

# **Biochemische Analyse der Eigenschaften der HMG-Domäne des Transkriptionsfaktors Sox10**



**Den naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
zur  
Erlangung des Doktorgrades**

**vorgelegt von  
Sandra Wißmüller  
aus Nürnberg**

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 09.Oktober 2006

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. D.-P. Häder

Erstberichterstatter: Prof. Dr. M. Wegner

Zweitberichterstatter: PD Dr. R. Slany

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Eukaryotische Transkription .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Spezielle Transkriptionsfaktoren.....	2
1.1.2	Aufbau von Transkriptionsfaktoren .....	2
<b>1.2</b>	<b>Das DNA-Bindemotiv.....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Das bHLH-Motiv .....	3
1.2.2	Das bZIP-Motiv.....	5
1.2.3	Das Zinkfinger-Motiv .....	8
1.2.3.1	C2H2-Typ.....	8
1.2.3.2	C4-Typ .....	10
1.2.3.3	Notenschlüssel-Motiv.....	11
1.2.4	Das HTH-Motiv .....	11
1.2.4.1	Die Homöodomäne .....	11
1.2.4.1.1	Hox-Proteine .....	12
1.2.4.1.2	Pax-Proteine .....	14
1.2.4.1.3	POU-Proteine .....	16
1.2.4.1.4	LIM-Proteine.....	18
1.2.5	Die HMG-Domäne.....	19
1.2.5.1	Sox-Proteine .....	22
<b>1.3</b>	<b>Funktion der Transkriptionsfaktoren der Sox-Gruppe E.....</b>	<b>24</b>
1.3.1	Sox8.....	24
1.3.2	Sox9.....	25
1.3.3	Sox10.....	25
<b>2</b>	<b>Problemstellung .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifikation von Sox10-Interaktionspartnern mit Hilfe von <i>Yeast two-hybrid Screens</i>.....</b>	<b>29</b>
3.1.1	Amplifikation einer cDNA-Bank aus Maus.....	30
3.1.2	Auswahl des Sox10- <i>bait</i> s .....	31
3.1.3	Vorausgehende Tests.....	32
3.1.3.1	Untersuchung von Sox10 <i>bait</i> B auf Eignung für die Verwendung in <i>Screens</i> .....	32
3.1.3.2	Analyse der cDNA-Bank für die Verwendung in <i>Screens</i> .....	33
3.1.3.3	Test-Transformationen zur Ermittlung der optimalen <i>Screen</i> -Bedingungen.....	33
3.1.4	<i>Yeast two-hybrid Screens</i> mit Sox10 <i>bait</i> B und der cDNA-Bank .....	34
3.1.4.1	Übersicht zur Durchführung der <i>Screens</i> .....	34
3.1.4.2	Ergebnisse der <i>Yeast two-hybrid Screens</i> mit Sox10 <i>bait</i> B und der cDNA-Bank .....	35
<b>3.2</b>	<b>Verifizierung der Interaktion von Sox10 mit ausgewählten Transkriptionsfaktoren durch GST-<i>Pulldown</i>-Studien.....</b>	<b>39</b>
3.2.1	Klonierung der DNA-bindenden Domänen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren .....	39
3.2.2	Verifizierung der Interaktion von Sox10 sowie Sox8 und SRY mit DNA-bindenden Domänen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren durch GST- <i>Pulldown</i> -Studien .....	40
3.2.2.1	Auswahl und Klonierung der <i>bait</i> s aus Sox10, Sox8 und SRY.....	40

3.2.2.2	GST-Pulldown-Studien von Sox10, Sox8 und SRY mit den DNA-Bindedomänen ausgewählter Transkriptionsfaktoren.....	42
<b>3.3</b>	<b>Identifizierung des für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlichen Teils von Sox10</b> .....	<b>44</b>
3.3.1	Einführung von Mutationen in Sox10 <i>bait</i> B .....	44
3.3.2	GST-Pulldown-Studien zur Identifizierung der für die Protein-Protein-Interaktionen der Transkriptionsfaktoren verantwortlichen Aminosäuren .....	45
3.3.3	Immunlokalisation der mutierten Proteine m1-Sox10 und m2-Sox10.....	46
<b>3.4</b>	<b>Einfluss anderer Transkriptionfaktoren auf die Sox10-abhängige Aktivierung von Zielgenen</b> .....	<b>48</b>
3.4.1	Identifikation benachbarter Bindestellen für Sox10 und andere Transkriptionsfaktoren mit Hilfe des TFSEARCH-Programms in ausgesuchten Promotoren .....	48
3.4.2	Untersuchung der identifizierten mutmaßlichen Bindestellen anderer Transkriptionsfaktoren in den <i>P0</i> -, <i>Trp2</i> - und <i>MBP</i> -Promotoren mit Hilfe von Gelshifts .....	49
3.4.3	Aktivierung des <i>Trp2</i> -Promotors durch Sox10 und C/EBP $\alpha$ .....	51
3.4.4	Gelshifts mit mutiertem Sox10 .....	52
3.4.5	Luziferase-Aktivitätstests mit wt-Sox10 und m1-Sox10 .....	53
<b>3.5</b>	<b>Analyse der Veränderung des Bindeverhaltens von Sox10 an DNA durch Phosphorylierung</b> .....	<b>55</b>
3.5.1	Vorhersage möglicher Phosphorylierungsstellen von Sox10 mit Hilfe des NetPhos-Programms.....	56
3.5.2	Einführung von Mutationen in Sox10 mit Hilfe von <i>overlap</i> -PCR .....	56
3.5.3	Untersuchung der DNA-Bindung mutierter Sox-Proteine mittels Gelshifts....	57
3.5.4	2D-Gele zur Analyse der Phosphorylierung von Sox10 .....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
4.1	Identifikation von Interaktionspartnern von Sox10 durch <i>Yeast two-hybrid Screens</i> .....	61
4.2	Verifizierung der Interaktion von Sox10 mit anderen Transkriptionsfaktoren durch GST-Pulldown-Studien .....	66
4.3	Interaktion von Sox10 mit anderen Transkriptionsfaktoren an DNA.....	69
4.3.1	Gelshifts und Luziferase-Aktivitätstest mit Sox10 und C/EBP $\alpha$ .....	69
4.3.2	Verhalten der mutierten Sox-Proteine m1 und m2 in Immunlokalisationen und Gelshifts .....	71
4.3.3	Luziferase-Aktivitätstests mit m1-Sox10 und weiteren Transkriptionsfaktoren .....	74
4.4	Phosphorylierung .....	79
<b>5</b>	<b>Material</b> .....	<b>83</b>
5.1	<b>Organismen</b> .....	<b>83</b>
5.1.1	Bakterienstämme <i>E. coli</i> .....	83
5.1.2	Hefestämme.....	83
5.1.3	Zelllinien .....	84
5.2	<b>Chemikalien und allgemeine Reagenzien</b> .....	<b>84</b>
5.3	<b>Medien und Lösungen</b> .....	<b>84</b>
5.4	<b>Oligonukleotide für PCR und Gelshifts</b> .....	<b>87</b>
5.4.1	Oligonukleotide für <i>overlap</i> -PCR .....	87
5.4.2	PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der <i>baits</i> für <i>Yeast two-hybrid Screens</i> .....	88
5.4.3	PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der DNA-BD verschiedener Transkriptionsfaktoren .....	89
5.4.4	PCR-Oligonukleotide zur Klonierung von DNA-BD für Gelshifts .....	89

5.4.5	Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	90
5.4.6	Oligonukleotide für Gelshifts.....	91
5.4.7	Oligonukleotide zur Mutagenese von Sox10 (Ratte).....	91
<b>5.5</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>92</b>
5.5.1	Primärantikörper.....	92
5.5.2	Sekundärantikörper.....	92
<b>6</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>93</b>
<b>6.1</b>	<b>Nukleinsäuremethoden.....</b>	<b>93</b>
6.1.1	Standardmethoden.....	93
6.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	93
6.1.2.1	Gezielte Mutagenese: <i>overlap</i> -PCR und site-directed mutagenesis.....	94
6.1.3	Radioaktive Markierung von DNA.....	95
<b>6.2</b>	<b>Zellkulturmethoden.....</b>	<b>95</b>
6.2.1	Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen.....	95
6.2.1.1	Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen durch Calciumphosphat-Präzipitation.....	96
6.2.1.2	Transiente Transfektion von COS-Zellen mit DEAE-Dextran.....	96
6.2.1.3	Transiente Transfektion von N2A-Zellen mit SuperFect.....	96
6.2.2	Luziferase-Aktivitätstests.....	97
<b>6.3</b>	<b>Proteinanalytische Methoden.....</b>	<b>97</b>
6.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	97
6.3.2	Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen.....	97
6.3.3	Immunochemischer Nachweis von Proteinen.....	98
6.3.3.1	Elektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	98
6.3.3.2	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot).....	99
6.3.3.3	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf Membranen.....	99
6.3.3.4	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in Zellen.....	100
6.3.4	Detektion von Protein-DNA-Komplexen.....	100
6.3.4.1	Gelshifts.....	100
6.3.4.2	2D-Gele.....	101
6.3.4.2.1	Vorbereitung der Proteinextrakte.....	101
6.3.4.2.2	Rehydrierung der IPG-Streifen.....	101
6.3.4.2.3	Isoelektrische Fokussierung.....	102
6.3.4.2.4	SDS-Gele.....	102
6.3.4.2.5	Vorbereitung für SDS-PAGE.....	103
6.3.4.2.6	SDS-PAGE.....	103
6.3.4.2.7	Silbernitratfärbung.....	103
<b>6.4</b>	<b>Bakterielle Expression von Genen.....</b>	<b>103</b>
6.4.1	Synthese und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	103
6.4.2	GST- <i>Pulldown</i> -Studien.....	104
<b>6.5</b>	<b>Methoden zur Arbeit mit Hefezellen.....</b>	<b>105</b>
6.5.1	Transformation von Hefezellen mit Lithiumacetat in kleinem Maßstab.....	105
6.5.2	Transformation von Hefezellen im <i>Screen</i> -Maßstab.....	105
6.5.3	Herstellung von Carrier-DNA für Hefetransformationen.....	106
6.5.4	Plasmidisolierung aus Hefezellen.....	106
6.5.5	Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen.....	106
6.5.6	Filterlift-Test.....	107
6.5.7	Mating.....	107
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>115</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Struktur des bHLH-ZIP-Motivs von Max in freier Lösung und an DNA.....	5
Abb. 1.2:	C/EBP $\alpha$ -bZIP-Komplex an DNA.....	7
Abb. 1.3:	Übersicht und Struktur der DNA-Bindedomäne von Sp1.....	9
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung des Estrogen-Rezeptors.....	10
Abb. 1.5:	Notenschlüssel-Motiv der Zinkfinger vom GATA-Typ.....	11
Abb. 1.6:	Sequenzübersicht von Ubx und Exd und Struktur des Komplexes an DNA....	13
Abb. 1.7:	Paired-Domäne von Pax6 und Pax6(5a).....	14
Abb. 1.8:	Schematische Darstellung und DNA-Bindung der Paired-Domäne von Pax6.....	15
Abb. 1.9:	Kristallstruktur von Sox2 und Oct-1 an DNA.....	18
Abb. 1.10:	Konservierte Sequenz und Struktur der LIM-Domäne.....	19
Abb. 1.11:	L-förmige Struktur der HMG-Domäne von zfSox9.....	20
Abb. 1.12:	Konservierte und nichtkonservierte Aminosäuren von klassischen und sequenzspezifischen HMG Domänen.....	21
Abb. 1.13:	Sequenz und Kristallstruktur von Sox2.....	23
Abb. 3.1:	Prinzip des verwendeten <i>Yeast two-hybrid Screens</i> .....	30
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung des Sox10-Proteins mit den <i>baits</i> A bis D.....	31
Abb. 3.3:	Western-Blot mit Gesamtzelllysaten des mit Sox10 <i>bait</i> B transfizierten und untransfizierten Hefestammes AH109.....	32
Abb. 3.4:	Die DNA-bindende Domäne von Sox10.....	38
Abb. 3.5:	Sequenzvergleich und schematische Darstellung von Sox10, Sox8 und SRY mit den <i>baits</i> A und B.....	41
Abb. 3.6:	Mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel der GST-Fusionsproteine.....	42
Abb. 3.7:	Interaktion der HMG-Domänen von Sox-Proteinen mit den DNA-Bindedomänen anderer Transkriptionsfaktoren in GST- <i>Pulldown</i> -Studien.....	43
Abb. 3.8:	Sequenzvergleich der HMG-Domänen von mSox2, hSox10 und rSox10.....	44
Abb. 3.9:	GST- <i>Pulldown</i> -Studien mit Wildtyp- und mutierten <i>baits</i> B von Sox10 und den DNA-Bindedomänen anderer Transkriptionsfaktoren.....	46
Abb. 3.10:	Immunlokalisation von Wildtyp-Sox10-Protein und verschiedenen mutierten Sox-Proteinen in COS-Zellen.....	47
Abb. 3.11:	Mit dem TFSEARCH-Programm vorhergesagte Bindestellen im <i>P0</i> -,	

<i>Trp2</i> - und <i>MBP</i> -Promotor.....	48
Abb. 3.12: Gelshifts am <i>Trp2</i> -Oligonukleotid mit Sox8 bzw. Sox10 und C/EBP $\alpha$ .....	50
Abb. 3.13: Gelshift am <i>Trp2</i> -Oligonukleotid mit C/EBP $\alpha$ und verschiedenen Verdünnungen von Sox10.....	51
Abb. 3.14: Luziferase-Aktivitätstest am 0,9 kb <i>Trp2</i> -Promotor mit Sox10 und C/EBP $\alpha$ ...	52
Abb. 3.15: Gelshifts mit Wildtyp-Sox10 und den mutierten Proteinen m1- und m2-Sox10 am <i>Trp2</i> -Oligonukleotid.....	53
Abb. 3.16: Luziferase-Aktivitätstests mit Wildtyp- und m1-Sox10.....	54
Abb. 3.17: Gelshifts mit Wildtyp MIC-Sox10 und mutierten Proteinen.....	57
Abb. 3.18: Gelshift mit den MIC-Sox10-Mehrfachmutanten.....	58
Abb. 3.19: 2D-Gele mit Sox10.....	59
Abb. 4.1: Strukturmodell der HMG-Domäne von Sox10 und m1-Sox10 am <i>FGF4</i> - Enhancer.....	72
Abb. 4.2: Strukturmodell der HMG-Domäne von m2-Sox10 an DNA.....	74

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Übersicht der durchgeführten Schritte bei den <i>Yeast two-hybrid Screens</i> .....	35
Tabelle 3.2: Ergebnisse der <i>Yeast two-hybrid Screens</i> .....	36
Tabelle 3.3: Übersicht aller in den <i>Yeast two-hybrid Screens</i> gefundenen Transkriptionsfaktoren.....	37
Tabelle 3.4: Für Interaktionsstudien benutzte DNA-Bindedomänen ausgewählter Transkriptionsfaktoren.....	39
Tabelle 3.5: Übersicht über die bei den <i>GST-Pulldown</i> -Studien verwendeten <i>baits</i> .....	41
Tabelle 5.1: Bakterienstämme <i>E. coli</i> .....	83
Tabelle 5.2: Hefestämme.....	83
Tabelle 5.3: Zelllinien.....	84
Tabelle 5.4: Medien und Lösungen.....	84
Tabelle 5.5: Oligonukleotide für <i>overlap</i> -PCR.....	87
Tabelle 5.6: PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der <i>baits</i> für <i>Yeast two-hybrid Screens</i> .....	88
Tabelle 5.7: PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der DNA-Bindedomänen verschiedener Transkriptionsfaktoren.....	89
Tabelle 5.8: PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der DNA-Bindedomänen und umgebender Stücke für Gelshifts.....	89
Tabelle 5.9: Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	90
Tabelle 5.10: Oligonukleotide für Gelshifts.....	91
Tabelle 5.11: Oligonukleotide zur Mutagenese von Sox10 (Ratte).....	91
Tabelle 5.12: Primärantikörper.....	92
Tabelle 5.13: Sekundärantikörper.....	92
Tabelle 6.1: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	99
Tabelle 6.2: Zusammensetzung von 2D-Gelen.....	102



## Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Sox10 wird in der Neuralleiste und deren Derivaten sowie in Oligodendrozyten des zentralen Nervensystems exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Gliazellen, indem er z. B. die Transkription von Myelinen steuert. An Zielgen-Promotoren konnte eine synergistische Interaktion von Sox10 mit Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Zur Identifikation von Interaktionspartnern wurden hier *Yeast two-hybrid Screens* mit Sox10 durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine große Anzahl solcher Interaktionspartner gefunden. Davon waren über 50 % aller verifizierten Kandidaten entweder Transkriptionsfaktoren oder Chromatin-Remodelling-Faktoren. Durch *GST-Pulldown*-Studien mit Sox10 konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion dieser Proteine sowie zusätzlich ausgewählter Transkriptionsfaktoren mit Sox10 über die jeweiligen DNA-Bindedomänen erfolgt. Auf Seite von Sox10 wurde Arginin 176 als eine für die Interaktion essentielle Aminosäure identifiziert. Weitere *GST-Pulldown*-Studien mit Sox8 und SRY zeigten, dass die Fähigkeit, mit anderen Transkriptionsfaktoren über die HMG-Domäne zu interagieren, eine generelle Fähigkeit von Sox-Proteinen ist, jedoch nicht bei anderen HMG-Proteinen vorkommt.

Mit bioinformatischen Methoden wurden Promotoren von Sox10-Zielgenen nach direkt benachbarten Bindestellen für Sox-Proteine und in Lösung interagierende Transkriptionsfaktoren durchsucht. Mit Hilfe von Gelshifts wurde eine C/EBP $\alpha$ -Bindestelle im *Trp2*-Promotor bestätigt. In Luziferase-Aktivitätstests konnte eine synergistische Aktivierung des *Trp2*-Promotors durch Sox10 zusammen mit C/EBP $\alpha$  gezeigt werden. Eine direkte Interaktion der DNA-Bindedomänen von Sox10 und C/EBP $\alpha$  am *Trp2*-Promotor konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die durch Phosphorylierung veränderte Bindung von Sox10 an DNA untersucht. Mit Hilfe von 2D-Gelen wurden drei modifizierte Varianten von Sox10 gefunden. Für die bioinformatisch vorhergesagten Phosphorylierungsstellen liess sich experimentell aber keine veränderte DNA-Bindung nachweisen.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die HMG-Domäne von Sox-Proteinen nicht nur der DNA-Bindung dient, sondern auch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und damit den für Sox-Proteine postulierten Partnercode vermitteln.



## Summary

The transcription factor Sox10 is expressed in the neural crest and derivative cells, as well as in oligodendrocytes of the central nervous system. It also plays an important role in the development of glial cells, for example by regulating the transcription of myelin genes. A synergistic interaction of Sox10 with other transcription factors on target promoters has already been shown in other works. For identification of interaction partners yeast two-hybrid screens with Sox10 were carried out in this thesis.

As part of the work described in this thesis many such interaction partners were found. More than half of all verified candidates were either transcription factors or chromatin remodelling factors. Using GST-pulldown assays it was demonstrated that the interaction of these proteins, as well as a number of additional transcription factors, with Sox10 is via the DNA binding domains. Residue arginine 176 in the high mobility group (HMG) DNA-binding domain of Sox10 was identified as essential for these interactions. Additional GST-pulldown assays using Sox8 and SRY showed that the ability to interact with transcription factors via the HMG domain is a general feature of Sox proteins but not of other HMG proteins.

Bioinformatic methods were used to find promoters with directly neighbored binding sites for Sox proteins and other transcription factors. A C/EBP $\alpha$  binding site in the *Trp2* promoter was verified using electrophoretic gel mobility shift assays and using luciferase assays a synergistic activation of the *Trp2* promoter by Sox10 and C/EBP $\alpha$  could be shown. However, a direct interaction between the DNA binding domains of Sox10 and C/EBP $\alpha$  could not be detected at the *Trp2* promoter.

In the second part of the thesis the altered DNA binding of Sox10 by phosphorylation was investigated. With the aid of 2D-gels three post-translationally modified variants of Sox10 were found. However, no altered DNA binding could be demonstrated experimentally for bioinformatically predicted phosphorylation sites.

In summary, in this thesis it could be shown that the HMG domain of Sox proteins not only acts as a DNA-binding motif, but also mediates interactions with other transcription factors as already postulated by a partner code for Sox proteins.



# 1 Einleitung

Aufgrund der Struktur und Organisation ihrer Zellen lassen sich Organismen in Pro- und Eukaryoten einteilen. Die Zellen der Eukaryoten besitzen einen echten Zellkern (Karyon), während sich bei Prokaryoten das Protoplasma nicht in Zellkern und Zytoplasma unterteilen lässt, da die DNA zwar in einem Nukleoid konzentriert ist, eine Kernmembran jedoch fehlt. RNA- und Proteinsynthese sind deshalb gekoppelt und laufen unmittelbar nacheinander ab. Bei Eukaryoten erfolgt die RNA-Synthese, die auch als Transkription bezeichnet wird, dagegen im Kern, während die Proteine im Zytoplasma synthetisiert werden (Passarge, 1994; Wehner und Gehring, 1995; Knippers, 1997). Zur Regulation der Transkription dienen verschiedene Proteine, die an bestimmte DNA-Sequenzen in Zielgenen binden und die Transkription entweder stimulieren oder hemmen. Diese Proteine bezeichnet man als Transkriptionsfaktoren (Wehner und Gehring, 1995). Man spricht auch von „transaktivierenden“ Proteinen, die an „cis-aktivierende“ Sequenzen binden können (Villard, 2004). Der eukaryotische Bauplan ist das Ergebnis unzähliger solcher Bindungen von Transkriptionsfaktoren an Bindestellen und die darauf folgende Aktivierung oder Repression von Genen. Gewebespezifische Transkriptionsfaktoren wirken synergistisch oder antagonistisch, um die gezielte Expression bestimmter Gene zu bewirken. Außerdem können diese Transkriptionsfaktoren sowohl die Expression von Signalmolekülen bewirken, als auch darauf reagieren, und so die interzelluläre Kommunikation steuern. Transkriptionsfaktoren wirken als molekulare Schalter, die fundamentale Prozesse während der Entwicklung, wie Zelldifferenzierung, Proliferation oder Ausbildung verschiedener Gewebe, regeln.

## 1.1 Eukaryotische Transkription

Bei der eukaryotischen Transkription unterscheidet man die Promotorregion, die unmittelbar vor dem Gen liegt und an die die basalen Transkriptionsfaktoren binden, von Sequenzen, die zum Teil in großen Entfernungen zum Gen liegen können und als Enhancer bezeichnet werden. Hier binden Transkriptionsfaktoren, die für die zeitliche und gewebespezifische Expression des Gens über die basale Transkription hinaus verantwortlich sind und auch als spezielle Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden (Villard, 2004).

### **1.1.1 Spezielle Transkriptionsfaktoren**

Verschiedene Gene können jeweils durch unterschiedliche Signale der Zelle aktiviert werden. Neben den basalen Transkriptionsfaktoren spielen spezielle Transkriptionsfaktoren für die differenzielle Genexpression eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu den basalen Transkriptionsfaktoren kommen sie nicht in allen Zellen vor, sondern nur in bestimmten Geweben bzw. Zelltypen und zu verschiedenen Zeitpunkten. Dabei kann ein Faktor auch in verschiedenen Zelltypen vorhanden sein. Die Kombination mit weiteren Faktoren bewirkt jedoch erst die Spezifität und die Transkription (oder auch Repression) bestimmter Gene (Villard, 2004). Da es in Eukaryoten weit weniger Transkriptionsfaktoren (ca. 2000) als Gene (30.000-40.000) gibt, ist diese Kombination verschiedener Faktoren notwendig. Insgesamt kodieren in Säugern etwa fünf bis zehn Prozent aller Gene für Transkriptionsfaktoren oder an der Transkription beteiligte Proteine (Wegner, 2005).

### **1.1.2 Aufbau von Transkriptionsfaktoren**

Transkriptionsfaktoren besitzen mindestens zwei wichtige Domänen, um ihre Funktion ausüben zu können: Erstens eine DNA-Bindedomäne (DNA-BD), die eine bestimmte DNA-Sequenz erkennen und daran binden kann. Wie ein Transkriptionsfaktor an DNA bindet, und mit welchen anderen Regulatoren der Transkription er interagiert, wird maßgeblich von der Struktur der DNA-BD beeinflusst (Herr und Cleary, 1995). Die meisten Transkriptionsfaktoren binden an spezifische DNA-Sequenzen. Die zweite wichtige Domäne ist die Transaktivierungsdomäne (TA), die die Transkription des Gens, an dessen Promotor oder Enhancer der Transkriptionsfaktor gebunden hat, aktiviert oder reprimiert. Normalerweise ermöglicht diese Domäne dem Transkriptionsfaktor, mit den Proteinen, die zur Bindung und Stabilisierung der RNA-Polymerase II benötigt werden, zu interagieren. Oft kommt noch eine dritte Domäne hinzu, die dem Transkriptionsfaktor erlaubt, mit anderen Proteinen oder weiteren Transkriptionsfaktoren zu interagieren und deshalb auch als Protein-Protein-Interaktionsdomäne bezeichnet wird.

## 1.2 Das DNA-Bindemotiv

Es gibt verschiedene DNA-BD, die sich in unterschiedlichen Familien von DNA-bindenden Proteinen wiederfinden. Wichtige Motive sind das Helix-*loop*-Helix- (HLH) und das Leucizipper-Motiv (ZIP), die oft zusammen mit einer basischen Domäne vorkommen und dann als bHLH- bzw. bZIP-Motive bezeichnet werden, das Zinkfinger-Motiv, das Helix-*turn*-Helix (HTH)-Motiv und die HMG-Domäne (Villard, 2004). Diese Motive können allein oder zusammen mit weiteren in Proteinen vorhanden sein, die dann aufgrund ihrer DNA-BD in verschiedene Familien eingeteilt werden. Die große Gruppe der Transkriptionsfaktoren umfasst dabei so bedeutende Familien wie Homöodomänen-Proteine, zu denen Hox-, POU-, LIM- oder Pax-Proteine zählen, Zinkfinger-Proteine unterschiedlichen Aufbaus oder HMG-Proteine.

Im Folgenden werden einige wichtige Motive und ihre Bindung an DNA sowie typische Transkriptionsfaktor-Familien anhand besonders gut untersuchter Mitglieder näher beschrieben.

### 1.2.1 Das bHLH-Motiv

bHLH-Proteine besitzen eine Region, in der ungewöhnlich viele basische Aminosäuren (AS) vorkommen, gefolgt von einem Helix-*loop*-Helix (HLH)-Motiv. Dies ist ein Abschnitt aus zwei alpha-helikalen Bereichen, die durch eine Schleife (*loop*) von AS ohne ausgeprägte Sekundärstruktur verbunden sind. Während der basische Teil der DNA-Bindung dient, ist der HLH-Teil wichtig für die Dimerisierung der bHLH-Proteine, da sie nur als Dimer ihre Funktion ausüben können. Durch die Dimer-Bildung kommen die basischen Regionen in eine gegenüberliegende, scherenförmige Stellung und legen sich jeweils in die große Rinne der DNA. Bei dieser Bindung nehmen sie die Konfiguration einer alpha-Helix an und verursachen eine Beugung der DNA (Shimizu et al., 1997; Massari und Murre, 2000; Bertrand et al., 2002).

Als Erkennungssequenz für bHLH-Proteine dient die Basenfolge 5'-CANNTG-3', die sogenannte E-Box, wobei die Bindungsspezifität durch die inneren Nukleotide und zusätzliche Basen in der Umgebung bestimmt wird (Shimizu et al., 1997; Wegner, 2000; Massari und Murre, 2000; Sauvé et al., 2004).

bHLH-Proteine können mit Histon-Acetyltransferase-Komplexen interagieren, um eine lokale Auflockerung des Chromatins zu bewirken und der Transkriptionsmaschinerie Zugang zu gewähren. Im Gegensatz dazu können sie auch reprimierend wirken, wenn sie mit Histon-Deacetylasen interagieren (Massari und Murre, 2000; Sauv e et al., 2004).

Die Einteilung der bHLH-Proteine in verschiedene Klassen erfolgt aufgrund von Dimerisierungspartnern, dem Vorkommen in bestimmten Geweben und der DNA-Bindungspezifit t. Alternativ können bHLH-Proteine auch nach ihrer evolutionären Verwandtschaft geordnet werden. Eine Übersicht findet sich bei Massari und Murre (2000). Transkriptionsfaktoren mit bHLH-Motiv sind zum Beispiel MyoD, Max, Daughterless, REB, Olig2 oder Mitf (Rudnicki und Jaenisch, 1995; Wegner, 2001).

Das bHLH-ZIP-Protein Max (*Myc-associated X factor*) ist ein besonders gut untersuchtes Protein und soll als Beispiel der Bindung einer bHLH-Domäne an DNA dienen. Max bildet Dimere mit sich selbst und mit der Myc- (von *Myelocytomatosis*-Virus) und Mad- (*Max dimerization protein*) Proteinfamilie, deren Mitglieder ebenfalls zusätzlich zur bHLH-Domäne eine ZIP-Domäne besitzen. Zusammen mit c-Myc hat es sowohl aktivierenden als auch reprimierenden Einfluss auf Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose (Sauv e et al., 2004). Die DNA-Bindung erfolgt über die basischen Regionen des Dimers. Sauv e et al. (2004) haben die Struktur von Max an DNA und in freier Lösung untersucht (Abb. 1.1).

Es existieren hochkonservierte Reste in der basischen Region, z.B. E12 bis R16, und im oberen Teil der Schleife (K37 und R40), die spezifische Protein-DNA-Interaktionen vermitteln. E12 bildet Wasserstoff-Brücken mit Cytosin und Adenin in der E-Box (CACGTG). Dieser Glutamat-Rest ist in allen bHLH-Proteinen konserviert, und Veränderungen verhindern die DNA-Bindung (Sauv e et al., 2004). R15, R16 und R40 des partiell geformten Stadiums (siehe unten) passen in die große Rinne der DNA. R16 bildet Wasserstoff-Brücken mit dem zentralen Guanin (CACGTG) und ist außerordentlich bedeutsam für die Spezifität der DNA-Bindung. Max interagiert durch K37 und R40 mit den Phosphat-Gruppen der DNA. Dabei wird R40 tief in die große Rinne gedrückt. In allen bHLH-Familien ist an Position 40 ein basischer Rest konserviert, was auf eine wichtige Funktion bei der DNA-Bindung hinweist (Sauv e et al., 2004).

Wie Untersuchungen der Struktur von Max in freier Lösung zeigen, sind hier im Gegensatz zur Bindung an DNA die ersten 14 AS der basischen Region gr btentils ungefalted (Sauv e et al., 2004). Das bedeutet, diese Domäne muss mit der Bindung an DNA eine Konformationsänderung durchführen, um eine alpha-helikale Struktur zu erreichen. Allerdings sind teilweise gefaltete Strukturen vorhanden, die direkten Kontakt mit der großen

Rinne der DNA aufnehmen können und so eine schnelle und spezifische, aber auch reversible DNA-Bindung erlauben. Der volle Kontakt mit der DNA wird dann durch die Konformationsänderung der basischen Region in eine alpha-Helix hergestellt. Die Helices des HLH-Motivs sowie der Zipper sind in freier Lösung und an DNA identisch gefaltet (vgl. Abb. 1.1b bis e).

Dieser Aspekt der DNA-Erkennung von bHLH-Proteinen, bei der die Helixfaltung der basischen Region erst durch Assoziation mit der DNA induziert wird, ist auch bei bZIP-Proteinen beobachtet worden (Abate et al., 1990; Miller et al., 2003) und scheint somit eine generelle Eigenschaft der basischen Region zu sein.

