

Funktionelle Charakterisierung von CREM-Isoformen in männlichen Keimzellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Saskia Jaspers gen. Bünger

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann
und der
Klinik für Urologie und Kinderurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. K. Steger

Funktionelle Charakterisierung von CREM-Isoformen in männlichen Keimzellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Saskia Jaspers gen. Bünger
Tierärztin aus Münster

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann

Prof. Dr. K. Steger

Tag der Disputation: 20.12.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ZIELE	9
2. LITERATURÜBERSICHT.....	12
2.1 Histologie und Funktion des Hodens	12
2.2 Spermatogenese	13
2.3 Regulation der Spermatogenese.....	15
2.4 Regulation der Genexpression über Transkriptionsfaktoren	16
2.5 Regulation der Genexpression durch den Transkriptionsfaktor CREM	16
2.6 CREM-Gen und daraus entstehende Isoformen	20
2.7 Rolle von CREM in der Spermatogenese.....	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 Gewinnung der CREM-Isoformen	25
3.1.1 Differenzierung der CREM-Isoformen	26
3.1.1.1 RT-PCR.....	26
3.1.1.2 PCR	27
3.1.1.3 Agarosegelelektrophorese	28
3.1.1.4 Detektion	29
3.1.1.5 Extraktion der CREM-cDNA aus dem Agarosegel	30
3.1.2 Konservierung und Vervielfältigung der CREM-cDNA.....	30
3.1.2.1 Klonierung der CREM-cDNA in Plasmide.....	30
3.1.2.2 Transformation der rekombinanten Plasmide in <i>E. coli</i>	31
3.1.2.3 Anzucht der Bakterien.....	31
3.1.2.4 Plasmidisolierung	31
3.1.2.5 Verifizierung des Inserts durch Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide	32
3.1.2.6 Sequenzierung der CREM-cDNA	33
3.2 Vorbereitungen zur Klonierung und Klonierung der CREM-cDNA in einen Expressionsvektor	33
3.2.1 Vorbereitung des Expressionsvektors	33
3.2.1.1 Restriktionsverdau des Expressionsvektors	33
3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese, Detektion und Extraktion des linearisierten Expressionsvektors aus dem Agarosegel	34
3.2.2 Vorbereitung der CREM-cDNA	35
3.2.2.1 Quantifizierung der Plasmid-DNA.....	35

3.2.2.2 PCR	35
3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese, Detektion und Extraktion der CREM-cDNA aus dem Agarosegel	36
3.2.2.4 Restriktionsverdau der PCR-Produkte	36
3.2.2.5 Agarosegelelektrophorese, Detektion und Extraktion der CREM-cDNA aus dem Agarosegel	37
3.2.3 Klonierung der CREM-cDNA in den Expressionsvektor	37
3.2.3.1 Klonierung der CREM-cDNA in den Expressionsvektor	37
3.2.3.2 Transformation der rekombinanten Plasmide in <i>E. coli</i>	38
3.2.3.3 Anzucht der Bakterien	39
3.2.3.4 Plasmidisolierung	39
3.2.3.5 Verifizierung des Inserts durch Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide	40
3.2.3.6 Sequenzierung der CREM-cDNA	40
3.3 Sequenzanalyse	41
3.4 Gewinnung der Proteine in-vitro	41
3.4.1 Vorbereitung der Plasmidproben	41
3.4.1.1 Plasmidfällung	41
3.4.1.2 Quantifizierung der Plasmid-DNA	42
3.4.1.3 Reinigung der Plasmidproben	42
3.4.2 In-vitro Transkription/Translation	43
3.5 Nachweis der gewonnenen Proteine mittels Western Blotting	43
3.5.1 Probenvorbereitung	43
3.5.2 Gelelektrophorese	44
3.5.3 Transfer	44
3.5.4 Nachweisreaktion	45
3.5.5 Visualisierung	47
3.6 Nachweis der Sequenzspezifischen Bindung der gewonnenen Proteine an DNA mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	47
3.6.1 Hybridisierung der Oligonucleotide	48
3.6.2 Herstellung eines 4 % Polyacrylamidgels	49
3.6.3 EMSA	50
3.6.4 Visualisierung	53
3.7 Nachweis der funktionellen Aktivität der Proteine in-vivo mittels Luziferase-Reportergen-Analyse	53
3.7.1 Kultivierung von SKUT-1B Zellen	54
3.7.2 Aussäen von SKUT-1B Zellen für die Transfektion	55
3.7.3 Transfektion von SKUT-1B Zellen	55
3.7.4 Luziferase-Reportergen-Analyse	58
4. ERGEBNISSE	60
4.1 Sequenzanalyse	60

4.2 Nachweis der gewonnenen Proteine mittels Western Blotting.....	62
4.3 Nachweis der Sequenzspezifischen Bindung der gewonnenen Proteine an DNA mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	64
4.4 Nachweis der funktionellen Aktivität der Proteine in-vivo mittels Luziferase- Reportergen-Analyse.....	68
5. DISKUSSION.....	71
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	75
7. SUMMARY	77
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	78
9. ANHANG	84

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (doppelt destilliertes Wasser)
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunoglobulin G
kb	Kilobasen
LB	Luria broth
M	molar
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
p.a.	pro analysi
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuclease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TBS	tris buffered saline (Trisgepufferte Salzlösung)

Abkürzungsverzeichnis

TBST	TBS mit Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

1. EINLEITUNG UND ZIELE

Über die formale und morphologische Genese von befruchtungsfähigen Spermien sowie die neurohumoralen (hormonellen) Regulations- und Steuerungsmechanismen in der Spermatogenese existieren heute weitreichende Kenntnisse.

Bei zwei Drittel aller andrologischen Erkrankungen, die mit Fertilitätsstörungen oder einer Infertilität einhergehen, lassen sich differenzierte Ursachen eruieren.

Kausal sind Erkrankungen an den Organen der Samendisposition z.B. durch Tumore, entzündliche Veränderungen, Umwelttoxinen, hormonelle Störungen sowie immunologische Prozesse bekannt (Neesen, 1999; Schuppe et al., 1999).

Für die Beurteilung qualitativer und quantitativer Veränderungen stehen in der diagnostischen Routine das Spermogramm, die Hodenbiopsie (Bergmann, 2006) und laborchemische Untersuchungsmethoden (Bergmann et al, 1994) zur Verfügung. Zur Erweiterung unseres Verständnisses individueller Infertilitätsprobleme, die auf Störungen der genetischen Regulationsmechanismen zurückgeführt werden können (Mak u. Jarvi, 1996; Neesen, 1999; Vogt, 1997) werden daneben in jüngerer Zeit in zunehmendem Maße molekularbiologische Untersuchungsmethoden eingesetzt. Die Regulationsabläufe der Spermatogenese mit ihren genetischen Steuerungsmechanismen sind aber noch nicht vollständig geklärt.

Während der Spermatogenese ist für die terminale Differenzierung befruchtungsfähiger Spermien die korrekte sequentielle Genexpression in den Keimzellen eine *conditio sine qua non*. Über drei Entwicklungsphasen entstehen aus den Stammzellen der Spermatogenese, den Spermatogonien, durch komplexe Zellproliferations- und differenzierungsprozesse, reife Spermatozoen (Steger, 2001a). Die ersten beiden Phasen bestehen aus der mitotischen und meiotischen Vermehrungsphase. In der sich anschließenden Differenzierungsphase, der Spermio-genese, vollziehen sich an den haploiden Spermatozoen morphologische, biochemische und physiologische Prozesse, die reife Spermatozoen hervorgehen lassen (Bergmann, 1998; Steger, 1999). Die Expression von Genen, die für benötigte Proteine kodieren, unterliegt regulatorischen Mechanismen (Eddy, 1998). Die Regulation der Transkription von Genen in einer Zelle erfolgt über eine Kontrollregion auf der DNA nahe des Transkriptionsstartpunktes (Foulkes u. Sassone-Corsi, 1992). Transkriptionsfaktoren erkennen kurze, aus einer spezifischen Sequenz bestehende DNA-Abschnitte in der

Promotorregion von Genen, an die sie zu binden vermögen und somit die Initiation der Transkription durch die RNA Polymerase aktivieren oder reprimieren können (De Cesare u. Sassone-Corsi, 2000; Goldberg, 1996).

Zur Regulation der mRNA-Expression in Spermatozyten kommt dem Transkriptionsfaktor cyclic AMP-responsive element modulator (CREM) eine besondere Bedeutung zu (Lalli et al., 2006; Walker u. Habener, 1996). Über den Adenylatzyklase-Signaltransduktionsweg kann CREM an eine spezifische Sequenz binden, die als cAMP responsive element (CRE)-Box bezeichnet wird (Steger, 1999) und in der Promotorregion mehrerer an der Spermatozytogenese beteiligter Gene vorkommt (Behr u. Weinbauer, 2001).

Durch Mechanismen wie alternative Promotorverwendung, alternatives Exonspleißen und alternative Translationsinitiation entstehen bei der CREM-Genexpression funktionell unterschiedliche CREM Proteine mit aktivierendem oder reprimierendem Potential auf die Zielgenexpression (Delmas et al., 1992; de Cesare et al., 2000).

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine Vielzahl von CREM-mRNAs als Isoformen existent sind. Kürzlich erfolgte die Beschreibung von zwei neuen Startexons, die hodenspezifisch sind und Isoformen mit den beiden Anfangsexons $\theta 1$ respektive $\theta 2$ entstehen lassen (Gellersen et al., 2002). Es wurde das Expressionsmuster und die Zuteilung zu spezifischen Keimzelltypen während der normalen und gestörten Spermatozytogenese bei Mensch und Pferd untersucht (Blöcher et al., 2003; Blöcher et al., 2005). Für die beiden Isoformen **$\theta 2$ -F-G-H-Ib** und **$\theta 2$ -G-H-Ib** erfolgte die funktionelle Zuordnung „Repressor“ bisher ausschließlich auf Grund der Exonzusammensetzung der Transkripte, d.h. auf mRNA-Ebene (Blöcher et al., 2003). Funktionelle Studien stellen daher eine Voraussetzung für die Charakterisierung dieser Isoformen dar.

Ziele dieser Untersuchung waren, zu klären:

- 1.) Ob von den CREM mRNA Isoformen $\theta 2$ -F-G-H-Ib und $\theta 2$ -G-H-Ib Proteine synthetisiert werden und wenn ja, ob vollständige Proteine entstehen.**

Methodisch wurden hierzu zunächst zur Vorbereitung und Materialgewinnung die CREM-Isoformen gewonnen und in einen Expressionsvektor kloniert. Nach einer

Sequenzanalyse wurden die von den Isoformen kodierten Proteine in-vitro hergestellt. Die gewonnenen Proteine wurden anschließend im Western Blot nachgewiesen.

2.) Ob die von den CREM-mRNA Isoformen kodierten Proteine in-vitro sequenzspezifisch an die DNA binden können.

Eine sequenzspezifische Bindung der hergestellten Proteine an die DNA wurde mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) nachgewiesen.

3.) Und ob diese Proteine funktionell als transkriptionale Aktivatoren oder Repressoren fungieren.

Der Nachweis der funktionellen Aktivität (Aktivator / Repressor) der Proteine erfolgte durch Transfektions-Experimente. Intakte Zellen wurden zu diesem Zweck mit den für die Proteine kodierenden CREM-Isoformen im Expressionsvektor transfiziert und abschließend eine Luziferase-Reportergen-Analyse durchgeführt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Histologie und Funktion des Hodens

Die Funktion des Hodens besteht im Wesentlichen aus der Bildung der männlichen Keimzellen (Spermatozoen) und der Geschlechtshormone.

Die Herstellung der Keimzellen (Spermatogenese) erfolgt in Kanälchen, den so genannten Tubuli seminiferi contorti. Sie bestehen aus einer Wand und dem durch eine Basallamina abgegrenzten Keimepithel. Im Keimepithel finden sich somatische Sertoli-Zellen und, von ihnen umgeben, die Keimzellen. Zu den Funktionen der Sertoli-Zellen zählen die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke, Ernährung der Keimzellen, Phagozytose und die Vermittlung hormonaler Stimuli. Die Keimzellen liegen in einem Tubulusquerschnitt in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, ausgehend von Spermatogonien über Spermatozyten I. und II. Ordnung, runden Spermatiden bis zu elongierten Spermatiden vor (Abb. 1).

Zwischen den Kanälchen liegen im interstitiellen Gewebe neben Nerven, Blut- und Lymphgefäßen Testosteron produzierenden Leydig Zellen (Bergmann, 1998).

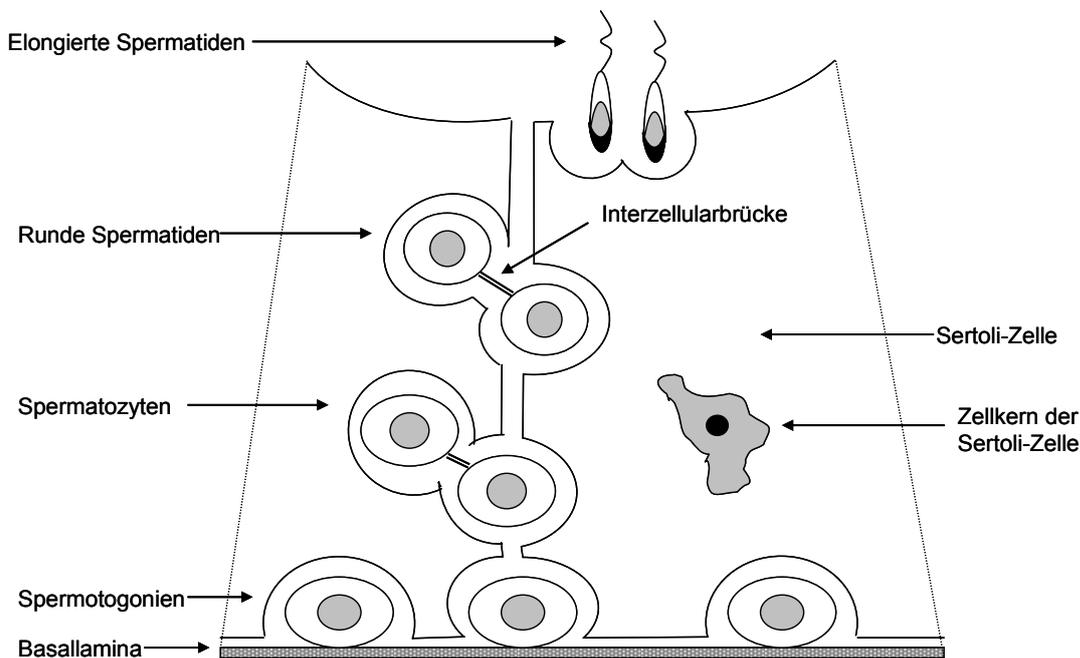


Abb. 1: Schema des Keimepithels des Menschen, modifiziert nach Bergmann (1998)
 Basallamina mit aufliegendem Keimepithel bestehend aus den Keimzellen (Spermotogonien, Spermatozyten runden Spermatisiden, elongierten Spermatisiden) und den Sertoli-Zellen.

2.2 Spermatogenese

Die Spermatogenese ist ein Prozess bei dem über drei Entwicklungsphasen aus Stammzellen, den sogenannten Spermotogonien, durch komplexe Zellproliferations- und differenzierungsprozesse reife Spermatisiden entstehen. Die ersten beiden Phasen bestehen aus der mitotischen und meiotischen Vermehrungsphase (jeweils unterteilt in die Stadien Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase); die dritte Phase (Spermiogenese) stellt die Differenzierungsphase dar. Während der mitotischen Vermehrungsphase entstehen aus einer Stammspermatogonie zwei A-Spermatogonien, von denen sich eine über weitere Mitosen zu B-Spermatogonien und anschließend zu primären Spermatozyten entwickelt. Die primären Spermatozyten verdoppeln ihre DNA und treten in die Meiose ein, wobei bei der ersten Reifeteilung aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten entstehen. Bei der zweiten sich anschließenden Reifeteilung gehen aus zwei sekundären Spermatozyten vier runde Spermatisiden hervor. Abschließend erfolgt die

Differenzierungsphase (Spermiogenese) in der sich an den runden Spermatiden morphologische, biochemische und physiologische Prozesse vollziehen, die reife elongierte Spermatiden hervorgehen lassen (Steger, 2001a) (Abb. 2).

Die Reifung der Spermatiden wird nochmals in acht Schritte (steps) unterteilt, wobei sich in Tubulusquerschnitten sechs Assoziationen von Keimzellstadien (Stadium I – IV) finden (Bergmann, 1998) (Abb. 3).

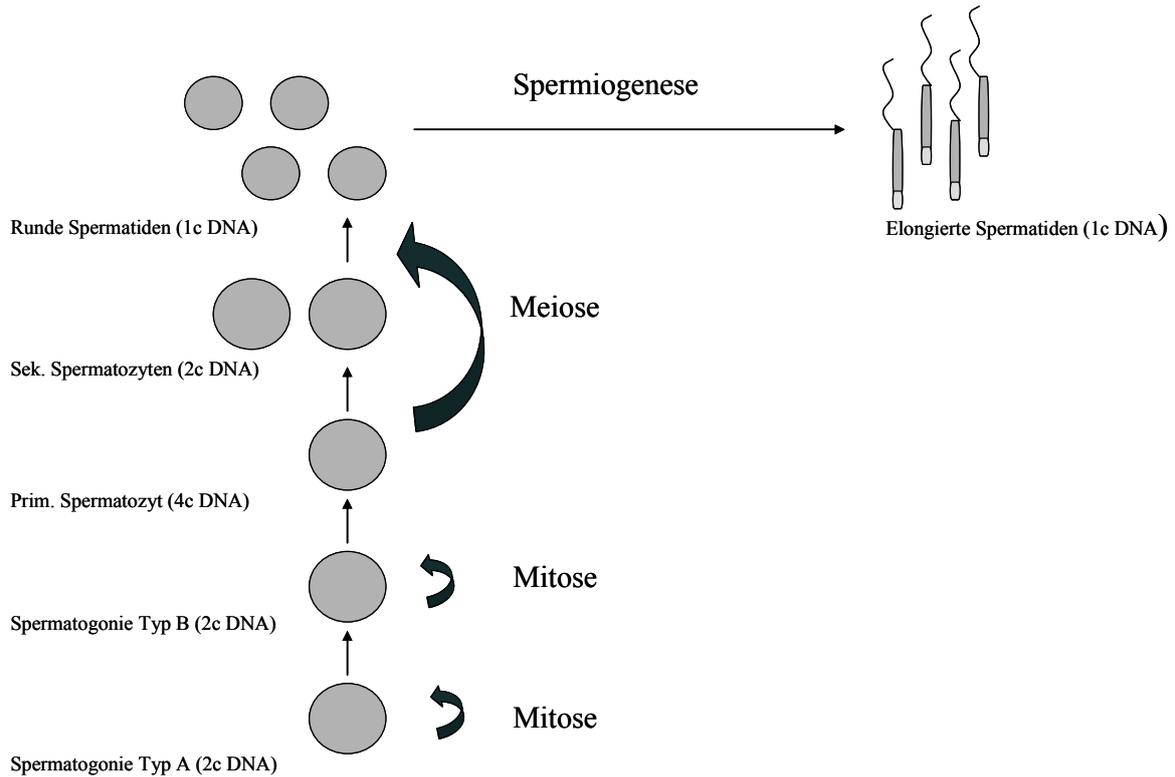


Abb. 2: Schema der Spermatogenese, modifiziert nach Steger (2001a). Über die mitotische und meiotische Vermehrungsphase und die Differenzierungsphase (Spermiogenese) entstehen aus Spermatogonien durch Zellproliferations- und differenzierungsprozesse reife Spermatiden.

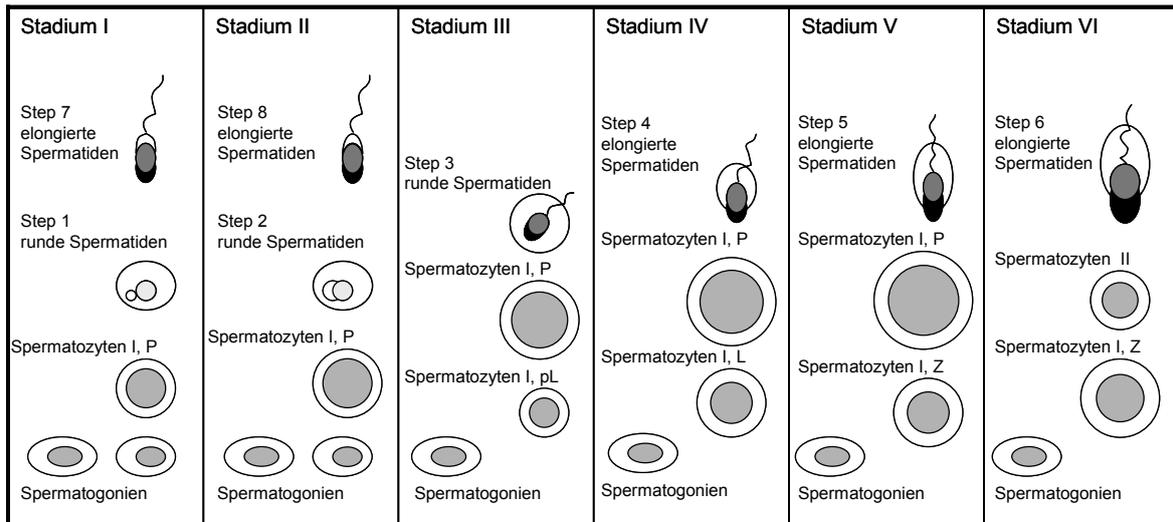


Abb. 3: Spermatogenesestadien I-VI und Spermatidenreifungsschritte (steps) 1-8 beim Menschen, modifiziert nach Bergmann (1998) mit Unterscheidung der primären Spermatozyten in der Prophase der Meiose aufgrund ihrer Kernmorphologie: P = pachytäne Spermatozyten, pL = präleptotäne Spermatozyten, L = leptotäne Spermatozyten, Z = zygotäne Spermatozyten.

