verwendeten c-Myc-Fusionskonstrukte (Sterne).

Immunpräzipitationen aus transfizierten α T3 Zelllysaten zeigen, dass sowohl RLIM als auch SSDP1 mit den CLIM-Deletionsmutanten CLIM-LCCD und Myc-CLIM Δ C kopräzipitieren. Die Verwendung der Deletionsmutante Myc-DN-CLIM führt zu keiner Kopräzipitation, da in diesem Konstrukt die LCCD-Domäne deletiert wurde. Daher bestätigt dieses Ergebnis eine Spezifität der Koimmunpräzipitationen und eine direkte Interaktion von RLIM und SSDP1 mit CLIM-Proteinen. Somit vermittelt die CLIM-LCCD Domäne sowohl eine Interaktion mit SSDP1, als auch mit RLIM. Durch die Anwendung von *in vitro* GST-Interaktionsexperimenten, konnte dieses Ergebnis verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

III.I.2.3 SSDP1 inhibiert eine RLIM-CLIM Interaktion und reguliert die Expression von Lhx3 Zielgenen *in vivo*

Da gezeigt werden konnte, dass sowohl RLIM als auch SSDP1 mit der LCCD-Domäne von CLIM-Proteinen interagieren (Abb. III.I.11), sollte in den folgenden Experimenten unsere Hypothese untersucht werden, ob es zu einem konkurrierenden Bindungsverhalten von SSDP1 und RLIM mit CLIM-Proteinen *in vitro* und *in vivo* kommt. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob die SSDP1-CLIM Interaktion einen indirekten Einfluss auf die

Expression von Lhx3 Zielgenen hat. Als ein Zielgen von Lhx3 sollte hier ein möglicher Einfluss auf die Expression von α -GSU (α Glycoprotein-subunit; Hypophysen-Hormon) untersucht werden.

Zunächst sollte aus transfizierten α T3 Zelllysaten, RLIM kopräzipitiert werden. Hierbei sollte eine zelluläre RLIM-CLIM-Interaktion in GFP-N-SSDP1 überexprimierenden α T3 Zellen untersucht werden.

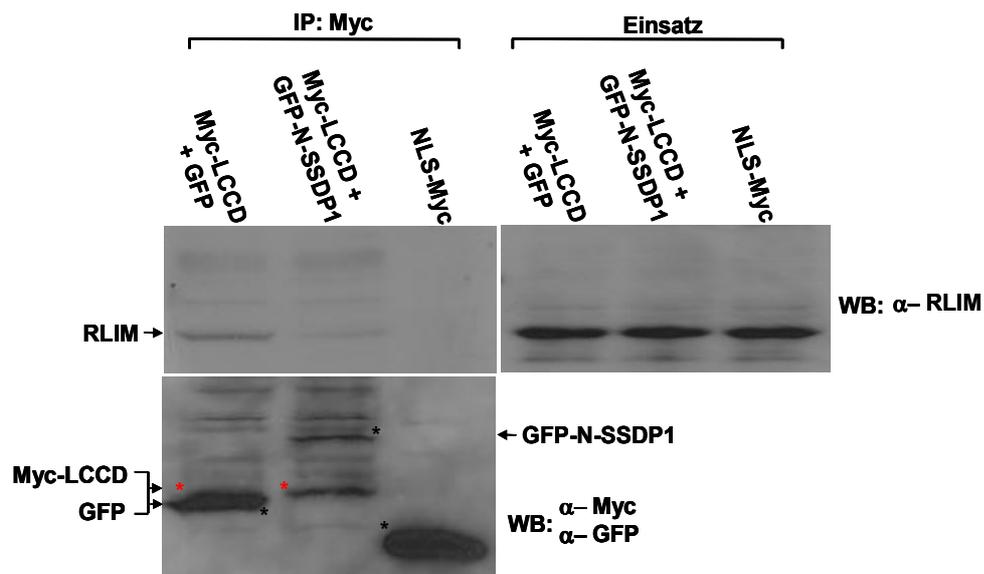


Abbildung III.I.12 SSDP1 inhibiert die RLIM-CLIM-Interaktion *in vivo*.

Western Blot-Analysen von Immunpräzipitationen. α T3 Zellen wurden mit verschiedenen Plasmid-DNA-Kombinationen, kodierend für Myc-LCCD, GFP (*green fluorescent protein*) und c-Myc (NLS-Myc), transfiziert bzw. kotransfiziert. Mit den Zelllysaten der transfizierten Zellen wurden Immunpräzipitationen mit c-myc ererkennenden Antikörpern durchgeführt. *oben links*. Eine Immunpräzipitation von Myc-LCCD in GFP ko-überexprimierten Zellen, führt zu einer Kopräzipitation von endogenem RLIM. Hingegen kommt es in Myc-LCCD und GFP-N-SSDP1 ko-überexprimierten Zellen, zu einer sichtbar reduzierten Kopräzipitation von endogenem RLIM. Die Negativ-Kontrolle (NLS-Myc) führt zu keiner Kopräzipitation von RLIM. *oben rechts*. Gezeigt ist der Einsatz an Gesamtprotein von RLIM. *unten*. Nachweis für erfolgreiche Transfektionen und Expression der verwendeten c-Myc-, GFP- und GFP-Fusions-Konstrukte (rote und schwarze Sterne).

Mittels Immunpräzipitationen konnte unsere Hypothese bestätigt werden. In α T3 Zellen, welche Myc-LCCD überexprimieren, konnte RLIM kopräzipitiert werden. Hingegen konnte in Myc-LCCD und GFP-N-SSDP1 ko-überexprimierenden α T3 Zellen, RLIM lediglich in weitaus geringeren Konzentrationen präzipitiert werden. Die Verwendung eines Leer-Vektors (NLS-Myc) als Negativ-Kontrolle, führte zu keiner Kopräzipitation von RLIM. Es scheint, dass durch direkte Interaktion von SSDP1 und der LCCD-Domäne von CLIM-Proteinen, RLIM nicht mehr in der Lage ist CLIM-Proteine zu binden und diese durch Polyubiquitinierung zum proteasomalen Abbau zu dirigieren. Somit weisen diese Ergebnisse

darauf hin, dass die Stabilisierung und Formation von SSDP1/Lhx3/CLIM-Multiproteinkomplexen mit hierarchischen Protein-Interaktionen bzw. Maskierungen von entscheidenden Proteindomänen einhergeht. In LIM-HD-Transkriptionsfaktoren resultiert die Maskierung der LIM-Domäne durch Bindung von CLIM-Proteinen und in CLIM-Proteinen die Maskierung der LCCD-Domäne durch Bindung von SSDP1, in einer verstärkten Stabilität bedingt durch den Schutz vor proteasomalen Abbau *in vivo*. Auch in Ubiquitinierungsreaktionen führt die Anwesenheit von SSDP1 zu einer deutlich reduzierten Ubiquitinierung von CLIM-Proteinen durch RLIM *in vitro* (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die SSDP1 vermittelte Stabilisierung von LIM-HD Proteinkomplexen direkte Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren hat, sollte mittels *knockdown* von SSDP1-Proteinen ein möglicher indirekter Einfluss auf die Expression des Lhx3 Zielgens α -GSU analysiert werden. Hierfür wurden α T3 Zellen mit spezifischen shRNA-Molekülen (shSSDP1 2-3) retroviral infiziert und anschließend endogene α -GSU-Proteinkonzentrationen mittels Western Blot-Verfahren detektiert und endogene mRNA Konzentrationen mittels *Real Time* RT-PCR quantifiziert. Die retrovirale Infektion eines Leer-Vektors diente als Kontrolle.

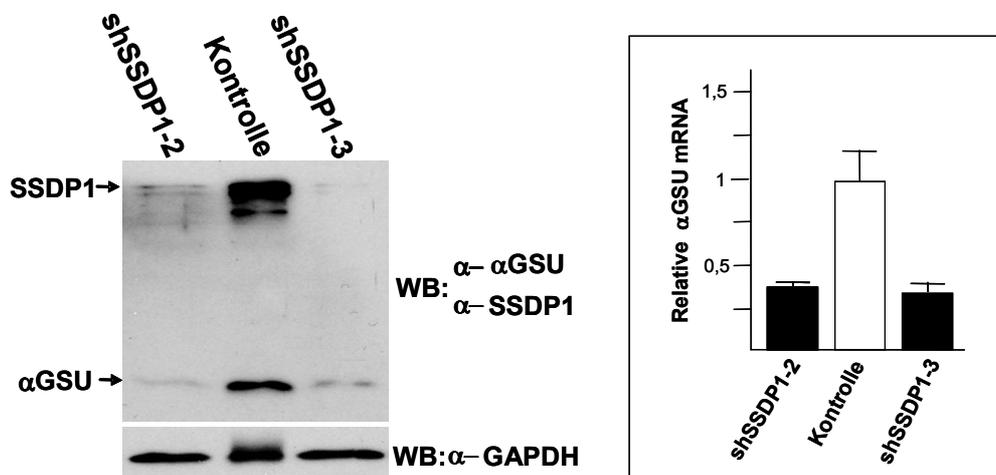


Abbildung III.I.13 Der Einfluss des SSDP1 *knockdown* auf die Expression des Lhx3 Zielgens α -GSU.

Links. Western Blot-Analysen von Proteinextrakten retroviral infizierter α T3 Zellen. Es wurden shSSDP1 Konstrukte (2 und 3) zusammen mit einem Virus-Verpackungs-Konstrukt in HEK-293T transient transfiziert. Nach 24 h wurde der Überstand des Zellkultur-Mediums abgenommen und auf α T3 enthaltene Zellkulturschalen verteilt und für weitere 48 h, in Gegenwart von Polybrene, inkubiert. Die Zelllysate wurden anschließend aufgeteilt, um sowohl RNA- als auch Proteinkonzentrationen getrennt analysieren zu können. So führt ein spezifischer SSDP1 *knockdown*, zu einer deutlichen Reduktion von endogenen α -GSU Proteinkonzentrationen, im Vergleich zur Kontrolle. Detektiert wurde ein spezifischer *knockdown* von SSDP1 mit Antiserum aus Maus. Endogene α -GSU Proteinkonzentrationen wurden mit Antikörpern aus Kaninchen detektiert, während die Detektion mit GAPDH-Antikörpern aus Maus als Ladekontrolle diente.

Rechts. Säulendiagramm der quantitativen *Real Time* RT-PCR zum Nachweis endogener α -GSU mRNA Konzentrationen in SSDP1 *knockdown* Zellen. Eingesetzt wurden spezifische Primer zur Amplifikation von α -GSU mRNA Molekülen. Das Säulendiagramm zeigt eine, im Vergleich zur Kontrolle, deutliche Reduktion von α -GSU mRNA Konzentrationen in SSDP1 *knockdown* Zellen. Die Mittelwerte der mRNA Moleküle aus Dreifachbestimmungen, wurden auf die relative Aktin-mRNA normiert.

Mittels eines spezifischen retroviral vermittelten *knockdown* zellulärer SSDP1 Proteinkonzentrationen, konnte sowohl eine verringerte Expression als auch eine Translation des α -GSU Gens, im Vergleich zur Kontrolle, beobachtet werden. Somit weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Depletion zellulärer SSDP1 Konzentrationen, Auswirkungen auf die Expression des Lhx3 Zielgens α -GSU hat.

Dieses Ergebnis bestätigt somit, dass der SSDP1 *knockdown* in α T3 Zellen indirekt zu einer Destabilisierung von Lhx3 führt (Abb. III.I.8), während eine SSDP1-Überexpression zu einer Stabilisierung von CLIM-Proteinen und somit auch von Lhx3-Proteinen führt (Abb. III.I.7 links).

III. Ergebnisse Teil 2

III.II.1 Expression von RLIM und CLIM2 im Brustgewebe von Mäusen

Die Ubiquitin-Ligase RLIM spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Protein-Netzwerkes von LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren. Die CLIM-Proteine hingegen vermitteln als Adaptoren, zusammen mit anderen (LMO-) Proteinen, die Formation von Transkriptionskomplexen auf Zielgenpromotoren. RLIM vermittelt durch Polyubiquitinierung, den proteasomalen Abbau von CLIM-Proteinen und reguliert daher negativ das LIM-Proteinnetzwerk. Welche entscheidende Rolle CLIM in der frühen Embryonalentwicklung von Wirbeltieren hat, zeigte erst eine CLIM *knockout* Maus. CLIM^{-/-} Mäuse sind lediglich bis zum Embryonaltag E9.5-E10 lebensfähig. Diese Mäuse zeigen u.a. schwere Abnormalien in der Entwicklung von Kopf- bzw. Hirn- und Herzstrukturen (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Andere LIM Proteine sind zudem in Verbindung mit Leukämie (LMO2, LMO4) und Brustkrebs (LMO4) gebracht worden (Boehm *et al.*, 1988; Visvader *et al.*, 2001; Montañez-Wiscovich *et al.*, 2009).

Der zweite Teil meiner Arbeit sollte sich daher mit der funktionellen Analyse der LIM Proteine RLIM und CLIM, im Brust- und Brustkrebsgewebe beschäftigen. Der beobachtete multiple Phänotyp in *Drosophila*-CLIM-Mutanten und CLIM2^{-/-} Mäusen lässt vermuten, dass dessen zelluläre Funktionen über dem des LIM-Proteinnetzwerkes hinausgehen (Visvader *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2007). In diesem Kontext konnte CLIM bereits als Adaptermolekül im Proteinkomplex mit anderen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise GATA-1 und GATA-2 identifiziert werden (Song *et al.*, 2007; Nottingham *et al.*, 2007). Obwohl CLIM-Proteine bereits mit der Differenzierung von Brustepithelzellen in Verbindung gebracht worden sind, ist die Funktion von CLIM bzw. RLIM im Brustgewebe bzw. Brustkrebsgewebe bisher nicht bekannt (Visvader *et al.*, 2001).

Initial sollte daher das Expressionsprofil von RLIM und CLIM im Brustgewebe von Mäusen näher untersucht werden. Hierfür wurden Vibratonschnitte vom Brustepithelium mit spezifischen Antiseren gegen RLIM und CLIM immunhistochemisch gefärbt. Da unser polyklonaler CLIM-Antikörper sowohl CLIM1 als auch CLIM2 bindet und im Brustepithelgewebe ausschließlich CLIM2 exprimiert wird (Daten nicht gezeigt), soll CLIM nachstehend als CLIM2 bezeichnet werden.

III.II.1.1 Das Expressionsprofil von RLIM und CLIM2 im Brustepithel und während der Brustdrüsen-Entwicklung in Mäusen

Für die Untersuchung des Expressionsprofils von RLIM und CLIM2 während der Brustdrüsen-Entwicklung, wurden transversale Vibratomschnitte der Brustdrüse von Mäusen mit einer Dicke von 30-70 µm verwendet. Es wurden adulte Mäuse mit Antiseren gegen RLIM und CLIM2 behandelt. Die Abbildungen zeigen den immunhistochemischen Nachweis beider Proteine im Brustepithel bzw. der Brustdrüse von jungfräulichen, schwangeren und stillenden Mäusen. Beide Proteine zeigen ein nahezu identisches Expressionsprofil in allen Stadien der Entwicklung.

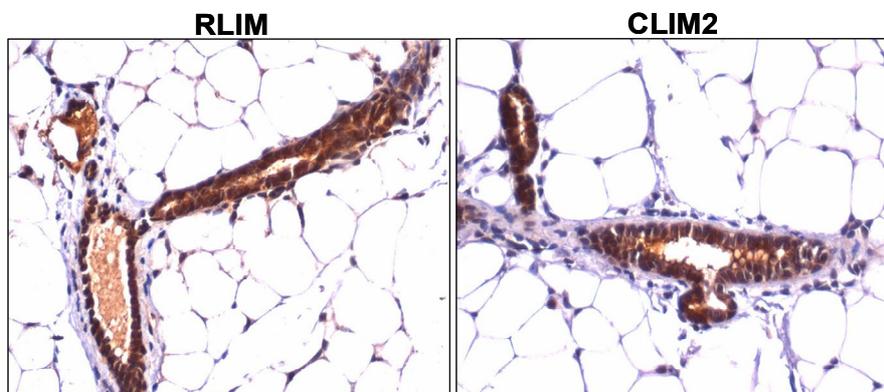


Abbildung III.II.1 Expression von RLIM und CLIM2 in der Brustdrüse von adulten Mäusen.

Transversale Vibratomschnitte von Milchdrüsengängen (Ducti) adulter Mäuse, immunhistochemisch gefärbt mit Antiseren gegen RLIM und CLIM2. Beide Proteine sind ausschließlich in den Epithelzellen von distalen Gangabschnitten der Milchdrüse exprimiert. Im umliegenden Stroma und Bindegewebe ist keine Lokalisation zu erkennen.

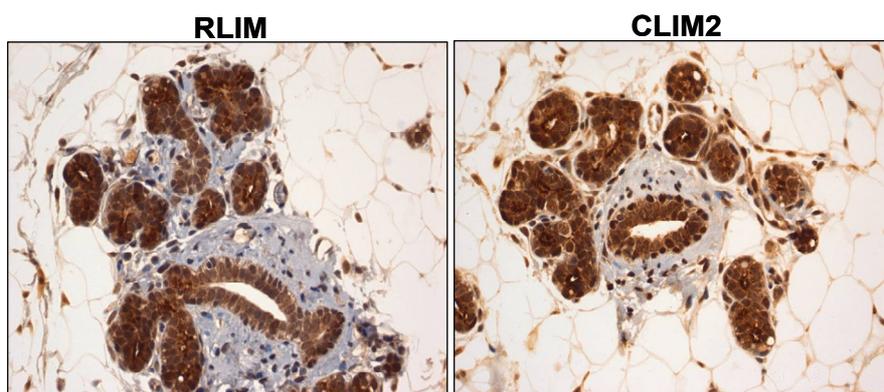


Abbildung III.II.2 Expression von RLIM und CLIM2 in der Brustdrüse von schwangeren Mäusen.

Transversale Vibratomschnitte von Milchdrüsengängen (Ducti) und Milchläppchen (Lobuli) schwangerer Mäuse (12,5 Tage), immunhistochemisch gefärbt mit Antiseren gegen RLIM und CLIM2. Beide Proteine sind sowohl in den Epithelzellen von Milchdrüsengängen exprimiert, als auch in den während der Schwangerschaft gebildeten alveolären Drüsenendstücken, hervorgerufen durch einen hohen Östrogenspiegel. Eine Expression im umliegenden Stroma ist nicht erkennbar.

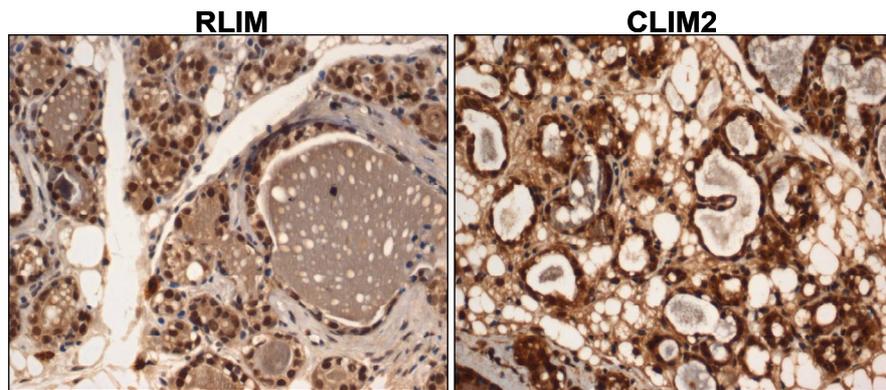


Abbildung III.II.3 Expression von RLIM und CLIM2 in der Brustdrüse von stillenden Mäusen.

Transversale Vibratomschnitte von Milchdrüsengängen (Ducti) und Milchläppchen (Lobuli) stillender Mäuse (3 Tage post Geburt), immunhistochemisch gefärbt mit Antisera gegen RLIM und CLIM2. Beide Proteine sind ausschließlich in der einschichtigen Epithelschicht der Drüsenendstücke exprimiert. Deutlich zu erkennen ist der Einschluss von Milch, hervorgerufen durch den während der Geburt entstandenen hohen Prolaktinspiegel.

Mittels immunhistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, konnte sowohl RLIM als auch CLIM2 in transversalen Vibratomschnitten der Brustdrüse von adulten, schwangeren als auch stillenden Mäusen, positiv angefärbt werden. Hierbei sind beide Proteine ausschließlich in der Epithelschicht bzw. den Epithelzellen lokalisiert, also jene Zellen der Brustdrüse, welche ebenfalls positiv für ER α sind. Im umliegenden Stroma und Bindegewebe konnte keine Lokalisation beider Proteine identifiziert werden.

III.II.1.2 Die Expression von CLIM2 im Mammakarzinom von 1335 Patientinnen

Die Kernlokalisierten LIM- und LMO-Proteine bzw. Proteine des LIM-Netzwerks sind erst seit geraumer Zeit in Verbindung mit Brustkrebs gebracht worden (Visvader *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Um detaillierte Kenntnisse über die Expression von CLIM2 in Mammakarzinomen zu erhalten, wurde ein Gewebe-Microarray (TMA *Tissue Microarray*) von 1335 Brustkrebspatientinnen immunhistochemisch untersucht. Ein TMA besteht aus zahlreichen Gewebeproben von klinisch und pathologisch gut charakterisierten Tumoren. Nach Auswahl des zu untersuchenden Proteins, kann die Korrelation immunhistochemisch detektierter Proteinexpressionsmuster mit dem klinischen Verlauf der Patienten nach Erstdiagnose der malignen Erkrankung, eine Aussage hinsichtlich der prognostischen Bedeutung an Malignomen veränderter Proteinexpression für das zu erwartende biologische Verhalten des einzelnen Tumors innerhalb einer bestimmten Tumorentität liefern. Man erhält also bei vertretbarem Material die Möglichkeit, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Aktivierung eines bestimmten Gens (also eine in einem Genprodukt resultierende

Transkriptionsaktivität) mit dem klinischen bzw. biologischen Verhalten eines Malignoms korreliert. Im Vergleich zur konventionellen immunhistochemischen Charakterisierung (IHC), bietet der Gewebe-Microarray einen entscheidenden Vorteil: Er erlaubt es Gewebeproben effizient und unter einheitlichen methodischen Bedingungen zu analysieren. Darüber hinaus kann eine sehr große Anzahl von Patientenproben zu einem Zeitpunkt analysiert werden und durch die Auswahl dreier Gewebekerne pro Originalprobe ist es möglich, die Tumorerogenität verlässlich zu repräsentieren.

Daher wurden hier 1335 paraffineingebettete Tumorsektatblöcke von Patientinnen mit Mammakarzinom, immunhistochemisch mit spezifischen Antiserum aus Kaninchen gegen CLIM2 gefärbt. Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Olympus-Lichtmikroskops bei 400facher Vergrößerung durch zwei unabhängige Untersucher. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte elektronisch mit dem Kruskal-Wallis und dem *t*-Test, unter Bezugnahme des statistischen Auswertungsprogramms SPSS für Windows Release 11.0.1.

In der vorliegenden Studie wurde das immunhistochemische *Scoring*, statistisch repräsentativ, auf der Grundlage der Analyse von mindestens 1000 Zellen durchgeführt. Parallel wurden die konventionellen prognostischen Parameter (nach TNM-Klassifikation) Östrogen- und Progesteron-Rezeptor Status (ER und PR), T-Stadium, N-Stadium, Mitotischer Index und histologischer Grad mit dem Kruskal-Wallis und dem *t*-Test analysiert. Anschließend wurde das CLIM2-Expressionsmuster mit den prognostischen Parametern verglichen und eine Korrelation analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf $P = 0,05$ festgelegt. Im Anschluß wurden die Karzinome in folgende vier Klassen unterteilt:

- | | |
|---|--------------|
| 1. negative Expression von CLIM2 | (-) |
| 2. schwache Expression von CLIM2 | (+) |
| 3. mittlere Expression von CLIM2 | (++) |
| 4. starke Expression von CLIM2 | (+++) |

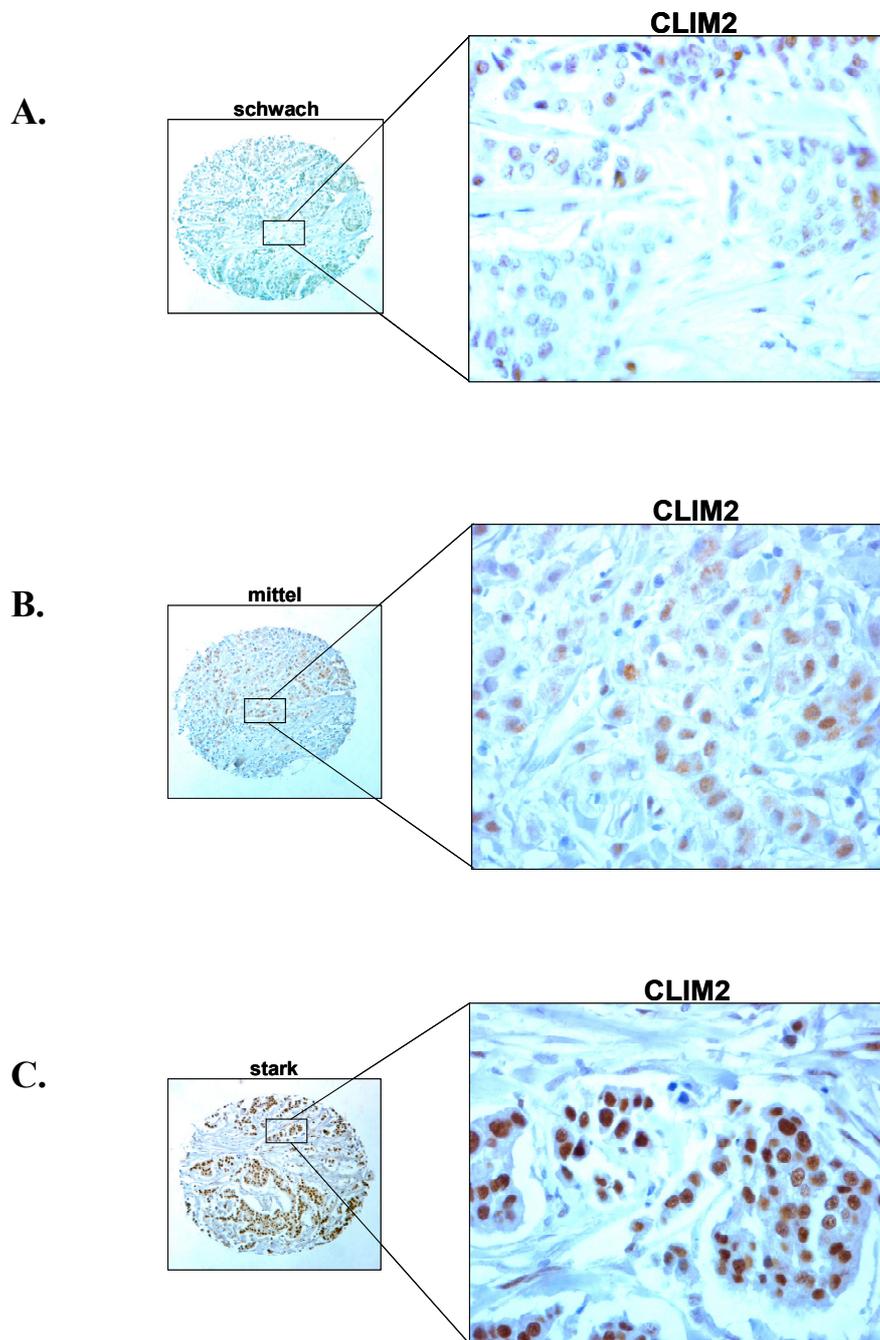


Abbildung III.II.4 Expression von CLIM2 im Mammakarzinom.

Bohrkerne von mammalen Tumorresektatblöcken wurden immunhistochemisch mit CLIM2 ererkennendem Antiserum behandelt. **A.** schwache duktae CLIM2-Expression im ER/PR negativen Mammakarzinom (2,8% der Gewebsproben). **B.** moderate duktae CLIM2-Expression im moderat ER/PR exprimierenden Mammakarzinom (39,7% der Gewebsproben). **C.** starke duktae CLIM2-Expression im Mammakarzinom mit stark exprimierenden ER/PR-Rezeptoren (57% der Gewebsproben).

Tissue Micro-Array humaner Mammakarzinome

Expression von CLIM2 in 1335 Brustkrebsproben

		Negativ	schwach (+)	Mittel (++)	Stark (+++)
Anzahl der Proben		33	106	518	678
Histologischer Typ					
Duktale Karzinome		19	62	351	493
n=925		2,10%	6,70%	37,90%	53,30%
Lobuläre Karzinome		4	18	85	82
n=189		2,10%	9,50%	45%	43,40%
Andere		10	26	76	99
n=211		4,70%	12,30%	36%	46,90%
Total: n=1325		2,50%	8%	38,60%	50,90%
Lymphknoten Status					
pN0		16	525	249	310
n=627		2,60%	8,30%	39,70%	49,40%
pN1/2		12	35	224	296
n=567		2,10%	6,20%	39,50%	52,20%
Total: n=1194		2,34%	7,29%	39,60%	50,80%
Tumorgrösse					
pT1		11	41	197	203
n=452		2,40%	9,10%	43,60%	44,90%
pT2		17	53	228	361
n=659		2,58%	8%	34,60%	54,80%
pT3		1	5	33	45
n=84		1,20%	6%	39,30%	53,60%
pT4		3	7	56	64
n=130		2,30%	5,40%	43,10%	49,20%
Total: n=1325		2,40%	8%	38,80%	50,80%
Histologischer Grad					
G1		11	33	148	162
n=354		3,10%	9,30%	41,80%	45,80%
G2		11	38	172	253
n=474		2,30%	8%	36,30%	53,40%
G3		6	28	110	203
n=347		1,70%	8,10%	31,70%	58,50%
Total: n=1175		2,40%	8,40%	36,60%	52,60%

		Negativ	schwach (+)	Mittel (++)	Stark (+++)
Anzahl der Proben		33	106	518	678
Miotischer Index					
M1	n=686	14 2%	64 9,30%	267 38,9	341 49,7
M2	n=190	9 4,70%	14 7,40%	64 33,70%	103 54,20%
M3	n=300	4 1,30%	20 6,70%	102 34%	174 58%
Total: n=1176		2,30%	8,30%	36,80%	52,60%
ER Status					
Negativ	n=280	16 5,70%	36 12,90%	107 38,20%	121 43,20%
Positiv	n=987	14 1,40%	61 6,20%	384 38,90%	528 53,30%
Total: n= 1267		2,40%	7,70%	38,80%	51,20%
PR Status					
Negativ	n= 715	17 2,40%	72 10,10%	288 40,30%	338 47,30%
Positiv	n=447	4 0,90%	15 5,40%	176 39%	252 56,40%
Total: n=1162		1,80%	7,50%	39,90%	50,60%
ER/PR					
1	n=280	16 5,70%	36 12,90%	107 38,20%	121 43,20%
2	n=465	8 1,70%	40 8,60%	191 41,10%	226 48,60%
3	n=426	2 0,47%	12 2,80%	169 39,70%	243 57%
Total: n=1171		2,20%	7,50%	39,90%	50,40%
Patientenalter					
<50	n=282	9 3,20%	9 3,20%	105 37,20%	159 56,40%
>50	n=1052	24 2,30%	97 9,20%	412 39,20%	519 49,30%
Total: 1334		2,50%	7,90%	38,80%	50,80%

Tabelle III.II.1 Gewebe-Microarray Ergebnisse von 1334 untersuchten humanen Mammakarzinomen.

Die statistische Auswertung der Daten des Tumorkollektivs erfolgte elektronisch mit dem Kruskal-Wallis und dem *t*-Test, unter Bezugnahme des statistischen Auswertungsprogramms SPSS für Windows Release 11.0.1. Analysiert wurden die konventionellen prognostischen Parameter (TNM-Klassifikation) wie Östrogen- und Progesteron-Rezeptor Status (ER und PR), T-

Stadium, N-Stadium, Mitotischer Index und Histologischer Grad. Anschließend wurde das CLIM2-Expressionsmuster mit den prognostischen Parametern verglichen und eine Korrelation analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf $P = 0,05$ festgelegt.

Statistische Auswertung:

Die Expression von CLIM2 korreliert positiv mit dem ER/PR Status im Mammakarzinom.

Östrogen-Rezeptor Status (ER Status)

Anhand des Tumor-ER Status wurde das Tumorkollektiv in zwei Gruppen mit ER-Status negativ ($n=280$) und ER-Status positiv ($n=987$) aufgeteilt. Ein Vergleich der zwei Gruppen zur CLIM2-Expression, wies eine starke Expression von CLIM2 (53%; $P = 0,0001$) in den ER positiven Tumoren auf.

Progesteron-Rezeptor Status (PR Status)

Anhand des Tumor-PR Status, wurde das Tumorkollektiv ebenfalls in zwei Gruppen mit PR-Status negativ ($n=715$) und PR-Status positiv ($n=447$) aufgeteilt. Ein Vergleich der zwei Gruppen zur CLIM2-Expression, wies eine starke Expression von CLIM2 (56,4%; $P = 0,0001$) in den PR positiven Tumoren auf.

Östrogen-Rezeptor Status/ Progesteron-Rezeptor Status (ER/PR Status)

Für den Tumor-ER/PR Status erfolgte eine Aufteilung in drei Gruppen, ER Status negativ ($n=280$), ER Status negativ/PR Status positiv ($n=465$), ER Status positiv/PR Status positiv ($n=426$). Auch dieser Vergleich zur CLIM2-Expression im Tumorkollektiv, wies eine starke CLIM2-Expression (57%; $P = <0,0001$) in ER und PR positiven Tumoren auf.

Mitotischer Index

Unter Bezugnahme des mitotischen Indexes der analysierten Tumorproben, wurde eine strenge Korrelation der CLIM2-Expression und den Mitoseraten beobachtet. Statistisch gesehen weisen die Fälle unter den ER-positiven, die ein höheres Grading und mehr Mitosen aufweisen, also schlechter differenziert sind, eine starke Expression von CLIM2 (58%; $P = 0,0042$) auf. Im Normalfall korreliert der ER und PR Status negativ zur Mitoserate, also ER- und PR-Positivität ist eigentlich eher in besser differenzierten Tumoren (G1) vorzufinden. Von den 1335 Tumorgewebsproben waren lediglich 33 (2,5%) CLIM2 negativ. Hinsichtlich der Intensität der CLIM2-Expression und der Anzahl positiver Tumorzellen, ist in dieser Studie eine positive Korrelation der CLIM2-Expression mit dem ER- und PR-Rezeptorstatus zu erkennen. D.h., dass die Tumorzellen welche positiv für ER und PR sind, auch eine starke

Expression von CLIM2 aufweisen. Der Nachweis von Hormon-Rezeptoren ist für eine postoperative Hormon-Behandlung, generell ein günstiger Prognosefaktor für die Überlebenszeit des Patienten.

III.II.1.3 RLIM und CLIM2 sind mit ER α in Östrogen-abhängigen MCF7 Brustkrebszellen kolokalisiert

Da bereits eine kolokale Expression von RLIM und CLIM2 immunhistochemisch im Östrogen-abhängigen Brustgewebe detektiert wurde (Abb. III.II.1-3), sollte in diesem Versuch immunzytochemisch eine mögliche intra- bzw. subzelluläre Kolokalisierung mit endogenem ER α in MCF7 Zellen untersucht werden. Als ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor ist ER α im Kern lokalisiert. Nach exogenem Stimulus durch Östrogen, bindet er an Zielsequenzen (ERE, *Estrogen Response Element*) auf Östrogen induzierbaren Genpromotoren wie z.B von CyclinD1, pS2 oder CathepsinD.

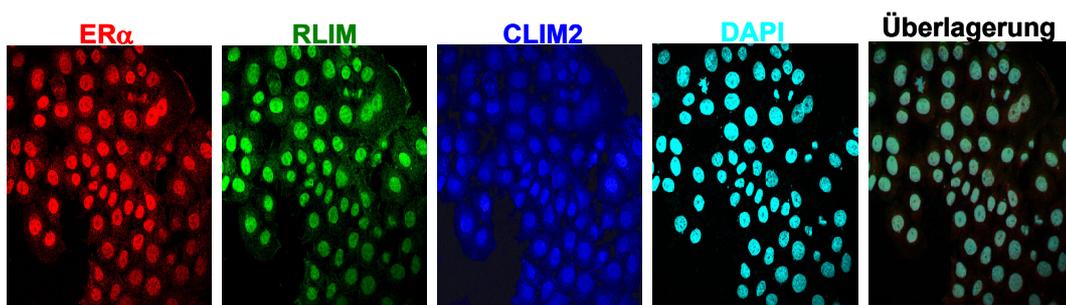


Abbildung III.II.5 ER α kolokalisiert mit RLIM und CLIM2 in MCF7 Zellen.

MCF7 Zellen wurden fixiert und mit spezifischem Maus-Antiserum gegen ER α sowie mit Meerschweinchen-Antiserum gegen RLIM und Kaninchen-Antiserum gegen CLIM2 inkubiert. Die Fluoreszenzsignale der Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper, wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops dokumentiert. Als Marker für Kernfärbung diente DAPI. Die Überlagerung des roten (ER α) grünen (RLIM) und blauen (CLIM2) Kanals, weist auf eine intra- bzw. subzelluläre Kolokalisation der ER α -, RLIM- und CLIM2-Proteine im Zellkern hin. [Vergrößerung: 63x]

Intrazelluläre MCF7 Zellfärbungen zeigen eine kolokale Expression von RLIM, CLIM2 und ER α im Nukleus. Eine Zellfärbung mit dem Kern-Marker DAPI, bestätigt eine dominante Kernfärbung der Proteine in humanen MCF7 Brustkrebszellen. Parallel durchgeführte Versuchsansätze unter der Verwendung von Brusttumorgeweben und deren immunhistochemische Färbung mit Antiseren gegen ER α , RLIM und CLIM2, zeigten gleiche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

III.II.2 CLIM2 und RLIM interagieren mit ER α *in vivo* und *in vitro*

III.II.2.1 *In vivo* Interaktion von CLIM2 und RLIM mit ER α

Aufgrund der TMA-Ergebnisse war es wahrscheinlich, dass CLIM2 mit ER α in MCF7 Zellen interagiert. Da auch RLIM in Östrogen-abhängigen Zellen exprimiert und mit ER α kolokalisiert ist, wurde ebenfalls eine mögliche Interaktion untersucht. Um eine *in vivo* Interaktion durchzuführen, wurden MCF7 Brustkrebszellen einer Immunpräzipitation unterzogen.