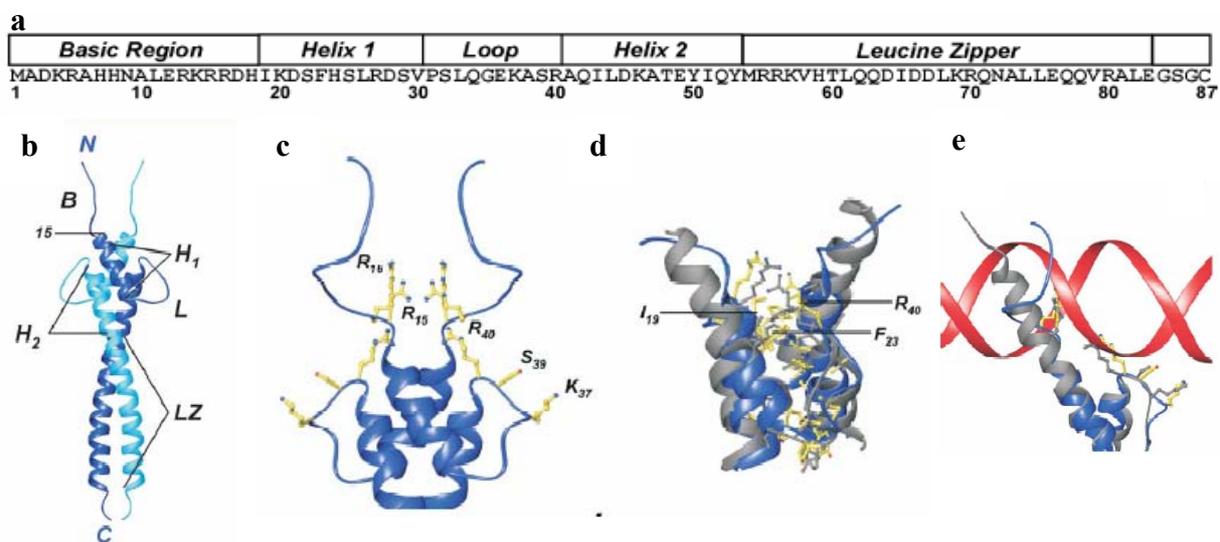


Abb. 1.1: a) Aminosäuresequenz des für die Strukturanalyse von Max verwendeten Fragments. Darüber sind die Regionen des bHLH-ZIP-Motivs dargestellt. b) Max-Dimer ohne DNA. Jede Untereinheit der Domäne ist durch einen Buchstaben bezeichnet: B, basische Region, H1, Helix eins, H2, Helix zwei, L, Loop, LZ, Zipper. Die N-terminale basische Region erscheint unstrukturiert. Die Helixfaltung beginnt erst mit R15. c-e) Strukturen mit für die DNA-Bindung wichtigen konservierten Seitenketten. c) Partiiell gefalteter Komplex ohne DNA. Konservierte Seitenketten im oberen Teil des loops (R40) und der basischen Region (R15 und R16), sowie S39 und K37, die Kontakt mit der DNA aufnehmen, sind in gelb dargestellt. d) Vergleich zwischen dem hydrophoben Kern der HLH-Struktur des teilweise gefalteten Proteins (blau) und der Kristallstruktur des untersuchten Teils an DNA (grau). Die beiden hydrophoben Kerne sind nahezu identisch. R40 trägt zum hydrophoben Kern bei. e) Die Seitenketten R15, R16 und R40 der teilweise gefalteten Konformation passen genau in die große Rinne der DNA und entsprechen der an DNA-gebundenen Form. Im Gegensatz zur gebundenen Form sind die N-terminalen AS der basischen Region ungefaltet (Sauvé et al., 2004).

## 1.2.2 Das bZIP-Motiv

Die Gemeinsamkeit aller bZIP-Proteine besteht in einer basischen Region ähnlich der der bHLH-Proteine, die für die DNA-Bindung wichtig ist, sowie einem darauf folgenden Motiv, dem Leucin-Zipper (ZIP), der für die Dimerisierung zuständig ist (Miller et al., 2003). Er besteht aus vier oder fünf Heptameren, deren sieben AS mit a bis g bezeichnet werden und

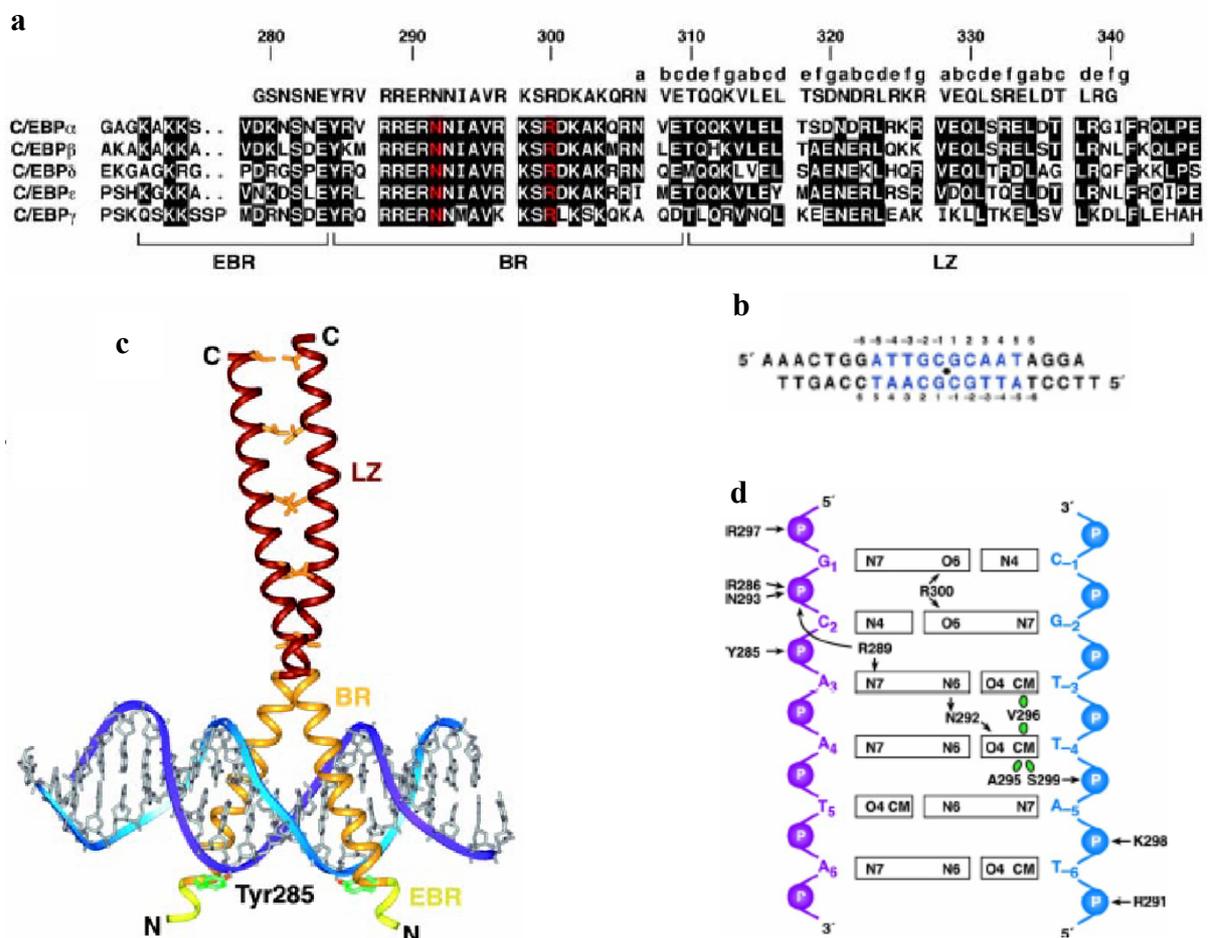
eine alpha-Helix aufbauen. An jeder siebten Position kommt ein Leucin-Baustein vor. Durch die Periodizität von 3,5 AS pro Helixdrehung gelangt jede siebte AS in die gleiche strukturelle Umgebung (Vinson et al., 2002). Die AS in Position a, d, e und g regulieren die Zipper-Aneinanderlagerung, die Dimerisierungsstabilität und -spezifität. Die Reste a und d liegen dabei auf derselben Seite der Oberfläche und sind typischerweise hydrophob, so dass sie in der gegenüberliegenden Helix mit a' und d' interagieren können und einen hydrophoben Kern bilden. Dagegen sind die AS an Position g und e typischerweise geladen und wegen der anziehenden und abstoßenden Kräfte für die Homo- und Heterodimerisierung wichtig. Die Leucin-Zipper winden sich umeinander und bilden eine Konformation, die als *coiled coil* bekannt ist (Vinson et al., 2002).

bZIP-Proteine können in verschiedene Unterfamilien eingeteilt werden, von denen jede eine andere palindromische DNA-Sequenz erkennt. Eine Übersicht über menschliche bZIP-Proteine findet sich bei Vinson et al. (2002), deren Einteilung vorwiegend auf den Möglichkeiten der Dimerbildung beruht: So bilden CREB (*cyclic-AMP response element binding protein*)-Faktoren fast ausschließlich Homodimere innerhalb ihrer Familie, Jun (japanisch für 17; entdeckt als Virus-transduziertes Onkogen in *Avian Sarcoma Virus 17*) oder C/EBP (CCAAT/*enhancer-binding*-Protein) Homo- und Heterodimere und Fos (FBJ murines Osteosarkom-Virus) fast ausschließlich Heterodimere (Vinson et al., 2002). Über ein Zwischenglied (CREB-Bindeprotein, CBP) wird dann der Kontakt zu den basalen Transkriptionsfaktoren am Promotor aufgenommen. bZIP-Proteine erkennen spezifische DNA-Sequenzen durch Kontakte, die von fünf AS in der basischen Region vermittelt werden und die charakteristisch für jede Unterfamilie sind. Sie beinhalten immer die AS Asparagin und Arginin (Miller et al., 2003).

CCAAT/*enhancer-binding*-Proteine (C/EBP) sind eine Unterfamilie der bZIP-Proteine. Eine Nomenklatur findet sich bei Ramji und Foka (2002). Das erste C/EB-Protein, C/EBP $\alpha$ , wurde als Faktor entdeckt, der an die CCAAT-Box binden kann (Landschulz et al., 1989). Seither wurde gezeigt, dass es in großen Mengen in Fettgewebe, Leber, Darm, Lunge, Nebenniere und Plazenta exprimiert wird (Ramji und Foka, 2002) und die terminale Differenzierung verschiedener Zelltypen, zum Beispiel Adipozyten oder neutrophiler Granulozyten, regelt (Miller et al., 2003).

Bei der Erkennungssequenz von C/EBP $\alpha$  handelt es sich um das Palindrom 5'-ATTGCGCAAT-3'. Miller et al. (2003) verwendeten für die Röntgenstrukturanalyse ein 21 bp langes Oligonukleotid, das diese Sequenz enthält (Abb. 1.2).

Das benutzte C/EBP $\alpha$ -Protein (Ratte) enthielt die AS 281 bis 340 und war fähig, mit sich selbst Dimere zu bilden. Dabei formen die AS 285 bis 300 die Erkennungshelix und legen sich in die große Rinne der DNA. Die AS 281 bis 284 bilden die verlängerte basische Region, ein Charakteristikum der C/EBP-Familie, die nicht zum DNA-Kontakt beiträgt. Zur Bildung des Dimers wird der erste Kontakt über elektrostatische Interaktionen zwischen den AS-Resten 307 hergestellt, gefolgt von der Interaktion der hydrophoben Reste an Position a und d: T310 bildet eine Wasserstoff-Brücke mit Q'311, und AS 321 mit der entsprechenden AS des Dimerpartners. Das Dimer wird durch Salzbrücken zwischen D320 und R'325 bzw. E334 und R'339 stabilisiert. Die Protein-DNA-Interaktion findet nur in der Region zwischen den



AS 285 bis 300 statt. Dabei kontaktieren zehn AS jeder Erkennungshelix die DNA-Halbseiten der Erkennungssequenz (auch bei nichtpalindromischen Erkennungssequenzen; Nye und Graves, 1990). Direkte Kontakte mit der DNA an den Basen T-4, T-3, G-2, G1 und A3 werden durch R289, N292, A295, V296, S299 und R300 vermittelt. Die Protein-DNA-Grenzfläche wird dabei durch die Seitenketten von R289, N292 und N293 stabilisiert. N292, A295 und S299 sind bei bZIP-Proteinen konserviert (Miller et al., 2003).

### 1.2.3 Das Zinkfinger-Motiv

Ein Zinkfinger-Motiv kann aus verschiedenen AS-Abfolgen gebildet werden. Insgesamt werden 14 Klassen unterschieden, die jedoch nicht alle an der Transkription beteiligt sind (Dreosti, 2001; Matthews und Sunde, 2002). Eine Übersicht findet sich bei Matthews und Sunde (2002).

#### 1.2.3.1 C2H2-Typ

Klassische Zinkfinger-Proteine haben das Motiv C2H2. Sie wurden im basalen Transkriptionsfaktor TFIIIA bei *Xenopus* entdeckt (Miller et al., 1985) und stellen die Mehrzahl der Zinkfinger-Proteine (Matthews und Sunde, 2002). Beim Typ C2H2 befinden sich in einer Folge von etwa dreißig AS jeweils am Beginn zwei benachbarte Cystein-Reste und am jeweiligen Ende zwei Histidin-Reste, die gemeinsam mit ihren Seitenketten ein Zink-Ion binden. Dadurch bildet der dazwischen liegende Bereich eine Ausstülpung, den so genannten Zinkfinger. Die dreidimensionale Struktur zeigt den Aufbau aus zwei kurzen beta-Blättern und einer kurzen alpha-Helix ( $\beta\beta\alpha$ ) (Matthews und Sunde, 2002). Diese Struktur legt sich in die große Rinne der DNA, wo spezifische Wechselwirkungen zwischen zwei bis vier Nukleinsäure-Basen und den AS-Seitenketten entstehen (Matthews und Sunde, 2002). Da ein einzelner Zinkfinger nicht an DNA binden kann, weil die Erkennungssequenz zu kurz ist, liegen mehrere Zinkfinger hintereinander vor (Berg, 1992; Matthews und Sunde, 2002). C2H2-Zinkfinger besitzen zum Beispiel die Proteine Sp1 (*Specific protein 1*, Abb. 3), Snail oder Krox20 (Krüppel-Box, da aufgrund von Homologien zu dem *Drosophila*-Gen *Krüppel* identifiziert (Chavrier et al., 1988)). Als Bindestelle dienen sogenannte GC-Boxen, für Sp1 die Sequenz 5'-<sup>G</sup>/<sub>T</sub>GGGCGG<sup>G</sup>/<sub>A</sub><sup>G</sup>/<sub>A</sub><sup>C</sup>/<sub>T</sub>-3' (Berg, 1992; Oka et al., 2004).

Die DNA-Bindedomäne von Sp1 besteht aus drei Zinkfingern (Berg, 1992), von denen die hinteren beiden mit den Resten -1, 2, 3 und 6 (Nummerierung siehe Abb. 1.3a) je vier DNA-

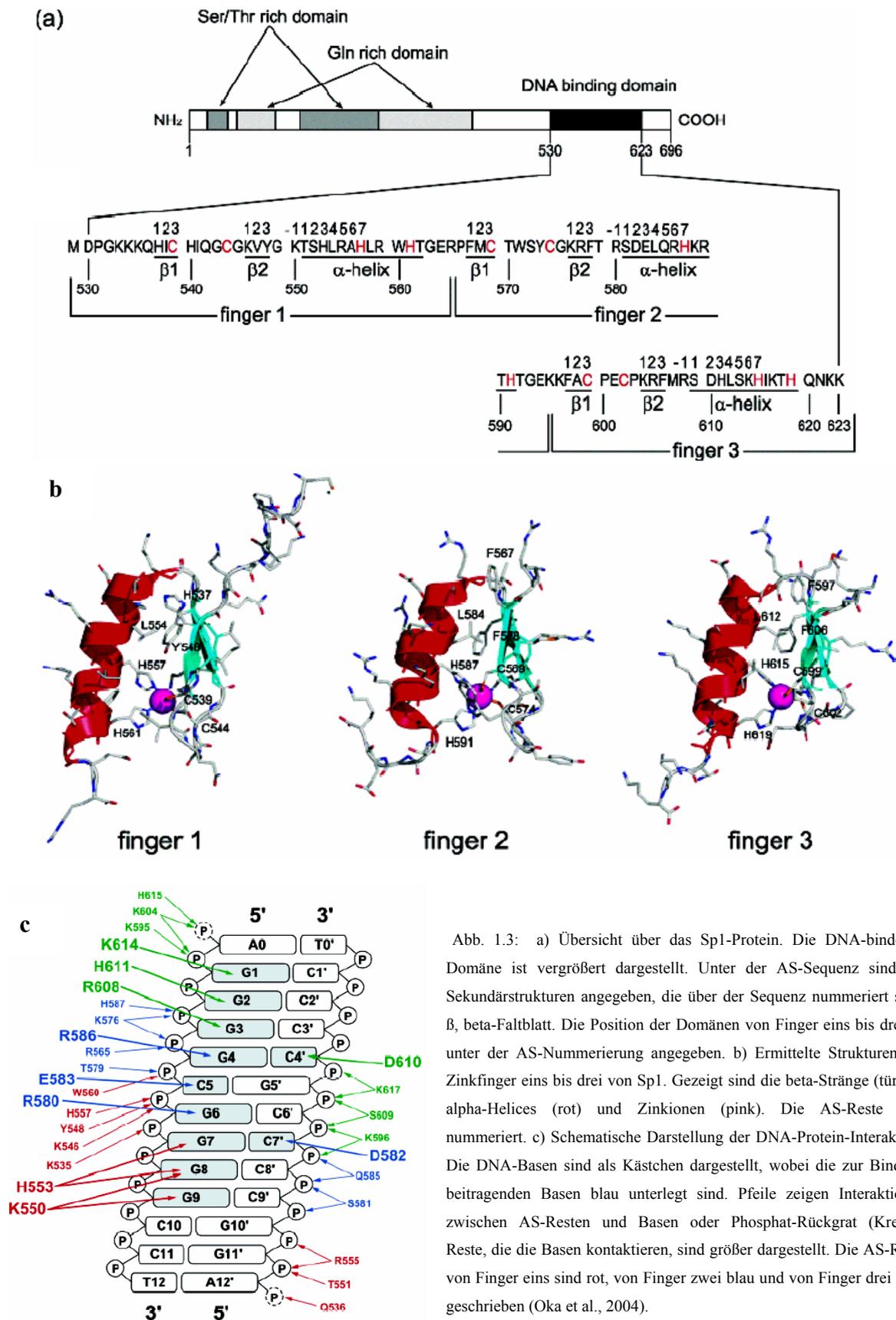


Abb. 1.3: a) Übersicht über das Sp1-Protein. Die DNA-bindende Domäne ist vergrößert dargestellt. Unter der AS-Sequenz sind die Sekundärstrukturen angegeben, die über der Sequenz nummeriert sind. β, beta-Faltblatt. Die Position der Domänen von Finger eins bis drei ist unter der AS-Nummerierung angegeben. b) Ermittelte Strukturen der Zinkfinger eins bis drei von Sp1. Gezeigt sind die beta-Stränge (türkis), alpha-Helices (rot) und Zinkionen (pink). Die AS-Reste sind nummeriert. c) Schematische Darstellung der DNA-Protein-Interaktion. Die DNA-Basen sind als Kästchen dargestellt, wobei die zur Bindung beitragenden Basen blau unterlegt sind. Pfeile zeigen Interaktionen zwischen AS-Resten und Basen oder Phosphat-Rückgrat (Kreise). Reste, die die Basen kontaktieren, sind größer dargestellt. Die AS-Reste von Finger eins sind rot, von Finger zwei blau und von Finger drei geschrieben (Oka et al., 2004).

Basen erkennen. Der erste Zinkfinger kann mit den Resten K550 und H553 nur mit zwei Basen an den Positionen -1 und 3 der Helix Kontakt aufnehmen (Oka et al., 2004). Diese weitgehend unspezifische DNA-Erkennung durch Finger eins erlaubt dem ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor Sp1 vermutlich, mit hoher Affinität an verschiedene DNA-Sequenzen zu binden (Oka et al., 2004).

### 1.2.3.2 C4-Typ

Ein weiterer Zinkfinger-Typ findet sich bei den nukleären Hormonrezeptoren (Matthews und Sunde, 2002). Die nukleären Hormonrezeptoren besitzen zusätzlich zur Zinkfinger-Domäne, bei der zwei Cystein-Paare das Zink-Ion binden, eine Hormon-Bindedomäne. Sie teilen sich in drei Gruppen (Melvin et al., 2004): Zu den Steroidhormon-Rezeptoren gehören unter anderem der Estrogen-, Glukokortikoid- und Androgen-Rezeptor, zur Klasse II der nukleären Hormonrezeptoren zum Beispiel der Vitamin D- oder der Retinsäure-Rezeptor. Die dritte Klasse bilden Rezeptoren ohne bekannte Liganden. Im Gegensatz zum C2H2-Typ, bei dem jeder Zinkfinger eine Struktur für sich ist, falten sich hier zwei asymmetrische Finger zu einer kompakten Domäne (Matthews und Sunde, 2002; Melvin et al., 2004), gefolgt von ca. 30 AS, der sogenannten C-terminalen Verlängerung (CTE, *c-terminal extension*, vgl. Abb. 1.4). Diese scheint den Rezeptor-DNA-Komplex durch weitere Kontakte zu stabilisieren (Melvin et al., 2004). Die Zinkfinger sind durch zwei im rechten Winkel zueinander gelagerte alpha-Helices charakterisiert. Zwischen den Fingern liegt die alpha-Helix eins, die spezifischen Kontakt zu den DNA-Basen der Erkennungssequenz (HRE, *hormone response element*) in der großen Rinne herstellt. Die zweite alpha-Helix nach dem zweiten Finger bindet nicht an DNA, ist aber wichtig für die Faltung der DNA-Bindedomäne. Eine weitere wichtige Region

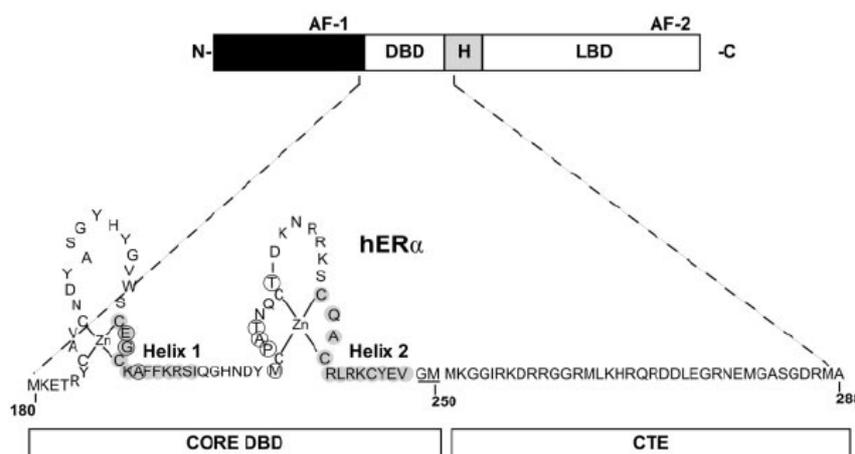


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Estrogen-Rezeptors und vergrößert dargestellte DNA-Bindedomäne mit dem Zinkfinger-Motiv. Die DNA-Erkennungshelix eins und Helix zwei sind grau unterlegt. Core DBD, Zinkfinger-Motiv, CTE, C-terminale Verlängerung (Melvin et al., 2004).

befindet sich auf der Außenseite des gefalteten Proteins: Mit einer Schleife wird Kontakt mit einem Dimer-Partner aufgenommen (Melvin et al., 2004). Viele Steroidhormon-Rezeptoren liegen in inaktiven Zustand an das Hitzeschockprotein Hsp90 gebunden vor. Die Bindung des Hormons setzt die Rezeptoren frei. Die aktive DNA-bindende Form ist ein Dimer aus zwei Hormonrezeptoren. Jede Untereinheit tritt mit einer der beiden Hexanukleotid-Folgen der DNA-Erkennungsstelle in Wechselwirkung (Matthews und Sunde, 2002). Für den Estrogen-Rezeptor ist diese Folge 5'-AGGTCANNNTGACCT-3' (Knippers, 1997).

### 1.2.3.3 Notenschlüssel-Motiv

Weitere Zinkfinger-Strukturen finden sich z.B. beim GATA-Typ (Abb. 1.5). Diese haben ein dreifaches Notenschlüssel-Motiv (*treble-clef*) und erkennen GATA-haltige DNA-Sequenzen. Die meisten Kontakte gehen von der alpha-Helix und dem basischen Teil aus (Matthews und Sunde, 2002).



Abb. 1.5: Notenschlüssel-Motiv der Zinkfinger vom GATA-Typ. Das Zinkion ist als Kugel dargestellt. Die alpha-Helix rechts im Bild und der basische, unstrukturierte Teil binden das Zinkion (Matthews und Sunde, 2002).

## 1.2.4 Das HTH-Motiv

Das HTH (Helix-*turn*-Helix)-Motiv kommt in vielen Proteinfamilien vor, von denen im Folgenden einige vorgestellt werden. Es besteht aus drei alpha-Helices, die durch definierte Drehungen (*turns*) getrennt sind.

### 1.2.4.1 Die Homöodomäne

Die Homöodomäne besteht aus zirka sechzig AS, die sich zu einem HTH-Motiv, ähnlich dem vieler bakterieller Transkriptionsfaktoren, falten (Knippers, 1997). Dabei liegen Helix eins und zwei in antiparalleler Anordnung dicht beieinander. Sie sind von Helix drei durch eine Drehung getrennt, so dass diese etwa im rechten Winkel zu den beiden anderen Helices zu liegen kommt. Im Inneren dieser kompakten Struktur liegen die hydrophoben Seitengruppen, die der Anordnung ihre Stabilität verleihen. Helix drei, die Erkennungshelix, legt sich in die große Rinne der DNA, und definierte AS-Seitengruppen treten in Wechselwirkung mit

bestimmten DNA-Basen und den Sauerstoff-Gruppen des Phosphatrückgrats. Zusätzliche spezifische Bindungen mit den DNA-Basen gehen von den AS des Arms am N-terminalen Ende der Homöodomäne aus (Acampora et al., 1989; Knippers, 1997).

Bei Hox-Proteinen ist die Homöodomäne das einzige DNA-Bindemotiv. In POU-, LIM- und PAX-Proteinen dagegen kommt zusätzlich noch eine weitere DNA-Bindedomäne vor.

#### 1.2.4.1.1 Hox-Proteine

Homöobox-Gene und die von ihnen kodierten Proteine wurden bei *Drosophila* entdeckt und nach homöotischen Genen (Gene, die die Umwandlung eines Körpersegments in ein anderes verursachen) benannt. Sie kommen aber in allen vielzelligen Organismen vor und werden allgemein als *Hox*-Gene bzw. -Proteine bezeichnet. Eine Übersicht findet sich z.B. bei Acampora et al. (1989, Mensch) oder Passner et al. (1999, *Drosophila*). *Hox*-Gene steuern die Entwicklung der anterior-posterioren Achse (Passner et al., 1999). Ein Hox-Protein allein, wie Ultrabithorax (Ubx) aus *Drosophila*, hat nur geringe DNA-Bindenspezifität, steigert diese aber, wenn es zusammen mit dem Homöoprotein Extradenticle (Exd bzw. Pbx1 in Säugern) bindet (Passner et al., 1999). Vermutlich kommen deshalb in anderen Proteingruppen Homöoboxen oft zusammen mit weiteren DNA-Bindemotiven vor. Zur Aufklärung der Struktur beider Homöodomänen-Proteine an DNA wurde von Passner et al. (1999) ein 15 bp langes Oligonukleotid, zusammen mit AS 233 bis 313 von Ubx und AS 238 bis 300 von Exd, die jeweils die Homöodomänen enthalten, verwendet (Abb.1.6).

Normale Homöodomänen wie die von Ubx binden an das DNA-Erkennungsmotiv ATTA, wobei die hydrophoben Resten (Valin oder Isoleucin an Position 47, Q50 und N51 sowie M54) der Erkennungshelix in der großen Rinne Kontakt mit den ersten zwei Basenpaaren aufnehmen, während die Homöodomäne in der kleinen Rinne die letzten beiden Basenpaare kontaktiert (siehe auch Court et al., 2005). Der N-Terminus der Helix zwei liegt normalerweise sehr nah am Phosphatrückgrat der DNA und bildet spezifische Wechselwirkungen aus.

Dagegen ist die Exd-Homöodomäne genau wie ihr Säuger-Homolog Pbx1 ein Sonderfall, da sie an das Erkennungsmotiv ATCA der DNA bindet und die direkten Kontakte mit der DNA durch Wasserstoff-Brücken über Wassermoleküle ersetzt sind. Da außerdem an Position 50 anstelle einer polaren oder geladenen AS ein Glycin sitzt, kommt auch hier kein direkter Kontakt zustande.

Eine Interaktion von Hox-Proteinen mit Exd wird über ein spezielles Motiv, das die AS Tyrosin, Tryptophan, Prolin und Methionin (YWPM) enthält und in variablem Abstand vor

der Homöodomäne sitzt, vermittelt. Dazu bildet Exd mit Hilfe des N-Terminus von Helix eins, der Schleife zwischen Helix eins und Helix zwei sowie dem C-terminalen Ende der Erkennungshelix drei eine hydrophobe Tasche aus, in die das YWPM-Motiv der Hox-Proteine hineinragt. Dieses bildet eine Schleife durch eine Wasserstoff-Brücke zwischen Y und M. Der Tryptophanrest hat dabei die größte Bedeutung bei der Bindung der Tasche. Weitere Interaktionen zwischen Ubx und Exd werden durch die direkt benachbarten Erkennungshelices vermittelt.

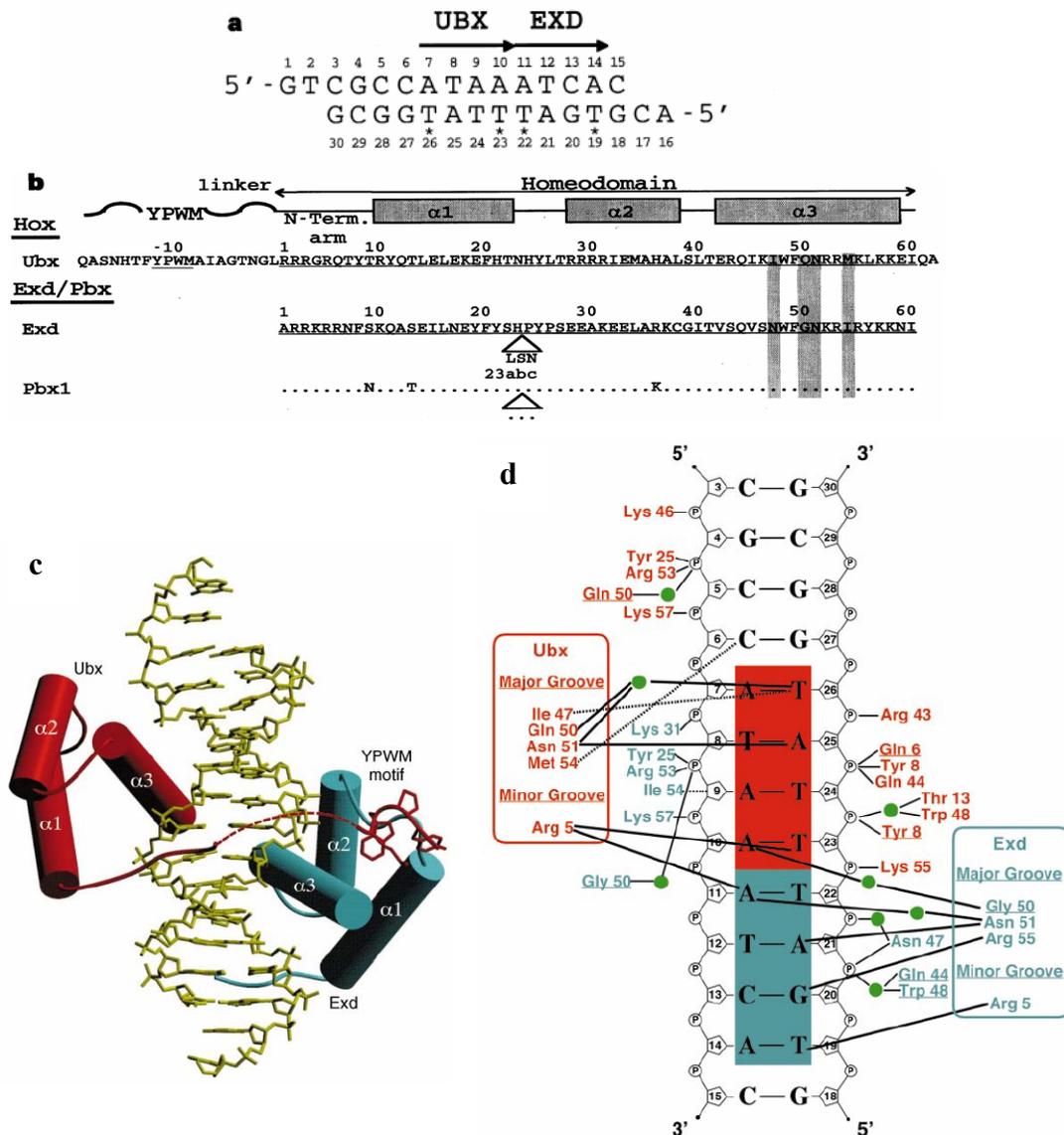


Abb. 1.6: a) Sequenz des 15 bp-Oligonukleotids, das für die Kristallisation benutzt wurde. Die Pfeile zeigen die Bindestellen mit der Kopf-an-Schwanz-Anordnung von Ubx und Exd. b) Sequenz der für die Strukturanalyse benutzten Ubx- und Exd-Fragmente. Die Homöodomäne ist von 1 bis 60 nummeriert, und Reste N-terminal davon, die das YPWM-Motiv enthalten, von -1 bis -19. Reste, die normalerweise Kontakt mit den DNA-Basen in der großen Rinne aufnehmen, sind grau unterlegt. c) Der Ubx-Exd-Komplex an DNA. d) Schematische Darstellung der Protein-DNA-Kontakte. Ubx-Reste und die Bindestelle sind rot, Exd-Reste und Bindestelle blau dargestellt, analog c). Wasserstoffbrücken werden durch schwarze Linien angezeigt, nichtpolare Interaktionen sind gestrichelt. Grüne Punkte stellen Wassermoleküle dar (Passner et al., 1999).