2.3 Regulation der Spermatogenese

Auf hormoneller Ebene wird die Spermatogenese durch das in den Leydig Zellen produzierte männliche Geschlechtshormon Testosteron und die beiden aus dem Hypophysenvorderlappen stammenden Hormone luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH) sowie das aus dem Hypothalamus stammende Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) gesteuert. Die Freisetzung von GnRH bewirkt dabei die Ausschüttung von FSH und LH. Beide Hormone gelangen über das Blut in den Hoden, wo FSH die Funktionen der Sertoli-Zellen steuert und LH die Testosteronbildung in den Leydig-Zellen veranlasst. Testosteron stimuliert die Spermatogenese und hemmt in negativer Rückkopplung die Freisetzung von LH und GnRH (Steger, 2001a).

Die Regulationsabläufe der Spermatogenese mit ihren genetischen Steuerungsmechanismen sind im Gegensatz zu den hormonellen Mechanismen bis dato weniger erforscht (Steger, 2001a). Während der Spermatogenese ist für die terminale Differenzierung befruchtungsfähiger Spermien die korrekte sequentielle Genexpression in den Keimzellen unabdingbar (Hecht, 1990; Steger, 1999). Die Regulation der Genexpression erfolgt auf

transkriptionaler Ebene über Transkriptionsfaktoren, auf translationaler Ebene über Proteinbindung an die RNA und posttranslational durch Signaltransduktionsmechanismen (Eddy, 1998).

2.4 Regulation der Genexpression über Transkriptionsfaktoren

Die Regulation der Transkription von Genen in einer Zelle erfolgt über eine Kontrollregion auf der DNA nahe des Transkriptionsstartpunktes (Foulkes u. Sassone-Corsi, 1992). Eine bestimmte Klasse von Proteinen, sogenannte Transkriptionsfaktoren erkennen kurze, aus einer spezifischen Sequenz bestehende DNA-Abschnitte in der Promotorregion von Genen, an die sie zu binden vermögen und somit die Initiation der Transkription durch die RNA Polymerase aktivieren oder reprimieren können (De Cesare u. Sassone-Corsi, 2000; Goldberg, 1996). Zwei solcher spezifischen DNA-Sequenzen stellen die am besten charakterisierte TATA-Box und die CRE-Box dar, wobei erstere das Ziel für den Transkriptionsfaktor TATA box-binding protein (TBP) und letztere die Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren cAMP-responsive-element-binding-Protein (CREB) und cAMP-responsive-element-modulator-Protein (CREM) darstellt (Steger, 1999). CRE-ähnliche Sequenzen wurden in einer Reihe von Genen gefunden, die in Spermatisden transkribiert werden (Goldberg, 1996).

2.5 Regulation der Genexpression durch den Transkriptionsfaktor CREM

Die Regulation der Genexpression in haploiden Spermatisden erfolgt auf transkriptionaler und translationaler Ebene (Steger, 2001a; Steger, 2001b). CREM gehört wie CREB (CRE-binding protein) zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Wirkung über den cAMP-Signaltransduktionsweg vermittelt wird (Meyer u. Habener, 1993; Montminy, 1997). Die Regulation der Transkription von cAMP-induzierten Genen erfolgt via cAMP-Signaltransduktionsweg durch Bindung von CREM-Proteinen an die CRE-Box, eine spezifische aus 8 pb bestehende palindromische Sequenz in der Promotorregion des Zielgens (Sassone-Corsi, 1998a; Sassone-Corsi, 1998c). Nach Bindung von spezifischen

CREM-Isoformen an CRE kann die Transkription beeinflusst und die Genexpression in männlichen Keimzellen reguliert werden (Delmas u. Sassone-Corsi, 1994; Walker u. Habener, 1996; Steger, 2001a). Der Einfluß der CREM-Proteine auf die Transkription kann aktivierend oder reprimierend sein (Fimia et al., 1998; Don u. Stelzer, 2002).

CRE-Sequenzen wurden in der Promotorregion einiger an der Spermatogenese beteiligter Gene, wie z.B. den Protamingenen oder dem Gen für das Transitionsprotein 1 gefunden (Oliva u. Dixon, 1991; Steger et al., 1999; Behr u. Weinbauer, 2001). Die für Protamin kodierenden Gene werden während der Spermiogenese transkribiert (Hecht, 1998; Steger 1999). Der Austausch DNA-bindender Histone gegen Protamine führt zu einer Chromatinkondensation und schließlich zu einem Stop der Transkription in elongierenden Spermatischen. Eine genaue Regulation der Genexpression scheint daher wichtig zu sein, um eine vollständige Differenzierung in reife Spermatischen zu garantieren (Hecht, 1990; Steger, 1999).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige Gene, wie z.B. RT7, das für einen Hauptbestandteil des Spermischwanz kodiert, Transitionsprotein 1 oder testis Angiotensin-Converting Enzym (tACE) Ziele für eine CREM vermittelte Transkriptionsregulation darstellen (Zhou, 1996; De Cesare et al., 2000).

Der cAMP Signaltransduktionsweg, über den die Wirkung von CREM vermittelt wird, wird folgendermaßen beschrieben (Delmas et al., 1993, Delmas u. Sassone-Corsi, 1994; Sassone-Corsi; 1998b; Sassone-Corsi; 1998c, De Cesare u. Sassone-Corsi; 2000). Nach Bindung eines spezifischen Liganden an einen Membranrezeptor wird gekoppeltes G-Protein aktiviert. Dieses wiederum aktiviert die membranassoziierte Adenylatzyklase, die ATP in cAMP umwandelt. cAMP bindet im Zytoplasma an das zuvor inaktive Enzym Proteinkinase A (PKA), dessen aktive katalytische Untereinheit daraufhin abdissoziiert und in den Zellkern wandert. Dort phosphoryliert und damit aktiviert PKA CREM an Serin 117.

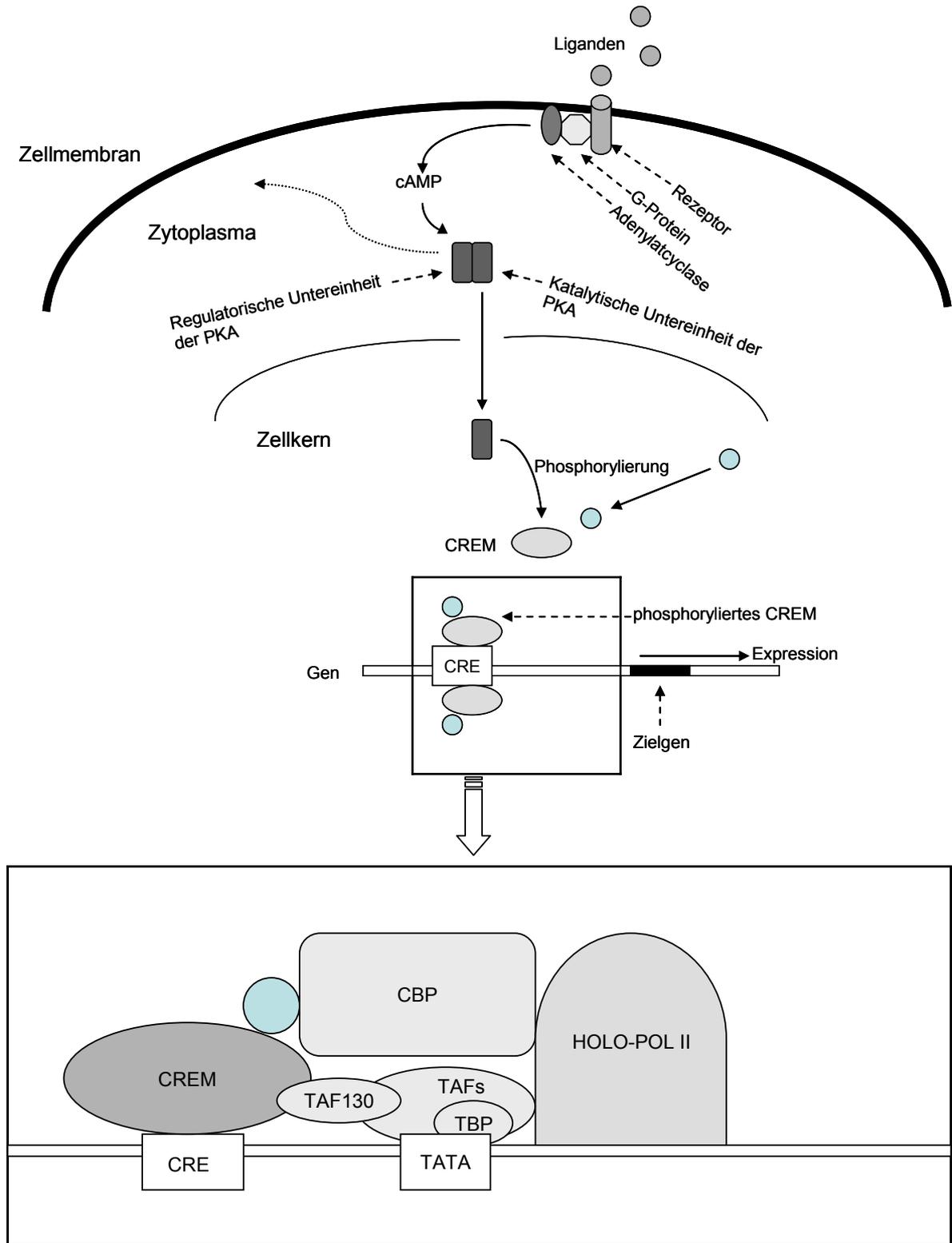


Abb. 4: cAMP Signaltransduktionsweg, modifiziert nach Sassone-Corsi (1998c) und De Cesare et al. (2000). CBP = CREB-binding-Protein, TBP = TATA-Box-binding Protein, TAFs = TBP-assoziierter Faktor, TAF 130 = TBP-assoziierter Faktor, HOLO-POL II = RNA Polymerase II Holoenzym

Ein aktiviertes CREM kann an ein CRE binden und durch die Interaktion mit dem Coaktivator CBP (CREB binding protein) und TAF 130 (mit dem TATA-binding Protein (TBP) assoziiert) unter Vermittlung noch weiterer Faktoren seine Funktion entfalten. Die Initiation der Transkription kann daraufhin durch die RNA-Polymerase II erfolgen (Abb. 4).

Die Phosphorylierung von CREM stellt ein Ereignis dar, das in Keimzellen zum Zeitpunkt der transkriptionalen Aktivierung durch CREM jedoch nicht beobachtet werden konnte (De Cesare et al., 2000). Auch hat ein Austausch von Serin 117 gegen Alanin die CREM-Aktivität in runden Spermatisden nicht beeinflusst (Fimia et al., 2001). Es wird daher angenommen, dass es in Keimzellen eine andere Möglichkeit der Aktivierung von CREM gibt, wobei der keimzellspezifische activator of CREM in the testis (ACT) eine Rolle zu spielen scheint (De Cesare et al., 1999; Fimia et al., 1998). Das Expressionsmuster von ACT wurde von Steger et al. (2004) untersucht, wobei ACT mRNA hauptsächlich in pachytänen Spermatozyten nachgewiesen werden konnte. Die genaue Funktionsweise von ACT konnte bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt werden. Es ergibt sich daher folgendes Modell nach De Cessare et al. (2000) und Fimia et al. (2001) (Abb. 5).

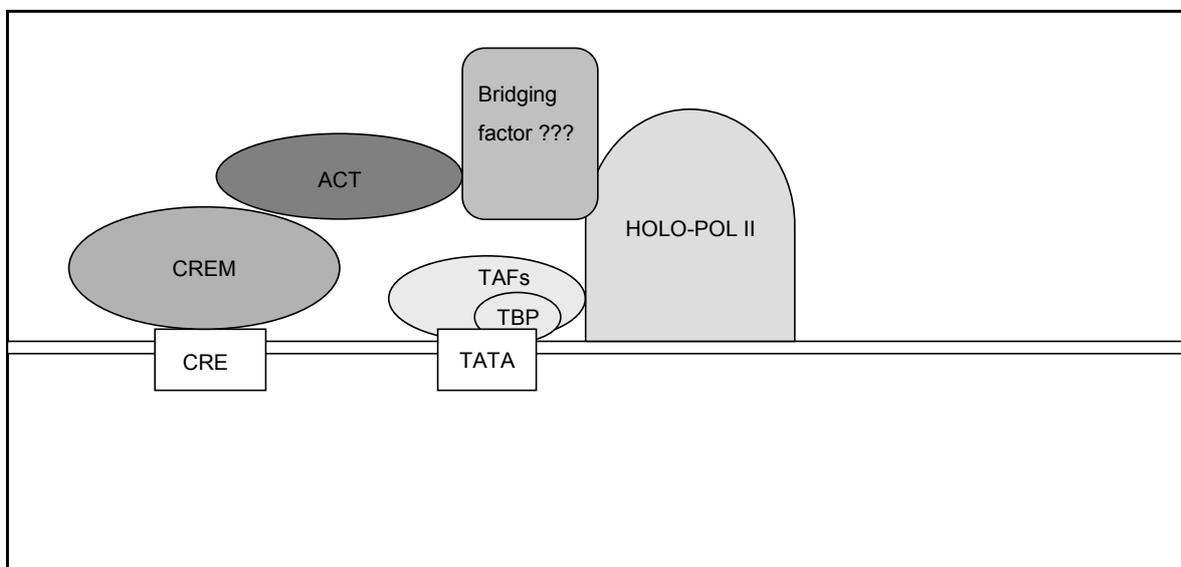


Abb. 5: Mögliche Funktionsweise von activator of CREM in testis (ACT), modifiziert nach De Cessare et al. (2000) und Fimia et al. (2001). Ein sogenannter Bridging factor stellt die Verbindung zwischen CREM und der Tanskriptionsmaschinerie her.

Im weiteren Verlauf der Erforschung der Funktionsweise von CREM im Hoden stellte sich heraus, dass CREM mit einem zusätzlichen allgemeinen Transkriptionsfaktor (TFIIA) interagiert (De Cesare et al., 2003). In einem erweiterten Modell der phosphorylierungsunabhängigen Funktion von CREM wird ein Kinesin-Protein erwähnt (KIF17b), über das ACT reguliert wird (Kimmins et al., 2004; Monaco et al., 2004).

2.6 CREM-Gen und daraus entstehende Isoformen

Das Gen, das für den Transkriptionsfaktor CREM codiert, besteht aus 14 Exons mit funktionell unterschiedlichen Domänen (Walker u. Habener, 1996, Gellersen et al., 2002) (Abb. 6). Exons E und F codieren für die kinase-inducible domain (KID). Sie enthält viele Serine, die phosphoryliert werden können. Exons C und G stellen Domänen dar, die für die transkriptionale Aktivierung benötigt werden. H und Ia/Ib stellen die basic leucin zipper (bZIP) DNA-Bindedomäne dar, die für die Dimerisierung und DNA-Bindung der Proteine erforderlich ist (Behr u. Weinbauer, 2001).

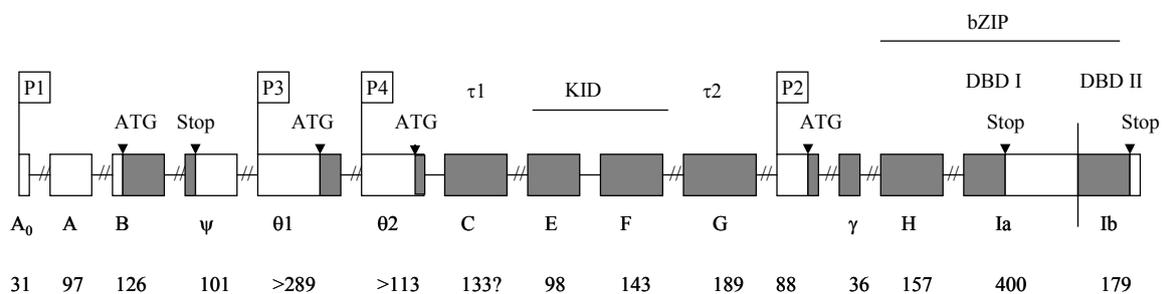


Abb. 6: CREM-Gen nach Gellersen et al. (2002). Kästchen = Exons, dunkle Bereiche = codierende Abschnitte, Buchstaben unterhalb der Kästchen = Bezeichnung der Exons, P1-P4 = Promotoren 1-4, Zahlen = Größe der Exons in bp, ATG und Stop = potentielle Start und Stop Codons

Durch **(1)** den Gebrauch verschiedener Promotoren (P1 - P4), sowie durch **(2)** alternatives Spleißen und **(3)** alternative Translationsinitiation entstehen aus dem CREM-Gen verschiedene Isoformen, deren Proteine aktivierende oder reprimierende Eigenschaften auf die Zielgenexpression aufweisen (Delmas et al., 1992; Behr u. Weinbauer, 2001; Gellersen et al., 2002).

(1) Unter Verwendung des Promotors P1 entstehen Isoformen, die als CREM- τ , τ_1 , τ_2 , $\tau\alpha$, α , β , und γ bezeichnet werden (Foulkes et al., 1992; Foulkes u. Sassone-Corsi, 1996). Der Repressor inducible cAMP early repressor (ICER) entsteht ausgehend vom Promotor P2 (Molina et al., 1993). Die kürzlich beschriebenen Promotoren P3 und P4 lassen Isoformen mit den Anfangsexons θ_1 respektive θ_2 entstehen (Daniel et al., 2000; Gellersen et al., 2002).

(2) Durch den Prozess des alternativen Exonspleißens können wiederum Isoformen mit unterschiedlicher Exonzusammensetzung und Funktionalität entstehen (Laoide et al., 1993; Walker et al., 1994). Ein besonderes Merkmal der CREM cDNA ist das Vorhandensein von zwei DNA-Bindedomänen (DBDI und DBDII), die ebenfalls alternativ gespleißt zur Vielfalt der Isoformen beitragen, wobei DBDII die vorherrschende Bindedomäne bei im Hoden vorkommenden CREM-Spleißvarianten ist (Foulkes et al., 1991; Gellersen et al., 2002). Unter Verwendung der kürzlich beschriebenen neuen, stark hodenspezifischen Startexons θ_1 und θ_2 sind Isoformen mit folgender unterschiedlicher Exonzusammensetzung in menschlichem Hoden nachgewiesen worden: θ_1 -E-F-G-H-Ib, θ_1 -E-F-H-Ib, θ_2 -E-F-G-H-Ib, θ_2 -E-F-H-Ib (Gellersen et al., 2002) (auch bezeichnet als CREM- θ_1 - τ_2 - β , CREM- θ_1 - β , CREM- θ_2 - τ_2 - β , CREM- θ_2 - β), θ_1 -F-H (Blöcher et al., 2005), θ_2 -F-G-H und θ_2 -G-H (Blöcher et al., 2003).

(3) Aus einer einzelnen CREM mRNA können durch die Verwendung alternativer Startpunkte für die Initiation der Translation Proteine mit aktivierender oder reprimierender Funktion entstehen. So gehen z.B. aus der CREM- τ -Variante durch Nutzung zweier Startcodons im selben Leseraster nicht nur ein Aktivator, sondern auch ein Repressor hervor (Delmas et al., 1992; Foulkes et al., 1992).

Durch diese beschriebenen Mechanismen entstehen aus dem CREM-Gen verschiedene mRNA-Isoformen, deren Proteine funktionell als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription fungieren können. Aufgrund der Exonzusammensetzung der Transkripte erfolgt eine Zuteilung „Aktivator“, wenn das Protein die KID, Exon C oder G und Exon H und Ia oder Ib enthält. Einem Repressor fehlt die KID oder Exons C und G (Behr u.

Weinbauer, 2001). Demnach handelt es sich bei den Isoformen mit der Exonzusammensetzung $\theta 1$ -E-F-G-H-Ib und $\theta 2$ -E-F-G-H-Ib um Aktivatoren, wohingegen $\theta 1$ -E-F-H-Ib, $\theta 1$ -F-H, $\theta 2$ -E-F-H-Ib, $\theta 2$ -F-G-H und $\theta 2$ -G-H als Repressoren bezeichnet werden (Blöcher et al., 2003). Funktionell untersucht wurden bislang die Isoformen CREM- $\theta 1$ - $\tau 2$ - β ($\theta 1$ -E-F-G-H-Ib), CREM- $\theta 1$ - β ($\theta 1$ -E-F-H-Ib), CREM- $\theta 2$ - $\tau 2$ - β ($\theta 2$ -E-F-G-H-Ib), CREM- $\theta 2$ - β ($\theta 2$ -E-F-H-Ib) (Gellersen et al., 2002). Bei diesen Isoformen ist Exon E jeweils an Exon $\theta 1$ respektive Exon $\theta 2$ gespleißt. Dies führt zur Synthese von Proteinen voller Länge mit Translationsinitiation in Exon $\theta 1$ bzw. an dem am äußersten 3'Ende gelegenen Triplet (ATG) in Exon $\theta 2$ (Gellersen et al., 2002) (Abb. 7).

Exon $\theta 2$

5' GGA ACATTCTTAG CCACCGAAGT ATGGGCACCA AAAGCGATAA GGAGCATGTG

TTCCTTAATAAATGTCACAT CAGAAAATGA CTGTTCCAGG ACAGTAACCA CCTACCG**ATG** 3'

Abb. 7: Humane Sequenz des Exon $\theta 2$ nach Gellersen et al. (2002). Das für die Translationsinitiation bekannte ATG ist fett dargestellt.