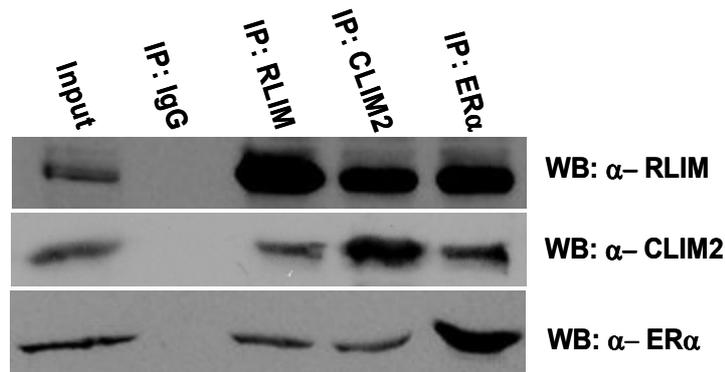


Abbildung III.II.6 *In vivo* Interaktion von CLIM2 und RLIM mit ER α .

Western Blot-Analysen der Immunpräzipitationen zur Interaktionsanalyse von endogenem RLIM und CLIM2 mit ER α aus MCF7 Zelllysaten. MCF7 Zellen wurden kultiviert und anschließend lysiert. Mit den Zelllysaten wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Präzipitation von endogenem RLIM und CLIM2 führt zu einer Kopräzipitation von endogenem ER α . Die Präzipitation von endogenem ER α , führt ebenfalls zu einer Kopräzipitation von CLIM2 und RLIM. Hierfür wurden spezifische Antiseren aus Kaninchen verwendet. Ein unspezifisches Antiserum (IP:IgG) führt zu keiner Kopräzipitation von CLIM2, RLIM oder ER α .

Immunpräzipitationen aus MCF7 Zelllysaten zeigen, dass sowohl RLIM als auch CLIM2 mit ER α kopräzipitieren. Die Verwendung eines unspezifischen Antiserums (IP:IgG) führt hingegen, als Negativ-Kontrolle, zu keiner Kopräzipitation von RLIM, CLIM2 oder ER α . Dieses Ergebnis bestätigt die Spezifität der Koimmunpräzipitationen und somit eine direkte Interaktion von CLIM2 und RLIM mit ER α in MCF7 Brustkrebszellen.

III.II.2.2 *In vitro* Interaktion von CLIM2 und RLIM mit ER α

III.II.2.2.1 CLIM2 interagiert mit ER α *in vitro*

Eine weitere Möglichkeit potenzielle Protein-Protein Interaktionen *in vitro* zu untersuchen, stellt die GST-Fusionsprotein Interaktionsanalyse dar. Dazu wird ein in Bakterien exprimiertes GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend mit einem radioaktiv (^{35}S) markiertem Zielprotein inkubiert. Bindet das Zielprotein an das

GST-Fusionsprotein, kann dies an Hand der radioaktiven Markierung nachgewiesen werden. Somit sollte die bereits durch Immunpräzipitationen nachgewiesene *in vivo* Interaktion von CLIM2 und ER α , unabhängig durch folgendes *in vitro* Experiment bestätigt werden. Als immobilisiertes GST-Fusionsprotein wurde der gesamte kodierende Bereich von CLIM2 eingesetzt. Als potenzieller Interaktor wurde in dieser Analyse als Zielprotein, *in vitro* radioaktiv translaterter ER α eingesetzt. Um zu untersuchen, ob CLIM2 eventuell auch mit anderen Vertretern der Kern-Rezeptoren Familie interagiert, wurden ebenfalls Östrogen-Rezeptor β (ER β), Androgen-Rezeptor (AR) und Glukokortikoid-Rezeptor (GR) *in vitro* radioaktiv markiert und für das Interaktionsexperiment mit CLIM2 verwendet. GST-CLIM2 wurde in Gegenwart von radioaktiv markiertem ER α , ER β , AR und GR bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert und 3x mit PPI-Puffer gewaschen. Anschließend wurden mögliche Protein-Interaktionen mittels SDS PAGE und folgender Autoradiographie analysiert.

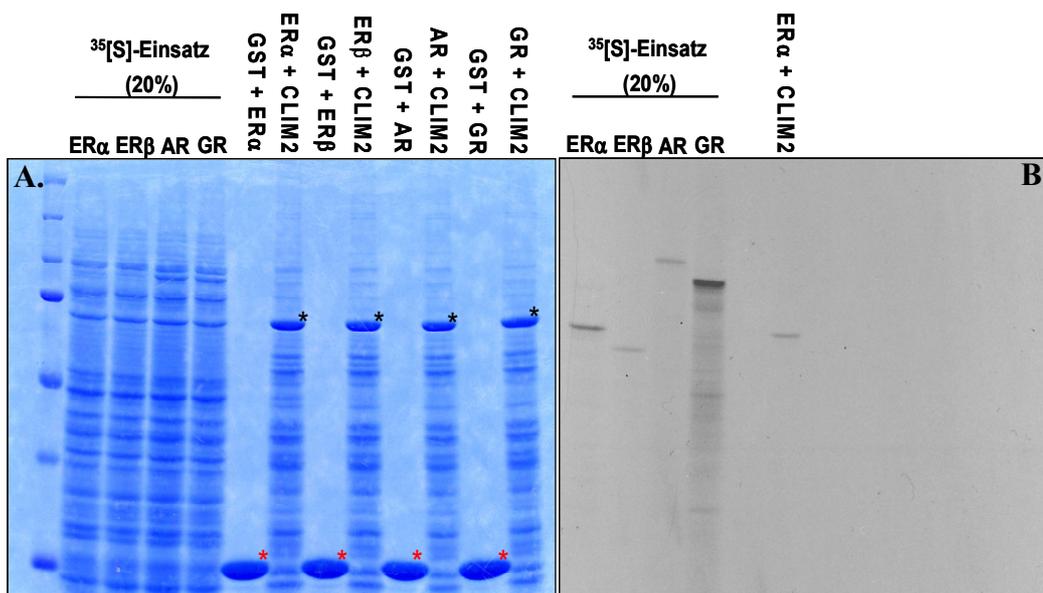


Abbildung III.II.7 In vitro Interaktionsexperiment von CLIM2 mit ER α und anderen Kern-Rezeptoren.

A. Coomassie-Färbung zur Darstellung von gleich geladenen Proteinkonzentrationen. Sowohl Glutathionagarose (GST) (rote Sterne) als Negativ-Kontrolle, als auch GST-CLIM2 (schwarze Sterne) sind in gleichen Mengen im Interaktionsexperiment eingesetzt worden. Als Einsatz bzw. Ladekontrolle wurden die radioaktiv (^{35}S) markierten Kern-Rezeptoren Östrogen-Rezeptor α (ER α), Östrogen-Rezeptor β (ER β), Androgen-Rezeptor (AR) und Glukokortikoid-Rezeptor (GR) eingesetzt. Es folgte eine zweistündige Rotation von GST-CLIM2 Agarose und ^{35}S markiertem Kern-Rezeptor bei 4°C. B. Autoradiographie kopräzipitierter Kern-Rezeptor Proteine im GST Interaktionsexperiment mit CLIM2. Es konnte nur im Falle einer Inkubation von GST-CLIM2 und ^{35}S -ER α eine Interaktion nachgewiesen werden. Eine Inkubation von GST Agarose, als Negativ-Kontrolle, führt zu keiner Kopräzipitation von ^{35}S -ER α . Alle anderen Kern-Rezeptoren können in Gegenwart von GST-CLIM2, ebenfalls nicht kopräzipitiert werden.

Die bereits durch Koimmunpräzipitation verifizierte *in vivo* Interaktion von CLIM2 und ER α (Abb. III.II.6), konnte durch *in vitro* GST-Fusionsprotein Experimente, als ein weiteres unabhängiges Testsystem, nochmals bestätigt werden. Diese direkte Interaktion und auch die bereits im Gewebe-Microarray (III.1.2) erzielten Ergebnisse der Ko-Expression von CLIM2 und ER α im Mammakarzinom, weisen somit auf eine direkte physiologische Relevanz dieser Interaktion in Brustkrebszellen hin.

III.II.2.2.2 *In vitro* Identifizierung der Interaktionsdomäne von CLIM2 mit ER α

Eine Identifizierung der CLIM2 Interaktionsdomäne mit ER α sollte mittels GST-Fusionsprotein Experimente analysiert werden. Bisher bekannt war, dass eine Bindung von Korepressor Proteinen, wie z.B. *nuclear receptor corepressor* (N-CoR), an die ligandengebundene Ligandenbindungsdomäne von ER α (ER α -LBD), mittels eines so genannten Korepressor Bindemotifs erreicht wird (Hu and Lazar, 1999; Laszso *et al.*, 1999). Dieses Bindemotif hat die Aminosäurenabfolge (LXX (L,I,V)L), wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann. Diese *corepressor* NR- (CoRNR) Box kodiert für den Aufbau von drei α -Helices, welche einem Aufbau von bisher beschriebenen klassischen LxxLL Motiven sehr ähnlich ist. Hierbei wird mit definierten Aminosäuren der Ligandenbindungsdomäne von ER α , spezifisch auf dieses Bindemotif hin selektioniert.

Beim näheren Betrachten der CLIM2 Proteinsequenz fiel im Vorwege bereits auf, dass CLIM2 in der so genannten Ldb/Chip *Conserved Domain* (LCCD), ein solches Bindemotif mit der Abfolge LXXIL enthält. Da die ER α Interaktion mit CLIM2 (volle Länge) bereits durch *in vitro* und *in vivo* Interaktionsexperimente verifiziert worden ist, sollte hier die spezifische Interaktionsdomäne von ER α -CLIM2 mittels GST fusionierter CLIM2 Deletionsmutante untersucht werden. Hierfür wurde im Vergleich zu GST-CLIM2 (volle Länge) eine LxxIL-Deletionsmutante (Aminosäurenaustausch zu Alanin) von CLIM2 hergestellt, ebenfalls an GST fusioniert (GST-CLIM2 Δ LIL) und im Interaktionsexperiment mit ER α eingesetzt. GST-CLIM2 oder GST-CLIM2 Δ LIL wurden in Gegenwart von radioaktiv markiertem ER α für 2 h rotierend bei 4°C inkubiert und 3x mit PPI-Puffer gewaschen. Anschließend wurden mögliche Protein-Interaktionen erneut mittels SDS PAGE und folgender Autoradiographie analysiert.

hCLIM2	SNSTLNYLR	L	CV	IL	EPMQELM
mCLIM2	SNSTLNYLR	L	CV	IL	EPMQELM
zCLIM2	SNSTLNYLR	L	CV	IL	EPMQELM
xCLIM2	SNSTLNYLR	L	CV	IL	EPMQELM

Abbildung III.II.8 Homologie Vergleich des ER α Korepressor Bindemotifs in CLIM2.

Dargestellt ist ein Homologie Vergleich des CLIM2 Korepressor Bindemotifs (h=Humanes; m=Maus, z=Zebrafisch, x=Xenopus (Krallenfrosch)). Die Aminosäurenabfolge LxxIL ist hervorgehoben (rot). Mittels *in vitro* Mutagenese wurden die Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Leucin zu Alanin mutiert und anschließend an GST fusioniert und im GST Interaktions-experiment eingesetzt.

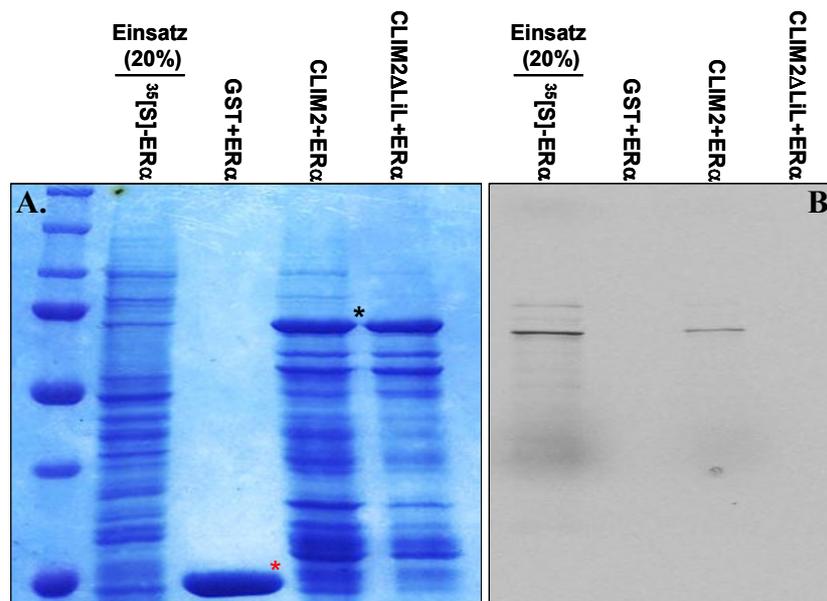


Abbildung III.II.9 *In vitro* Interaktionsanalyse zur Identifizierung der Interaktionsdomäne von CLIM2 und ER α .

A. Coomassie-Färbung zur Darstellung von gleich geladenen Proteinkonzentrationen. Glutathionagarose (GST) (roter Stern) diente als Negativ-Kontrolle. GST-CLIM2 (volle Länge) und die Deletionsmutante CLIM2 Δ LiL sind in gleichen Mengen im Interaktionsexperiment eingesetzt worden (schwarzer Stern). Als Einsatz bzw. Ladekontrolle wurde radioaktiv (³⁵[S]) markierter Östrogen-Rezeptor α (ER α) eingesetzt. Es folgte eine zweistündige Rotation mit der entsprechenden GST-CLIM2 Agarose und ³⁵[S] markiertem ER α bei 4°C. **B.** Autoradiographie kopräzipitierter ³⁵[S]-ER α -Proteine im GST Interaktionsexperiment mit CLIM2 und dessen Vergleich zur Deletionsmutante CLIM2 Δ LiL. Es kann nur im Falle von CLIM2 (volle Länge) eine Interaktion mit ³⁵[S]-ER α nachgewiesen werden. Eine Inkubation von GST Agarose, als Negativ-Kontrolle, führt zu keiner kopräzipitation von ³⁵[S]-ER α . ³⁵[S]-ER α kann ebenfalls in Gegenwart der Deletionsmutante CLIM2 Δ LiL nicht kopräzipitiert werden.

Durch *in vitro* GST-Fusionsprotein Experimente konnte als putative Interaktionsdomäne mit ER α , das ER α Korepressor Bindemotif in CLIM2 identifiziert werden. Dieser Aminosäurenbereich liegt in der CLIM2-LCCD Domäne. Für diesen während der Evolution hochkonservierten Aminosäurenbereich war bereits bekannt, dass sowohl RLIM als auch SSDP1 binden (Güngör *et al.*, 2007).

III.II.2.2.3 *In vitro* Identifizierung der Interaktionsdomäne von ER α mit CLIM2

Für ER α konnte bereits gezeigt werden, dass die Ligandenbindung unmittelbar in einer sterischen Veränderung der Ligandenbindungsdomäne, ausgelöst durch Helix12, resultiert (Shiau *et al.*, 1998). Weiterhin hat diese Bindung eine Rekrutierung und Bindung von Proteinen mit entsprechendem Bindemotif zu Folge. Ob CLIM2 mit der Ligandenbindungsdomäne (Aminosäuren 295-595; ER α -LBD) von ER α interagiert, sollte erneut durch GST-Fusionsexperimente analysiert werden. Hierfür wurde im Vergleich zu GST-CLIM2 (volle Länge) ebenfalls die Deletionsmutante GST-CLIM2 Δ LIL eingesetzt. Als Zielprotein wurde in diesem Experiment nicht der gesamte kodierende Bereich, sondern lediglich die LBD (295-595) von ER α *in vitro* radioaktiv translatiert und im Experiment eingesetzt.

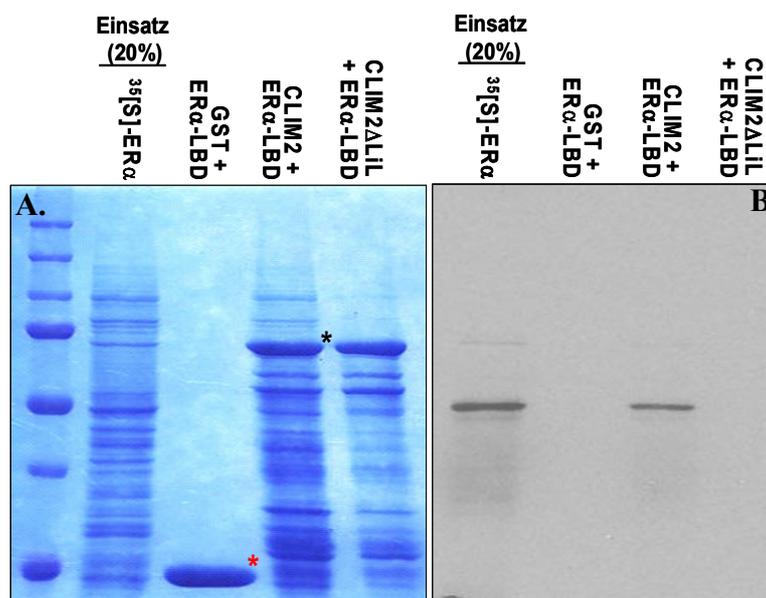


Abbildung III.II.10 *In vitro* Interaktionsanalyse zur Identifizierung der Interaktionsdomäne von ER α und CLIM2.

A. Coomassie-Färbung zur Darstellung von gleich geladenen Proteinkonzentrationen. Glutathionagarose (GST) (roter Stern) diente als Negativ-Kontrolle. GST-CLIM2 (volle Länge) und die Deletionsmutante CLIM2 Δ LIL sind in gleichen Mengen im Interaktionsexperiment eingesetzt worden (schwarzer Stern). Als Einsatz bzw. Ladekontrolle wurde die radioaktiv (35 [S]) markierte ER α -LBD eingesetzt. Es folgte eine zweistündige Rotation mit der entsprechenden GST-CLIM2 Agarose und 35 [S] markierter ER α -LBD bei 4°C **B.** Autoradiographie kopräzipitierter ER α -LBD im GST Interaktionsexperiment mit CLIM2 (volle Länge) und der Deletionsmutante CLIM2 Δ LIL. Es kann nur im Falle von CLIM2 (volle Länge) eine Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α nachgewiesen werden. Eine Inkubation von GST-Agarose, als Negativ-Kontrolle, führt zu keiner Kopräzipitation von 35 [S]-ER α -LBD. Die 35 [S]-ER α -LBD wird ebenfalls in Gegenwart der Deletionsmutante CLIM2 Δ LIL nicht kopräzipitiert.

Durch *in vitro* GST-Fusionsprotein Experimente, konnte als putative Interaktionsdomäne mit CLIM2, der C-terminale Aminosäurebereich von ER α (232-595; ER α -LBD) identifiziert werden. Dieser Bereich bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins und führt so zur Rekrutierung und Bindung von Korepressoren. Weiterhin konnte eine Interaktion nur mit CLIM2 (volle Länge) beobachtet werden. Im Falle der Deletionsmutante GST-CLIM2 Δ LIL, konnte keine Interaktion mit der ER α -LBD beobachtet werden. Diese evolutiv hoch konservierte Aminosäureabfolge (LxxIL) in CLIM2-Proteinen, scheint daher essentiell für eine ER α -LBD Interaktion zu sein.

III.II.2.3 RLIM interagiert mit ER α *in vitro*

Die bereits durch Immunpräzipitation nachgewiesene *in vivo* Interaktion von RLIM und ER α (Abb. III.II.6), sollte ebenfalls durch GST-Fusionsprotein Experimente bestätigt werden. Als immobilisiertes GST-Fusionsprotein wurde der gesamte kodierende Bereich von RLIM eingesetzt. Als potenzieller Interaktor wurde auch in dieser Analyse als Zielprotein, *in vitro* radioaktiv translaterter ER α eingesetzt. Um zu untersuchen, ob RLIM möglicherweise auch mit anderen Vertretern der Kern-Rezeptoren Familie interagiert, wurden Östrogen-Rezeptor β (ER β), Androgen-Rezeptor (AR) und Glukokortikoid-Rezeptor (GR) *in vitro* radioaktiv markiert und für das Interaktionsexperiment mit RLIM verwendet. GST-RLIM wurde in Gegenwart von radioaktiv markierten ER α , ER β , AR und GR bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert und 3x mit PPI-Puffer gewaschen. Anschließend wurden mögliche Protein-Interaktionen erneut mittels SDS PAGE und folgender Autoradiographie analysiert.

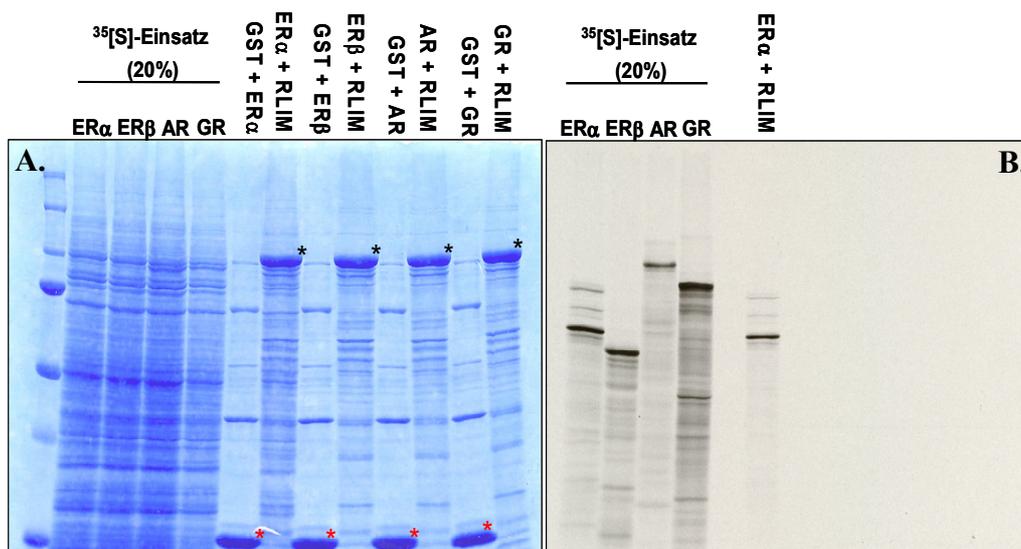


Abbildung III.II.11 *In vitro* Interaktionsexperiment von RLIM mit ER α und anderen Kern-Rezeptoren.

A. Coomassie-Färbung zur Darstellung von gleich geladenen Proteinkonzentrationen. Sowohl Glutathionagarose (GST) (rote Sterne) als Negativ-Kontrolle, als auch GST-RLIM (schwarze Sterne) sind in gleichen Mengen im Interaktionsexperiment eingesetzt worden. Als Einsatz bzw. Ladekontrolle wurden die radioaktiv (^{35}S) markierten Kern-Rezeptoren Östrogen-Rezeptor α (ER α), Östrogen-Rezeptor β (ER β), Androgen-Rezeptor (AR) und Glukokortikoid-Rezeptor (GR), eingesetzt. Es folgte eine zweistündige Rotation von GST-RLIM Agarose und ^{35}S markiertem Kern-Rezeptor bei 4°C **B.** Autoradiographie kopräzipitierter Kern-Rezeptor Proteine im GST Interaktionsexperiment von Kern-Rezeptoren mit RLIM. Es kann nur im Falle einer Inkubation von GST-RLIM und ^{35}S -ER α eine Interaktion nachgewiesen werden. Eine Inkubation von GST-Agarose, als Negativ-Kontrolle, und ^{35}S -ER α führt zu keiner Kopräzipitation. Alle anderen Kern-Rezeptoren werden in Gegenwart von GST-RLIM, ebenfalls nicht kopräzipitiert.

Die bereits durch Immunpräzipitation verifizierte *in vivo* Interaktion von RLIM und ER α , konnte durch *in vitro* GST-Fusionsprotein Experimente nochmals bestätigt werden. Da RLIM, als putativer Interaktor von CLIM2 (Ostendorff *et al.*, 2002), das gleiche Expressionsmuster wie CLIM2 im Brustgewebe von Mäusen aufweist und ebenfalls spezifisch mit ER α sowohl *in vivo* als auch *in vitro* interagiert, lag die Vermutung nahe, dass das RLIM/CLIM2 Netzwerk in der Östrogen vermittelten Transkription von Genen vermutlich eine physiologische Rolle spielen könnte. Weitere *in vivo* Untersuchungen sollten in späteren Kapiteln zu näherer Erkenntnis führen.

III.II.2.3.1 *In vitro* Identifizierung der Interaktionsdomäne von RLIM mit ER α

Da die Interaktionsdomäne von RLIM mit CLIM2 bereits bekannt war (Ostendorff *et al.*, 2002), sollte in diesem *in vitro* Versuch die Interaktionsdomäne von RLIM mit ER α näher untersucht werden. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen, stellt die GST-Fusionsprotein Interaktionsanalyse dar. Hierfür wurden GST-Fusionskonstrukte von verschiedenen RLIM Deletionsmutanten (Abb. III.II.12) in Bakterien exprimiert und anschließend mit GST-Agarose aufgereinigt. Als Zielprotein wurde auch in dieser Analyse, *in vitro* radioaktiv translatierter ER α eingesetzt. GST-Deletionsmutanten von RLIM wurden zusammen mit radioaktiv markiertem ER α bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert und 3x mit PPI-Puffer gewaschen. Anschließend wurden mögliche Protein-Interaktionen mittels SDS PAGE und folgender Autoradiographie analysiert.

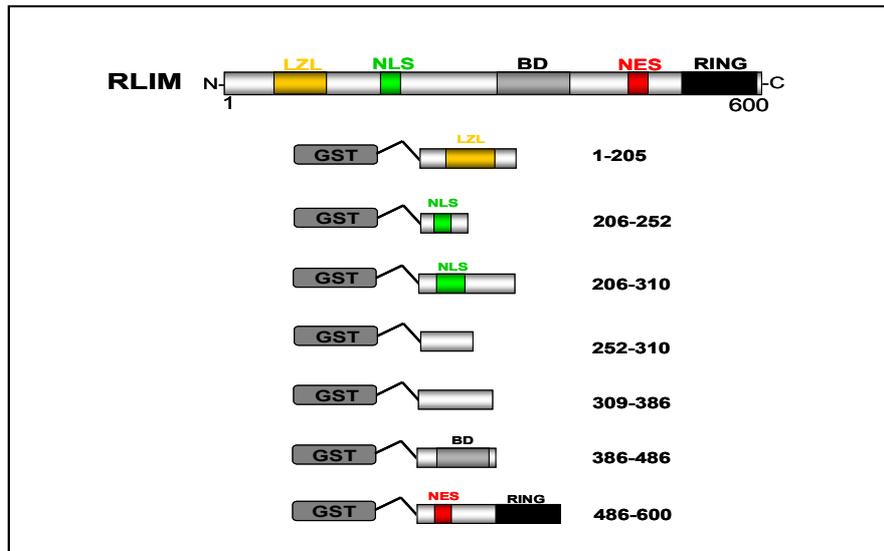


Abbildung III.II.12 Deletionsmutanten von RLIM (GST-Fusion).

Dargestellt sind die in diesem Versuch verwendeten unterschiedlichen Deletionsmutanten von RLIM, fusioniert an GST. Die Ziffern weisen auf die jeweilige kodierende Region der RLIM Aminosäuresequenz hin. (LZL-Leucin-Zipper-Like Domäne; NLS-Nuclear localisation sequence; BD-Basic Domain; NES-Nuclear Export Sequence; RING-Really Interesting New Gene, Aminosäuresequenz kodiert für den RINGfinger und somit für die Ubiquitinierungsaktivität von RLIM).

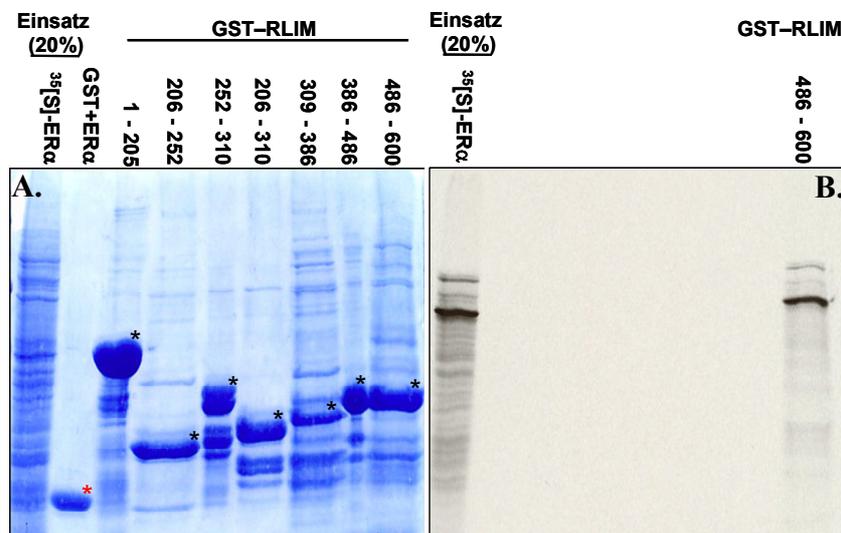


Abbildung III.II.13 *In vitro* Interaktionsanalyse zur Identifizierung der Interaktionsdomäne von RLIM und ER α .

A. Coomassie-Färbung zur Darstellung von gleich geladenen Proteinkonzentrationen. Gluthation-Agarose (GST) (roter Stern) diente als Negativ-Kontrolle. Die unterschiedlichen GST-fusionierten RLIM-Deletionsmutanten sind im Interaktionsexperiment eingesetzt worden (schwarze Sterne). Die Ziffern weisen auf die jeweiligen Aminosäuren der RLIM Proteinsequenz hin. Als Einsatz bzw. Ladekontrolle wurde radioaktiv markierter ER α eingesetzt. Es folgte eine zweistündige Rotation mit der jeweiligen RLIM GST-Deletionsmutanten Agarose und ³⁵[S] markiertem ER α bei 4°C **B.** Autoradiographie kopräzipitierter ³⁵[S]-ER α -Proteine im GST-Interaktionsexperiment mit RLIM Deletionsmutanten. Es kann nur im Falle der RLIM Deletionsmutante GST-486-600 eine Interaktion mit ³⁵[S]-ER α nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit GST-Agarose, als Negativ-Kontrolle, führt zu keiner Kopräzipitation von ³⁵[S]-ER α . ³⁵[S]-ER α wird ebenfalls in Gegenwart aller anderen RLIM Deletionsmutanten nicht kopräzipitiert.

Durch *in vitro* GST-Fusionsprotein Experimente, konnte als putative Interaktionsdomäne mit ER α , der C-terminale Aminosäurenbereich von RLIM (GST-488-600) identifiziert werden. Dieser Aminosäurenbereich kodiert zum einen für die nukleäre Lokalisation von RLIM, zum anderen für den Aufbau einer RINGfinger Struktur (Zink-bindendes Motiv), welche für die biologische Aktivität einer Ubiquitin-Ligase, also für die Vermittlung von Ubiquitinierungen an ein Substrat, essentiell ist. Da schon länger bekannt war, dass der Östrogen-Rezeptor α in Zellen ubiquitiniert und vom 26S-Proteasom abgebaut wird (Nawaz *et al.*, 1999), lag die Vermutung nahe das RLIM diese Ubiquitinierung vermittelt und/oder zusammen mit CLIM2 am Auf- bzw. Abbau von Transkriptionskomplexen beteiligt ist. Weitere *in vivo* und *in vitro* Experimente, sollten in einem anderen Teil dieser Arbeit (III.II.2.5) zu weiterer Erkenntnis führen.

III.II.2.3.2 *In vitro* Identifizierung der Interaktionsdomäne von ER α mit RLIM

Für ER α war bisher bekannt, dass die Ligandenbindung zu Veränderungen der Proteinstruktur führt. Die Konformationsänderung im C-terminalen Bereich des Proteins in Helix12, führt so unmittelbar zu einer Rekrutierung und Bindung sowohl von transkriptionellen Koaktivatoren als auch von Korepressoren (Pissios *et al.*, 2000). Weiterhin war bekannt, dass das Ubiquitinsystem bzw. die proteasomale Regulierung, eine entscheidende Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung bzw. Regulierung von Genen einnimmt. Ob RLIM mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α interagiert, sollte durch GST-Fusionsexperimente analysiert werden. Hierfür wurden erneut RLIM Deletionsmutanten (Abb. III.II.12) verwendet. Als Zielprotein wurde in diesem Experiment nicht der gesamte kodierende Bereich, sondern lediglich der C-terminale Bereich von ER α (ER α -LBD) *in vitro* radioaktiv translatiert. So wurden GST-Deletionsmutanten von RLIM zusammen mit radioaktiv markierter ER α -LBD bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert und 3x mit PPI-Puffer gewaschen. Anschließend wurden mögliche Protein-Interaktionen mittels SDS PAGE und folgender Autoradiographie analysiert.

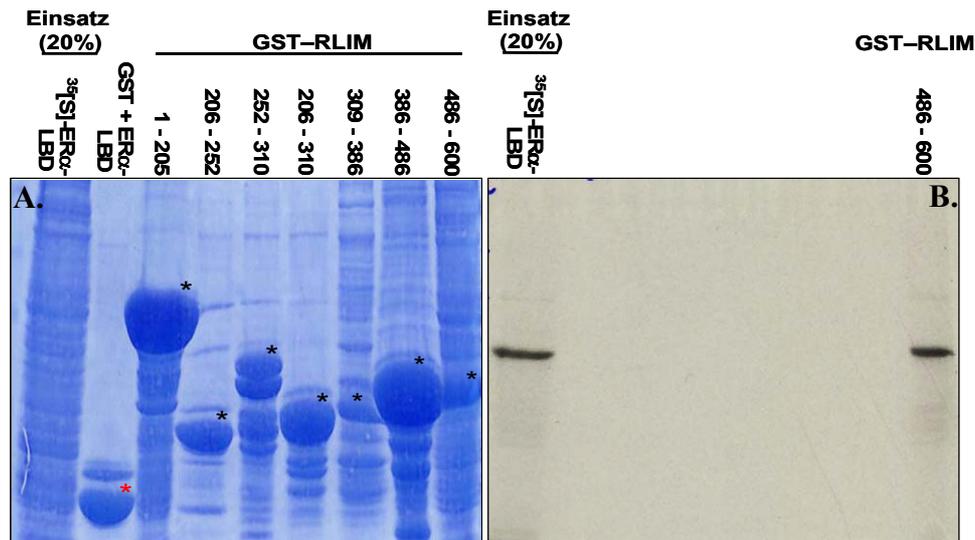


Abbildung III.II.14 *In vitro* Interaktionsanalyse zur Identifizierung der Interaktionsdomäne von ERα und RLIM.

A. Coomassie-Färbung zur Darstellung von eingesetzten Proteinkonzentrationen. Glutathion-Agarose (GST) (roter Stern) diene als Negativ-Kontrolle. Die unterschiedlichen GST-fusionierten Deletionsmutanten von RLIM (schwarze Sterne) sind im Interaktionsexperiment eingesetzt worden. Die Ziffern weisen auf die jeweiligen Aminosäuren der RLIM Proteinsequenz hin. Als Einsatz bzw. Ladekontrolle wurde die radioaktiv (³⁵[S]) markierte ERα-LBD eingesetzt. Es folgte eine zweistündige Rotation mit der jeweiligen RLIM GST-Deletionsmutanten Agarose und ³⁵[S] markierter ERα-LBD bei 4°C **B.** Autoradiographie kopräzipitierter ³⁵[S]-ERα-LBD im GST Interaktionsexperiment mit RLIM Deletionsmutanten. Es kann nur im Falle der RLIM Deletionsmutante GST-486-600 eine spezifische Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne von ERα nachgewiesen werden. Eine Inkubation von GST-Agarose, als Negativ-Kontrolle, führt zu keiner Kopräzipitation von ³⁵[S]-ERα-LBD. ³⁵[S]-ERα-LBD wird ebenfalls in Gegenwart aller anderen RLIM Deletionsmutanten nicht kopräzipitiert.

Durch *in vitro* GST-Fusionsprotein Experimente konnte als putative Interaktionsdomäne mit RLIM, der C-terminale Aminosäurebereich von ERα (295-595; ERα-LBD) identifiziert werden. Dieser Aminosäurebereich bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins und führt zur Rekrutierung und Bindung von Koaktivatoren und Korepressoren. Ob RLIM, aufgrund der Interaktion mit der ERα-LBD, in der Östrogen vermittelten Transkription eine dieser Rollen einnimmt, soll in späteren Kapiteln dieser Arbeit aufgezeigt werden.