Die Exd-Homöodomäne scheint für kooperative Interaktionen ausgelegt zu sein: Die schwache DNA-Bindung, die modifizierte Erkennungssequenz ATCA und die hydrophobe Tasche bilden Voraussetzungen für die Interaktion mit Hox-Proteinen. Die direkte Nachbarschaft der Erkennungssequenzen führt zu stark überlappenden Protein-DNA-Kontakten. Möglicherweise bereitet Exd die DNA für die Hox-Bindung vor, indem es die Struktur und Flexibilität der DNA an der Erkennungsstelle beeinflusst (Passner et al., 1999).

#### 1.2.4.1.2 Pax-Proteine

Pax (Paired-box)-Proteine besitzen eine 128 AS lange DNA-Bindedomäne, die so genannte Paired-Domäne, und stellen eine evolutionär konservierte Familie dar (Bruun et al., 2005; Chi und Epstein, 2002; Kamaraju et al., 2002). In Säugern wurden neun Pax-Gene identifiziert, die anhand von zusätzlichen strukturellen Domänen in vier Gruppen aufgeteilt werden. Pax-Proteine wurden außerdem in Nematoden, *Drosophila*, *Xenopus*, Zebrafisch und Huhn gefunden (Chi und Epstein, 2002).

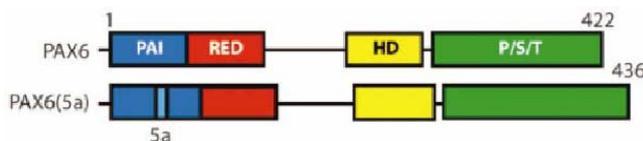


Abb. 1.7: Paired-Domäne von Pax6 und Pax6(5a). (Chi und Epstein, 2002)

Zwei unabhängige DNA-bindende HTH-Untereinheiten, PAI und RED, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind, bilden die Paired-Domäne (Abb. 1.7). Isolierte Paired-Domänen nehmen in Lösung keine feste Struktur an, sondern erst, wenn sie mit DNA inkubiert werden. Die DNA-Bindung wurde zuerst beim *Drosophila*-Protein Paired gezeigt und ist unabhängig von der Homöodomäne, die in Pax3, 4, 6 und 7 zusätzlich vorkommt (Chi und Epstein, 2002).

Die Homöodomäne vom Paired-Typ unterscheidet sich von normalen Homöodomänen, die ein ATTA-Motiv an DNA erkennen, indem sie als Dimer kooperativ an palindromische Sequenzen vom Typ 5'-TAAT(N)<sub>2-3</sub>ATTA-3' binden, genannt P2 oder P3, je nach Anzahl der dazwischen liegenden Basen (Bruun et al., 2005; Chi und Epstein, 2002). Die Dimerisierung erlaubt diesen Homöodomänen, Sequenzen zu erkennen, die nicht von anderen Homöodomänen gebunden werden (Chi und Epstein, 2002). Im Gegensatz zur kooperativen DNA-Bindung und Dimerisierung anderer Homöodomänen, z.B. von Hox-Proteinen, interagiert die Paired-Typ Homöodomäne über die gesamte Länge von 60 AS mit der DNA (Bruun et al., 2005). Die Homöodomäne spielt nicht nur eine Rolle bei der DNA-Erkennung,

sondern bietet auch eine Oberfläche für Interaktionen mit bestimmten Transkriptionsfaktoren wie TFIID und anderen Homöodomänen-Proteinen (Chauhan et al., 2004).

Außer in Pax4 und Pax6 gibt es in allen Pax-Proteinen zwischen der N-terminalen Paired-Domäne und der mittig liegenden Homöodomäne ein Oktamer-Motiv, von dem vermutet wird, dass es transkriptionelle Aktivität hat (Chi und Epstein, 2002).

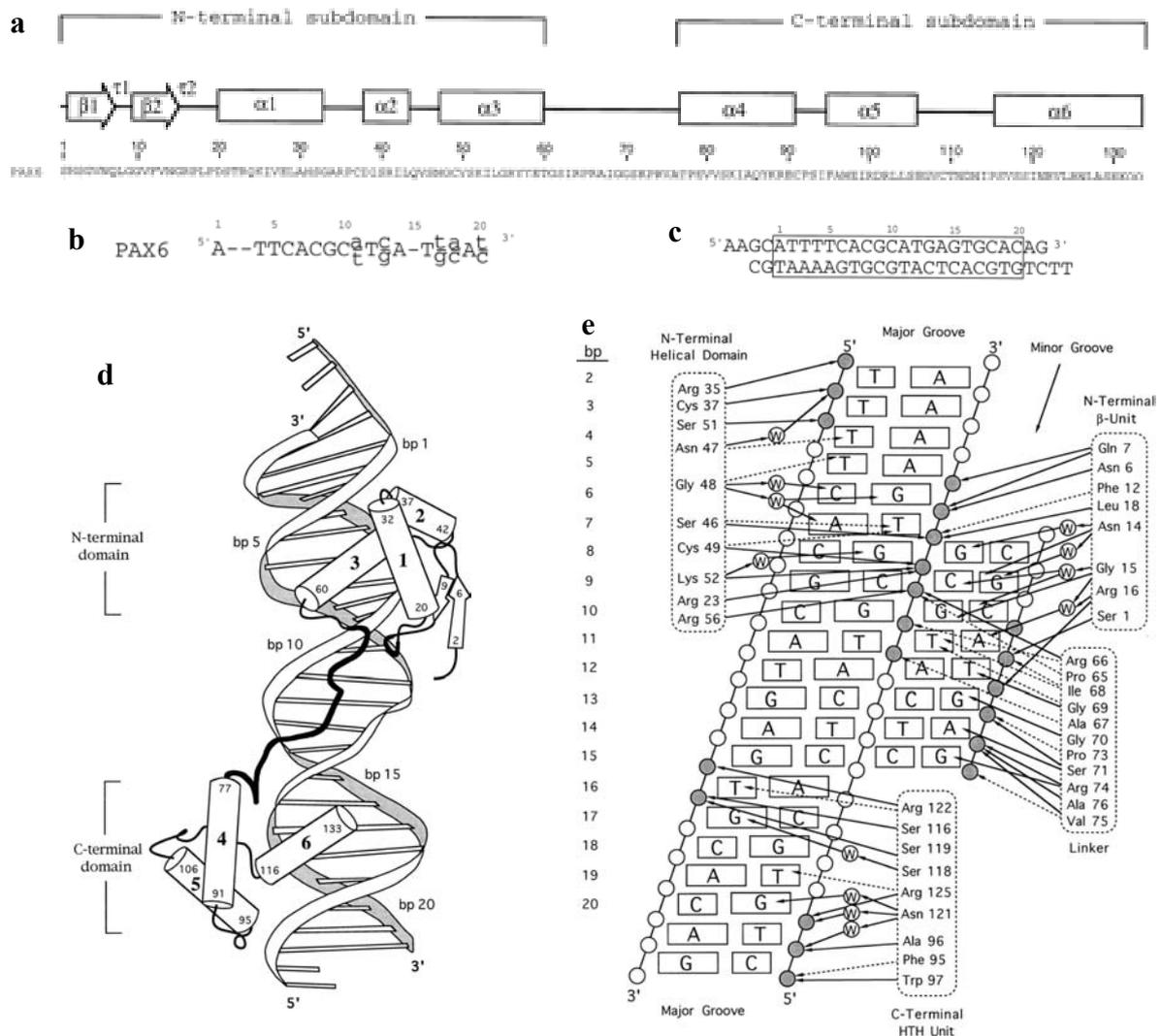


Abb. 1.8: a) Übersicht über die Sekundärstruktur der Paired-Domäne von Pax6. Links die N-terminale Untereinheit mit den  $\beta$ -Strängen eins und zwei und den  $\alpha$ -Helices eins bis drei, rechts die C-terminale Untereinheit mit den  $\alpha$ -Helices vier bis sechs. Dazwischen liegt das Verbindungsstück (Linker). Unterhalb ist die AS-Sequenz des verwendeten Stückes von Pax6 angegeben. b) Konsensus-Bindestelle für Pax6. c) Für die Kristallstruktur verwendetes Oligonucleotid. Die Bindestelle für die Paired-Domäne ist umrandet. d) Schematische Darstellung der Paired-Domäne mit dem N- und C-terminalen Bereich und dem flexiblen Verbindungsstück. Alpha-Helices sind als Zylinder, beta-Stränge als Pfeile dargestellt. e) DNA-Protein-Interaktionen. Die DNA-Basen sind als Kästchen gezeichnet, das Phosphatrückgrat als Kreise. Grau unterlegte Kreise markieren Stellen, an denen Pax6 die DNA kontaktiert. Durchgehende Pfeile zeigen Wasserstoffbrücken zwischen Protein und DNA, gestrichelte Linien van-der-Waals-Kontakte. Kreise mit W stehen für Wassermoleküle (Xu et al., 1999).

Ein gut untersuchtes Pax-Protein ist Pax6. Es ist essentiell für die Entwicklung der Augen und des zentralen Nervensystems von Vertebraten und Invertebraten sowie einigen anderen wichtigen Strukturen (Prossner und van Heyningen, 1998; Chi und Epstein, 2002; Chauhan et al., 2004; Bruun et al., 2005). Zwei Formen von Pax6, Pax6 und Pax6(5a), unterscheiden sich in einer 14 AS-Insertion in der PAI-Domäne, die durch das alternativ gespleißte Exon 5a hervorgerufen wird (Abb. 1.7) (Chauhan et al., 2004). Sie werden gleichzeitig exprimiert und aktivieren synergistisch die Transkription von Promotoren, die von ihren Paired-Domänen, jedoch nicht von ihren Homöodomänen, erkannt werden (Chauhan et al., 2004). Pax6 bindet als Dimer an P3-Bindestellen (Czerny und Busslinger, 1995).

Xu et al. (1999) zeigen die Paired-Domäne von Pax6 an DNA (Abb. 1.8). Dabei kontaktiert der beta-Strang eins das Phosphatrückgrat der DNA in der kleinen Rinne, der beta-Strang zwei die Basen. Die N-terminale Untereinheit der Paired-Domäne bindet in die große Rinne, wobei N47 mit einem AT-Basenpaar interagiert. Dies bestimmt vermutlich die Sequenzspezifität. Nahe dem Zentrum der Bindestelle bildet das Verbindungsstück (*linker*) von C- und N-terminalem Teil der Paired-Domäne zahlreiche Kontakte zu Basen und Phosphatresten aus. Helix sechs der C-terminalen Untereinheit bindet in die große Rinne der DNA, und Helix fünf interagiert mit dem Phosphatrückgrat (Abb. 1.8).

#### 1.2.4.1.3 POU-Proteine

Der Name POU ist von den drei Säuger-Transkriptionsfaktoren Pit-2, Oct-1 und Oct-2 sowie von Unc86 aus *Caenorhabditis elegans* abgeleitet (Schoenemann et al., 1998; Latchman, 1999; Phillips und Luisi, 2000; Andersen und Rosenfeld, 2001). POU-Gene kommen außerdem in *Xenopus*, Zebrafisch und Mensch vor, wurden aber nicht in Pflanzen und Pilzen gefunden. Sie sind durch eine nur in diesen Proteinen vorkommende DNA-BD, die POU-Domäne, charakterisiert, die 150 bis 160 AS überspannt (Wegner et al., 1993; Latchman, 1999; Andersen und Rosenfeld, 2001). Diese besteht aus einer variablen, C-terminal gelegenen POU-Homöodomäne (POU<sub>H</sub>) von 60 AS, die über einen nicht konservierten Linker von 15 bis 56 AS mit einer hochkonservierten POU-spezifischen Domäne (POU<sub>S</sub>) aus 74 bis 82 AS verbunden ist (Wegner et al., 1993; Cleary und Herr, 1995; Schoenemann et al., 1998; Latchman, 1999; Andersen und Rosenfeld, 2001). Basierend auf der Sequenz des Verbindungsstücks und dem N-Terminus der POU<sub>H</sub> wird die POU-Familie in sechs Klassen eingeteilt (siehe Wegner et al., 1993 und Andersen und Rosenfeld, 2001). Die POU<sub>S</sub> ist durch vier alpha-Helices charakterisiert, während die POU<sub>H</sub> wie klassische Homöodomänen aus drei alpha-Helices besteht. In beiden Untereinheiten bilden die zweite und dritte Helix ein HTH-

Motiv, und jeweils die dritte Helix nimmt in der großen Rinne der DNA Kontakt zu den Basen auf. Die zwei Untereinheiten sind strukturell unabhängig und können jeweils mit geringer Affinität an DNA binden (Wegner et al., 1993; Schoenemann et al., 1998; Phillips und Luisi, 2000; Andersen und Rosenfeld, 2001). Im Gegensatz zur klassischen Homöodomäne ist die POU<sub>H</sub> jedoch nicht ausreichend, um das POU-Protein an seine Zielsequenz zu binden. Starke Bindung an die DNA erfordert die gesamte POU-Domäne, wobei jede der Untereinheiten Kontakt zur großen Rinne der DNA herstellt (Wegner et al., 1993; Andersen und Rosenfeld, 2001). Es scheint, dass dabei eine Untereinheit an die DNA bindet und sie so organisiert, dass die Bindung der zweiten Untereinheit erleichtert wird (Phillips und Luisi, 2000).

Beide Untereinheiten enthalten HTH-Motive, die direkt mit den beiden Hälften des DNA-Bindemotivs, Oktamer-Sequenzen, interagieren (Wegner et al., 1993; Phillips und Luisi, 2000; Andersen und Rosenfeld, 2001). Die Konsensussequenz ist 5'-ATGCAAAT-3'. Das fünfte Basenpaar A/T trägt in gewisser Weise zur Kooperativität der POU-Domäne bei, da es die einzige Stelle ist, an der die Untereinheiten den Kontakt zu einem Basenpaar teilen (Phillips und Luisi, 2000). Die zwei Untereinheiten nehmen jedoch keinen direkten Kontakt auf (Andersen und Rosenfeld, 2001). Die Interaktion von POU-Proteinen mit DNA ist nicht auf Basenpaare im Bindemotiv beschränkt, sondern findet auch an angrenzenden Sequenzen statt, was eine gewisse Degeneration des DNA-Bindemotivs erlaubt (Wegner et al., 1993). POU-Proteine zeigen bei der DNA-Bindung unterschiedliche Präferenzen, es gibt aber Übereinstimmungen: Hochaffine Bindestellen sind oft zweigeteilt und jede Hälfte wird entweder von der POU<sub>S</sub> oder der POU<sub>H</sub> kontaktiert. Der Abstand und die Orientierung der Untereinheiten an DNA können variieren, und die Fähigkeit von POU-Proteinen, solche Hälften zu binden, beruht auf der Länge, Sequenz und Flexibilität des Verbindungsstücks (Wegner et al., 1993; Phillips und Luisi, 2000). Vermutlich ist eine Funktion des Verbindungsstücks, den kooperativen Effekt einer Dimerisierung nachzustellen. Ein Glutamat-Rest trägt möglicherweise zur Ausbildung eines elektrostatischen Felds bei und erleichtert die Bindung der Untereinheiten (Phillips und Luisi, 2000). Außerdem sind die AS-Basen-Interaktionen flexibler als bei klassischen Homöodomänen. Während klassische Homöodomänen an kurze AT-reiche Sequenzen mit ATTA-Kern binden, scheinen die POU-Bindehälften der Erkennungssequenz der DNA nur isolierte AT-reiche Regionen zu enthalten (Phillips und Luisi, 2000; Andersen und Rosenfeld, 2001). Manche POU-Proteine binden als Monomer, z.B. Oct-1, andere als Dimer (Pit-1) an DNA (Schoenemann et al., 1998).



spezifisch mit anderen Proteinen zu interagieren (Dawid et al., 1998; Yao et al., 1999; Deane et al., 2004; Kadrmas und Beckerle, 2004).

Die LIM-Homöodomänen-Unterfamilie, auch LHX genannt, spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Differenzierung, Zelldeterminierung und Organentwicklung, bei der die Proteine als negative Regulatoren zu wirken scheinen (Dawid et al., 1995 und 1998; Yao et al., 1999; Deane et al., 2004). Die DNA-Bindung der LHX-Proteine wird ausschließlich von der Homöodomäne vermittelt, die bereits besprochen wurde, während die LIM-Domäne der Protein-Protein-Interaktion dient (Dawid et al., 1998). LIM-Homöodomänen sind sich untereinander sehr viel ähnlicher als die Homöodomänen anderer Proteine. Eine Übersicht über die unterschiedlichen LIM-Homöodomänen findet sich bei Hobert und Westphal (2000). Zu den LHX-Proteinen gehört z.B. die Islet-Gruppe, die wichtig für die Neuronenentwicklung ist (Hobert und Westphal, 2000).

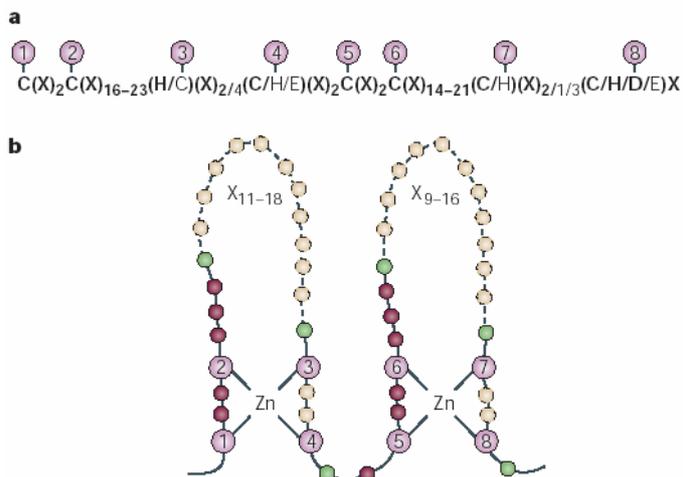


Abb. 1.10: Konservierte Sequenz und Struktur der LIM-Domäne. a) Konsensussequenz. Die Zink-bindenden Reste sind mit lilafarbenen Kreisen markiert. b) Struktur der LIM-Domäne. Lilafarbige Kreise geben die Zinkbindenden Reste an. Weitgehend konservierte aliphatische Reste sind grün dargestellt, nichtkonservierte Reste rot. Gelbe Kreise stellen eine variable Zahl von AS, die in der Sequenz möglich sind, dar (Kadrmas und Beckerle, 2004).

### 1.2.5 Die HMG-Domäne

Die HMG-Domäne erhielt ihren Namen aufgrund der Homologie zu Regionen des HMG1-Proteins und wurde zuerst im Transkriptionsfaktor UBF identifiziert (Jantzen et al., 1990). Die Bezeichnung HMG-Proteine rührt daher, dass diese Proteine in der Elektrophorese schneller als die meisten anderen Nicht-Histonproteine des Zellkerns wandern, also eine „hochmobile Gruppe“ (*high mobility group*) sind (Landsman und Bustin, 1993).

Die HMG-Domäne besteht aus ca. 80 AS und kommt in Proteinen aller Eukaryoten vor. Die durchschnittliche Sequenzübereinstimmung zwischen verschiedenen HMG-Domänen liegt bei etwa 25 % (Laudet et al., 1993; Dailey und Basilico, 2001). Im Gegensatz zu den meisten anderen DNA-BD erfolgt die Bindung von HMG-Domänen an DNA in die kleine Rinne. Dazu faltet sich die HMG-Domäne zu drei alpha-Helices, die eine flache, L-förmige Struktur

mit einem hydrophobem Kern aus konservierten, aromatischen AS bilden (van Houte et al., 1995), wobei Helix eins und zwei antiparallel im kurzen Arm und Helix drei sowie der N-terminale beta-Strang im langen Arm liegen (Abb. 1.11, Werner et al., 1995; Cary et al., 2001). Helix zwei dient als Erkennungshelix und bindet in die kleine Rinne der DNA, wodurch diese geweitet und vertieft und eine starke Beugung der DNA verursacht wird (Grosschedl et al., 1994; Werner et al., 1995; Wegner, 1999; Cary et al., 2001). Man nimmt generell an, dass HMG-Proteine dadurch als architektonische Proteine wirken (Grosschedl et al., 1994). Dies könnte zur Anlagerung von Präinitiationskomplexen beitragen und damit die Genexpression regulieren, möglicherweise auch durch Anlagerung von Trithorax- oder Polycombgruppenfaktoren (Weiss, 2005).

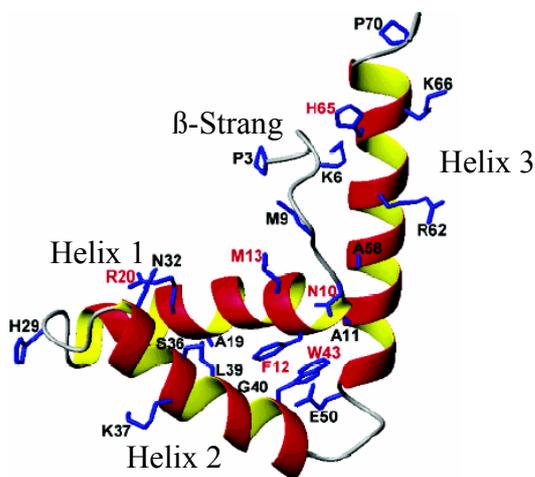


Abb. 1.11: L-förmige Struktur der HMG-Domäne von zfx9. Der N-terminale beta-Strang und die C-terminale Helix drei bilden den langen Arm, die Helices eins und zwei den kurzen Arm (Hsiao et al., 2003).

Alle HMG-Proteine binden an ungewöhnliche DNA-Strukturen wie kreuzförmige DNA (Dailey und Basilico, 2001). Darüber hinaus unterscheidet man zwei Klassen von HMG-Proteinen, abhängig von der Art ihrer DNA-Erkennung: Die erste Klasse bilden Proteine, die nicht-sequenzspezifisch an DNA binden. Meist besitzen diese Proteine zwei oder mehr HMG-Boxen. Dazu gehören UBF, HMG1 und HMG2, die in allen Eukaryoten ubiquitär vorkommen (Dailey und Basilico, 2001). Die zweite Klasse besitzt nur eine HMG-Domäne und bindet sequenzspezifisch an DNA, wie LEF-1, TCF1 und die Sox-Proteine (Laudet et al., 1993; Grosschedl et al., 1994; Bewley et al., 1998; Soullier et al., 1999). Sie kommen nur in Metazoen in bestimmten Zelltypen vor und haben eine spezifische Rolle während der Embryonalentwicklung (Dailey und Basilico, 2001).

Während nicht-sequenzspezifische Domänen in Lösung bei Raumtemperatur weitgehend gefaltet vorliegen, falten und stabilisieren sich sequenzspezifische HMG-Domänen erst an DNA (Dragan et al., 2004; Love et al., 2004). Der Hauptunterschied ist, dass zwar beide

Domänen allein aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen AS-Resten und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat an die DNA binden können (Murphy IV et al., 1999), bei sequenzspezifischer Bindung aber durch extensive van-der-Waals-Kontakte zwischen apolaren Gruppen der AS mit den Basenpaaren der Erkennungssequenz eine weitergehende Interaktion stattfindet. Dies führt zu einem engeren Kontakt zwischen Protein und DNA als bei nicht-sequenzspezifischer Bindung (Dragan et al., 2003 und 2004). Bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung spielt der hydrophobe Kern zwischen Helix eins und zwei eine große Rolle, der mit der DNA interagiert. Vor allem Phenylalanin (F12 in Abb. 1.11) und zwei andere AS (W43 und E50 in Abb. 1.11), die eine zweite, kleinere hydrophobe Struktur in der Ecke der L-Form bilden, scheinen entscheidend zu sein (Hsiao et al., 2003). Demzufolge haben genetische Defekte, die diese Dreiergruppe, den hydrophoben Kern oder die in die DNA interkalierenden AS betreffen, einen Verlust der DNA-Bindung, veränderten DNA-Beugungswinkel oder beides zur Folge (Werner et al., 1996).

Sequenzunabhängige DNA-Bindung ist von vielen schwachen Interkationen und Wasserstoff-Brücken von AS-Seitenketten mit DNA-Basen der kleinen Rinne begleitet, z. B. von Serin an Position 10 (Abb. 1.12). Dieser Mechanismus erlaubt es, mit jeder beliebigen Base Kontakt aufzunehmen. In sequenzspezifisch bindenden HMG-Domänen sitzt an Position 10 dagegen ein Asparagin, das direkte Wasserstoffbrücken mit spezifischen Basen der

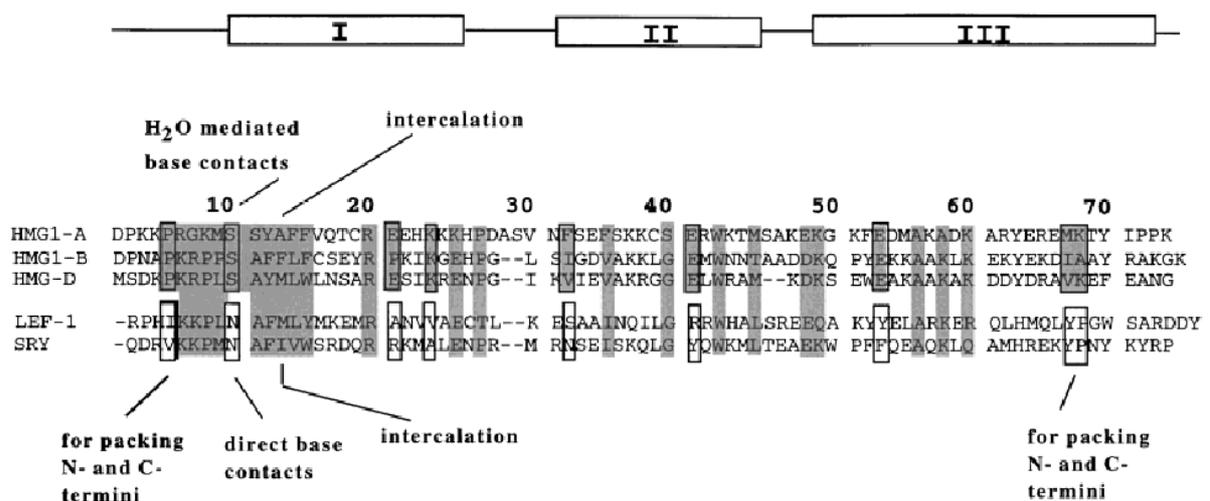


Abb. 1.12: Konservierte und nichtkonservierte AS von klassischen (HMG1-A, HMG1-B und HMG1-D) und sequenzspezifischen (LEF-1, SRY) HMG-Domänen. HMG-D ist das *Drosophila*-Homolog zu HMG1 aus Säugern. Die Position der drei alpha-Helices ist über den AS-Sequenzen gezeigt. Eingerahmte und grau hinterlegte Reste findet man in klassischen HMG-Domänen, während eingerahmte Reste ohne Hinterlegung nur bei sequenzspezifischen HMG-Domänen vorkommen. Grau hinterlegte AS kommen in beiden Gruppen vor. Von den AS-Resten an Position fünf, 67 und 68 wird angenommen, dass sie die Gesamtstruktur von spezifisch bindenden HMG-Domänen beeinflussen (Dailey und Basilico, 2001).

Erkennungssequenz vermittelt (vgl. auch Weiss, 2005). Weitere Reste, die entweder spezifisch Kontakt zu DNA-Basen aufnehmen oder die Faltung der HMG-Domäne selbst unterstützen, tragen zur sequenzspezifischen Bindung bei (Dailey und Basilico, 2001).

### 1.2.5.1 Sox-Proteine

Sox (Sry-Box)-Proteine gehören zu der sequenzspezifisch bindenden Gruppe von HMG-Proteinen. Alle Sox-Proteine scheinen *in vitro* dasselbe Bindemotiv 5'-<sup>A</sup>/<sub>T</sub><sup>A</sup>/<sub>T</sub>CAA<sup>A</sup>/<sub>T</sub>G-3' (Wegner, 1999) zu erkennen, haben aber spezifische Funktionen *in vivo* (Argenton et al., 2004). Man nimmt an, dass die Spezifität für die Bindung bestimmter Zielgene durch Interaktion mit anderen gewebspezifischen Transkriptionsfaktoren bzw. räumlich und zeitlich unterschiedliche Expression der Sox-Gene erreicht wird (Kamachi et al., 2000; Wilson und Koopman, 2002; Wegner, 2005; Wegner und Stolt, 2005). In allen untersuchten Zelltypen konnte während der Embryogenese bzw. im erwachsenen Organismus mindestens ein Sox-Protein gefunden werden.

Sox-Proteine binden im Verhältnis zu anderen Transkriptionsfaktoren nur relativ schwach an DNA, was Kamachi et al. (2000) zu der Annahme bringt, dass erst ein Kofaktor stabile Bindung an DNA und starke Transkription vermittelt.

Der Prototyp aller Sox-Proteine ist das Säugerprotein Sry (*sex-determining region of Y chromosome*), dessen Gen auf dem Y-Chromosom liegt und das die Testisentwicklung einleitet (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990; Koopman, 1999). Die Expression von Sry führt zur Differenzierung von Sertoli-Zellen und so direkt zur Entwicklung von Hoden und dem männlichen Geschlecht (Werner et al., 1996). Es wird nur in einem begrenzten Zeitraum (etwa zwei Tage bei Mäusen) hergestellt und nach der Differenzierung der Sertoli-Zellen zur Aufrechterhaltung des männlichen Phänotyps nicht mehr benötigt. Eine Übersicht über Mutationen des Sry-Gens finden sich bei Werner et al. (1996) und Knowler et al. (2003). Die Suche nach Genen, die durch Sry reguliert werden, führte zu Sox9. Die Expression von Sox9 in den Keimdrüsen ist in allen bis jetzt untersuchten Spezies spezifisch für das männliche Geschlecht und scheint somit das geschlechtsbestimmende Gen in allen Vertebraten zu sein (Koopman et al., 2001). Auch außerhalb der Keimdrüsen ist Sox9 essentiell für die Ausbildung bestimmter Gewebe (siehe Abschnitt 1.3.2).