Abb. 8 zeigt durch alternatives Spleißen aus dem CREM-Gen entstandene Isoformen mit den Startexons $\theta 2$. Aufgeführt sind weiterhin Startpunkte für die alternative Translationsinitiation und die durch die zuvor beschriebenen verschiedenen Mechanismen resultierenden Proteine.

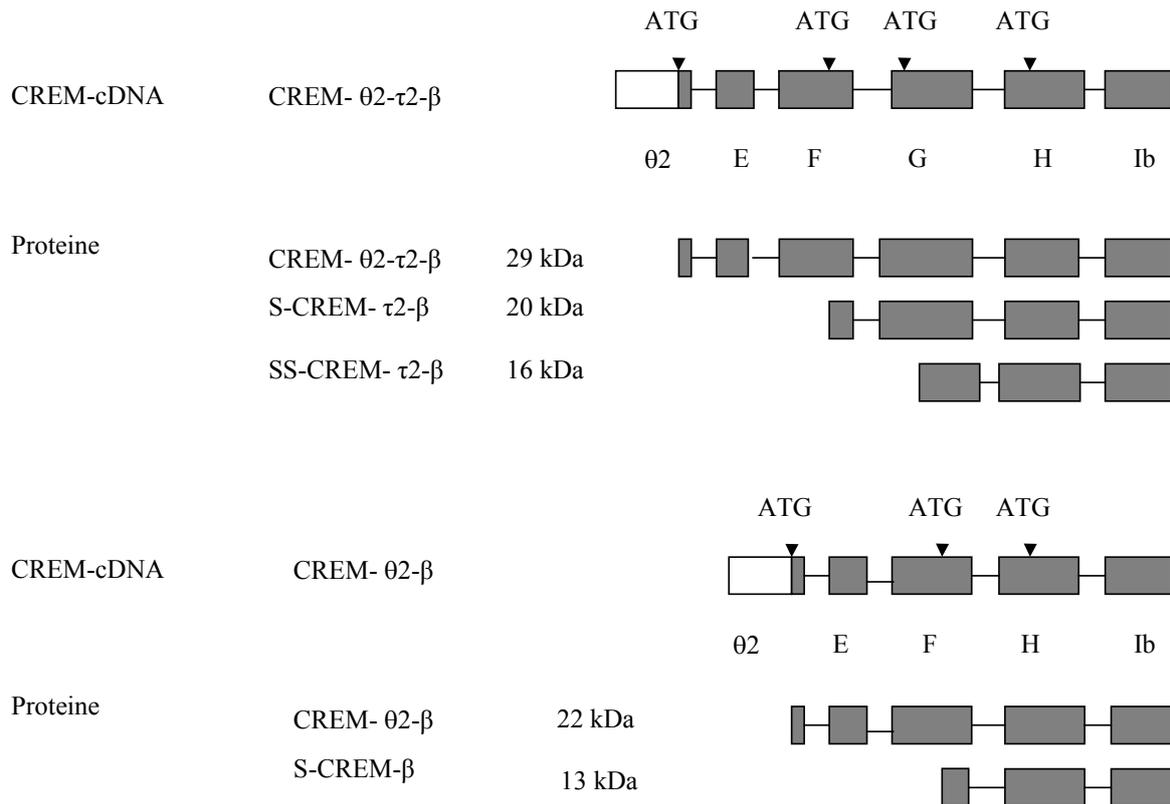


Abb. 8: Schematische Darstellung der aus dem CREM-Gen durch alternatives Spleißen entstandene Isoformen und Proteine, die nach in-vitro Translation aus diesen Isoformen hervorgehen (nach Gellersen et al., 2002)

2.7 Rolle von CREM in der Spermatogenese

Die Rolle des Transkriptionsfaktors CREM für die Spermatogenese bei Mäusen wird anhand zweier Studien deutlich (Blendy et al., 1996; Nantel et al., 1996). Mäuse bei denen das CREM-Gen inaktiviert wurde, waren trotz normalen Geschlechtsverhaltens und nicht reduzierter Androgen- und FSH-Werte nicht fortpflanzungsfähig. Eine histologische Untersuchung der Hoden ergab, dass die Spermatogenese sich lediglich bis zum Stadium der runden Spermatiden vollzog; eine Ausdifferenzierung in elongierte Spermatiden erfolgte nicht (Blendy et al., 1996). Zeitgleich wurden von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls Mäuse mit einem defekten CREM-Gen generiert, indem die für die DNA-Bindung erforderliche funktionelle Domäne des CREM-Gens entfernt und durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt wurde (Nantel et al., 1996). Eine Analyse der RNA aus dem Hoden zeigte, dass keine CREM Transkripte vorhanden waren. CREM hat demnach

zumindest bei Mäusen eine essentielle Bedeutung für die Differenzierung von runden Spermatisden zu Spermien.

Histologische und immunzytologische Untersuchungen von Hodengewebe von Männern mit einem Spermatogenese-arrest zeigten, dass sich runde Spermatisden nicht über das Stadium III der Spermatogenese hinaus entwickelten. Die CREM-Expression war in diesen Fällen signifikant reduziert (Weinbauer et al., 1998). Auch konnten CREM-Proteine in immunhistochemischen Untersuchungen von Steger et al. (1999) bei infertilen Männern mit einem Spermatogenese-arrest auf der Stufe der runden Spermatisden nicht nachgewiesen werden. Die Reifung der runden Spermatisden erfolgte nur bis Schritt (step) 3 (siehe Abb. 3). Darüber hinaus wurden in einem Hoden mit gestörter Spermatogenese inakkurat gespleißte CREM Isoformen gefunden (Behr u. Weinbauer, 2000). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass CREM beim Menschen ebenfalls eine Rolle in der Spermatogenese bei der Spermatisdenreifung spielt.

Nicht nur in testikulärem Gewebe von Mensch und Maus, sondern auch in anderen Geweben (Liu et al., 2005) und bei verschiedenen Spezies wie Hunden (Uyttersprot u. Miot, 1997), Pferden (Blöcher et al., 2003), Ratten (Daniel et al., 2000) und Affen (Behr et al., 2000) wurde der Transkriptionsfaktor CREM nachgewiesen.

3. MATERIAL UND METHODEN

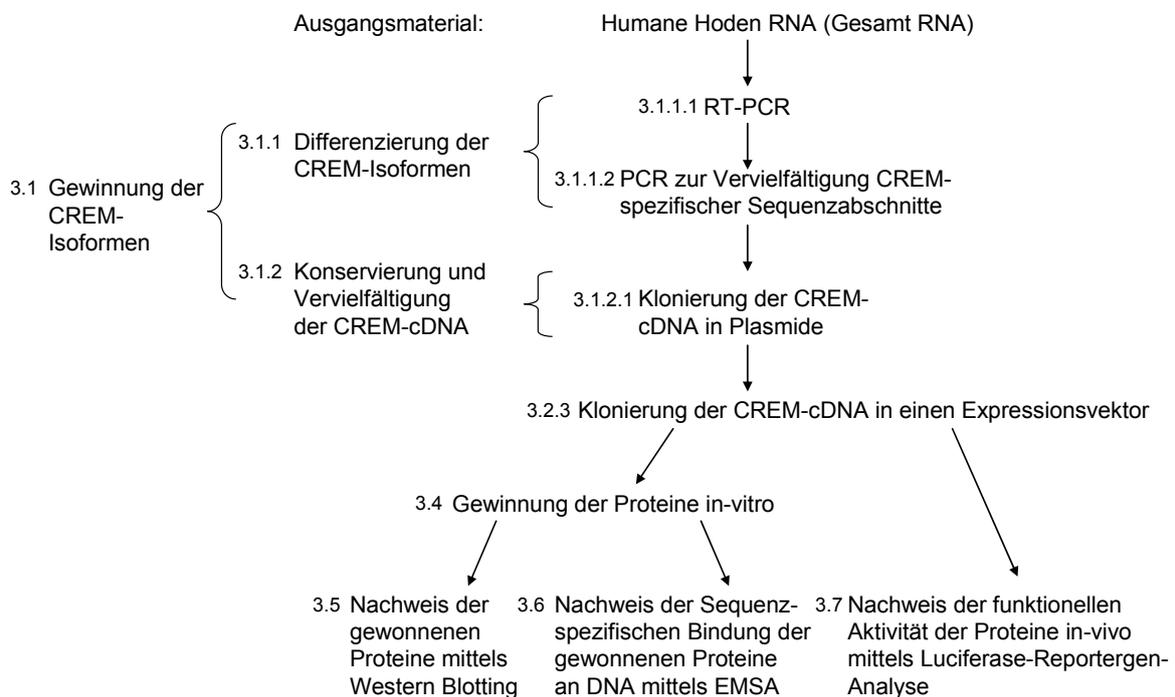


Abb.9: Methodische Vorgehensweise

3.1 Gewinnung der CREM-Isoformen

In einem ersten Schritt wurde RNA aus menschlichen Hoden mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben, um diese im Weiteren mit definierten CREM-Primern durch eine PCR zu vervielfältigen (Abb. 9). Zur Identifizierung und Isolierung der einzelnen CREM-Isoformen, die nach der PCR noch als Gemisch vorlagen, erfolgte eine Trennung nach Größe mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Extraktion aus dem Agarosegel.

Nach Erhalt der einzelnen CREM-cDNA-Isoformen wurden von diesen zur Konservierung und weiteren Vervielfältigung nach Ligation mit einem geeigneten Plasmidvektor (Klonierung) und Einschleusung dieses sogenannten rekombinanten Plasmids in gentechnisch veränderte *E.coli* Bakterien (Transformation) identische Kopien in großer Zahl durch Wachstum und Teilung der Bakterien hergestellt. Im Anschluß erfolgt eine

Isolierung der rekombinanten Plasmide aus den Bakterien zur genauen Identifizierung und Ermittlung der Basenabfolge (Sequenzierung) der ligierten CREM-cDNA-Isoformen durch die Fa. Qiagen.

3.1.1 Differenzierung der CREM-Isoformen

3.1.1.1 RT-PCR

RNA kann nicht direkt in einer PCR eingesetzt werden und musste daher zunächst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase in copy DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Bangsow et al., 2002).

cDNA besitzt keine Intronsequenzen und eignet sich daher besonders für die Analyse des Proteinprodukts (Alberts et al., 2004). Als Ausgangsmaterial diente RNA aus gepoolten humanen Hoden-Proben von 39 Männern im Alter von 14-64 Jahren (Fa. BD Biosciences). Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mit dem OmniscriptTM RT Kit von der Fa. Qiagen. Es wurden Oligo d(T)₁₆ Primer der Fa. Applied Biosystems verwendet. Zur Minimierung des RNA-Abbaus durch RNasen wurde ein RNase Inhibitor (Fa. Roche) hinzugefügt. Für die reverse Transkription wurden folgende Reagenzien nach dem OmniscriptTM Reverse Transkriptase Handbook pipettiert:

Reagenzien	Volumen/Reaktion
10 x Buffer RT	2 µl
dNTP Mix (5mM each dNTP)	2 µl
Oligo-d(T) ₁₆ Primer (50µM)	0,4 µl
RNase Inhibitor (40u/µl)	0,25 µl
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl
Human Testis Total RNA (1µg/µl)	2 µl
RNase-freies Wasser	ad 20 µl
Endvolumen	20 µl

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37°C im T3 Thermocycler (Fa. Biometra) inkubiert mit anschließender Inaktivierung der Omniscript Reversen Transcriptase bei 95°C für 5 min. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, in dem die Reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt wurde.

3.1.1.2 PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden die CREM-spezifischen Sequenzabschnitte der gewonnenen cDNA zur Analyse vervielfältigt.

Zur Amplifikation der Isoformen $\theta 2$ -E-F-G-H-Ib, $\theta 2$ -E-F-H-Ib, $\theta 2$ -F-G-H-Ib und $\theta 2$ -G-H-Ib dienten folgende von den Firmen Invitrogen und MWG-Biotech AG synthetisch hergestellte, CREM-spezifische Oligonucleotide, die in den Exons $\theta 2$ (sense Primer) und Ib (antisense Primer) lokalisiert sind: 5'ACCGAAGTATGGGCACCA3' (sense) (Gellersen et al., 2002) und 5'CTAGTAATC(A/T)GTTTTGGGAGA3' (antisense) (nach der humanen cDNA-Sequenz in Masquillier et al., 1993; Gellersen et al., 2002). Da die PCR-Produkte in einen Expressionsvektor kloniert werden sollten, wurde eine Polymerase mit Proofreading-Aktivität gewählt, um die Fehlerrate bei der Synthese dieser Produkte zu minimieren. Eventuell falsch eingebaute Desoxynucleotide werden hierbei erkannt und entfernt (Bangsow et al., 2002). Verwendet wurde die Pfu DNA Polymerase der Fa. Promega. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle für die PCR verwendeten Reagenzien von Promega bezogen. Folgende Komponenten wurden nach Herstellerangaben kombiniert (zusätzlich wurde zum PCR-Ansatz $MgCl_2$ aus dem Taq DNA Polymerase Kit (Fa. Qiagen) hinzugegeben):

Reagenzien	Volumen/Reaktion
Pfu DNA Polymerase 10x Puffer mit MgSO ₄	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM each)	1 µl
sense Primer	1 µl (10 pmol)
antisense Primer	1 µl (10 pmol)
CDNA	2 µl
Pfu DNA Polymerase (3 u/µl)	0,42 µl
Nuclease freies Wasser	ad 50 µl
Endvolumen	50 µl

Die Pfu DNA Polymerase wurde als letztes hinzugefügt und die Reaktionsansätze unmittelbar in den auf 95°C vorgeheizten T3 Thermocycler (Fa. Biometra) gegeben. Folgendes Programm wurde durchlaufen: initiale Denaturierung 1 min bei 95°C, 35 Zyklen jeweils bestehend aus den drei Schritten Denaturierung 45 sec bei 95°C, Annealing 30 sec bei 51°C, Extension 2 min bei 72°C, abschließend einmalige Extension 5 min bei 72°C. Zur Erkennung eventueller Kontaminationen diene als Negativkontrolle ein Ansatz, bei dem die 2 µl cDNA durch Wasser ersetzt wurden.

3.1.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung und Identifizierung der einzelnen Isoformen aus dem gewonnenen PCR-Produkt erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Wanderung negativ geladener Teilchen in einem elektrischen Feld (Dechert, 2002). Die negativ geladene DNA wandert hierbei in einem Agarosegel in Abhängigkeit von der Molekülgröße zur Anode.

Benötigte Chemikalien:

- 1 x TAE Laufpuffer:
aus 10 x TAE-Stammlösung: 48,4 g Tris, 11,4 ml Essigsäure, 20 ml 0,5 M EDTA,
Aqua bidest. ad 1 l, pH 8,0

- Probenauftragspuffer:
0,5 ml 1 %ige Bromphenolblau-Lösung, 0,5 ml 1 %ige Xylencyanol-Lösung, 3g Ficoll 400, 3 ml 0,5 M EDTA, 1x TAE-Puffer ad 20 ml, steril filtriert

Mit 1x TAE-Puffer wurde ein 2 %iges Agarosegel (QA-AgaroseTM Molecular Biology Grade, Fa. Qbiogene) hergestellt, das einen Trennbereich für DNA von 0,1-2 kb aufweist (Dechert, 2002). Nach Einsetzen des Gels in die Elektrophoresekammer (Agargel Mini, Fa. Biometra) wurde dieses mit 1 x TAE-Laufpuffer überschichtet.

Zur erstmaligen Analyse der DNA-Fragmente wurden 5µl des PCR-Produktes mit 2µl Probenauftragspuffer und 5µl Nuclease-freiem Wasser in die Geltaschen gegeben. Als Größenstandard diente ein 100 bp DNA Marker von New England Biolabs. 2 µl einer 1:10 Verdünnung des Markers wurden hierzu mit 8 µl Nuclease-freiem Wasser und 2 µl Probenauftragspuffer versehen und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 70 min bei 100V durchgeführt (BIO RAD Power Pac 200).

3.1.1.4 Detektion

Zur Detektion der cDNA wurde das Gel nach erfolgter Elektrophorese mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR^R GREEN I (Fa. Sigma) angefärbt.

Der Farbstoff wurde hierzu 1:10000 mit 1 x TAE-Puffer pH 8,0 in einer Kunststoffschale verdünnt und das Gel darin unter Schütteln für ca. 35 min gefärbt. Die anschließende Dokumentation erfolgte unter UV-Licht (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP Upland, CA) mit einer Polaroid Gel Cam.

Nach Identifizierung der einzelnen Isoformen wurde eine erneute Gelelektrophorese zwecks Isolierung der cDNA aus dem Gel durchgeführt. Die PCR Produkte wurden mit 1/5 ihres Volumens an Probenauftragspuffer versehen, in die Taschen eines 2 %igen Agarosegels (s.o.) gegeben, ein Größenstandard hinzugefügt und die Elektrophorese unter gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben, durchgeführt.

3.1.1.5 Extraktion der CREM-cDNA aus dem Agarosegel

Für die Extraktion der elektrophoretisch aufgetrennten CREM-cDNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurden die Banden zunächst mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Gewinnung der cDNA aus dem Gel erfolgte anschließend mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Hierbei wird die cDNA durch Auflösung der Agarose frei und an Silica-Gelpartikel gebunden. Die Elution der cDNA erfolgte mit 10 mM Tris-Puffer pH 8,5.

3.1.2 Konservierung und Vervielfältigung der CREM-cDNA

3.1.2.1 Klonierung der CREM-cDNA in Plasmide

Für die Klonierung und nachfolgende Transformation der nach der PCR und Extraktion aus dem Agarosegel gewonnenen CREM-cDNA wurde das Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit von der Fa. Invitrogen verwendet. Das Kit ist auf die Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden abgestimmt, so dass sich die mit der Pfu DNA-Polymerase erzeugte cDNA mit dem Plasmidvektor pCR[®]-Blunt II –TOPO[®] ligieren ließ.

Durchgeführt wurde die Klonierungsreaktion nach dem im Kit enthaltenen Protokoll (für jede der vier Isoformen ein separater Ansatz):

Reagenzien	Volumen/Reaktion
aus dem Gel extrahierte cDNA	0,5 µl
Salzlösung	1 µl
steriles Wasser	ad 5 µl
pCR [®] -Blunt II –TOPO [®]	1 µl
Endvolumen	6 µl

Während einer ca. 20 min Inkubationszeit der Reaktionsansätze bei Raumtemperatur kam es zur Ligation der cDNA mit dem Plasmidvektor.

3.1.2.2 Transformation der rekombinanten Plasmide in *E. coli*

Die Transformation der rekombinanten Plasmide erfolgte in die im Klonierungskit enthaltenen chemisch kompetenten TOP10 *E. coli*, ebenfalls nach dem Protokoll von Invitrogen: jeweils 2 µl des Ligationsansatzes wurden in je ein Tube mit Zellen gegeben, auf Eis inkubiert und anschließend zur Aufnahme der rekombinanten Plasmide in die Zellen für 30 sec bei 42°C in ein Wasserbad verbracht. Danach wurde der Ansatz wieder auf Eis inkubiert, S.O.C. Medium (Kitbestandteil) hinzugefügt und für 1 Std. bei 37°C geschüttelt.

Von jedem Transformationsansatz wurden anschließend 10-50 µl auf vorgewärmten LB-Kanamycin-Platten (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (LB-Agar-Medium Fa. BIO 101, Kanamycin Sulfate Liquid, Fa. Invitrogen).

Da der Plasmidvektor ein Kanamycinresistenzgen trägt, konnten nur die Zellen wachsen, die ein rekombinantes Plasmid aufgenommen hatten. Des weiteren verfügt der Vektor über ein für *E.coli* letales Gen. Nach Klonierung eines DNA-Fragmentes wird die Expression dieses Gens unterbrochen, so dass transformierte Zellen wachsen können. Zellen, die ein nicht rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, sterben nach dem Ausplattieren (Benutzerhandbuch, Invitrogen).

3.1.2.3 Anzucht der Bakterien

Zur Anzucht zwecks Plasmidisolierung wurden 3 ml LB-Kanamycin-Medium (50 µg/ml) mit einer Kolonie angeimpft und unter Schütteln für 10-12 Std. bei 37°C inkubiert.

3.1.2.4 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung wurde mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen durchgeführt. Das Prinzip basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Gelmembran. Durch einen folgenden Waschschrift wird die DNA mit Puffer eluiert (Benutzerhandbuch Qiagen).

Nach Anzucht der Bakterien wurden 2 ml aus der flüssigen Kultur für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert und mit dem Bakterienpellet wie in dem im Kit enthaltenen Protokoll beschrieben verfahren.

(Die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid erfolgte durch Anzucht in einem größeren Volumen Medium und anschließender Plasmidisolierung mit dem QIAGEN Plasmid Kit (Fa. Qiagen).

3.1.2.5 Verifizierung des Inserts durch Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide

Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen, nachfolgender Agarosegelelektrophorese und Visualisierung wurden die Plasmide auf das Vorhandensein des entsprechenden Inserts überprüft. Restriktionsendonucleasen sind Enzyme, die DNA an einer für sie spezifischen Nucleotidsequenz schneiden können. Da der Vektor pCR[®]-Blunt II –TOPO[®] beidseits des eingefügten cDNA-Fragments über eine definierte Nucleotidsequenz für das Restriktionsenzym EcoRI verfügt, kann das Insert zur weiteren Analyse mit dem entsprechenden Enzym herausgeschnitten werden (EcoRI und dazugehöriger Puffer, Fa. New England Biolabs).

Reagenzien	Volumen/Reaktion
10 x Puffer für EcoRI	2 µl
Plasmid	5 µl
EcoRI	1 µl
Nuclease freies Wasser	ad 20 µl
Endvolumen	20 µl

Die Ansätze wurden für ca. 1 Std. bei 37°C inkubiert.