III.II.2.4 RLIM ubiquitiniert ERα *in vitro* und *in vivo*

Die Polyubiquitinierung von Substrat-Proteinen ist eine wichtige Voraussetzung für einen proteasomalen Abbau durch das 26S-Proteasom. Hierbei spielt vor allem die Anzahl der Ubiquitin-Markierungen eine entscheidende Rolle. Bedingung für die Polyubiquitinierung eines Ziel-Proteins sind mindestens vier Ubiquitin-Moleküle, welche über das Lysin 48 verkettet sind. (Spence *et al.*, 1995). Die Verkettung von Ubiquitin am Substrat-Protein resultiert in einer Zunahme des Molekulargewichtes. In diesem Experiment sollte daher

untersucht werden, ob RLIM als Ubiquitin-Ligase in der Lage ist, *in vitro* und *in vivo* die Polyubiquitinierung von ER α zu vermitteln. Für die Durchführung von *in vitro*-Ubiquitinierungen wurde zunächst ER α *in vitro* translatiert und radioaktiv (^{35}S) markiert. Eine Inkubation mit bakteriell aufgereinigtem GST-RLIM, sollte bei erfolgreicher Polyubiquitinierung mit einem deutlich höheren Molekulargewicht von ER α einhergehen. Um eine RLIM spezifische Polyubiquitinierung bestätigen zu können, wurde ER α ebenfalls mit den an der Ubiquitinierungskaskade beteiligten Enzymen E1 und/oder E2, allerdings in Abwesenheit von GST-RLIM inkubiert. Um eine RLIM vermittelte Ubiquitinierung von ER α *in vivo* zu überprüfen, wurden MCF7 Zellen ausgewählt, da sie endogen ER α exprimieren. So wurde in MCF7 Zellen RLIM und Ubiquitin ektopisch mit entsprechenden Vektoren koüberexprimiert. Als entsprechende Kontrolle, wurde entweder nur RLIM oder nur Ubiquitin mit entsprechenden Vektoren überexprimiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden ebenfalls unbehandelte Zellen verwendet. Die Expression von Ubiquitin resultiert in einem Fusionsprotein mit His-Linker (bestehend aus 6 Histidin-Resten), welcher anschließend eine spezifische Bindung aller ubiquitinierten Substrate an eine Ni-NTA-Säulenmatrix vermitteln soll. Mögliche Veränderungen in der Größe der Molekülmasse von ER α , wurden anschließend entweder mittels SDS PAGE und Autoradiographie für *in vitro*-Ubiquitinierungen, oder mittels SDS PAGE und Western Blot in Kombination mit spezifischen ER α -Antikörpern für *in vivo*-Ubiquitinierungen analysiert.

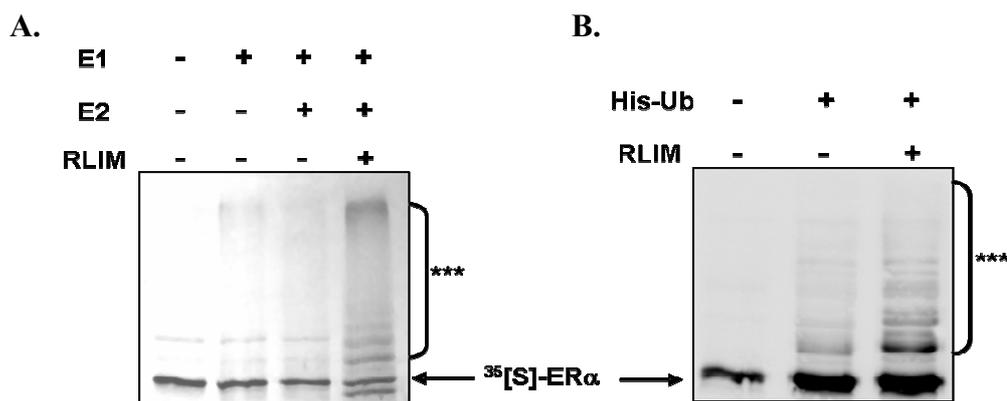


Abbildung III.II.15 RLIM vermittelt die Polyubiquitinierung von ER α *in vitro* und *in vivo*.

A. Autoradiographie zur Darstellung einer RLIM abhängigen Polyubiquitinierung von ER α *in vitro*. Eingesetzt wurden *in vitro* translatierter und radioaktiv markierter ^{35}S -ER α (Pfeil) in Gegenwart von E1, E2 oder RLIM. Das E2-Protein sowie RLIM wurden bakteriell exprimiert und aufgereinigt. E1-Enzym und Ubiquitin-Moleküle sind kommerzieller Herkunft. Die Reaktionsansätze wurden mittels SDS PAGE analysiert. Die Inkubation mit E1 oder E2 führt zu keiner Erhöhung des Molekulargewichtes von ER α . Erst die Gegenwart von rekombinantem RLIM zeigt ein typisches höher molekulares Laufverhalten im SDS PAGE, wie es für polyubiquitinierte Proteine charakteristisch ist (Sterne). **B.** Western Blot-Analyse zur Darstellung

einer RLIM vermittelten Polyubiquitinierung von ER α *in vivo*. MCF7 Zellen blieben entweder unbehandelt, wurden mit His-Ubiquitin (His-Ub) ektopisch überexprimiert oder wurden mit His-Ub und RLIM ektopisch koüberexprimiert. Anschließend wurden Lysate der His-Ub überexprimierten Zellen über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt, gebundene ubiquitinierte Proteine gewaschen und anschließend eluiert. Die Eluate wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Verfahren konnte endogener ER α mittels spezifischen Antiserum aus Kaninchen detektiert werden. Während in den Kontroll-Zellen erwarteterweise keine Ubiquitinierung von ER α detektiert wurde, konnte in den His-Ub und RLIM koüberexprimierten Zellen, eine im Vergleich zu His-Ub exprimierten Zellen, gesteigerte Polyubiquitinierung von ER α detektiert werden (Sterne).

In *in vitro* Ubiquitinierungs-Experimenten kann bakteriell exprimiertes RLIM, in Anwesenheit aller notwendigen Komponenten der Ubiquitin-Reaktion, die Polyubiquitinierung von radioaktiv markiertem ER α vermitteln. Im Gegensatz führte die Anwesenheit von E1 oder E2 zu keiner Erhöhung der Molekülmasse von ER α . Weitere Kontroll-Experimente mit anderen Vertretern der Kern-Rezeptoren Familie, wie Thyroid-Rezeptor oder *Germ Cell Nuclear Factor* (GCNF), führten zu keiner Polyubiquitinierung in Anwesenheit von RLIM (Daten nicht gezeigt). Die Durchführung von *in vivo* Ubiquitinierungs-Experimenten mittels ektopisch überexprimierten His-Ubiquitin zeigte in Gegenwart von ektopisch überexprimiertem RLIM, ebenfalls eine gesteigerte Polyubiquitinierung von ER α .

III.II.3 Die funktionelle Rolle von RLIM und CLIM2 in der ER α vermittelten Transkription von Zielgenen

Da gezeigt werden konnte, dass sowohl RLIM als auch CLIM2 mit ER α *in vivo* und *in vitro* interagieren, stellten wir die Hypothese auf, dass beide Proteine funktionell mit ER α interagieren und die ER α vermittelte Transkription von Zielgenen beeinflussen. Daher sollte vorerst mit Hilfe der folgenden Reporter-gen-Experimente (Luziferase), ein möglicher Einfluss auf die ER α gesteuerte Transkription von Zielgenen in MCF7 Brustkrebszellen näher untersucht werden. Mittels transienter Transfektion eines Östrogen-Rezeptor α responsiblen Luziferase Reporter-genkonstruktes (ERE-TK-Luziferase), sollten mögliche Effekte von RLIM und CLIM2 näher studiert werden.

III.II.3.1 Eine Überexpression von RLIM führt zu einer verstärkten Transaktivierung des Reportergens in ER α positiven MCF7 Zellen

In diesem *in vivo* Experiment sollte der Wirkungsmechanismus von RLIM auf die ER α gesteuerte Transkription von Zielgenen näher untersucht werden. Hierzu wurden MCF7 Zellen mit einem für ER α spezifischen responsiblen Luziferase Reporter-genkonstrukt (ERE-TK-Luziferase) und einem für die Expression von RLIM kodierenden Vektor, transient

kotransfiziert. Um mögliche funktionelle Domänen von RLIM mit einzubeziehen, wurde die Analyse mit einem Expressionsvektor durchgeführt, in dem die kodierende Region für RLIM vollständig integriert war. Zum Vergleich wurden Zellen mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert. Nach Hormon-Stimulus durch 17- β Östradiol, wurde die relative Luziferase-Aktivität in Extrakten von MCF7 Zellen luminometrisch gemessen und anschließend miteinander verglichen.

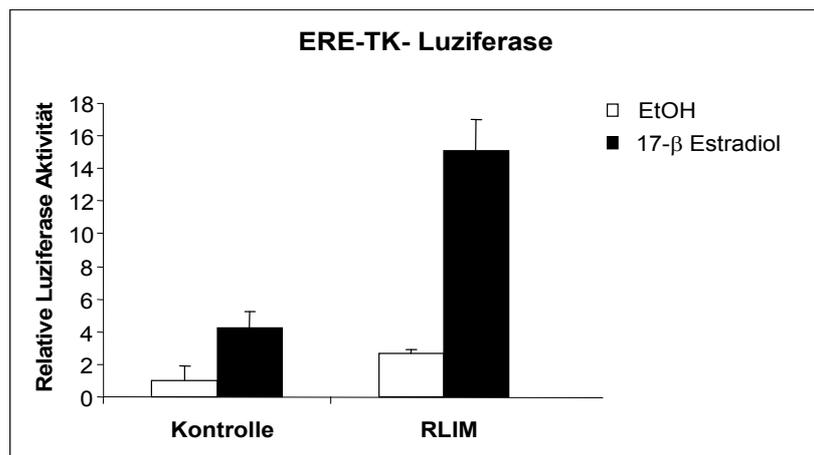


Abbildung III.II.16 Die Überexpression von RLIM in MCF7 Zellen.

Luziferase Reportergen-Experiment von RLIM-überexprimierten MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt eine, im Vergleich zur Kontrolle, verstärkte Transaktivierung des ER α responsiblen Luziferase Reportergens, vermittelt durch eine RLIM Überexpression. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit einem für RLIM kodierenden Expressionsvektor oder einem Kontroll-Plasmid, zusammen mit dem Luziferase Reportergen Vektor (ERE-TK-Luziferase) transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen entweder mit Östrogen (10^{-7} M), oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH, für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die relative Luziferase-Aktivität bzw. Expression luminometrisch gemessen. Die Mittelwerte der Reportergen-Aktivitäten aus Dreifachbestimmungen, wurden jeweils auf die nicht stimulierte Reportergen-Aktivität der entsprechenden Kotransfektion normiert.

Mittels Reportergen-Analyse konnte RLIM als potenzieller Koaktivator von ER α identifiziert werden. Eine durch Östrogen vermittelte Transaktivierung der ER α initiierten Transkription und Expression des Luziferase Reportergens, ist im Falle einer Überexpression von RLIM, im Vergleich zur nicht stimulierten Transkription, ca. 4-fach verstärkt. Ob dieser funktionelle Einfluss auf die ER α Transaktivierung konzentrationsabhängig ist, sollte erneut durch Überexpression von ansteigenden Konzentrationen des für RLIM kodierenden Expressionsvektors, analysiert werden. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen (0,2-2 μ g) des Expressionsvektors für RLIM, zusammen mit dem Luziferase Reportergenkonstrukt, transient kotransfiziert.

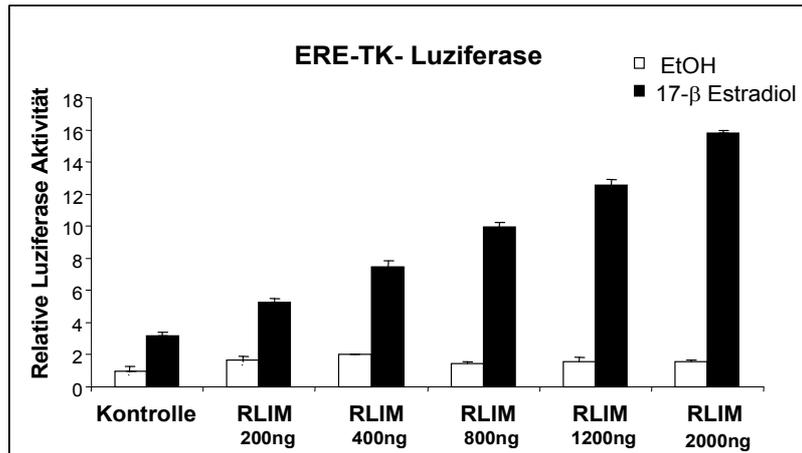


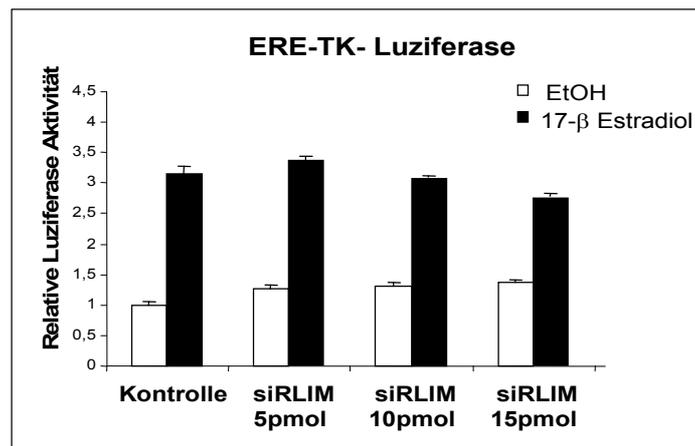
Abbildung III.II.17 Die Überexpression von definierten RLIM Konzentrationen in MCF7 Zellen.

Luziferase Reporter-Experiment von RLIM-überexprimierten MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt, im Vergleich zur Kontrolle, eine konzentrationsabhängige Verstärkung der Transaktivierung des ER α responsiblen Luziferase Reportergens, vermittelt durch eine RLIM-Überexpression. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit einem für RLIM kodierenden Expressionsvektor, oder einem Kontroll-Plasmid, zusammen mit dem Luziferase Reporter-Gen Vektor (ERE-TK-Luziferase) transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östrogen (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH, für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die relative Luziferase-Aktivität bzw. Expression luminometrisch gemessen. Die Mittelwerte der Reporter-Gen-Aktivitäten aus Dreifachbestimmungen, wurden jeweils auf die nicht stimulierte Reporter-Gen-Aktivität der entsprechenden Kotransfektion normiert.

Es konnte gezeigt werden, dass der funktionelle Einfluss von RLIM auf die ER α gesteuerte Transkription des Reportergens, konzentrationsabhängig ist. Das heißt, je mehr RLIM in MCF7 Zellen überexprimiert wurde, desto mehr verstärkt war die Transaktivierung des Luziferase Reportergens. RLIM scheint somit an ER α eingeleiteten transkriptionellen Prozessen positiv beteiligt zu sein und wirkt koaktivatorisch. Des Weiteren bestätigt diese Analyse, dass RLIM nicht für den ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau von ER α in MCF7 Zellen verantwortlich ist, da es sonst bei dessen Überexpression zu einer Abnahme des exprimierten Reportergens kommen sollte.

Um den Effekt eines siRNA vermittelten *knockdown* von RLIM auf die Transaktivierung des Reportergens zu überprüfen, wurden erneut MCF7 Zellen transient mit spezifischen siRNA Molekülen gegen RLIM und dem Luziferase Reporter-Genkonstrukt, kotransfiziert.

A.



B.

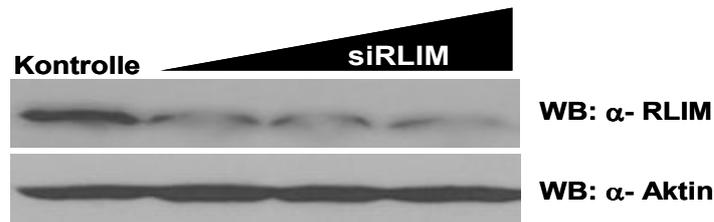


Abbildung III.II.18 Einfluss der RLIM-Depletion auf die ER α -Transaktivierung des Luziferase Reportergens.

Luziferase Reportergen-Experiment von RLIM-expressionsdefizienten MCF7 Zellen. **A.** Das Säulendiagramm zeigt eine, im Vergleich zur Kontrolle, reduzierte Transaktivierung des ER α verantwortlichen Luziferase Reportergens, vermittelt durch einen dosisabhängigen und siRNA vermittelten *knockdown* von RLIM. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit spezifischen siRNA Molekülen gegen RLIM (5-15 pmol), oder einer Kontroll-siRNA (15 pmol), zusammen mit dem Luziferase Reportergen Vektor (ERE-TK-Luziferase), transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH, für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und aufgeteilt. Ein Teil der Lysate wurde für die Messung der relativen Luziferase-Aktivität bzw. Expression eingesetzt, ein anderer hingegen für ein SDS PAGE und folgendem Western Blot zur Quantifizierung eines effektiven RLIM *knockdown*. Die Mittelwerte der Reportergen-Aktivitäten aus Dreifachbestimmungen, wurden jeweils auf die nicht stimulierte Reportergen-Aktivität der entsprechenden Kotransfektion normiert. **B.** Western Blot-Analysen zum Nachweis eines spezifischen *knockdown* von RLIM, vermittelt durch transiente Transfektion von siRNA Molekülen. Die Detektion von RLIM wurde mit spezifischem Antiserum aus Kaninchen durchgeführt. Ein effektiver *knockdown* (ca. 70%), kann hier mit 15 pmol der RLIM siRNA beobachtet werden. Als Ladekontrolle diente die Detektion von Aktin mit spezifischem Antiserum aus Kaninchen.

Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu einer RLIM-Überexpression, ein siRNA vermittelter *knockdown* von RLIM zu einer Abnahme der Transaktivierung des Luziferase Reportergens in MCF7 Zellen führt. Das bedeutet, dass RLIM als Koaktivator von ER α eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Reportergens einnimmt. Eine im Vergleich zur Kontrolle minimal erhöhte Transaktivierung des Reportergens in den siRLIM (5pmol) transfizierten MCF7 Zellen, lässt sich vermutlich auf eine restliche endogene Aktivität von nicht vollständig runter regulierten RLIM-Proteinen zurückführen. So konnte gezeigt werden,

dass sowohl die ektopische Überexpression von RLIM, als auch dessen siRNA vermittelter *knockdown*, einen Einfluss auf Transaktivierungsprozesse von ER α hat.

III.II.3.2 Die verstärkte RLIM vermittelte Transaktivierung ist RINGfinger abhängig

In diesem Experiment sollte der Wirkungsmechanismus von RLIM eingehender analysiert werden, um aufzuklären, welche Proteindomäne von RLIM für die Koaktivierung in Transaktivierungsprozessen von ER α verantwortlich ist. Da bereits im Rahmen von GST-Interaktionsexperimenten (Abb. III.II.13-14) die C-terminale RINGfinger Domäne von RLIM als spezifische Interaktionsdomäne mit ER α identifiziert werden konnte, sollte hier der Einfluss der RLIM RINGfinger Deletionsmutante in Transaktivierungsprozessen von ER α , mittels transienter Überexpression analysiert werden. Die RLIM RINGfinger Deletionsmutante (RLIM Δ RING) ist in Überexpressions-Experimenten bereits als ein dominant-negativ wirkendes Molekül bekannt (Bach *et al.*, 1999). Das bedeutet, dass die RINGfinger Domäne für die biologische Aktivität von RLIM als Ubiquitinligase, essentiell ist. Ein fehlender Aufbau der RINGfinger Domäne führt weder zu einer *in vitro* noch zu einer *in vivo* Ubiquitinierung von Substraten. Hierzu wurde die RLIM RINGfinger Deletionsmutante zusammen mit dem Luziferase Reporter-genkonstrukt in MCF7 Zellen transient kotransfiziert und anschließend die resultierende Reporter-gen-Aktivität luminometrisch gemessen. Im Vergleich wurde ein Expressionsvektor verwendet, welcher den RLIM Wildtyp kodiert.

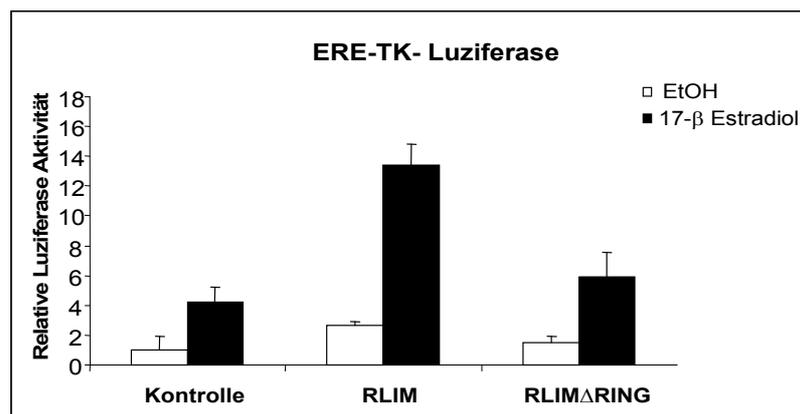


Abbildung III.II.19 Die RLIM RINGfinger abhängige Transaktivierung des Luziferase Reportergens.

Luziferase Reporter-gen-Experiment von RLIM- und RLIM Δ RING-überexprimierten MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt eine verstärkte Transaktivierung des ER α responsiblen Luziferase Reportergens, vermittelt durch eine Überexpression von RLIM. Im Vergleich dazu zeigt die RINGfinger Deletionsmutante (RLIM Δ RING), eine deutlich reduzierte Transaktivierung. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit einem für Wildtyp RLIM kodierenden Expressionsvektor, der RINGfinger Deletionsmutante oder einem Kontroll-Plasmid, zusammen mit dem Luziferase Reporter-gen Vektor (ERE-TK-Luziferase) transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol

(10^{-7} M), oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH, für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die relative Luziferase-Aktivität bzw. Expression luminometrisch gemessen. Die Mittelwerte der Reporter-Gen-Aktivitäten aus Dreifachbestimmungen, wurden jeweils auf die nicht stimulierte Reporter-Gen-Aktivität der entsprechenden Kotransfektion normiert.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Ubiquitinierung generell von wichtiger Bedeutung für die ordentliche Transkription von ER α gesteuerten Zielgenen ist (Ismail und Nawaz, 2005). ER α selbst wird ubiquitiniert und proteasomal reguliert (Nawaz *et al.*, 1999). Die spezifische Hemmung des 26S-Proteasoms mittels MG132 führt zu einer vollständigen Blockade der Transkription von ER α Zielgenen. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein erfolgreiches zyklisches Binden von ER α an Zielgenpromotoren, dessen Ubiquitinierung und Abbau durch das 26S-Proteasom erfordern (Metivier *et al.*, 2003).

Hier konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der RLIM RINGfinger Deletionsmutante, einen dominant-negativen Effekt auf die ER α gesteuerte Transkription des Luziferase Reportergens vermittelt.

III.II.3.3 Eine Überexpression von CLIM2 führt zu einer Repression des Reportergens in ER α positiven MCF7 Zellen

Bisher war bekannt, dass das LMO4 Protein (LIM-Domänen Protein) als potenzieller Interaktionspartner von CLIM2, die Differenzierung von epithelialen Maus Brustgewebszellen bei Überexpressionen hemmt und in humanen Brustkrebszellen häufig überexprimiert ist (Visvader *et al.*, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eventuelle Deregulationen des LMO4 Gens zur Brust-Tumorgenese führen kann. Auch die Durchführung des TMA Microarrays vom Brustkrebsgewebe (III.II.1.2), zeigte eine statistisch häufige und hohe Expression von CLIM2 im Mammakarzinom, welche mit einem schlechten Differenzierungsgrad der Tumore korreliert.

Im folgenden Experiment sollte daher der Wirkungsmechanismus von CLIM2 auf die ER α gesteuerte Transkription von Zielgenen näher untersucht werden. Hierzu wurden MCF7 Zellen mit einem für ER α spezifischen verantwortlichen Luziferase Reporter-Genkonstrukt (ERE-TK-Luziferase) und einem für die Expression von CLIM2 kodierenden Vektor, transient kotransfiziert. Um mögliche funktionelle Domänen von CLIM2 mit einzubeziehen, wurde die Analyse mit einem Expressionsvektor durchgeführt, in dem die kodierende Region für Wildtyp CLIM2 integriert war. Zum Vergleich wurden Zellen mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert und dienten als Kontrolle. Nach Hormon-Stimulus mittels

17 β Östradiol, wurde die relative Luziferase-Aktivität in Extrakten der MCF7 Zellen luminometrisch gemessen und anschließend miteinander verglichen.

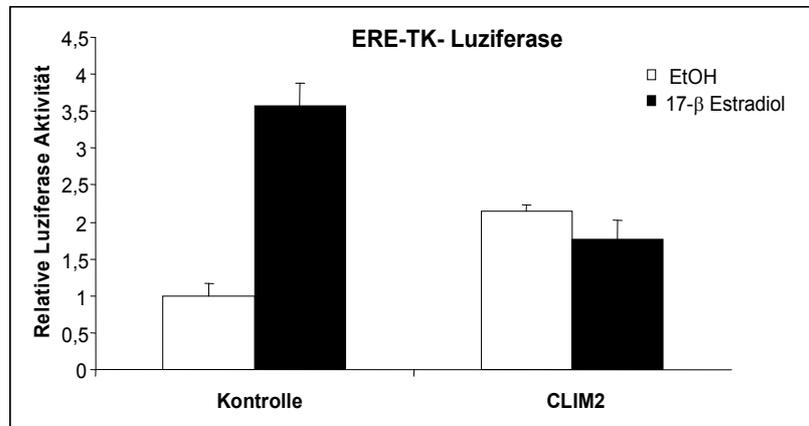
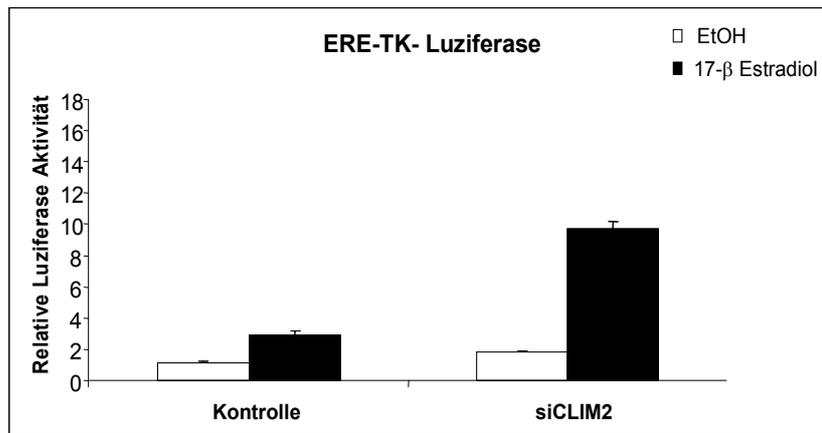


Abbildung III.II.20 Die Überexpression von CLIM2 in MCF7 Zellen.

Luziferase Reporter-Experiment von CLIM2-überexprimierten MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt eine, im Vergleich zur Kontrolle, verringerte Transaktivierung des ER α responsiblen Luziferase Reportergens, vermittelt durch eine Überexpression von CLIM2. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit einem für CLIM2 kodierenden Expressionsvektor oder einem Kontroll-Plasmid, zusammen mit dem Luziferase Reporter-Gen Vektor (ERE-TK-Luziferase) transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die relative Luziferase-Aktivität bzw. Expression luminometrisch gemessen. Die Mittelwerte der Reporter-Gen-Aktivitäten aus Dreifachbestimmungen, wurden jeweils auf die nicht stimulierte Reporter-Gen-Aktivität der entsprechenden Kotransfektion normiert.

Mittels Reporter-Gen-Analysen konnte CLIM2 als Korepressor von ER α identifiziert werden. Die Östrogen vermittelte Transaktivierung der ER α initiierten Transkription und Expression des Luziferase Reportergens ist bei ektopischer CLIM2-Überexpression, im Vergleich zur nicht stimulierten Transkription, um ca. 50% reduziert. CLIM2 ist somit in ER α eingeleiteten transkriptionellen Prozessen negativ involviert. Dieser Effekt zeigt, dass die *in vivo* Funktion(en) von CLIM2 in Brustkrebszellen, mit der von bereits für LMO4 beschriebenen Funktion korreliert (Visvader *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). Um den Effekt eines siRNA vermittelten *knockdown* von CLIM2 auf die Transaktivierung des Reportergens zu überprüfen, wurden erneut MCF7 Zellen transient mit spezifischen siRNA Molekülen gegen CLIM2 und dem Luziferase Reporter-Genkonstrukt kotransfiziert und anschließend luminometrisch gemessen.

A.



B.

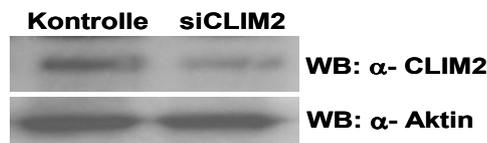


Abbildung III.II.21 Einfluss der CLIM2-Depletion auf die ER α -Transaktivierung des Luziferase Reportergens.

Luziferase Reportergen-Experiment von CLIM2-expressionsdefizienten MCF7 Zellen. **A.** Das Säulendiagramm zeigt eine, im Vergleich zur Kontrolle, verstärkte Transaktivierung des ER α verantwortlichen Luziferase Reportergens, vermittelt durch den siRNA induzierten CLIM2 *knockdown*. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit spezifischen siRNA Molekülen gegen CLIM2 (20 pmol) oder einer Kontroll-siRNA (20 pmol), zusammen mit dem Luziferase Reportergen Vektor (ERE-TK-Luziferase) transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH, für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und aufgeteilt. Ein Teil der Lysate wurde für die luminometrische Messung der relativen Luziferase-Aktivität bzw. Expression eingesetzt, ein anderer hingegen für ein SDS PAGE und folgendem Western Blot, zur Quantifizierung eines effektiven CLIM2 *knockdown*. Die Mittelwerte der Reportergen-Aktivitäten aus Dreifachbestimmungen, wurden jeweils auf die nicht stimulierte Reportergen-Aktivität der entsprechenden Kotransfektion normiert. **B.** Western Blot-Analysen zum Nachweis eines spezifischen CLIM2 *knockdown*, vermittelt durch transiente Transfektion von siRNA Molekülen. Die Detektion von CLIM2 wurde mit spezifischem Antiserum aus Kaninchen durchgeführt. Der effektive *knockdown* liegt bei ca. 60%. Als Ladekontrolle diente die Detektion von Aktin mit spezifischem Antiserum aus Kaninchen.

Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur CLIM2-Überexpression, ein siRNA vermittelter *knockdown* von CLIM2 zu einer verstärkten Transaktivierung des Luziferase Reportergens in MCF7 Zellen führt. Das bedeutet, dass CLIM2 in ER α vermittelten Transkriptionsprozessen als Korepressor fungiert. Für die Transkription von ER α verantwortlichen Genen konnte bereits gezeigt werden, dass ein zyklisches Binden von ER α auch eine geordnete Rekrutierung von Korepressor-Komplexen erfordert (Metivier *et al.*, 2003). Diese Korepressor-Komplexe sind zum einen Chromatin bindende Proteine wie die Mitglieder der SWI/SNF Familie, oder Proteine, welche direkt Histone binden z.B. Histone Deacetylasen. Außerdem ist die in III.II.2.2.2 beschriebene spezifische Aminosäuresequenz

in CLIM2 (Bindemotif LxxIL) ein weiteres Indiz dafür, dass CLIM2 in der Transkription von ER α verantwortlichen Genen involviert ist. So konnte erneut bestätigt werden, dass CLIM2 sowohl in ektopischen Überexpressionen, als auch in siRNA vermittelten *knockdown* Experimenten, bei Transaktivierungsprozessen von ER α von Bedeutung ist.

III.II.3.4 CLIM2 vermittelt die Repression von ER α gesteuerten Zielgenen *in vivo*.

Eine weitere Methode um den Einfluss eines Proteins auf die ER α gesteuerte Transkription zu analysieren, ist die quantitative *Real Time* RT-PCR. Da CLIM2 in der Lage ist eine ER α vermittelte Transkription des Luziferase Reportergens *in vitro* zu reprimieren, sollte in diesem Versuchsteil primär der Einfluss von CLIM2 auf die ER α vermittelte Transkription der endogenen Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 untersucht werden. Hierzu wurden erneut siRNA Moleküle gegen CLIM2 in MCF7 Zellen transient transfiziert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Nach Umschreibung der RNA in cDNA, konnte so mit spezifischen Primern die relative mRNA Expression von CLIM2 und den jeweiligen ER α Zielgenen in MCF7 Zellen detektiert und quantifiziert werden. Hierzu wurden Primer für die Amplifikation des pS2, Cathepsin D und WISP2 Gens verwendet. Für die Amplifikation des pS2 Zielgens wurden Primer verwendet, welche gegen die pS2-hnRNA (*heterogenous nuclear RNA*) gerichtet sind. Der entscheidende Vorteil bei der quantitativen Analyse von nicht-gespliceter hnRNA ist der, als das sie präzise die Rate an aktiver Transkription in den zu untersuchenden Zellen widerspiegelt. Um sicher zu stellen, dass ein möglicher CLIM2-Einfluss auf die Expression der Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 letztendlich auf dessen zelluläre Depletion zurückzuführen ist, sollte vorab der spezifische siRNA vermittelte CLIM2 *knockdown* mittels spezifischen Primern und *Real Time* RT-PCR Analysen bestätigt werden.

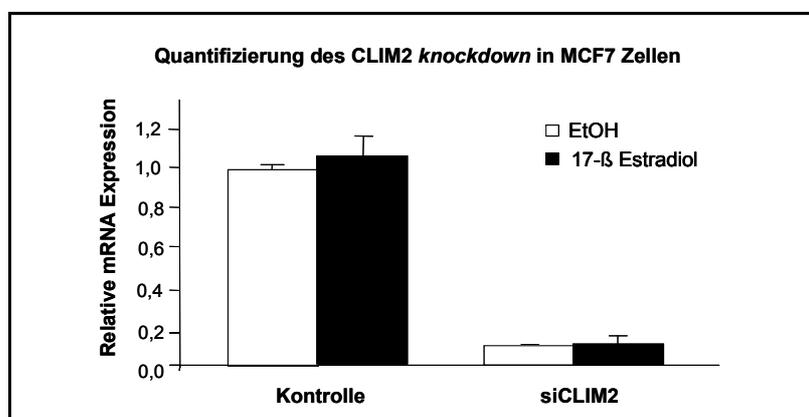


Abbildung III.II.22 Quantifizierung des CLIM2 *knockdown* in MCF7 Zellen.

Real Time RT-PCR-Analyse als Nachweis eines effektiven CLIM2 *knockdown* in MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt einen, im Vergleich zur Kontrolle, spezifischen *knockdown* von endogener CLIM2 mRNA, vermittelt durch transfizierte siRNA Moleküle gerichtet gegen CLIM2. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit spezifischen siRNA Molekülen gegen CLIM2 (20 pmol) oder einer Kontroll-siRNA (20 pmol), transient transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach anschließender Reverser Transkriptase Reaktion und Umschreibung der RNA in cDNA, wurde mit CLIM2 spezifischen Primern quantitativ mittels *Real Time* RT-PCR die relative Genexpression gemessen. Als Kontrolle wurden die Mittelwerte der Genexpression aus Dreifachbestimmungen, jeweils auf die Expression des 36B4 Gens normiert.

Mittels quantitativer *Real Time* RT-PCR konnte initial gezeigt werden, dass die relative CLIM2-Genexpression um ca. 90% in den siRNA transfizierten MCF7 Zellen reduziert ist. Die geringfügig ansteigende Genexpression von CLIM2 im Östrogen-induzierten Kontroll-Experiment, konnte allerdings in Western Blot-Analysen nicht beobachtet werden. Auch konnte mittels vorangegangenen Experimenten ausgeschlossen werden, dass CLIM2 ein Östrogen bzw. ER α Zielgen darstellt (Daten nicht gezeigt). In den CLIM2 *knockdown* Zellen sollte nun ein möglicher Einfluss auf die relative Expression der ER α Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 mittels *Real Time* RT-PCR analysiert werden.

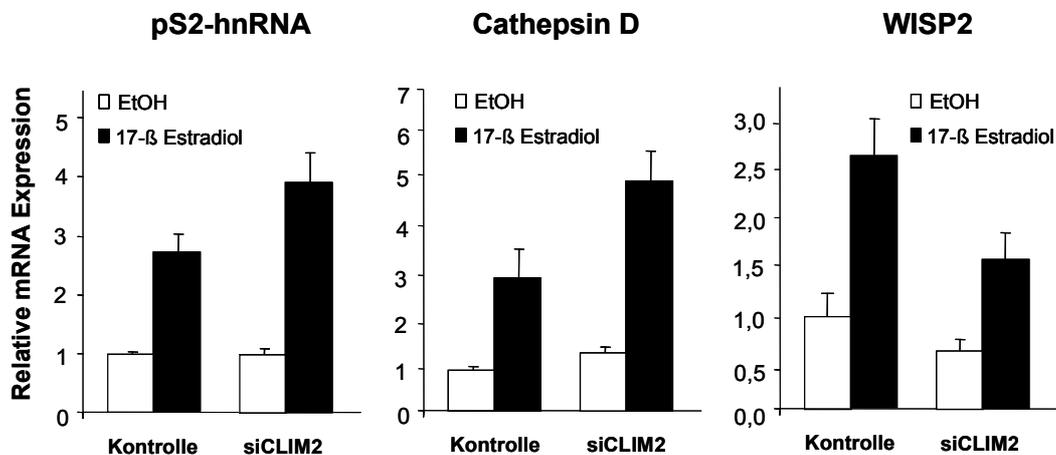


Abbildung III.II.23 Expression der ER α Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 in CLIM2-depletierten MCF7 Zellen.

Real Time RT-PCR basierte Genexpressionsanalysen in CLIM2-expressionsdefizienten MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt eine, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, verstärkte Genexpression von pS2 und Cathepsin D in CLIM2 *knockdown* MCF7 Zellen. Hingegen konnte für das WISP2 Gen eine verringerte Expression in CLIM2 *knockdown* Zellen beobachtet werden. Hierfür wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit spezifischen siRNA Molekülen gegen CLIM2 (20 pmol) oder einer Kontroll-siRNA (20 pmol), transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH, für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach anschließender Reverser Transkriptase Reaktion und Umschreibung der RNA in cDNA, wurde mit pS2, Cathepsin D und WISP2 spezifischen

Primern quantitativ die relative Genexpression gemessen. Als Kontrolle wurden die Mittelwerte der Genexpression aus Dreifachbestimmungen, erneut auf die Expression des 36B4 Gens normiert.