Per Definition zeigt die HMG-Domäne von Sox-Proteinen mindestens 50% Übereinstimmung mit der von Sry (Wegner, 1999; Bowles et al., 2000), obwohl neu identifizierte Proteine wie Sox30 zum Teil geringere Homologien aufweisen (Bowles et al., 2000). In Vertebraten sind heute mehr als 20 Sox-Proteine bzw. -Gene bekannt. Aufgrund von Sequenzhomologien teilt

man sie in verschiedene Gruppen von A bis J ein (Bowles et al., 2000; Schepers et al., 2002). Innerhalb einer Gruppe erreicht die AS-Übereinstimmung der HMG-Domäne über 90 %, während sie zwischen den verschiedenen Gruppen nur durchschnittlich 60 % beträgt. Zwischen Proteinen einer Gruppe finden sich normalerweise auch außerhalb der HMG-Domäne konservierte Sequenzbereiche (Kamachi et al., 2000).

Als Beispiel eines Sox-Proteins an DNA soll Sox2 (Abb. 1.13) dienen, das von Reményi et al. (2003) untersucht wurde und in Abb. 1.9 zusammen mit Oct-1 gezeigt ist. Sox2 bindet sequenzspezifisch an die DNA, was zu einer Weitung der kleinen Rinne und gleichzeitiger Verengung der großen Rinne führt. Dabei wird die DNA stark gebeugt. Die Seitenketten der Helix zwei (N30, S31, S34) und der Helix eins (M7, F10 und M11) bewirken dabei jeweils eine Beugung von 45 Grad. Die in Abb. 1.12 dargestellten Reste, die wichtig für die sequenzspezifische Bindung der Sox-Proteine an DNA sind, sind auch bei Sox2 konserviert. Der in Abb. 1.11 gezeigte hydrophobe Kern aus F12, W43 und E50 entspricht in Abb. 1.13 den AS F10, W41 und E48. Die C-terminale Verlängerung nach Helix drei hat nur über einen einzigen Rest, Y72, Kontakt zur DNA.

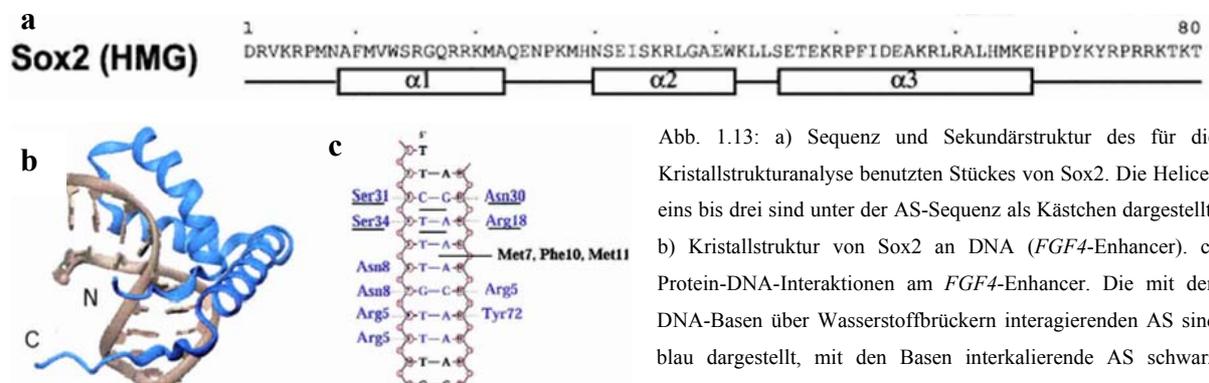


Abb. 1.13: a) Sequenz und Sekundärstruktur des für die Kristallstrukturanalyse benutzten Stückes von Sox2. Die Helices eins bis drei sind unter der AS-Sequenz als Kästchen dargestellt. b) Kristallstruktur von Sox2 an DNA (*FGF4*-Enhancer). c) Protein-DNA-Interaktionen am *FGF4*-Enhancer. Die mit den DNA-Basen über Wasserstoffbrücken interagierenden AS sind blau dargestellt, mit den Basen interkalierende AS schwarz (Reményi et al., 2003).

Zur Gruppe E der Sox-Proteine gehören Sox8, Sox9 und Sox10. Sie besitzen neben der HMG-Domäne und der C-terminal gelegenen TA eine Dimerisierungsdomäne, die direkt N-terminal vor der HMG-Domäne liegt. Für Sox10 wurde gezeigt, dass diese Domäne die kooperative Bindung von zwei Sox10-Proteinen an benachbarte Bindestellen im P0 (*protein zero*)- oder MBP (*myelin basic protein*)-Promotor ermöglicht, wobei auch die HMG-Domäne zur Dimer-Bildung beiträgt (Peirano und Wegner, 2000; Schlierf et al., 2002). Außerdem befindet sich C-terminal der HMG-Domäne eine weitere Region, die konservierte Domäne, deren Funktion bis dato unklar ist. Möglicherweise handelt es sich um eine zweite TA, wie im Labor durchgeführte Versuche vermuten lassen.

## 1.3 Funktion der Transkriptionsfaktoren der Sox-Gruppe E

### 1.3.1 Sox8

Sox8 wurde als letztes Mitglied der Gruppe E identifiziert (Pfeifer et al., 2000; Schepers et al., 2000; Bell et al., 2000). Während der Embryonalentwicklung kann es bei Mäusen in vielen Geweben nachgewiesen werden, wie Skelettmuskeln, Knorpeln und Knochen, Gehirn und Nervensystem, sensorischen Organen, Nieren, Nebennieren und Hoden (Sock et al., 2001). Es ist ein spezifischer Marker für Muskel-Satellitenzellen und wirkt als negativer Regulator der Skelettmuskeldifferenzierung, möglicherweise durch Störung der Funktion von myogenen bHLH-Proteinen (Schmidt et al., 2003).

*Sox8* wird häufig mit *Sox9* oder *Sox10* koexprimiert, wie in Osteoblasten oder dem zentralen Nervensystem (Schmidt et al., 2005). Dies führte zu der Annahme, dass der Verlust von Sox8 durch ein anderes Sox-Protein der Gruppe E kompensiert werden kann und spricht somit für eine redundante Funktion von Sox9 und Sox10 (Stolt et al., 2004; Maka et al., 2005; Stolt et al., 2005).

Überlappende Expression mit Sox9 wurde vor allem in mesodermalen Derivaten beobachtet (Sock et al., 2001). Außerdem ist *Sox8* möglicherweise an der Geschlechtsentwicklung beteiligt, da es zusammen mit *Sox9* in Sertoli-Zellen exprimiert wird (Schepers et al., 2003; Chaboissier et al., 2004). Sox8-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fertil, zeigten aber neben einer leichten Verringerung des Körpergewichts weitere Entwicklungsstörungen (Sock et al., 2001; Schmidt et al., 2003; Schmidt et al., 2005). So war die terminale Differenzierung von Oligodendrozyten verzögert (Stolt et al., 2004), vor allem bei *Sox8*-defizienten Mäusen, die zusätzlich nur noch ein funktionelles *Sox10*-Allel besaßen. Dies weist auf eine redundante Funktion von *Sox8* und *Sox10* hin, wobei sich die Proteine nicht in vollem Umfang gegenseitig ersetzen können. Mäuse, die *Sox8* anstelle von *Sox10* exprimierten, wiesen Defekte auf, die auf eine beschränkte Redundanz von Sox8 in Bezug auf die Entwicklung des enterischen Nervensystems und der Oligodendrozytendifferenzierung hindeuten (Stolt et al., 2004; Maka et al., 2005; Kellerer et al., 2006).

### 1.3.2 Sox9

Wie bereits erwähnt, spielt *Sox9* bei der Geschlechtsentwicklung eine Schlüsselrolle, in Säugern möglicherweise direkt nach der Expression von *Sry*, und bewirkt in vermutlich allen Vertebraten die Differenzierung von Sertoli-Zellen und die daraus folgende Entwicklung der Hoden (Morais da Silva et al., 1996). Dabei reguliert *Sox9* sowohl die Expression von Anti-Müller-Hormon (AMH) als auch des steroidogenen Faktors 1 (SF1) (de Santa Barbara et al., 1998; Shen und Ingraham, 2002). Außerdem ist es für die Chondrogenese bei der Skelettentwicklung verantwortlich (Akiyama et al., 2002). Bereits heterozygote Mutationen des *Sox9*-Gens führen bei Menschen zu Campomelischer Dysplasie (CD), oft zusammen mit einer Geschlechtsumkehr (SRA1, *autosomal sex reversal*) (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). Diese Krankheit ist durch schwere Fehlbildungen der Langknochen und des Schädels charakterisiert, an der die meisten Betroffenen bereits im Kindesalter sterben. Die in 75 % der Fälle auftretende Geschlechtsumkehr beim XY-Genotyp zum weiblichen Phänotyp weist darauf hin, dass die Geschlechtsentwicklung von der *Sox9*-Dosis abhängt und mit nur einer funktionellen Kopie von *Sox9* ein kritischer Wert erreicht ist (Koopman et al., 2001). Weiterhin ist *Sox9* wichtig für die Entwicklung von Astrozyten und Oligodendrozyten. Es bewirkt die Spezifizierung der Oligodendrozyten und wird in diesen Zellen mit dem Einsetzen der terminalen Differenzierung herunterreguliert (Stolt et al., 2003).

### 1.3.3 Sox10

*Sox10* wird in der Neuralleiste und deren Derivaten exprimiert (Kuhlbrodt et al., 1998b) und ist kritisch für die Spezifizierung der Neuralleiste, der Entwicklung von Melanozyten und der terminalen Differenzierung von Oligodendrozyten (Southard-Smith et al., 1998; Herbarth et al., 1998; Kuhlbrodt et al., 1998a und b; Pingault et al., 1998). Es spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des peripheren und enterischen Nervensystems (Britsch et al., 2001). *Sox10*-Defekte verursachen Myelinisierungsstörungen (Pingault et al., 2001), da es die Expression verschiedener Myelogene wie MBP oder P0 kontrolliert (Stolt et al., 2002; Peirano et al., 2000; Peirano und Wegner, 2000). Die Mutation beider Allele ist embryonal letal und durch schwere Defekte in verschiedenen Teilen des peripheren und enterischen Nervensystems charakterisiert (Kuhlbrodt et al., 1998c; Britsch et al., 2001). Heterozygote Mutationen wurden in Patienten mit Waardenburg-Shah-Syndrom entdeckt (Pingault et al., 1998). Diese Krankheit kombiniert die klassischen Eigenschaften des Waardenburg-Syndroms (Taubheit

und Pigmentierungsstörungen) mit dem aganglionotischen Megacolon der Hirschsprung-Krankheit. Die spontane DOM (*dominant megacolon*)-Maus-Mutante stellt ein Modell für diese Krankheit dar, da hier ebenfalls Pigmentierungsdefekte und Megacolon auftreten (Herbarth et al., 1998; Southard-Smith et al., 1998). Als Zielgene von Sox10 wurden neben *P0* und *MBP c-ret*, die Untereinheiten des *nACh*-Rezeptor  $\beta 4$  und  $\alpha 3$ , *Connexin 32*, *Trp2*, *Mitf* (*microphthalmia transcription factor*), *Connexin 47*, *Cntf* (*ciliary neurotrophic factor*) und *Krox20* identifiziert (Lang et al., 2000; Liu et al., 1999; Melnikova et al., 2000a und b; Bondurand et al., 2001; Ludwig et al., 2004; Potterf et al., 2001; Lee et al., 2000; Bondurand et al., 2000; Verastegui et al., 2000; Schlierf et al., 2006; Ito et al., 2006; Ghislain und Charnay, 2006; zusammengefasst in Mollaaghababa und Pavan, 2003), die Sox10 außer bei *P0* zusammen mit Kofaktoren synergistisch aktiviert.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass Sox10 nicht isoliert agiert, sondern meist in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren wirkt. Die Aufdeckung des zugrunde liegenden Mechanismus dieser synergistischen Interaktion, eingeschlossen der Identifizierung von Faktoren, die möglicherweise direkt an Sox10 binden, ist für das Verständnis der Funktion von Sox10 essentiell. Dazu soll diese Arbeit beitragen.

## 2 Problemstellung

Sox-Proteine sind wichtige Transkriptionsfaktoren für eine große Anzahl von Entwicklungsprozessen. Durch die Bindung in die kleine Rinne der DNA und die dadurch verursachte starke Beugung der DNA sowie aufgrund der Tatsache, dass viele Sox-Proteine nur eine schwache Transaktivierungsfähigkeit aufweisen, wurde angenommen, dass sie zur effektiven Transaktivierung von Zielgenen weitere Transkriptionsfaktoren benötigen. Der Transkriptionsfaktor Sox10 ist wesentlich an der Entwicklung von Gliazellen des peripheren, enterischen und zentralen Nervensystems beteiligt. Mit welchen anderen Proteinen er dazu interagiert bzw. welche Zielgene er reguliert, konnte bis jetzt nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten deshalb mit Hilfe von *Yeast two-hybrid Screens* Interaktionspartner von Sox10 gefunden werden.

Neben der Verifizierung der gefundenen Interaktionen durch *GST-Pulldown*-Studien sollten die für die Interaktion wichtigen Domänen bzw. Aminosäuren von Sox10 identifiziert werden. Weitere Untersuchungen der interagierenden Proteine und Sox10 sollten an DNA durchgeführt werden. Dazu sollten zuerst Promotoren mit direkt benachbarten Bindestellen von Sox10 und den identifizierten interagierenden Transkriptionsfaktoren gefunden werden und dann mittels Gelshifts eine direkte Interaktion der Proteine an DNA gezeigt werden. Diese Interaktionen sollten mit Hilfe von Luziferase-Aktivitätstests bestätigt werden.

Von anderen Sox-Proteinen wurde bereits über eine Phosphorylierung berichtet. Auch bei Sox10 gab es Hinweise, dass es phosphoryliert werden kann und dadurch schlechter an DNA bindet. An welchen Stellen die Phosphorylierung stattfindet, war jedoch noch ungeklärt. Im zweiten Teil der Arbeit sollten deshalb die für die Phosphorylierung von Sox10 wichtigen Aminosäuren zuerst mit bioinformatischen Methoden identifiziert werden, um dann mittels *overlap-PCR* Mutationen in in Frage kommende Aminosäuren einzuführen. Die mutierten Proteine sollten dann in Gelshifts im Vergleich zum Wildtyp-Sox10 untersucht werden. Weitere Experimente sollten mit 2D-Gelen durchgeführt werden, um die phosphorylierten Aminosäuren analysieren und die Ergebnisse bestätigen zu können.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Identifikation von Sox10-Interaktionspartnern mit Hilfe von *Yeast two-hybrid Screens*

Um mögliche Interaktionspartner von Sox10 zu identifizieren, wurden *Yeast two-hybrid Screens* durchgeführt. *Yeast two-hybrid*-Systeme kann man nutzen, um eine cDNA-Bank nach neuen Interaktionspartnern für ein bekanntes Protein zu durchsuchen. Sie stellen eine sensitive Methode dar, um auch relativ schwache oder kurzlebige Proteininteraktionen nachzuweisen (Fields und Sternglanz, 1994). Außerdem bieten sie den Vorteil, in lebenden Organismen durchgeführt zu werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass die Proteine in ihrer natürlichen Konformation vorliegen und detektierte Interaktionen echt sind, größer als bei *in vitro* Untersuchungen ist (Bai und Elledge, 1996).

Das dem *Yeast two-hybrid Screen* zugrunde liegende Prinzip wurde 1989 von Fields und Song entwickelt (Fields und Song, 1989). Es beruht darauf, dass Transkriptionsfaktoren eine DNA-bindende und eine transaktivierende Domäne enthalten (DNA-BD und TA; Fields und Sternglanz, 1994; Gietz et al., 1997). Diese Strukturen werden im *Screen* getrennt und können nur dann wieder zusammen aktiv werden, wenn die zugleich mit ihnen als Fusionsprotein synthetisierten zu untersuchenden Proteine interagieren und dadurch den DNA-bindenden und den transaktivierenden Teil in unmittelbare Nachbarschaft bringen (Fields und Song, 1989). Die Aktivität ist dabei von der Distanz und Orientierung der Domänen zueinander unabhängig (Fields und Sternglanz, 1994). Der so entstandene Transkriptionsfaktor bewirkt die Expression eines Reportergens, wodurch die Identifikation interagierender Proteine ermöglicht wird (Fields und Song, 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurde die GAL4-DNA-BD des Vektors pGBKT7 zusammen mit einem Teil von Sox10 als Fusionsprotein in Hefe synthetisiert. Sox10 fungierte dabei als „Köder“, engl. *bait*, mit dem in einer cDNA-Bank nach interagierenden Proteinen, der „Beute“, engl. *prey*, „gefischt“ wurde. Diese cDNAs wurden als translationelle Fusion mit der VP16-TA exprimiert. Ein funktionstüchtiger transaktivierender Komplex, entstanden durch die Interaktion des Sox10-Fusionsproteins mit einem aus der cDNA-Bank synthetisierten Protein, wurde über die Reportergene *his3*, *ade2* und *lacZ* des hier verwendeten Hefestamms AH109 nachgewiesen (Abb. 3.1).

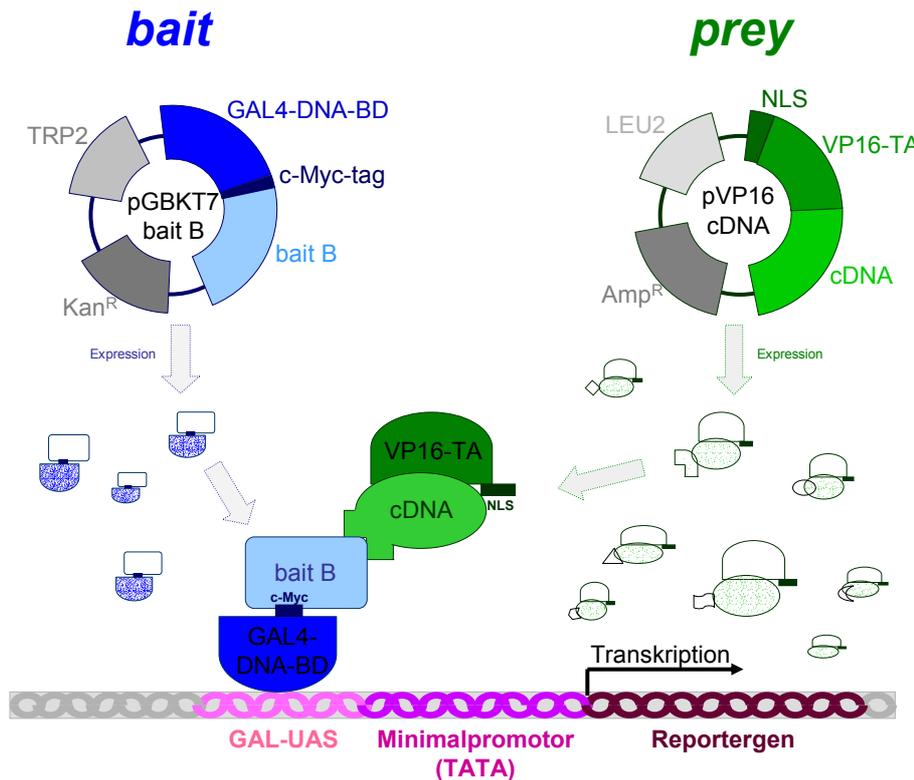


Abb. 3.1: Prinzip des hier verwendeten *Yeast two-hybrid*-Systems. Dargestellt sind der *bait*-Vektor pGBKT7 mit *bait B* von Sox10 und der *prey*-Vektor pVP16, der die cDNA-Bank enthält. Kann ein *prey*-Protein mit Sox10 *bait B* interagieren, kommen die GAL4-DNA-BD und die VP16-TA in direkte räumliche Nachbarschaft, wodurch ein funktioneller Transkriptionsfaktor entsteht und die Expression des Reportergens erfolgen kann.

### 3.1.1 Amplifikation einer cDNA-Bank aus Maus

Für die Suche nach Interaktionspartnern von Sox10 mit Hilfe des *Yeast two-hybrid*-Systems wurde eine entsprechende cDNA-Bank benötigt. Von Prof. J. Behrens erhielten wir ein Aliquot einer aus 10.5 dpc (*days post coitum*) Mäuseembryonen hergestellten cDNA-Bank (Behrens et al., 1996). Während dieses Embryonalstadiums lässt sich eine hohe Sox10-Expression in verschiedenen Zelltypen nachweisen (Kuhlbrodt et al., 1998b). Da zu dieser Zeit wohl auch die Zahl von Interaktionspartnern für Sox10 besonders hoch ist, erschien diese Bank als geeignet, mit Sox10 interagierende Proteine zu finden. Die Anzahl unabhängiger Klone der cDNA-Bank wurde mit  $1 \times 10^8$  angegeben und übertrifft somit die Mindestanzahl von  $1 \times 10^6$  Klonen für eine bei *Screens* verwendete Bank (MATCHMARKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual, 1999). Um genügend Plasmid-DNA für Hefe-*Screens* zu erhalten, musste das Aliquot amplifiziert werden. Dabei wurden 5,6 mg DNA erhalten.

Das pVP16-Plasmid trägt neben einem Trp2-Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen für die Amplifikation in *E. coli*. Die cDNA-Fragmente sind über eine NotI-Schnittstelle hinter die Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localization sequence*) und die TA von VP16 kloniert und werden damit als zusammenhängendes Protein hergestellt (vgl. Abb. 3.1). Die NLS stellt sicher, dass das Protein auch in den Kern gelangt und dort mit *bait* B interagieren und die Expression eines Reportergens bewirken kann.

### 3.1.2 Auswahl des Sox10-baits

Da es sich bei Sox10 um einen Transkriptionsfaktor mit eigener DNA-BD und TA handelt, konnte für die *Screens* nicht das ganze Protein als *bait* verwendet werden, da dies zu autonomer Transaktivierung der Reportergene führen würde, sondern nur ein Teil, der diese Domänen nicht (vollständig) enthält. Es existierten bereits Fragmente von Sox10 (Ratte), die *baits* A bis D, die diesen Ansprüchen genügten (Abb. 3.2).

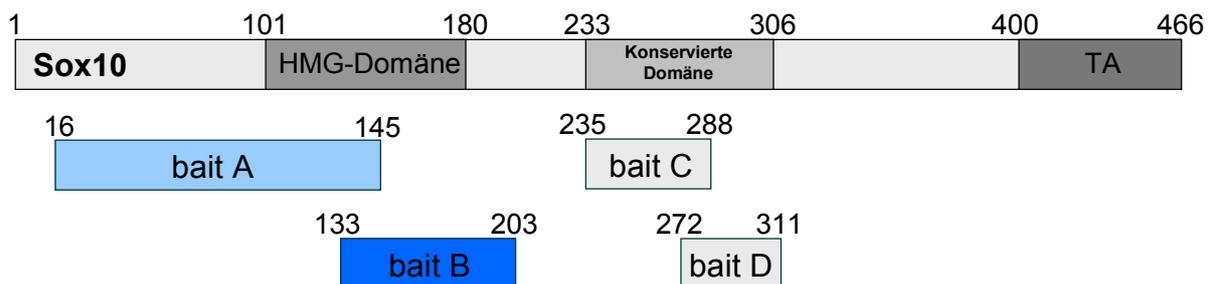


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Sox10-Proteins (Ratte) mit den *baits* A bis D. Die HMG-Domäne, die konservierte Domäne und die transaktivierende Domäne (TA) sind hervorgehoben. Die *baits* A und B enthalten den N- bzw. C-terminalen Bereich der HMG-Domäne, die *baits* C und D den N- bzw. C-terminalen Bereich der konservierten Domäne. Zahlen über den Balken stehen für die AS an Beginn und Ende des Proteins, der Domänen und der *baits*.

Davon wurde *bait* B bereits erfolgreich in *Screens* eingesetzt (Schlierf et al., 2005). Deshalb wurde dieses *bait* ausgewählt und aus dem Plasmid pGBT9, das eine Ampicillin-Resistenz enthält, in den Vektor pGBKT7 mit Kanamycin-Resistenz umklontiert, wo es zusammen mit der GAL4-DNA-BD und einem c-myc-Epitop-tag als Fusionsprotein synthetisiert wurde (vgl. Abb. 3.1). Die Kanamycin-Resistenz ist wichtig, um das *bait*-Plasmid später von den Plasmiden der cDNA-Bank mit Ampicillin-Resistenz trennen zu können.

### 3.1.3 Vorausgehende Tests

Bevor mit den *Screens* begonnen werden konnte, musste geprüft werden, ob die Bank und das in den neuen Vektor umgesetzte *bait* auch für die Verwendung im Hefestamm AH109 geeignet waren und unter welchen Bedingungen die *Screens* durchgeführt werden konnten.

#### 3.1.3.1 Untersuchung von Sox10 *bait* B auf Eignung für die Verwendung in *Screens*

Zuerst wurde untersucht, ob das *bait*-Konstrukt möglicherweise toxisch auf die Hefen wirkt. Dies konnte durch stündliche Messung der OD<sub>600</sub> einer Flüssigkultur von AH109, die mit pGBKT7-*bait* B transformiert wurde, ausgeschlossen werden. Das Wachstum in der log-Phase war exponentiell und entsprach dem des untransformierten Stamms (Daten nicht gezeigt).

Um festzustellen, ob das Fusionsprotein aus GAL4-DNA-BD und Sox10 auch in voller Länge hergestellt wird, wurden aus transformierten und untransformierten Hefen Proteinextrakte hergestellt und mittels Western-Blot auf das Vorhandensein des Fusionsproteins hin untersucht. Das Konstrukt aus GAL4-DNA-BD, c-myc-tag und *bait* B Sox10 hat eine Länge von 783 bp, was 261 AS und somit einer ungefähren Größe von 32,6 kDa entspricht. Es konnte mittels eines gegen den c-myc-tag gerichteten Antikörpers in den transformierten Hefen in der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abb. 3.3).

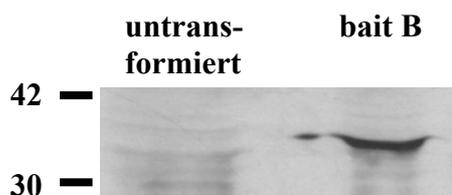


Abb. 3.3: Western-Blot mit Gesamtzelllysaten des Hefestamms AH109, links der untransformierte Stamm und rechts mit pGBKT7/*bait* B Sox10 transformiert. Das Fusionsprotein aus GAL4-DNA-BD, c-myc-tag und *bait* B hat eine Größe von 32,6 kDa. Der Nachweis des Proteins im Westernblot erfolgte über seinen c-myc-tag.

Außerdem wurden Untersuchungen zu einer eventuellen autonomen Transaktivierung durch das *bait* durchgeführt. Dazu wurden mit dem *bait*-Konstrukt transformierte Hefen verwendet. Auf Selektionsplatten ohne Tryptophan wuchsen wie erwartet Kolonien, da der pGBKT7-Vektor diesen Mangel unabhängig vom Insert komplementieren kann. Auf Platten ohne Tryptophan und Histidin fand ebenso wie auf Platten ohne Tryptophan und Adenin kein Wachstum statt. Dies könnte nur erfolgen, wenn das *bait* zu autonomer Transaktivierung der Reportergene in der Lage wäre. Als Positivkontrolle wurde das *bait* zusammen mit einem verifizierten Interaktionspartner, Trip12 (S. Lang, unveröffentlichte Daten), in Hefen transformiert und auf Selektionsplatten ohne Tryptophan und Histidin bzw. ohne Tryptophan

und Adenin getestet. Dieser Partner konnte mit Sox10 interagieren und somit die Expression der Reportergene und Wachstum auf den Selektionsmedien bewirken. Als Negativkontrolle wurde der leere pGBKT7-Vektor auf den genannten Medien eingesetzt. Erwartungsgemäß bildeten sich hier außer auf Platten ohne Tryptophan keine Kolonien (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.3.2 Analyse der cDNA-Bank für die Verwendung in Screens

Durch eine Testtransformation von *E. coli* mit der cDNA-Bank und anschließendem Restriktionsverdau der isolierten Plasmide mit NotI wurde ermittelt, dass 95 % der Vektoren ein cDNA-Insert mit durchschnittlich 450 bp trägt.

Untersuchungen des mit der cDNA-Bank transformierten Hefestamms AH109 auf Medium ohne Leucin zeigten erwartungsgemäß Wachstum von Kolonien, da der pVP16-Vektor das Gen enthält, das die Synthese von Leucin ermöglicht. Weitere mit dem leeren pVP16-Vektor durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass dieser nicht in der Lage ist, die Reportergene des Hefestamms allein oder zusammen mit dem *bait*-Konstrukt zu aktivieren (Daten nicht gezeigt). Dies kann somit allein über die Interaktion des *preys* mit dem *bait* erfolgen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl das *bait*-Konstrukt als auch die cDNA-Bank für Screens mit dem Hefestamm AH109 geeignet waren.

### 3.1.3.3 Test-Transformationen zur Ermittlung der optimalen Screen-Bedingungen

Im kleinen Maßstab durchgeführte Testtransformationen des Hefestamms AH109 mit Sox10 *bait* B und der cDNA-Bank wurden auf Selektionsplatten mit verschiedenen Medien ausgebracht, um die optimalen Screenbedingungen zu ermitteln. Dabei wurde sowohl die Originalbank als auch die amplifizierte Bank verwendet. Zwischen diesen ließ sich bezüglich der Kolonienzahl auf den unterschiedlichen Platten kein Unterschied feststellen, weshalb sie für alle folgenden Transformationen im Verhältnis eins zu eins gemischt wurden, um genügend DNA, aber trotzdem möglichst viele unabhängige Klone (die beim Amplifizieren der Bank verloren gehen können) zur Verfügung zu haben. Es wurden Platten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 3-AT-Konzentrationen (3-Amino-1,2,4-Triazol, ein Hemmstoff der Histidin-Synthese) im Bereich zwischen 0 mM und 50 mM sowie Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin getestet. Dabei zeigte sich, dass auf Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin kein 3-AT nötig war, um das Wachstum von Hintergrundkolonien zu unterbinden und gleichzeitig die positiven

Interaktionen nicht zu stören. Die zusätzliche Selektion mit 3-AT bzw. Adenin war zu stringent.

Als Positivkontrolle wurden die kommerziell erhältlichen Vektoren pGBKT7-53 und pGADT7-T eingesetzt (Clontech), die Fusionen zwischen der GAL4 DNA-BD und Maus-p53 sowie der GAL4-TA und SV40 large T-Antigen kodieren, von denen eine starke Interaktion bekannt ist und anhand derer die Selektionsplatten überprüft wurden. Dabei trägt der pGBKT7-Vektor, wie schon beschrieben, einen Selektionsmarker für Tryptophan, der pGADT7-Vektor für Leucin. Als Negativkontrolle wurde das *bait*-Konstrukt zusammen mit dem leeren Bank-Vektor verwendet, was erwartungsgemäß zu keinem Wachstum führte (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.4 *Yeast two-hybrid Screens* mit Sox10 *bait B* und der cDNA-Bank

Es wurden drei *Screens* unter den bei den Test-Transformationen (siehe Abschnitt 3.1.3.3) ermittelten Bedingungen auf Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin durchgeführt. Die Transformation von AH109 erfolgte dabei, wie auch bei den Testtransformationen, nicht simultan, sondern es wurde zuerst das *bait*-Konstrukt in den Stamm eingebracht und dieser dann mit der cDNA-Bank transformiert. Diese Methode bietet den Vorteil, dass weniger DNA der cDNA-Bank benötigt wird.

#### 3.1.4.1 Übersicht zur Durchführung der *Screens*

Die Anzahl der gescreenten Klone wurde in den drei *Screen*-Runden mit  $5,3 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  bestimmt. Die Transformationseffizienzen lagen mit durchschnittlich  $1,6 \times 10^4$  *cfu* (*colony forming units*) pro  $\mu\text{g}$  DNA im Normalbereich.