Zur Trennung und nachfolgenden Visualisierung der aus dem Vektor herausgeschnittenen cDNA wurden die verschiedenen Ansätze nach dem Verdau auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen.

3.1.2.6 Sequenzierung der CREM-cDNA

Durch eine Sequenzierung (Fa. Qiagen) der cDNA in den Plasmiden wurde die genaue Nucleotidsequenz der Isoformen ermittelt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Transkriptvarianten aus der DNA-Sequenzdatenbank vom NCBI verglichen.

3.2 Vorbereitungen zur Klonierung und Klonierung der CREM-cDNA in einen Expressionsvektor

Nach erfolgter Klonierung, Anzucht der Bakterien und Plasmidisolierung trugen die gewonnenen Plasmide die erwünschte proteinkodierende Sequenz. Für die Synthese großer Mengen Proteine aus dieser Sequenz in lebenden Zellen werden Expressionsvektoren benötigt (Aigner, 2002).

Aus diesem Grund erfolgte eine erneute Klonierung der cDNA in einen Expressionsvektor. Um den zirkulär vorliegenden Vektor als Klonierungsvektor verwenden zu können, wurde dieser mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und somit linearisiert. Die zu klonierende CREM-cDNA wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, so dass sich der Vektor mit dem DNA-Fragment ligieren ließ.

Die Einschleusung der rekombinanten Plasmide erfolgte in *E. coli* XL1-blue (Fa. Stratagene) mit nachfolgender Vermehrung, Isolierung und erneuter Sequenzierung der Plasmide.

3.2.1 Vorbereitung des Expressionsvektors

3.2.1.1 Restriktionsverdau des Expressionsvektors

Der verwendete Expressionsvektor, pcDNA/FLAG-His, verfügt über ein für ein FLAG-(DYKDDDDK) und ein 6xHis-Epitop kodierendes Fragment. Zur Herstellung dieses Vektors wurde aus dem Vektor pcDNA3.1(+) (Fa. Invitrogen) zunächst das NheI-AflIII-Fragment herausgeschnitten. In die XbaI/PmeI Schnittstelle wurde dann ein Fragment

eingesetzt, das für ein FLAG- und ein 6xHis-Epitop kodiert (persönliche Mitteilung von Fr. Gellersen). Das FLAG-Epitop dient der späteren immunologischen Detektion der Proteine. Für die Klonierung der cDNA-Fragmente in den Expressionsvektor wurde dieser zunächst mit den zwei Restriktionsendonucleasen EcoRV und XbaI (Fa. New England Biolabs) geschnitten. Im Ergebnis entsteht ein linearer Expressionsvektor mit einem glatten Ende, erzeugt durch EcoRV und einem kohäsiven Ende durch XbaI, bei dem ein kurzer Einzelstrang übersteht. Beide Enden können sich mit auf die gleiche Art und Weise erzeugten Enden anderer Stränge verbinden.

Reagenzien	Volumen/Reaktion
10 x Puffer NEB 3	2 μ l
BSA 100 x	0,2 μ l
pcDNA/FLAG-His	1 μ g
EcoRV	0,5 μ l
XbaI	1 μ l
Nuclease freies Wasser	ad 20 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Die Ansätze wurden für ca.1 Std. bei 37°C inkubiert.

3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese, Detektion und Extraktion des linearisierten Expressionsvektors aus dem Agarosegel

Zur Reinigung der linearisierten DNA wurde im Anschluß an den Restriktionsverdau eine Agarose-Gelelektrophorese in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel für 45 min bei 100V durchgeführt (Dechert, 2002). Als Größenstandard diente ein 1kb DNA Marker (Fa. New England Biolabs). Nach Detektion der DNA mit SYBR^RGREEN I (Fa. Sigma) unter UV-Licht erfolgte die Extraktion und Aufreinigung aus dem Gel mit dem QIAEX II Gel Extraktion Kit (Fa. Qiagen). Die Elution erfolgte in TE-Puffer pH 8,0.

3.2.2 Vorbereitung der CREM-cDNA

Um eine Klonierung der CREM-cDNA aus dem pCR[®]-Blunt II –TOPO[®] Vektor in den Expressionsvektor zu ermöglichen, musste die cDNA die gleichen Enden wie der Expressionsvektor nach der Linearisierung aufweisen.

Hierzu wurden die CREM-cDNA-Isoformen in pCR[®]-Blunt II –TOPO[®] mit einem reverse Primer amplifiziert, der gegen die letzten sechs Codons CREM spezifische Sequenz gerichtet ist. Dieser Primer mutiert das Stop Codon, geht in eine Schnittstelle für XbaI über und ist durch einige nachfolgende Nucleotide geschützt (persönliche Mitteilung von Fr. Gellersen).

Da für diese PCR ebenfalls die Pfu DNA Polymerase, die glatte Enden hinterlässt, verwendet wurde, konnte das andere Ende des PCR-Produktes ohne Behandlung mit Restriktionsenzymen mit dem glatten Ende des Expressionsvektors ligiert werden.

3.2.2.1 Quantifizierung der Plasmid-DNA

Für die nachfolgende PCR wurden 10 ng Plasmid als Template eingesetzt. Die Konzentration der Plasmid-DNA nach der Isolierung wurde daher zunächst durch photometrische Messung bei 260 nm (BioPhotometer, Fa. Eppendorf) in 0,1 M TrisHCl – Puffer pH 7,3 ermittelt, um das einzusetzende Volumen berechnen zu können.

3.2.2.2 PCR

Zur Amplifikation der CREM-cDNA, die in den Plasmiden vorliegt, wurden folgende Primer (Fa. MWG-Biotech AG) eingesetzt:

Sense 5'ACCGAAGTATGGGCACCA3' (Gellersen et al., 2002)

Antisense 5'TGTATTCTAGATAGTAATC(A/T)GTTTTGGGAGA3'

Reagenzien	Volumen/Reaktion
Pfu DNA Polymerase 10 x Puffer mit MgSO ₄	5 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µl
sense Primer	1 µl (10 pmol)
antisense Primer	1 µl (10 pmol)
Plasmid	10 ng
Pfu DNA Polymerase (3 u/µl)	0,42 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 50 µl
Endvolumen	50 µl

Ein Ansatz, in dem das Template durch Wasser ersetzt wurde, diente als Negativkontrolle. Die Reaktionsansätze wurden unmittelbar in den auf 95°C vorgeheizten T3 Thermocycler (Fa. Biometra) gegeben. Folgendes Programm wurde durchlaufen: initiale Denaturierung 2 min bei 95°C, 35 Zyklen jeweils bestehend aus den drei Schritten Denaturierung 45 sec bei 95°C, Annealing 30 sec bei 51°C, Extension 2 min bei 72°C, abschließend einmalige Extension 5 min bei 72°C.

3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese, Detektion und Extraktion der CREM-cDNA aus dem Agarosegel

Zur Reinigung wurden die PCR-Produkte auf ein 2 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese für 70 min bei 100 V mit nachfolgender Isolierung der cDNA aus dem Gel durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit SYBR^RGREEN wie unter 3.1.1.4 beschrieben. Für die Extraktion der cDNA aus dem Agarosegel wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit verwendet und die cDNA mit 10 mM Tris-Puffer pH 8,5 eluiert.

3.2.2.4 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Die aus dem Gel extrahierte CREM-cDNA wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnitten und bei 37°C für ca. 1Std. inkubiert.

Reagenzien	Volumen/Reaktion
10 x Puffer NEB 2	2 μ l
BSA 100 x	0,2 μ l
cDNA	12 μ l
XbaI	1 μ l
Nuclease freies Wasser	ad 20 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

3.2.2.5 Agarosegelelektrophorese, Detektion und Extraktion der CREM-cDNA aus dem Agarosegel

Nach dem Restriktionsverdau wurde zur Reinigung der cDNA-Fragmente erneut eine Gelelektrophorese mit anschließender Detektion und cDNA-Extraktion aus dem Gel mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) durchgeführt. Die auf diese Weise gereinigte DNA konnte direkt für die folgende Klonierung verwendet werden.

3.2.3 Klonierung der CREM-cDNA in den Expressionsvektor

Expressionsvektoren werden für die gezielte Synthese großer Mengen Proteine eingesetzt (Aigner, 2002). Sie tragen hochaktive Promotoren zur Herstellung großer Mengen mRNA aus dem klonierten DNA-Fragment. In der Zielzelle werden aus dieser Information Proteine synthetisiert (Alberts et al., 2004).

3.2.3.1 Klonierung der CREM-cDNA in den Expressionsvektor

Die Ligation der CREM-cDNA mit dem Expressionsvektor erfolgte in einem molaren Verhältnis von 2:1, wobei 100 ng des Expressionsvektors pro Ligationsansatz eingesetzt wurden. Die benötigte Menge cDNA ließ sich mit Hilfe der Formel aus dem Technical Manual pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Fa. Promega) nach photometrischer Konzentrationsmessung errechnen:

$$\frac{\text{ng Größe des Vektors} \times \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} \times \frac{2}{1} = \text{ng des Inserts}$$

Für die Klonierung werden 2x Rapid Ligation Buffer und T4 DNA Ligase aus dem pGEM[®]-T Vector System I Kit (Fa. Promega) verwendet:

Reagenzien	Volumen/Reaktion
2 x Rapid Ligation Buffer	5 µl
pcDNA/FLAG-His (linearisiert)	100 ng
errechnete Menge cDNA	variabel
T4 DNA Ligase	1 µl
Nuclease freies Wasser	ad 10 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der Ligationsansatz wurde für ca. 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3.2 Transformation der rekombinanten Plasmide in *E. coli*

Die nach der Klonierung gewonnenen rekombinanten Plasmide wurden anschließend zur Vermehrung in *E. coli* XL 1-Blue Competent Cells (Fa. Stratagene) eingeschleust. Die Transformation und Herstellung des benötigten SOC Mediums erfolgte nach dem den Zellen beigefügten Protokoll von Stratagene.

Benötigte Medien und Reagenzien:

- SOC Medium:
aus SOB Medium + Glukose
SOB Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, Aqua dest. ad 1 l
autoklaviert, kurz vor der Verwendung werden 10 ml 1 M MgCl₂ (steril filtriert),
10 ml 1 M MgSO₄ (steril filtriert) hinzugefügt
SOC Medium: 2 ml 20 %ige (w/v) Glukose, SOB Medium ad 100 ml
Glukose erst unmittelbar vor Verwendung hinzufügen

- LB-Agar

Kapseln (Fa. BIO 101), Aqua dest., nach Autoklavierung und Abkühlung des Agars Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (Ampicillin-Natriumsalz Fa. AppliChem)

Zu jeweils 100 µl auf Eis aufgetauten XL1-Blue kompetenten Zellen wurden 1,7 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Während einer 10 min Inkubation auf Eis wurden diese Ansätze alle 2 min vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 2 µl des Ligationsansatzes erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 30 min. Das Gemisch kam anschließend für 45 sec in ein 42°C warmes Wasserbad. Nach wiederholter Inkubation auf Eis für 2 min und anschließender Zugabe von 0,9 ml vorgewärmtem SOC-Medium mussten die Transformationsansätze 1 Std. unter Schütteln (225-250 rpm) bei 37°C inkubiert werden. Das Ampicillinresistenzgen des Expressionsvektors erlaubte eine selektive Anzucht der Bakterien, die das rekombinante Plasmid aufgenommen hatten, durch den Zusatz von Ampicillin zum LB-Agar. Von jedem Transformationsansatz wurden unterschiedliche Mengen (20-80 µl) auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3.3 Anzucht der Bakterien

Zur Anzucht zwecks Identifizierung der richtigen Klone wurden zunächst, wie unter 3.1.2.3 und 3.1.2.4 beschrieben, wenige ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg/ml) mit einer Kolonie angeimpft und inkubiert (Vorkultur). Nach Isolierung der Plasmide, Identifizierung der richtigen Klone durch Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese wurden dann zur Gewinnung größerer Mengen Plasmide 25 ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg/ml) mit 50µl der Vorkultur beimpft.

3.2.3.4 Plasmidisolierung

Nach Restriktionsverdau und Auswahl der entsprechenden Klone erfolgt die Isolierung der Plasmide aus dem 25 ml Ansatz mit dem QIAGEN Plasmid Kit. Nach der im QIAGEN® Plasmid Purification Handbuch beschriebenen alkalischen Lyse der Bakterien, basierend

auf einer Methode von Birnboim u. Doly (1979), wurde die Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden, nach Waschschrinen eluiert, mit Isopropanol (Fa. Merck) präzipitiert und in 10 mM Tris-Puffer pH 8,5 aufgenommen.

3.2.3.5 Verifizierung des Inserts durch Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide

Zur Überprüfung der klonierten Isoformen wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Verwendete Restriktionsenzyme, Puffer und BSA wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

10 x Puffer NEB 2	2 μ l
BSA 100 x	0,2 μ l
Plasmid	5 μ l
XbaI	1 μ l
BamH I (oder EcoRI)	1 μ l
Nuclease-freies Wasser	ad 20 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Inkubiert wurde der Ansatz für ca. 1 Std. bei 37°C.

Zur Trennung und nachfolgenden Visualisierung der aus dem Expressionsvektor herausgeschnittenen cDNA wurden die verschiedenen Ansätze nach dem Verdau auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen.

3.2.3.6 Sequenzierung der CREM-cDNA

Durch Sequenzierung (Fa. Qiagen) der Inserts im Expressionsvektor wurde zur Überprüfung erneut die genaue Nucleotidsequenz der CREM-cDNA ermittelt.

3.3 Sequenzanalyse

Anhand der cDNA-Sequenz wurde daraufhin die Proteinsequenz der zu analysierenden CREM-Isoformen ermittelt (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Gasteiger et al., 2003).

3.4 Gewinnung der Proteine in-vitro

3.4.1 Vorbereitung der Plasmidproben

Die gewonnenen rekombinanten Plasmide (Expressionsvektoren mit ligierten CREM-cDNAs) dienen im Weiteren zur Herstellung der Proteine in-vitro, deren Nachweis mittels Western Blot und die sequenzspezifische Bindung an DNA durch einen Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) erfolgte. Vorab wurde eine RNase A Behandlung und eine Fällung der Plasmide mit Polyethylenglycol vorgenommen.

3.4.1.1 Plasmidfällung

Benötigte Chemikalien:

- RNase A Lösung (10 mg/ml):
100 mg RNase (Fa. Roche), 100 µl 1 M Tris pH 7,5, 30 µl 5 M NaCl (Fa. Cambrex), Aqua bidest. ad 10 ml, 15 min bei 100°C, langsam auf Raumtemperatur abkühlen (Wasserbad ausschalten, RNase Gemisch im Wasserbad belassen).
- Polyethylenglycol (PEG) 40 %:
PEG 6000 (Fa. Merck) in autoklaviertem Aqua dest. lösen
- 5 M NaCl (Fa. Cambrex)
- Ethanol 70 %
- TE-Puffer:
10 mM Tris (Fa. Roth) pH 8,0, 1 mM EDTA (Fa. Roth)

Zu 300 µl Plasmid nach der Plasmidisolierung wurden 24 µl RNase A Lösung gegeben, gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 %

des Probenvolumens eines 1:1 Gemischs aus 40 %iger PEG-Lösung und 5 M NaCl. Nach mindestens einstündiger Inkubation (oder über Nacht) auf Eis wurde die Probe für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand abermals verworfen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von TE-Puffer zum Pellet und Lagerung im Kühlschrank über Nacht, wurden die Plasmide am nächsten Tag durch häufiges auf und ab pipettieren gemischt.

3.4.1.2 Quantifizierung der Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Messung der Plasmide im Ultrospec 2100 pro UV/visible Spectrophotometer durchgeführt und die Plasmide auf ca. 1 µg/µl in TE-Puffer pH 8,0 verdünnt.

3.4.1.3 Reinigung der Plasmidproben

Zur Probenvorbereitung wurde zunächst eine Reinigung der Plasmidproben mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Fa. Roche) vorgenommen, um eventuell enthaltene kleine Moleküle (z.B. Salze) und Proteine (z.B. Enzyme) zu entfernen.

Ca. 15 µg der nach der Plasmidfällung in TE-Puffer gelösten Plasmide und 300 µl Bindungspuffer wurden in ein im Kit enthaltenes Filtergefäß gegeben, für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge pico Fa. Heraeus) und der Durchfluss verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 µl Waschpuffer und einminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm. Die Plasmide wurden anschließend mit 30 µl Nuclease-freiem Wasser in ein sauberes Gefäß eluiert (vor der Zentrifugation wurde eine kurze Inkubationszeit von einer min abgewartet).

3.4.2 In-vitro Transkription/Translation

Der Expressionsvektor trägt einen T7 Promotor, an dem zur Proteingewinnung eine gekoppelte in-vitro Transkription/Translation mit dem TNT[®] Quick Coupled durchgeführt werden konnte.

500 ng der aufgereinigten Plasmide wurden ad 4,5 µl mit Nuclease-freiem Wasser in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben, 0,5 µl Methionin (1 mM) und 20 µl TNT[®] T7 Quick Master Mix hinzugefügt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 30°C inkubiert (Thermomixer comfort 1,5 ml, Fa. Eppendorf).

3.5 Nachweis der gewonnenen Proteine mittels Western Blotting

Proteine können, bedingt durch die Wanderung in einem elektrischen Feld, aus einem Gemisch nach gelelektrophoretischer Trennung, entsprechend ihrer Molmasse und Überführung auf eine Membran (Blot), mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Methode wird als Western Blotting bezeichnet und besteht im Wesentlichen aus den Schritten Probenvorbereitung, Gelelektrophorese, Transfer (Blotting), Nachweisreaktion und Visualisierung (Frey, 2002).

Eingesetzt wurden in-vitro translatierte Proteine der Isoformen CREM-θ2-F-G-H-Ib und CREM-θ2-G-H-Ib und zum Vergleich Proteine der bereits charakterisierten Isoformen CREM-θ2-E-F-G-H-Ib, CREM-θ2-E-F-H-Ib und CREM-τ2-α.

3.5.1 Probenvorbereitung

Benötigte Chemikalien:

- Gelladepuffer:
10 mM Tris pH 7,2, 10 % SDS (Fa. USB), 25 % 2-Mercaptoethanol (Fa. Sigma), 25 % Glycerol (Fa. Sigma), 0,01 % Bromphenolblau (Fa. Sigma)

Jeweils 5 μ l in-vitro Translatat wurden mit 5 μ l Gelladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C hitzedenaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm.

3.5.2 Gelelektrophorese

Benötigte Chemikalien:

Laufpuffer

- 1 x MES-Puffer:
aus 20 x NuPAGE[®] MES SDS Running Buffer (Fa. Invitrogen)
- 1 x MES-Puffer mit Antioxidant:
200 ml 1 x MES-Puffer, 500 μ l NuPAGE[®] Antioxidant (Fa. Invitrogen) (nicht länger als 30 min vor der Elektrophorese ansetzen)

Nach der Hitzedenaturierung erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese in einem NuPAGE[®] 4-12 % Bis-Tris Gel (Fa. Invitrogen). Die Fertiggele wurden in die Xcell SureLock[™] Novex Mini-Cell Elektrophoreseapparatur eingesetzt, wodurch zwei Kammern entstanden. Die innere Kammer wurde mit 200 ml 1 x MES-Puffer mit Antioxidant, die äußere Kammer mit 1 x MES-Puffer gefüllt und die Taschen der Fertiggele mit 1 x MES-Puffer gespült. Danach wurden die hitzedenaturierten Proben (10 μ l) auf das Gel aufgetragen. Als Protein-Marker wurden 5 μ l des See Blue Plus 2 (Fa. Invitrogen) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 30 min bei 200 V.

3.5.3 Transfer

Nach der Trennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden diese durch einen elektrophoretischen Transfer auf eine proteinbindende Membran verbracht. Der Wet (Tank)-Blot und der Semi-Dry-Blot sind zwei Verfahren, die den Transfer von Proteinen ermöglichen, wobei ersteres ein sehr schonendes Verfahren darstellt. Durchgeführt wurde hier ein Wet-Blot, bei dem die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF Immobilon P, Fa. Millipore) transferiert wurden. Diese Membranen zeichnen sich u.a.

durch ein gutes Signal/Hintergrundverhältnis mit chemilumineszenz-Detektionssystemen aus (Frey, 2002).

Benötigte Chemikalien:

Transferpuffer

- 1 x Transferpuffer (nach dem Protokoll der Fa. Invitrogen):
50 ml NuPAGE[®] Transfer Buffer 20 x (Fa. Invitrogen), 1 ml NuPAGE[®] Antioxidant (Fa. Invitrogen), 100 ml Methanol (Fa. Merck), 849 ml H₂O

Zur Vorbereitung des Transfers wurde die PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, für ca. 2 min in Methanol p.A. 100 % (Fa. Merck) gelegt und einige Schwämme (ebenfalls ca. Gelgröße) in Transfer-Puffer getränkt (luftblasenfrei). Die das Gel umgebenden Kunststoffplatten wurden mit einem geeigneten Messer (Fa. Invitrogen) geöffnet, die überstehenden Gelstücke an der Kammseite und der dickere Gelrand an der unteren Seite entfernt und ein in Transfer-Puffer getränktes Filterpapier (Whatman Chromatography paper 3 MM Crh) auf das Gel gebracht. Entsprechend den Herstellerangaben wurden anschließend in einem X-Cell II[™]Blot Module (Fa. Invitrogen) der Reihe nach folgende Komponenten von unten nach oben geschichtet: zwei Schwämme, das Filterpapier mit dem darauf befindlichen Gel, die PVDF-Membran, (Luftblasen wurden durch Rollen eines geeigneten Gegenstands über die geschichteten Komponenten entfernt), ein mit Transfer-Puffer getränktes Filterpapier und abschließend Schwämme, bis das X-Cell II[™]Blot Module ausgefüllt ist. Nach Verschluss des X-Cell II[™]Blot Module wurde dieses in die Xcell SureLock[™] Novex Mini-Cell Apparatur verbracht, innen mit Transferpuffer, außen mit Aqua dest. gefüllt und der Transfer für 1 Std. bei 30V durchgeführt.