Hier konnte der bereits in Reporter-gen-Experimenten verifizierte repressorische Einfluss von CLIM2 auf die ER α gesteuerte Transkription, erneut für zwei der von drei untersuchten Zielgene mittels *Real Time* RT-PCR bestätigt werden. Im Unterschied zum Reporter-gen-Experiment, wurde hier der direkte Einfluss eines siRNA vermittelten CLIM2 *knockdown* auf die relative Expression der ER α Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 gemessen. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die zelluläre CLIM2-Depletion den bereits in CLIM2-Überexpressions-Experimenten beobachteten repressorischen Effekt wieder aufhebt. Dies bedeutet, dass endogene CLIM2 Proteine bei der Transkription des pS2 und Cathepsin D Gens eine korepressorische Funktion ausüben. Für das WISP2 Gen konnte in den CLIM2 *knockdown* Zellen eine, im Vergleich zur Kontrolle, verringerte Expression beobachtet werden. Ob die CLIM2 vermittelte Koregulatorfunktion genspezifisch ist, müsste in weiterführenden Experimenten allerdings unter Hinzunahme und Analyse weiterer anderer Zielgene näher untersucht werden.

III.II.3.5 RLIM vermittelt die Aktivierung von ER α gesteuerten Zielgenen *in vivo*.

Für RLIM konnte bereits in Reporter-gen-Experimenten eine koaktivatorische Rolle in der ER α vermittelten Transkription *in vitro* zugeschrieben werden. Daher sollte in diesem Versuchsteil der Einfluss einer RLIM-Depletion, auf die Transkription der ER α Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 untersucht werden. Hierfür wurden RLIM-spezifische siRNA Moleküle in MCF7 Zellen transient transfiziert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Nach Umschreibung der RNA in cDNA, konnte so mit spezifischen Primern die relative RLIM mRNA Expression und den jeweiligen ER α Zielgenen detektiert und quantifiziert werden. Hierzu wurden erneut Primer für die Amplifikation des pS2, Cathepsin D und WISP2 Gens verwendet. Um sicher zu stellen, dass ein möglicher RLIM-Einfluss auf die Expression der Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2, auf dessen zelluläre Depletion zurückzuführen ist, sollte vorweg ein siRNA vermittelter RLIM *knockdown* mittels spezifischen Primern und *Real Time* RT-PCR Analysen bestätigt werden.

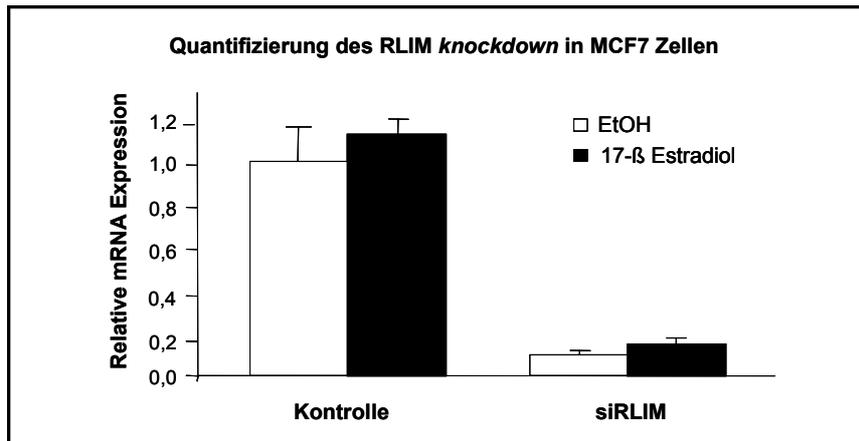


Abbildung III.II.24 Quantifizierung des RLIM knockdown in MCF7 Zellen.

Real Time RT-PCR-Analyse als Nachweis eines effektiven RLIM *knockdown* in MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt einen, im Vergleich zur Kontrolle, spezifischen *knockdown* von endogener RLIM mRNA, vermittelt durch die Transfektion von siRNA Molekülen. Hierzu wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit spezifischen RLIM siRNA Molekülen (20 pmol) oder einer Kontroll-siRNA (20 pmol), transient transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach folgender Reverser Transkriptase Reaktion und Umschreibung der RNA in cDNA, wurde mit RLIM spezifischen Primern quantitativ die relative Genexpression gemessen. Als Kontrolle wurden die Mittelwerte der Genexpression aus Dreifachbestimmungen, jeweils auf die Expression des 36B4 Gens normiert.

Durch den Einsatz quantitativer *Real Time* RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die relative RLIM-Genexpression um ca. 88% in den siRNA transfizierten MCF7 Zellen reduziert ist. Die geringfügig ansteigende Genexpression von RLIM im Östrogen-induzierten Kontroll-Experiment, konnte allerdings in Western Blot-Analysen nicht beobachtet werden. Auch konnte, wie bereits für CLIM2, mittels vorangegangenen Experimenten ausgeschlossen werden, dass RLIM ein Östrogen bzw. ER α Zielgen darstellt (Daten nicht gezeigt). In den RLIM depletierten Zellen, sollte nun ein möglicher Einfluss auf die relative Expression der ER α Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 mittels *Real Time* RT-PCR analysiert werden.

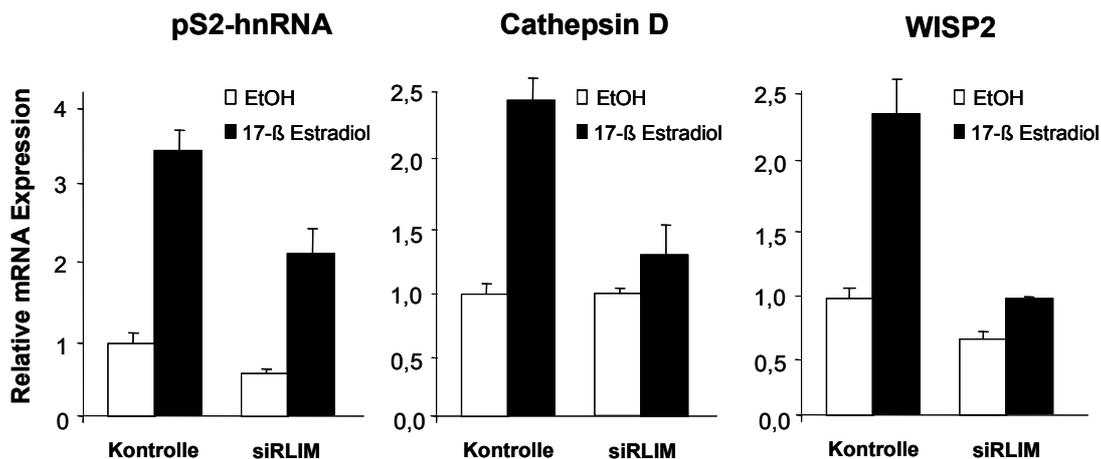


Abbildung III.II.25 Expression der ER α Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 in RLIM *knockdown* MCF7 Zellen.

Real Time RT-PCR basierte Genexpressionsanalysen in RLIM-expressionsdefizienten MCF7 Zellen. Das Säulendiagramm zeigt eine, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, verringerte Genexpression von pS2, Cathepsin D und WISP2 in RLIM *knockdown* MCF7 Zellen. Hierfür wurden MCF7 Zellen für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend mit RLIM-spezifischen siRNA Molekülen (20 pmol) oder einer Kontroll-siRNA (20 pmol), transient kotransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Östradiol (10^{-7} M) oder dem gleichen Volumen an 10% EtOH, für weitere 12 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach anschließender Reverser Transkriptase Reaktion und Umschreibung der RNA in cDNA, wurde mit pS2, Cathepsin D und WISP2 spezifischen Primern quantitativ die relative Genexpression gemessen. Als Kontrolle, wurden die Mittelwerte der Genexpression aus Dreifachbestimmungen erneut auf die Expression des 36B4 Gens normiert.

Hier konnte der bereits in Reporter-gen-Experimenten verifizierte aktivatorische Einfluss von RLIM auf die ER α gesteuerte Transkription, erneut für alle hier untersuchten Zielgene *in vivo* bestätigt werden. Im Unterschied zum Reporter-gen-Experiment, wurde hier der direkte Einfluss eines siRNA vermittelten RLIM *knockdown*, auf die relative Expression der ER α Zielgene pS2, Cathepsin D und WISP2 *in vivo* gemessen. Auch in diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass die zelluläre RLIM-Depletion in MCF7 Zellen, den bereits in RLIM-Überexpressions-Experimenten beobachteten koaktivatorischen Effekt, wieder aufhebt. Dies bedeutet, dass endogene RLIM Proteine bei der Transkription des pS2, Cathepsin D und WISP2 Gens, eine Koaktivierung vermitteln. Im Gegensatz zu CLIM2, konnte für RLIM keine genspezifische Koregulatorfunktion beobachtet werden.

III.II.3.6 Die Rekrutierung von RLIM und CLIM2 zu den ER α Zielgen-Promotoren des pS2-, WISP2- und Cathepsin D-Gens

Ob die koregulatorischen Funktionen von CLIM2 und RLIM mit deren *in vivo* Rekrutierung zu ER Zielgenpromotoren verbunden sind, sollte in folgenden Experimenten durch die

Kombination aus Chromatin-Immunpräzipitationen und *Real Time* RT-PCR eingehend untersucht werden.

Das Grundprinzip der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) beruht darauf, die zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Bindungen bzw. Wechselwirkungen durch Fixierung mit Formaldehyd (*crosslinking*) festzuhalten. Im Anschluss werden die Zellen aufgeschlossen und das Chromatin mittels Ultraschall in Stücke von einigen hundert Basenpaaren Länge zertrümmert. Jene Proteine die das gewünschte Chromatin gebunden haben, werden mit einem für das Protein spezifischen Antikörper immunpräzipitiert bzw. isoliert. Die isolierten DNA-Protein-Komplexe werden dann wieder gelöst (*reverse crosslinking*). Die Identität der so isolierten DNA-Fragmente kann nun mit spezifischen Primern gegen den vermuteten oder bekannten Bindebereich der Proteine am Chromatin, mit *Real Time* RT-PCR analysiert werden.

Die Primerpaare für dieses Experiment wurden so konzipiert, dass sie jeweils ca. 100 bp stromauf- und stromabwärts der jeweiligen ERE-Konsensus-Sequenz binden. Die ausgewählten Primerpaare erlauben somit im Falle einer erfolgreichen Immunpräzipitation, die Amplifikation des spezifischen Promotorbereiches, welche bereits als Bindestellen für den Transkriptionsfaktor ER α in den Zielgenpromotoren von pS2, CathepsinD und WISP2 im Vorwege bekannt waren.

Hierfür wurden MCF7 Zellen entweder für eine Stunde mit 17- β Östradiol behandelt oder sie blieben unbehandelt (EtOH) und dienten als Kontrolle. Nach einer zehnmütigen Fixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen aufgeschlossen und vorhandenes Chromatin mittels Ultraschall in kleinere Bruchstücke zertrümmert. Mögliche CLIM2- und RLIM-DNA-Komplexe, wurden anschließend mit jeweiligen spezifischen Antikörpern oder isotypspezifischen Kontroll-Antikörpern einer Immunpräzipitation unterzogen. Die so isolierten Komplexe wurden anschließend mittels SDS und hohen Temperaturen wieder voneinander gelöst. Zum Abschluß folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung, um eine möglichst „reine“ DNA für den Einsatz in der *Real Time* RT-PCR gewährleisten zu können.

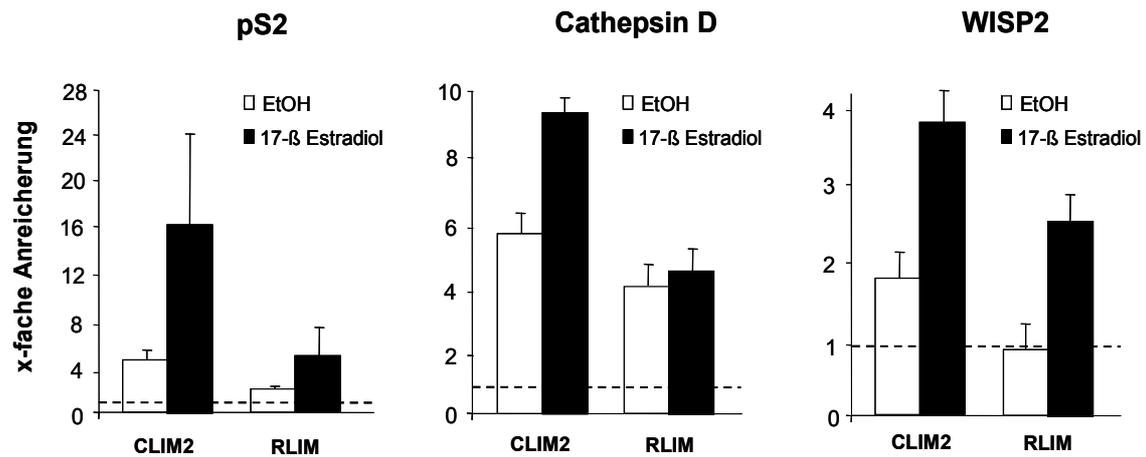


Abbildung III.II.26 Die Rekrutierung von CLIM2 und RLIM zu ER α Zielgenpromotoren *in vivo*.

ChIP und *Real Time* RT-PCR Analysen zeigen eine Rekrutierung von sowohl CLIM2 als auch RLIM zu den Östrogen-regulierten Genpromotoren von pS2, CathepsinD und WISP2. MCF7 Zellen wurden für 2 Tage mit hormonfreiem Kulturmedium behandelt und anschließend für einen gesamten Zeitraum von 1 h mit Östradiol behandelt oder blieben unbehandelt und dienten als Kontrolle (EtOH). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Formaldehyd gestoppt und die Zelllysate einer Chromatin-Immünpräzipitation unterzogen. Präzipitierte Chromatinbereiche wurden anschließend für die Amplifikation der entsprechenden Gensequenzen in der *Real Time* RT-PCR eingesetzt. Eine Chromatinbindung bzw. Rekrutierung von CLIM2 zu den Genpromotoren von pS2, Cathepsin D und WISP2, konnte nach Östrogen-Stimulus deutlich gesteigert werden. Hingegen konnte für RLIM, eine deutlich gesteigerte Rekrutierung nach Östrogen-Stimulus zu den Zielgenpromotoren des pS2 und WISP2 Gens detektiert werden. Eine RLIM-Rekrutierung zum Promotor des Cathepsin D Gens, konnte nach Östrogen-Stimulus nicht gesteigert werden. RLIM war sowohl im nicht-induzierten als auch im Östrogen-induzierten Zustand gleichermaßen am Zielgenpromotor detektierbar. Die Mittelwerte der ChIP-Proben aus Dreifachbestimmungen, wurden jeweils auf die nicht-stimulierten Kontroll-ChIP-Proben der entsprechenden Transfektion normiert.

Unter der Verwendung von Chromatin-Immünpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass sowohl CLIM2 als auch RLIM zu den hier untersuchten ER α Zielgenpromotoren rekrutiert werden. Während für CLIM2 eine deutlich gesteigerte Rekrutierung nach Östrogen-Stimulus zu den Promotoren des pS2, Cathepsin D und WISP2 Gens detektiert werden konnte, konnte für RLIM lediglich eine gesteigerte Rekrutierung nach Östrogen-Stimulus zu den Zielgenpromotoren des pS2 und WISP2 Gens beobachtet werden. Hingegen konnte eine gesteigerte RLIM-Rekrutierung zum Promotor des Cathepsin D Gens nach Östrogen-Stimulus nicht beobachtet werden. RLIM war sowohl im nicht-induzierten als auch im Östrogen-induzierten Zustand gleichermaßen am Cathepsin D Promotor detektierbar.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass der bereits im Vorwege dieses Experimentes beobachtete korepressorische Einfluss von CLIM2 als auch der koaktivatorische Einfluss von RLIM auf die ER α gesteuerte Transkription, mit deren Rekrutierung zu den hier analysierten Zielgenpromotoren verbunden ist.

III.II.4 CDK9 interagiert mit RLIM und CLIM2 *in vitro* und *in vivo*

Da sowohl RLIM als auch CLIM2 bei der Aktivierung bzw. Repression von ER α gesteuerten Zielgenen beteiligt sind, sollten weitere an der Transkription beteiligte Proteine, näher untersucht werden. Hierbei sollten in erster Linie mögliche neue Interaktionspartner mittels Immunpräzipitationen identifiziert werden. Parallel zu dieser Arbeit konnte CDK9 (pTEFb *positive transcription elongation factor b*) als neuer Interaktionspartner von CLIM2 *in vivo* identifiziert werden (Meier *et al.*, 2006). CDK9 ist positiv an der Genregulation und somit Transkription beteiligt (Gargano *et al.*, 2007). Als Cyclin-abhängige Kinase ist CDK9 für den elongativen Schritt der Transkription essentiell, da sie für eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der RNA Polymerase II unabdinglich ist (Wada *et al.*, 1998).

RLIM sollte in diese Untersuchungen mit einbezogen werden. Hierfür wurden im *in vitro* Interaktionsexperiment bakteriell exprimiertes GST-RLIM und GST-CLIM2 eingesetzt. Als Zielprotein wurde in diesem Experiment der gesamte kodierende Bereich von CDK9 *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Anschließend wurden RLIM und CLIM2 zusammen mit radioaktiv markiertem CDK9 bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert und 3x mit PPI-Puffer gewaschen. Anschließend wurden Protein-Interaktionen mittels SDS PAGE und folgender Autoradiographie analysiert.

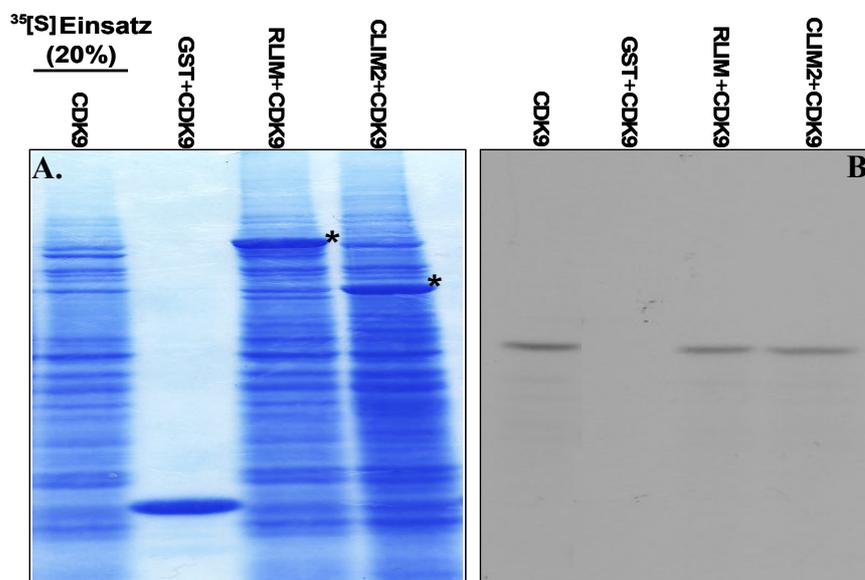


Abbildung III.II.27 *In vitro* Interaktionsexperiment von RLIM und CLIM2 mit CDK9.

A. Coomassie-Färbung zur Darstellung von gleich geladenen Proteinkonzentrationen. Glutathionagarose (GST) diente als Negativ-Kontrolle. GST-RLIM und GST-CLIM2 (Sterne) sind in gleichen Mengen im Interaktionsexperiment eingesetzt worden. Als Einsatz bzw. Ladekontrolle wurde radioaktiv (³⁵[S]) markierte CDK9 eingesetzt. Es folgte eine zweistündige Rotation von GST-RLIM oder GST-CLIM2 Agarose mit ³⁵[S] markierter CDK9 bei 4°C B. Autoradiographie kopräzipitierter ³⁵[S]-CDK9-Proteine im GST Interaktionsexperiment mit RLIM und CLIM2. Es kann sowohl eine Interaktion mit RLIM als auch mit CLIM2 und ³⁵[S]-CDK9

nachgewiesen werden. Eine Inkubation von GST-Agarose, als Negativ-Kontrolle, und $^{35}\text{[S]}$ -CDK9 führt zu keiner Kopräzipitation.

Um eine *in vivo* Interaktion durchzuführen, wurden Lysate von MCF7 Brustkrebszellen einer Koimmunpräzipitation unterzogen.

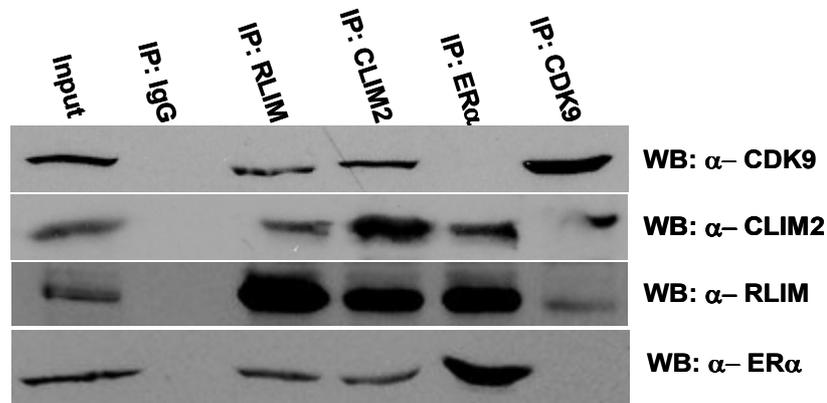


Abbildung III.II.28 *In vivo* Interaktion von RLIM und CLIM2 mit CDK9 in MCF7 Zellen.

Western Blot-Analysen der Koimmunpräzipitationen von endogenem RLIM, CLIM2, ER α und CDK9 aus MCF7 Zelllysaten. MCF7 Zellen wurden kultiviert und anschließend lysiert. Mit den Zelllysaten wurden Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen RLIM, CLIM2, ER α und CDK9 durchgeführt. Die Präzipitation von endogener CDK9 (α -CDK9) führt zur erfolgreichen Kopräzipitation von RLIM und CLIM2. Eine Kopräzipitation von ER α bleibt aus. Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen RLIM (α -RLIM) und CLIM2 (α -CLIM2), führen ebenfalls zur Kopräzipitation endogener CDK9 und ER α . Ein unspezifisches Antiserum (IP:IgG) führt zu keiner Kopräzipitation von RLIM, CLIM2, ER α und CDK9.

Mittels Durchführung von Interaktionsexperimenten *in vitro* und *in vivo*, konnte CDK9 als neuer Interaktionspartner von RLIM und CLIM2 in Brustkrebszellen identifiziert werden.

III.II.4.1 RLIM ist mit CDK9 in Östrogen-abhängigen MCF7 Brustkrebszellen kolokalisiert

Um zu untersuchen, ob RLIM mit CDK9 subzellulär kolokalisiert, sollten immunzytochemische Färbungen von MCF7 Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurden MCF7 Zellen kultiviert, fixiert und mit spezifischen Antiseren inkubiert. Durch erneute Inkubation mit Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern, wurden die Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Eine CLIM2 Ko-Expression mit CDK9 konnte nicht untersucht werden, da Antiseren gegen CDK9 ebenfalls gleichen Ursprungs waren (aus Kaninchen).

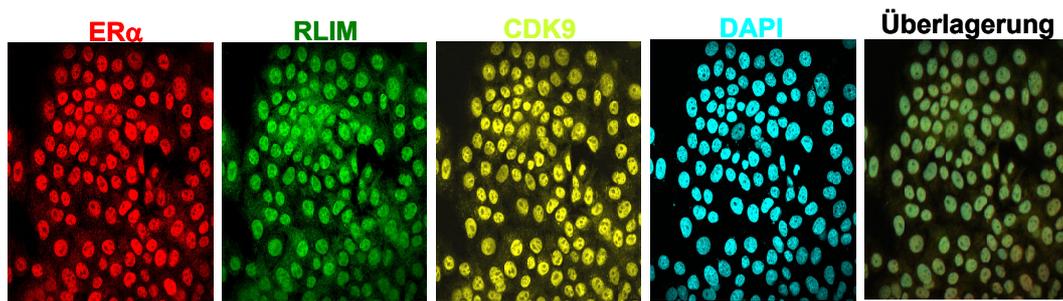


Abbildung III.II.29 RLIM kolokalisiert mit CDK9 in MCF7 Zellen.

MCF7 Zellen wurden fixiert und mit spezifischem Maus-Antiserum gegen $ER\alpha$, sowie mit Meerschweinchen-Antiserum gegen RLIM und Kaninchen-Antiserum gegen CDK9 inkubiert. Die Fluoreszenzsignale der Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper, wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops dokumentiert. Als Marker für Kernfärbung diente DAPI. Die Überlagerung des roten ($ER\alpha$), grünen (RLIM) und gelben (CDK9) Kanals, weist auf eine intra- bzw. subzelluläre Kolokalisation der $ER\alpha$ -, RLIM- und CDK9-Proteine im Zellkern hin. [Vergrößerung: 63x]

Intrazelluläre MCF7 Zellfärbungen zeigen eine kolokale Expression von RLIM-, $ER\alpha$ - und CDK9-Proteinen im Nukleus. Eine Zellfärbung mit dem Kern-Marker DAPI bestätigt eine dominante Kernfärbung der Proteine in MCF7 Brustkrebszellen.

Die Grundlage und Konsequenz(en) dieser Kolokalisation müssen in weiterführenden Experimenten näher untersucht werden.

IV. Diskussion

Die in diese Arbeit gesteckten Ziele und Erwartungen konnten im Rahmen beider Projekte erfüllt werden. So konnte als Ergebnis dieser Arbeit gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen bzw. proteasomale Regulation einen wichtigen Einfluss auf die Formation von LIM-HD-Multiproteinkomplexen haben. Hierbei spielen CLIM- und SSDP1-Proteine, als Adaptoren im Aufbau von Transkriptionskomplexen auf Zielgenpromotoren von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, eine fundamentale Rolle. Von entscheidender Bedeutung bei der Regulation zellulärer Proteinkonzentrationen ist das 26S-Proteasom. Mittels prozessiver Selektion ubiquitinmarkierter Zielproteine greift es entscheidend in die Genexpression ein. Darüber hinaus spielen hierarchische und stabile Protein-Interaktionen, eine wichtige Rolle beim Schutz vor proteasomalen Abbau durch Maskierung von instabilen Protein-Domänen (Güngör *et al.*, 2007).

Des Weiteren konnte das bis dato nur im Kontext der neuronalen Entwicklung gut charakterisierte nukleäre LIM-Proteinnetzwerk, mit der Entwicklung/Progression des Mammakarzinoms in Verbindung gebracht werden. Hier konnten sowohl CLIM2 als auch RLIM als neue Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors ER α identifiziert werden. Darüber hinaus führte die funktionelle Analyse dieser Interaktionen zu weiteren neuen Erkenntnissen. Sowohl RLIM als auch CLIM2, konnten als neue Koregulatoren in der Östrogen vermittelten Transkription von ER α Zielgenen identifiziert werden. Während CLIM2-Proteine fähig sind eine Östrogen vermittelte Transkription zu inhibieren, sind RLIM-Proteine in der Lage diese zu aktivieren. Auch konnte eine direkte Korrelation der CLIM2-Expression im Zusammenhang mit der ER α -Expression, als prognostischer Marker in Brustkrebs, identifiziert werden (Johnsen und Güngör *et al.*, 2009).

IV.1 Die Rolle von CLIM-Proteinen im LIM-HD-Transkriptionsnetzwerk

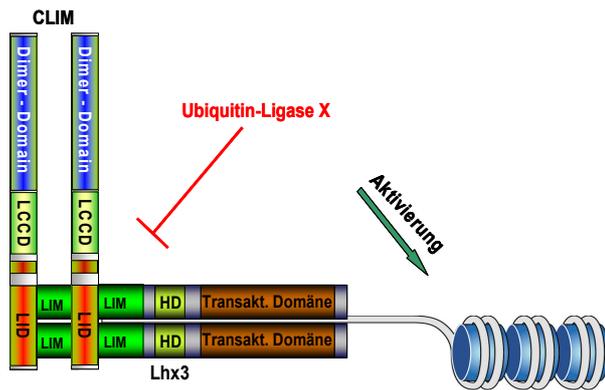
Als Transkriptionsfaktoren regulieren LIM-Homöodomänen-Proteine die Ausbildung der Zellidentität bzw. Organogenese sowie Zellposition und axonale Projektionen in sehr unterschiedlichen Organsimen, wie *Drosophila*, Huhn, Zebrafisch und Mammalia. Mittels Homöodomäne bindet das LIM-HD-Protein Lhx3, als Homodimer, an DNA-Sequenzen in Zielgenpromotoren, um die Transaktivierung von spezifischen Genen zur Synthese von regulatorischen Proteinen, wie beispielsweise α GSU, auszuführen. Die N-terminal lokalisierten LIM-Domänen in Lhx3-Proteinen sind von wichtiger Bedeutung für die Interaktion mit der CLIM-Kofaktorfamilie. Hierbei interagiert die *LIM interaction Domain*

(LID) von CLIM-Proteinen mit der LIM-Domäne von LIM-HD-Proteinen. Mittels einer Dimerisierungs-Domäne führt eine Interaktion zur Ausbildung eines tetrameren Transkriptionskomplexes auf dem Lhx3-Zielgenpromotor von α GSU und resultiert in einer synergistischen Aktivierung von α GSU (Güngör *et al.*, 2007). Vor geraumer Zeit konnten in unserer Arbeitsgruppe CLIM Kofaktoren als Substrat für ubiquitin-abhängige Degradation identifiziert werden. So konnte gezeigt werden, dass RLIM als E3-Ubiuitin-Ligase, die Polyubiquitinierung von CLIM-Proteinen vermittelt (Ostendorff *et al.*, 2002). Hierbei reguliert und kontrolliert RLIM zelluläre CLIM-Konzentrationen und sorgt so für ausgeglichene Mengenverhältnisse zwischen CLIM- und LIM-HD-Proteinen. Weiterhin wurde von Hiratani und Kollegen vorgeschlagen, dass CLIM-Proteine durch eine Komplexformation mit LIM-HD-Proteinen stabilisiert werden (Hiratani *et al.*, 2003). Wie essentiell die CLIM-Proteinkonzentrationen und deren kontrollierte Prozessierung für die Genexpression sind, zeigen verschiedenste und gravierende Phänotypen in $CLIM2^{-/-}$ *knockout* Mäusen. Hier kommt es zu dramatischen embryonalen Entwicklungsstörungen, die zwischen dem Embryonaltag 9,5-10,5 zur Letalität führen. Eine Folge von Entwicklungsstörungen schon während der Gastrulation, führt zum Fehlen ganzer Organe wie das Herz oder etwa Augen, sowie zur Störung eines Aufbaus der Grenzsicht zwischen Stamm- und Hinterhirn (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die Störung des Gleichgewichts zwischen dem LIM-HD-Protein Apterous, dem Kofaktor Chip (CLIM-Homolog in *Drosophila*) und dem *LIM-only* (LMO) Protein Beadex zu schwerwiegenden Defekten in der Flügelentwicklung führt. Hierbei konkurriert Beadex mit Apterous um die Bindung von Chip-Kofaktoren und verdrängt dadurch dem LIM-HD-Protein die Kofaktoren. Da die Expression von Beadex durch Apterous stimuliert wird, handelt es sich dabei um eine negative Rückkopplung, bei der einerseits die Aktivität von Apterous gehemmt wird und andererseits Apterous-Proteine verstärkt durch das Proteasom abgebaut werden (Milan *et al.*, 1998; Milan *et al.*, 1999; Kadrmas & Beckerle, 2004). Bislang konnte in *Drosophila* kein RLIM-Homolog gefunden werden. Das Fehlen einer Ubiquitin-Ligase die den Abbau von Chip vermittelt, könnte somit durch den beschriebenen Mechanismus der negativen Rückkopplung ausgeglichen werden. Da in Säugetieren sowohl RLIM als auch LMO-Proteine exprimiert werden, könnte dies zur Unterstützung der Ansicht herangezogen werden, dass in der Evolution komplexer Lebewesen zusätzliche Regulationsmechanismen entwickelt wurden, um zelluläre Proteinkonzentrationen zu kontrollieren.

Interessanterweise zeigen Überexpressions-Experimente eines Dominant-negativen CLIM-Moleküls (DN-CLIM2) in Zebrafisch-Embryonen, einen sehr ähnlichen Phänotyp wie er für CLIM^{-/-} *knockout* Mäuse beschrieben worden ist. Der Verlust der Dimerisierungs-Domäne führt hier zu einer unvollständigen Formation von CLIM-Lhx3-Komplexen *in vivo* und demnach zu einer Fehlregulation der Genexpression. Das Resultat dieser Fehlregulation sind augenlose Zebrafisch-Embryonen, eine in ihrem Aufbau gestörte Grenzschicht zwischen Stamm- und Hinterhirn und die fehlende Differenzierung sog. Mauthner Neurone im Hinterhirn (Becker *et al.*, 2002). Im Laufe dieser Arbeit stellte sich dann heraus, dass die DN-CLIM-Lhx3-Interaktion zu einer erhöhten Lhx3-Proteinkonzentration führt; die Folge ist eine verstärkte Genexpression und somit eine erhöhte α GSU-Proteinkonzentration. Eine durch CLIM-Bindung vermittelte Stabilität von Proteinkonzentrationen im LIM-HD-Netzwerk ist offensichtlich nicht nur auf Lhx3 beschränkt, da wir ähnlich veränderte Proteinstabilitäten auch bei DN-CLIM-Isl1-Interaktionen beobachten konnten. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die Stabilisierung der Lhx3- und Isl1-Proteinkonzentrationen auf posttranslationaler Ebene stattfinden und nicht auf eine erhöhte Genexpression des Lhx3- bzw. Isl1-Gens zurückzuführen sind. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch den Einsatz von Inhibitoren des 26S-Proteasoms. Applikationen von Zellen mit Lactacystin, führen, äquivalent zur Überexpression von DN-CLIM, zu einer erhöhten Lhx3- und Isl1-Proteinkonzentration. Folglich basiert diese Stabilisierung auf die Bindung von CLIM-Proteinen an LIM-Domänen von Lhx3- und Isl1-Proteinen. CLIM-Proteine sind, als Adaptoren, somit maßgeblich an der Stabilisierung von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren beteiligt. Eine E3-Ubiquitin-Ligase, welche die Polyubiquitinierung von Lhx3 und somit Degradation vermittelt, ist bisher nicht identifiziert worden. Diese Ergebnisse weisen daher darauf hin, dass es zu einer konkurrierenden Bindung von CLIM-Proteinen und einer bisher unbekanntem E3-Ubiquitin-Ligase, an LIM-Domänen von Lhx3 kommt. Hierbei kann zurzeit allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die CLIM-Lhx3-Interaktion zu einer Konformationsänderung von Lhx3-Proteinen führt und es hierdurch zu einem Schutz vor proteasomalen Abbau kommt. Eine potentielle E3-Ligase die den proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors Isl1 vermittelt, konnte erst kürzlich in Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) identifiziert werden. Hierbei vermittelt Fbxo25 als multimerer RINGfinger-E3-Ligase, ebenfalls die spezifische Ubiquitinierung eines weiteren in Kardiomyozyten exprimierten LIM-HD-Transkriptionsfaktors, dem Nkx2-5, (Jang *et al.*, 2011). Ob Fbxo25 fähig ist die Ubiquitinierung von Lhx3 in neuronalen Zellen zu vermitteln, ist nicht bekannt und bedarf daher weiterer Untersuchungen. Somit steuert die Ubiquitin vermittelte Degradation von

Proteinen innerhalb des LIM-HD-Netzwerkes selektiv die Expression spezifischer Zielgene. Wie wichtig die entsprechenden zellulären Proteinkonzentrationen einzelner Mitglieder dieses Netzwerkes für die Formation multimerer Transkriptionskomplexe sind, konnten Lee und Kollegen aufzeigen. So ist Lhx3 beispielsweise fähig, in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Isl1, mit CLIM Kofaktoren einen tetrameren Komplex (2x Lhx3, 2x CLIM) einzugehen, um gezielt die Expression von Genen zu steuern, die für die Differenzierung von V2-Interneuronen aus embryonalen Stammzellen im Neuralrohr von Hühnerembryonen essentiell sind (Lee *et al.*, 2011). Wird allerdings zusätzlich Isl1 exprimiert, so entsteht ein Hexamer-Komplex (2x Lhx3, 2x CLIM, 2x Isl1), der spezifisch die Transkription von Genen aktiviert, welche für die Differenzierung von Motoneuronen aus embryonalen Stammzellen essentiell sind aber gleichzeitig jene Gene reprimiert, welche zur Differenzierung in V2-Interneurone essentiell sind (Lee *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse waren das Resultat einer gezielten Überexpression eines Isl1-Lhx3 Fusionsgens, also die gesteuerte Expression beider Proteine in einem Mengenverhältnis von 1:1. Der Versuch beide Gene in embryonalen Stammzellen zu ko-exprimieren, resultierte in einer Mischpopulation aus sowohl V2-Interneuronen als auch Motoneuronen. Die Autoren konnten somit aufzeigen, dass die Stöchiometrie vorhandener LIM-HD-Transkriptionsfaktoren entscheidend für deren biologische Aktivität während der embryonalen Entwicklung ist. Hierbei gilt es noch zu erwähnen, dass diese Stöchiometrie durch die Expression der RLIM-E3-Ligase, welche den proteasomalen Abbau der CLIM Kofaktoren vermittelt, beeinflusst werden könnte. Einen möglichen Einfluss von RLIM auf die Lhx3-Isl1 induzierte Differenzierung aus embryonalen Stammzellen, wurde allerdings im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Je nach zellulärem Kontext hängt es also davon ab, mit welchem Partnerprotein Lhx3 einen Komplex bildet. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Ko-Expression von CLIM Kofaktoren und somit der erfolgreiche Aufbau eines Hexamer-Transkriptionskomplexes essentiell für die Differenzierung in Motoneuronen aus embryonalen Stammzellen ist (Lee *et al.*, 2011). Die Autoren beschreiben in ihrer Studie ebenfalls eine neue elegante Methode, um aus embryonalen Stammzellen entsprechende Motoneuronen-Populationen differenzieren zu können. Des Weiteren ist die ektopisch gesteuerte Differenzierung von Stammzellen zu Motoneuronen mittels Überexpression entsprechender Transkriptionsfaktoren, im Vergleich zum nativen durch Retinsäure induzierten Differenzierungsprozess, mit einem entscheidenden zeitlichen Vorteil verbunden. Ähnliche Ergebnisse konnten zeitnah ebenfalls in induzierten pluripotenten Stammzellen reproduziert werden (Hester *et al.*, 2011).