Von den *Screen*-Platten wurden 237, 92 bzw. 269 Klone gepickt und mit sogenannten Filterlift-Tests zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität überprüft (Tabelle 3.1). Dabei handelt es sich um *LacZ*-Reporter-Untersuchungen der Hefekolonien, die auf Filterpapier durchgeführt werden (siehe Material und Methoden). Von den dunkelblauen (bei *Screen* drei auch von den hellblauen) Kolonien wurden die Plasmide isoliert, *E. coli* durch Elektroporation damit transformiert und die Bakterien mittels Ampicillin-Platten auf die *prey*-Plasmide selektioniert. Dabei konnte von zwei Hefekolonien keine DNA isoliert werden. Von je fünf bis zehn *E. coli*-Kolonien pro Elektroporation wurden die Plasmide isoliert, die Insertgrößen mittels Restriktionsverdau bestimmt und die DNA für die Rücktransformation in

Hefe verwendet. Wurden unterschiedliche Insertgrößen erhalten, was darauf hindeutet, dass die Hefen ursprünglich mehr als ein *prey*-Plasmid aufgenommen hatten, wurde diese DNA separat rücktransformiert. Das erklärt, warum in Tabelle 3.1 die Summe der Rücktransformanten höher als die Zahl der ursprünglichen Elektroporationen ist. Hefen, die bei der Rücktransformation sehr viele Kolonien bildeten oder bei denen die Kolonien außergewöhnlich groß waren, wurden erneut einem Filterlift-Test unterzogen und die DNA von dunkelblauen, und, falls diese nicht klar unterschieden werden konnten, von hellblauen Kolonien sequenziert. Dabei wurden von anfangs insgesamt 698 gepickten Klonen 69 endgültige Kandidaten erhalten. Die restlichen Klone wurden verworfen.

Screen Nr.	Gepickte Klone	Farbe der Hefekolonien beim Filterlift-Test			Elektroporation in <i>E. coli</i>	Wachstum der Hefen bei Rücktransformation				Farbe der Hefekolonien beim 2. Filterlift-Test			Anzahl sequenzierter Klone	Endgültige Kandidaten
		d.-blau	hellblau	weiß		+++	++	+	/	d.-blau	hellblau	weiß		
1	237	51	158	28	50	25	5	4	23	28	3	4	29	23
2	92	23	20	49	22	16	11	10	6	17	6	14	18	12
3	269	51	45	173	96	38	22	40	47	25	11	2	36	34
Summe	698	125	223	250	168	79	38	54	76	70	20	20	83	69

Tabelle 3.1: Übersicht der durchgeführten Schritte bei den *Yeast two-hybrid Screens*. Die Zahlen geben die Kolonien- bzw. Sequenzenanzahl der einzelnen Schritte an. Von links nach rechts wurden für jeden *Screen* die Anzahl der gepickten Klone, die Farbe und Anzahl der Kolonien beim Filterlift-Test (d.-blau, dunkelblau), die Zahl von Elektroporationen in *E. coli*, die Anzahl der rücktransformierten Hefen und deren Wachstumsstärke (+++ starkes Wachstum, ++ normales Wachstum, + schwaches Wachstum, / kein Wachstum), die Farbe und Anzahl der Kolonien beim zweiten Filterlift-Test, die Anzahl sequenzierter Klone und die Zahl der endgültigen Kandidaten aufgeführt.

### 3.1.4.2 Ergebnisse der *Yeast two-hybrid Screens* mit Sox10 *bait B* und der cDNA-Bank

Insgesamt wurden 83 Klone sequenziert. Vier waren nicht im korrekten Leseraster, neun in falscher Orientierung inseriert, und ein Kandidat konnte nicht sequenziert werden. Es blieben also 69 Sequenzen übrig (vgl. Tabelle 3.1), die mit der Genbank verglichen wurden ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Davon wurden jeweils die Ergebnisse mit der höchsten Homologie ausgewählt, woraus sich die in Tabelle 2 gezeigten Resultate ergaben. Von den 69 verifizierten Sequenzen kamen zwei je fünf- bzw. viermal vor, drei je dreimal, zwölf kamen je zweimal vor und 18 nur einmal.

Viele Kandidaten (13 von 37, also 35 %) wurden in mehr als einem Screen gefunden, was für eine gute Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse spricht. Auch die Anzahl von bekannten Falsch-Positiven ([www.dualsystems.com](http://www.dualsystems.com), [www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html](http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html)), zum Beispiel Filamine, die oft in *Screens* auftauchen, war

Lokali- sation	Kandidat	Genbank- Nummer	Screen Nummer		
			1	2	3
Kern (Transkriptionsfaktor)	Distal-less homeodomain 5 (Dlx5)	NM_010056	x	x	
	HoxA3	NM_153632	x		
	HoxA3	NM_010452			x
	HoxB2	XM_220894			x
	Hematopoietically expressed homeodomain (Hhex)	NM_008245	x		
	Aristaless 4 (Alx4)	NM_007442			x
	Upstream transcription factor 1 (UTF1)	NM_009480	x	x	x
	POU domain, class 3 (Brn-1)	NM_008900	2x		2x
	Host cell factor 1 (Hcfc1)	NM_008224			2x
Kern	Nuclear receptor coactivator 6	NM_019825	x	x	
	Ring finger protein 2	NM_011277	x		
	Ring finger protein 110	NM_009545			x
	cDNA (SNF2/RAD54 family protein)	NM_146235	3x	2x	
	Nucleosome assembly protein-1-like-1	NM_015781			x
	Cyclin D3	NM_007632	x	x	
	Homeodomain interacting protein kinase 2	NM_010433			2x
	Similar to transformation / transcription domain associated protein	XM_213706			x
	FtsJ homolog 3	NM_025310			x
	SET and MYND domain containing 1	NM_009762			x
	E1A binding protein p400	NM_0293370			x
Cytoplasma	Ribophorin 1	NM_133933	x		x
	Glycerinaldehyde-3-phosphat-dehydrogenase	NM_008084	2x		
	Transient receptor potential cation channel	NM_021450	2x	x	2x
	Suppression of tumorigenicity 13	NM_133726			2x
	Sorting nexin 5	NM_024225			x
	SH3-domain binding protein 1	NM_009164			x
	DEP domain containing 5	NM_177786			2x
	Enolase 1	XM_282742			3x
	Enolase 1	NM_023119	x	x	x
	Filamin A	XM_289920		x	x
Filamin B	XM_127565	x			
andere	Oxysterol binding protein like 5	NM_024289	x		x
	cDNA	NM_021303	x		
	RIKEN cDNA Arsenic ATPase	NM_026753			x
	RIKEN cDNA (uncharacterized protein Sand)	NM_028369	x	x	2x
	Desmin-binding fragment	AJ403401		x	
	Catenin alpha 1	NM_009313	2x		

Tabelle 3.2: Ergebnisse der *Yeast two-hybrid Screens*. Von links nach rechts sind der Name des gefundenen Kandidaten, die Genbank-Nummer und die *Screen*-Nummer angegeben. Kreuze (x) bezeichnen einmal, Zahlen davor die Anzahl mehrfach gefundener Kandidaten. Die Spalte ganz links gibt die bevorzugte Lokalisation der Proteine in der Zelle an (Informationen unter der jeweiligen Genbank-Nummer in der NCBI-Genbank), wobei nochmals zwischen Kernproteinen und ebenfalls im Kern vorkommenden Transkriptionsfaktoren unterschieden wurde. Proteine, die weder im Kern noch im Cytoplasma lokalisiert sind, sondern in der extrazellulären Matrix vorkommen, integrale Membranbestandteile sind oder deren Lokalisation unbekannt ist, wurden unter „andere“ zusammengefasst.

äußerst gering. Insgesamt schienen die erhaltenen Kandidaten somit für weitere Untersuchungen geeignet.

Die cDNAs wurden in Tabelle 3.2 nach der bevorzugten Lokalisation der resultierenden Proteine in der Zelle geordnet, wobei nochmals zwischen Kernproteinen und ebenfalls im Kern vorkommenden Transkriptionsfaktoren unterschieden wurde. Neben Proteinen, die im Cytoplasma lokalisiert sind, wurden solche, deren Lokalisation unbekannt ist, die integrale Membranproteine darstellen oder die in der extrazellulären Matrix vorkommen, unter „andere“ zusammengefasst.

Auffällig ist die große Anzahl an Transkriptionsfaktoren, die 24 % aller verifizierten Kandidaten ausmachen. Dazu gehören *Dlx5*, verschiedene Hox-Proteine, *Hhex* und *Alx4*, die alle eine Homöodomäne besitzen, *UTF1* mit einer bHLH-Domäne, das POU-Domänen-Protein *Brn-1* und *Hcfc1* mit einer beta-Propeller-Domäne (s. Tabelle 3.3). Dabei enthalten die cDNA-Fragmente außer bei *Hcfc1* zumindest einen Teil der DNA-Bindedomäne.

Name	Genbank-Nr.	DNA-BD	Länge Domäne [bp] (vollständige DNA)	Länge Domäne [AS] (vollständiges Protein)	Länge cDNA [bp] (Übereinstimmung Blast)	Länge cDNA [Codons] (Übereinstimmung Blast)	DNA-BD enthalten
<i>Dlx5</i>	NM_010056	Homöodomäne	594- 764	138-194	540- 912	120- 243	ganz
<i>Hhex</i>	NM_008245	Homöodomäne	445- 615	139-195	287- 719	86- 230	ganz
<i>Alx 4</i>	NM_007442	Homöodomäne	802- 988	203-264	757-1401	188- 399	ganz
<i>HoxA3</i>	NM_153632	Homöodomäne	290- 460	34- 90	260- 530	24- 107	ganz
<i>HoxA3</i>	NM_010452	Homöodomäne	877-1059	190-250	854-1114	183- 268	ganz
<i>HoxB2</i>	XM_220894	Homöodomäne	491- 607	153-191	429- 688	133- 218	ganz
<i>Brn-1</i>	NM_008900	POU <sub>s</sub>	943-1149	315-383	1076-1462	360- 487	Anfang fehlt
		POU <sub>H</sub>	1195-1374	366-458			ganz
<i>UTF1</i>	NM_009480	bHLH	855-1022	200-255	979-1293	242- 310	Anfang fehlt
<i>Hcfc1</i>	NM_008224	β-Propeller	406- 519 1072-1239	32- 69 251-309	3974-4178	1222-1288	nein

Tabelle 3.3: Übersicht aller in den *Yeast two-hybrid Screens* gefundenen Transkriptionsfaktoren. Von links nach rechts sind der abgekürzte Name (vgl. Tabelle 1), die Genbank-Nummer, die DNA-BD der Transkriptionsfaktoren, die Länge der Domäne der vollständigen DNA bzw. des vollständigen Proteins in bp und AS, die Übereinstimmung der im Blast gefundenen cDNA mit der vollständigen DNA bzw. der Codons mit dem vollständigen Protein, sowie ob die Domäne im cDNA-Stück enthalten ist, angegeben. POU<sub>s</sub> bezeichnet die POU-spezifische, POU<sub>H</sub> die POU-Homöodomäne.

Neben den Transkriptionsfaktoren sind weitere 30 % der Kandidaten vorwiegend im Kern lokalisierte Proteine, z.B. Kofaktoren der Transkription, Helikasen, Kinasen und Zellzyklusproteine.

24 % aller Kandidaten kommen natürlicherweise im Cytoplasma vor. Beim *Yeast two-hybrid Screen* sind sie jedoch durch die Expression ihrer cDNA zusammen mit der NLS des *prey*-Plasmids im Kern lokalisiert, damit eine Interaktion mit dem *bait* stattfinden kann. Die

normalerweise cytoplasmatische Lokalisation schließt aber eine Interaktion solcher Proteine mit Sox10 nicht aus, da Sox10 zwischen Kern und Cytoplasma hin- und herwechseln kann (Rehberg et al., 2002), und so auch neben den für einen Transkriptionsfaktor nötigen nukleären Proteinen durchaus cytoplasmatische Interaktionspartner haben könnte.

Insgesamt sind über 50 % aller gefundenen Proteine entweder Transkriptionsfaktoren oder an der Transkription beteiligte Proteine. Dies führte zu der Vermutung, dass Sox10 über das im *Screen* verwendete Fragment direkt mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren kann, und dazu keine weiteren Kofaktoren benötigt werden. Dies würde bedeuten, dass die HMG-Domäne von Sox-Proteinen nicht nur die Funktion der DNA-Bindung hat, sondern auch der Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren dient.

Ein genauerer Blick auf das *bait* zeigt, dass es aus Helix zwei, drei und einem kurzen C-terminalen Stück der HMG-Domäne besteht (Abb. 3.4).

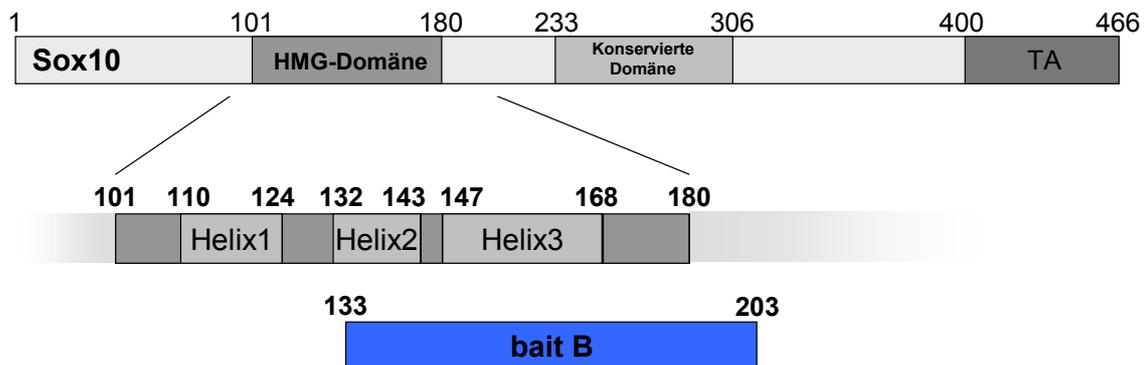


Abb. 3.4: Die DNA-bindende Domäne von Sox10. Schematische Darstellung des Sox10-Proteins (Ratte) mit der HMG-Domäne, der konservierten Domäne und der transaktivierenden Domäne (TA). Die HMG-Domäne mit den alpha-Helices eins bis drei und *bait B* sind vergrößert dargestellt. *Bait B* enthält Helix zwei und drei sowie den C-terminalen Teil der HMG-Box und weitere 23 AS. Zahlen über den Balken stehen für die AS an Beginn und Ende des Proteins, der Domänen, der Helices und des *baits*.

Helix eins trägt durch Ausbildung eines hydrophoben Proteinkerns mit Helix zwei wesentlich zur Stabilisierung der DNA-Bindung bei, wohingegen Helix drei und die C-terminale Region relativ frei liegen (Hsiao et al., 2003; Rémenyi et al., 2003; vgl. Einleitung). Diese exponierte Lage von Helix drei und der C-terminalen Region könnte der Interaktion mit anderen Proteinen dienen. Man kann also anzunehmen, dass Sox10 über diesen Teil der HMG-Domäne Kontakt zu anderen Transkriptionsfaktoren aufnimmt.

Daraus ergaben sich zwei Fragestellungen:

- 1) Kann Sox10 mit Transkriptionsfaktoren, deren Gene koexprimiert werden, interagieren?
- 2) Ist diese Fähigkeit, mit anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren, eine generelle Fähigkeit von Sox-Proteinen?

## 3.2 Verifizierung der Interaktion von Sox10 mit ausgewählten Transkriptionsfaktoren durch GST-Pulldown-Studien

### 3.2.1 Klonierung der DNA-bindenden Domänen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren

Um zu untersuchen, ob Sox10 neben den im *Screen* gefundenen Homöodomänen-, POU- und bHLH-Proteinen mit Transkriptionsfaktoren aus weiteren Proteinfamilien interagiert, wurden die DNA-BD verschiedener Faktoren ausgewählt (Tabelle 3.4). Diese wurden zusammen mit den gefundenen Kandidaten weiter untersucht. Die zusätzlich ausgewählten Transkriptionsfaktoren kommen in verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Entwicklungsphasen gleichzeitig mit Sox10 vor. Die DNA-bindenden Domänen wurden mittels PCR amplifiziert, in den *prey*-Vektor kloniert und mit diesem der Hefestamm AH109 transformiert. Mit bHLH- (REB, Olig2) und bZIP-Proteinen (c-Jun, C/EBP $\alpha$ ), Zinkfingerproteinen (Krox20 und Sp1 vom Typ C2H2 sowie Estrogen-Rezeptor und Thyroid-Hormonrezeptor  $\beta$  vom Typ C4), einem Paired-Protein (Pax3) und dem POU-Protein Oct-3/4 wurde ein breites Spektrum verschiedener Transkriptionsfaktor-Familien abgedeckt (siehe auch Einleitung).

Name	Genbank-Nr.	Spezies	DNA-BD	Amplifizierte bp
REB	NM_013176	Ratte	bHLH	2005–2171
Olig2	AB038697	Maus	bHLH	460– 626
c-Jun	X17163	Ratte	bZIP	1011–1303
C/EBP $\alpha$	NM_012524	Ratte	bZIP	830–1044
Krox20	K78102	Ratte	Zinkfinger	1336–1580
Sp1	I03133	Mensch	Zinkfinger	1607–1857
Estrogen-Rezeptor	NM_000125	Mensch	Zinkfinger	905–1134
Thyroid-Hormonrezeptor $\beta$	NM_000461	Mensch	Zinkfinger	595– 831
Pax3	XM_343601	Ratte	Paired box	179– 555
Oct-3/4	NM_013633	Maus	POU <sub>s</sub>	425– 665

Tabelle 3.4: Für Interaktionsstudien benutzte DNA-BD ausgewählter Transkriptionsfaktoren. Angegeben sind der Name des Transkriptionsfaktors, die Genbank-Nummer, die Spezies sowie die Art der DNA-BD und der amplifizierte Bereich, der der DNA-BD entspricht. POU<sub>s</sub> bezeichnet die POU-spezifische Domäne.

Die Interaktion von Sox10 mit diesen Transkriptionsfaktor-DNA-BD sollte wie bei den vorausgegangenen *Yeast two-hybrid Screens* durch Wachstum der Hefen auf Selektionsplatten nachgewiesen werden. Leider gelang dies nicht, da die Domänen der Transkriptionsfaktoren in Hefe nicht hergestellt wurden (Überprüfung von Hefelysaten auf die entsprechenden Proteine mittels Westernblot; Daten nicht gezeigt). Ein Austausch der Inserts von *bait*- und *prey*-Vektor oder Verwendung anderer *prey*-Vektoren zeigte ebenfalls kein Wachstum auf den Selektionsplatten. Auch bei *Mating* des verwendeten Hefestamms AH109 mit dem Stamm Y187 des entgegengesetzten Paarungstyps, bei dem sich zwei haploide Sporen (die jeweils das *bait*-Plasmid oder die cDNA-Vektoren der Bank tragen) zu einer diploiden Zelle vereinigen, führte zu keinem Wachstum der Hefen auf den Selektionsplatten. *Mating* kann anstelle von Transformationen eingesetzt werden, um zwei unterschiedliche Plasmide in eine Hefezelle einzubringen.

### **3.2.2 Verifizierung der Interaktion von Sox10 sowie Sox8 und SRY mit DNA-bindenden Domänen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren durch GST-Pulldown-Studien**

Da der Nachweis einer Interaktion der Proteine durch Wachstum der Hefen auf Selektionsplatten erfolglos war, wurde die Interaktion durch Glutathion-S-Transferase- (GST) *Pulldown*-Studien untersucht. Mit dieser Methode können Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* verifiziert werden. Ein Vorteil von GST-*Pulldown*-Studien ist, dass ein Interaktionspartner gereinigt vorliegt und so unspezifische Interaktionen verringert werden. Dabei sollte auch untersucht werden, ob die Interaktion mit bestimmten Transkriptionsfaktoren eine individuelle Eigenschaft von Sox10 ist oder auch noch bei anderen Mitgliedern der Sox-Familie vorkommt. Dazu wurden Sox8 als weiteres Mitglied der Gruppe E und SRY als „Prototyp“ aller Sox-Proteine ausgewählt (siehe Einleitung). Außerdem sollte geklärt werden, ob möglicherweise auch der vordere Teil der HMG-Domäne diese Protein-Protein-Interaktion vermitteln kann.

#### **3.2.2.1 Auswahl und Klonierung der *baits* aus Sox10, Sox8 und SRY**

Um zu untersuchen, ob auch der vordere Teil der HMG-Domäne die Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren vermitteln kann, wurde für Sox10 neben dem

Bait	Genbank-Nr.	Spezies	bp	AS
Sox10 A	AJ001029	Ratte	630-1017	17-147
Sox10 B	AJ001029	Ratte	979-1191	133-203
Sox8 A	Q04886	Maus	452- 537	96-122
Sox8 B	Q04886	Maus	535- 692	122-175
SRY A	L10102	Mensch	2255-2325	58- 84
SRY B	L10102	Mensch	2326-2472	84-133

Tabelle 3.5: Übersicht über die bei den durchgeführten GST-Pulldown-Studien verwendeten baits. Von links nach rechts Name, Genbank-Nummer, Spezies und Lage des baits im Gen bzw. Protein in bp bzw. AS.

a

```

Sox10 101 KPHVKRPMNAFMVWAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNESDKRPFTEEAERLRMQHKKDHDPYKYQPRRKN 180
Sox8   96 KPHVKRPMNAFMVWAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLSESEKRPFVEEAERLRVQHKKDHDPYKYQPRRKS 175
SRY    57 QDRVKRPMNAFIVSRDQRRKMALENPRMRNSEISKQLGYQWKMLTEAEKWPFFQEAQKIQAMHREKYPNPKYRPRR--- 134
  
```

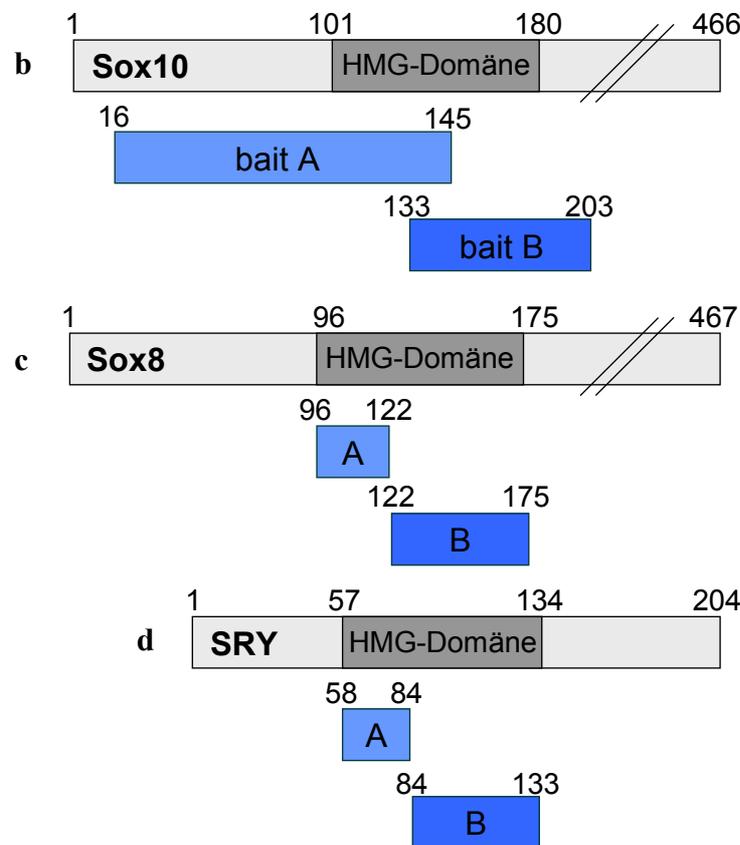


Abb. 3.5: a) Vergleich der HMG-Domänen-Proteine Sox10, Sox8 und SRY aus Tabelle 5. Zahlen geben den Anfang und das Ende der HMG-Domäne an. In allen drei Proteinen identische AS sind durch rote Buchstaben gekennzeichnet, in zwei Proteinen übereinstimmende durch blaue. Grün sind AS gekennzeichnet, die zu den anderen eine schwache Ähnlichkeit aufweisen, während Blöcke konservierter bzw. stark homologer AS grau hinterlegt sind. b) bis d) Schematische Darstellung von a) Sox10 (Ratte), b) Sox8 (Maus) und c) SRY (Mensch) mit den zugehörigen baits A und B. Die HMG-Domäne ist hervorgehoben. Zahlen über den Balken geben Anfang und Ende des Proteins, der HMG-Domäne oder der baits an. a) Die baits Sox10 A und Sox10 B überlappen leicht und enthalten einen N- bzw. C-terminalen Abschnitt der HMG-Domäne sowie umgebende Bereiche. b) und c) Im Gegensatz zu den baits von Sox10 enthalten die baits Sox8 A und B sowie SRY A und B nur Teile der HMG-Domänen, die sich nicht überschneiden.

schon verwendeten bait B zusätzlich bait A (Abb. 3.2), das den vorderen Teil der HMG-Box und ein großes Stück N-terminal davon enthält, benutzt. Für Sox8 und SRY wurden nach einem Sequenzvergleich mit Sox10 analog Bereiche für die baits A und B gewählt, die nur die HMG-Box, also keine N- oder C-terminalen Abschnitte davon, enthalten, und auch nicht überlappen, um zu überprüfen, ob die interagierenden Stellen in der HMG-Domäne oder außerhalb liegen (Tabelle 3.5 und Abb. 3.5).

Die *baits* wurden in den pGEX-KG-Vektor kloniert, der es ermöglicht, die Domänen als GST-Fusionsproteine in Bakterien zu synthetisieren. Diese wurden aus Bakterienlysaten mittels des GST-Teiles an Glutathion-Sepharose gekoppelt.

Die Domänen der ausgewählten und einiger der im Screen identifizierten Proteine, die unterschiedliche Familien von Transkriptionsfaktoren repräsentieren, wurden aus pVP16 in die eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3 oder pCMV umgesetzt und in 293-Zellen *in frame* mit einem T7-Epitop exprimiert. Das Vorhandensein aller Proteine wurde im Western-Blot über den T7-tag (Daten nicht gezeigt) bzw. für die GST-Fusionsproteine mittels Coomassie-gefärbter SDS-Gele überprüft. Dies diente auch dazu, die *bait*-Proteine mengenmäßig anzugleichen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle der GST-*Pulldown*-Studien diente GST allein.

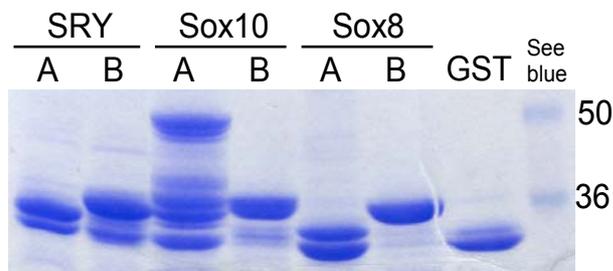


Abb. 3.6: Mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gele mit den GST-Fusionsproteinen SRY A, SRY B, Sox10 A, Sox10 B, Sox8 A und Sox8 B sowie GST allein. Rechts ist der Proteinmarker *See blue* als Größenstandard aufgetragen (Größe in kDa). Die erwarteten Proteingrößen liegen bei 29, 32, 42, 35, 29, 32 und 26 kDa. Aufgetragen wurden 5, 5, 10, 2, 10, 2 und 5  $\mu$ l an GST-Sepharose gekoppeltes Protein aus einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die jeweils höchste Bande stellt das Vollängen-Fusionsprotein dar, alle darunterliegenden Banden sind Abbruchprodukte.

### 3.2.2.2 GST-*Pulldown*-Studien von Sox10, Sox8 und SRY mit den DNA-Bindedomänen ausgewählter Transkriptionsfaktoren

Die GST-*Pulldown*-Studien wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt und Interaktion der Sox- bzw. SRY-GST-Fusionsproteine mit den unterschiedlichen DNA-BD der ausgewählten und im *Screen* identifizierten Transkriptionsfaktoren dann im Western-Blot mittels eines T7-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 3.7).

Wie in Abb. 2.7 zu erkennen ist, konnte mit allen getesteten Domänen außer den nukleären Hormonrezeptoren eine Interaktion, die spezifisch für die *baits* B ist, nachgewiesen werden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die Hormonrezeptoren ebenfalls mit Sox-Proteinen interagieren, entweder über einen nicht untersuchten Proteinteil oder über Kofaktoren. Die *baits* A oder GST allein zeigten keine Interaktion.

Dies bedeutet, dass die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen über die HMG-Box eine allgemeine Eigenschaft von Sox-Proteinen ist. Die HMG-Domäne dient somit nicht nur

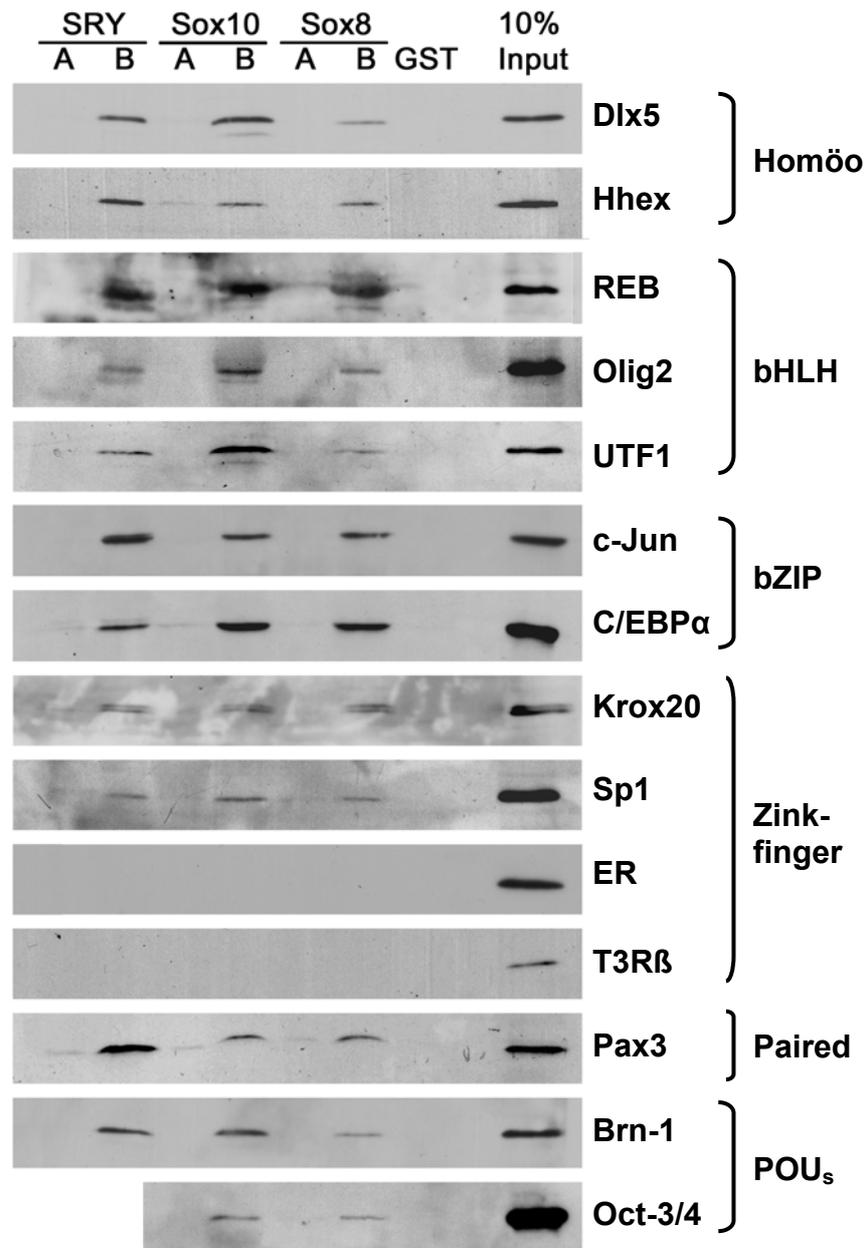


Abb. 3.7: Interaktion der C-terminalen Bereiche der HMG-Domänen von Sox-Proteinen (*baits* B) mit den DNA-BD anderer Transkriptionsfaktoren in GST-Pulldown-Studien. Die Untersuchungen wurden mit den *baits* SRY A und B, Sox10 A und B und Sox8 A und B sowie GST allein ausgeführt. Ganz rechts ist ein Zehntel des bei den GST-Pulldown-Studien eingesetzten Proteinextrakts aufgetragen (10 % Input). Als Interaktionspartner wurden die Homöodomäne der Proteine Dlx5 und Hhex aus dem *Screen*, die bHLH-Domänen von REB, Olig2 und UTF1 (*Screen*), die bZIP-Domänen von c-Jun und C/EBP $\alpha$ , die Zinkfingerdomänen von Krox20 und Sp1 vom Typ C2H2 sowie von Estrogen-Rezeptor (ER) und Thyroid-Hormonrezeptor  $\beta$  (T3R $\beta$ ) vom Typ C4, die Paired-Domäne von Pax3 und die POU-spezifischen Domänen von Brn-1 (*Screen*) und Oct-3/4 getestet. Mit allen untersuchten Domänen außer den Hormonrezeptoren konnte eine spezifische Interaktion mit den jeweiligen *baits* B nachgewiesen werden. Die *baits* A und GST allein zeigten keine Interaktion. Abbildung der GST-Pulldown-Studien mit REB und Sp1 mit freundlicher Genehmigung von T. Kosian aus Wißmüller et al. (2006).

wie bislang angenommen der DNA-Bindung oder der architektonischen Veränderung der DNA (Kamachi et al., 2000; Wegner 2005), sondern erfüllt auch eine Aufgabe bei der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaft zur Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren nur bei Sox-Proteinen vorkommt, nicht aber bei anderen HMG-Domänen-Proteinen wie LEF-1, HMGB1 oder UBF1 (Wißmüller et al., 2006). Außerdem muss der hintere Teil der HMG-Box, der in den *baits* B enthalten ist, für die Interaktionen verantwortlich sein, da mit dem in den *baits* A enthaltenen Stück keine Interaktion beobachtet werden konnte.