3.5.4 Nachweisreaktion

Der Nachweis der Proteine erfolgte über die Bindung von Erst- und enzymmarkiertem Zweit-Antikörper. Als Erstantikörper wurde der anti-FLAG[®]M2 Antikörper (Fa. Stratagene), der gegen die antigene Determinante (das FLAG-Epitop) der Proteine gerichtet ist, eingesetzt. Der Zweitantikörper ist gegen den Erstantikörper gerichtet und in diesem

Fall an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, über das die Bindung visualisiert werden kann. Als Zweitantikörper diente der Ziege anti-Maus IgG F(ab')₂-spezifische Antikörper (Jackson ImmunoResearch). Durch die Bindung mehrerer Zweitantikörper an einen Erstantikörper kommt es zur Signalverstärkung (Frey, 2002).

Vor der Nachweisreaktion mussten überzählige Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden (sog. „Blocken“ mit Blotto (entfettete Trockenmilch)), damit es nicht zu einer unspezifischen Bindung der Nachweisreagenzien kommen konnte (Frey, 2002).

Benötigte Chemikalien:

- 1 x TBS:
aus 10 x TBS-Stammlösung: 80 g NaCl, 24,2 g Tris, HCl ad pH 7,6, Aqua bidest. ad 1 l
- 1 x TBST:
aus 10x TBST-Stammlösung: 80 g NaCl, 24,2 g Tris, HCl pH 7,6, Aqua bidest. ad 1 l, 0,3 % Tween 20 (Fa. Calbiochem)
- Blotto:
1 x TBS mit 5 % Magermilchpulver (Fa. Saliter) und 0,005 % Thimerosal USP (Fa. Merck)

Die PVDF-Membran, auf der sich nach dem Transfer die Proteine befanden, wurde aus dem X-Cell II™ Blot Module entnommen, zunächst bei Raumtemperatur getrocknet, dann für kurze Zeit in Methanol verbracht und anschließend für ca. 15 min bei 37°C im Inkubator erneut getrocknet. Nach der Trocknung wurde die Membran wieder in Methanol eingelegt und anschließend kurz in TBS gewaschen, bevor sie über Nacht bei 4°C in der Blocklösung Blotto auf einem Wipptisch inkubiert wurde.

Daraufhin wurde die Membran für ca. 2 min in 1 x TBS gewaschen und zum Nachweis der in-vitro gewonnenen Proteine mit dem Erstantikörper anti-FLAG® M2 in einer 1:1000 Verdünnung in Blotto für 1 Std. bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert (Membran muss ausreichend mit der Lösung bedeckt sein).

Nach der einstündigen Inkubation wurde die Lösung mit dem Erstantikörper entfernt und die Membran zweimal kurz in 1 x TBST gewaschen, bevor sie in einer neuen Schale zweimal für 15 min mit 1 x TBS-T unter Schwenken gewaschen wurde. Anschließend

wurde die Membran dann kurz in 1 x TBS gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Ziege anti-Maus IgG F(ab')₂-spezifisch), in einer 1:5000 Verdünnung in Blotto. Im Anschluß erfolgten die gleichen Waschschriffe wie nach der ersten Inkubation mit einem abschließenden kurzen Waschschriff in autoklaviertem Aqua dest.

3.5.5 Visualisierung

Durch Zusatz des Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Fa. Pierce) für das an den Zweit-Antikörper gebundene Enzym (HRP) wurde Licht emittiert. Diese Signale konnten anschließend auf einem Röntgenfilm dargestellt werden. Das verwendete Substrat zeichnet sich durch eine intensive Signalgebung aus und ermöglicht die Messung sehr geringer Mengen (pikogramm) Antigen (Instructions Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Fa. Pierce). Die beiden Komponenten (Stable Peroxide Solution und Luminol/Enhancer Solution) wurden nach Herstellerangaben in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und die Membran darin für 5 min inkubiert. Die Membran wurde danach luftblasenfrei in eine Folie (Fa. Leitz) eingeschweißt (Impulse Sealer, TEW), zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette eingelegt und entwickelt (AGFA curius 60).

3.6 Nachweis der Sequenzspezifischen Bindung der gewonnenen Proteine an DNA mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zur Beantwortung der eingangs gestellten Frage, ob die von den CREM-mRNA Isoformen codierten Proteine in der Lage sind, sequenzspezifisch an die DNA zu binden, wurde ein electrophoretic mobility shift assay (Bandshift-Analyse) durchgeführt. Diese Methode stellt die Standardmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen in-vitro dar (Schrumpf 2002).

Die zu analysierenden Proteine wurden hierzu zunächst mit einem entsprechenden, im voraus synthetisiertem fluoreszenzmarkierten doppelsträngigen DNA-Fragment inkubiert.

Als DNA-Fragment diente eine CRE-Sequenz, die durch Hybridisierung zweier synthetisch hergestellter Oligonucleotide gebildet wurde. In der Inkubationslösung entstandene Protein-DNA-Komplexe konnten daraufhin über eine native Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Detektion der Signale mit dem Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Pharmacia Biotech) dargestellt werden. Die am unteren Rand des Gels befindlichen Banden stellen ungebundene DNA-Fragmente dar, während weiter oberhalb befindliche Banden mit verändertem Laufverhalten („Bandshift“) die Protein-DNA-Komplexe erkennen lassen.

Um die Spezifität der Bindung zu prüfen, wurden zusätzlich Konkurrenzexperimente durchgeführt. Den Proteinen wurden hierbei neben dem markierten DNA-Fragment zusätzlich nicht markiertes DNA-Fragment oder ein DNA-Fragment, das Mutationen in seiner Sequenz enthält, im Überschuss zugefügt. Kann der unmarkierte Kompetitor das Protein binden, so nimmt die Intensität des Signals des spezifischen Protein-DNA-Komplexes ab, wohingegen das Signal nach Zusatz der mutierten CRE-Sequenz erhalten bleibt.

Zur Überprüfung der Identität des spezifischen DNA-Bindeproteins wurde außerdem eine Supershift-Analyse durchgeführt (List, 2002). Der Inkubationslösung wurden dabei markiertes DNA-Fragment und ein Antikörper zugefügt, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist. Verwendet wurde hier wiederum der anti-FLAG[®]M2 Antikörper (Fa. Stratagene). Erscheint eine zusätzliche Bande mit verzögertem Laufverhalten, wird dieses als „Supershift“ bezeichnet.

Als Positivkontrolle diente die bereits charakterisierte Isoform CREM- τ 2- α (Gellersen et al., 1997; Gellersen et al., 2002).

3.6.1 Hybridisierung der Oligonucleotide

Zur Herstellung von doppelsträngigen fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten wurden die synthetisch hergestellten und komplementär zueinander vorliegenden fluoreszenzmarkierten (Cy5), einzelsträngigen Oligonucleotide CRE-Cy5 sense: 5' AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG 3' (100 pmol/ μ l) und CRE-Cy5 antisense: 5' CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT 3' (100 pmol/ μ l) (Fa. IBA Nucleic Acids) verwendet. Jeweils 10 μ l der beiden Oligonucleotide wurden zusammen mit 18,56 μ l

autoklaviertem Aqua bidest. und 1,44 µl 5 M NaCl-Lösung in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Dieser Ansatz wurde für 4 min bei 95°C in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Fa. Eppendorf) inkubiert. Die Abkühlung erfolgte langsam über Nacht im Thermocycler bei geschlossenem Deckel. Die DNA-Fragmente lagen nach der Hybridisierung doppelsträngig vor. Es erfolgte eine Verdünnung auf 100 fmol/µl mit autoklaviertem A. bidest..

3.6.2 Herstellung eines 4 % Polyacrylamidgels

Benötigten Chemikalien:

- 5 x TBE-Puffer:
aus 10 x TBE Puffer (Fa. Invitrogen)
- 30 % (w/v) AA/BAA 37,5:1 (Acrylamid/Bisacrylamid Fa. Serva)
- 10 % APS (w/v) (Fa. ICN Biomedicals GmbH)
- TEMED (Fa. Serva)

Glasplatten, Taschenschablone und Abstandhalter wurden gründlich mit Spülmittel gereinigt, mit Aqua dest. gewaschen und mit 100 % Ethanol abgewischt. Zwischen zwei Glasplatten wurden U-förmig drei Abstandhalter angelegt und die Glasplatten von außen mittels mehrerer Klemmen fixiert. Zur Herstellung der 4 % igen Gellösung wurden 44,4 ml autoklaviertes Aqua bidest., 2,75 ml 5 x TBE-Puffer, 7,35 ml 30 % (w/v) AA/BAA, 480 µl 10 % APS und 20 µl TEMED in ein Becherglas gegeben, verrührt und luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Anschließend wurde eine Taschenschablone für 12 Taschen zwischen die Glasplatten eingesetzt. Nach der Polymerisation des Gels wurde dieses auf 4°C gekühlt.

3.6.3 EMSA

Benötigte Chemikalien:

- Proteinextraktionspuffer B:
10 mM HEPES (Fa. Sigma), 10 mM KCl (Fa. Merck), 0,1 mM EDTA (Fa. Roth), 0,1 mM EGTA (Fa. Fluka), 2 mM DTT (Fa. Calbiochem), 400 mM NaCl (Fa. Cambrex), 1 % IGEPAL (Fa. Sigma), 1 M KOH (Fa. Sigma) ad pH 7,4, 1 Tablette Protease Inhibitor Boehringer complete (Fa. Roche) ad 50 ml
- 4 x Bandshift- Puffer:
80 mM Tris pH 8,0, 4 mM EDTA, 10 mM DTT, 40 % Glycerol, 8 mM MgCl, 0,4 % IGEPAL, 200 ng/μl BSA (Fa. NEB)
- 10 x Loading Buffer:
40 mg Bromphenolblau, 40mg Xylencyanol, 5 ml Glycerol, 20 μl 0,5 M EDTA pH 8,0 (Fa. Sigma), autoklaviertes Aqua bidest. ad 10 ml
- 0,25 x TBE-Puffer (für die Elektrophorese ca. 2 l vorgekühlt auf 4°C)
aus 10 x TBE Puffer (Fa. Invitrogen)
- poly (deoxyinosinic acid-deoxycytidylic acid) (Poly(dIdC)) (Fa. Amersham/Pharmacia)
- ds CRE-Cy5 (fluoreszenzmarkiert) (100 fmol/μl) (s. 3.6.1)
- Kompetitoren:
 - unmarkierte ds CRE-Sequenz (10 pmol/μl):
aus Sequenzen wie unter 3.3.1 beschrieben jedoch ohne Fluoreszenzmarkierung (Fa. IBA Nucleic Acids)
 - mutierte ds CRE-Sequenz (40 pmol/μl):
aus sense: 5' AGAGATTGCCTGtgGTCAGAGAGCTAG 3' und
antisense: 5' CTAGCTCTCTGACcaCAGGCAATCTCT 3' (Fa. IBA Nucleic Acids)
- anti-FLAG[®]M2 Antikörper (Fa. Stratagene)

Tab. 1B: Pipettierschema für In-vitro Translatate

Reaktionsgefäß Nr.	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Aqua bidest.	8	5	7,25	6	8	5	7,25	6	8	5	7,25	6
Proteinextraktionspuffer B	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
4 x Bandshift-Puffer	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Poly(dIdC) (1,6 µg/µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
In-vitro Translatat CREM-θ2-F-G-H-Ib	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-
In-vitro Translatat CREM-θ2-G-H-Ib	-	-	-	-	4	4	4	4	-	-	-	-
In-vitro Translatat CREM-τ2-α	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4
unmarkierte ds CRE-Sequenz (10 pmol/µl)	-	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-
mutierte ds CRE-Sequenz (40 pmol/µl)	-	-	0,75	-	-	-	0,75	-	-	-	0,75	-
15 min Eis												
CRE-Cy5 (100 fmol/µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30 min Eis, dunkel												
anti-FLAG [®] M2 Antikörper	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2
30 min Raumtemperatur, dunkel												
Endvolumen	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Die Gelkammer wurde während der Inkubationszeiten des Reaktionsansatzes für die Bandshift-Analyse aus dem Kühlraum entnommen und die entstandenen Taschen vor Entfernung der Schablone auf der Glasplatte markiert. Die Taschen wurden vorsichtig mit 0,25 x TBE-Puffer zwecks Entfernung eventuell noch vorhandener Acrylamid-Reste gespült. Nach Entfernung des unteren Abstandhalters wurde die Gelkammer in die Elektrophoreseapparatur (Fa. Renner GmbH) eingesetzt und mittels Klemmen fixiert. Die Elektrophoreseapparatur wurde nun mit 0,25 x TBE-Puffer aufgefüllt, eventuell entstandene Luftblasen am unteren Rand der Gelkammer mit Hilfe einer Spritze und Kanüle entfernt, die Taschen nochmals mit 0,25 x TBE-Puffer gespült. Bevor die Proben in die Taschen gegeben wurden, erfolgte eine Vorelektrophorese bei 150 V für 15 min (Standard Power Pack P25, Fa. Biometra).

Nach der 30 minütigen Inkubationszeit des Reaktionsansatzes mit dem Antikörper wurden die Taschen erneut gewaschen und die Proben zügig hinein gegeben. Eine freie Tasche wurde mit Loading Buffer beschickt, um die Dauer der Elektrophorese anhand der Bromphenolblau-Front bestimmen zu können. Die Elektrophoresedauer betrug insgesamt 2

Stunden bei zunächst 300 V für 7 min, dann wurde die Voltzahl für die verbleibende Zeit auf 210 V reduziert. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

3.6.4 Visualisierung

Die Visualisierung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mit dem TyphoonTM 8600 Variable Mode Imager (molecular dynamics part of Amersham Pharmacia Biotech) bei 633 nm über die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente. Nach Anregung der zu messenden Probe wurde Licht emittiert, das in ein elektrisches Signal umgewandelt wurde und digitalisiert auf einem angeschlossenen Computer mittels entsprechender Software (ImageQuantTM) dargestellt werden konnte (Typhoon Variable Mode Imager, data file).

3.7 Nachweis der funktionellen Aktivität der Proteine in-vivo mittels

Luziferase-Reportergen-Analyse

Zum Nachweis der funktionellen Aktivität der Proteine in-vivo wurden Säugerzellen der humanen uterinen Myosarkomzelllinie SKUT-1B (HTB 115, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) mit dem (1) Reportergen-Konstrukt pCRE/-36rPRL/luc3 (Gellersen et al. 1997), (2) einem Expressionsvektor für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (pcDNA/c β) oder einer inaktiven Mutante davon (pcDNA/c β mut) und (3) den entsprechenden CRE-Isoformen im Expressionsvektor transfiziert. Das Reportergen-Konstrukt pCRE/-36rPRL/luc3 enthält ein CRE-Element vor einem Minimalpromotor (rPRL) und einem Luciferase-Reportergen (Gellersen et al., 1997; Gellersen et al., 2002). Nach Lyse der Zellen konnte die Expression des Reportergens, in diesem Fall das Enzym Luziferase, durch einen enzymatischen Test (Luciferase Assay System, Fa. Promega) gemessen werden. Nach Zugabe des Substrats Luziferin wurde dieses durch Luziferase in Oxylluziferin umgesetzt. Dabei wurde Licht emittiert, so dass die Enzymaktivität in einem Luminometer (Berthold Detection Systems, Sirius) als relative Lichteinheiten gemessen werden konnte (Teifel, 2002).

3.7.1 Kultivierung von SKUT-1B Zellen

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit SKUT-1B-Zellen wurden an einer sterilen Werkbank (Steril GARD, Biological Safety Cabinet, The Baker Company Sanford, Maine) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Kultivierung der SKUT-1B Zelllinie erfolgte in einem Nährmedium mit folgender Zusammensetzung (steril):

- Dulbecco's Modified EAGLE'S Medium (DMEM) (Fa. Sigma) und Nutrient mixture F-12 HAM Hepes modification (Fa. Sigma), gemischt in einem Verhältnis von 1 : 1
- 10 % Foetal Bovine Serum (Fa. PAA Laboratories GmbH)
- 2 mM L-Glutamin (Fa. PAA Laboratories GmbH)
- 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Fa. PAA Laboratories GmbH)

Das Medium wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in T 75 Nunclon™ Surface Flaschen (Fa. Nunc) in ca. 10-12 ml Medium bei 37°C und 5 % CO₂-Zufuhr in einem Inkubator (Fa. Heraeus) bei wassergesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte bei Konfluenz 1:5 mit Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 %, Fa. PAA Laboratories GmbH). Hierzu wurde das alte Medium aus der Flasche abgesaugt (Pipetus^R-akku, Fa. Hirschmann) und die Zellen mit auf 37°C erwärmtem Trypsin/EDTA bedeckt, das nach kurzem Schwenken wieder abgesaugt wurde. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA mit anschließender Inkubation der Zellen für ca. 5 min im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden (Beurteilung unter dem Mikroskop, Fa. Olympus CK X 41) und Resuspendierung durch Pipettieren wurden 1/5 der Zellsuspension in eine neue Flasche mit ca. 12 ml frischem Medium überführt und weiter kultiviert (37°C, 5 % CO₂, wassergesättigte Luftatmosphäre).

3.7.2 Aussäen von SKUT-1B Zellen für die Transfektion

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 24-Loch-Platten ausgesät. Hierzu erfolgte zunächst eine Beschichtung des Bodens der 24-Loch-Platten (Multiwell™ 24 Well Tissue Culture Plates, Fa. BD Biosciences) mit Poly-L-Lysin (0,5 ml einer 0,1 mg/ml Lösung zur Beschichtung von 25 cm², Fa. Sigma). Die entsprechende Menge wurde in jede Vertiefung der Platten gegeben, nach 5 min abgesaugt und die Vertiefungen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen.

Zum Ausplattieren wurde nach Anzucht der Zellen und Beurteilung der Konfluenz und eventueller Kontaminationen unter dem Mikroskop das Medium aus den T 75 Flaschen abgesaugt, wie oben beschrieben vorgewärmtes Trypsin/ EDTA hinzugefügt, ebenfalls abgesaugt und 1,5ml Trypsin/ EDTA hinzugegeben. Nach dem Ablösen der Zellen vom Untergrund (Begutachtung unter dem Mikroskop) wurden ca. 11 ml vorgewärmtes Medium ohne Penicillin / Streptomycin zu den Zellen in die T 75 Flaschen gegeben und durch Pipettieren gemischt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl der Zellsuspension in 5 ml Casy[®]ton Lösung (Schärfe Systems) gegeben und die Messung in einem Casy-Gerät (Schärfe Systems) durchgeführt. Das Volumen mit der benötigten Zellzahl ($0,5 \times 10^5$ Zellen/Kavität) wurde aus dem 50 ml Zentrifugenröhrchen entnommen und für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in der erforderlichen Menge Nährmedium (500 µl/Kavität) aufgenommen. Für die Transfektionen wurden pro Kavität $0,5 \times 10^5$ Zellen in 500 µl ausgesät und für einen Tag bei 37°C, 5 % CO₂-Zufuhr und wassergesättigter Luftatmosphäre inkubiert.

3.7.3 Transfektion von SKUT-1B Zellen

Durchgeführt wurden die Transfektionen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Fa. Invitrogen) in Triplikaten nach den Herstellervorgaben. Pro Kavität wurden 0,5 µg Plasmid-DNA des Reportergens Luciferase (pCRE/-36r PRL/luc 3), 0,01 µg des Expressionsvektors für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (pcDNA/cβ) oder 0,01 µg einer inaktiven Mutante davon (pcDNA/cβmut) und 0,04 µg der entsprechenden CREM-cDNA im Expressionsvektor CREM-02-E-F-G-H-Ib, CREM-02-E-F-H-Ib, CREM-

02-F-G-H-Ib und CREM- 02-G-H-Ib eingesetzt. Als Kontrolle wurden die Leervektoren pcDNA/FLAG-His und pcDNA 3.1- (Invitrogen) und die bereits charakterisierten Isoformen CREM- τ 2- α respektive CREM- α eingesetzt (0,04 μ g) (Gellersen et al. 1997, 2002) (Abb. 10). Die Expressionsvektoren wurden für die Transfektion vorab auf 0,1 μ g/ μ l mit TE-Puffer verdünnt (Volumen ca. 20 μ l; die Verdünnungen wurden für jede Transfektion neu angesetzt).

Für die Transfektion wurde in einem ersten Schritt die Plasmid-DNA zu OptiMEM I + GlutaMAXTMI (50 μ l/Kavität) (Fa. Gibco, Invitrogen) hinzugefügt. In einem zweiten Schritt wurde das LipofectamineTM 2000 (2 μ l/Kavität) in OptiMEM I + GlutaMAXTMI (50 μ l/Kavität) verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min wurde das verdünnte LipofectamineTM 2000 mit der verdünnten DNA vermischt. Während einer 15 minütigen Inkubationszeit bildeten sich die DNA-LipofectamineTM 2000 Komplexe aus. Der Transfektionsmix wurde anschließend in eine Kavität mit den darin enthaltenen Zellen und dem Medium gegeben und durch vorsichtiges hin- und herschieben der Platten gemischt. Abb. 11 zeigt das Prinzip und die eingesetzten Mengen DNA, LipofectamineTM 2000 und Medium für eine einzelne Transfektion.