Fazit:
 CLIM Kofaktoren binden LIM-Domänen und modulieren einerseits die Aktivität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, andererseits beschützen sie so LIM-HD-Transkriptionsfaktoren vor proteasomalem Abbau. In der Regulation der Genexpression spielt selektive ubiquitin-abhängige Degradation eine wichtige Rolle.

IV.2 Die LIM-Domäne stellt eine Instabilitätsdomäne dar

Das hier untersuchte LIM-Proteinnetzwerk besteht aus den LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren, sowie deren Kofaktorfamilien CLIM, RLIM und SSDP1. Die zelluläre Konnektivität dieser Proteine wird durch das Vorhandensein der LIM-Domäne erreicht. Identifiziert worden ist die LIM-Domäne erst vor ca. 20 Jahren und obwohl der strukturelle Aufbau der LIM-Domäne der Zink-finger-Domäne von Transkriptionsfaktoren sehr ähnlich ist, konnten ihr als ein Proteinmotiv bis heute nur Funktionen als Protein-Protein Interaktionsdomäne zugeschrieben werden (Freyd *et al.*, 1990; Schmeichel *et al.*, 1994; Bhati *et al.*, 2008). Das evolutive Vorkommen von LIM-Domänen in ausschließlich höheren Organismen, den Eukaryoten, weist daher auf wichtige Funktionen in komplexeren Organismen hin. Hierbei können humane LIM-Proteinfamilien, 1-5 LIM-Domänen enthalten, die entweder N-terminal, zentral oder C-terminal lokalisiert sind. In Vertebraten wie *Drosophila* oder *C. elegans* wird zwar der gleiche Satz von LIM-Proteinen exprimiert, jedoch in weitaus geringeren Konzentrationen. Hierbei sind LIM-Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten, wie Zytoplasma und Nukleus, lokalisiert und weisen daher unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle auf. Zytoplasmatische LIM-Proteine werden mit der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts in Verbindung gebracht. Hierbei interagieren sie entweder direkt oder indirekt mit Aktin und reagieren so auf Signale, welche mit einer Umstrukturierung bzw. Dynamik des Zytoskeletts einhergehen. Hierbei spielen vor allem Mitglieder der Zyxin- und LIM-Kinase-Familien eine wichtige Rolle (Cattaruzza *et al.*, 2004; Tursun *et al.*, 2006; Po'uha *et al.*, 2010). Für andere zytoplasmatische LIM-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie als sog. Shuttle-Proteine zwischen beiden Kompartimenten wechseln können (Dong *et al.*, 2009). Den nukleären LIM-Proteinen, konnte bisher nur eine klare funktionelle Rolle in der Genexpression bzw. Transkription zugeschrieben werden, obwohl der LIM-Domäne selbst keine direkte DNA-Interaktion nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise besteht eine

auffällige strukturelle Ähnlichkeit zwischen der LIM-Domäne und der DNA-Bindedomäne (Zink-*finger*-Domäne) von GATA- oder hormonabhängigen-Transkriptionsfaktoren (Steroid-Rezeptoren). Im Nukleus spielen vor allem Mitglieder der Lhx- und Isl- (*insulin gene enhancer binding protein*) Familien eine entscheidende Rolle in der Genexpression, welche embryonale Entwicklung steuern. Bereits 1994 konnten Schmeichel und Kollegen zeigen, dass die LIM-Domäne eine Protein-Protein Interaktionsdomäne darstellt. (Schmeichel *et al.*, 1994).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der LIM-Homöodomänen Transkriptionsfaktor Lhx3 maßgeblich an der Organogenese der Hypophyse beteiligt ist. Hierbei steuert er während der embryonalen Entwicklung, die Differenzierung und Proliferation von hormonproduzierenden Zellen der Hypophyse (Sheng *et al.*, 1996; Reynaud *et al.*, 2011). Weiterhin konnten Netchine und Kollegen zeigen, dass eine *missense* Mutation im Lhx3 Gen, für das Syndrom „Hypophysenhormon-Defizienz“ (*combined pituitary hormon deficiency - CPHD*) verantwortlich ist. Hierbei zeigte sich, dass eine Punktmutation (Y111C) in der LIM2 Domäne dazu führt, dass die Hypophyse wichtige entwicklungsrelevante Hormone nicht mehr sezernieren kann. Das Fehlen dieser Hormone führt in betroffenen Patienten zu einer Wachstumsretardierung, welche in einen Kleinwuchs mündet, zu psychomotorischer Retardierung, Hörverlust und zu einer verspäteten Pubertät (Netchine *et al.*, 2000). Eine weitere Mutation im Lhx3 Gen konnte ebenfalls in der für die Homöo-(DNA)-Bindedomäne kodierenden Gensequenz identifiziert werden. Diese Mutation führt, aufgrund eines neuen Stop-Codons (W224ter), zu einem frühzeitigen Abbruch der Transkription des Lhx3 Gens (Kriström *et al.*, 2008). Eine weitere *missense* Mutation im Lhx4 Gen (P366T), konnte ebenfalls identifiziert werden und führt zu einem ähnlichen Phänotyp wie er bereits für das mutierte Lhx3 Gen beschrieben wurde (Tajima *et al.*, 2007). Diese identifizierte Mutation betrifft einen einzigen Aminosäureaustausch, welche für den Aufbau der LIM-Domäne-4 bzw. der Zink-*finger*-Domäne essentiell ist. Die Autoren konnten aufzeigen, dass diese Mutation mit einer stark verminderten Interaktion mit dessen Kofaktor CLIM einhergeht und eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Isl1 ausbleibt (Bhati *et al.*, 2012). So scheint es, dass ein unvollständiger Aufbau der LIM-Domäne, schwerwiegende Konsequenzen für die Zelle mit sich bringt und unterstreicht daher die Wichtigkeit der LIM-Domäne, besonders während der embryonalen Entwicklung. Der LIM-Domäne konnten bisher sowohl negative als auch positive Funktionen zugeschrieben werden. So konnte von Sanchezgarcia und Kollegen gezeigt werden, dass das Vorhandensein der LIM-Domänen im LIM-HD-Transkriptionsfaktor Isl1 mit einer verminderten DNA-Bindung verbunden ist. Hier wurden

DNA-Bindungsstudien unter der Verwendung von Isl1 LIM-Domänen-Deletionsmutanten und deren direkter Vergleich zu Wildtyp Isl1 durchgeführt. Während die Deletionsmutanten in der Lage waren optimal die Kernsequenz von TATA-Boxen zu binden, waren Wildtyp Isl1 Proteine nicht fähig mit dieser Kernsequenz zu interagieren. Neben diesen ersten Hinweisen einer funktionellen Rolle der LIM-Domäne in der DNA-Bindung, konnte der LIM-Domäne auch eine essentielle Funktion in der transkriptionellen Regulation von Zielgenen zugeschrieben werden. Es zeigte sich, dass die Stimulation der Transkription von Zielgenen durch Wildtyp Isl1 entscheidend geringer ist, als die von Isl1-LIM-Deletionsmutanten, obwohl beide Proteine exakt die gleiche Aktivierungsdomäne vorwiesen (Sanchezgarcia *et al.*, 1993). Eine Mutation der LIM-Domäne führt in diesem Fall zu einer verstärkten Aktivität des Transkriptionsfaktors Isl1 und folglich zur gesteigerten Transkription von Zielgenen. Somit scheint die strukturelle Integration der LIM-Domäne für die biologische Aktivität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren von großer Bedeutung zu sein. Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass Isl1 im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor BETA2 synergistisch die Transkription des Insulin Gens in β -Zellen der Bauchspeicheldrüse aktiviert. Die Autoren konnten weiterhin aufzeigen, dass die gezielte Mutagenese der Isl1 LIM-Domäne-1, mit einer reduzierten synergistischen Aktivierung des Insulin Gens verbunden ist, während die Deletion beider Isl1 LIM-Domänen zu einer deutlich gesteigerten Transaktivierung des Insulin Gens führt (Zhang *et al.*, 2009).

Weitere Faktoren welche die Aktivität von Isl1 zusätzlich beeinflussen könnten, sind die proteolytische Abspaltung der DNA-bindenden Domäne von der LIM-Domäne oder das zelluläre Vorhandensein regulatorischer Kofaktoren die in der Lage sind, LIM-Domänen zu binden und hierdurch die inhibitorische Funktion der LIM-Domäne wieder aufzuheben (Zhang *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang wurden ebenfalls Protein-Konformationsänderungen und deren Auswirkung auf die Aktivität/Inhibition der DNA-Bindung und/oder Transkription diskutiert (Taira *et al.*, 1994; Bach *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009). Im Rahmen von Untersuchungen zur Differenzierung von Motoneuronen aus embryonalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass die LIM-Domäne im Lhx3 Protein hierfür essentiell ist, da im Falle einer LIM-Domänen-Deletion, die Differenzierung zu Motoneuronen komplett unterbunden wird (Lee *et al.*, 2011).

Eine weitere Gruppe von Proteinen mit LIM-Domänen stellen die LMO-Proteine (LIM *only*-) dar. Sie ist die bislang kleinste Gruppe innerhalb der LIM-Proteine (LMO 1-4) und hat als gemeinsames Merkmal eine recht ähnliche Anordnung der beiden tandemartigen LIM-Domänen und einige wenige kurze Sequenzen ausserhalb der LIM-Domänen, deren

Funktionen aber bislang nicht bekannt sind (Matthews *et al.*, 2013). Die LMO-Proteine sind primär im Zellkern lokalisiert und nehmen dort an Transkriptionsereignissen teil, indem sie direkt mittels LIM-Domäne mit LIM-HD- oder anderen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise GATA-1, TAL1 oder E2A interagieren und gemeinsam Zellidentität, Differenzierung und embryonale Entwicklung steuern. Sie vermitteln den Aufbau von Multiproteinkomplexen wodurch sie maßgeblich die Transaktivierung/Repression entsprechender Zielgene beeinflussen können, ohne dabei direkt mit DNA zu wechselwirken. In allen bislang beschriebenen Fällen einer Deregulation der LMO-Proteine, kommt es zur Tumorgenese. Im transgenen Tiermodell führt beispielsweise die gezielte Überexpression von LMO1 und 2 im Thymus von Mäusen, zur Transformation von T-Zellen (Fisch *et al.*, 1992). Auch weisen mehr als 50% der T-Zell-Leukämien eine LMO1 und LMO2 Überexpression auf, die zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen führt (Larson *et al.*, 1996; Matthews *et al.*, 2013). Des Weiteren konnte LMO3 in Neuroblastom-Zellen als häufig überexprimiert identifiziert werden. Hier vermittelt das Onkogen LMO3, gemeinsam im Komplex mit dem basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor HEN2, Zellwachstum *in vitro* und im Tumormausmodell *in vivo*. Ausserdem scheint die Ko-Expression beider Proteine mit einer schlechten Prognose verbunden zu sein, so dass diese Patienten statistisch früher versterben, als jene in denen keine Überexpression vorgefunden werden konnte (Aoyama *et al.*, 2005). LMO4 ist dagegen statistisch häufig in Brustkrebszellen überexprimiert. Die gezielte transgene LMO4 Überexpression in der Brustdrüse von Mäusen, führt zur Hyperplasie und Transformation des Gewebes. Die Folge ist ein gesteigertes Zellwachstum. Auch konnte von Montañez-Wiscovich und Kollegen gezeigt werden, dass LMO4 ein Zielgen des aktivierten ErbB2/HER2 Signalweges darstellt und hohe LMO4-Expressionsraten den Zellzyklus positiv beeinflussen (Montañez-Wiscovich *et al.*, 2009). Dieser Signalweg ist ebenfalls statistisch häufig in Brustkrebszellen konstitutiv aktiviert und stellt als eines der wenigen therapeutischen Zielproteine, eine Hoffnung für Brustkrebspatienten dar. Ähnlich wie LMO3, scheinen auch hier die Patienten mit erhöhter LMO4 Expression eine schlechte Prognose zu haben. Darüber hinaus beeinflusst eine LMO4 Überexpression die Differenzierung von Brustepithelzellen negativ (Visvader *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 2013).

Da es in allen Fällen einer Deregulation der LMO-Proteine zur Tumorgenese kommt, werden LMO-Proteine auch als neue therapeutische Zielmoleküle bei der Bekämpfung von Krebs diskutiert (Matthews *et al.*, 2013). Da in LMO-Proteinen ausser den LIM-Domänen, keine weiteren bekannten Domänen vorhanden sind, liegt die Vermutung nahe, dass der Einfluss von LMO-Proteinen auf die Tumorgenese, primär auf das Vorhandensein der LIM-Domäne

zurückzuführen ist. Molekularbiologische Untersuchungen in Form von LIM-Domänen Interaktionsanalysen sind prinzipiell schwierig durchzuführen, da die rekombinante Expression der LIM-Domäne dazu tendiert unlöslich zu sein und ausserdem eine starke Tendenz zur Aggregation aufzeigt (Matthews *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LIM-Domäne einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des Lhx3-Proteins hat. Während das ektopisch überexprimierte Lhx3-Protein (volle Länge) in Zebrafischen über einen untersuchten Zeitraum von 24 Stunden instabil und nicht mehr detektierbar ist, führt der Einsatz von Lhx3-Deletionsmutanten, denen beide LIM-Domänen fehlen, zu einem stabilen und detektierbaren Lhx3-Protein. Bestätigt wurden diese Experimente ebenfalls für Isl1, ein weiteres Mitglied der LIM-HD-Transkriptionsfaktorenfamilie. Diese Ergebnisse weisen Hinweise auf, dass LIM-Domänen bzw. Protein-Protein Interaktionen entscheidend für die Stabilität und somit Funktionalität von LIM-HD Proteinen sind. Weiterhin steht diese Beobachtung im Einklang mit den Ergebnissen, welche durch Überexpressions-Experimente des DN-CLIM Moleküls gezeigt werden konnten. Es scheint, dass die Interaktion der LIM-Domäne mit dem Kofaktor CLIM, die Proteinstabilität des gesamten Lhx3-Proteins beeinflusst und LIM-HD-Proteine vor proteasomalen Abbau durch das 26S-Proteasom protektiert werden. Somit haben, abhängig vom Zelltyp, zellulär vorliegende CLIM-Proteinkonzentrationen vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität bzw. Aktivität diverser LIM-HD-Transkriptionsfaktoren.

Fazit:

Die LIM-Domäne stellt eine Instabilitätsdomäne in LIM-HD-Proteinen dar. Die Maskierung dieser Domäne, mittels Bindung von CLIM, bewirkt eine Stabilisierung von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren. Steuerung der Genexpression durch Protein-Protein Interaktionen.

IV.3 Die CLIM-LCCD Domäne und ihre Funktion

Der Begriff der LCCD Domäne (Ldb/Chip *conserved domain*) wurde aufgrund einer Interaktion von Mitgliedern der SSDP-Familie mit Chip-Proteinen geprägt (van Meyel *et al.*, 2003). Chip-Proteine stellen ein CLIM-Homolog in *Drosophila* dar und interagieren mit dem Transkriptionsfaktor Apterous, um die Flügelentwicklung zu regulieren (Agulnick *et al.*, 1996; Bronstein *et al.*, 2010). Weiterhin wurde der Aminosäurenbereich 387-435 des Chip-Proteins als spezifische Domäne der SSDP1-Chip Interaktion identifiziert. *In silico* Analysen zeigen eine 94%-ige Homologie zum Aminosäurenbereich 201-249 des CLIM-Proteins in Säugern. Des Weiteren konnte das Vorhandensein dieser Domäne auch in Pflanzen nachgewiesen werden (van Nocker und Ludwig, 2003). Innerhalb der LCCD Domäne konnten 10

spezifische Aminosäuren (214-223) als SSDP1 Interaktionsdomäne identifiziert werden (van Meyel *et al.*, 2003). Im Laufe dieser Arbeit konnte die CLIM-LCCD Domäne als eine weitere Instabilitätsdomäne identifiziert werden. Während die ektopische Überexpression von CLIM-LCCD-Deletionsmutanten in Zebrafischen in höheren Protein-Stabilitäten resultierte, zeigten Wildtyp CLIM-Proteine deutlich geringere Protein-Stabilitäten und waren nach 24 Stunden nicht mehr detektierbar. Auch die hohe Konservierung dieser Domäne im Laufe der Evolution, weist vermutlich auf eine wichtige Rolle der CLIM-SSDP1 Interaktion hin. Weitere wichtige Funktionen der LCCD Domäne sollen weiter unten im Zusammenhang mit SSDP1 diskutiert werden.

IV.4 Die Rolle von SSDP1 im LIM-HD-Transkriptionsnetzwerk

SSDP- bzw. SSBP-Proteine (*single strand DNA binding protein*) sind erstmals aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Kollagen 2a Promotor in Fibroblasten von Hühner-Embryonen beschrieben worden. Es zeigte sich, dass SSDP-Proteine mit einer viel höheren Affinität einzelsträngige pyrimidinreiche DNA Sequenzen binden, als doppelsträngige Sequenzen (Bayarsaihan *et al.*, 1998). Im Vorwege dieser Arbeit konnte, sowohl in unserem Labor als auch in anderen Arbeitsgruppen, SSDP1 als neuer Interaktionspartner von CLIM identifiziert werden (Chen *et al.*, 2002, van Meyel *et al.*, 2003; Bronstein *et al.*, 2010). Hierbei zeigte sich, dass SSDP1 ein weiteres neues Mitglied des LIM-HD Transkriptionsnetzwerkes darstellt. Wie essentiell SSDP-Proteine für die embryonale Entwicklung von Säugern sind, konnten SSDP1^{-/-} *knockout* Mäuse aufzeigen. Diese Mäuse zeigen die gleichen gravierenden Phänotypen, wie sie bereits für CLIM2^{-/-} *knockout* Mäuse beschrieben worden sind. Die Mäuse weisen enorme embryonale Entwicklungsstörungen auf, welche ebenfalls zur frühen Letalität führen (E9.5). Verbunden ist diese Letalität mit einer abnormen Entwicklung bzw. Verlust von Kopfstrukturen. Ausserdem zeigten sich massive Knochen-Deformationen am Brustkorb, Rippen und Schwanz (Enkhmandakh *et al.*, 2006).

Die SSDP1 Proteinsequenz weist bisher zwei identifizierte und wenig charakterisierte Proteindomänen auf. Die N-terminale FORWARD- bzw. LUFS-Domäne beinhaltet die CLIM-LCCD Interaktionsdomäne, während die C-terminal lokalisierte *proline rich* Domäne scheinbar transkriptionsfördernde Funktionen *in vitro* besitzt (Wu *et al.*, 2006). Phylogenetische Untersuchungen weisen eine hoch konservierte Proteinsequenz zwischen Pflanzen, Invertebraten und Säugern auf. Damit ist die Verbindung zwischen SSDP1- und den CLIM-Proteinen die wohl älteste evolutionär entstandene Verbindung zwischen den Proteinen innerhalb des LIM-Proteinnetzwerkes. Da in entsprechenden *knockout* Mäusen nur N-

terminale SSDP1-Deletionen zum selbigen Phänotyp wie in den CLIM2^{-/-} *knockout* Mäusen führen (Enkhmandakh *et al.*, 2006), wurde im Zusammenhang dieser Arbeit die Bedeutung der LUFS-Domäne und ihre Funktion im LIM-HD-Proteinnetzwerk näher analysiert.

Es stellte sich heraus, dass SSDP1-Proteine in LIM-HD-Multiproteinkomplexen zum Zielgenpromotor des α GSU Gens rekrutiert werden und mittels direkter N-SSDP1-CLIM Interaktion, in der Formation von SSDP1-CLIM-Lhx3-Multiproteinkomplexen eine essentielle Rolle spielen. Da Proteinkonzentrationen von CLIM und Lhx3 über das 26S-Proteasom reguliert werden, konnten Bindungsstudien mit SSDP1 zeigen, dass die SSDP1-CLIM Interaktion zu einer Inhibition von Ubiquitinierungsreaktionen an CLIM führt. Als ein weiterer Kofaktor des LIM-HD-Proteinnetzwerkes konnte das RLIM-Protein bereits als Ubiquitin-Ligase identifiziert werden, welches die Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau von CLIM-Proteinen einleitet (Ostendorff *et al.*, 2002). Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl RLIM als auch SSDP1, mit der Aminosäuresequenz 214-219 (innerhalb der LCCD-Domäne) des murinen CLIM spezifisch interagieren können. Darüber hinaus führt die ektopisch überexprimierte SSDP1-LUFS Domäne zu einer kompetitiven Bindung der CLIM-RLIM Interaktion *in vitro* und *in vivo*. Die Folge der SSDP1-CLIM Interaktion ist die Stabilisierung von CLIM *in vivo*, da die CLIM-LCCD Domäne für RLIM nicht mehr zugänglich ist und folglich CLIM-Proteine nicht mehr für Ubiquitinierungsreaktionen zur Verfügung stehen.

Während die CLIM-Lhx3 Interaktion zu einer *in vivo* Stabilisierung von Lhx3 führt, hat die SSDP1-CLIM Interaktion direkt zur Folge, dass CLIM stabilisiert wird und indirekt zur Folge, dass ebenfalls Lhx3 stabilisiert wird. Der stabile Aufbau eines SSDP1-CLIM-Lhx3 Proteinkomplexes auf Zielgenpromotoren wie beispielsweise von α GSU, wird somit unmittelbar durch spezifische Protein-Protein Interaktionen gesteuert. Hierbei hängt der Aufbau des Komplexes und somit die erfolgreiche Transkription von Zielgenen scheinbar davon ab, in welcher Konzentration bzw. Stöchiometrie die zellulären SSDP1-, CLIM- und Lhx3-Proteine vorliegen. Die Balance dieser Proteine wird zellulär durch proteasomalen Abbau reguliert. Hier können jedoch nur diejenigen Proteine abgebaut werden, welche als Monomer vorliegen und somit für Ubiquitinierungsreaktionen frei verfügbar sind. Offensichtlich spielen innerhalb des LIM-HD-Proteinnetzwerkes hierarchische Protein-Interaktionen eine entscheidende Rolle im Schutz vor proteasomalen Abbau. Das evolutive Vorkommen dieser Interaktionsdomänen in Proteinen des LIM-HD-Netzwerkes, ist ein Beispiel für die Integration der in der Aminosäuresequenz kodierten Informationen für entweder eine funktionelle, oder für eine nicht-funktionelle zelluläre Wirksamkeit. Die

maximale Aktivität dieser Proteine wird maßgeblich durch Maskierung(en) von instabilen Proteindomänen mittels Protein-Protein Interaktion erreicht. Die LIM-Domäne stellt beim Aufbau von Multiproteinkomplexen die Basis dar und beeinflusst einerseits die Rekrutierung von CLIM Kofaktoren, andererseits die Aktivität des gesamten Multiproteinkomplexes und folglich die Genexpression (Güngör *et al.*, 2007).

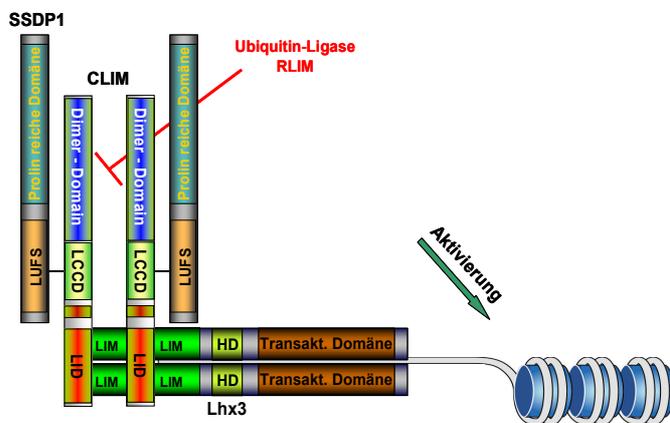
Ähnliche Ergebnisse konnten parallel zu dieser Arbeit, von Xu und Kollegen in hämatopoetischen Zellen aufgezeigt werden (Xu *et al.*, 2007). Die Autoren konnten aufzeigen, dass SSDP-Proteine integrale Komponenten des Multiprotein-Transkriptionskomplexes, bestehend aus TAL1, GATA1, CLIM und LMO2, auf dem β -Globin Zielgenpromotor sind und transkriptionsfördernde Eigenschaften mit sich bringen. Während die RNAi-induzierte Herunterregulation von SSDP-Proteinen in einer geringeren Reporter-gen-Aktivität resultierte, führte die SSDP-Überexpression zu einer dosisabhängigen Transaktivierung des Reporter-gens, welche von einer CLIM Ko-Expression abzuhängen scheint. Interessanterweise resultiert die Ko-Expression beider Proteine in einer verstärkten CLIM-Aktivität, obwohl die alleinige CLIM2-Überexpression die Reporter-gen-Aktivität inhibitorisch beeinflusst. Darüber hinaus führt diese Interaktion zur Protektion von CLIM vor proteasomalen Abbau durch RLIM (Xu *et al.*, 2007). Da die SSDP-Überexpression zu einer dosisabhängigen Aktivierung von CLIM-Proteinen führte, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass SSDP-Proteine de-ubiquitinierende Eigenschaften bzw. Aktivitäten besitzen. In entsprechenden Interaktionsexperimenten konnte diese Vermutung allerdings ausgeschlossen werden. SSDP-Proteine beeinflussen somit mittels CLIM-Interaktion positiv die Transaktivierung von Zielgenen während der Hämatopoese *in vitro*.

Erst kürzlich konnte eine Relevanz der SSDP-CLIM-LIM-HD-Protein-Interaktion ebenfalls *in vivo* aufgezeigt werden (Zhong *et al.*, 2011). Unter Verwendung des Zebrafisch-Systems konnten Zhong und Kollegen aufzeigen, dass die Expression von SSDP Kofaktoren (SSDP1a und SSDP1b), speziell SSDP1b, mit der von CLIM Kofaktoren während der frühen neuronalen Entwicklung überlappt. Die hohen Sequenzhomologien zwischen Zebrafisch und Maus SSDP-Proteinen, ließen ein ähnliches Expressionsmuster wie bereits für CLIM gezeigt erwarten. Besonders hohe SSDP- und CLIM-Expressionen konnten demnach sowohl in sog. Rohon-Beard- als auch Trigeminal-Neuronen detektiert werden, während deren Expressionen in Motorneuronen deutlich geringer ausfiel. Welche funktionalen Konsequenzen ein CLIM *knockout* bzw. die ektopische DN-CLIM Überexpression für die neuronale Zebrafisch Entwicklung hat, konnte bereits aufgezeigt werden (Becker *et al.*, 2002). So führt die Überexpression von dominant-negativen CLIM-Proteinen zu augenlosen Zebrafisch-

Embryonen, eine in ihrem Aufbau gestörte Grenzschicht zwischen Stamm- und Hinterhirn und eine fehlende Differenzierung sog. Mauthner Neurone im Hinterhirn (Becker *et al.*, 2002). Um einen möglichen Einfluss von SSDP-Proteinen für die Zebrafisch-Entwicklung aufzeigen zu können, haben die Autoren den N-terminalen Proteinbereich von SSDP1b, welcher für die CLIM-Interaktionsdomäne kodiert, ektopisch in Zebrafisch-Embryonen überexprimiert. Interessanterweise beobachteten die Autoren, dass die Augengröße der Embryonen deutlich kleiner ausfiel als die von kontrollinjizierten Zebrafischen. Somit scheint dieser Effekt weniger dramatisch zu sein, da es im Falle einer Überexpression von DN-CLIM zum kompletten Verlust der Augen kommt. In Bezug auf die embryonale Entwicklung der Grenzschicht zwischen Stamm- und Hinterhirn, konnte ebenfalls ein ähnlicher Phänotyp aufgezeigt werden, wie er bereits für DN-CLIM beschrieben wurde. So hat die ektopische N-SSDP-Überexpression einen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Grenzschicht zwischen Stamm- und Hinterhirn in Zebrafischen. In weiteren Analysen, welche sich mit der Hinterhirn-Entwicklung beschäftigten, konnte aufgezeigt werden das überexprimiertes N-SSDP-Protein keinen Einfluss auf die Differenzierung sog. Mauthner-Neurone hat, während eine DN-CLIM Überexpression die Differenzierung dieser Neuronen komplett negativ beeinflusste. Auch die mittels N-SSDP-Proteinen vermittelte CLIM-Interaktion und somit Stabilisierung von CLIM-Proteinen, konnte als Ergebnis dieser Arbeit aufgezeigt werden. Auch hier hypothetisieren die Autoren, dass geringste Abweichungen in der Stöchiometrie zellulärer CLIM-LIM-HD-Proteinkonzentrationen, einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression bzw. embryonale Entwicklung haben. Beeinflusst werden CLIM-LIM-HD-Proteinkonzentrationen somit einerseits durch die Ko-Expression von SSDP-Proteinen, andererseits durch die Ko-Expression von RLIM, welche den proteasomalen Abbau von CLIM-Proteinen vermittelt.

Darüber hinaus konnte in Pflanzen das Protein LEUNIG identifiziert werden, welches sehr ähnliche strukturelle Eigenschaften besitzt wie sie für das SSDP1-Protein aus Vertebraten beschrieben worden sind. Hier stellt die LUFSDomäne von LEUNIG-Proteinen die einzige strukturelle Ähnlichkeit zur LUFSDomäne von SSDP1-Proteinen aus Vertebraten dar, während die übrige Proteinsequenz keinerlei strukturelle Homologien aufweist (Conner und Liu, 2000). Später konnten Franks und Kollegen unter der Anwendung von Interaktionsexperimenten, SEUSS-Proteine als Interaktionspartner von LEUNIG-Proteinen identifizieren. Interessanterweise konnten in SEUSS-Proteinen ähnliche strukturelle Domänen identifiziert werden, wie sie bereits für CLIM-Proteine aufgezeigt worden sind (Franks *et al.*, 2002). So konnten in Pflanzen LEUNIG-Proteine als ein SSDP-Homolog und SEUSS-

Proteine als ein CLIM-Homolog identifiziert werden. Interessanterweise stellen beide Proteine in Pflanzen transkriptionelle Korepressoren dar und steuern die zeitlich begrenzte Expression des AGAMOUS Gens während der Blütenentwicklung *in planta* (Sridhar *et al.*, 2004; Grigorova *et al.*, 2011). Die erstaunliche Konservierung der Interaktion zwischen den LUFS-Domänen von SSDP- und LEUNIG-Proteinen und Sequenzen innerhalb der Chip/CLIM und SEUSS Proteine von Pflanzen bis zu Vertebraten, ist ein Beispiel für eine uralte transkriptionelle Regulationsfunktion, welche dann später in der Entwicklung noch durch Hinzufügen der LIM-Interaktionsdomäne bei den Chip/CLIM Proteinen und den damit verbundenen LIM-HD Protein-Wechselwirkungen erweitert wurde.



Fazit:
SSDP1-LUFS-Domänen binden CLIM-LCCD-Domänen in LIM-HD-Multiprotein-Komplexen und stabilisieren so den Gesamtkomplex auf Zielgenpromotoren. SSDP1-Proteine inhibieren eine CLIM-RLIM Interaktion und regulieren so die Genexpression von Lhx3 Zielgenen. Die Kontrolle einer stabilen Formation von LIM-HD-Multiproteinkomplexen wird durch Protein-Protein Interaktionen erreicht. Das 26S-Proteasom ist direkt in Vorgängen der Genexpression involviert.

IV.5 Die Expression von RLIM und CLIM2 in Brustzellen

Das Brustgewebe und entsprechende Zellen sind ein Zielorgan des hormonabhängigen Transkriptionsfaktors ER α . Hier steuert dieser vor allem die Expression spezifischer Gene, welche beispielsweise an der Differenzierung des Gewebes beteiligt sind und mit strukturellen Veränderungen der Brustdrüse einhergehen. Sowohl RLIM als auch CLIM, sind bisher nur im Kontext einer Expression in Hirnstrukturen näher charakterisiert worden. Daher hatte sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Analyse der Expression von RLIM und CLIM-Proteinen im Brust(krebs)gewebe beschäftigt. Da im Brustgewebe ausschließlich eine CLIM2-mRNA Expression detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden in Projekt II die CLIM Kofaktoren, als CLIM2 Kofaktoren benannt. Hierbei konnte durch die Verwendung von immunhisto- und immunzytochemischen Analysen gezeigt werden, dass RLIM und CLIM2 im Brustgewebe exprimiert und nukleär lokalisiert sind. Generell unterliegt das Brustgewebe einer streng kontrollierten Proliferation und Differenzierung von spezifischen Zellen. Da beide subzellulären Vorgänge im Brustgewebe mit der (veränderten)

Expression spezifischer Gene einhergehen, wurden mögliche Expressionsunterschiede der RLIM- und CLIM2-Proteine in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Brustgewebes untersucht. Unabhängig vom Menstruationszyklus einer jeden Frau, sind Differenzierungsvorgänge des Brustgewebes während einer Schwangerschaft und nach ihr zu beobachten. Daher wurden für Expressionsstudien ebenfalls Maus-Kryoschnitte vom Brustgewebe schwangerer und stillender Mäuse herangezogen. Als Vergleich dienten Kontroll-Gewebeschnitte jungfräulicher Mäuse. Die Analyse der Gewebeschnitte zeigte, dass beide Proteine in allen untersuchten Stadien der Brustentwicklung stark und konstant im Nukleus von Epithelzellen exprimiert sind. Hierbei fiel weiterhin auf, dass beide Proteine ausschließlich in Zielzellen des Hormons Östrogen exprimiert und mit ER α kolokalisiert waren. Positive RLIM- und CLIM2-Färbungen konnten vor allem in Epithelschichten von Ausführungsgängen der Brustdrüse (*Ductus papillares*) beobachtet werden. Im umgebenden Stroma und Bindegewebe konnte hingegen keine Expression beobachtet werden.

Weitere immunzytochemische Färbungen in humanen Brustkrebszellen (MCF7), konnten eine endogene nukleäre Ko-Expression von ER α , RLIM und CLIM2 bestätigen. Entsprechende Beobachtungen zu den Kolokalisationen der endogenen Proteine konnten auch mit ektopisch überexprimierten Fusionsproteinen gemacht werden.

Erst kürzlich konnte unser Labor neue und interessante Hinweise aufzeigen, dass eine RLIM-Expression im normalen Brustgewebe bzw. in alveolären Epithelzellen von Mäusen essentiell ist (Jiao *et al.*, 2012). Um Hinweise über die spezifische Funktion von RLIM in der Brustdrüse zu bekommen, wurden Brustdrüsen-spezifische RLIM *knockout* Mäuse generiert und charakterisiert. Diese Mäuse zeigen eine stark veränderte Morphologie der alveolären Epithelzellen, also jene Zellen welche während einer Schwangerschaft zu Milchproduzierenden Zellen differenzieren und nach erfolgreichem Abstillen der Nachkommen einem programmierten Zelltod unterliegen; ein Prozess der auch als Involution bezeichnet wird (Sutherland *et al.*, 2007). Die Entwicklung anderer Zellen in der Brustdrüse wie beispielsweise duktale Epithelzellen, blieben morphologisch unbeeinflusst und bestätigen eine Zelltyp-spezifische Funktion von RLIM in alveolären Epithelzellen der Brust. Weitere Analysen zeigten, dass die mRNA-Konzentrationen von charakteristischen Milchproteinen wie α -Casein, β -Casein und WAP (*whey acidic protein*) in den RLIM *knockout* Zellen laktierender Mäuse, verglichen mit Wildtyp Zellen, deutlich reduziert sind. Die ungenügenden Mengen dieser essentiellen Milchproteine, haben erwarteter Weise einen drastischen Einfluss auf das Füttern bzw. Überleben neugeborener Nachkommen. Weitere molekulare Untersuchungen zeigten, dass es während einer Schwangerschaft in RLIM

knockout Mäusen, zu einem verfrühten Zelltod von RLIM *knockout* differenzierenden alveolären Epithelzellen kommt. Rescue-Experimente mittels Kultivierung primärer Brustzellen aus RLIM *knockout* Mäusen und deren transiente ektopische RLIM-Überexpression, resultierte, verglichen mit Kontrolltransfektionen, in einem signifikanten Anstieg lebender bzw. vitaler alveolärer Epithelzellen *in vitro*. Somit konnte die RLIM Expression als essentiell für das Überleben von alveolären Epithelzellen während einer Schwangerschaft in Mäusen identifiziert werden. Um zu überprüfen, ob RLIM möglicherweise den Vorgang der Involution in der Brustdrüse reguliert, wurden RLIM-Proteinexpressionen im Brustdrüsengewebe von jungfräulichen, schwangeren und laktierenden Mäusen miteinander verglichen. Während in jungfräulichen Mäusen RLIM kaum detektierbar ist, konnten erhöhte RLIM-Proteinexpressionen vor allem in schwangeren und laktierenden Mäusen detektiert werden. Letzteres könnte dadurch erklärt werden, dass alveoläre Epithelzellen durch eine Schwangerschaft induzierte Differenzierung des Brustgewebes weiter expandieren. Um den Vorgang der Involution in Mäusen experimentell zu induzieren, entzieht man der Mutter die Nachkommen. Interessanterweise konnte bereits 6 Stunden nach der induzierten Involution, eine deutlich geringere RLIM-Proteinexpression im Brustgewebe detektiert werden, welche im Laufe der nächsten weiteren 6 Stunden zum fast vollständigen RLIM-Proteinverlust führte. Der native Vorgang der Involution in der Brustdrüse von Mäusen geht offensichtlich mit einer reduzierten RLIM-Proteinexpression einher (Jiao *et al.*, 2012). Da die Halbwertszeit des RLIM-Proteins relativ gering ist und RLIM als E3-Ubiquitin-Ligase fähig zur Autoubiquitinierung ist, ist es denkbar das die Konzentrationsabnahme des RLIM-Proteins auf proteasomalem Abbau zurückzuführen ist. Ob die veränderten Genexpressionen der im Rahmen dieser Studie untersuchten Milchproteine einen direkten oder indirekten Effekt eines RLIM *knockout* darstellen, ist bisher unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Da für RLIM mittlerweile gezeigt werden konnte, dass es die Aktivität diverser Transkriptionsfaktoren sowohl fördern als auch inhibieren kann, liegt die Vermutung nahe das RLIM befähigt ist spezifische Transkriptionsfaktoren und/oder transkriptionelle Koregulatoren in ihrer Funktion zu beeinflussen und somit die Genexpression zu modulieren.