### 3.3 Identifizierung des für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlichen Teils von Sox10

#### 3.3.1 Einführung von Mutationen in Sox10 *bait* B

Um zu klären, welche AS-Reste genau die bei den *GST-Pulldown*-Studien zwischen Sox-Proteinen und anderen Transkriptionsfaktoren beobachteten Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, wurden Mutationen in Sox10 *bait* B eingeführt.

Von Rémenyi et al. (2003) wurde die Interaktion der POU-spezifischen Domäne von Oct-3/4 mit der HMG-Domäne von Sox2 mittels Kristallstrukturanalysen untersucht, bei denen die Proteine an DNA gebunden vorlagen. Dabei wurden zwei verschiedene Enhancer aus dem *FGF4*- und *UTF1*-Gen getestet. Je nach Abstand der DNA-Bindestellen von Oct-3/4 und Sox2 in den Enhancern wurden zwei verschiedene Mutationen in der HMG-Domäne von Sox2 beschrieben, die die Interaktion der Proteine verhinderte. Eine Mutation liegt in Helix

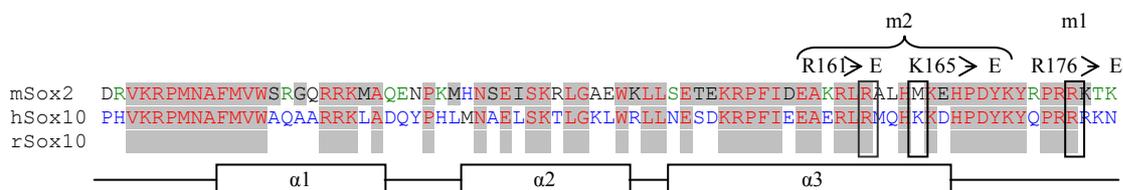


Abb. 3.8: Sequenzvergleich der HMG-Domänen von mSox2, hSox10 und rSox10 nach den bei Rémenyi et al. (2003) angegebenen Sequenzen. Die Farbcodes sind in Abb.3.5 erläutert. Unter den Sequenzen sind schematisch die alpha-Helices der HMG-Domäne dargestellt. Die in rSox10 zu Glutamat mutierten Aminosäuren R161, K165 und R176 sind durch Kästchen hervorgehoben und über den Sequenzen beschriftet.

drei (R100E, M104E), die andere in der C-terminalen Region der HMG-Domäne von Sox2 (R115E). Anhand eines Sequenzvergleichs wurden die analogen AS in Sox10 ermittelt und die Mutationen auf die entsprechenden Stellen von Sox10 (Ratte) übertragen und mittels eines Mutagenese-Kits eingeführt: R161E, K165E (m2) in Helix drei und R176E (m1) in der C-terminalen Region der HMG-Domäne (Abb. 3.8). Die mutierten *baits* B wurden aus den vollständigen Sox10-Sequenzen mittels PCR amplifiziert, in pGEX-KG kloniert und in *E. coli* exprimiert.

### **3.3.2 GST-Pulldown-Studien zur Identifizierung der für die Protein-Protein-Interaktionen der Transkriptionsfaktoren verantwortlichen Aminosäuren**

Die GST-Pulldown-Studien mit Wildtyp (wt)-, m1- bzw. m2-Sox10 *bait* B und den Domänen der verschiedenen Klassen von Transkriptionsfaktoren wurden analog zu den in Abschnitt 3.2.2.2 beschriebenen Studien durchgeführt und zeigten, dass das mutierte Protein m1-Sox10 *bait* B die Fähigkeit zur Interaktion vollkommen eingebüßt hat, während m2-Sox10 *bait* B wie das wt-Sox10 *bait* B mit allen untersuchten Transkriptionsfaktor-Domänen interagiert (Abb. 3.9). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die zur Interaktion notwendige AS Arginin 176 ist. Das war auch bei der GST-Pulldown-Studie mit der POU-spezifischen Domäne von Oct-3/4 der Fall, was darauf hinweist, dass zumindest in freier Lösung der C-terminale Bereich der HMG-Domäne von Sox10 für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich ist. Die bei Rémenyi et al. (2003) beschriebene Interaktion von Helix drei der HMG-Domäne mit der POU-spezifischen Domäne scheint demnach auf Sox2 und Oct-3/4 beschränkt zu sein; möglicherweise findet sie auch nur an DNA statt.

Aus den bisher durchgeführten Untersuchungen kann man schließen, dass Sox-Proteine über den C-terminalen Teil der HMG-Box mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und die HMG-Box somit neben der DNA-Bindung auch die Protein-Protein-Interaktion vermittelt. Mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen konnte die für die Interaktion von Sox10 mit anderen Transkriptionsfaktoren wichtige AS bestimmt werden. Es ist Arginin 176, das am C-terminalen Ende der HMG-Box in der NLS liegt.

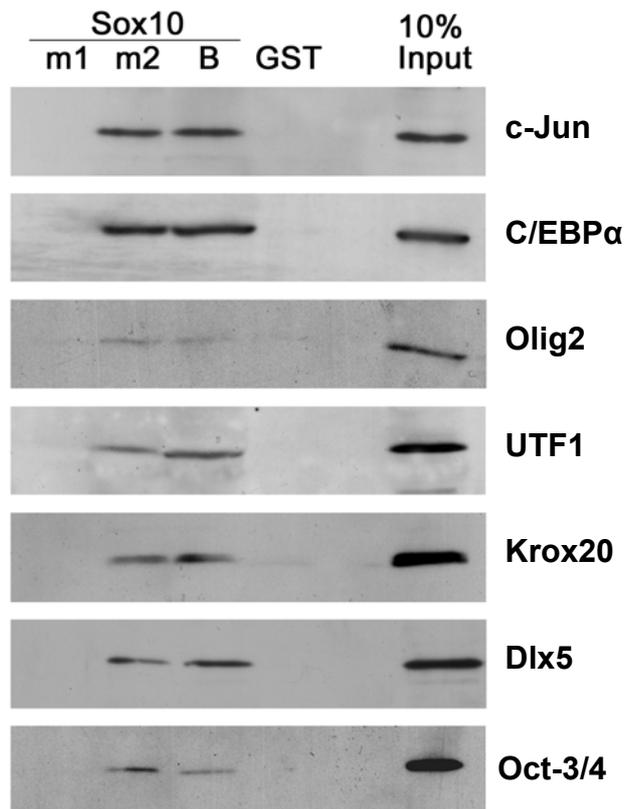


Abb. 3.9: GST-Pulldown-Studien mit m1-Sox10 bait B und m2-Sox10 bait B sowie Sox10 bait B und den DNA-BD der Transkriptionsfaktoren c-Jun, C/EBP $\alpha$ , Olig2, UTF1, Krox20, Dlx5 und Oct-3/4. Ganz rechts ist ein Zehntel des im Pulldown eingesetzten Proteinextrakts aufgetragen (10 % Input). Mit allen untersuchten Domänen konnte eine Interaktion mit m2-Sox10 bait B und Sox10 bait B nachgewiesen werden. m1-Sox10 bait B und GST allein zeigten keine Interaktion.

### 3.3.3 Immunlokalisation der mutierten Proteine m1-Sox10 und m2-Sox10

Da die AS 176 Teil der zweiten NLS von Sox10 ist (Rehberg et al., 2002) und durch die Mutation von Arginin zu Glutamat die Kernlokalisation von m1-Sox10 gestört sein könnte, sollte vor weiteren Versuchen die Lokalisation der mutierten Sox-Proteine untersucht werden. Neben der Lokalisation der Mutanten m1-Sox10 (R176E) und m2-Sox10 (R161E, K165E) wurden zusätzlich die Mutationen R176A und R176K nebst dem wt-Sox10-Protein mittels immunhistochemischer Methoden in transient transfizierten COS-Zellen untersucht. Dazu wurden die Vollängen-Proteine verwendet (Herstellung mittels Mutagenese-Kit, siehe Abschnitt 3.3.1). Die Proteine wurden mit einem Antikörper (AK) gegen Sox10 ( $\alpha$ Sox10) und einem fluoreszenzgekoppelten Sekundär-AK sichtbar gemacht. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne benutzt (Abb. 3.10).

Wie in Abb. 3.10 zu sehen, ist wt-Sox10 ganz überwiegend im Kern lokalisiert. In einigen wenigen Zellen kommt es jedoch zusätzlich im Cytoplasma vor; dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass Sox10 zwischen Kern und Cytoplasma hin- und herwechseln kann (Rehberg et al., 2002). Im Gegensatz zum wt-Sox10-Protein zeigten alle mutierten Sox10-Proteine eine gleichzeitige nukleäre und cytoplasmatische Lokalisation, wobei die

cytoplasmatische Lokalisation von einer anteilmäßig geringen wie bei R176K bis zur stark ausgeprägten von R161E, K165E reichte.

Die Mutationen von Arginin 176 zeigen eine von Lysin über Alanin zu Glutamat ansteigende cytoplasmatische Lokalisation, was durch die unterschiedliche Ladung der AS erklärt werden kann: Während Arginin ebenso wie Lysin positiv geladen ist, ist Alanin ungeladen und Glutamat eine negativ geladene AS. Demzufolge kann man bei dem Austausch von Arginin zu Lysin nur einen sehr schwachen, bei Glutamat dagegen einen starken Effekt bezüglich der Funktion des Kernlokalisierungssignals erwarten. Die vorwiegend nukleäre Lokalisation blieb jedoch bei allen Proteinen mit Mutation der AS 176 erhalten, auch wenn der effektive Transport in den Kern gestört war; möglicherweise kompensiert die erste NLS von Sox10 die Mutation der zweiten.

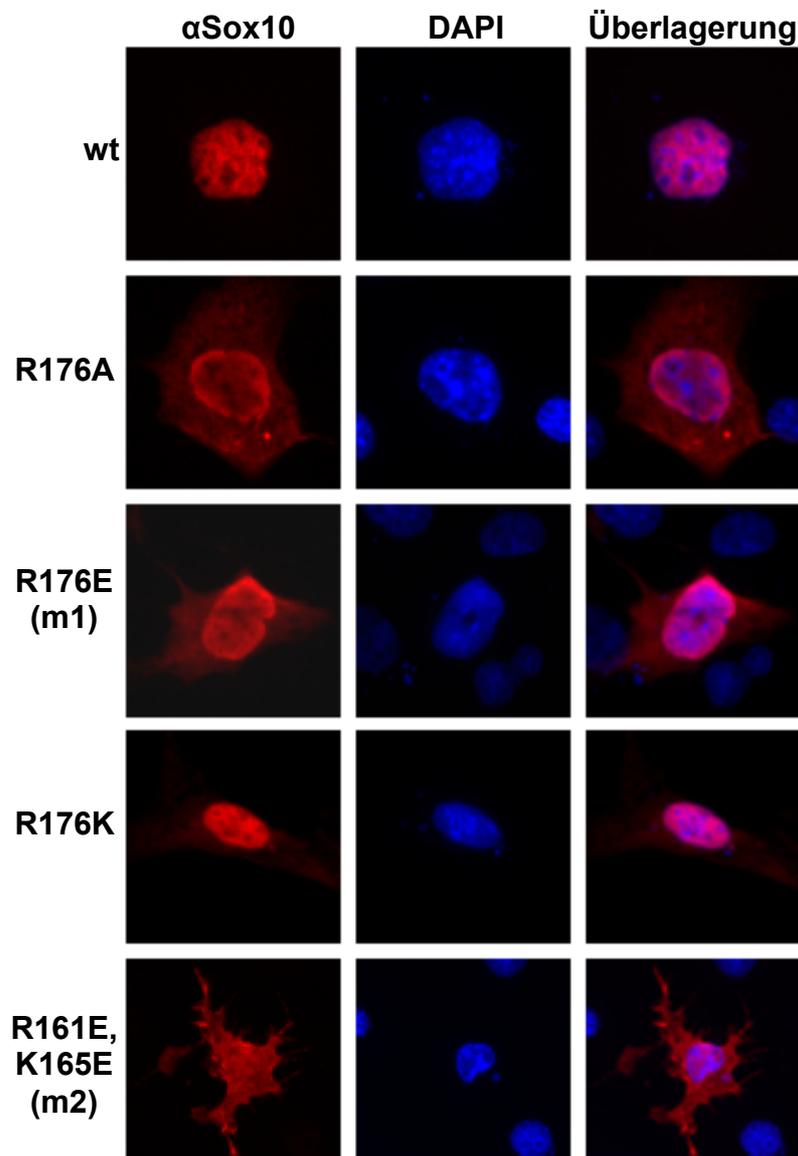


Abb. 3.10: Immunlokalisierung von wt-Sox10-Protein und den verschiedenen mutierten Sox10-Proteinen R176A (m1), R176E, R176K und der Doppelmutante R161E, K165E (m2) in transient transfizierten COS-Zellen. Zum Nachweis der Sox10-Proteine wurden ein Sox10-AK ( $\alpha$ Sox10) und ein fluoreszenzgekoppelter Sekundär-AK verwendet (linke Spalte). Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (Mitte). Die Überlagerung von Sox10-Signal mit DAPI wird in der rechten Spalte gezeigt. wt-Sox10 ist in der Abbildung ausschließlich im Kern lokalisiert, während die mutierten Proteine eine unterschiedlich ausgeprägte gleichzeitige Lokalisation im Kern und im Cytoplasma zeigen. Die stärkste cytoplasmatische Lokalisation konnte bei der Doppelmutante R161E, K165E beobachtet werden.



bekannt war, wurden die *P0*-, *Trp2*- und *MBP*-Promotoren (M62857, X85126 und AY208921), die Sox-Bindestellen enthalten, mit dem TFSEARCH-Programm (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) nach solchen benachbarten Bindestellen durchsucht (Abb.3.11).

Im *P0*- Promotor wurden in 3'-Richtung nach den Sox-Bindestellen C und C' (Peirano et al., 2000) eine Bindestelle für Sp1 und C/EBP $\alpha$  vorhergesagt, im *Trp2*-Promotor vor den S4' und S4-Bindestellen (Ludwig et al., 2004) eine mögliche C/EBP-Bindestelle und im *MBP*-Promotor neben der Site2 genannten Sox-Bindestelle (Stolt et al., 2002) eine Pax-Bindestelle.

### **3.4.2 Untersuchung der identifizierten mutmaßlichen Bindestellen anderer Transkriptionsfaktoren in den *P0*-, *Trp2*- und *MBP*-Promotoren mit Hilfe von Gelshifts**

Durch Gelshifts sollte geklärt werden, ob die vorhergesagten Bindestellen tatsächlich von den Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Außerdem sollte eine mögliche Protein-Protein-Interaktion zwischen der HMG-Domäne der Sox-Proteine und den DNA-BD der anderen Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Ob Proteine an DNA binden, kann bei Gelshifts durch unterschiedliche Laufhöhen von freier DNA und DNA mit daran gebundenem Protein im Gel unterschieden werden.

Für die *P0*-, *Trp2*- und *MBP*-Promotoren wurden Oligonukleotide verwendet, die die vorhergesagten benachbarten Bindestellen für Sox-Proteine und die anderen Transkriptionsfaktoren enthielten (siehe Abb. 3.11). Die verwendeten Proteine müssen zur Bindung an das Oligonukleotid die vollständige DNA-BD enthalten, sollten in diesem Fall aber auch möglichst kurz sein, um eine im Experiment beobachtete Protein-Protein-Interaktion auf die DNA-BD eingrenzen zu können. Deshalb wurde für Sox10 die Kurzform MIC verwendet, die die AS 1 bis 189 enthält (Kuhlbrodt et al., 1998c), und für Sox8 ein die AS 1 bis 201 enthaltendes Protein (Sox8 $\Delta$ 201). Die anderen Transkriptionsfaktoren enthielten nur die DNA-BD und umgebende Bereiche bis zur nächsten Domäne: An der Sp1-Bindestelle wurden die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Krox20 (von AS 236 bis 471) und Sp1 (von AS 489 bis 786) getestet. Der die bZIP-Domäne von C/EBP $\alpha$  repräsentierende Proteinteil enthielt die AS 123 bis 359. Für Tests an der Pax-Bindestelle wurde ein Teil von Pax6 verwendet, der die AS 1 bis 293 mit der Paired-Domäne enthielt (vgl. auch Tabelle 3.4).

Außerdem wurde ein Teil von Pax3 verwendet, der nur die Homöodomäne (AS 277 bis 346) enthielt, um eine mögliche Interaktion mit der HMG-Domäne der Sox-Proteine über diesen Proteinteil zu testen.

Zunächst wurden Gelshifts mit MIC-Sox10 und den möglicherweise an die vorhergesagten Bindestellen bindenden Proteinen durchgeführt. Dazu wurden die Proteine mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert und die Proben dann auf ein PAA-Gel aufgetragen. Dabei stellte sich heraus, dass nur die C/EBP $\alpha$ -Bindestelle im *Trp2*-Promotor tatsächlich gebunden wurde; die anderen vorhergesagten und in Abb. 3.11 dargestellten Bindestellen konnten, auch mit den vollständigen Proteinen, nicht als echte Bindestelle bestätigt werden (Abb. 3.12 und nicht gezeigt).

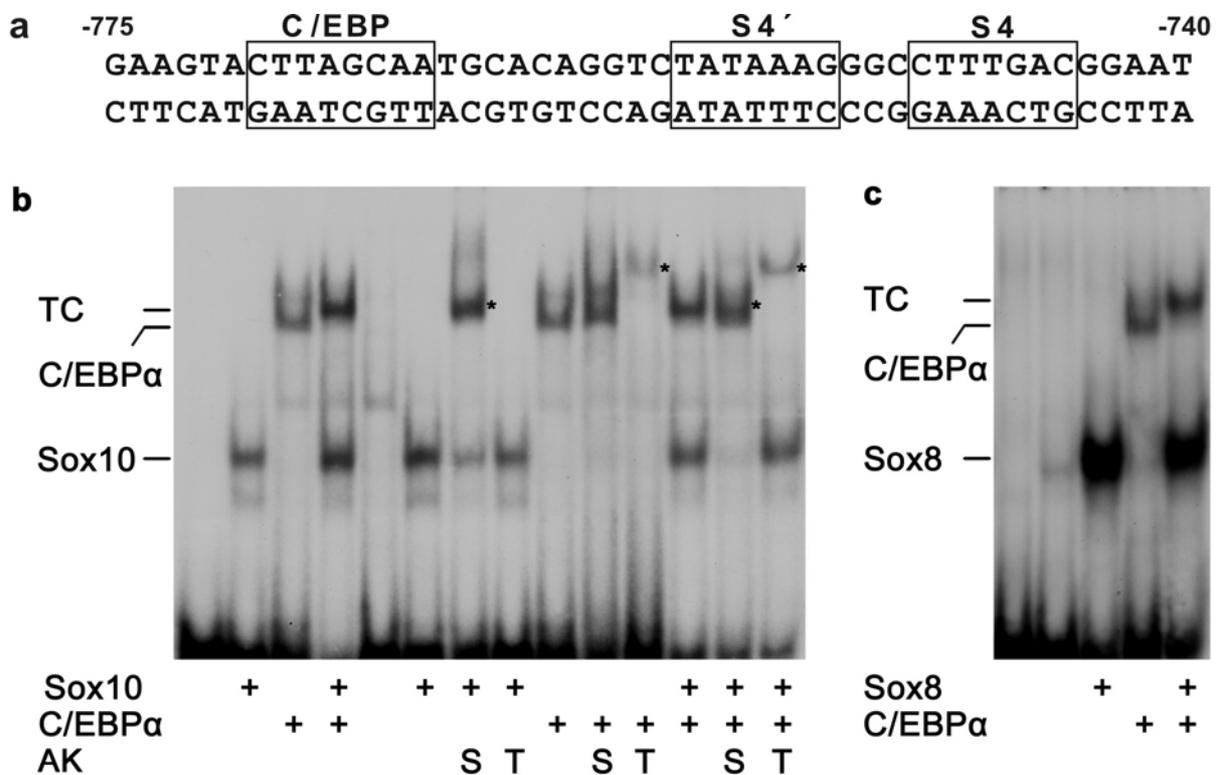


Abb. 3.12: Gelshifts mit Sox8 bzw. Sox10 und C/EBP $\alpha$  a) Das *Trp2*-Oligonukleotid enthält die benachbarten Sox-Bindestellen S4 und S4' sowie eine C/EBP $\alpha$ - Bindestelle. Zahlen über dem Oligonukleotid geben den Abstand zum Start-ATG an. b) Für den Gelshift wurden MIC-Sox10 und ein die bZIP-Domäne enthaltendes Stück von C/EBP $\alpha$  verwendet. Sox10 und C/EBP $\alpha$  können jeweils einzeln an das Oligonukleotid binden. Ist nur ungenügend freies Oligonukleotid vorhanden, können sie einen ternären Komplex (TC) mit DNA bilden. *Supershifts* mit AK gegen Sox10 (S) bzw. C/EBP $\alpha$  (T, für  $\alpha$ T7) sind mit \* gekennzeichnet. c) Gelshift mit Sox8 $\Delta$ 201 und C/EBP $\alpha$ . Auch hier können die Proteine einzeln an DNA binden. Liegt nur ungenügend freies Oligonukleotid vor, bildet sich ein ternärer Komplex (TC) aus.

Mit MIC-Sox10 bzw. Sox8 $\Delta$ 201 und C/EBP $\alpha$  durchgeführte Gelshifts zeigten, dass sowohl die Sox-Proteine als auch C/EBP $\alpha$  jeweils einzeln an das *Trp2*-Oligonukleotid binden können. Zusammen bildeten die Proteine einen ternären Komplex, der sowohl mit Antikörpern gegen die Sox-Proteine als auch C/EBP $\alpha$  zerstört werden konnte (Abb. 3.12 b, c und nicht gezeigt).

Wie weitere Versuche zeigten, bildete sich dieser ternäre Komplex jedoch bevorzugt, wenn zu wenig Sonde im Ansatz vorhanden war, C/EBP $\alpha$  also gezwungen war, an das gleiche Oligonukleotid zu binden, das schon von zwei Sox-Proteinen besetzt war (Abb. 3.13). In Abb. 3.13 ist jedoch auch in der Spur mit 1:10 verdünntem Sox10 noch ein ternärer Komplex zu beobachten. Durch die geringe Sox10-Proteinmenge war C/EBP $\alpha$  hier nicht gezwungen, mit Sox10 zusammen an das gleiche Oligonukleotid zu binden. Deshalb könnte man vermuten, dass eine schwache Interaktion zwischen den Proteinen stattfindet. Möglicherweise war der Abstand der Bindestellen von Sox10 bzw. Sox8 und C/EBP $\alpha$  unpassend, so dass eine kooperative Bindung an DNA nur sehr schwer stattfinden konnte.

Um die Interaktion der Proteine an DNA in einer möglichst natürlichen Umgebung zu testen, wurden Luziferase-Aktivitätstests durchgeführt.

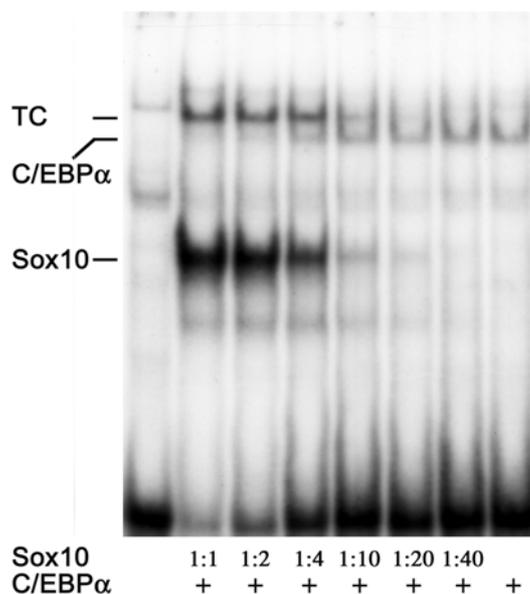


Abb. 3.13: Gelshift am *Trp2*-Oligonukleotid mit C/EBP $\alpha$  und verschiedenen Verdünnungen von Sox10. Der ternäre Komplex (TC) aus DNA, Sox- und C/EBP $\alpha$ -Protein bildet sich bevorzugt, wenn zu wenig freies Oligonukleotid im Ansatz vorhanden ist.

### 3.4.3 Aktivierung des *Trp2*-Promotors durch Sox10 und C/EBP $\alpha$

Mit Hilfe von Luziferase-Aktivitätstests können die transaktivierenden Fähigkeiten von Proteinen in Zellen getestet werden. Um eine mögliche Interaktion von Sox10 und C/EBP $\alpha$  an natürlich vorliegender DNA zu testen und herauszufinden, welchen Einfluß Sox10 und C/EBP $\alpha$  auf die Transkription bzw. Transaktivierung haben, wurden Luziferase-Aktivitätstests am *Trp2*-Promotor durchgeführt.

Als Reportervektor wurde der pGL2c-Vektor mit einem 0,9 kb langen Stück des *Trp2*-Promotors verwendet (Ludwig et al., 2004), der vor das Luziferase-Reportergen kloniert war,

sowie *Sox10* und *C/EBP $\alpha$*  in eukaryotischen Expressionsvektoren. Davon wurden je 75 ng mit 125 ng Reporterplasmid in Neuro2A-Zellen in 24-well-Schalen transfiziert. Um die transfizierte DNA-Menge konstant zu halten, wurde leerer Expressionsvektor verwendet. Alle Versuche wurden als Doppelansätze in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass *Sox10* und *C/EBP $\alpha$*  den *Trp2*-Promotor mehr als additiv aktivieren (Abb. 3.14). *C/EBP $\alpha$*  allein vermag die Luziferase-Expression nur ca. dreifach zu induzieren, während *Sox10* allein eine 90-fache Induktion erreicht. Beide Proteine zusammen führten zu einer mehr als 115-fachen Aktivierung des *Trp2*-Promotors.

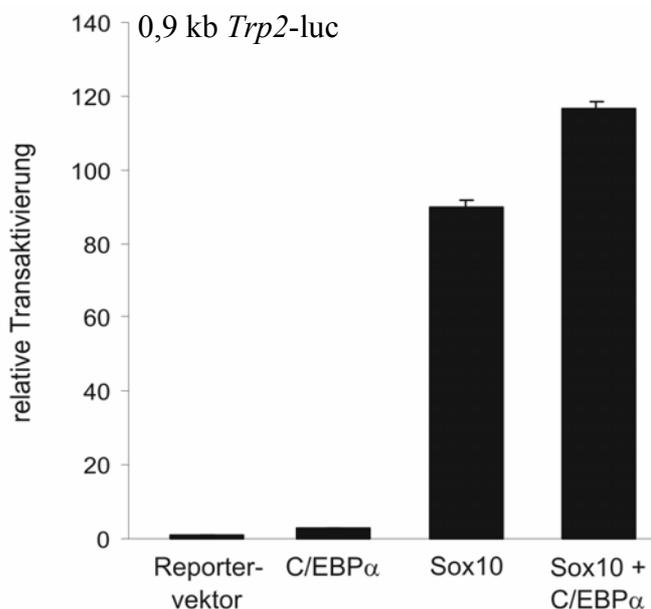


Abb. 3.14: Luziferase-Aktivitätstest in Neuro2A-Zellen am 0,9 kb *Trp2*-Promotor mit *Sox10* und *C/EBP $\alpha$* . *C/EBP $\alpha$*  allein aktiviert den Promotor ca. dreifach, während *Sox10* allein eine 90-fache Aktivierung erreicht. Beide Proteine zusammen führen zu einer mehr als 115-fachen Aktivierung des Promotors. Alle Versuche wurden als Doppelansätze in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Wie bei Ludwig et al. (2004) beschrieben, ist zumindest für den Synergismus zwischen *Sox10* und *Mitf* am *Trp2*-Promotor nicht nur die TA, sondern auch die HMG-Box von *Sox10* nötig. Um herauszufinden, ob sich die Mutationen m1 und m2 von *Sox10* auf den Synergismus auswirken, sollten die Versuche mit den mutierten Proteinen wiederholt werden.

#### 3.4.4 Gelshifts mit mutiertem *Sox10*

Zuerst musste untersucht werden, ob die mutierten Proteine m1-*Sox10* und m2-*Sox10* überhaupt an DNA binden können. Dazu wurden mit den verkürzten MIC-Formen dieser Proteine ebenfalls Gelshifts am *Trp2*-Oligonukleotid durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass m1-*Sox10* analog dem wt-*Sox10*-Protein an die DNA bindet (Abb. 3.15). Im Gegensatz dazu erfolgte mit dem m2-*Sox10*-Protein keine Bindung an das Oligonukleotid.

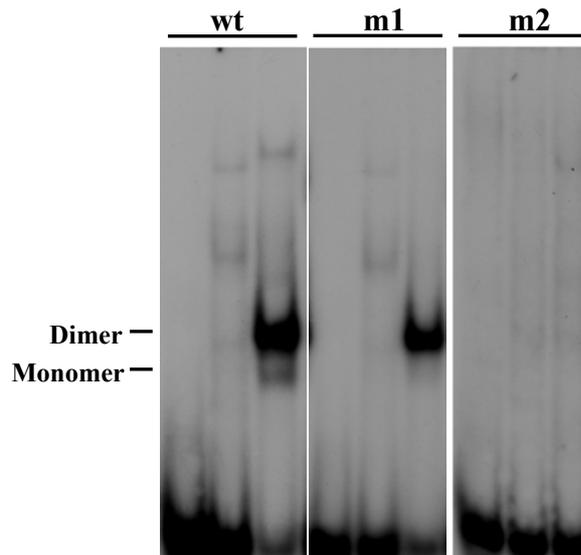


Abb. 3.15: Gelshifts mit wt-Sox10 und den mutierten Proteinen m1-Sox10 und m2-Sox10 am *Trp2*-Oligonukleotid. Die jeweils linke Spur enthält nur Oligonukleotid. In die mittleren Spuren wurde Proteinextrakt aus untransfizierten Zellen zugegeben, in die rechte Spur jeweils Extrakt aus mit wt-Sox10, m1-Sox10 bzw. m2-Sox10 transfizierten Zellen.

Dieses Ergebnis und die in Abschnitt 3.3.3 mit Hilfe von Immunlokalisation erhaltenen Resultate zeigen, dass durch die Mutation sowohl die Fähigkeit des m2-Sox10-Proteins zur Lokalisation in den Zellkern als auch zur Bindung an DNA vollkommen verloren gingen. Hingegen konnte mit m1-Sox10 trotz der gleichzeitigen nukleären und cytoplasmatischen Lokalisation in der Zelle eine dem wt-Protein entsprechende Bindung an die DNA nachgewiesen werden. Die folgenden Experimente zur Untersuchung der synergistischen Aktivierung von Promotoren zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren im Vergleich zum wt-Sox10 wurden deshalb nur mit m1-Sox10 ausgeführt.