Pipetiert wurden die Ansätze jedoch nicht für jede einzelne Kavität, sondern drei Mastermixansätze für die entsprechende Anzahl der Kavitäten, die anschließend aufgeteilt wurden. Mastermix (A), bestehend aus Reporter pCRE/-36r PRL/luc 3, Expressionsvektor **pcDNA/c β mut** und OptiMEM I + GlutaMAXTMI, wurde für die Hälfte der Anzahl der Kavitäten hergestellt und zu je 150 μ l (entspricht der Menge für ein Triplikat) auf Mikroreaktionsgefäße verteilt. Mastermix (B), hergestellt für die zweite Hälfte der Kavitäten, bestand aus dem Reporter pCRE/-36r PRL/luc 3, Expressionsvektor **pcDNA/c β** und OptiMEM I + GlutaMAXTMI und wurde ebenfalls zu je 150 μ l (entspricht der Menge für ein Triplikat) auf weitere Reaktionsgefäße verteilt.

0,12 μ g (0,04 μ g x 3, da Triplikate) der entsprechenden Expressionsvektoren aus den Verdünnungen in TE-Puffer wurden separat zu den Reaktionsgefäßen gegeben. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Plasmide wurde irrelevantes Plasmid (p0GH, Fa. Nichols Institute Diagnostics, Ca) in entsprechender Menge hinzugefügt, um die gleiche Menge DNA in jeder Kavität zu gewährleisten.

Ein dritter Mastermix (C) für die gesamte Anzahl der Kavitäten enthielt LipofectamineTM 2000 und OptiMEM I + GlutaMAXTMI. 150 μ l des Mastermix C wurden in jedes

Reaktionsgefäß mit der DNA gegeben. Nach Inkubation der DNA mit dem Lipofectamine™ 2000 wurde das Gemisch zu den SKUT-1B-Zellen in die Kavitäten gegeben.

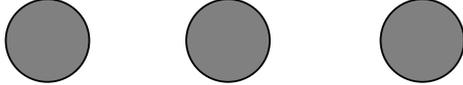
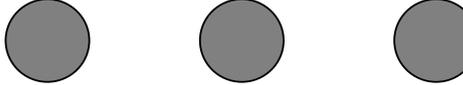
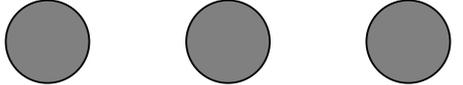
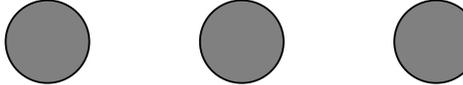
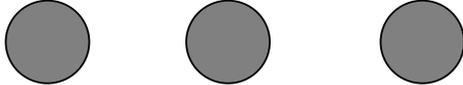
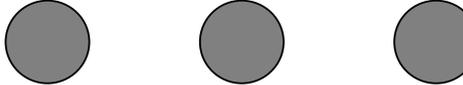
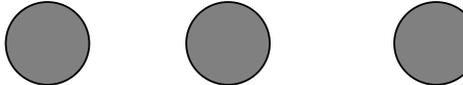
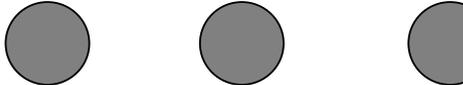
<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβmut (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-E-F-G-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 	<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβ (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-E-F-G-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 
<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβmut (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-E-F-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 	<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβ (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-E-F-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 
<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβmut (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-F-G-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 	<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβ (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-F-G-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 
<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβmut (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-G-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 	<p>pCRE/-36r PRL/luc 3 (0,5 µg/Kavität) pcDNA cβ (0,01 µg/Kavität) CREM-θ2-G-H-Ib (0,04 µg/Kavität) Lipofectamine 2000 (2 µl/Kavität)</p> 

Abb. 10: Schematische Darstellung einer 24-Loch-Platte mit den enthaltenen, zu transfizierenden Zellen. Für die Transfektion eingesetzte Plasmide, das Transfektionsreagenz und die verwendeten Mengen sind jeweils oberhalb der Kavitäten angegeben (CREM- τ 2- α und CREM- α sind hier nicht aufgeführt).

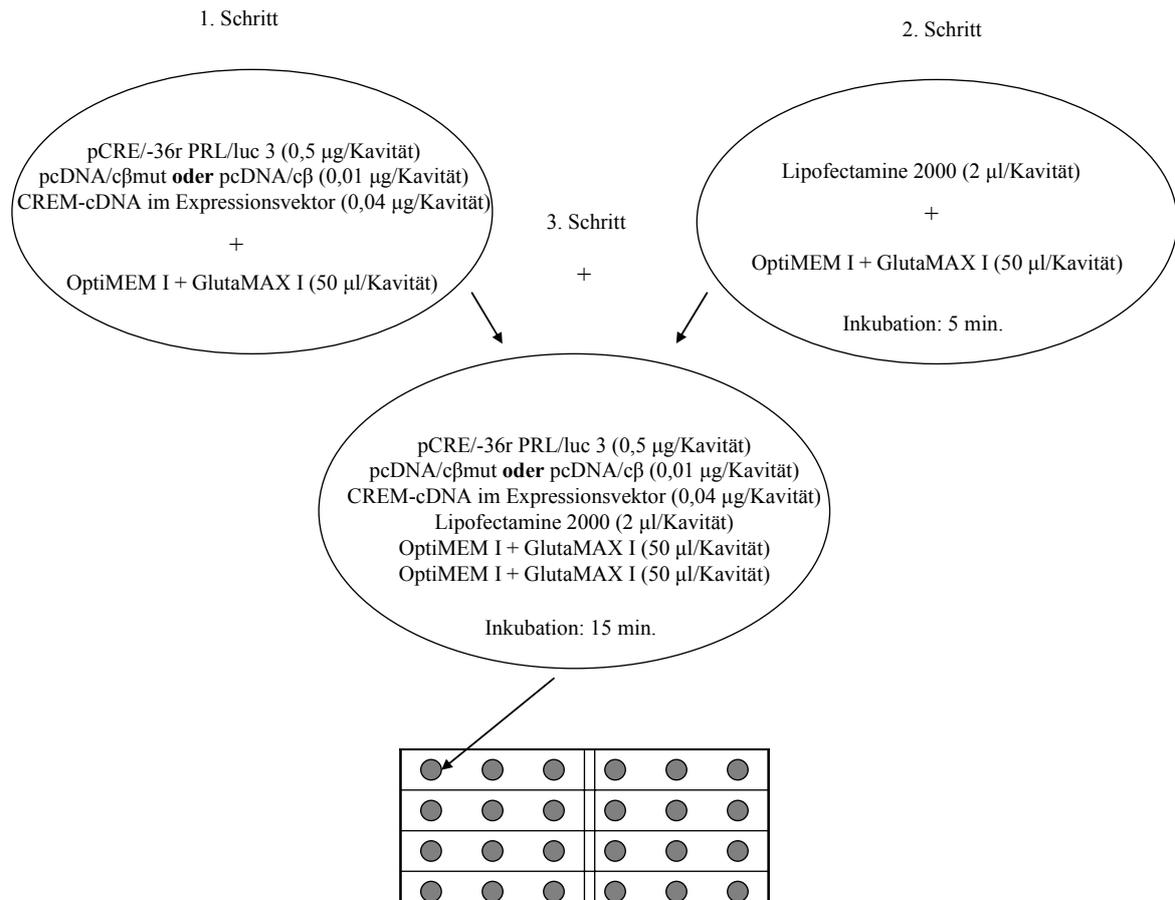


Abb. 11: Vorgehensweise für die Transfektion anhand eines Beispiels für eine Kavität.

3.7.4 Luziferase-Reportergen-Analyse

Benötigte Chemikalien:

- 1 x Passive Lysis Buffer:
aus 5 x Passive Lysis Buffer (Fa. Promega) und autoklaviertem Aqua bidest.
- Luciferase Assay System (E1501, Fa. Promega)

Zur Messung der Expression des Reportergens (Luziferase) wurden die Zellen zunächst mit Passive Lysis Buffer (Fa. Promega) lysiert. Hierzu wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Kavitäten mit 500 µl PBS gewaschen und nach Entfernung des Puffers 100 µl 1 x Passive Lysis Buffer in jede Kavität gegeben. Die 24-Loch-Platte wurde für 30 min auf einen Wipptisch (WT 16, Fa. Biometra) gelegt. Der Überstand aus den Kavitäten wurde in

Mikroreaktionsgefäße überführt und für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte mit dem Luciferase Assay System von Promega, einem enzymatischem Test, bei dem das zugefügte Substrat Luziferin von der Luziferase in Oxylluziferin umgesetzt wird. Das hierbei emittierte Licht wurde in relativen Lichteinheiten gemessen (rlu) (Teifel, 2002; Technical Bulletin, Fa. Promega). 50µl des Luciferasereagenz wurden in 5ml Röhrchen (75 x 12 mm Ø, Fa. Sarstedt) vorgelegt. Von der zu untersuchenden Probe wurden 20 µl des Überstandes erst unmittelbar vor jeder Messung hinzugegeben und im Luminometer (Berthold Detection Systems, Sirius) gemessen. Die Messwerte wurden direkt an einen Computer übermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Sequenzanalyse

Basierend auf der cDNA-Sequenz der zu analysierenden CREM-Isoformen konnten potentielle Proteine unterschiedlicher Größe abgeleitet werden. Aus einer Isoform können bedingt durch alternative Startpunkte für die Translationsinitiation in den verschiedenen Exons potentiell mehrere Proteine hervorgehen. In den beiden zu analysierenden Isoformen CREM-02-F-G-H-Ib und CREM-02-G-H-Ib ist Exon 02 direkt an Exon F respektive G gespleißt. Dies bedingt eine Unterbrechung des bekannten Leserasters unter der Voraussetzung, dass das am äußersten 3'Ende gelegene ATG Triplet in Exon 02 für die Translationsinitiation genutzt wird. Die Entstehung nur sehr kurzer Translationsprodukte wären die Folge. Bei der Isoform CREM-02-F-G-H-Ib könnte jedoch ein weiter vorne in Exon 02 liegendes ATG (markiert als ATG ?) (Abb. 12) für die Initiation der Translation genutzt werden. Es ergäbe sich ein neues offenes Leseraster in Exon 02, wobei dann ein Protein voller Länge entstehen könnte. Beide potentiellen Translationsinitiationspunkte in Exon 02 führen in Isoform CREM-02-G-H-Ib jedoch nicht zur Synthese von Proteinen ganzer Länge. Potentielle Proteine würden hier erst ab einem ATG in Exon G entstehen. Abb. 13 zeigt die Exonzusammensetzung der CREM-cDNAs mit markierten alternativen Startpunkten für die Translationsinitiation und den potentiell resultierenden Proteinen und deren Molekülmasse. Erwähnt sei an dieser Stelle, dass sich die angegebenen Molekülmassen um ca. 2 kDa von denen aus einer früheren Studie (Gellersen et al., 2002) aufgrund eines längeren 3'Endes des Expressionsvektors unterscheiden.

Exon 02

?

5' GGA ACATTCTTAG CCACCGAAGT ATGGGCACCA AAAGCGATAA GGAGCAT**AT**GTG

TTCCTTAATAAATGTCACAT CAGAAAATGA CTGTTCCAGG ACAGTAAACCA CCTACCG**AT**G 3'

Abb. 12: Humane Sequenz des Exon 02 nach Gellersen et al. (2002). Das für die Translationsinitiation bekannte ATG am äußersten 3'Ende ist fett dargestellt (siehe auch Abb. 7 S. 22). Ein potentielles neues ATG für die Translationsinitiation Richtung 5'Ende gelegen ist fett dargestellt und mit einem Fragezeichen versehen.

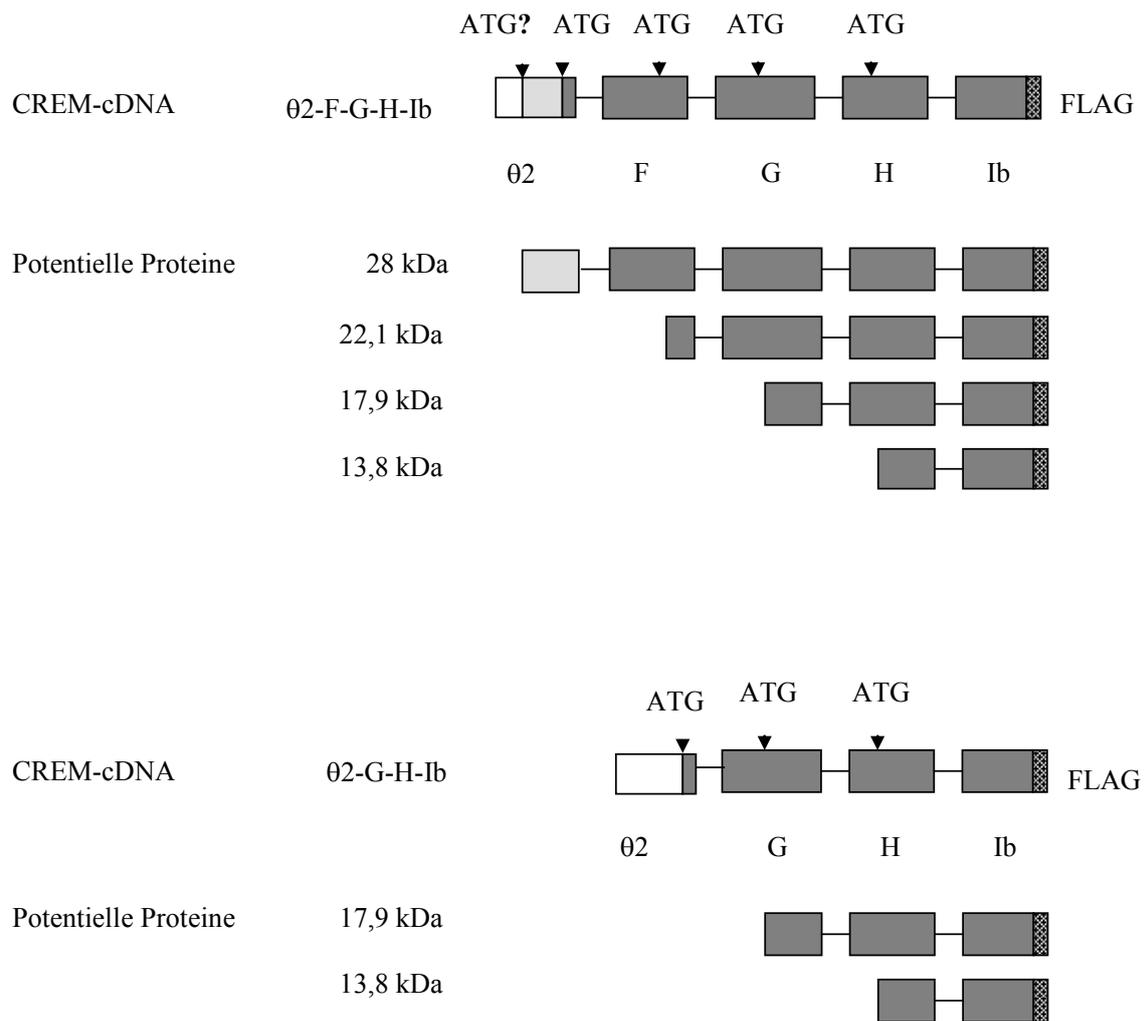


Abb. 13: CREM-cDNAs und Ableitung potentieller Proteine. Das bekannte offene Leseraster mit Translationsinitiation am letzten 3' Triplet von Exon 02, abgeleitet von den Isoformen CREM-02-E-F-G-H-Ib und CREM-02-E-F-H-Ib (Gellersen et al., 2002), ist in dunkelgrau dargestellt. ATG ? markiert die weiter vorn in Exon 02 liegende Möglichkeit der Translationsinitiation. Das alternative offene Leseraster ist in hellgrau dargestellt. Die potentiell resultierenden Proteine und deren Molekülmasse sind jeweils unter den cDNAs aufgeführt.

4.2 Nachweis der gewonnenen Proteine mittels Western Blotting

Mit den CREM-cDNAs im Expressionsvektor wurde zur Gewinnung der Proteine eine in-vitro Transkription/Translation durchgeführt. Über das integrierte FLAG-Epitop konnten mittels Western Blot unter Verwendung des anti-FLAG[®] M2 Antikörpers Proteine, die aus den untersuchten Isoformen gebildet wurden, nachgewiesen werden (Abb. 14).

Aus der Isoform θ 2-F-G-H-Ib gingen Proteine ganzer Länge mit einer Molekülmasse von ca. 28 kDa und kürzere Formen von 22,1 kDa hervor. Die beiden anderen aus der cDNA Sequenz abgeleiteten Proteine (17,9 und 13,8 kDa s. Abb. 13) wurden nicht gebildet. Von Isoform θ 2-G-H-Ib wurde ein Protein von ca. 17,9 kDa Molekülmasse gebildet, wobei die Translation in Exon G beginnt. Ein Protein mit Translationsinitiation in Exon H konnte nicht detektiert werden.

Translationsprodukte ganzer Länge mit Initiation in Exon θ 2 entstanden nur bei einer der beiden zum Vergleich mit einbezogenen Isoformen. Im Western Blot wurde ein Signal geringer Intensität bei ca. 29,3 kDa (θ 2-E-F-G-H-Ib) detektiert. Ein weiteres Signal konnte bei ca. 22,1 kDa festgestellt werden. Proteine der Isoform θ 2-E-F-H-Ib wurden erst ab Exon F synthetisiert (15,9 kDa). Ebenfalls zum Vergleich mit einbezogen wurden in-vitro Translationsprodukte der bereits charakterisierten Isoform CREM- τ 2- α , bestehend aus den Exons B, E, F, H und Ia (Gellersen et al., 1997, 2002), wobei Proteine von 32,5 und 20 kDa evident wurden.

Das kleinste potentielle Protein von 13,8 kDa wurde bei keiner der untersuchten Isoformen gebildet. Translationsprodukte des leeren Expressionsvektors (pcDNA/FLAG-His) ergaben ebenfalls kein Signal in der Western Blot Analyse.

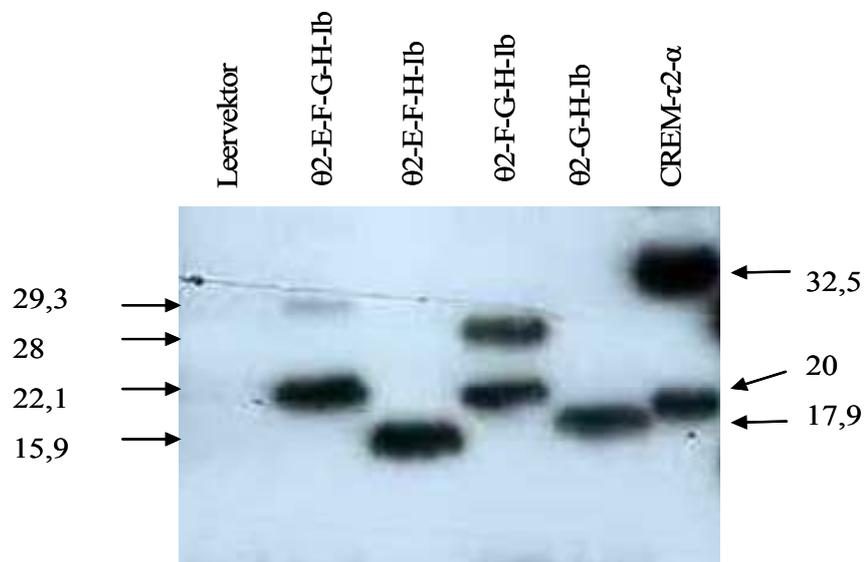


Abb. 14: Western Blot Analyse der in-vitro translatierten Proteine der CREM-Isoformen. Detektion mittels anti-Flag[®] M2-Antikörper. Die Molekülmasse ist in kDa angegeben.

4.3 Nachweis der Sequenzspezifischen Bindung der gewonnenen Proteine an DNA mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zur Klärung der anfangs gestellten Frage, ob die von den CREM mRNA-Isoformen kodierten Proteine sequenzspezifisch an die DNA binden können, wurden EMSAs mit den in-vitro gewonnenen Proteinen durchgeführt (Abb. 15A und 15B). Spur 1 zeigt einen Reaktionsansatz, in dem nur die fluoreszenzmarkierte CRE-Sequenz enthalten ist (gekennzeichnet durch *). Nach Inkubation des in-vitro Translatats des leeren Expressionsvektors pcDNA/FLAG-His (Spuren 2-3) sowie der CREM in-vitro Translatate mit der fluoreszenzmarkierten CRE-Sequenz (Spuren 4-23) wurde ein Komplex sichtbar (Rechteck), der sich nach Zugabe eines 300 fachen Überschusses einer unmarkierten CRE-Sequenz nicht kompetitieren ließ. Ein zweiter Komplex, gekennzeichnet durch zwei Rechtecke, konnte sowohl mit der unmarkierten CRE-Sequenz im Überschuß als auch mit der mutierten CRE-Sequenz kompetitiert werden.

Eine spezifische Bindung der Proteine an die CRE-Sequenz konnte bei allen Proben, die CREM-Translationsprodukte enthielten, nachgewiesen werden. Proteine der Isoform θ 2-F-G-H-Ib ließen drei Komplexe entstehen, die durch einen Überschuß unmarkierter CRE-Sequenz kompetitiert und mit dem anti-Flag[®] M2-Antikörper supergeschiftet wurden. Die Zugabe der mutierten CRE-Sequenz hingegen bedingt jedoch keine Competition (Spuren 12-15). θ 2-G-H-Ib bringt einen spezifischen Komplex hervor (Spuren 16-19).

Proteine der Isoform θ 2-E-F-G-H-Ib bildeten drei Komplexe durch Bindung an die DNA, die nur mit dem unmarkierten CRE-Element kompetitiert und mittels Antikörper supergeschiftet werden konnten (Spuren 4-7). CREM- θ 2-E-F-H-Ib Protein-DNA-Bindung resultierte in einem spezifischen Komplex (Spuren 8-11). CREM- τ 2- α wurde als Kontrolle eingesetzt und bildet zwei spezifische Protein-DNA-Komplexe (Spuren 20-23).