IV.6 Die Expression von CLIM2-Proteinen im Mammakarzinom

Die erst seit geraumer Zeit bestehende Verbindung von LIM-Proteinen und der Entwicklung von Brustkrebs, sollte während dieser Arbeit der Initiator für eine vertiefte Analyse von der Beteiligung und Funktion von Proteinen des LIM-Netzwerkes in Brustkrebs (-zellen) sein.

Hierbei wurden in erster Linie CLIM2-Proteine, als potenzielle Koregulatoren in transkriptionellen Differenzierungsvorgängen des Brustgewebes untersucht. Visvader und Kollegen konnten zeigen, dass LMO4- und CLIM2-Proteine als negative Regulatoren in Differenzierungsvorgängen des Brustgewebes beteiligt sind. Für LMO4 konnten außerdem sehr hohe Expressionsraten statistisch häufig in humanen Brusttumoren vorgefunden werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ektopische Ko-Überexpression von LMO4 und CLIM2 zu einer Inhibition der Expression des β -Casein Gens, als ein Differenzierungsmarker des Brustgewebes, führt (Visvader *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse bestätigten eine parallel durchgeführte Untersuchung in der LMO2, ein weiterer Vertreter des LIM-Proteinnetzwerkes, und CLIM2 ebenfalls in Differenzierungsvorgängen der Erythropoese negativ involviert sind (Visvader *et al.*, 1997; Wadman *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 2013). Welche exakten molekularen Mechanismen hinter der Funktion von CLIM2-Proteinen für die Differenzierung und/oder Brustkrebs stehen, sind noch weites gehend unbekannt. Jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Funktionsweise von CLIM2-Proteinen in Brust-(krebs) Zellen gewonnen werden. So konnte mittels immunhistochemischer Färbung eines Gewebe-Microarray von 1335 Brustkrebspatientinnen gezeigt werden, dass die CLIM2-Expression signifikant mit der Expression von ER α und PR (Progesteron-Rezeptor) in primären Brusttumoren korreliert. Beide Proteine sind prognostische Marker in Brustkrebs, deren Expression generell mit gut differenzierten Tumoren und somit einem wenig aggressiven Phänotyp korrelieren. Überraschenderweise korreliert die Ko-Expression von CLIM2, ER α und PR mit schlecht differenzierten Tumoren, welche generell mit einem deutlich aggressiveren Phänotyp verbunden sind. So wiesen im Hinblick auf den histologischen Grad der Tumore, 57% aller untersuchten ER α /PR positiven Tumore, eine starke CLIM2-Expression auf. Des Weiteren konnte unter Bezugnahme des mitotischen Indexes der analysierten Tumorproben, eine Korrelation der CLIM2-Expression und den Mitoseraten beobachtet werden. Statistisch gesehen weisen die Fälle unter den ER α /PR positiven, die ein höheres Grading und mehr Mitosen aufweisen, also schlechter differenziert (G3) sind, eine starke Expression von CLIM2 auf. Im Normalfall korreliert der ER α und PR Status negativ zur Mitoserate, also ER α - und PR-Positivität ist eigentlich eher in besser differenzierten Tumoren (G1) vorzufinden. Interessanterweise konnten Montañez-Wiscovich und Kollegen ein sehr ähnliches Expressionsmuster für das LMO4-Protein in humanen Brustkrebsgeweben identifizieren (Montañez-Wiscovich *et al.*, 2010). Daher scheint es, dass sowohl hohe CLIM2- als auch LMO4-Proteinexpressionen, positiv mit der Mitoserate in

Brustkrebszellen korrelieren und die Zellteilung in transformierten Brustzellen positiv beeinflussen. Von den hier untersuchten 1335 Tumorgewebeproben waren lediglich 2,5% CLIM2 negativ. Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine starke CLIM2-Expression statistisch häufiger in Tumoren der Größen T2 und T3 vorzufinden ist. Somit scheint CLIM2 eine wichtige Rolle in der Progression des Mammakarzinoms einzunehmen. Darüber hinaus korreliert die CLIM2-Expression mit der von wichtigen prognostischen Markern in Brustkrebs, wie beispielsweise den Transkriptionsfaktoren ER α und PR. Somit bestätigen diese Befunde den bereits von Visvader und Kollegen beobachteten CLIM2-Phänotyp in Brustkrebszellen, bei dem eine CLIM2-Überexpression mit der Inhibition der Differenzierung von Brustkrebszellen verbunden ist (Visvader *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 2013). Andere veröffentlichte Daten zeigen, dass LMO4 und CLIM2 in der Regulation der Expression des BMP7-Gens (*bone morphogenic protein*) involviert sind und gemeinsam im Komplex mit HDAC2 (Histon Deacetylase), Zellproliferation und Apoptose in Brustepithelzellen beeinflussen (Wang *et al.*, 2007). Ob und in welchem Ausmaß RLIM-Proteine in primären Brusttumoren exprimiert sind, muss in noch gegenwärtigen Untersuchungen vollständig evaluiert werden.

Auch konnten CLIM2 Kofaktoren erst kürzlich mit der Entstehung von Leberkrebs in Verbindung gebracht werden (Teufel *et al.*, 2010). Ein leberspezifischer CLIM2 *knockout* in Mäusen führte im chemisch induzierten Leberkarzinogenese-Modell (DEN/Phenobarbital), zu einer deutlich schnelleren Entwicklung von malignen Läsionen in der Leber aus denen sich anschließend Lebertumore entwickelten, als in Wildtyp-Mäusen. Eine spontane Entwicklung von Lebertumoren, entzündlich verändertes Parenchymgewebe oder morphologische Veränderungen von Leberzellen konnten nicht beobachtet werden. Allerdings proliferierten die CLIM2 *knockout* Leberzellen offensichtlich deutlich schneller als die von Wildtyp-Mäusen. Die Autoren führten daher Genexpressionsanalysen durch und konnten vor allem als ein stark überexprimiertes Gen, das CyclinD1 identifizieren. Als Onkogen bekannt, fördert CyclinD1 vor allem Zellwachstum und Differenzierung auch in vielen anderen Tumorentitäten (Musgrove *et al.*, 2011). Ausserdem scheinen die CLIM2 *knockout* Leberzellen, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich resistenter gegenüber einer Behandlung mit dem Apoptose-induzierendem Anti-CD95 Antikörper zu sein *in vivo* (Teufel *et al.*, 2010). Es wäre daher interessant in der Zukunft zu überprüfen, welche Auswirkungen ein spezifischer CLIM2 *knockout* im Brustgewebe von Mäusen auf eine mögliche Tumorgenese hat.

Fazit:

In Brustkrebs korreliert eine CLIM2-Expression mit der von ER α und PR. Während ER α - und PR-Positivität in Brustkrebs generell mit gut differenzierten Tumoren korreliert, zeigt eine starke Ko-Expression von CLIM2 eine statistische Signifikanz zu schlecht differenzierten ER α /PR positiven Tumoren. Gewebe-Untersuchungen hinsichtlich einer Korrelation der RLIM-Expression und Brustkrebs sind derzeit noch gegenwärtig.

IV.7 RLIM und CLIM2: neue Interaktionspartner von ER α in Brustkrebszellen

Die Adaptorfunktion welche CLIM2-Proteine in Multiproteinkomplexen ausüben, sind bislang lediglich im Kontext der neuronalen Entwicklung näher analysiert worden. Daher hatte sich diese Arbeit auch mit der Analyse beschäftigt, neue transkriptionsregulierende Interaktionspartner von RLIM und CLIM2-Proteinen in Brustkrebszellen zu identifizieren. Als ein potentiell neuer Interaktionspartner konnte im Rahmen dieser Arbeit, mittels Koimmunpräzipitationen aus MCF7 Zelllysaten, ER α identifiziert werden. Des Weiteren konnten diese Ergebnisse unter der Verwendung von Zelllysaten aus primären Patiententumoren und der Anwendung von Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Der Transkriptionsfaktor ER α interagiert sowohl mit RLIM als auch mit CLIM2 *in vitro* und *in vivo*. Darüber hinaus konnten spezifische Proteindomänen identifiziert werden, welche für die jeweiligen Interaktionen essentiell sind. Bei näherer Betrachtung der CLIM2-Sequenz stellte sich heraus, dass innerhalb der CLIM2-LCCD Domäne (AS 209-214) eine kurze und hoch konservierte Aminosäuresequenz vorhanden ist, welche in der Literatur als *corepressor* NR-(CoRNR) Box (*nuclear receptor box*) oder *nuclear receptor interaction domain* (NID) bereits beschrieben worden ist (Heery *et al.*, 1997; Hu und Lazar, 1999; Green *et al.*, 2007). Dieses kurze Bindemotiv beinhaltet die Aminosäureabfolge LXX(L,I,V)L, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann. Erstmals beschrieben wurde dieses Bindemotiv im Zusammenhang mit N-CoR-Proteinen (*nuclear receptor corepressor*) und deren Interaktion mit ER α . Hierbei interagiert der Korepressor N-CoR mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α und reprimiert, mittels Konkurrenz essentieller Koaktivatoren, die ER α -abhängige Transkription von Zielgenen. Die Spezifität einer NR-Box hinsichtlich der Bindung an verschiedene Kern-Rezeptoren wird durch Aminosäuren entscheidend mitbestimmt, die carboxyterminal zum Kernmotiv liegen (McInerney *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2007). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb CLIM2 innerhalb der Kern-Rezeptoren-Familie, ausschließlich und spezifisch mit ER α interagiert. Die Verwendung von CLIM2-Deletionsmutanten denen die CoRNR-Box bzw. NID fehlt, zeigte in Interaktions-Analysen mit ER α eine Notwendigkeit für erfolgreiche Wechselwirkungen *in vitro*. Erwarteter Weise interagieren Wildtyp CLIM2-

Proteine mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α . Überraschenderweise zeigen weitere Mitglieder der Kern-Rezeptoren, wie ER β , Androgen-Rezeptor oder Glukokortikoid-Rezeptor weder eine Wechselwirkung mit CLIM2- noch mit RLIM-Proteinen. Diese Ergebnisse weisen daher auf eine spezifische Interaktion mit ER α hin. Unter der Verwendung von RLIM-Deletionsmutanten konnte ich weiterhin aufzeigen, dass RLIM mittels C-terminaler RINGfinger-Domäne fähig ist, ebenfalls mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α *in vitro* zu interagieren. Somit konnten Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen RLIM, CLIM2 und ER α in meiner Arbeit bekräftigt werden. Ob CLIM2 und RLIM fähig sind, die ER α -Ligandenbindungsdomäne simultan zu binden, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Da beide Proteine mit der selbigen Domäne interagieren, ist die simultane Bindung von ER α vermutlich eher unwahrscheinlich, bedarf aber weiterer Untersuchungen. Eine Interaktion von Proteinen mit ER α , welche dessen Ubiquitinierung vermitteln können, wurde bereits in der Literatur beschrieben. So kann beispielsweise die Ubiquitin-Ligase Efp (*estrogen-responsive finger protein*) Östrogen-abhängig mit ER α interagieren und mittels Ubiquitinierung die Halbwertszeit und somit Transkriptionsaktivität des Rezeptors steuern (Nakajima *et al.*, 2007). Als ein vermuteter kritischer Faktor in Brustkrebs führen Efp *knockout* Experimente zu einem reduzierten Brustkrebszellwachstum *in vitro* (Horie *et al.*, 2003). Die funktionelle Rolle der RLIM/ER α - und CLIM2/ER α -Interaktionen, sollen gesondert im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

Fazit:

RLIM und CLIM2 interagieren spezifisch mit ER α in vitro und in vivo. Hierbei interagieren die CLIM2 Aminosäuren 209-214 spezifisch mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α , während RLIM mittels C-terminaler RINGfinger Domäne mit der Ligandenbindungsdomäne von ER α interagiert.

IV.8 Die funktionelle Rolle von RLIM und CLIM2 in der ER α vermittelten Transkription von Zielgenen

Die Östrogen-abhängige Transkription von Zielgenen wird mittels ER α eingeleitet. Hierbei war bekannt, dass die Initiierung der Transkription einen hoch molekularen und komplexen Vorgang darstellt. Metivier und Kollegen konnten zeigen, dass die ER α vermittelte Transkription ein zyklischer und koordinierter Prozess ist. Hierbei konnten mehr als vierzig weitere Kofaktoren identifiziert werden, welche kombinatorisch zum pS2-Zielgenpromotor rekrutiert werden (Metivier *et al.*, 2003). Rekrutiert werden Kofaktoren, welche sowohl aktivatorische als auch repressorische Funktionen ausüben. Erst die Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparates führt zu erfolgreicher Transkription des Zielgens. So konnte mittels

Chromatin-Immunpräzipitationen aufgezeigt werden, dass eine Interaktion von ER α mit der Promotor-DNA des pS2-Gens, ca. alle 20 Minuten zyklisch verläuft. Hierbei kommt es nach Östrogenbindung des Rezeptors zunächst zu einer ersten Interaktion mit der Promotor-DNA, auf welche wiederum, in Folge von proteasomalem Abbau, eine Dissoziation des Rezeptors folgt. Beschrieben wurde dieser erste Zyklus als „unproduktiver Zyklus“, der dadurch erklärt worden ist, als dass die aktiv phosphorylierte Form der RNA-Polymerase II zu diesem Zeitpunkt nicht am pS2-Promoter detektierbar war. Des Weiteren wird vermutet, dass dieser erste „unproduktive Zyklus“ dem Zwecke dient, den Promotor für weitere Zyklen optimal vorzubereiten. Die nächsten weiteren Zyklen werden als „produktive Zyklen“ beschrieben und führen mittels Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparates zu erfolgreicher Transkription des ER α Zielgens pS2 (Metivier *et al.*, 2003).

Aufgrund der Tatsache, dass sowohl CLIM2 als auch RLIM *in vitro* und *in vivo* mit ER α interagieren und ebenfalls in Brustkrebszellen nukleär kolokalisieren, stellte ich die Hypothese auf, dass CLIM2 und RLIM in der ER α vermittelten Transkription als Koregulatoren fungieren. Initial konnte im Laufe dieser Arbeit unter der Verwendung von Luziferase Reporter-Gen-Experimenten, CLIM2 als negativer Regulator und RLIM als positiver Regulator der ER α vermittelten Transkription *in vitro* identifiziert werden. Während die ektopische CLIM2-Überexpression in MCF7 Zellen dosisabhängig in einer bis zu ca. 65%-igen Repression der ER α gesteuerten Transkription resultierte, führte der spezifische und transiente CLIM2 *knockdown* zu einer dreifach verstärkten Transaktivierung *in vitro*. Die ektopische Überexpression einer CLIM2-Mutante in der die ER α Interaktionsdomäne deletiert wurde, führte erneut zur verstärkten Transaktivierung des Reportergens. Somit scheint die bereits in Interaktionsexperimenten identifizierte CLIM2-NID-Domäne einerseits essentiell für die CLIM2-ER α Interaktion zu sein, andererseits für eine CLIM2 vermittelte Repression der ER α vermittelten Transaktivierung des Reportergens unerlässlich zu sein. Die Identifikation von CLIM2 als negativer Regulator war überraschend, da im Zusammenhang mit dem LIM-HD-Proteinnetzwerk, CLIM2-Proteine als positive Koregulatoren aufgezeigt worden sind (Ostendorff *et al.*, 2002; Matthews *et al.*, 2003; Matthews *et al.*, 2013). Interessanterweise konnte für LMO4 aufgezeigt werden, dass dessen Überexpression ebenfalls die ER α vermittelte Transaktivierung von Zielgenen in Brustkrebszellen negativ beeinflusst (Singh *et al.*, 2005). In diesem Kontext konnten Wang und Kollegen aufzeigen, dass CLIM2-Proteine im Komplex mit LMO4, die Transkription des BMP7-Gens in Brustkrebszellen negativ regulieren. Die Autoren schlugen vor, dass die Rekrutierung und

Interaktion von CLIM2 und LMO4 am BMP7-Genpromoter eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Mammakarzinoms spielt (Wang *et al.*, 2007). Auch die Tatsache, dass die Transkription des BMP7-Gens nach einer Öströgen-Stimulation reprimiert ist, bekräftigt die negative Koregulatorfunktion von CLIM2-Proteinen im Mammakarzinom. Die Östrogen-induzierte Rekrutierung von CLIM2-Proteinen zum BMP7 Genpromotor, scheint daher für das sich im reprimierten Status befindliche BMP7 Gen essentiell zu sein.

Obwohl die Repression des BMP7-Gens im Mammakarzinom von einer zellulären CLIM2-LMO4-Interaktion abzuhängen scheint, konnte ich eine potentielle Rolle für LMO4 in der ER α vermittelten Transkription nicht beobachten. Vielmehr scheint es, dass die zelluläre Stöchiometrie zwischen CLIM2- und LMO4-Proteinen kritisch für deren Wirksamkeit ist, da sowohl der CLIM2 *knockdown* als auch die CLIM2-Überexpression in eine gesteigerte BMP7-Genexpression in Brustkrebszellen münden.

Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in anderen entwicklungsbiologisch relevanten Zellmodellen aufgezeigt werden. So spielt während der *Drosophila*-Flügelentwicklung, die Stöchiometrie von CLIM2- und LMO4-Proteinen im LIM-HD-Proteinnetzwerk eine zentrale Rolle für deren zelluläre Wirksamkeit. Hier führen bereits gering abweichende Mengenverhältnisse zwischen CLIM2- und LMO4-Proteinen zu massiven Entwicklungsstörungen der Flügel (Fernandez-Funez *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2003). Im Gegensatz hierzu konnte ich die ER α abhängige Transkription von Zielgenen mittels CLIM2 *knockdown* steigern und mittels einer ektopischen CLIM2-Überexpression verringern. Daher scheint es, dass sich der Wirkungsmechanismus von CLIM2 in der Öströgen-abhängigen Genexpression, von dem im BMP7-Proteinnetzwerk unterscheidet und nicht von einer definierten zellulären CLIM2-LMO4-Stöchiometrie abhängig ist.

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse von CLIM2-Proteinen weisen demnach, je nach zellulärem Kontext, auf multiple Funktionsweisen hin. So spielen sie einerseits eine positive Rolle in der Regulation der Transkription von Genen, welche embryonale Entwicklung steuern, andererseits spielen sie als Adaptoren in Multiproteinkomplexen eine negative Rolle in der Regulation der Transkription spezifischer Gene, welche Differenzierung steuern (Visvader *et al.*, 1997; Wadman *et al.*, 1997; Visvader *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2008).

Die Ubiquitin-Ligase RLIM, ein weiterer Koregulator der bislang nur im Kontext des LIM-HD-Proteinnetzwerkes beschrieben worden ist, war ebenfalls ein weiterer Schwerpunkt meiner Untersuchungen. Für RLIM war bisher bekannt, dass es mit CLIM-Proteinen interagiert und diese, mittels Ubiquitinierung, für den proteasomalen Abbau vorbereitet. Außerdem wurde RLIM im LIM-HD-Netzwerk als Korepressor beschrieben, der in der Lage

ist, eine durch Lhx3 vermittelte transkriptionelle Aktivierung des α GSU- und des Prolaktin-Promotors, zu inhibieren (Bach *et al.*, 1999). Hierbei stellte sich heraus, dass RLIM seine Repressorfunktion durch zwei unterschiedliche Inhibitionsmechanismen erfüllt: Einerseits durch die Rekrutierung des HDAC-Korepressorkomplexes und andererseits mittels Steuerung der Ubiquitinierung und folglich des proteasomalen Abbaus des Koaktivators CLIM2. Mittels dieser posttranslationalen Modifikation an CLIM2 Kofaktoren, verdrängt RLIM somit den LIM-HD-Transkriptionsfaktoren die Kofaktoren, welche essentiell für die Transaktivierung von Zielgenen sind (Bach *et al.*, 1999; Ostendorff *et al.*, 2002; Hiratani *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit führte die funktionelle Analyse von RLIM in Östrogen-abhängiger Transkription zu neuen Erkenntnissen. Hier zeigte sich, dass RLIM eine wichtige Rolle in der Regulation der Östrogen-abhängigen Transkription spielt. Die ektopische und dosisabhängige RLIM-Überexpression mündete in einer bis zu ca. fünffach erhöhten Transaktivierung der ER α gesteuerten Transkription in MCF7 Zellen, während der spezifische und transiente RLIM *knockdown* zu einer dreifach verringerten Transaktivierung *in vitro* führte. Des Weiteren resultierte die ektopische Überexpression einer RLIM RINGfinger Deletionsmutante, in keiner verstärkten Transaktivierung *in vitro*. In diesem Kontext bestätigte dieses Ergebnis daher die bereits in Interaktionsexperimenten identifizierte Notwendigkeit der RLIM RINGfinger Domäne, welche essentiell für die RLIM-ER α Interaktion ist. Somit scheint es, dass die RLIM vermittelte verstärkte ER α -Transaktivierung, mit der Vermittlung von Ubiquitinierungsreaktionen verbunden ist, da die RINGfinger Domäne die Ubiquitinierung von Substratproteinen vermittelt. In diesem Zusammenhang sollen RLIM vermittelte Ubiquitinierungsreaktionen im Kontext der ER α vermittelten Transkription, gesondert im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

Die Durchführung der Reporter-gen-Experimente in Brustkrebszellen verifizierte meine aufgestellte Hypothese. Sowohl RLIM- als auch CLIM2-Proteine fungieren als Koregulatoren in ER α vermittelter Transkription *in vitro*. Die Spezifität der RLIM und CLIM2 vermittelten Koregulation im ER α Transkriptionsnetzwerk, konnte mittels Durchführung weiterer Experimente untermauert werden. So konnten unter der Verwendung eines Glukokortikoid-Rezeptor verantwortlichen Reportergens keinerlei Hinweise einer RLIM- oder CLIM2 vermittelten Koregulation beobachtet werden. Interessanterweise spielen beide Proteine in der ER α abhängigen Transkription, im Vergleich zur LIM-Homöodomänen abhängigen Transkription, reziproke Rollen.

Mittels Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) und Genexpressionsanalysen konnte ich die Koregulatorfunktion von RLIM und CLIM2 im ER α Transkriptionsnetzwerk *in vivo* bestätigen. Konsistent mit den Luziferase-Daten, resultierte die zelluläre CLIM2-Depletion in Östrogen-stimulierten Brustkrebszellen, in einer deutlich gesteigerten Expression der ER α Zielgene pS2 und Cathepsin D. Für das WISP2 Gen konnte ich interessanterweise keine gesteigerte, sondern eine verringerte Genexpression *in vivo* beobachten. Es scheint daher, dass die Rolle von CLIM2 im ER α Transkriptionsnetzwerk zielgenspezifisch ist. Im Gegensatz hierzu, führte die zelluläre RLIM-Depletion zu einer deutlich reduzierten Genexpression von sowohl pS2 und Cathepsin D, als auch WISP2 *in vivo*. Somit scheint die Rolle von RLIM als Koregulator im ER α Transkriptionsnetzwerk zumindest für die in dieser Arbeit analysierten Zielgene, im Gegensatz zu CLIM2, nicht zielgenspezifisch zu sein. Hier ist noch zu erwähnen, dass die Genexpression von Cathepsin D und WISP2 in RLIM-depletierten Zellen und einer darauf folgenden zweistündigen Östrogen-Stimulation, nahezu vollständig reprimiert waren.

Um zu überprüfen, ob RLIM- und CLIM2-Proteine durch eine Östrogen-Stimulation zu ER α Zielgenpromotoren rekrutiert werden, wurden ChIP-Experimente durchgeführt. So konnten RLIM und CLIM2 auf allen hier untersuchten Zielgenpromotoren detektiert werden. Während CLIM2 bereits unabhängig von einer Östrogen-Stimulation auf den Zielgenpromotoren von pS2, Cathepsin D und WISP2 detektiert wurde, konnte nach Östrogen-Stimulation eine nochmals verstärkte CLIM2-Rekrutierung auf allen drei Zielgenpromotoren beobachtet werden. Hingegen war die RLIM-Rekrutierung zum Zielgenpromotor von pS2 und WISP2 Östrogen-abhängig. Interessanterweise konnte RLIM bereits Östrogen-unabhängig am Cathepsin D Promotor detektiert werden, während in Östrogen-stimulierten Zellen keine verstärkte RLIM-Rekrutierung am Cathepsin D Promotor beobachtet werden konnte.

Überraschend zeigten präliminäre Daten, dass in Östrogen-stimulierten MCF7 Brustkrebszellen, sowohl RLIM- als auch CLIM2-Proteine zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten, aber nie synchron an ER α Zielgenpromotoren detektierbar waren. Dies lässt vermuten das RLIM, im Gegensatz zum LIM-HD-Proteinnetzwerk, nicht die Ubiquitinierung von CLIM2-Proteinen im Östrogen-abhängigen Transkriptionsnetzwerk vermittelt.

Hierbei verläuft die Rekrutierung von CLIM2-Proteinen, im Vergleich zu ER α und RNA Polymerase II, asynchron. Das bedeutet, dass CLIM2-Proteine nach einer Östrogen-Stimulation nur zu den Zeitpunkten rekrutiert wurden (ca. alle 30 Minuten), bei denen ER α bereits als Folge von proteasomalem Abbau, vom Promotor dissoziiert ist und RNA Polymerase II für eine aktive Transkription nicht mehr zur Verfügung steht. Im Gegensatz

hierzu wurde RLIM bereits nach einer zwanzigminütigen Östrogen-Stimulation synchron mit ER α zum pS2-Promotor rekrutiert. Dieser erste Zyklus wurde als „unproduktiver“ Zyklus definiert, als das die aktive RNA-Polymerase II nicht zum Promotor rekrutiert wird. Der erste „produktive“ Zyklus mit aktivem ER α beginnt nach ca. 45 Minuten und verläuft synchron mit der Rekrutierung von RNA Polymerase II zum pS2 Zielgenpromotor. Diese synchrone Rekrutierung steht daher im Einklang mit den bereits in Reporter-gen-Experimenten und Genexpressionsanalysen beobachteten koaktivatorischem Phänotyp von ektopisch überexprimierten RLIM-Proteinen. Diese Ergebnisse stehen aber auch im Einklang mit dem von Metivier und Kollegen beobachteten zyklischen Binden von ER α und der funktionellen Wichtigkeit einer koordinierten Rekrutierung von sowohl aktivatorischen als auch repressorischen Proteinen zum pS2 Zielgenpromotor (Metivier *et al.*, 2003). Es scheint daher, dass für die Assemblierung von Transkription-Koregulator-Komplexen auf ER α Zielgenpromotoren, eine Rekrutierung von Korepressoren wie beispielsweise CLIM2-Proteine unerlässlich ist. Die erste frühe RLIM-Rekrutierung zum Zielgen-Promotor während des „unproduktiven“ Zyklus, könnte womöglich wichtig für die initiale und optimale Vorbereitung des Zielgenpromotors und/oder für eine effiziente ER α -Promotor-DNA Interaktion von Bedeutung sein.

Die koordinierte Rekrutierung bzw. das komplexe Wechselspiel von bisher mehr als vierzig identifizierten Koaktivatoren und Repressoren an nur einem ER α Zielgenpromotor lässt erahnen, dass die Transaktivierung von Zielgenen weitaus komplexer ist als bis dahin vermutet. In diesem Kontext war es umso überraschender, als das für ER α eine zyklische Bindung des Zielgenpromotors aufgezeigt werden konnte, welche sowohl „unproduktive“ als auch „produktive“ Zyklen der Genaktivierung mit einschliessen. (Metivier *et al.*, 2003).

Fazit:

RLIM und CLIM2 sind neue Koregulatoren der ER α -abhängigen Transkription in vitro und in vivo. CLIM2-Proteine stellen Korepressoren dar, während RLIM-Proteine als Koaktivatoren identifiziert wurden. Die CLIM2 vermittelte Korepression ist abhängig von der CLIM2-RID Domäne und die RLIM vermittelte Koaktivierung ist abhängig von der RINGfinger Domäne. Beide Proteine werden zu ER α Zielgenpromotoren rekrutiert.

IV.9 ER α , ein neues *in vivo* Zielprotein von RLIM?

Der Transkriptionsfaktor ER α bindet nach Östrogen-Stimulation zyklisch an Zielgenpromotoren und initiiert mittels Rekrutierung von Kofaktoren und des basalen Transkriptionsapparates die Transkription. Das Ubiquitin-Proteasom-System greift in die Kontrolle der Konzentration von ER α durch deren Proteolyse ein (Nawaz *et al.*, 1999; Lee *et*

al., 2012). Die Behandlung von Zellen mit Proteasom-Inhibitoren verhindert eine zyklische Bindung von ER α an Zielgenpromotoren und es kommt zu einer Akkumulation in der Zellkernmatrix. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass polyubiquitiniertes ER α nicht mehr fähig ist, RNA-Polymerase II zu binden und somit transkriptionell aktiv zu sein (Reid *et al.*, 2003). Daher ist die Funktionalität des 26S-Proteasoms von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Transaktivierung von ER α Zielgenen. Vielmehr zeigen die Forschungsergebnisse der letzten Jahre, dass das Ubiquitin-Proteasom-System in höheren Organismen einen wichtigen und integralen Bestandteil funktionaler Transkription darstellt (Geng *et al.*, 2012). Auch der Androgen-Rezeptor (AR) weist ein durch Proteasom-Inhibitoren unterbindbares zirkulierendes Bindungsverhalten am PSA-Promotor (*prostate-specific Antigen*) auf. Darüber hinaus kann die 19S-Proteasom-Untereinheit den PSA-Promotor blockieren (Kang *et al.*, 2002) und MG132, ein Proteasom-Inhibitor der 26S-Proteasom-Untereinheit, unterdrückt die Transaktivierung von AR indem er die nukleäre Translokation von AR und dessen Interaktion mit Kofaktoren hemmt (Lin *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte erst kürzlich die Ubiquitin vermittelte Degradation von AR durch die E3-Ubiquitin-Ligase CHIP aufgezeigt werden (Sarkar *et al.*, 2012). Im Laufe meiner Untersuchungen sollte die Ubiquitin-Ligase RLIM im Kontext der Ubiquitin vermittelten Proteolyse von ER α näher untersucht werden. Der im Vorwege dieser Untersuchungen beobachtete Einfluss einer RLIM-Überexpression auf die ER α gesteuerte Transkription von Zielgenen ließ vermuten, dass RLIM nicht für die Vermittlung von *in vivo* Polyubiquitinierungen und proteasomalem Abbau des ER α verantwortlich ist, da die RLIM-Überexpression mit einer Stabilität und verstärkten Aktivität von ER α einhergeht. Wäre RLIM spezifisch in der Lage ER α zu polyubiquitiniere, so sollte es als Folge einer proteasomalen Degradation zu einer stark reduzierten Transaktivierung von Zielgenen kommen. Diese Vermutung schließt allerdings nicht aus, dass RLIM eventuell eine *in vivo* Mono-Ubiquitinierung von ER α vermittelt. Die posttranslationale Regulation von Proteinen durch Mono-Ubiquitinierungen kann zu einer Modifikation der Protein-Funktion, Protein-Lokalisierung oder Protein-Protein Interaktion führen (Jentsch *et al.*, 1987; Sun und Allis, 2002; Hilt, 2004; Geng *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitin-Ligase BRCA1 (*breast cancer suppressor protein 1*) Mono-Ubiquitinierungen von ER α vermittelt. Es stellte sich heraus, dass hierbei ausschließlich die Ligandenbindungsdomäne mono-ubiquitiniert wird, also jene Domäne mit der auch RLIM *in vitro* und *in vivo* interagiert. Welchen direkten Einfluss diese Modifikation auf die ER α -

Aktivität *in vivo* hat, konnte allerdings nicht aufgeklärt werden (Eakin *et al.*, 2007). Erst geraume Zeit später, konnten Ma und Kollegen aufzeigen das die BRCA1 vermittelte Mono-Ubiquitinierung von ER α , mit dessen Repression einhergeht (Ma *et al.*, 2010).

Um einen möglichen Einfluss von RLIM auf die Proteinstabilität von ER α zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Ubiquitinierungs-Experimente durchgeführt. Entgegen den Erwartungen zeigte sich, dass bakteriell exprimiertes bzw. rekombinantes RLIM in Anwesenheit aller notwendigen Komponenten der Ubiquitin-Reaktion, die spezifische Polyubiquitinierung von radioaktiv markiertem ER α *in vitro* vermittelt. Im Gegensatz hierzu führten Kontroll-Untersuchungen mit weiteren Mitgliedern dieser Proteinfamilie wie AR, TR oder GCNF, weder zur Mono- noch zur Polyubiquitinierung dieser Proteine und bestätigen somit die Spezifität der RLIM vermittelten Polyubiquitinierung von ER α innerhalb der Kern-Rezeptoren Proteinfamilie.

In anschließenden *in vivo* Untersuchungen konnte die Polyubiquitinierung von ER α verifiziert werden. So resultierte die ektopische RLIM-Überexpression, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, in einer gesteigerten Polyubiquitinierung von ER α *in vivo*. Da polyubiquitinierte Proteine schlechter Detergenz-löslich sind als nicht-ubiquitinierte Proteine, wurde überprüft, ob die ektopische RLIM-Überexpression in einer verstärkten Akkumulation von polyubiquitinierten ER α -Molekülen in der unlöslichen Detergenz-Proteinfraktion resultiert. Während die Menge an unlöslichem ER α in Wildtyp-Zellen konstant blieb, kam es in den RLIM-überexprimierten Zellen zu einer Zunahme von unlöslichem ER α . Somit konnte die RLIM vermittelte *in vivo* Polyubiquitinierung von ER α nochmals bestätigt werden. Überraschenderweise unterschieden sich die absoluten intrazellulären ER α Proteinkonzentration zwischen RLIM-überexprimierten und Wildtyp-Zellen nicht und bestätigen somit, dass die RLIM vermittelte Polyubiquitinierung von ER α , nicht in dessen proteasomalen Abbau münden *in vivo*. Dieses Ergebnis steht daher im Einklang mit der RLIM vermittelten Koaktivierung von ER α Zielgenen *in vitro* und *in vivo*.

Die RLIM vermittelte Polyubiquitinierung und dem damit verbundenen nicht-proteolytischen Abbau von ER α , steht allerdings im Widerspruch zu den bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen von Polyubiquitinierungen, da sie bis auf wenige Ausnahmen mit der Degradation von Proteinen einhergehen. Durch die intensive Erforschung des 26S-Proteasoms konnte im Laufe der letzten Dekade eine Vielzahl von neuen 26S-Proteasom-Substratproteinen identifiziert werden. Ausserdem konnten polyubiquitinierte Substrat-Proteine identifiziert werden, bei denen nur definierte vom 26S-Proteasom erkennbare Proteindomänen

proteolytisch abgespalten werden, während andere Proteindomänen intakt bleiben und vom Proteasom stabil bzw. „aktiv“ freigelassen werden. Dieser Prozess ist auch bekannt als „*regulated ubiquitin proteasome-dependent processing*“ (RUP) und endet in allen bisherigen Untersuchungen mit biologisch aktiven Polypeptid-Fragmenten (Rape *et al.*, 2004).

Das bislang am besten charakterisierte und erforschte Beispiel für proteasom-abhängige Prozessierung, ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B aus Säugern. Hier besteht die NF- κ B-Familie aus fünf Mitgliedern: RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 und p100/p52. Alle Proteine zeichnen sich durch eine konservierte und aus 300 Aminosäuren bestehende Rel-Homologie-Domäne (RHD) aus, welche für DNA-Bindung, Dimerisierung und Kernlokalisierung verantwortlich ist (Chen und Ghosh, 1999; Luqman *et al.*, 2010). Die Proteine RelA, RelB und c-Rel werden als reife Proteine synthetisiert und sind aufgrund ihrer C-terminal lokalisierten Transaktivierungsdomäne fähig, die Transkription von Zielgenen direkt zu aktivieren. Im Gegensatz dazu werden die inaktiven p105- und p100-Proteine als Vorläufermoleküle synthetisiert, deren charakteristisches Merkmal eine C-terminale Ankyrin-Wiederholungsdomäne ist. Diese Domäne wird als Folge zellulärer Signale in einem Ubiquitin-abhängigen Prozess proteolytisch vom 26S-Proteasom abgespalten und so in eine reife p50 bzw. p52 aktive Form überführt (Hoffman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2012). Die zelluläre Mobilisierung von prozessierten Transkriptionsfaktoren bietet daher die Möglichkeit bereits synthetisierte aber inaktiv vorliegende Proteine, bei Bedarf schnell in eine aktive Form zu überführen.