### 3.4.5 Luziferase-Aktivitätstests mit wt-Sox10 und m1-Sox10

Da m1-Sox10 offenbar die Fähigkeit hat, wie wt-Sox10 an DNA zu binden, stellte sich die Frage, ob in Luziferase-Aktivitätstests auch die Transaktivierungsfähigkeit der des wt-Proteins entspricht. Dazu wurden Neuro2A-Zellen mit *wt-Sox10* bzw. *m1-Sox10* zusammen mit einem Luziferase-Reporterplasmid, das den künstlichen *3xMWL*-Promotor mit hintereinanderliegenden Sox-Bindestellen enthielt, transfiziert. Zur Untersuchung der synergistischen Fähigkeiten wurden in weiteren Experimenten *Mitf* oder *Krox20*, jeweils in eukaryotischen Expressionsvektoren, und verschiedene Promotoren transient kotransfiziert. Neben dem 3,7 kb *Trp2*-Promotor mit *Mitf*-Bindestellen (Ludwig et al., 2004) waren das der

*Connexin32*-416-Promotor, der neben Sox- auch Krox20-Bindestellen besitzt (Bondurand et al., 2001).

Am *3xMWL*-Promotor war m1-Sox10 nicht in der Lage, eine ebenso starke Aktivierung wie wt-Sox10 zu bewirken (Abb. 3.16 a). Bei dieser Aussage ist jedoch zu beachten, dass bereits

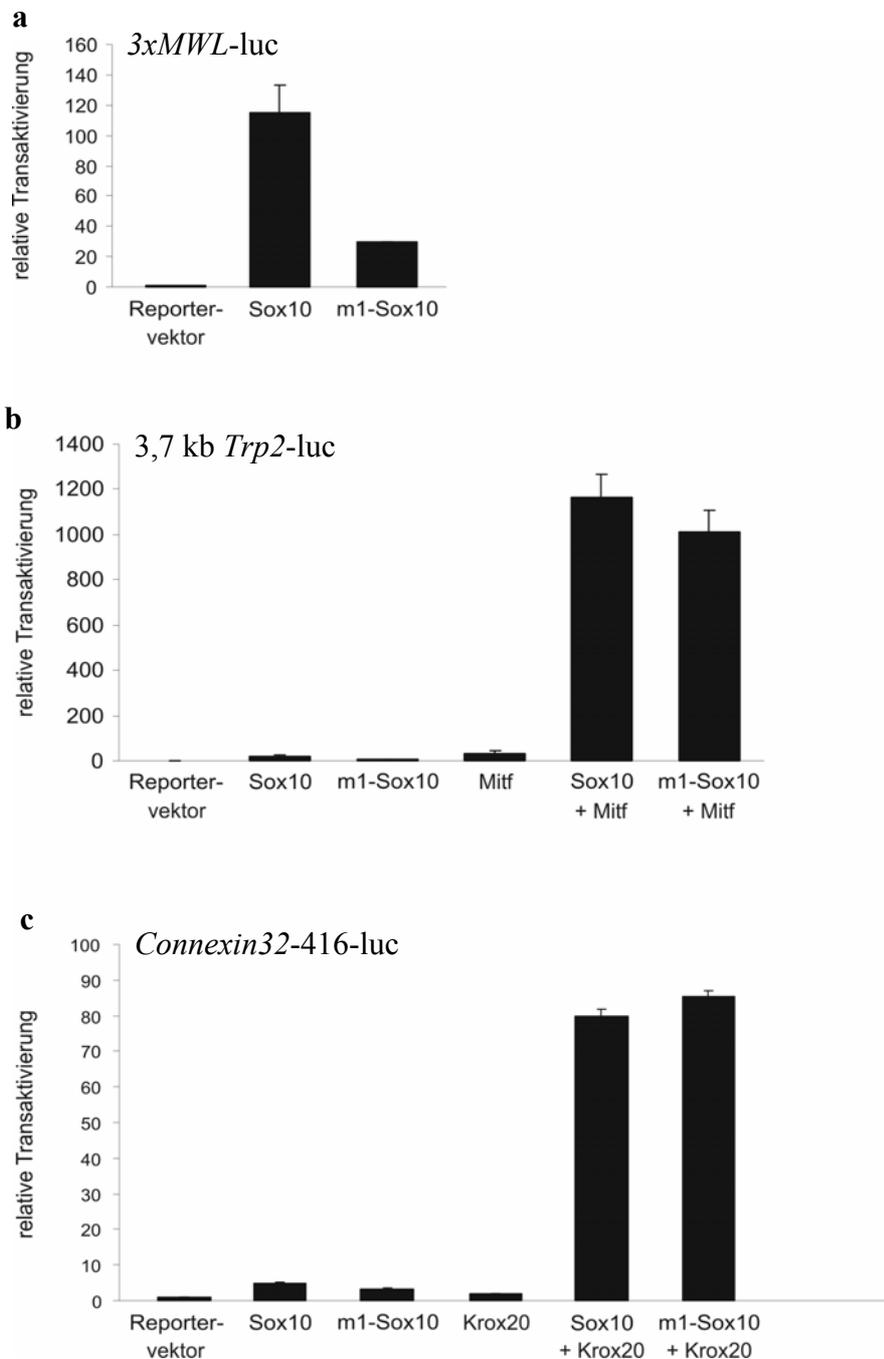


Abb. 3.16: Luziferase-Aktivitätstests mit wt-Sox10 und m1-Sox10. a) Der künstliche *3xMWL*-Promotor wird durch wt-Sox10 ca. 115-fach, durch die m1-Sox10-Mutante nur ca. 30-fach aktiviert. b) m1-Sox10 erreicht nur ein Drittel der Transaktivierung des wt-Sox10-Proteins am *Trp2*-3,7kb-Promotor. Mitf allein stimulierte den Promotor ca. 35-fach. wt-Sox10 bewirkte zusammen mit Mitf eine ca. 1200-fache, m1-Sox10 mit Mitf eine ca. 1050-fache Aktivierung des Promotors. c) Der *Connexin32*-416-Promotor wurde von wt-Sox10 ca. achtfach, von m1-Sox10 ca. fünffach und von Krox20 ca. dreifach aktiviert. wt-Sox10 bzw. Sox10-m1 und Krox20 zusammen stimulierten den Promotor ca. 83-fach.

in Immunlokalisationen (Abschnitt 3.3.3) festgestellt worden war, dass m1-Sox10 nicht ausschließlich im Kern lokalisiert ist. Eine geringere Aktivierung könnte also auch darauf beruhen, dass weniger m1-Protein im Kern vorhanden ist.

Die Untersuchungen der *Trp2*- und *Connexin32*-Promotoren mit Bindestellen für Sox10 und Mitf bzw. Krox20 zeigten, dass m1-Sox10 allein analog dem *3xMWL*-Promotor die Luziferase-Expression jeweils nur halb so stark wie wt-Sox10 induziert. Zusammen mit den jeweiligen anderen Transkriptionsfaktoren ist die Induktion jedoch ähnlich stark wie mit wt-Sox10 (Abb. 3.16 b und c). So ist am *Trp2*-Promotor die Transaktivierung durch wt-Sox10 mit etwa 19-fach mehr als dreimal so hoch wie durch m1-Sox10 (sechsfach); zusammen mit Mitf erreicht die m1-Sox10-Mutante jedoch mit ca. 1050-facher Aktivierung fast die Werte des wt-Proteins (ca. 1200-fach). Mitf allein stimuliert den Promotor nur ca. 30-fach. Beim *Connexin32*-Promotor war ebenfalls bezüglich der Luziferase-Expression kein Unterschied zwischen der Induktion durch wt- und m1-Sox10 zusammen mit Krox20 festzustellen (beide ca. 80-fach), obwohl die Induktion für das wt-Sox10-Protein allein fast doppelt so hoch wie für m1-Sox10 war (fünf- bzw. dreifach). Krox20 allein induzierte die Expression des Reportergens nur zweifach. Die schwächere Transaktivierung des m1-Sox10-Proteins wird also durch einen weiteren Transkriptionsfaktor kompensiert.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die direkte Interaktion von Sox-Proteinen mit anderen Transkriptionsfaktoren über die HMG-Domäne zwar mit *GST-Pulldown*-Studien zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, Luziferase-Aktivitätstests aber nicht eindeutig beweisen können, dass die Interaktion in Lösung für die Synergie an verschiedenen Promotoren Bedeutung besitzt.

### **3.5 Analyse der Veränderung des Bindeverhaltens von Sox10 an DNA durch Phosphorylierung**

Da bereits von anderen Sox-Proteinen bekannt war, dass die Phosphorylierung der Proteine Einfluß auf die Kernlokalisation und die DNA-Bindung hat (Desclozeaux et al., 1998; Preiss et al., 2001), sollte für Sox10 ebenfalls die Phosphorylierung untersucht werden. Mit Hilfe von Deletionsmutanten war bereits festgestellt worden, dass die kritische Stelle für eine Phosphorylierung zwischen AS 1 und 101 liegt. Allerdings konnte dabei nicht ausgeschlossen werden, dass die interne Deletion der AS 61 bis 101 eine außerhalb dieser Deletion im Protein

auftretende Phosphorylierung unterbindet (S. Lang, unveröffentlichte Daten). Deshalb wurde zur Untersuchung die verkürzte Form von Sox10, MIC, verwendet. Weiterhin war bereits bekannt, dass die Phosphorylierung die DNA-Bindung hemmt bzw. Dephosphorylierung die DNA-Bindung von Sox10 verstärkt. Durch Antikörper wurde die Phosphorylierung an Serin nachgewiesen, während eine Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin unklar blieb (S. Lang, unveröffentlichte Daten).

### **3.5.1 Vorhersage möglicher Phosphorylierungsstellen von Sox10 mit Hilfe des NetPhos-Programms**

Mit Hilfe des NetPhos2.0-Programms ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)) wurden für MIC-Sox10 (Ratte) neun Serine und ein Tyrosin als mögliche Phosphorylierungsstellen vorhergesagt: Die Serine 8, 13, 24, 30, 45, 77, 81, 98 und 148 sowie Tyrosin 171. Diese AS sind zwischen Ratte, Maus und Mensch alle konserviert, so dass hier noch keine Aussage in Bezug auf eine möglicherweise besonders wichtige Stelle getroffen werden konnte. In der im Labor schon untersuchten Deletion 61-101 liegen die AS 77, 81 und 98; diese könnten somit von größerer Bedeutung sein.

### **3.5.2 Einführung von Mutationen in Sox10 mit Hilfe von *overlap*-PCR**

Um mögliche Phosphorylierungsstellen zu finden, wurden die Serine und das Tyrosin von MIC-Sox10 mit Hilfe von *overlap*-PCRs zu Alaninen bzw. Phenylalanin mutiert. Diese AS können nicht phosphoryliert werden. Die entsprechenden Plasmide wurden in COS-Zellen transfiziert und die Lokalisation der mutierten Proteine mittels immunhistochemischer Methoden überprüft. Dabei wurde keine Veränderung zum wt-MIC-Sox10 festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Zellextrakte mit den mutierten Proteinen wurden für Gelshift-Analysen eingesetzt. Da Sox10 deutlich besser an DNA bindet, wenn es dephosphoryliert ist, wurde der Gelshift einmal mit Zellextrakt, der mit  $\lambda$ -Phosphatase behandelt worden war, und einmal mit Zellextrakt, der unter gleichen Bedingungen ohne  $\lambda$ -Phosphatase inkubiert worden war, durchgeführt. Nach Mutation einer funktionellen Phosphorylierungsstelle sollte kein Unterschied mehr zwischen den Banden der beiden Ansätze feststellbar sein, da sie jeweils gleich stark an DNA binden sollten.

### 3.5.3 Untersuchung der DNA-Bindung mutierter Sox-Proteine mittels Gelshifts

Für die Gelshifts wurde ein Oligonukleotid, das die Sox-Bindestellen C und C' aus dem *P0*-Promotor enthält (Peirano et al., 2000), verwendet, sowie die oben beschriebenen mit  $\lambda$ -Phosphatase behandelten und unbehandelten Zellextrakte. Da im Gelshift jedoch bei allen mutierten MIC-Sox-Proteinen wie beim wt-Protein ein deutlicher Unterschied zwischen phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Extrakt festzustellen war (Abb. 3.17), wurde angenommen, dass es nicht nur eine einzige Phosphorylierungsstelle gibt. Deshalb wurden Mehrfachmutanten hergestellt.

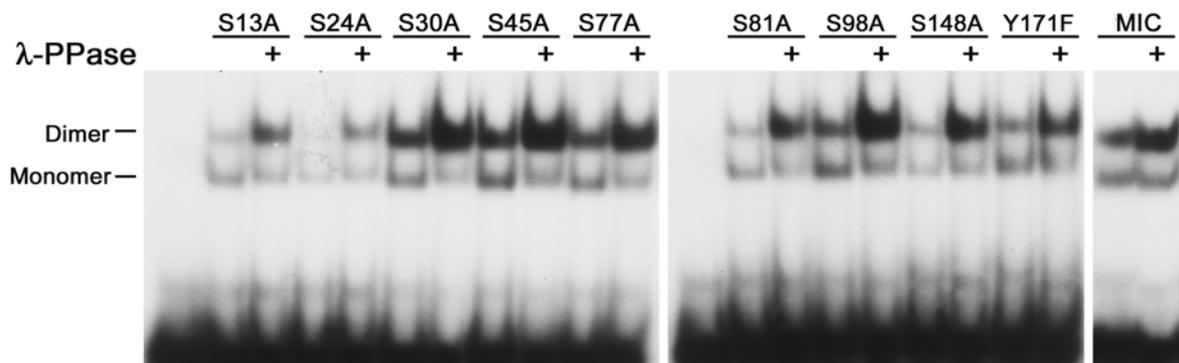


Abb. 3.17: Gelshifts mit den mutierten MIC-Sox10-Proteinen S13A, S24A, S30A, S45A, S77A, S81A, S98A und Y171F sowie wt-MIC. Die Extrakte wurden vor dem Auftragen unter gleichen Bedingungen inkubiert, wobei zu den Ansätzen, die mit + gekennzeichnet sind, zusätzlich noch  $\lambda$ -Phosphatase ( $\lambda$ -PPase) gegeben wurde. Als Oligonukleotid wurde C/C' aus dem *P0*-Promotor verwendet, an das Sox10 bevorzugt als Dimer bindet (Peirano et al., 2000). Bei allen Extrakten ist ein deutlicher Unterschied zwischen phosphoryliertem und mit  $\lambda$ -PPase-behandeltem Extrakt zu sehen. Die unbeschrifteten Spuren enthalten nur Oligonukleotid.

Bei der Analyse dieser Mehrfachmutanten im Gelshift war wieder ein deutlicher Unterschied zwischen den  $\lambda$ -PPase-behandelten und unbehandelten Proteinen festzustellen (Abb. 3.18), was bedeutet, dass die für die Phosphorylierung kritische(n) AS nicht (alle) mutiert wurde(n). Da die möglichen Kombinationen von mutierten Proteinen den experimentellen Rahmen sprengten, musste eine weniger aufwendige Möglichkeit zur Untersuchung der Phosphorylierung von Sox10 gefunden werden. Es wurden 2D-Gele gewählt, da hier sowohl die Anzahl der Phosphorylierungsstellen, als auch durch Massenspektroskopie die kritischen AS bestimmt werden können.

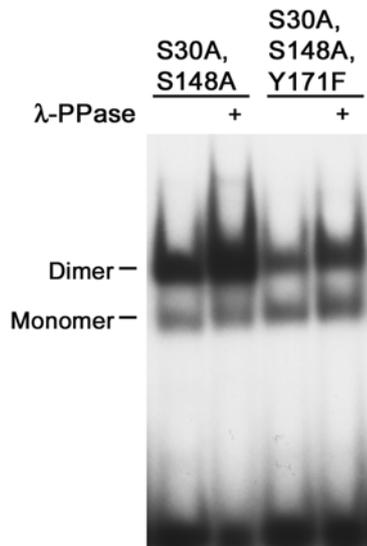


Abb. 3.18: Gelshift mit den MIC-Sox10 Mehrfachmutanten S30A, S148A und S30A, S148A, Y171F. Zwischen den mit  $\lambda$ -Phosphatase und den unbehandelten Proben ist auch hier ein deutlicher Unterschied zu sehen.

### 3.5.4 2D-Gele zur Analyse der Phosphorylierung von Sox10

Für die Analysen wurde das komplette Sox10-Protein verwendet, um alle Phosphorylierungsstellen identifizieren zu können. Der theoretische isoelektrische Punkt für Sox10 (Ratte) liegt bei 6,12 und musste vor den Versuchen bestimmt werden, um eine Verwendung der richtigen Matrix bei der Auftrennung in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, zu gewährleisten. Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung beruht darauf, dass alle Proteine aufgrund ihrer AS-Reste bei bestimmten pH-Werten eine gewisse Ladung aufweisen. Der isoelektrische Punkt ist der spezifische pH-Wert, an dem das Protein ungeladen ist. In einem pH-Gradient wird sich das Protein unter Anlegung einer elektrischen Spannung also zu dem Punkt bewegen, an dem es ungeladen ist. Dieser fokussierende Effekt bewirkt eine sehr scharfe Trennung auch bei geringsten Ladungsunterschieden. Für Sox10 wurde die isoelektrische Fokussierung in einer Matrix mit einem pH-Bereich zwischen drei und zehn durchgeführt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte dann mittels SDS-PAGE.

Durch eine Phosphorylierung verändern sich sowohl der isoelektrische Punkt (durch die negative Ladung der Phosphatgruppe(n)) als auch die Proteingröße, was sich im 2D-Gel durch eine Verschiebung sowohl in der Horizontalen als auch analog zum Western-Blot in der Laufhöhe bemerkbar macht. Dadurch bilden sich bei 2D-Gelen keine Banden, sondern Punkte. Ein Protein mit mehreren unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen sollte mehrere Punkte ergeben; sind die Phosphorylierungsstellen mutiert, ergibt sich nur noch ein Punkt.

Auch andere Modifikationen wie Acetylierung oder Sumoylierung können dabei eine Verschiebung bzw. Veränderung des Laufverhaltens bewirken.

Die Versuche wurden mit wt-Sox10-Protein durchgeführt. Dabei wurden nach dem Lauf der 2D-Gele mittels Western-Blot die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Durch einen Sox10-spezifischen AK und Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers konnte der Nachweis von Sox10 mit Hilfe von aufgelegten Röntgenfilmen erfolgen. Parallel zum Western-Blot wurden Gele mit Silbernitrat und Coomassie-Blau gefärbt, um die Auftrennung der Proteine sichtbar zu machen (Abb. 3.19 und nicht gezeigt).

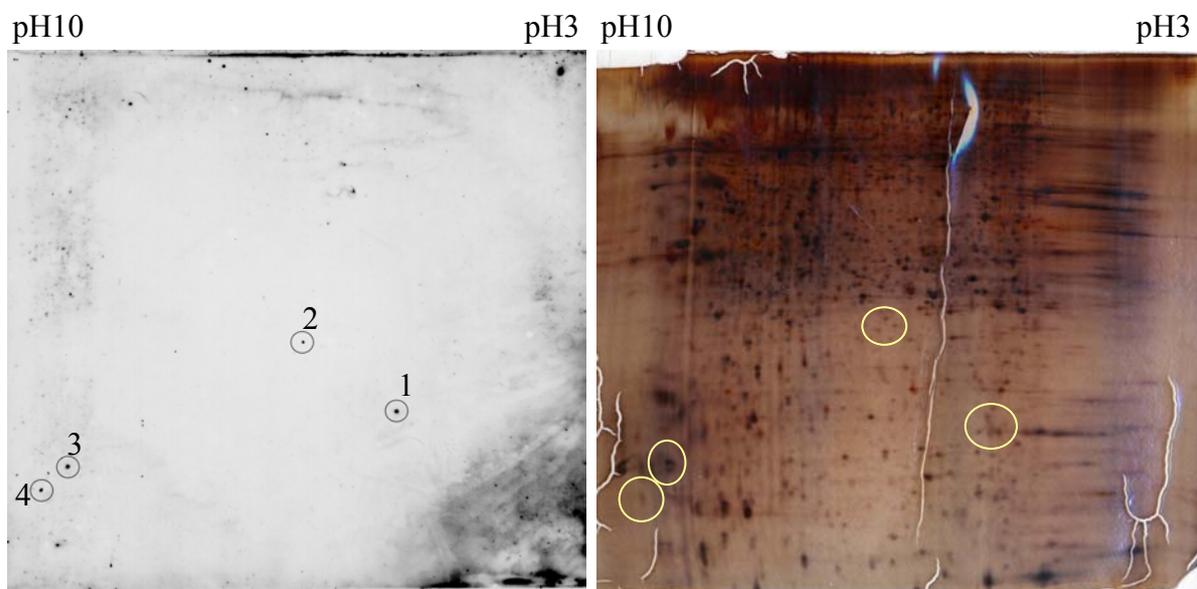


Abb. 3.19: 2D-Gele. Links der Western-Blot, rechts Silbernitrat-gefärbtes Gel. Über den Gelen sind die pH-Werte der isoelektrischen Fokussierung angegeben. Der im Western-Blot markierte Punkt eins könnte das nicht-phosphorylierte Sox10-Protein darstellen, während die Spots zwei bis vier möglicherweise modifiziertes Sox10 sind. Diese Punkte werden auch im silbergefärbten Gel gefunden. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte mittels eines Sox10-spezifischen Antikörpers.

Im Western-Blot zeigten sich an vier Stellen deutliche Punkte, die möglicherweise vier Varianten von Sox10 mit unterschiedlichem Laufverhalten darstellen. Diese Punkte konnten auch im Silbernitrat-gefärbten Gel gefunden werden (Färbung mit Coomassie-Blau erwies sich als zu schwach). Dabei wäre das mit 1 in Abb. 3.19 markierte Protein nicht-phosphoryliertes bzw. unmodifiziertes Sox10, während Punkt 2, möglicherweise auch die Punkte 3 und 4, modifiziertes Protein darstellen. Alle anderen Punkte im Western-Blot wurden aufgrund ihrer Laufhöhe ausgeschlossen und sind wohl bei der Entwicklung des Western-Blots entstandener Hintergrund.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit Hilfe von bioinformatischen Methoden zehn potentielle Phosphorylierungsstellen in MIC-Sox10 identifiziert wurden. Durch Mutation jeweils einer potentiellen Phosphorylierungsstelle konnte in Gelshifts jedoch keine Veränderung im Vergleich zum wt-Protein festgestellt werden. Deshalb kann man davon ausgehen, dass das Protein an mehr als einer Stelle phosphoryliert wird. Im 2D-Gel wurden vier Varianten von Sox10 identifiziert, wovon drei möglicherweise phosphoryliertes Sox10-Protein darstellen. Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob es sich tatsächlich um unterschiedlich phosphorylierte Sox10-Proteine handelt, müssen massenspektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Kürzlich von T. Kosian erhaltene unveröffentlichte Daten sprechen unter anderem für eine Phosphorylierung an S45.

## 4 Diskussion

Sox-Proteine sind wichtige Transkriptionsfaktoren und regulieren eine große Anzahl von Entwicklungsprozessen (Wegner et al., 1999, Schepers et al., 2002). Sie unterscheiden sich von den meisten anderen Transkriptionsfaktoren durch die Bindung in die kleine Rinne der DNA und die dadurch bewirkte starke Beugung und Entwindung der DNA-Doppelhelix relativ zur klassischen B-Form (Werner et al., 1995). Deshalb wurde generell angenommen, dass Sox-Proteine als architektonische Komponenten wirken, die die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren erleichtern. Da viele Sox-Proteine außerdem nur schwache Transaktivierungsfähigkeit zeigen, vermutete man, dass sie zur effizienten Transaktivierung von Zielgenen weitere (Transkriptions-) Faktoren als Partner benötigen (Wegner, 1999; Bowles et al., 2000; Kamachi et al., 2000; Wilson und Koopman, 2002; Wegner, 2005). Über mögliche Interaktionspartner war jedoch nur wenig bekannt. Auch für Sox10 konnte bislang nur eine kleine Zahl interagierender Proteine identifiziert werden (Bondurand et al., 2000 und 2001; Potterf et al., 2001; Lang und Epstein, 2003; Ludwig et al., 2004; Ghislain und Charnay 2006). Um weitere Kandidaten zu erhalten, beschäftigte sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Suche nach Interaktionspartnern von Sox10.

### 4.1 Identifikation von Interaktionspartnern von Sox10 durch *Yeast two-hybrid Screens*

Die mit Hilfe von *Yeast two-hybrid Screens* durchgeführte Suche nach Interaktionspartnern von Sox10 erbrachte eine große Anzahl von in Frage kommenden Proteinen, die aus einer cDNA-Bank aus 10.5 dpc Mäuseembryonen isoliert wurden. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung lässt sich Sox10 im zentralen Nervensystem in Gliazellvorläufern nachweisen, die später zu Oligodendrozyten differenzieren, und in Neuralleistenzellen, die sich zu Gliazellen des peripheren und enterischen Nervensystems oder zu Melanozyten entwickeln (Kuhlbrodt et al., 1998b; Britsch et al., 2001). Die für die Funktion von Sox10 *in vivo* erforderlichen Interaktionspartner sollten während dieses Entwicklungsstadiums ebenfalls vorhanden sein und somit mittels *Yeast two-hybrid Screens* in der cDNA-Bank nachgewiesen werden können.

Die cDNA-Bank wurde vor den *Screens* amplifiziert, um genügend DNA zu erhalten (Abschnitt 3.1.1). Dies ist jedoch stets mit dem Risiko verbunden, Klone zu verlieren. Anhand der Kolonienzahl von Hefen, die mit der Originalbank oder der im Rahmen dieser Arbeit amplifizierten cDNA-Bank transformiert worden waren, konnte kein Unterschied festgestellt werden, weshalb davon auszugehen ist, dass bei der Amplifikation nahezu keine Veränderungen auftraten. Außerdem wurden die *Screens* mit einer Mischung aus Originalbank und amplifizierter Bank durchgeführt, so dass in jedem Fall eine ausreichende Anzahl an unabhängigen Klonen vorhanden gewesen sein sollte.

Die mit Sox10 *bait* B, das die C-terminalen 47 AS der HMG-Domäne umfasst, durchgeführten *Yeast two-hybrid Screens* führten zur Identifikation von 69 Sequenzen, die für 37 verschiedene Proteine codierten (Abschnitt 3.1.4.2). Viele dieser Proteine wurden in mehreren *Screens* gefunden, was darauf schließen lässt, dass die Ergebnisse reproduzierbar und verlässlich sind. Die bei jedem Schritt durchgeführten Kontrollen der erhaltenen Kandidaten, die zweimal einem Filterlift-Test sowie einer Rücktransformation unterzogen wurden (Abschnitt 3.1.4.1), lassen vermuten, dass es sich bei den verifizierten Interaktionspartnern um stabil mit Sox10 interagierende Proteine handelt. Dafür spricht auch, dass die Anzahl bekannter falsch-positiver Interaktionspartner äußerst gering war.

Bei *Yeast two-hybrid Screens* müssen alle *prey*-Fusionsproteine im Kern lokalisiert sein, um eine Interaktion mit dem *bait* durch die Transaktivierung eines Reportergens nachweisen zu können. Dazu besitzt der cDNA-Bank-Vektor eine *in frame* mit den cDNAs klonierte Kernlokalisationssequenz (NLS). Dies führt dazu, dass auch Proteine, die normalerweise in anderen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind, wie zum Beispiel der Extrazellulären Matrix, in den Kern gelangen. Eine Interaktion von Sox10 mit solchen Proteinen *in vivo* ist sehr unwahrscheinlich, kann im *Yeast two-hybrid Screen* aber auftreten, wenn ein solches Protein ein Motiv enthält, das Sox10 bei seinen natürlichen Interaktionspartnern erkennt. Dadurch lassen sich Kandidaten erklären, die in Tabelle 3.2 unter „andere“ zusammengefasst sind.

Ein ebenfalls auf den ersten Blick unwahrscheinlich erscheinender Interaktionspartner, der auch oft auf Listen falsch-positiver Kandidaten auftaucht, ist Filamin A. Bei Filaminen handelt es sich um Proteine des Cytoskeletts, die eine Funktion als Stützelemente besitzen und bei Bewegungsvorgängen der Zelle (z. B. Zellteilung) eine Rolle spielen (Wehner und

Gehring, 1995), weshalb eine Interaktion mit Sox10 zunächst unwahrscheinlich erscheint. Zu Filamin A gibt es jedoch weitere, interessante Daten: Durch Abspaltung des C-terminalen Teils von Filamin A, an das der Androgenrezeptor (AR), ein nukleärer Hormonrezeptor (vgl. Einleitung), im Cytoplasma gebunden vorliegt, kolokalisieren beide Proteine im Kern. Dort kann das Filamin A-Teilstück die Transaktivierung von Zielgenen durch den AR reprimieren, zum einen, indem es die N- und C-terminale Interaktion der Subdomänen des AR unterbindet, zum anderen durch Störung der Interaktion des AR mit der Transkriptionsmaschinerie. Erst durch Abspaltung eines Teilstücks des AR wird die Bindung an Filamin A soweit gelöst, dass die Transkription der Zielgene möglich ist (Loy et al., 2003). Möglicherweise interagiert Sox10 auch *in vivo* mit dem im Kern präsenten Teilstück von Filamin A, oder es kommt zu einer Interaktion im Cytoplasma, auch wenn hier vielleicht keine Abspaltung eines Filamin A-Teilstücks und gemeinsamer Transport in den Kern erfolgt, sondern die Interaktion nur der Verankerung im Cytoplasma dient. Von Sox9 wird berichtet, dass es im Cytoplasma an Mikrotubuli gebunden vorliegt, von denen es sich erst nach Phosphorylierung löst und in den Kern wandert (Malki et al., 2005a). Möglicherweise liegt der Interaktion von Sox10 mit Filamin A ein ähnlicher Mechanismus zugrunde. Normalerweise im Cytoplasma lokalisierte Proteine sind auch *in vivo* mögliche Interaktionspartner von Sox10, da es neben zwei NLS auch eine Kernexportsequenz besitzt und somit die Fähigkeit, zwischen Kern und Cytoplasma hin- und herzuwechseln (Rehberg et al., 2002). Deshalb ist es vermutlich auch notwendig, Sox10 sowohl im Cytoplasma durch Bindung an Proteine als auch im Kern durch Bindung an die DNA zurückzuhalten. Ein primär im Cytosol lokalisierter bereits verifizierter Interaktionspartner von Sox10 ist Nmi (*N-myc interacting protein*) (Schlierf et al., 2005). Dies beweist die Interaktion von Sox10 mit cytosolischen Proteinen.

Andere identifizierte und im Cytoplasma lokalisierte Proteine sind am Proteintransport oder an der Signaltransduktion beteiligt, wie *Sorting nexin 5* (NM\_024225, Gullapalli et al., 2004), *SH3-domain binding protein* (NM\_009164, Li, 2005) oder ein Kationenkanal (NM\_021450), der in der Zellmembran von Mikrogliazellen des Gehirns vorkommt (Jiang et al., 2003). Zu dieser Gruppe gehört auch ein Protein, das eine DEP-Domäne (*Disheveled*, EGL-10, Pleckstrin) besitzt (NM\_177786). Diese Domäne findet sich bei vielen Proteinen des Nervensystems, die andere Proteine zu ihren Zielkompartimenten bringen (Martemyanov et al., 2003). Da Sox10 in verschiedenen Zellen des Nervensystems exprimiert wird, ist eine Interaktion mit diesem Protein *in vivo* möglich.