	Leervektor			θ2-E-F-G-H-Ib				θ2-E-F-H-Ib			
CRE unmarkiert	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
CRE mutiert	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
anti-FLAG	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

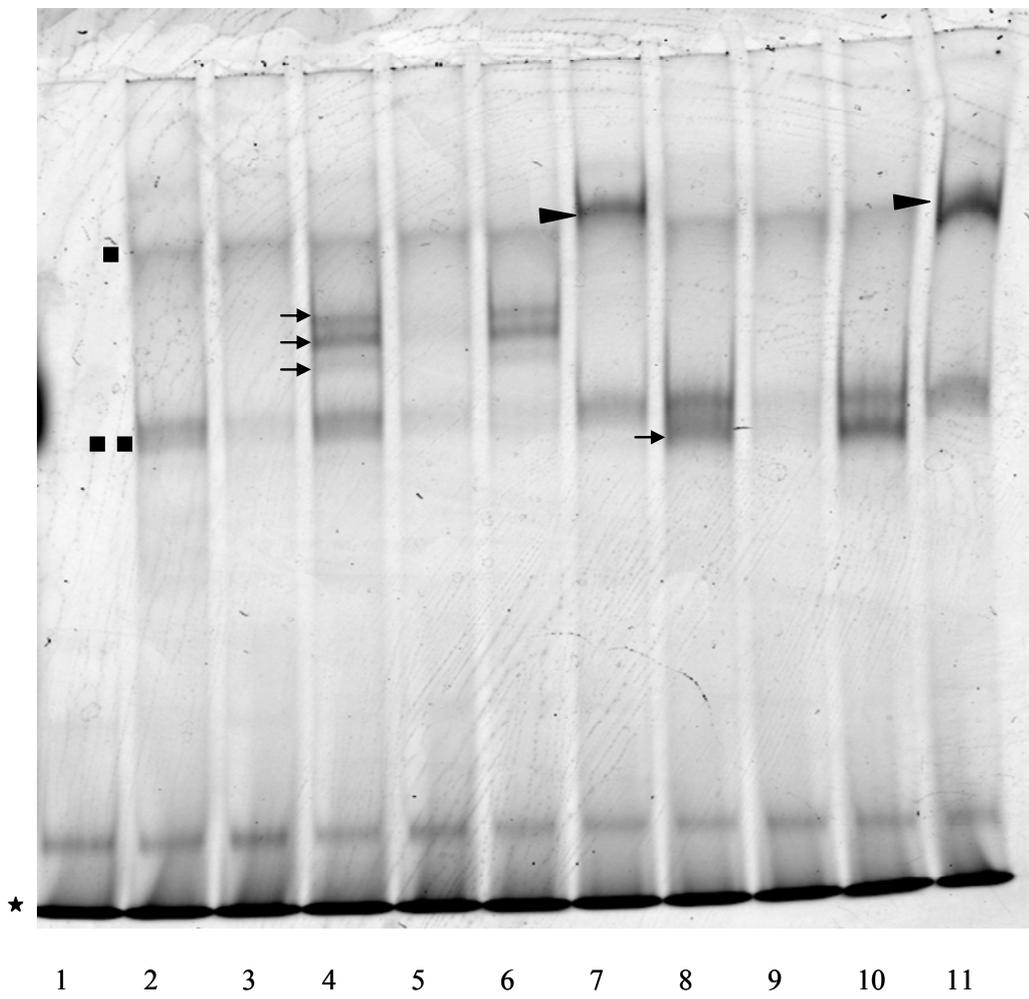


Abb. 15A

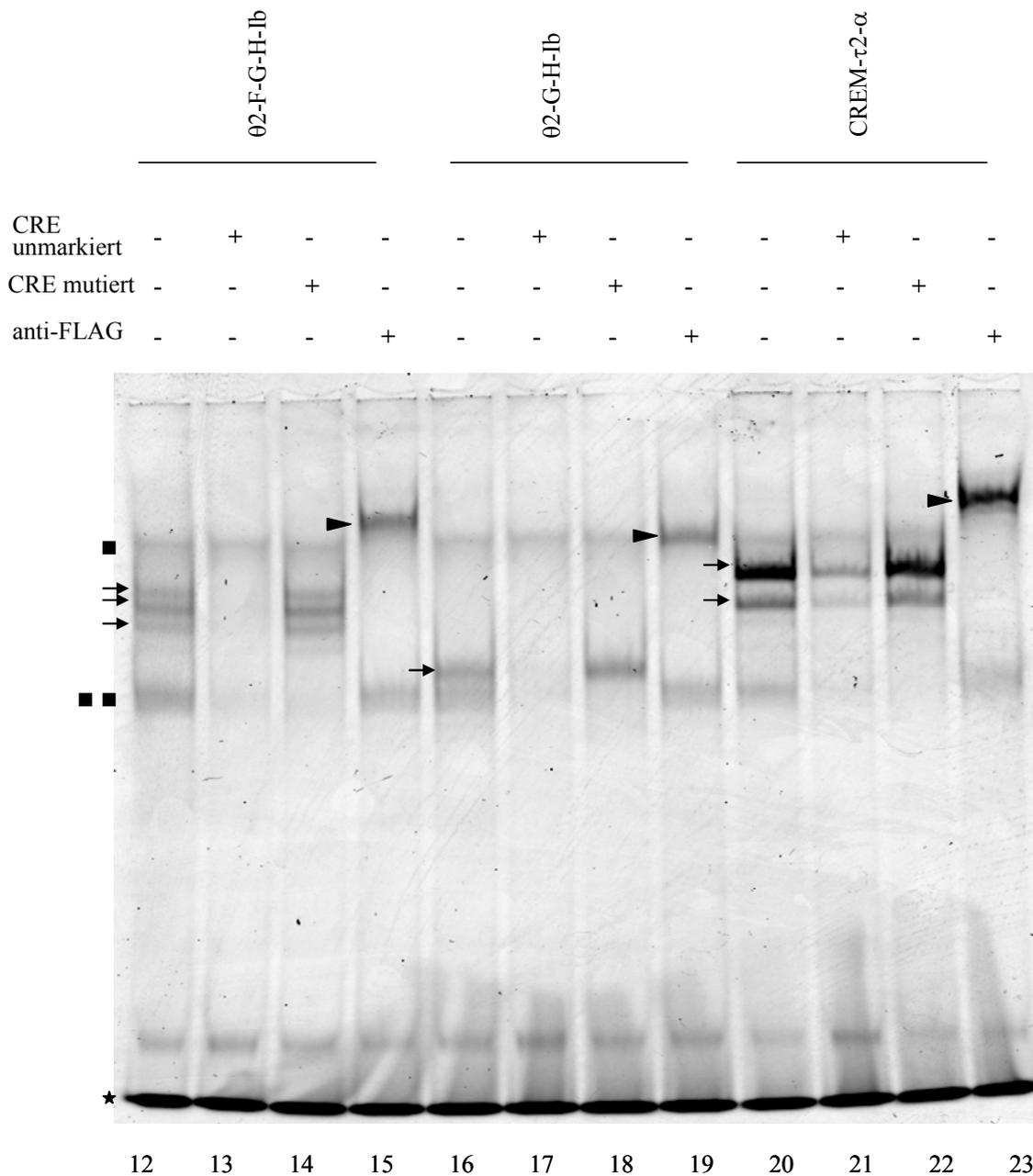


Abb15B

Abb. 15A und B: EMSAs mit in-vitro translatierten Proteinen der CREM-Isoformen. Am unteren Gelrand ist die fluoreszenzmarkierte CRE-Sequenz sichtbar (*). Komplexe, die sich durch Überschuss einer unmarkierten CRE-Sequenz nicht kompetieren ließen, sind gekennzeichnet durch ein Rechteck. Zwei Rechtecke zeigen Komplexe an, die sowohl mit der unmarkierten CRE-Sequenz im Überschuß, als auch mit der mutierten CRE-Sequenz kompetitiert wurden. Pfeile markieren spezifische Komplexe, Pfeilköpfe den Supershift. Die Anwesenheit bzw. Abwesenheit der unmarkierten CRE-Sequenz, mutierten CRE-Sequenz und des Antikörpers in den einzelnen Spuren sind durch + bzw. – oberhalb des Gels angezeigt. (Die Spur in der sich Ladepuffer (0 in Tab. 1) befand wurde in Abb. 14A

entfernt, da es sich hierbei nur um einen Anhaltspunkt für die Dauer der Elektrophorese handelte.)

4.4 Nachweis der funktionellen Aktivität der Proteine in-vivo mittels

Luziferase-Reportergen-Analyse

Zum Nachweis der funktionellen Aktivität der von den CREM-mRNA Isoformen kodierten Proteine wurden Säugerzellen mit einem Plasmid transfiziert, das ein CRE-Element vor einem Minimalpromotor und einem Luciferase-Reportergen enthält. Dazu transfiziert wurden entweder ein Expressionsvektor für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (pcDNA/c β) oder eine inaktive Mutante davon (pcDNA/c β mut) und die entsprechenden CREM-Isoformen im Expressionsvektor bzw. der Leervektor. Nach Lyse der Zellen wurde die enzymatische Aktivität der Luziferase gemessen. Die mittels Säulendiagramm (Abb. 16A und 16B) abgebildeten Werte stellen Durchschnittswerte dar, die jeweils aus einem Triplikat gebildet wurden.

Nach Transfektion der Zellen mit pcDNA/c β mut und dem Leervektor konnte die Basalaktivität des Reportergenkonstrukts, die durch zelleigene CRE-bindende Proteine und Proteinkinasen hervorgerufen wird, gemessen werden. Die jeweiligen CREM-Isoformen im Expressionsvektor in Kombination mit pcDNA/c β mut beeinflussten die Basalaktivität kaum.

Durch Transfektion der Zellen mit pcDNA/c β wurde das Reportergenkonstrukt aktiviert (siehe Leervektor + pcDNA/c β), vermittelt durch die Phosphorylierung zelleigener CRE-bindender Proteine durch den von außen zugeführten Expressionsvektor für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A. CREM-Isoformen mit aktivierender Funktion erhöhen die Aktivität des Reportergenkonstrukts, Isoformen mit reprimierender Funktion erniedrigen sie.

Die Transfektion von Zellen mit CREM- θ 2-F-G-H-Ib und den bereits charakterisierten Formen CREM- θ 2-E-F-G-H-Ib und CREM- θ 2-E-F-H-Ib zusammen mit pcDNA/c β zeigt, dass die gemessenen Werte in beiden Transfektionsexperimenten niedriger sind, als die für den Leervektor ermittelten. Die für CREM- θ 2-G-H-Ib gemessene Werte liegen ungefähr im Bereich des für den Leervektor ermittelten Wertes.

Ein weiteres Transfektionsexperiment, wurde von der Arbeitsgruppe Gellersen durchgeführt. Nach einer statistischen Auswertung der Experimente durch Frau Gellersen wurde deutlich, dass die pcDNA/c β abhängige Aktivierung des Reportergenkonstrukts bei CREM- θ 2-F-G-H-Ib, CREM- θ 2-E-F-G-H-Ib und CREM- θ 2-E-F-H-Ib, nicht jedoch bei

CREM- θ 2-G-H-Ib signifikant inhibiert wurde. Proteine der ersten drei Isoformen stellen somit überwiegend Repressoren dar (Jaspers et al, 2007).

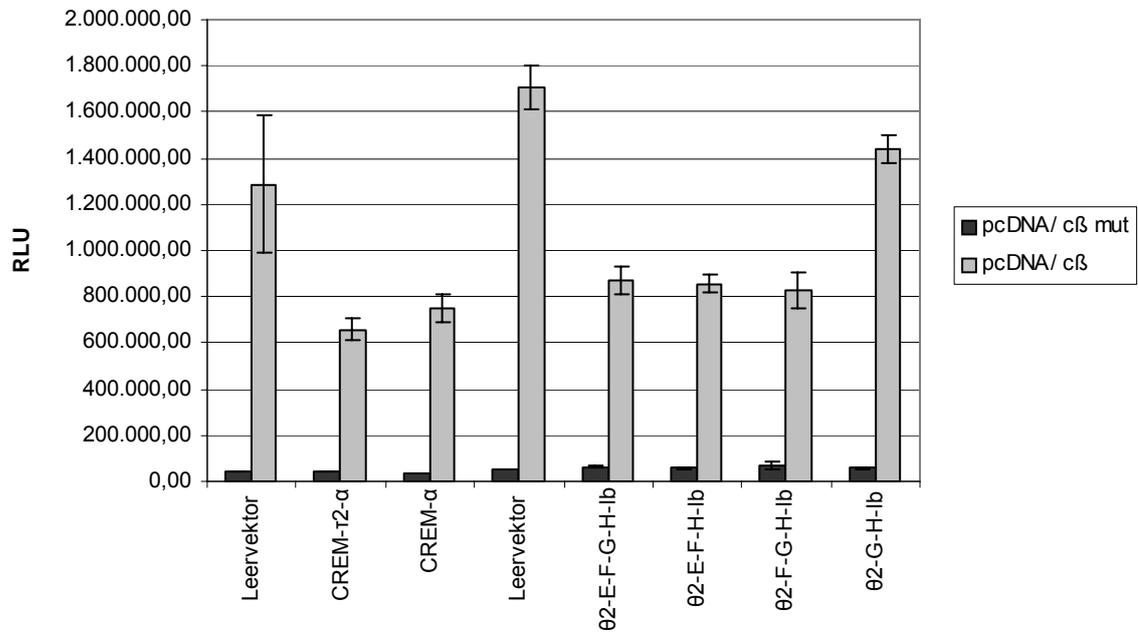


Abb. 16A

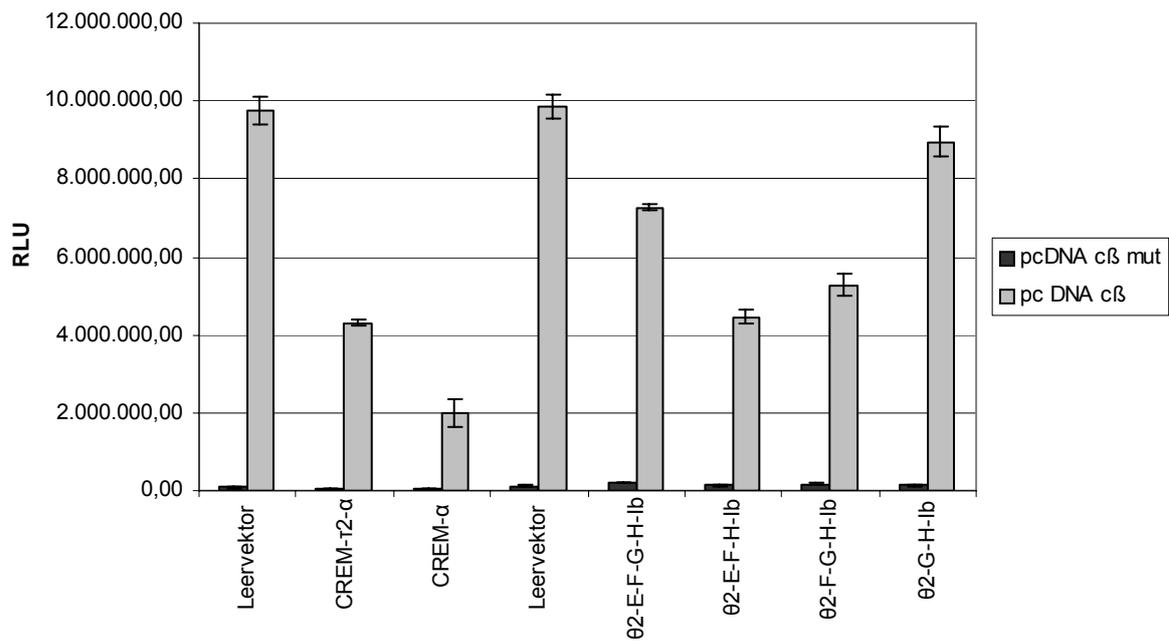


Abb. 16B

Abb. 16A und B: Transkriptionale Aktivität der CREM-Isoformen nach gleichzeitiger Transfektion mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (pcDNA/cβ) = hellgraue Säulen oder einer inaktiven Mutante davon (pcDNA/cβmut) = schwarze Säulen. Die Enzymatische Aktivität der Luziferase ist in relativen Lichteinheiten angegeben (RLU).

5. DISKUSSION

Der Transkriptionsfaktor CREM spielt bei der Regulation der mRNA-Expression und somit der Genexpression in haploiden Keimzellen eine entscheidende Rolle (De Cesare u. Sassone-Corsi, 2000). CREM bindet an eine spezifische DNA-Sequenz (CRE) und vermag so die Transkription von Zielgenen zu beeinflussen (Sassone-Corsi, 1995). Aus dem CREM-Gen entstehen durch diverse Mechanismen Isoformen mit aktivierendem oder reprimierendem Potential (Delmas et al., 1992; Walker u. Habener, 1996). Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, ob von den CREM-mRNA Isoformen $\theta 2$ -F-G-H-Ib und $\theta 2$ -G-H-Ib Proteine translatiert werden, ob diese Proteine dann in-vitro sequenzspezifisch an die DNA binden können und ob sie funktionell als transkriptionale Aktivatoren oder Repressoren fungieren.

Bisherige funktionelle Studien berücksichtigen Isoformen, in denen Exon E direkt an Exon $\theta 2$ gespleißt ist. Das am 3'Ende von Exon $\theta 2$ liegende ATG trägt als Start-Codon zu einem offenen Leseraster bei, so dass Proteine ganzer Länge aus diesen Isoformen entstehen können (Gellersen et al., 2002). Bei den hier untersuchten Isoformen **$\theta 2$ -F-G-H-Ib** und **$\theta 2$ -G-H-Ib** ist Exon $\theta 2$ direkt an Exon F respektive Exon G gespleißt, wodurch das offene Leseraster unter der Voraussetzung, dass das am äußersten 3'Ende gelegene ATG in Exon $\theta 2$ für die Translationsinitiation genutzt wird, unterbrochen wird.

Die nach der Analyse der Isoform CREM- $\theta 2$ -F-G-H-Ib im Western Blot erhaltenen Ergebnisse weisen erstmalig darauf hin, dass ein weiter in 5'Richtung liegendes ATG in Exon $\theta 2$ als Start-Codon für die Translationsinitiation genutzt wurde. Dies führt zur Bildung eines Proteins voller Länge von 28 kDa mit einem neuen offenen Leseraster in Exon $\theta 2$. Das kleinere Protein, das von Isoform CREM- $\theta 2$ -F-G-H-Ib translatiert wurde entspricht der kürzeren von Gellersen et al. (2002) beschriebenen Form S-CREM- $\tau 2$ - β , bei dem die Translation in Exon F initiiert wird. Eine S-CREM-Form (21 kDa), deren Molekülmasse annähernd der des kleineren Proteins von $\theta 2$ -F-G-H-Ib entspricht, ist auch von Delmas et al. (1992) im Gehirn von Mäusen beschrieben worden. Es handelt sich dabei um ein Protein, das durch alternative Translationsinitiation Strangabwärts aus CREM τ hervorgeht (Delmas et al., 1992), wobei diese Form zusätzlich eine für nur wenige Aminosäuren kodierende γ Domäne enthält, die in menschlichen Transkripten nur bei

gestörter Spermatogenese nachgewiesen wurde (Behr u. Weinbauer, 2000). Erwartungsgemäß bringt $\theta 2$ -G-H-Ib aufgrund der Unterbrechung des Leserasters kein Protein voller Länge hervor. Weder das am äußersten 3'Ende gelegene ATG, noch das weiter vorne in Exon $\theta 2$ liegende ATG bedingen ein offenes Leseraster.

Eine DNA-Bindung erfolgt via Dimerbildung über eine DNA-Bindedomäne (DBD) der Proteine (Habener et al., 1995), wobei die Bindung über Homo- oder Heterodimerbildung erfolgen kann (Foulkes et al., 1992; Behr u. Weinbauer, 2001). Die beiden analysierten Isoformen CREM- $\theta 2$ -F-G-H-Ib und CREM- $\theta 2$ -G-H-Ib enthalten an ihrem 3'Ende die DBDII, eine der beiden alternativen Bindedomänen (Foulkes et al., 1991; Masquillier et al., 1993). Bei allen untersuchten CREM-Translationsprodukten konnte eine sequenzspezifische Bindung an die DNA nachgewiesen werden. Wurde im Western Blot ein Protein nachgewiesen, wie bei $\theta 2$ -E-F-H-Ib (CREM- $\theta 2$ - β) und CREM- $\theta 2$ -G-H-Ib, so wurde im EMSA in Analogie ein spezifischer Protein-DNA-Komplex sichtbar, bei dem die Bindung offensichtlich über Homodimerbildung erfolgte (vergl. WB Abb. 14 und EMSA Abb. 15A und 15B). Wurden zwei Proteine aus einer Isoform synthetisiert (CREM- $\theta 2$ -F-G-H-Ib und $\theta 2$ -E-F-G-H-Ib) (s. WB Abb. 14 und EMSA Abb. 15A und 15B), so stellten sich bei der Gelshift-Analyse drei spezifische DNA-Protein-Komplexe dar, von denen wahrscheinlich zwei durch Homodimerbildung und einer durch Heterodimerbildung entstanden. Sowohl von Delmas et al. (1992), als auch von Gellersen et al. (1997) wurde eine Heterodimerisierung zweier unterschiedlicher Proteine bei CREM τ mit S-CREM oder CREM- $\tau 2$ - α und S-CREM- $\tau 2$ - α bzw. CREM- α und S-CREM- α respektive beschrieben. Aus CREM- $\tau 2$ - α gingen hier nach der in-vitro Transkription/Translation zwei Proteine hervor. Anders als bei CREM- $\theta 2$ -F-G-H-Ib und $\theta 2$ -E-F-G-H-Ib konnten bei der Gelshift-Analyse jedoch nur zwei spezifische Komplexe detektiert werden. In welchem Maße es hierbei zur Homo- bzw. Heterodimerbildung kam, bleibt offen.