Jegliche Hinweise einer Polyubiquitin vermittelten Prozessierung von ER α durch das 26S-Proteasom, konnte in meiner Arbeit allerdings nicht bekräftigt werden. Somit scheint die RLIM vermittelte Polyubiquitinierung von ER α , eine andere intrazelluläre Funktion zu haben und bedarf in der Zukunft weiterer Untersuchungen.

In diesem Kontext wurden weitere E3-Ubiquitin-Ligasen beschrieben, welche ebenfalls in ER α vermittelter Transkription, als Koaktivatoren wirksam sein können. Sowohl Mdm2 als auch E6-AP interagieren mit ER α in Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* und verstärken, wenn ektopisch überexprimiert, die Östrogen vermittelte Transkription von ER α Zielgenen *in vitro* (Nawaz *et al.*, 1999; Saji *et al.*, 2001). Für Mdm2 konnte, ähnlich wie für RLIM, in Reporter-Experimenten aufgezeigt werden, dass die verstärkte Transaktivierung Mdm2-dosisabhängig ist. Mögliche Hinweise für die Mdm2- und E6-AP vermittelte verstärkte bzw. synergistische Transaktivierung konnten allerdings nicht aufgezeigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die RLIM vermittelte Polyubiquitinierung von ER α und somit verstärkten Transaktivierung von Zielgenen, könnte der Komplex aus CDK9/CyclinT1

(pTEFb-Komplex-*positive transcription elongation factor*) darstellen. Als Cyclin-abhängige Kinase vermittelt CDK9 prinzipiell die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II und überführt diese somit in eine aktiv transkribierende Form (Price, 2000; Larochelle *et al.*, 2012). Im Laufe dieser Arbeit konnte CDK9 als neuer *in vivo* Interaktionspartner von RLIM in Brustkrebszellen identifiziert werden. Interessanterweise konnte für CyclinT1 sowohl eine Interaktion mit Ubiquitin als auch mit ER α aufgezeigt werden. Die spezifische Interaktion von Ubiquitin mit dem C-Terminus von CyclinT1, stellte sich als unerlässlich für eine „stabile“ Interaktion mit Aktivierungsdomänen entsprechender Transkriptionsfaktoren heraus. Je stabiler diese Interaktion ist, desto effizienter wird auch der gesamte pTEFb-Komplex zum Zielgenpromotor rekrutiert und aufgebaut. In diesem Zusammenhang konnte auch ER α als ein weiterer CyclinT1-Interaktionspartner identifiziert werden (Wittmann *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2012).

So könnte es möglich sein, dass (1) die RLIM vermittelte Polyubiquitinierung von ER α eine Rekrutierung des pTEFb-Komplexes zum Zielgenpromotor verstärkt und somit die Elongation der Transkription eingeleitet werden kann, (2) die Rekrutierung von CyclinT1 und dessen Interaktion mit ER α unmittelbar von einer RLIM vermittelten Polyubiquitinierung von ER α abhängig ist, oder (3) RLIM zusätzlich die Ubiquitinierung von CDK9 vermittelt und somit die Rekrutierung von CDK9 ermöglicht.

Letzteres muss in noch weiterführenden Experimenten analysiert werden. Auch ist in diesem Zusammenhang noch nicht überprüft, ob RLIM die Ubiquitinierung von CyclinT1 vermittelt. Denkbar wäre es, dass die CyclinT1-ER α Interaktion von einer RLIM vermittelten CyclinT1-Ubiquitinierung abhängig ist.

Fazit:

RLIM vermittelt die spezifische Polyubiquitinierung von ER α in vitro und in vivo. Die RLIM vermittelte ER α -Polyubiquitinierung mündet nicht in dessen proteasomalen Abbau durch das 26S-Proteasom.

IV.10 Die Rolle von CDK9 in Östrogen-abhängiger Transkription in Brustkrebszellen

Proteinkodierende Gene werden in Eukaryoten ausschließlich von der RNA Polymerase II transkribiert. Hierbei lässt sich die Transkription dieser Gene formal in die drei Schritte *Initiation*, *Elongation* und *Termination* einteilen. Die Initiation wird mit der Bildung des Präinitiationskomplexes, bestehend aus RNA Polymerase II und generelle Transkriptionsfaktoren wie TF_{II}A, TF_{II}B, TF_{II}D, TF_{II}E, TF_{II}F und TF_{II}H eingeleitet (Roeder *et al.*, 1996; Biggin, 2012). Es zeigte sich, dass der frühe Übergang von der Initiation in die Elongation,

mit einer Serin-2 Phosphorylierung der Heptapeptid Sequenzwiederholung (YSPTSPS) der C-terminalen Domäne (CTD) von RNA Polymerase II verbunden ist. Zuständig für diese Hyper-Phosphorylierung ist der aus CDK9/CyclinT1 bestehende Transkriptionsfaktor TF_{II}H (Price, 2000; Larochelle *et al.*, 2012). Somit wird für die produktive Elongationsphase eine inaktive nicht-phosphorylierte RNA-Polymerase II, in eine hyper-phosphorylierte aktiv transkribierende Form überführt. Daher nimmt CDK9 eine Schlüsselfunktion im Übergang des Prä-Initiationskomplexes zum produktiven Elongationskomplex ein. Schlussendlich muss die Transkription noch terminiert werden, wobei eine enge Kopplung der Termination mit der Polyadenylierung des 3'-Endes der prä-mRNA für diesen Vorgang als wesentlich betrachtet wird. Voraussetzung für die Termination ist die Freisetzung des Transkriptes, worauf die Dissoziation der RNA Polymerase II von der DNA erfolgt.

Während dieser Arbeit konnte CDK9 als neuer *in vitro* und *in vivo* Interaktionspartner von RLIM und CLIM2 identifiziert werden. Außerdem kolokalisieren sie in Zellkernen von MCF7 Brustkrebszellen. Für RLIM konnte bislang keine CDK9 Interaktion nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass CDK9-Proteinkonzentrationen über den proteasomalen Abbauweg kontrolliert werden (Kiernan *et al.*, 2001), lässt vermuten das der aktivatorische Einfluss von RLIM auf die ER α gesteuerte Transkription, ebenfalls auf eine RLIM-CDK9 Interaktion zurückzuführen wäre. Die molekulare Funktion der RLIM-CDK9 Interaktion bedarf allerdings, im Kontext der ER α gesteuerten Genexpression in Brustkrebszellen, weiterer Untersuchungen. Im Gegensatz zu RLIM, deckt sich die CLIM2-CDK9 Interaktion mit parallel zu dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass der CLIM2-CDK9-Komplex in erythroiden Vorläuferzellen an der Aufrechterhaltung der Zellen im proliferierenden Stadium beteiligt ist (Meier *et al.*, 2006). Einen funktionellen Zusammenhang der CLIM2-Expression und der Erythropoese zeigten bereits CLIM2^{-/-} *knockout* Mäuse, in denen keine Hämatopoese mehr vorzufinden ist und es somit zu einer frühen embryonalen Letalität der Mäuse kommt (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Da CLIM2-Proteine essentielle Adaptoren in transkriptionellen Multiproteinkomplexen sind, welche u.a. die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen steuern, wird vermutet das CLIM2-Proteine negativ die Aktivität von CDK9 beeinflussen, was sich wiederum negativ auf die Phosphorylierung der RNA Polymerase II auswirkt und somit einen inhibitorischen Einfluss auf die Transkription von Hämatopoese steuernden Genen hat. Auch die Beobachtung das die CLIM2-CDK9 Interaktion während einer induzierten Differenzierung nicht mehr gewährleistet ist, stützen diese Vermutungen (Meier *et al.*, 2006). Dies würde auch erklären, weshalb die CLIM2-Überexpression mit einer Inhibition der Brustzellen-Differenzierung

verbunden ist (Visvader *et al.*, 2003). Auch die direkte Verbindung des pTEFb Komplexes mit transkriptionellen Vorgängen in Brustkrebs wird diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass CyclinT1 mit ER α interagiert und dessen Aktivität positiv beeinflusst (Wittmann *et al.*, 2005; Kapoor-Vazirani *et al.*, 2011). Des Weiteren wird hier die Aktivität des pTEFb Komplexes durch eine Interaktion mit EDG1 (*estrogen down regulated gene*) negativ beeinflusst. Auch eine Interaktion von EDG1 und ER α konnte aufgezeigt werden, wobei diese mit einer Repression der transkriptionellen Aktivität von ER α in Brustkrebszellen verbunden ist (Wittmann *et al.*, 2005).

Den repressorischen Effekt den CLIM2-Proteine in der ER α gesteuerten Transkription vermitteln, konnte ebenfalls für NELF-A (*negative elongation factor*) und Spt5 (DRB *sensitivity inducing factor complex*, DSIF) beobachtet werden. Die Rekrutierung beider Proteine zu Zielgenpromotoren, führt zur Inhibition der CDK9-Aktivität (Aida *et al.*, 2006). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ein weiterer Inhibitor der CDK9-Aktivität, NELF-B, ebenfalls mit ER α interagiert und die Transaktivierung von ER α Zielgenen inhibiert. Ob RLIM und/oder CLIM2 mit NELF-Proteinen oder DSIF interagieren, ist nicht bekannt und bedarf daher, im Kontext der Aktivierung oder Repression von ER α gesteuerter Transkription in Brustkrebszellen, weiterer Untersuchungen.

Fazit: RLIM und CLIM2 interagieren mit CDK9 in vitro und in vivo. Die Mechanismen dieser Interaktionen und der Einfluss auf die ER α gesteuerte Transkription in Brustkrebszellen müssen näher untersucht werden und sind gegenwärtig.

Schlusswort

Ich konnte im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Regulation der Transkription gewinnen und aufzeigen. So konnte ich vor allem neue molekulare Mechanismen der Assemblierung und Dynamik von LIM-HD-Multiproteinkomplexen identifizieren, in denen CLIM-Proteine als positive Koregulatoren eine essentielle Rolle einnehmen. Hierbei regulieren sie mittels Interaktion mit Transkriptionsfaktoren des LIM-HD-Proteinnetzwerkes und SSDP1-Proteinen, die Aktivität der Genexpression. Des Weiteren hat vor allem die proteasomale Kontrolle von intrazellulären Proteinkonzentrationen eine wichtige Funktion in der Genexpression.

Darüber hinaus konnte ich RLIM und CLIM2 als eine neue Klasse von Koregulatoren in ER α vermittelter Transkription in Brustkrebszellen identifizieren. Hierbei werden beide Proteine zu ER α Zielgenpromotoren rekrutiert und implizieren, im Gegensatz zum LIM-HD-Proteinnetzwerk, reziproke Rollen. Auch eine direkte Korrelation der CLIM2-Expression im Zusammenhang mit der ER α -Expression, als ein prognostischer Marker in Brustkrebs, konnte identifiziert werden. Mittels dieser molekularbiologischen Untersuchungen der CLIM2-Funktionen in Brustkrebszellen, konnte CLIM-Proteinen, im Vergleich zum neuronalen LIM-HD-Proteinnetzwerk, eine neue Rolle zugeschrieben werden. Ob CLIM2 den Aufbau von Multiproteinkomplexen ebenfalls im ER α -Transkriptionsnetzwerk vermittelt, wurde nicht analysiert. Auch eine mögliche Funktion von SSDP1 im ER α -Transkriptionsnetzwerk, konnte aus zeitlichen Gründen nicht näher analysiert werden.

Durch die funktionelle Analyse des Einflusses einer ektopischen RLIM-Überexpression auf das ER α -Transkriptionsnetzwerk, konnte ich Hinweise aufzeigen das ER α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* polyubiquitiniert wird, ohne dabei vom 26S-Proteasom prozessiert zu werden.

So könnten als neue Therapieansätze zur Behandlung von Brustkrebs, vor allem die Expression und/oder die Aktivität von RLIM und CLIM2, einen neuen Wirkort von Medikamenten darstellen. Vor allem aber könnte die Ubiquitin-Ligase RLIM, ein attraktives Ziel für die Entwicklung einer neuen Klasse von molekularen Medikamenten (Nutline) sein, welche eine RLIM-ER α Interaktion unterbinden. Die Funktionalität der Nutline konnte im Zusammenhang mit p53 und dessen proteasomalen Kontrolle durch Mdm2, aufgezeigt werden (Vassilev *et al.*, 2004; Impicciatore *et al.*, 2010).

V. ANHANG

V.1 Abkürzungsverzeichnis

V.1.1 Allgemeine Abkürzungen

A, mA	Ampere, Milliampere
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
ca.	circa
Ci, mCi	Curie, Millicurie
cm	centimeter
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
MDa	Megadalton
M, mM, µM	molar, millimolar, mikromolar
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
RT	Raumtemperatur
U	Unit (enzymatische Wirkungseinheit)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

V.1.2 Abkürzungen von Substanzen und Puffern

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo 4-Chloro 3-Inolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DIG	Digoxigenin
dNTPs	Desoxyribonuklein-Triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactosidase
Lys	Lysin
MeOH	Methanol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Phosphat gepufferte Säure
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
³⁵ S	Schwefel-Isotop 35
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

V.1.3. Spezielle Abkürzungen

BRCA1	Breast and ovarian cancer susceptibility gene 1
CBP	CREB-binding protein
CLIM/Ldb1/NLI	Cofactor of LIM-HD proteins
CMV	Cytomegalovirus
DN	dominant negativ
E	Embryonaltag
ER α	Östrogen-Rezeptor alpha
ERE	Östrogen-Rezeptor alpha erkennende Zielsequenz
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin Protein-Ligase
E4	multiubiquitin chain assembly factor
gp	Meerschweinchen
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HECT	Domäne homolog zu E6-AP C-Terminus (nach Hamburger & Hamilton)
IgG	Immunglobulin G

LIM	konserviertes Interaktionsmotiv von Zinkfinger-Proteinen, abgeleitet von <i>Lin11</i> , <i>Isl-1</i> und <i>Mec-3</i>
LIM-HD	LIM Homöodomänen Protein
LMO	LIM- <i>only</i> Proteine
NES	nukleäre Export-Sequenz
NLS	nukleäre Lokalisations-Sequenz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POU	Abkürzung für Pit1, Oct-1/2 und unc86
rab	Kaninchen
RING	Really Interesting New Gene
RLIM	RINGfinger LIM domain-binding protein
RNF12	RINGfinger Protein 12
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAF	TBP-assoziierte Faktoren
TBP	TATA-Bindungsprotein
TF	Transkriptionsfaktor
Ub	Ubiquitin
Ubc/E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
UBL	Ubiquitin ähnliche Moleküle
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

VI. Literaturverzeichnis

- Aberle, H, Bauer A, Stappert, J, Kispert, A, Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16(13): 3797-804.
- Agulnick, AD, Taira, M, Breen, JJ, Tanaka, T, Dawid, IB, Westphal, H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature.* 384: 270-272.
- Ahlgren, U, Pfaff, SL, Jessell, TM, Edlund, T, Edlund, H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature.* 385: 257-260.
- Aida, M, Chen, Y, Nakajima, K, Yamaguchi, Y, Wada, T, Handa, H. (2006). Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Mol. Cell Biol.* 26: 6094-6104.
- Amir, RE, Haecker, H, Karin, M, Ciechanover, A. (2004). Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF (beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene.* 23(14): 2540-7.
- Amoutzias GD, Robertson DL, Van de Peer Y, Oliver SG. (2008). Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends Biochem Sci.* May; 33(5):220-9.
- Anbalagan M, Huderson B, Murphy L, Rowan BG. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal.* 10
- Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. (2005). LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* Jun 1; 65(11):4587-97.
- Atchison ML. (1988). Enhancers: Mechanisms of Action and Cell Specificity. *Annual Review of Cell Biology* Vol. 4: 127-153
- Auwerx, J. (1999). PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia.* (9): 1033-49. Review
- Bach, I, Carriere, C, Ostendorff, HP, Andersen, B, Rosenfeld, MG. (1997). A family of LIM domain associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11: 1370-1380.
- Bach, I, Rodriguez-Esteban, C, Carriere, C, Bhushan, A, Krones, A, Rose, DW, Glass, CK, Andersen, B, Belmonte, JCI, Rosenfeld, MG. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nature Genetics.* 22: 394-399.
- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mechanisms of Development.* 91: 5-17.
- Barretino, D, Vivanco-Ruiz, MdM, Stunnenberg, HG. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J.* 13: 3039-3049
- Barton, HA, Andersen, ME. (1998). Endocrine active compounds: from biology to dose response assessment. *Crit Rev Toxicol.* (4): 363-423. Review.
- Bayarsaihan, D, Soto, RJ, Lukens, LN. (1998). Cloning and characterization of a novel sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein. *Biochem J.* 331(2): 447-52.
- Beal, RE, Toscano-Cantaffa, D, Young, P, Rechsteiner, M, Pickart, CM. (1998). The hydrophobic effect contributes to polyubiquitin chain recognition. *Biochemistry.* 37(9): 2925-34.

- Beck T, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Pollow K, Knapstein PG. (1994). Immunohistochemical detection of hormone receptors in breast carcinomas (ER-ICA, PgR-ICA): prognostic usefulness and comparison with the biochemical radioactive-ligand-binding assay (DCC). *Gynecol Oncol.* May; 53(2):220-7
- Becker-André, M, André, E, DeLamarter, JF. (1993). Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 194(3): 1371-9.
- Becker,T, Ostendorff, HP, Bossenz, M, Schluter, A, Becker, CG, Peirano, RI, Bach, I. (2002). Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafish Development. *Mech Dev.* 117: 75-85.
- Beckmann MW, Niederacher D, Bender HG. (1998). Mechanisms of steroid hormone action and resistance in endometrial and breast cancer. *Eur J Cancer Prev.*; 1: 25-28.
- Beenken, SW, Bland, KI. (2002). Biomarkers for breast cancer. *Minerva Chir.* 57(4): 437-48. Review.
- Bertilsson, G, Heidrich, J, Svensson, K, Asman, M, Jendeberg, L, Sydow-Bäckman, M, Ohlsson, R, Postlind, H, Blomquist, P, Berkenstam, A. (1998). Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(21): 12208-13.
- Bertucci, F, Eisinger, F, Houlgatte, R, Viens, P, Birnbaum, D. (2002). Gene-expression profiling and identification of patients at high risk of breast cancer. *Lancet.* 360(9327): 173-4
- Bettencourt-Dias, M, Giet, R, Sinka, R, Mazumdar, A, Lock, WG., Balloux, F, Zafiroopoulos, PJ, Yamaguchi, S, Winter, S, Carthew, RW, Cooper, M, Jones, D, Frenz, L, Glover, DM. (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature.* 432 (7020): 980-987.
- Bhati M, Lee C, Nancarrow AL, Lee M, Craig VJ, Bach I, Guss JM, Mackay JP, Matthews JM. (2008). Implementing the LIM code: the structural basis for cell type-specific assembly of LIM-homeodomain complexes. *EMBO J.* 27(14): 2018-29.
- Bhati M, Lee C, Gadd MS, Jeffries CM, Kwan A, Whitten AE, Trewhella J, Mackay JP, Matthews JM. (2012). Solution structure of the LIM-homeodomain transcription factor complex Lhx3/Ldb1 and the effects of a pituitary mutation on key Lhx3 interactions. *PLoS One.* 7(7)
- Bieniossek C, Papai G, Schaffitzel C, Garzoni F, Chaillet M, Scheer E, Papadopoulos P, Tora L, Schultz P, Berger I. (2013). The architecture of human general transcription factor TFIID core complex. *Nature.* Jan 6
- Biersack B, Schobert R. (2012). Indole compounds against breast cancer: recent developments. *Curr Drug Targets.* Dec 1; 13(14):1705-19.
- Biggin MD. (2011). Animal transcription networks as highly connected, quantitative continua. *Dev Cell.* Oct 18; 21(4):611-26.
- Blumberg, B, Evans, RM. (1998). Orphan nuclear receptors - new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* 12(20): 3149-55. Review.
- Boehm, T, Lavenir, I, Forster, A, Wadey, RB, Cowell, JK, Harbott, J, Lampert, F, Waters, J, Sherrington, P, Couillin, P. (1988). The T-ALL specific t(11;14)(p13;q11) translocation breakpoint cluster region is located near to the Wilms-tumour predisposition locus. *Oncogene.* 6: 691-5.
- Borden, KL. (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol.* 295(5): 1103-12. Review.
- Børresen-Dale, AL. (2003). Genetic profiling of breast cancer: from molecular portraits to clinical utility. *Int J Biol Markers.* 18(1): 54-6. Review

- Bourgout, W, Ruff, M, Chambon, P, Gronemeyer, H, Moras, D. (1995). Crystalstructure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR. *Nature*. 375: 377-382
- Brent GA. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. Sep 4;122(9):3035-43
- Bronstein R, Levkovitz L, Yosef N, Yanku M, Ruppin E, Sharan R, Westphal H, Oliver B, Segal D. (2010). Transcriptional regulation by CHIP/LDB complexes. *PLoS Genet*. Aug 12;6(8)
- Brzozowski, AM, Pike, AC, Dauter, Z, Hubbard, RE, Bonn, T, Engström, O, Ohman, L, Greene, GL, Gustafsson JA, Carlquist M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 389 (6652): 753-8
- Bucci, B, D'Agnano, I, Botti, C, Mottolese, M, Carico, E, Zupi, G, Vecchione, A. (1997). EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications. *Anticancer Res*. (1B): 769-74.
- Budhidarmo R, Nakatani Y, Day CL. (2012). RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends Biochem Sci*. Feb; 37(2):58-65.
- Burrows JF, Johnston JA. (2012). Regulation of cellular responses by deubiquitinating enzymes: an update. *Front Biosci*. Jan 1;17:1184-200.
- Byford, JR, Shaw, LE, Drew, MG, Pope, GS, Sauer, MJ, Darbre, PD. (2002). Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80(1): 49-60.
- Cantor, AB, Orkin, SH. (2001). Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev*. 11(5): 513-9. Review.
- Carlberg C, Seuter S. (2010). Dynamics of nuclear receptor target gene regulation. *Chromosoma*. Oct; 119(5):479-84
- Cattaruzza, M, Latrich, C, Hecker, M. (2004). Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 43(4): 726-30.
- Chang, C, Da Silva, SL, Ideta, R, Lee, Y, Yeh, S, Burbach, JP. (1994). Human and rat TR4 orphan receptors specify a subclass of the steroid receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(13): 6040-4.
- Chen, JD, Evans, RM. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 377(6548): 454-7.
- Chen JQ, Russo J. (2012). Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. Dec;1826(2):370-84.
- Chen, FE, Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene*. 18(49): 6845-52. Review.
- Chen, L, Segal, D, Hukriede, NA, Podtelejnikov, AV, Bayarsaihan, D, Kennison, JA, Ogryzko, VV, Dawid, IB, Westphal, H. (2002). Ssdp proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 14320-14325.
- Chhangani D, Joshi AP, Mishra A. (2012). E3 ubiquitin ligases in protein quality control mechanism. *Mol Neurobiol*. Jun; 45(3):571-85.
- Cho, KR, Vogelstein, B. (1992). Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer*. 70(6): 1727-31. Review.
- Choo YY, Hagen T. (2012). Mechanism of cullin3 E3 ubiquitin ligase dimerization. *PLoS One*. 7(7):e41350.

- Chrousos, GP, Brandon, D, Renquist, DM, Tomita, M, Johnson, E, Loriaux, DL, Lipsett, MB. (1984). Uterine estrogen and progesterone receptors in an estrogen- and progesterone- "resistant" primate. *J Clin Endocrinol Metab.* 58(3): 516-20.
- Cornelisse, CJ, Cornelis, RS, Devilee, P. (1996). Genes responsible for familial breast cancer. *Pathol Res Pract.* 192(7): 684-93. Review.
- Cuervo, AM, Dice, JF, Knecht, E. (1997). A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J Biol Chem.* 272(9): 5606-15.
- Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11(3): 1025-33.
- Davidoff, AM, Kerns, BJ, Pence, JC, Marks, JR, Iglehart, JD. (1991). p53 alterations in all stages of breast cancer. *J Surg Oncol.* 48(4): 260-7.
- Dawid, IB, Toyama, R, Taira, M. (1995). LIM domain proteins. *C R Acad Sci III.* 318(3): 295-306.
- Dawid, IB, Breen, JJ, Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends in Genetics.* 14: 156-162.
- Delmas, PD, Bjarnason, NH, Mitlak, BH, Ravoux, AC, Shah, AS, Huster, WJ, Draper, M, Christiansen, C. (1997). Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med.*; 337(23): 1641-7.
- DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. (2011). Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin.* Nov-Dec; 61(6):409-18
- Deshaias, RJ. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 435-67. Review.
- Dong JM, Lau LS, Ng YW, Lim L, Manser E. (2009). Paxillin nuclear-cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation of the LD4 motif: evidence that nuclear paxillin promotes cell proliferation. *Biochem J.* Feb 15; 418(1):173-84
- Dover, J, Schneider, J, Tawiah-Boateng, MA, Wood, A, Dean, K, Johnston, M, Shilatifard, A. (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem.* 277: 28368-28371.
- Eakin, CM, Maccoss, MJ, Finney, GL, Kleivit, RE. (2007). Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(14): 5794-9.
- EBCT-Group. (1992). Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 339(8785): 71-85.
- EBCT-Group. (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 351(9114): 1451-67.
- Enkhmandakh, B, Makeyev, AV, Bayarsaihan, D. (2006). The role of the proline-rich domain of Ssdp1 in the modular architecture of the vertebrate head organizer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(31): 11631-6.
- Enmark, E, Gustafsson JA. (1996). Orphan nuclear receptors-the first eight years. *Mol Endocrinol.* 10(11): 1293-307. Review.
- Enmark, E, Pelto-Huikko, M, Grandien, K, Lagercrantz, S, Lagercrantz, J, Fried, G, Nordenskjöld, M, Gustafsson JA. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(12): 4258-65.

- Evans, RM. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240(4854): 889-95.
- Fernandez-Funez, P, Lu, CH, Rincon-Limas, DE, Garcia-Bellido, A, Botas, J. (1998). The relative expression amounts of apterous and its co-factor dLdb/Chip are critical for dorso-ventral compartmentalization in the Drosophila wing. *EMBO J*. 23: 6846-6853.
- Ferraro DA, Gaborit N, Maron R, Cohen-Dvashi H, Porat Z, Pareja F, Lavi S, Lindzen M, Ben-Chetrit N, Sela M, Yarden Y. (2013). Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 14.
- Finley, D., Özkaynak, E., Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*. 48: 1035-1046.
- Fisch P, Boehm T, Lavenir I, Larson T, Arno J, Forster A, Rabbitts TH. (1992). T-cell acute lymphoblastic lymphoma induced in transgenic mice by the RBTN1 and RBTN2 LIM-domain genes. *Oncogene*. Dec; 7(12):2389-97.
- Fisher, B, Costantino, JP, Wickerham, DL, Redmond, CK, Kavanah, M, Cronin, WM, Vogel, V, Robidoux, A, Dimitrov, N, Atkins, J, Daly, M, Wieand, S, Tan-Chiu, E, Ford, L, Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 90(18): 1371-88.
- Freemont, PS. (2000). Ubiquitination: RING for destruction? *Current Biology*. 10: R84-R87.
- Freyd, G, Kim, SK, Horvitz, HR. (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the C. elegans cell lineage gene lin-11. *Nature*. 344(6269): 876-9.
- Fujinami, K, Tanahashi, N, Tanaka, K, Ichihara, A, Cejka, Z, Baumeister, W, Miyawaki, M, Sato, T, Nakagawa, H. (1994). Purification and characterization of the 26s proteasome from spin ach leaves. *J Biol Chem*. 269: 25905-25910.
- Garfinkel, L, Boring, CC, Heath, CW Jr. (1994). Changing trends. An overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer*. 74(1): 222-7.
- Gargano, B, Amente, S, Majello, B, Lania, L. (2007). P-TEFb is a crucial co-factor for Myc transactivation. *Cell Cycle*. 6(16): 2031-7.
- Geng F, Wenzel S, Tansey WP. (2012). Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu Rev Biochem*. 81:177-201.
- Giguère, V, Hollenberg, SM, Rosenfeld, MG, Evans, RM. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 46(5): 645-52.
- Gilbert, SF. (2000). *Developmental Biology*. 6th. Ref Type: Serial (Book)
- Glotzer, M, Murray, AW, Kirschner, MW. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349(6305): 132-8.
- Goder V. (2012). Roles of ubiquitin in endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). *Curr Protein Pept Sci*. Aug; 13(5):425-35.
- Greenblatt, J. (1997). RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 9(3): 310-9. Review.
- Grill, HJ, Knichel, A, Schweikhart, G, Beck, T, Manz, B, Pollow, K. (1985). Characterization of a high-affinity, low-capacity androgen binding protein in human term placental cytosol. *Exp Clin Endocrinol*. 85(3): 331-40.
- Green KA, Carroll JS. (2007). Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat Rev Cancer*. Sep;7(9):713-22.

- Green, S, Walter, P, Kumar, V, Krust, A, Bornert, JM, Argos, P, Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 320(6058): 134-9.
- Green, S, Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet*. 4(11): 309-14. Review.
- Grigorova B, Mara C, Hollender C, Sijacic P, Chen X, Liu Z. (2011). LEUNIG and SEUSS co-repressors regulate miR172 expression in Arabidopsis flowers. *Development*. Jun; 138(12):2451-6.
- Groll M, Potts BC. (2011). Proteasome structure, function, and lessons learned from beta-lactone inhibitors. *Curr Top Med Chem*. Dec; 11(23):2850-78.
- Gronemeyer, H. (1991). Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet*. 25: 89-123. Review.
- Gronemeyer, H, Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile*. 2(11): 1173-308. Review.
- Gronemeyer, H, Moras, D. (1995). Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature*. 375(6528): 190-1.
- Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 6;305(3):709-18.
- Güngör C, Taniguchi-Ishigaki N, Ma H, Drung A, Tursun B, Ostendorff HP, Bossenz M, Becker CG, Becker T, Bach I. (2007). Proteasomal selection of multiprotein complexes recruited by LIM homeodomain transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(38): 15000-5.
- Haas, AL, Rose, I. (1982). The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem*. 257(17): 10329-37.
- Haas, AL, Warms, JV, Hershko, A, Rose, IA. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem*. 257(5): 2543-8.
- Hall, JM, McDonnell, DP. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 140(12): 5566-78.
- Hatfield, PM, Callis, J, Vierstra, RD. (1990). Cloning of ubiquitin activating enzyme from wheat and expression of a functional protein in Escherichia coli. *J Biol Chem*. 15(265): 15813-1587.
- Heinzel, T, Lavinsky, RM, Mullen, TM, Söderstrom, M, Laherty, CD, Torchia, J, Yang, WM, Brard, G, Ngo, SD, Davie, JR, Seto E, Eisenman, RN, Rose, DW, Glass, CK, Rosenfeld, MG. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*. 387(6628): 43-8.
- Hershko, A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci*. 21: 445-449.
- Hershko, A, Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*. 67: 425-479.
- Hester ME, Murtha MJ, Song S, Rao M, Miranda CJ, Meyer K, Tian J, Boulting G, Schaffer DV, Zhu MX, Pfaff SL, Gage FH, Kaspar BK. (2011). Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Mol Ther*. Oct; 19(10):1905-12.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 195-201.
- Hilt, W. (2004). Targets of programmed destruction: a primer to regulatory proteolysis in yeast. *Cell Mol Life Sci*. 61(13): 1615-32.

- Hiratani, I, Yamamoto, N, Mochizuki, T, Ohmori, SY, Taira, M. (2003). Selective degradation of excess Ldb1 by Rnf12/RLIM confers proper Ldb1 expression levels and Xlim-1/Ldb1 stoichiometry in *Xenopus* organizer functions. *Development*. 130: 4161-4175.
- Hirschhorn, JN, Brown, SA, Clark, CD, Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev*. 6(12A): 2288-98.
- Hobert, O und Westphal, H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends in Genetics*. 16: 75-83.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*. 30: 405-439.
- Hochstrasser und Kornitzer. (1998). Ubiquitin-dependent degradation of transcription regulators. *Plenum Press New York*.
- Hoekstra EJ, von Oerthel L, van der Linden AJ, Schellevis RD, Scheppink G, Holstege FC, Groot-Koerkamp MJ, van der Heide LP, Smidt MP. (2013). Lmx1a is an activator of Rgs4 and Grb10 and is responsible for the correct specification of rostral and medial mdDA neurons. *Eur J Neurosci*. Jan; 37(1):23-32
- Hoffmann, A, Levchenko, A, Scott, ML, Baltimore, D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. 298(5596): 1241-5.
- Hoppe, T, Matuschewski, K, Rape, M, Schlenker, S, Ulrich, HD, Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*. 102(5): 577-86.
- Horie, K, Urano, T, Ikeda, K, Inoue, S. (2003). Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 85(2-5): 101-4. Review.
- Horwitz, KB, Jackson, TA, Bain, DL, Richer, JK, Takimoto, GS, Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*. 10(10): 1167-77. Review.
- Hou Y, Moreau F, Chadee K. (2012). PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. *Nat Commun*. Dec 18;3:1300.
- Hörlein, AJ, Näär, AM, Heinzl, T, Torchia, J, Gloss, B, Kurokawa, R, Ryan, A, Kamei, Y, Söderström, M, Glass CK. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377(6548): 397-404.
- Hu, X, Lazar, MA. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*. 402(6757): 93-6.
- Huibregtse, JM, Scheffner, M, Beaudenon, S, Howley, PM. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(7): 2563-7.
- Hwang J, Winkler L, Kalejta RF. (2011). Ubiquitin-independent proteasomal degradation during oncogenic viral infections. *Biochim Biophys Acta*. Dec; 1816(2):147-57.
- Ikeda, TM, Gray, MW. (1999). Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol Cell Biol*. 19(12): 8113-22.
- Imhof, MO, McDonnell, DP. (1996). Yeast RSP5 and its human homolog hRPF1 potentiate hormone-dependent activation of transcription by human progesterone and glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*. 16(6): 2594-605.
- Impicciatore G, Sancilio S, Miscia S, Di Pietro R. (2010). Nutlins and ionizing radiation in cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 16(12):1427-42.
- Ing, NH, Beekman, JM, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW. (1992). Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem*. 267(25): 17617-23.

- Jacq, X, Brou, C, Lutz, Y, Davidson, I, Chambon, P, Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*. 79(1): 107-17.
- Jang JW, Lee WY, Lee JH, Moon SH, Kim CH, Chung HM. (2011). A novel Fbxo25 acts as an E3 ligase for destructing cardiac specific transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 1; 410(2):183-8.
- Järvinen PM, Laiho M. (2012). LIM-domain proteins in transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition and myofibroblast differentiation. *Cell Signal*. Apr;24(4):819-25.
- Jensen, EV, Suzuki, T, Kawashima, T, Stumpf, WE, Jungblut, PW, DeSombre, ER. (1968). A Two-Step Mechanism for the Interaction of Estradiol with Rat Uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 59(2): 632-638.
- Jentsch, S, McGrath, JP, Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*. 329(6135): 131-4.
- Jentsch, S. (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*. 26: 179-207.
- Jiang, F, Basavappa, R. (1999). Crystal structure of the cyclin-specific ubiquitin-conjugating enzyme from clam E2-C at 20 Å resolution. *Biochemistry*. 38: 6471-6478.
- Jiao B, Ma H, Shokhirev MN, Drung A, Yang Q, Shin J, Lu S, Byron M, Kalantry S, Mercurio AM, Lawrence JB, Hoffmann A, Bach I. (2012). Paternal RLIM/Rnf12 is a survival factor for milk-producing alveolar cells. *Cell*. Apr 27; 149(3):630-41
- Johnsen SA, Gungör C, Prenzel T, Riethdorf S, Riethdorf L, Taniguchi-Ishigaki N, Rau T, Tursun B, Furlow JD, Sauter G, Scheffner M, Pantel K, Gannon F, Bach I. (2009). Regulation of estrogen-dependent transcription by the LIM cofactors CLIM and RLIM in breast cancer. *Cancer Res*. 69(1): 128-36.
- Jonathan, EC, Bernhard, EJ, McKenna, WG. (1999). How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol*. 3: 77-83.
- Joazeiro, CAP und Weissman, AM. (2000). RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 102: 549-552.
- Jurata, LW, Kenny, DA, Gill, GN. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 11693-11698.
- Jurata, LW. und Gill, GN. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol. Cell. Biol*. 17: 5688-5698.
- Jurata, LW, Pfaff, SL, Gill, GN. (1998). The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors. *J. Biol. Chem*. 273: 3152-3157.
- Kadmas, JL und Beckerle, MC. (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5: 920-931. Review.
- Kaida D, Schneider-Poetsch T, Yoshida M. (2012). Splicing in oncogenesis and tumor suppression. *Cancer Sci*. Sep; 103(9):1611-6
- Kanarek N, Ben-Neriah Y. (2012). Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs. *Immunol Rev*. Mar; 246(1):77-94
- Kania, A, Johnson, RL, Jessell, TM. (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell*. 102: 161-173.