Der zusätzliche Komplex (markiert durch ein Rechteck, Abb. 15A und 15B) war nicht durch einen Überschuss unmarkierter CRE-Sequenz kompetitierbar und stellt somit einen unspezifischen Komplex dar, der auf Bestandteile des Retikulozytenlysats aus dem Reaktionsansatz zurückzuführen ist (Foulkes et al., 1991). Der durch zwei Rechtecke markierte Komplex ließ sich sowohl mit einem Überschuss unmarkierter CRE-Sequenz als auch mit der mutierten CRE-Sequenz kompetitieren. Dies führt zu der Annahme, dass es

sich hierbei ebenfalls um Proteine aus dem Reaktionsansatz handelt (Gellersen et al., 1997), die nicht direkt an die CRE-Sequenz binden, sondern an Bereiche der synthetisierten Oligonucleotide, die die CRE-Sequenz einrahmen.

Zur Klärung, ob es sich bei den untersuchten Isoformen funktionell um Aktivatoren oder Repressoren handelt, wurde eine Luciferase-Reportergen-Analyse durchgeführt. Aktivatoren besitzen eine KID (Exons E und F), eine der beiden Transaktivierungsdomänen (τ_1 , τ_2 , Exons C, G) und eine der beiden DNA Bindedomänen (Exons H und Ia oder Ib), wohingegen Repressoren entweder die KID oder beide Transaktivierungsdomänen fehlen (Behr u. Weinbauer, 2001). Den beiden Isoformen CREM- θ 2-F-G-H-Ib und CREM- θ 2-G-H-Ib wird potentiell eine repressorische Funktion zugesprochen (Blöcher et al., 2003; Blöcher et al., 2005). Da das aus CREM- θ 2-F-G-H-Ib resultierende Protein voller Länge jedoch neben einer Transaktivierungsdomäne und einer DNA Bindedomäne einen Teil der KID (Exon F) besitzt, stellt sich die Frage, ob eine halbe KID für aktivierende Eigenschaften ausreichend ist. Nach der Luciferase-Reportergen-Analyse stellen sich die Proteine der Isoform CREM- θ 2-F-G-H-Ib und der beiden als Kontrollen eingesetzten Isoformen CREM- θ 2-E-F-G-H-Ib und CREM- θ 2-E-F-H-Ib überwiegend als Repressoren dar, denn die PKA vermittelte Stimulierung des Reportergenkonstrukts wurde durch diese Isoformen inhibiert (Jaspers et al., 2007). Die Expression der CREM- θ 2-F-G-H-Ib cDNA resultiert nicht nur in der Bildung eines Proteins ganzer Länge, sondern in der gleichzeitigen Translation eines Proteines an einem alternativen Startpunkt innerhalb derselben Isoform (siehe Abb. 13). Dem so entstandenen kürzeren Protein fehlen dadurch jedoch bestimmte funktionelle Domänen, die für aktivatorische Eigenschaften eine Rolle spielen. Inwiefern lediglich ein inhibierender Einfluß des kleineren Proteins in der Luciferase-Reportergen-Analyse zum Tragen kam, ist nicht differenzierbar. Durch Konkurrenz mit eventuell vorhandenen aktivatorischen Proteinen könnte es zur Blockierung der Bindungsstelle durch einen Repressor kommen (Foulkes u. Sassone-Corsi, 1992). Offen bleibt daher die Frage ob es sich bei dem Protein voller Länge aus CREM- θ 2-F-G-H-Ib um ein Protein mit aktivatorischen Eigenschaften handelt.

CREM- θ 2-E-F-G-H-Ib werden gemäß seiner Exonzusammensetzung aktivatorische, CREM- θ 2-E-F-H-Ib repressorische Eigenschaften zugeschrieben. Bei CREM- θ 2-E-F-G-H-Ib kommt es ebenfalls zur parallelen Translation von Proteinen voller Länge und verkürzter

Produkte, beruhend auf alternativer Translationsinitiation. Eine erwartete stimulierende Aktivität blieb auch bei Untersuchungen von Gellersen et al. (2002) bei dieser Isoform aus. Ein kausaler Zusammenhang wurde zum einen mit dem gleichzeitigen Vorkommen verkürzter Proteine mit fehlenden funktionellen Bereichen vermutet, zum anderen jedoch auch mit der Gegebenheit, dass das Protein voller Länge von Isoform CREM θ 2-E-F-G-H-Ib in COS-7 Zellen (Gellersen et al., 2002) nicht exprimiert wurde. CREM- θ 2-E-F-H-Ib stellt sich erwartungsgemäß als Repressor dar (Gellersen et al., 2002). Die funktionelle Aktivität des Proteins aus der Isoform CREM- θ 2-G-H-Ib konnte nicht bestimmt werden (Jaspers et al., 2007). Begründet sein mag dies in der geringen Expression dieses Proteins in transfizierten Zellen.

Den untersuchten CREM Isoformen θ 2-F-G-H-Ib und θ 2-G-H-Ib konnte nach Durchführung der beiden hier beschriebenen Transfektionsexperimente (s. 4.4), eines weiteren Transfektionsexperiments und statistischer Auswertung durch die Arbeitsgruppe Gellersen keine eindeutige funktionelle Aktivität zugeordnet werden. Methodische Grenzen ergeben sich hier aus dem Phänomen, dass aus einer cDNA nicht nur ein Protein, sondern gleichzeitig mehrere Proteine durch alternative Translationsinitiation hervorgehen können. Der Einfluß der einzelnen Proteine ist daher nicht genau zu determinieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Während der Spermatogenese ist für die terminale Differenzierung befruchtungsfähiger Spermien die korrekte sequentielle Genexpression in den Keimzellen eine *conditio sine qua non*. Zur Regulation der mRNA-Expression in Spermatiden kommt dem Transkriptionsfaktor cAMP responsive element modulator (CREM) eine besondere Bedeutung zu. Nach Bindung von spezifischen CREM-Isoformen an ein cAMP responsive element (CRE) in der Promotorregion von Zielgenen kann die Transkription über den cAMP Signaltransduktionsweg beeinflusst und die Genexpression in männlichen Keimzellen reguliert werden. Die essentielle Bedeutung von CREM für die Spermatogenese wird bei Mäusen deutlich, bei denen das CREM-Gen inaktiviert wurde. Sie waren nicht fortpflanzungsfähig und ihre Spermatogenese vollzog sich lediglich bis zum Stadium der runden Spermatiden. Bei Männern mit einem Spermatidenreifungsdefekt kam es nicht zur vollständigen Ausdifferenzierung der Spermatiden, die CREM Expression war hier drastisch vermindert.

Durch Mechanismen wie alternative Promotorverwendung, alternatives Exonspleißen und alternative Translationsinitiation entstehen bei der CREM-Genexpression funktionell unterschiedliche CREM-Proteine mit aktivierendem oder reprimierendem Potential auf die Zielgenexpression. Für die beiden Isoformen **02-F-G-H-Ib** und **02-G-H-Ib** erfolgte die funktionelle Zuordnung „Repressor“ bisher ausschließlich auf Grund der Exonzusammensetzung der Transkripte, d.h. auf mRNA-Ebene. Dadurch, dass in diesen beiden Isoformen Exon 02 direkt an Exon F respektive G gespleißt ist, kommt es zu einer Unterbrechung des bekannten Leserasters. Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, ob von den CREM-mRNA Isoformen 02-F-G-H-Ib und 02-G-H-Ib Proteine translatiert werden, ob diese Proteine dann *in-vitro* sequenzspezifisch an die DNA binden können und ob sie funktionell als transkriptionale Aktivatoren oder Repressoren fungieren.

Im Western Blot wurden Translationsprodukte sowohl ganzer Länge sowie kürzere Formen von CREM-02-F-G-H-Ib nachgewiesen, wohingegen von CREM-02-G-H-Ib nur Proteine gebildet wurden, bei denen die Translation erst in Exon G beginnt. Eine spezifische Bindung der Proteine an die DNA konnte bei allen Proben, die CREM-Translationsprodukte enthielten, mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay nachgewiesen werden. Die Luziferase-Reportergen-Analyse zeigte, dass die pcDNA/c β abhängige

Aktivierung des Reportergenkonstrukts bei CREM- θ 2-F-G-H-Ib, nicht jedoch bei CREM- θ 2-G-H-Ib signifikant inhibiert wurde und weist somit auf eine überwiegende Repressorfunktion der von CREM- θ 2-F-G-H-Ib kodierten Proteine hin. Die transkriptionale Aktivität von CREM- θ 2-G-H-Ib konnte nicht eindeutig ermittelt werden.

7. Summary

During the process of spermiogenesis the correct sequential gene expression in germ cells is indispensable for the terminal differentiation of fertile sperm. For the regulation of mRNA expression in spermatids the transcription factor cAMP responsive element modulator (CREM) is of great significance. After binding of specific CREM-isoforms to a cAMP responsive element (CRE) in the promoter region of target genes transcription can be modulated via cAMP signal transduction pathway and gene expression in male germ cells can be regulated. The significance of CREM for spermatogenesis becomes obvious in mice in which the CREM gene was inactivated. They were not able to reproduce and their spermatogenesis only proceeded to the stage of round spermatids. In men with a spermatid maturation arrest spermatids failed to differentiate completely, CREM expression was drastically reduced.

Due to alternative promoter usage, alternative splicing and alternative translation initiation, expression of the CREM gene results in the production of functionally different CREM proteins with either activating or repressing potential on target gene expression. For the isoforms **02-F-G-H-Ib** and **02-G-H-Ib** functional classification „repressor“ occurred solely on the base of the exon composition of the transcripts i. e. on the mRNA-level. Due to the fact that in both isoforms exon 02 is directly spliced to exon F and G respectively the known open reading frame is disrupted. The aim of this study was to find out if proteins are translated from CREM-mRNA isoforms 02-F-G-H-Ib and 02-G-H-Ib, if these proteins are able to specifically bind to DNA and if they function as transcriptional activators or repressors. Full length translation products as well as shorter forms from CREM-02-F-G-H-Ib were detected in western blotting whereas CREM-02-G-H-Ib only gave rise to proteins with translation initiation in exon G. Sequence-specific DNA-binding ability was observed with all samples containing CREM-translation products in electrophoretic mobility shift assays. Chemiluminescent luciferase assays showed that pcDNA/c β dependent activation of the reporter gene construct was inhibited significantly by CREM-02-F-G-H-Ib but not by CREM-02-G-H-Ib and therefore points to a predominant repressor function of CREM-02-F-G-H-Ib coded proteins. The transcriptional activity of CREM-02-G-H-Ib could not be determined exactly.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molekularbiologie der Zelle. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim. 2004; 569-594
- Aigner A. Genexpression in *E.coli* und Insektenzellen: Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine. In: Gentechnische Methoden. Schrimpf G (Hrsg) Spektrum 2002; 279-297.
- Bangsow T, Huch R, Male D, Müller S. Polymerse-Kettenreaktion. In: Gentechnische Methoden. Schrimpf G (Hrsg) Spektrum 2002; 147-168.
- Behr R, Hunt N, Ivell R, Wessels J, Weinbauer GF. Cloning and expression analysis of testis-specific cyclic 3',5'adenosine monophosphate-responsive element modulator activators in the nonhuman primate (*Macaca fascicularis*): comparison with other primate and rodent species. Biol Reprod. 2000; 62: 1344-1351.
- Behr R, Weinbauer GF. CREM activator and repressor isoforms in human testis: sequence variations and inaccurate splicing during impaired spermatogenesis. Mol Hum Reprod. 2000; 6: 967-972.
- Behr R, Weinbauer GF. cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? Int J Androl. 2001; 24: 126-135.
- Bergmann M. Evaluation of testicular biopsy samples from the clinical perspective. In: Andrology for the clinician. Schill WB, Comhaire FH, Hargreave TB (Hrsg) Springer 2006; 454-461.
- Bergmann M. Spermatogenese. In: Andrologie- Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. Krause W, Weidner W (Hrsg) Enke, Stuttgart 1998; 9-14.
- Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. Clin Endocrinol. 1994; 40: 133-136.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res. 1979; 7: 1513-1523.
- Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. Nature. 1996; 380: 162-165.
- Blöcher S, Behr R, Weinbauer GF, Bergmann M, Steger K. Different CREM-isoform gene expression between equine and human normal and impaired spermatogenesis. Theriogenology. 2003; 60: 1357-1369.

-
- Blöcher S, Fink L, Bohle RM, Bergmann M, Steger K. CREM activator and repressor isoform expression in human male germ cells. *Int J Androl.* 2005; 28: 215-223.
- Daniel P, Rohrbach L, Habener JF. Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element modulator θ isoforms expressed by two newly identified cAMP-responsive promoters active in the testis. *Endocrinology.* 2000; 141: 3923-3930.
- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *TIBS.* 1999; 24: 281-285.
- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. CREM, a master-switch of the transcriptional cascade in male germ cells. *J Endocrinol invest.* 2000; 23: 592-596.
- De Cesare D, Sassone-Corsi P. Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2000; 64: 343-369.
- De Cesare D, Fimia GM, Brancorsini S, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Transcriptional control in male germ cells: general factor TFIIA participates in CREM-dependent gene activation. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 2554-2565.
- Dechert U. Gelelektrophoresen. In: *Gentechnische Methoden.* Schrimpf G (Hrsg) Spektrum 2002; 39-88.
- Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, De Groot RP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 4226-4230.
- Delmas V, van der Hoorn F, Mellström B, Jégou B, Sassone-Corsi P. Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid Germ cell differentiation. *Mol Endocrinol.* 1993; 7: 1502-1514.
- Delmas V, Sassone-Corsi P. The key role of CREM in the cAMP signaling pathway in the testis. *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 100: 121-124.
- Don J, Stelzer G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 187: 115-124.
- Eddy EM. Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998; 9: 451-457.
- Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P. Mechanisms of activation by CREB and CREM: phosphorylation, CBP, and a novel coactivator, ACT. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1998; 63: 631-642.

-
- Fimia GM, Morlon A, Macho B, De Cesare D, Sassone-Corsi P. Transcriptional cascades during spermatogenesis: pivotal role of CREM and ACT. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 179: 17-23.
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM-gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell.* 1991; 64: 739-749.
- Foulkes NS, Sassone-Corsi P. More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell.* 1992; 68: 411-414.
- Foulkes NS, Mellström B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P. Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature.* 1992; 355: 80-84.
- Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1288: F101-F121.
- Frey A. Protein-Blotting und Nachweis membran-gebundener Proteine. In: *Gentechnische Methoden.* Schrimpf G (Hrsg) Spektrum 2002; 343-368.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3784-3788.
- Gellersen B, Kempf R, Telgmann R. Human endometrial stromal cells express novel isoforms of the transcriptional modulator CREM and up-regulate ICER in the course of decidualisation. *Mol Endocrinol.* 1997; 11: 97-113.
- Gellersen B, Kempf R, Sandhowe R, Weinbauer GF, Behr R. Novel leader exons of the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response element modulator (CREM) gene, transcribed from promoters P3 and P4 are highly testis-specific in primates. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8: 965-976.
- Goldberg E. Transcriptional regulatory strategies in male germ cells. *J Androl.* 1996; 17: 628-632.
- Habener JF, Miller CP, Vallejo M. cAMP-dependent regulation of gene transcription by cAMP response element-binding protein and cAMP response element modulator. *Vitam Horm.* 1995; 51: 1-57.
- Hecht NB. Regulation of "haploid expressed genes" in male germ cells. *J Reprod Fert.* 1990; 88: 679-693.

-
- Hecht NB. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bio Essays*. 1998; 20: 555-561.
- Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M, Steger K. Functional characterization of male germ cell-specific CREM isoforms. *J Androl*. 2007; 28: 59-66.
- Kimmins S, Kotaja N, Davidson I, Sassone-Corsi P. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*. 2004; 128: 5-12.
- Lalli E, Lee JS, Lamas M, Tamai K, Zazopoulos E, Nantel F, Penna L, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. The nuclear response to cAMP: role of transcription factor CREM. *Phil Trans R Soc Lond*. 1996; 351: 201-209.
- Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P. The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J*. 1993; 12: 1179-1191.
- List HJ. Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Bindeproteinen. In: *Gentechnische Methoden*. Schrimpf G (Hrsg) Spektrum 2002; 369-385.
- Liu F, Huang Y-F, Kream BE. Identification of novel cAMP responsive element modulator (CREM) isoforms expressed by osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2005; 77: 91-95.
- Mak V, Jarvi KA. The genetics of male infertility. *J Urol*. 1996; 156: 1245-1257.
- Masquillier D, Foulkes NS, Mattei MG, Sassone-Corsi P. Human CREM gene: evolutionary conservation, chromosomal localization, and inducibility of the transcript. *Cell Growth Differ*. 1993; 4: 931-937.
- Meyer TE, Habener JF. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev*. 1993; 14: 269-290.
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*. 1993; 75: 875-886.
- Monaco L, Kotaja N, Fienga G, Hogeveen K, Kolthur US, Kimmins S, Brancorsini S, Macho B, Sassone-Corsi P. Specialized rules of gene transcription in male germ cells: the CREM paradigm. *Int J Androl*. 2004; 27: 322-327.
- Montminy M. Transcriptional Regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem*. 1997; 66: 807-822.

-
- Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquilier D, Le Meur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Spermogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*. 1996; 380: 159-162.
- Neesen J. Zur Genetik funktioneller und struktureller Spermidefekte. *Reproduktionsmedizin*. 1999; 15: 55-64.
- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1991; 40: 25-94.
- Sassone-Corsi P. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995; 11: 355-377.
- Sassone-Corsi P. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998a; 30: 27-38.
- Sassone-Corsi P. Regulating the balance between differentiation and apoptosis: role of CREM in male germ cells. *J Mol Med*. 1998b; 76: 811-817.
- Sassone-Corsi P. CREM: a master-switch governing male germ cell differentiation and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*. 1998c; 9: 475-482.
- Sassone-Corsi P. CREM: a master-switch regulating the balance between differentiation and apoptosis in male germ cells. *Mol Reprod Dev*. 2000; 56: 228-229.
- Schuppe HC, Köhn FM, Haidl G, Schill WB. Umwelteinflüsse auf die männliche Fertilität. *Reproduktionsmedizin*. 1999; 15: 87-95.
- Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol*. 1999; 199: 471-487.
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Behr R, Schaller R, Drabent B, Doenecke D, Nieschlag E, Bergmann M, Weinbauer GF. Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest. *J Androl*. 1999; 20: 747-754.
- Steger K. Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Reproduktionsmedizin*. 2001a; 17: 137-148.
- Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol*. 2001b; 203: 323-334.

-
- Steger K, Behr R, Kleiner I, Weinbauer GF, Bergmann M. Expression of activator of CREM in the testis (ACT) during normal and impaired spermatogenesis: correlation with CREM expression. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10: 129-135.
- Teifel M. Transfektion von Säugerzellen. In: *Gentechnische Methoden*. Schrimpf G (Hrsg) Spektrum 2002; 249-277.
- Uyttersprot N, Miot F. Dog CREM transcription factors: cloning, tissue distribution, and identification of new isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 237: 74-78.
- Vogt PH. Molecular basis of male (in)fertility. *Int J Androl.* 1997; 20: 2-10.
- Walker WH, Sanborn BM, Habener JF. An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91: 12423-12427.
- Walker WH, Habener JF. Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *TEM.* 1996; 7: 133-138.
- Weinbauer GF, Behr R, Bergmann M, Nieschlag E. Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4: 9-15.
- Zhou Y, Sun Z, Means AR, Sassone-Corsi P, Bernstein KE. cAMP-response element modulator τ is a positive regulator of testis angiotensin converting enzyme transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 12262-12266.

9. Anhang

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Publikationen

Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M, Steger K. Functional characterization of male germ cell-specific CREM isoforms. *J Androl.* 2007; 28: 59-66.

Publizierte Abstracts

Steger K, Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M. Funktionelle Charakterisierung von CREM-Isoformen in männlichen Keimzellen. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 2006; 3: 229.

Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M, Steger K. Funktionelle Charakterisierung männlicher keimzellspezifischer CREM-Isoformen. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 2006; 3: 252.

Vorträge

Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M, Steger K. Funktionelle Charakterisierung männlicher keimzellspezifischer CREM Isoformen. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Düsseldorf, 07. –09. September 2006

Poster

Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M, Steger K. Funktionelle Charakterisierung männlicher keimzellspezifischer CREM Isoformen. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Düsseldorf, 07. – 09. September 2006

Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M, Steger K. Funktionelle Charakterisierung männlicher keimzellspezifischer CREM Isoformen. 26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin, Regensburg, 05. – 07. Oktober 2006

DANKSAGUNG

Freundlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Bergmann für die Überlassung des Themas und die Unterstützung beim Anfertigen der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. K. Steger danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, für seine jederzeit gewährte Gesprächsbereitschaft und die Hilfe bei der Erstellung der Veröffentlichung, Abstracts und Poster.

Mein besonderer Dank gilt Frau B. Gellersen, PhD vom Endokrinologikum Hamburg für die Ermöglichung der Durchführung der Untersuchungen am Endokrinologikum Hamburg, die bereitgestellten Vektoren und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit und bei der Veröffentlichung.

Weiterhin bedanke ich mich bei Rita Kempf und Annemarie Samalecos vom Endokrinologikum Hamburg, sowie Sonja Hartmann aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie der JLU Gießen für die Hilfe bei der Einführung in die Untersuchungstechniken.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergeschrieben sind, eingehalten.