- Kang, Z, Pirskanen, A, Jänne, OA, Palvimo, JJ. (2002). Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem.* 277(50): 48366-71.
- Kang, RS, Daniels, CM, Francis, SA, Shih, SC, Salerno, WJ, Hicke, L, Radhakrishnan, I. (2003). Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding. *Cell.* 113(5): 621-30.
- Karlsson, O, Thor, S, Norberg, T, Ohlsson, H, Edlund, T. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature.* 344(6269): 879-82.
- Karpiuk O, Najafova Z, Kramer F, Hennion M, Galonska C, König A, Snaidero N, Vogel T, Shchebet A, Begus-Nahrman Y, Kasse M, Simons M, Shcherbata H, Beissbarth T, Johnsen SA. (2012). The histone H2B monoubiquitination regulatory pathway is required for differentiation of multipotent stem cells. *Mol Cell.* Jun 8; 46(5):705-13.
- Keightley, MC. (1998). Steroid receptor isoforms: exception or rule? *Mol Cell Endocrinol.* 137(1): 1-5. Review.
- Khan SH, Awasthi S, Guo C, Goswami D, Ling J, Griffin PR, Simons SS Jr, Kumar R. (2012). Binding of the N-terminal Region of Coactivator TIF2 to the Intrinsically Disordered AF1 Domain of the Glucocorticoid Receptor Is Accompanied by Conformational Reorganizations. *J Biol Chem.* Dec 28; 287(53):44546-60.
- Khurana, T, Khurana, B, Noegel, AA. (2002). LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma.* 219: 1-12. Review.
- Kiefer CM, Lee J, Hou C, Dale RK, Lee YT, Meier ER, Miller JL, Dean A. (2011). Distinct Ldb1/NLI complexes orchestrate γ -globin repression and reactivation through ETO2 in human adult erythroid cells. *Blood.* Dec 1; 118(23):6200-8.
- Kiernan RE, Emiliani S, Nakayama K, Castro A, Labbé JC, Lorca T, Nakayama Ki K, Benkirane M. (2001). Interaction between cyclin T1 and SCF(SKP2) targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol.* Dec; 21(23):7956-70.
- Klinge, CM. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 65(5): 227-51. Review.
- Knabbe, C, Kopp, A, Hilgers, W, Lang, D, Müller, V, Zugmaier, G, Jonat, W. (1996). Regulation and role of TGF beta production in breast cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 784: 263-76.
- Knop, M, Schiffer, HH, Rupp, S, Wolf DH. (1993). Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 5(6): 990-6.
- Koepp, D, Harper, M, Elledge, SJ. (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell.* 97(4): 431-434.
- Kolovos P, Knoch TA, Grosveld FG, Cook PR, Papantonis A. (2012). Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics Chromatin.* Review Jan 9; 5(1):1.
- Komander D, Rape M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem.* 81:203-29.
- Kousteni S, Almeida M, Han L, Bellido T, Jilka RL, Manolagas SC. (2007). Induction of osteoblast differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of the estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* Feb; 27(4):1516-30.
- Kozak, CA, Adamson, MC, Weinberger, C. (1996). Genetic mapping of gene encoding the farnesoid receptor, Fxr, to mouse Chromosome 10. *Mamm Genome.* 7(2): 164-5.
- Kebsregister Deutschland - <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/>

- Kriström B, Zdunek AM, Rydh A, Jonsson H, Sehlin P, Escher SA. (2009). A novel mutation in the LIM homeobox 3 gene is responsible for combined pituitary hormone deficiency, hearing impairment, and vertebral malformations. *J Clin Endocrinol Metab.* Apr; 94(4):1154-61.
- Krust, A, Green, S, Argos, P, Kumar, V, Walter, P, Bornert, JM, Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5(5): 891-7.
- Kumar, MB, Perdew, GH. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr.* 8(5-6): 273-86.
- Kumar R, Thompson EB. (2010). Influence of flanking sequences on signaling between the activation function AF1 and DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor. *Arch Biochem Biophys.* Apr 15; 496(2):140-5
- Lam, YA, Xu, W, DeMartino, GN, Cohen, RE. (1997). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature.* 385: 737-740.
- Laney, JD., Hochstrasser M. (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell.* 97(4): 427-30. Review.
- Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sansó M, Zhang C, Allen JJ, Shokat KM, Bentley DL, Fisher RP. (2012). Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol.* Nov; 19(11):1108-15
- Larson, RC, Lavenir, I, Larson, TA, Baer, R, Warren, AJ, Wadman, I, Nottage, K, Rabbitts, TH. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tall alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 15: 1021-1027.
- Larson, RC, Osada, H, Larson, TA, Lavenir, I, Rabbitts, TH. (1995). The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene.* 11: 853-862.
- Lee JH, Lee MJ. (2012). Emerging roles of the ubiquitin-proteasome system in the steroid receptor signaling. *Arch Pharm Res.* Mar; 35(3):397-407
- Lee MJ, Lee BH, Hanna J, King RW, Finley D. (2011). Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes. *Mol Cell Proteomics.* May;10 (5)
- Lee S, Cuvillier JM, Lee B, Shen R, Lee JW, Lee SK. (2011). Fusion protein Isl1-Lhx3 specifies motor neuron fate by inducing motor neuron genes and concomitantly suppressing the interneuron programs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 28; 109(9):3383-8.
- Lee, TI und Young, RA (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual Review of Genetics.*; 34: 77-137.
- Leitman DC, Paruthiyil S, Vivar OI, Saunier EF, Herber CB, Cohen I, Tagliaferri M, Speed TP. (2010). Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Curr Opin Pharmacol.* Dec;10 (6):629-36.
- Lewin, B (1997). Genes VI. *Oxford University Press* Ref. Type: Serial (Book, Monograph).
- Li A, Ponten F, dos Remedios CG. (2012). The interactome of LIM domain proteins: the contributions of LIM domain proteins to heart failure and heart development. *Proteomics.* Jan; 12(2):203-25
- Li L, Lee JY, Gross J, Song SH, Dean A, Love PE. (2010). A requirement for Lim domain binding protein 1 in erythropoiesis. *J Exp Med.* Nov 22; 207(12):2543-50
- Li, JJ, Rhim, JS, Schlegel, R, Vousden, KH, Colburn NH. (1998). Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene.* 16(21): 2711-21.

- Liebhaber, SA, Emery, JG, Urbanek, M, Wang, X, Cooke, NE. (1990). Characterization of a human cDNA encoding a widely expressed and highly conserved cysteine-rich protein with an unusual zinc finger motif. *Nucl. Acids Res.* 18: 3871-3879.
- Lin, HK, Altuwajjri, S, Lin, WJ, Kan, PY, Collins, LL, Chang, C. (2002). Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 277(39): 36570-6.
- Lin, L, und Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol.* 16: 2248-2254.
- Lin, L, und Kobayashi, M. (2003). Stability of the Rel homology domain is critical for generation of NF-kappa B p50 subunit. *J Biol Chem.* 278: 31479-31485.
- Lipford, JR, Deshaies, RJ. (2003). Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol.* 5(10): 845-50.
- Lipford, JR, Smith, GT, Chi, Y, Deshaies, RJ. (2005). A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature.* 438(7064): 113-6.
- Liu H, Urbé S, Clague MJ. (2012). Selective protein degradation in cell signalling. *Semin Cell Dev Biol.* Jul; 23(5):509-14.
- Lorick, KL, Jensen, JP, Fang, S, Ong, AM, Hatakeyama, S, Weissman, AM. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(20): 11364-9.
- Lucero, P, Penalver, E, Vela, L, Lagunas, R. (2000). Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 182: 241-243.
- Luisi, BF, Xu, WX, Otwinowski, Z, Freedman, LP, Yamamoto, KR, Sigler, PB. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature.* 352(6335): 497-505.
- Lupas, A, Koster, AJ, Baumeister, W. (1993). Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enz. Prot.* 47(4-6): 252-273.
- Luqman S, Pezzuto JM. (2010). NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res.* Jul; 24(7):949-63.
- Ma Y, Fan S, Hu C, Meng Q, Fuqua SA, Pestell RG, Tomita YA, Rosen EM. (2010). BRCA1 regulates acetylation and ubiquitination of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol.* Jan;24 (1):76-90.
- Mangelsdorf, DJ, Evans, RM. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 83(6): 841-50. Review.
- Marshall, NF, Peng, J, Xie, Z, Price, DH. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem.* 271(43): 27176-83.
- Matthews JM, Visvader JE. (2003). LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep.* Dec; 4(12):1132-7.
- Matthews JM, Bhati M, Craig VJ, Deane JE, Jeffries C, Lee C, Nancarrow AL, Ryan DP, Sunde M. (2008). Competition between LIM-binding domains. *Biochem Soc Trans.* Dec;3 6 (Pt 6):1393-7.
- Matthews JM, Lester K, Joseph S, Curtis DJ. (2013). LIM-domain-only proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* Jan 10.

- Matuschewski, K, Hauser, HP, Treier, M, Jentsch, S. (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J Biol Chem.* 271(5): 2789-94.
- May, M, Mengus, G, Lavigne, AC, Chambon, P, Davidson, I. (1996). Human TAF(II28) promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. *EMBO J.* 15(12): 3093-104.
- McEwan, IJ, Dahlgren-Wright, K, Amlöf, T, Ford, J, Wright, AP, Gustafsson, JA. (1995). Mechanisms of transcription activation by nuclear receptors: studies on the human glucocorticoid receptor tau 1 transactivation domain. *Mutat Res.* 333(1-2): 15-22. Review.
- McGrath, JP, Jentsch, S, Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.* 10: 227-236.
- MacGregor, JI, Jordan, VC. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev.* 50(2): 151-96. Review.
- McKenna, NJ, Lanz, RB, O'Malley, BW. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 20(3): 321-44. Review.
- McLachlan, JA, Korach, KS. (1995). Symposium on estrogens in the environment, III. *Environ Health Perspect.* 103(7): 3-4.
- McPherson, M, Elwood, M, English, DR, Baade, PD, Youl, PH, Aitken, JF. (2006). Presentation and detection of invasive melanoma in a high-risk population. *J Am Acad Dermatol.* 54(5): 783-92.
- Meier, N, Krpic, S, Rodriguez, P, Strouboulis, J, Monti, M, Krijgsveld, J, Gering, M, Patient, R, Hostert, A, Grosveld, F. (2006). Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development.* 133(24): 4913-23.
- Menasce, LP, White, GR, Harrison, CJ, Boyle, JM. (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics.* 17(1): 263-5.
- Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci.* Feb 1; 125(Pt 3):531-7.
- Milan, M, Diaz-Benjumea, FJ, Cohen, SM. (1998). Beadex encodes an LMO protein that regulates Apterous LIM-homeodomain activity in Drosophila wing development: a model for LMO oncogene function. *Genes Dev.* 12: 2912-2920.
- Milan, M und Cohen, SM. (1999). Regulation of LIM homeodomain activity in vivo: A tetramer of dLDB and apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. *Mol Cell.* 4: 267-273.
- Mitlak, BH, Cohen, FJ. (1997). In search of optimal long-term female hormone replacement: the potential of selective estrogen receptor modulators. *Horm Res.* 48(4): 155-63.
- Mitra P, Pereira LA, Drabsch Y, Ramsay RG, Gonda TJ. (2012). Estrogen receptor- α recruits P-TEFb to overcome transcriptional pausing in intron 1 of the MYB gene. *Nucleic Acids Res.* Jul; 40(13):5988-6000.
- Métivier, R, Penot, G, Hübner, MR, Reid, G, Brand, H, Kos, M, Gannon, F. (2003). Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell.* 115(6): 751-63.
- Montañez-Wiscovich ME, Seachrist DD, Landis MD, Visvader J, Andersen B, Keri RA. (2009). LMO4 is an essential mediator of ErbB2/HER2/Neu-induced breast cancer cell cycle progression. *Oncogene.* Oct 15; 28(41):3608-18.
- Montañez-Wiscovich ME, Shelton MD, Seachrist DD, Lozada KL, Johnson E, Miedler JD, Abdul-Karim FW, Visvader JE, Keri RA. (2010). Aberrant expression of LMO4 induces centrosome

- amplification and mitotic spindle abnormalities in breast cancer cells. *J Pathol.* Nov; 222(3):271-81.
- Mujtaba T, Dou QP. (2011). Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discov Med.* Dec;12(67)
- Mukhopadhyay, M, Teufel, A, Yamashita, T, Agulnick, AD, Chen, L, Downs, KM, Schindler, A, Grinberg, A, Huang, SP, Dorward, D, Westphal, H. (2003). Functional ablation of the mouse *Ldb1* gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development.* 130: 495-505.
- Muratani, M, Tansey, WP. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Mol Cell Biol.* 4(3): 192-201. Review.
- Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer.* Jul 7; 11(8):558-72.
- Müller L, Xu G, Wells R, Hollenberg CP, Piepersberg W. (1994). LRG1 is expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* and contains motifs similar to LIM and rho/racGAP domains. *Nucleic Acids Res.* Aug 11; 22(15):3151-4.
- Nagy, L, Kao, HY, Chakravarti, D, Lin, RJ, Hassig, CA, Ayer, DE, Schreiber, SL, Evans, RM. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 89(3): 373-80.
- Nakajima, A, Maruyama, S, Bohgaki, M, Miyajima, N, Tsukiyama, T, Sakuragi, N, Hatakeyama, S. (2007). Ligand-dependent transcription of estrogen receptor alpha is mediated by the ubiquitin ligase EFP. *Biochem Biophys Res Commun.* 357(1): 245-51.
- Narkis G, Tzchori I, Cohen T, Holtz A, Wier E, Westphal H. (2012). Isl1 and Ldb co-regulators of transcription are essential early determinants of mouse limb development. *Dev Dyn.* Apr; 241(4):787-91
- Nawaz, Z, Lonard, DM, Smith, CL, Lev-Lehman, E, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW. (1999). The Angelman Syndrome-Associated Protein, E6-AP, Is a Coactivator for the Nuclear Hormone Receptor Superfamily. *Molecular and Cellular Biology.* 19(2): 1182-1189.
- Nawaz, Z, Lonard, DM, Dennis, AP, Smith, CL, O'Malley BW. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 96: 1858-1862.
- Nawaz, Z, O'Malley, BW. (2004). Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *Mol Endocrinol.* 18(3): 493-9. Review.
- Netchine, I, Sobrier, ML, Krude, H, Schnabel, D, Maghnie, M, Marcos, E, Duriez, B, Cacheux, V, Moers, A, Goossens, M, Grüters, A, Amselem, S. (2000). Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet.* 25(2): 182-6.
- Nishioka, N, Nagano, S, Nakayama, R, Kiyonari, H, Ijiri, T, Taniguchi, K, Shawlot, W, Hayashizaki, Y, Westphal, H, Behringer, RR, Matsuda, Y, Sakoda, S, Kondoh, H, Sasaki, H. (2005). *Ssdpl* regulates head morphogenesis of mouse embryos by activating the *Lim1-Ldb1* complex. *Development.* 132(11): 2535-46.
- Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov.* Jan; 3(1):27-41.
- Ohta,T, Michel, JJ, Schottelius, AJ, Xiong, Y. (1999). ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell.* 4: 535-541.
- Osborne, CK. (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat.* 51(3): 227-38. Review.

- Osborne, CK, Fuqua, SA. (1994). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 32(1): 49-55. Review.
- Ostendorff, HP, Peirano, RI, Peters, MA, Schluter, A, Bossenz, M, Scheffner, M, Bach, I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature.* 416: 99-103.
- Oursler, MJ. (1998). Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 8(2): 125-40. Review.
- Oursler, MJ. (1998). Mechanisms of steroid action on osteoclasts and osteoblasts. *Biochem Soc Trans.* 26(1): 33-8.
- Osz J, Brélivet Y, Peluso-Iltis C, Cura V, Eiler S, Ruff M, Bourguet W, Rochel N, Moras D. (2012). Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 6; 109(10):E588-94.
- Özkaynak, E, Finley, D, Varshavsky, A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature.* 312: 663-666.
- Page, AM, Hieter, P. (1999). The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem.* 68: 583-609. Review.
- Pan, Y, Bai, CB, Joyner, AL, Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol.* 26(9): 3365-77.
- Pelzer, T, Shamim, A, Neyses, L. (1996). Estrogen effects in the heart. *Mol Cell Biochem.* 160-161: 307-13. Review.
- Pérez-Alvarado, GC, Miles, C, Michelsen, JW, Louis, HA, Winge, DR, Beckerle, MC, Summers, MF. (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nat Struct Biol.* 1(6): 388-98.
- Peters, JM, Cejka, Z, Harris, JR, Kleinschmidt, JA, Baumeister, W. (1993). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol.* 234: 932-937.
- Peterson TJ, Karmakar S, Pace MC, Gao T, Smith CL. (2007). The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) corepressor is required for full estrogen receptor alpha transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* Sep; 27(17):5933-48.
- Pfaff, SL, Mendelsohn, M, Stewart, CL, Edlund, T, Jessell, TM. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell.* 26: 309-320.
- Pickart, CM. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Rev of Biochemistry.* 70: 503-533.
- Pickart, CM. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell.* 116: 181-190.
- Pickering AM, Davies KJ. (2012). Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 109:227-48.
- Pike, AC, Brzozowski, AM, Walton, J, Hubbard, RE, Thorsell, AG, Li, YL, Gustafsson, JA, Carlquist, M. (2001). Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure.* 9(2): 145-53.
- Pissios, P, Tzamelis, I, Kushner, P, Moore, DD. (2000). Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol Cell.* 6(2): 245-53.
- Piwko, W, Jentsch, S. (2006). Proteasome-mediated protein processing by bidirectional degradation initiated from an internal site. *Nat Struct Mol Biol.* 13(8): 691-7.

- Plempner, RK und Wolf, DH (1999). Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 24: 266-270.
- Porter, FD, Drago, J, Xu, Y, Cheema, SS, Wassif, C, Huang, SP, Lee, E, Grinberg, A, Massalas, JS, Bodine, D, Alt, F, Westphal, H. (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development.* 124: 2935-2944.
- Po'uha ST, Shum MS, Goebel A, Bernard O, Kavallaris M. (2010). LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene.* Jan 28; 29(4):597-607
- Pratt, WB, Toft, DO. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 18(3): 306-60.
- Prenzel T, Begus-Nahrman Y, Kramer F, Hennion M, Hsu C, Gorsler T, Hintermair C, Eick D, Kremmer E, Simons M, Beissbarth T, Johnsen SA. (2011). Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res.* Sep 1; 71(17):5739-53
- Price, DH. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 20(8): 2629-34. Review.
- Rabbitts, TH. (1998). LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev.* 12: 2651-2657.
- Rape M, Jentsch S. (2004). Productive RUPTure: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta.* Nov 29;1695(1-3):209-13.
- Reid, G, Hübner, MR, Métivier, R, Brand, H, Denger, S, Manu, D, Beaudouin, J, Ellenberg, J, Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell.* 11(3): 695-707.
- Remmele, W, Stegner, HE. (1987). Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 8(3): 138-40.
- Renaud, JP, Rochel, N, Ruff, M, Vivat, V, Chambon, P, Gronemeyer, H, Moras, D. (1995). Crystal structure of the RARγ ligand-binding domain bound to *all-trans* retinoic acid. *Nature.* 378: 681-689.
- Reynaud R, Castinetti F, Galon-Faure N, Albarel-Loy F, Saveanu A, Quantien MH, Jullien N, Khammar A, Enjalbert A, Barlier A, Brue T. (2011). Genetic aspects of growth hormone deficiency. *Arch Pediatr.* Jun;18(6):696-706
- Robyr, D, Wolffe, AP, Wahli, W. (2000). Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol.* 14(3): 329-47. Review.
- Rocheftort, H. (1991). Mechanism of the overexpression of the cathepsin D gene in breast cancer and consequences in the metastatic process. *C R Seances Soc Biol Fil.* 185(6): 415-21. Review.
- Rocheftort, H. (1995). Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. *Ciba Found Symp.* 191: 254-65. Review.
- Rock, KL, Gramm, C, Rothstein, L, Clark, K, Stein, R, Dick, L, Hwang, D, Goldberg, AL. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78(5): 767-71.
- Roeder, RG. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* 21(9): 327-35. Review.

- Rotin, D, Staub, O, Haguenauer-Tsapis, R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol.* 176: 1-17.
- Römer, T, Lober, R, Göretzlehner, G, Bojahr, B. (1992). Uterine abnormality and fallopian tube damage-surgical correction in one session? *Zentralbl Gynakol.* 114(10): 486-90.
- Ryan, AK und Rosenfeld, MG. (1997). POU domain family values: Flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev.* 11: 1207-1225.
- Sadovsky, Y, Webb, P, Lopez, G, Baxter, JD, Fitzpatrick, PM, Gizang-Ginsberg, E, Cavailles, V, Parker, MG, Kushner, PJ. (1995). Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol.* 3: 1554-63.
- Saji, S, Okumura, N, Eguchi, H, Nakashima, S, Suzuki, A, Toi, M, Nozawa, Y, Saji, S, Hayashi, S. (2001). MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 281(1): 259-65.
- Salghetti, SE, Muratani, M, Wijnen, H, Futcher, B, Tansey, WP. (2000). Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(7): 3118-3123.
- Sanchezgarcia, I und Rabbitts, TH. (1994). The Lim Domain - A New Structural Motif Found in Zinc-Finger-Like Proteins. *Trends in Genetics.* 10: 315-320.
- Sande, S, Privalsky, ML. (1996). Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol.* 10(7): 813-25.
- Sauer, F, Hansen, SK, Tjian, R. (1995). Multiple TAFIIs directing synergistic activation of transcription. *Science.* 270(5243): 1783-8.
- Schmeichel, KL und Beckerle, MC. (1994). The Lim Domain Is A Modular Protein-Binding Interface. *Cell.* 79: 211-219.
- Schmidt-Matthiesen, A. (2000). Primary lymphoma of the stomach. An interdisciplinary challenge. *Zentralbl Chir.* 125(4): 326-32. Review.
- Schön, D, Bertz, J, Görsch, B, Haberland, J, Kurth, BM. (2002). Federal Cancer Reporting Unit. Surveillance program for cancer registration in Germany. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz.* ISSN1436-9990: 1437-1588.
- Schulman BA, Harper JW. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* May; 10(5):319-31.
- Schulman BA. (2011). Twists and turns in ubiquitin-like protein conjugation cascades. *Protein Sci.* Dec; 20(12):1941-54.
- Sharma, K, Sheng, HZ, Lettieri, K, Li, H, Karavanov, A, Potter, S, Westphal, H, Pfaff, SL. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell.* 95: 817-828.
- Sheng, HZ, Zhadanov, AB, Mosinger, B, Fujii, T, Bertuzzi, S, Grinberg, A, Lee, EJ, Huang, SP, Mahon, KA, Westphal, H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science.* 272: 1004-1007.
- Shiau, AK, Barstad, D, Loria, PM, Cheng, L, Kushner, PJ, Agard, DA, Greene, GL. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell.* 95(7): 927-37.
- Shilatifard, A, Conaway, RC, Conaway, JW. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem.* 72: 693-715. Review.

- Shin J, Bossenz M, Chung Y, Ma H, Byron M, Taniguchi-Ishigaki N, Zhu X, Jiao B, Hall LL, Green MR, Jones SN, Hermans-Borgmeyer I, Lawrence JB, Bach I. (2010). Maternal Rnf12/RLIM is required for imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Nature*. 467(7318): 977-81
- Singh RR, Barnes CJ, Talukder AH, Fuqua SA, Kumar R. (2005). Negative regulation of estrogen receptor alpha transactivation functions by LIM domain only 4 protein. *Cancer Res*. Nov 15; 65(22):10594-601.
- Sommer, T, Wolf, DH. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return *FASEB J*. 11: 1227-1233.
- Spence, J, Sadis, S, Haas, AL, Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*. 15(3): 1265-73.
- Spencer, TE, Jenster, G, Burcin, MM, Allis, CD, Zhou, J, Mizzen, CA, McKenna, NJ, Onate, SA, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*. 389 (6647): 194-8.
- Sridhar VV, Surendrarao A, Gonzalez D, Conlan RS, Liu Z. (2004). Transcriptional repression of target genes by LEUNIG and SEUSS, two interacting regulatory proteins for Arabidopsis flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 3;101 (31):11494-9.
- Stoltze, L, Nussbaum, AK, Sijts, A, Emmerich, NP, Kloetzel, PM, Schild, H. (2000). The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunol Today*. 21: 317-319.
- Su, K, Roos, MD, Yang, X, Han, I, Paterson, AJ, Kudlow, JE. (1999). An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro. *J Biol Chem*. 274(21): 15194-202.
- Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, Collins RE, Sharma D, Peng J, Cheng X, Vertino PM. (2008). Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell*. May 9; 30(3):336-47
- Sun, ZW, Allis, CD. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*. 418: 104-108.
- Tajima T, Hattori T, Nakajima T, Okuhara K, Tsubaki J, Fujieda K. (2007). A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. *Endocr J*. Aug; 54(4):637-41.
- Takeshita, A, Yen, PM, Misiti, S, Cardona, GR, Liu, Y, Chin, WW. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*. 137 (8): 3594-7.
- Tanaka K, Mizushima T, Saeki Y. (2012). The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol Chem*. Apr; 393(4):217-34.
- Tang, Z, Li, B, Bharadwaj, R, Zhu, H, Ozkan, E, Hakala, K, Deisenhofer, J, Yu, H. (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell*. 12: 3839-3851.
- Teufel A, Maass T, Strand S, Kanzler S, Galante T, Becker K, Strand D, Biesterfeld S, Westphal H, Galle PR. (2010). Liver-specific Ldb1 deletion results in enhanced liver cancer development. *J Hepatol*. Dec; 53(6):1078-84.
- Thaler, JP, Lee, SK, Jurata, LW, Gill, GN, Pfaff, SL. (2002). LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell*. 110: 237-249.

- Tian, H, Jeong, J, Harfe, BD, Tabin, CJ, McMahon, AP. (2005). Mouse *Displ* is required in sonic hedgehog-expressing cells for paracrine activity of the cholesterol-modified ligand. *Development*. 132(1): 133-42.
- Tiyerili V, Müller CF, Fung S, Panek D, Nickenig G, Becher UM. (2012). Estrogen improves vascular function via peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ . *J Mol Cell Cardiol*. Aug;53(2):268
- Tora, L, White, J, Brou, C, Tasset, D, Webster, N, Scheer, E, Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 59(3): 477-87.
- Turbin, DA, Cheang, MC, Bajdik, CD, Gelmon, KA, Yorida, E, De Luca, A, Nielsen, TO, Huntsman, DG, Gilks CB. (2006). MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma. *Mod Pathol*. 19(1): 69-74.
- Tursun, B, Schlüter, A, Peters, MA, Viehweger, B, Ostendorff, HP, Soosairajah, J, Drung, A, Bossenz, M, Johnsen, SA, Schweizer, M, Bernard, O, Bach, I. (2005). The ubiquitin ligase *Rnf6* regulates local LIM kinase 1 levels in axonal growth cones. *Genes Dev*. 19: 2307-19.
- Umayahara, Y, Kawamori, R, Watada, H, Imano, E, Iwama, N, Morishima, T, Yamasaki, Y, Kajimoto, Y, Kamada, T. (1994). Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem*. 269(23): 16433-42.
- van Meyel, DJ, O'Keefe, DD, Jurata, LW, Thor, S, Gill, GN, Thomas, JB. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. *Mol Cell*. 4(2): 259-65.
- van Meyel, DJ, Thomas, JB, Agulnick, AD. (2003). Ssdp proteins bind to LIM-interacting co-factors and regulate the activity of LIM-homeodomain protein complexes in vivo. *Development*. 130: 1915-1925.
- Vassilev, LT, Vu, BT, Graves, B, Carvajal, D, Podlaski, F, Filipovic, Z, Kong, N, Kammlott, N, Lukacs, C, Klein, C, Fotouhi, N, Liu, EA. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 303: 844-848.
- Verrijzer, CP, Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci*. 21(9): 338-42. Review.
- Visvader, JE, Mao, X, Fujiwara, Y, Hahm, K, Orkin, SH. (1997). The LIM-domain binding protein *Ldb1* and its partner *LMO2* act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 13707-13712.
- Visvader, JE, Venter, D, Hahm, K, Santamaria, M, Sum, EYM, O'Reilly, L, White, D, Williams, R, Armes, J, Lindeman, GJ. (2001). The LIM domain gene *LMO4* inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 14452-58.
- Vodermaier, HC. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol*. 14: 787-796.
- Wadman, IA, Osada, H, Grütz, GG, Agulnick, AD, Westphal, H, Forster, A, Rabbitts, TH. (1997). The LIM-only protein *Lmo2* is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the *TAL1*, *E47*, *GATA-1* and *Ldb1/NLI* proteins. *EMBO J*. 16(11): 3145-57.
- Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. (2012).The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*. Nov;33 (11):2007-17
- Walker, RA, Dearing, SJ. (1999). Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 53(2): 167-76.

- Walz, J, Erdmann, A, Kania, M, Typke, D, Koster, AJ, Baumeister, W. (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol.* 121(1): 19-29.
- Wang-Gohrke, S, Becher, H, Kreienberg, R, Runnebaum, IB, Chang-Claude, J. (2002). Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics.* 12(3): 269-72.
- Wang, H, Huang, ZQ, Xia, L, Feng, Q, Erdjument-Bromage, H, Strahl, BD, Briggs, SD, Allis, CD, Wong, J, Tempst, P, Zhang, Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science.* 293(5531): 853-7.
- Wang, N, Lin, KK, Lu, Z, Lam, KS, Newton, R, Xu, X, Yu, Z, Gill, GN, Andersen, B. (2007). The LIM-only factor LMO4 regulates expression of the BMP7 gene through an HDAC2-dependent mechanism, and controls cell proliferation and apoptosis of mammary epithelial cells. *Oncogene.* 26(44): 6431-41.
- Warren, AJ, Colledge, WH, Carlton, MB, Evans, MJ, Smith, AJ, Rabbitts, TH. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell.* 78: 45-57.
- Weihe, U, Milán, M, Cohen, SM. (2001). Regulation of Apterous activity in Drosophila wing development. *Development.* 128(22): 4615-22.
- Weissman, AM. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2: 169-178.
- Weisz, A, Bresciani, F. (1993). Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Crit Rev Oncog.* 4(4): 361-88. Review.
- Wenzel DM, Stoll KE, Klevit RE. (2011). E2s: structurally economical and functionally replete. *Biochem J.* Jan 1; 433(1):31-42.
- Wilkinson, KD. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 11: 1245-1256.
- Wilkinson-White L, Gamsjaeger R, Dastmalchi S, Wienert B, Stokes PH, Crossley M, Mackay JP, Matthews JM. (2011). Structural basis of simultaneous recruitment of the transcriptional regulators LMO2 and FOG1/ZFPM1 by the transcription factor GATA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 30; 108(35):14443-8.
- Williams CC, Basu A, El-Gharbawy A, Carrier LM, Smith CL, Rowan BG. (2009). Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor alpha: impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC Biochem.* Dec 31; 10:36.
- Wittmann, BM, Fujinaga, K, Deng, H, Ogba, N, Montano, MM. (2005). The breast cell growth inhibitor, estrogen down regulated gene 1, modulates a novel functional interaction between estrogen receptor alpha and transcriptional elongation factor cyclin T1. *Oncogene.* 24(36): 5576-88.
- Wolf IM, Heitzer MD, Grubisha M, DeFranco DB. (2008). Coactivators and nuclear receptor transactivation. *J Cell Biochem.* Aug 1;104(5):
- Wu, L. (2006). Structure and functional characterization of single-strand DNA binding protein SSDP1: carboxyl-terminal of SSDP1 has transcription activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 339(3): 977-84.
- Wu Y, Kawate H, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R. (2006). Nuclear compartmentalization of N-CoR and its interactions with steroid receptors. *Mol Cell Biol.* Sep; 26(17):6633-55.
- Wurtz JM, Bourguet, JP, Renaud, JP, Vivat, V, Chambon, P, Moras, D, Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* 3: 87-94.

- Xu W, Lukkarila JL, da Silva SR, Lynn-Pavia S, Gunning PT, Schimmer AD. (2012). Targeting the ubiquitin E1 as a novel anti-cancer strategy. *Curr Pharm Des.* Nov 2
- Xu Z, Meng X, Cai Y, Liang H, Nagarajan L, Brandt SJ. (2007). Single-stranded DNA-binding proteins regulate the abundance of LIM domain and LIM domain-binding proteins. *Genes Dev.* Apr 15; 21(8):942-55.
- Yamanaka, A, Hatakeyama, S, Kominami, K, Kitagawa, M, Matsumoto, M, Nakayama, K. (2000). Cell cycle-dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Mol Biol Cell.* 11: 2821-2831.
- Yamano, H, Tsurumi, C, Gannon, J, Hunt, T. (1998). The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *EMBO J.* 17: 5670-5678.
- Yang, H, Cromley, D, Wang, H, Billheimer, JT, Sturley, SL. (1997). Functional expression of a cDNA to human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in yeast. Species-dependent substrate specificity and inhibitor sensitivity. *J Biol Chem.* 272(7): 3980-5.
- Yankulov, K, Blau, J, Purton, T, Roberts, S, Bentley, DL. (1994). Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell.* 77(5): 749-59.
- Yee D, Goring DR. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J Exp Bot.* 60(4):1109-21.
- Yoshimura, T, Kameyama, K, Takagi, T, Ikai, A, Tokunaga, F, Koide, T, Tanahashi, N, Tamura, T, Cejka, Z, Baumeister, W. (1993). Molecular characterization of the 26S proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol.* 111: 200-211.
- Yudkovsky, N, Ranish, JA, Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature.* 408(6809): 225-9.
- Zavrski, I, Jakob, C, Schmid, P, Krebbel, H, Kaiser, M, Fleissner, C, Rosche, M, Possinger, K, Sezer, O. (2005). Proteasome: an emerging target for cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 16(5): 475-81. Review.
- Zawel L, Kumar, KP, Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 9(12): 1479-90.
- Zhang H, Wang WP, Guo T, Yang JC, Chen P, Ma KT, Guan YF, Zhou CY. (2009). The LIM-homeodomain protein ISL1 activates insulin gene promoter directly through synergy with BETA2. *J Mol Biol.* Sep 25; 392(3):566-77.
- Zhang QG, Han D, Wang RM, Dong Y, Yang F, Vadlamudi RK, Brann DW. (2011). C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)-mediated degradation of hippocampal estrogen receptor-alpha and the critical period hypothesis of estrogen neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 30; 108(35):E617-24.
- Zheng, N, Schulman, BA, Song, L, Miller, JJ, Jeffrey, PD, Wang, P, Chu, C, Koepp, DM, Elledge, SJ, Pagano, M. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature.* 416: 703-709.
- Zheng Q and Zhao Y. (2007). The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol. Cell.* 99, 489-502
- Zhong Z, Ma H, Taniguchi-Ishigaki N, Nagarajan L, Becker CG, Bach I, Becker T. (2011). SSDP cofactors regulate neural patterning and differentiation of specific axonal projections. *Dev Biol.* Jan 15; 349(2):213-24.
- Zhu, Y, Pe'ery, T, Peng, J, Ramanathan, Y, Marshall, N, Marshall, T, Amendt, B, Mathews, MB, Price, DH. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* 11(20): 2622-32.
- Zugmaier, G, Lippman, ME. (1990). Effects of TGF beta on normal and malignant mammary epithelium. *Ann N Y Acad Sci.* 593: 272-5.

Mein erster herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Ingolf Bach für die Bereitstellung der interessanten Themen und die Möglichkeit diese Dissertation in seinen Laboreinrichtungen durchführen zu können. Sein großes Interesse an den aktuellen Ergebnissen, die stete Diskussionsbereitschaft und seine fachlichen Anregungen, waren für diese Arbeit sehr hilfreich und wissenschaftlich förderlich.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, der mich in meiner wissenschaftlichen Laufbahn über viele Jahre hinweg begleitet hat, sei herzlich gedankt für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Allen meinen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bach danke ich für die stets kompetente Zusammenarbeit und für eine unvergessliche Atmosphäre im Labor. Hierbei gilt ein besonderer Dank Prof. Dr. Steven Johnsen, der mein wissenschaftliches Interesse bereichert und meine Motivation durch viele kritische Diskussionen und experimentellen Anregungen gesteigert hat. Micky und Birte möchte ich herzlich für die Abnahme von zeitlich anspruchsvollen Labortätigkeiten danken. Meinen Labortischnachbarn „Werder“ Marvin und Köörstiin möchte ich für die vielen spaßigen Momente im Labor danken. Auch bei Heather und Michi möchte ich mich für eine schöne Zusammenarbeit bedanken.

Allen anderen Mitarbeitern benachbarter Forschungsgruppen, besonders meinem rumänischen Kollegen Tudor, sei gedankt für viele nette Momente in unseren Gemeinschaftsräumen. Bei „Jackson“ Baris und „Pauli“ Alex möchte ich mich nicht nur für viele wissenschaftliche Diskussionen und Vorschläge bedanken, sondern auch für die über den gesamten Zeitraum meiner Arbeit stattgefundenen Begleitung in Hamburg und den USA. Nicht zuletzt auch dafür, dass die Dreier-WG in den USA eine angenehme, lustige und sehr abwechslungsreiche Atmosphäre zum Laboralltag darstellte.

Meinen amerikanischen Laborkollegen Naoko und Hong möchte ich für die Begleitung und Bewältigung vieler Experimente herzlich danken. Auch Shao-Lei möchte ich für die produktive Zusammenarbeit und dem *know-how* in der Durchführung von immunhistochemischen Experimenten danken.

Dem EMBL/EMBO, bzw. Prof. Dr. Frank Gannon sei ebenfalls gedankt für den Erhalt eines Forschungs-Stipendiums, welches mir die Möglichkeit gab, meine wissenschaftliche Expertise weiter zu vertiefen.

Meiner Mutter, Schwester und meinem Bruder gilt ein herzlichster und liebevoller Dank, da sie mir überhaupt das Biologie Studium und die Promotion ermöglicht haben! Viele Momente

Danksagung

in diesen für mich sehr wichtigen Jahren erinnerten und erinnern mich daran, wie wertvoll es ist, eine liebevolle Familie zu haben, die mir in sowohl leichten als auch schwierigen Situationen immer zur Seite steht und mir viel Kraft gegeben hat diesen Weg zu gehen. Auch das von ihnen mir entgegenbrachte Vertrauen war und ist eine sehr große Hilfe in meinem Leben.

Bei meiner Frau Maria möchte ich mich hier für ihre Unterstützung, Opferbereitschaft und Geduld ganz herzlich bedanken. Auch für ihr Vertrauen und ihre moralische Unterstützung bei der Bewältigung meines USA Aufenthaltes, gilt ein großer Dank. Nicht zuletzt möchte ich mich vor allem für ihre Liebe bedanken, aus der ich die benötigte Energie schöpfe, die ich in diesen Phasen meines Lebens brauche.