Um seiner Funktion als Transkriptionsfaktor nachkommen zu können, darf sich das Sox10-Protein nicht ständig im Cytoplasma aufhalten, sondern muss vor allem im Zellkern präsent sein und hier mit für die Genexpression nötigen Proteinen interagieren. Erwartungsgemäß wurde bei den *Screens* eine große Anzahl im Kern lokalisierter Proteine als Interaktionspartner von Sox10 identifiziert. Neben Zellzyklusproteinen wie Cyclin D3 (NM\_007632; Knippers, 1997) und einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren sprechen viele der gefundenen Interaktionspartner für eine Rolle von Sox10 beim sogenannten Chromatin-Remodelling. Hierbei handelt es sich um die Veränderung der Nukleosomenstruktur des Chromatins. Dabei spielen neben der Positionierung bzw. Verschiebung der Nukleosomen posttranslationale Modifikationen von Histonen eine große Rolle (Barrera und Ren, 2006). So ist z. B. von Sox9 bekannt, dass es mit p300 interagiert (Furumatsu et al., 2005), das Histonacetylierungsaktivität besitzt, was zu einer Ablösung der Histone von der DNA führt. Sox9 assoziiert zumindest *in vitro* mit Chromatin und aktiviert die Transkription von Zielgenen wie *Col2a1* (Kollagen Typ II  $\alpha 1$ ) durch Rekrutierung von p300 zur Chromatinmodifikation. Weiterhin interagiert Sox9 mit dem Kofaktor PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator  $\alpha 1$* ) zur synergistischen Aktivierung der Expression des *Col2a1*-Gens (Kawakami et al., 2004). Um Zielgene zu aktivieren, interagiert auch Sox10 möglicherweise mit weiteren Proteinen, die eine Umlagerung der Nukleosomen-Struktur bewirken. Im *Screen* wurden Proteine der SNF2/RAD54-Familie (NM\_146235 und NM\_0293370), die eine ATPase-Untereinheit der SWI/SNF-Superfamilie besitzen, identifiziert. Sie und einige andere Nukleosomen-Remodelling-Faktoren beeinflussen die Chromatin-Struktur durch ATP-abhängige Veränderungen der Histon-DNA-Interaktion (Eisen et al., 1995; Varga-Weisz und Becker, 2006). Des Weiteren wurden Ring-Finger-Proteine (*really interesting new gene*, NM\_011277 und NM\_009545) identifiziert, die zur Polycomb-Gruppe zählen und ein spezielles Zinkfinger-Motiv vom C3HC4-Typ zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen und zur Dimerisierung enthalten (Suzuki et al., 2002; Voncken et al., 2003). Die in den *Screens* identifizierten Teilstücke der beiden Proteine enthielten aber nicht die N-terminal gelegene Ring-Domäne mit dem Zinkfinger-Motiv, sondern ein etwas C-terminal davon gelegenes Stück. Wenn hier die Interaktion mit Sox10 stattfindet, könnten über die Ring-Domäne Interaktionen mit weiteren Proteinen vermittelt werden, was zur Bildung von Multiproteinkomplexen führen und der Aktivierung oder Reprimierung der Transkription dienen könnte. Zur Polycomb-Gruppe zählende Proteine dienen allgemein der Aufrechterhaltung des reprimierten Zustands von Genen (z.B. der Hox-Gene). Möglicherweise bewirkt eine Interaktion mit Sox10 eine Überführung der Gene in den

aktiven Zustand. Ein weiteres gefundenes Protein bewirkt die Nukleosomen-Zusammenlagerung (NM\_015781). Das SET- und MYND-Domänen-enthaltende Protein, dessen Domänen zur Deacetylierung von Histonen dienen (NM\_009762), wurde ebenfalls bei den *Screens* identifiziert (Gottlieb et al., 2002).

Die Interaktion von Sox10 mit Chromatin-Remodelling-Faktoren weist darauf hin, dass Sox10 neben der schon bekannten architektonischen Funktion der Bindung und Beugung der DNA (Kamachi et al., 2000; Wegner, 2005) auch eine Funktion bei der Interaktion mit anderen Proteinen zur Veränderung der Chromatinstruktur besitzen könnte. Diese Funktion wird ebenfalls von der HMG-Domäne des Proteins vermittelt.

Ein weiterer Interaktionspartner von Sox10 ist die Homoödomänen-interagierende Proteinkinase 2 (NM\_010433). Diese wurde ursprünglich als Mitglied einer neuen Familie von Serin/Threonin-Kinasen identifiziert, die als Korepressoren für Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren wirken (Kim et al., 1998), phosphoryliert aber auch zahlreiche andere Transkriptionsfaktoren wie Pax6, HMGA1a oder p53 (Kim et al., 2006; Pierantoni et al., 2001; D’Orazi et al., 2002). So könnte diese Kinase ebenso für die Phosphorylierung von Sox10 verantwortlich sein.

Etwa die Hälfte der bei den *Screens* identifizierten im Kern lokalisierten Interaktionspartner von Sox10 sind Transkriptionsfaktoren. Neben verschiedenen Hox-Proteinen wurden weitere Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren wie Dlx5, Hhex und Alx4 sowie das POU-Protein Brn-1, das bHLH-Protein UTF1 und das beta-Propeller-Protein Hcfc1 gefunden (Tabelle 3.3). Davon enthalten alle cDNA-Fragmente mit Ausnahme von Hcfc1 zumindest einen Teil der DNA-BD. Sox10 interagiert also über den im *Screen* verwendeten Teil der HMG-Domäne mit den DNA-Bindedomänen weiterer Transkriptionsfaktoren. Von Alx4 war bekannt, dass es über eine N-terminal gelegene Domäne mit der HMG-Domäne von LEF-1 interagiert und beide Proteine synergistisch den N-CAM-Promotor aktivieren (Boras und Hamel, 2002). Für Brn-1 konnte mit Sox11 die synergistische Aktivierung eines künstlichen Promotors mit direkt benachbarten Bindestellen für Sox- und POU-Proteine gezeigt werden (Kuhlbrodt et al., 1998a). Zumindest Alx4 und Brn-1 interagieren also tatsächlich mit HMG-Proteinen. Dies zeigt, dass die Ergebnisse der *Screens*, für die ja ein Teil der HMG-Domäne von Sox10 verwendet wurde, verlässlich sind.

Da man, wie eingangs erwähnt, annahm, dass viele Sox-Proteine zur effizienten Transaktivierung von Zielgenen weitere Proteine benötigen (Wegner, 1999; Bowles et al., 2000; Kamachi et al., 2000; Wegner, 2005), wurde mit der durch die Screens ermöglichten

Identifikation einer Anzahl von neuen möglichen Partner-Transkriptionsfaktoren ein erster Schritt zum Beweis dieser Hypothese getan. Für Sox- und POU-Proteine wurde aufgrund der Koevolution von HMG- und Homöodomänen bereits die Bildung spezialisierter Komplexe zur transkriptionellen Regulation von Entwicklungsvorgängen postuliert (Kuhlbrodt et al., 1998a; Dailey und Basilico, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nicht nur die Interaktion von Sox-Proteinen mit den Mitgliedern vieler weiterer Transkriptionsfaktor-Familien gezeigt werden, sondern mit Hilfe von *GST-Pulldown*-Studien, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden, die Interaktion auch noch auf die HMG-Domäne von Sox-Proteinen bzw. die DNA-BD der anderen Transkriptionsfaktoren eingegrenzt werden.

## 4.2 Verifizierung der Interaktion von Sox10 mit anderen Transkriptionsfaktoren durch *GST-Pulldown*-Studien

Um eine Interaktion von Sox10 mit den DNA-BD der verschiedenen Transkriptionsfaktoren direkt nachzuweisen, wurden *GST-Pulldown*-Studien durchgeführt. Dabei wurde auch untersucht, welcher Teil von Sox10 für die Interaktionen verantwortlich ist, und ob die Interaktion von Sox10 mit bestimmten Transkriptionsfaktoren eine Eigenschaft von Sox10 allein ist oder noch bei anderen Mitgliedern der Sox-Familie vorkommt. Dafür wurden das ebenfalls zur Gruppe E gehörende Protein Sox8 und SRY als Prototyp aller Sox-Proteine verwendet.

Die durchgeführten *GST-Pulldown*-Studien zeigten spezifische Interaktion des in den *baits* B enthaltenen C-terminalen Teils der HMG-Domäne von SRY, Sox10 und Sox8 mit den verwendeten Domänen der verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Abschnitt 3.2.2.2). Mit den *baits* A und GST allein erfolgte keine Interaktion. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Teil der HMG-Domäne für die Interaktionen verantwortlich ist. Nur mit den Hormonrezeptoren vom C2H2-Typ konnte auch mit den *baits* B keine Interaktion nachgewiesen werden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die Interaktion durch Kofaktoren vermittelt wird oder die Proteine möglicherweise über andere Stellen direkt miteinander in Kontakt treten. Auch bei den weiter oben beschriebenen in den *Screens* identifizierten Ring-Finger-Proteinen erfolgte die Interaktion nicht über das Zinkfinger-Motiv.

Die Interaktionen wurden vom in *bait* B enthaltenen Teil der HMG-Domäne, Helix drei und der C-terminalen Region, vermittelt. Auffälligerweise sind beide Regionen nur wenig an der Ausbildung von DNA-Kontakten beteiligt, so dass sie für andere Proteine auch dann noch

Interaktionsflächen bieten, wenn die Sox-Proteine an DNA gebunden haben. Vor allem die C-terminale Region, die in Lösung unstrukturiert vorliegt, ist ein guter Kandidat für diese Interaktionen. Dies konnte durch Experimente gezeigt werden, bei denen die m1-Mutation von Sox10 in Lösung zum Verlust aller Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren führte. Die C-terminale Region findet sich nur in HMG-Domänen von Sox-Proteinen. Demgemäß konnten auch keine Interaktionen mit den HMG-Domänen von LEF-1, HMGB1 oder UBF-1 beobachtet werden (Wißmüller et al., 2006).

Die bei den GST-Pulldown-Studien gezeigten Protein-Protein-Interaktionen sind schwach. Dies konnte sowohl bei Ko-Immünpräzipitationen als auch durch die Verwendung stringenterer Bedingungen gezeigt werden, bei denen die Interaktionen nicht mehr nachweisbar waren (Wißmüller et al., 2006; T. Kosian, unveröffentlichte Daten). Der Verlust der Protein-Protein-Interaktion der HMG-Domäne von Sox10 mit den DNA-BD anderer Transkriptionsfaktoren durch die Mutation von Arginin 176 zu Glutamat stützt die Annahme einer schwachen Protein-Protein-Interaktion, da bereits die Mutation dieser einen AS den vollständigen Verlust der Interaktion in GST-Pulldown-Studien bewirkt.

Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Bindungen zwischen Sox10 und anderen Faktoren einfach zu lösen sind und die Proteine neue Interaktionen eingehen können. Dies würde den Sox-Proteinen erlauben, in freier Lösung mit ständig wechselnden Partnern Kontakt aufzunehmen. Dazu schlagen Shoemaker et al. (2000) den sog. *fly-casting* (fliegender Wechsel) Mechanismus vor, durch den die Interaktion von in Lösung nur teilweise gefalteten Proteinen begünstigt wird. Teilweise unstrukturierte Proteine bieten durch ihre Flexibilität und die größere Oberfläche den Vorteil, Interaktionen mit vielen Partnern zu erlauben (Dyson und Wright, 2002). Weitere Protein-Protein-Interaktionen außerhalb der DNA-BD oder Kofaktoren könnten die spezifischen Interaktionen dann verstärken. So erfolgt die Interaktion von Sox9 mit p300 über eine C-terminal von der HMG-Box liegende Stelle (Furumatsu et al., 2005) ebenso wie die Interaktion von Sox17 mit  $\beta$ -Catenin (Zorn et al., 1999). Im Fall von nahe verwandten bzw. ähnlichen und koexprimierten Proteinen wäre eine Interaktion außerhalb der meist hochkonservierten DNA-BD eine Möglichkeit der spezifischen Genaktivierung. Ein solcher Mechanismus ist für Sox8 und Sox10 denkbar. Im Mausmodell konnte durch das Ersetzen des *Sox10*-Gens durch das Gen für *Sox8* gezeigt werden, dass gleiche Expressionsraten und nahezu identische DNA-BD nicht für eine funktionelle Äquivalenz der Proteine ausreichen (Kellerer et al., 2006). Die Spezifität der Proteine ist also in Teilen außerhalb der HMG-Domäne zu suchen. Die HMG-Domäne weist unter Sox-Proteinen eine Übereinstimmung von mindestens 50 % auf. Zwischen Proteinen einer

Gruppe, wie z. B. der Gruppe E, zu der Sox8, Sox9 und Sox10 zählen, beträgt die Übereinstimmung nahezu 100 %. Die Aminosäureabfolge außerhalb der HMG-Domäne ist dagegen nur zu ca. 55 % konserviert (Bowles et al., 2000). Diese Regionen könnten die Spezifität der Proteine, die Interaktion mit Partnern und somit die Effizienz der Transkription bestimmen. Nahe verwandte Proteine können deshalb zwar ein gewisses Maß an ähnlichen Funktionen und Interaktionspartnern haben, die Einzigartigkeit des einzelnen Proteins bleibt jedoch erhalten und wird vermutlich durch die nicht konservierten Bereiche bestimmt.

Für eine zusätzliche Interaktion außerhalb des in *bait B* enthaltenen Teils der HMG-Domäne von Sox10 sprechen auch die Ergebnisse, die in *Yeast two-hybrid Screens* mit Sox10 *bait A* erzielt wurden (T. Kosian, unveröffentlichte Daten). Diese *Screens* ergaben z.B. die Kandidaten Alx 4, das Ring-Finger-Protein 110 und die mit der Homöodomäne interagierende Kinase 2, die auch in den in dieser Arbeit durchgeführten *Screens* mit Sox10 *bait B* als Interaktionspartner identifiziert wurden. Ob hier jedoch der in *bait A* enthaltene vordere Teil der HMG-Domäne den spezifischen Kontakt vermittelt, Regionen N-terminal davon oder eventuell der mit *bait B* überlappende Proteinteil, muss noch untersucht werden.

Möglicherweise wird die Interaktion von Sox-Proteinen mit ihren Partnern auch erst dann verstärkt, wenn beide Proteine an DNA binden. Da für sequenzspezifisch bindende HMG-Proteine eine Konformationsänderung der Proteine vom teilweise unstrukturierten Zustand in eine definierte Sekundärstruktur durch Bindung an DNA beschrieben wurde, ist diese Möglichkeit denkbar (Dragan et al., 2003 und 2004). Durch die Flexibilität bei der Partnerwahl wäre es möglich, dass Sox-Proteine in verschiedenen Geweben oder während unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit verschiedenen dort koexprimierten Transkriptionsfaktoren interagieren. Dies konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden. So interagiert Sox10 z. B. mit Mitf in Melanozyten, mit Krox20 in Schwann-Zellen und mit Pax3 in Neuralleistenzellen (Bondurand et al., 2000 und 2001; Lang und Epstein, 2003; Ludwig et al., 2004; Potterf et al., 2001). Für Sox2 und Pax6 wurde gezeigt, dass sie *in vivo* nur zusammen an den DC5-Promotor binden können, obwohl *in vitro* jedes Protein auch einzeln an die DNA bindet (Kamachi et al., 2001). Dies zeigt, dass für die stabile Bindung an den Promotor Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind.

Auch von anderen Proteinen konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion gezeigt und auf die DNA-BD eingegrenzt werden: Sox2 interagiert über die HMG-Domäne mit der POU-Domäne von Brn-2 (Tanaka et al., 2004), das *Drosophila*-HMG-Protein Fish-hook mit Single-minded und Drifter über deren PAS- bzw. POU-Domäne (Ma et al., 2000), DSP1 mit

Bicoid über die HMG- bzw. Homöodomäne (Daulny et al., 2003), die Proteine HMG1 bzw. 2 mit der POU-Domäne von Oct-2 und den Homöodomänen von Hox9D und RAG1 (Zwilling et al., 1995; Zappavigna et al., 1996; Aidinis et al., 1999), und das Protein Csx4 mit der dritten Helix seiner Homöodomäne mit dem zweiten Zinkfinger von GATA4 (Lee et al., 1998).

## 4.3 Interaktion von Sox10 mit anderen Transkriptionsfaktoren an DNA

### 4.3.1 Gelshifts und Luziferase-Aktivitätstest mit Sox10 und C/EBP $\alpha$

Um die Protein-Protein-Interaktion von Sox10 mit weiteren Transkriptionsfaktoren an direkt benachbarten Bindestellen der DNA zu untersuchen, wurden Gelshifts am *Trp2*-Promotor mit dem bZIP-Protein C/EBP $\alpha$  durchgeführt (Abschnitt 3.4.2). Sowohl Sox10 als auch C/EBP $\alpha$  banden unabhängig voneinander an DNA. Wurden beide Proteine zusammen zugegeben, bildete sich ein ternärer Komplex aus Sox10 und C/EBP $\alpha$  vor allem dann, wenn wenig freie DNA-Sonde vorhanden war. Das gleiche Ergebnis konnte mit Sox8 beobachtet werden. Eine mit Sox10 und C/EBP $\alpha$  durchgeführte Titrierung der zur Bildung des ternären Komplexes benötigten Proteinmengen ergab, dass wahrscheinlich eine schwache Interaktion zwischen den Proteinen stattfindet, da selbst mit sehr geringen Mengen Sox10 und genügend freier DNA-Sonde noch ein ternärer Komplex beobachtet werden konnte (Abb. 3.13). Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion unter Gelshift-Bedingungen nicht stabil war.

Die äußerst geringe Ausbildung eines ternären Komplexes könnte damit erklärt werden, dass die in Lösung stattfindende schwache Interaktion der Proteine durch Bindung an die DNA unterbrochen wird. Dies wird möglicherweise dadurch verursacht, dass die Bindestellen für Sox10 und C/EBP $\alpha$  im verwendeten Oligonukleotid aus dem *Trp2*-Promotor in einem ungünstigen Abstand zueinander liegen. Da der Abstand der Sox- zur POU-Bindestelle im *FGF4*-Enhancer nur drei bp beträgt und die Bindestellen im *UTF1*-Enhancer sogar direkt benachbart sind (Rémenyi et al., 2003), könnte der im *Trp2*-Oligonukleotid vorliegende Abstand von neun bp zu groß für eine direkte Interaktion der DNA-BD der Proteine sein. Eine Interaktion der vollständigen Proteine über außerhalb der DNA-BD liegende Proteinteile oder über Kofaktoren sollte in Betracht gezogen werden, da bei den durchgeführten Luciferase-

Aktivitätstests am 0,9 kb *Trp2*-Promotor eine synergistische Aktivierung des Promotors erreicht wurde (Abschnitt 3.4.3).

Im Unterschied zu anderen beschriebenen direkt benachbarten Bindestellen für Sox-Proteine und andere Transkriptionsfaktoren wie beim *FGF4*- oder *c-RET*-Enhancer (Rémenyi et al., 2003; Lang und Epstein, 2003) wurde in dieser Arbeit ein DNA-Fragment verwendet, das eine Dimer-Bindestelle für Sox-Proteine besitzt. Sox10 hat wie die anderen Sox-Proteine der Gruppe E eine Dimerisierungsdomäne, die es dem Protein erlaubt, Dimer-Bindestellen kooperativ zu besetzen (Peirano und Wegner, 2000). Möglicherweise führt diese kooperative Bindung dazu, dass Interaktionen mit anderen Proteinen zurückgedrängt werden. Die Protein-Protein-Interaktionen an Monomer- bzw. Dimer-Bindestellen könnten sich daher unterscheiden und ein Grund dafür sein, dass in dieser Arbeit in Gelshifts eine Interaktion von Sox10 mit C/EBP $\alpha$  nur mit zu wenig freier Sonde im Ansatz beobachtet werden konnte.

Die mit Sox10 und C/EBP $\alpha$  durchgeführten Luziferase-Aktivitätstests am 0,9 kb *Trp2*-Promotor zeigten einen mehr als additiven Effekt bei der Induktion des Reportergens (Abschnitt 3.4.3). Dazu müssen die Proteine miteinander interagieren. Dies könnte entweder direkt oder über Kofaktoren erfolgen, die die Protein-Protein-Interaktion vermitteln oder stabilisieren könnten. Möglicherweise sind diese Faktoren in Gelshifts, im Gegensatz zu lebenden Zellen, nicht in ausreichendem Maße vorhanden.

Da für die Luziferase-Aktivitätstests ein wesentlich längeres Fragment des *Trp2*-Promotors als für die Gelshifts verwendet wurde, befinden sich möglicherweise neben den bekannten Sox-Bindestellen weitere, unentdeckte C/EBP $\alpha$ -Bindestellen, an denen eine Interaktion der Proteine zustande kommen könnte. Die Vorhersage von Bindestellen mit dem TFSEARCH-Programm ist nicht exakt, wie bereits bei der Suche nach benachbarten Bindestellen von Sox10 und weiteren Transkriptionsfaktoren in den *P0*-, *Trp2*- und *MBP*-Promotoren festgestellt wurde. Die bekannten Sox-Bindestellen S4 und S4' im *Trp2*-Promotor (Ludwig et al., 2004) wurden vom Programm nicht erkannt (Abschnitt 3.4.1). Einerseits wurden diese Bindestellen nicht gefunden, andererseits konnten vorhergesagte Bindestellen von Pax-Proteinen im *MBP*-Promotor und Zinkfinger-Proteinen sowie C/EBP $\alpha$  im *P0*-Promotor nicht bestätigt werden.

### 4.3.2 Verhalten der mutierten Sox-Proteine m1 und m2 in Immunlokalisationen und Gelshifts

Um die Bindung der mutierten Sox-Proteine m1 und m2 an DNA zu untersuchen, wurden Gelshifts durchgeführt (Abschnitt 3.4.4). Dabei zeigte sich, dass nur m1-Sox10 an DNA binden kann, das m2-Protein dagegen diese Fähigkeit vollständig verloren hat. In Immunlokalisationen zeigte die m1-Mutation eine partielle, das m2-Protein eine vorwiegend cytoplasmatische Lokalisation (Abb. 3.10). Durch die Mutationen R161E, K165E ist keine NLS von Sox10 betroffen, so dass man davon ausgehen kann, dass der Transport des mutierten Proteins in den Kern nach wie vor stattfindet. Dafür spricht auch, dass in den immunhistochemischen Untersuchungen m2-Sox10 nicht ausschließlich im Cytoplasma, sondern auch im Kern präsent war. Man muss deshalb annehmen, dass mehr Sox10 aus dem Kern exportiert wird, als hineingelangt. Wie mit Hilfe der Gelshifts festgestellt wurde, verhindert die m2-Mutation die DNA-Bindung des Proteins. Der Zusammenhang beider Beobachtungen wird anhand von Untersuchungen mit SRY deutlich. Von SRY ist bekannt, dass der Transport des Proteins in den Kern durch Importin  $\beta 1$  vermittelt wird, und die spezifische Bindung von SRY an die DNA die Ablösung von Importin  $\beta 1$  erleichtert (Forwood et al., 2001). Möglicherweise wird m2-Sox10 durch einen analogen Mechanismus in den Kern importiert, kann dort aber nicht an die DNA binden und wird aufgrund seiner NES wieder aus dem Kern exportiert. Die m2-Mutation würde zwar einen normalen Kernimport erlauben, nicht jedoch die Bindung an DNA. Da Sox10 weiterhin eine NES besitzt, würde sich das m2-Protein nicht im Kern anreichern, sondern wieder zurück ins Cytoplasma transportiert werden, woraus vermutlich die beobachtete gleichmäßige Verteilung des m2-Proteins in Kern und Cytoplasma resultiert. Wodurch der Verlust der DNA-Bindung verursacht wird, konnte durch dieses Modell jedoch nicht erklärt werden.

Deshalb wurde mit Hilfe des Programms SWISS-MODEL ([www.swissmodel.expasy.org](http://www.swissmodel.expasy.org); Schwede et al., 2003), basierend auf bekannten Kristallstrukturen anderer Sox-Proteine, ein Homologiemodell der HMG-Domäne von Sox10 am *FGF4*-Enhancer erstellt (Abb. 4.1). Dieses Modell beruht ausschließlich auf bekannten Strukturen von HMG-Domänen an DNA (Cary et al., 2001; Murphy et al., 2001; Rémenyi et al., 2004; Williams et al., 2004; Einträge in die pdb-Datenbank ([www.rcsb.org/pdb/Welcome.do](http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do)): 1gt0D.pdb: 61.5 % identity; 1o4xB.pdb: 63.2 % identity; 1j46A.pdb: 50 % identity; 1j47A.pdb: 48.7 % identity; 1i11A.pdb: 50 % identity) und wurde anhand elektrostatischer Daten der Aminosäuresequenz der HMG-Domäne von Sox10 berechnet (Abb. 4.1 a). Da die Sequenzidentität der für die

Erstellung des Homologiemodells herangezogenen Strukturen mehr als 50 % beträgt (laut Definition haben alle Sox-Proteine eine Übereinstimmung von mindestens 50 % innerhalb ihrer HMG-Domäne (Bowles et al., 2000)), kann man davon ausgehen, dass das Modell zuverlässig ist. Geringe Abweichungen wie in Abb. 4.1 b zwischen den Strukturen von Sox10 und Sox2 kann man auf die Eigenheiten des jeweiligen Proteins zurückführen, da die AS der

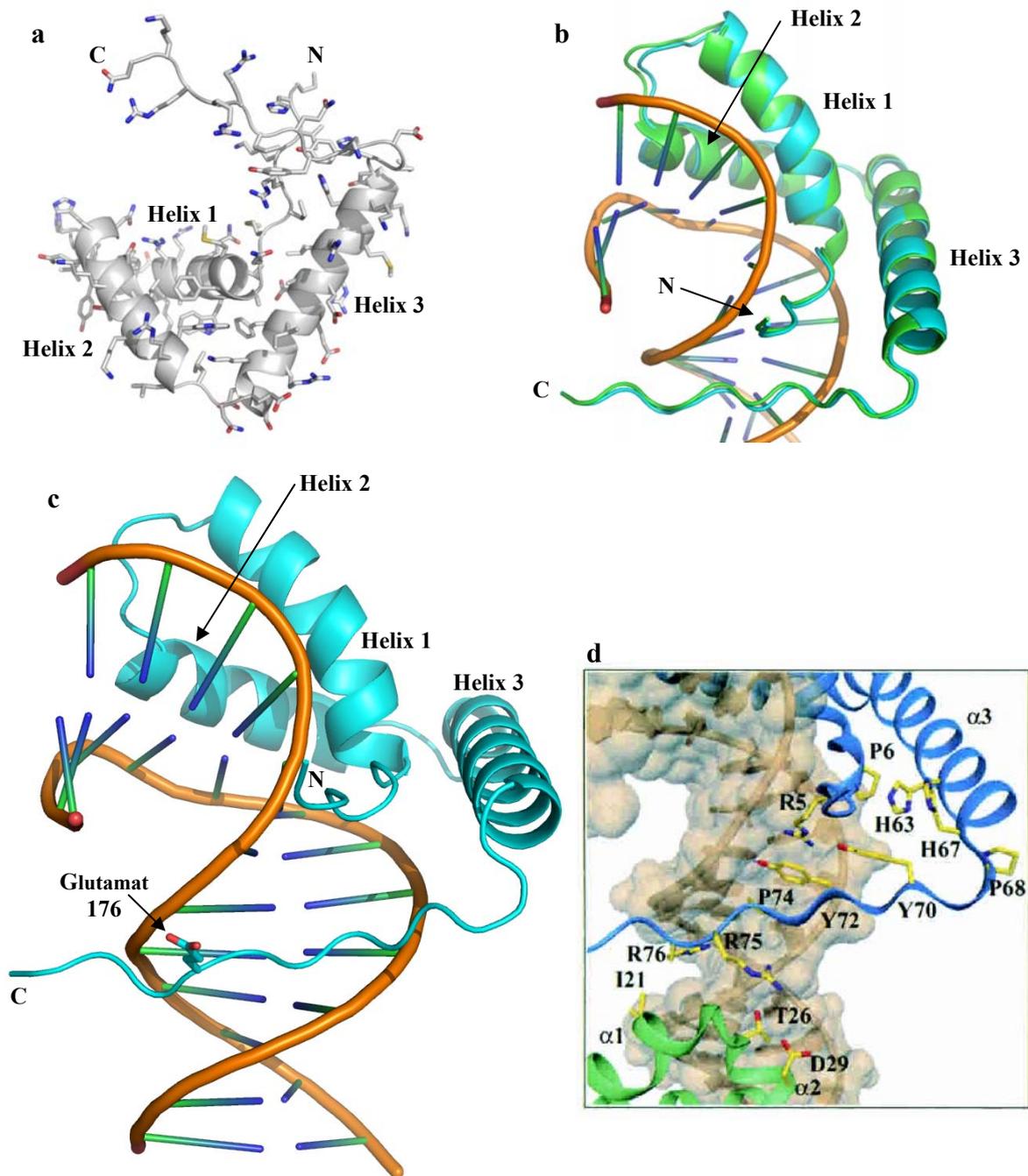


Abb. 4.1: Strukturmodell der HMG-Domäne von Sox10 aus Ratte (AS 102 bis 180) am *FGF4*-Enhancer. a) HMG-Domäne von Sox10 mit den AS-Seitenketten. Die DNA ist ausgeblendet, um eine bessere Ansicht des Proteins zu ermöglichen. b) Überlagerung der Kristallstruktur von Sox2 (grün) und des Homologiemodells von Sox10 (blau) am *FGF4*-Enhancer. c) m1-Sox10 am *FGF4*-Enhancer. Die zu Glutamat mutierte AS 176 ist als Stäbchenmodell im C-Terminus zu sehen. Sie weist von der DNA weg. d) Sox2 (blau) und Oct-3/4 (grün) am *FGF4*-Enhancer (Rémenyi et al., 2003). Die direkte Interaktion beider Proteine erfolgt nur über Arginin 75 der HMG-Domäne von Sox2 (was Arginin 176 von Sox10 entspricht). C, C-Terminus; N, N-Terminus.

HMG-Domänen nicht zu 100% übereinstimmen. Bei weitgehend sicheren Modellen legt man eine Übereinstimmung von mindestens 40 % zugrunde. Mit den Programmen Coot (Emsley und Cowtan, 2004; [www.yesbl.york.ac.uk/~emsley/cool/](http://www.yesbl.york.ac.uk/~emsley/cool/)) und pyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) konnten die wahrscheinlichsten Rotamere der mutierten AS berechnet werden.

In Abb. 4.1 c wurde die Mutation m1-Sox10 von Arginin 176 zu Glutamat dargestellt. Wie aus der Abbildung deutlich wird, würde man durch diese Mutation keine Beeinträchtigung der Bindung an DNA erwarten, da die Seitenkette des Glutamats von der DNA weg weist. Allerdings könnte sie die Interaktion mit anderen Proteinen stören, wenn diese über den C-terminalen Teil der HMG-Domäne erfolgt. Für Sox2 und Oct-3/4 an DNA konnte gezeigt werden, dass eine sequenzspezifische Interaktion am *FGF4*-Enhancer auf Seite des Sox2-Proteins nur über eine AS, nämlich Arginin 176, stattfindet (Rémenyi et al., 2003; Abb. 4.1 d). Vergleicht man die Abbildungen 4.1 c und d, kann man erkennen, dass durch die Mutation wahrscheinlich keine Interaktion mit Oct-3/4 mehr stattfinden kann, da der Glutamatrest erstens viel kürzer als Arginin ist und in eine andere Richtung weist, und außerdem durch die negative Ladung des Glutamats keine Interaktion mit der ebenfalls negativ geladenen Hydroxy-Gruppe des Threonins von Oct-3/4 mehr stattfinden kann, sondern eher eine Abstoßungsreaktion erfolgen würde. Die GST-Pulldown-Untersuchungen von m1-Sox10 mit den DNA-BD anderer Transkriptionsfaktoren lassen den Schluß zu, dass auch in Lösung eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren über die AS 176 erfolgt.

Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante m2-Sox10 in GST-Pulldown-Untersuchungen weiterhin Interaktion mit anderen DNA-BD, band aber in Gelshifts nicht mehr an DNA. Wie in Abb. 4.2 dargestellt ist, könnte dabei die Mutation von R161 und K165 zu Glutamat durch die negative Ladung der Glutamatreste und die daraus resultierende Abstoßung von der DNA eine Bindung verhindern. Normalerweise liegt Arginin 161 nahe an der DNA und nimmt über eine Wasserstoffbrücke Kontakt zum Phosphatrückgrat auf. Möglicherweise hat auch Lysin 165 Kontakt zur DNA, aufgrund des größeren Abstands vermutlich über ein Wassermolekül. Die Mutation dieser basischen Reste zu sauren, die direkt zur DNA hin orientiert sind, könnte zu einer starken Abstoßungsreaktion führen, so dass die Helix drei von der DNA weggedrückt wird. Möglicherweise führt diese Abstoßung dazu, dass zwischen Helix drei und der N-terminalen Region vor Helix eins kein Kontakt mehr aufgenommen werden kann, und so die Stabilität der gesamten HMG-Domäne beeinflusst wird. Dies würde sich in Lösung, in der das Protein nur teilweise gefaltet ist, möglicherweise nicht auf die Protein-Protein-Interaktion auswirken, vor allem, wenn diese über die C-terminale Region vermittelt wird. An DNA

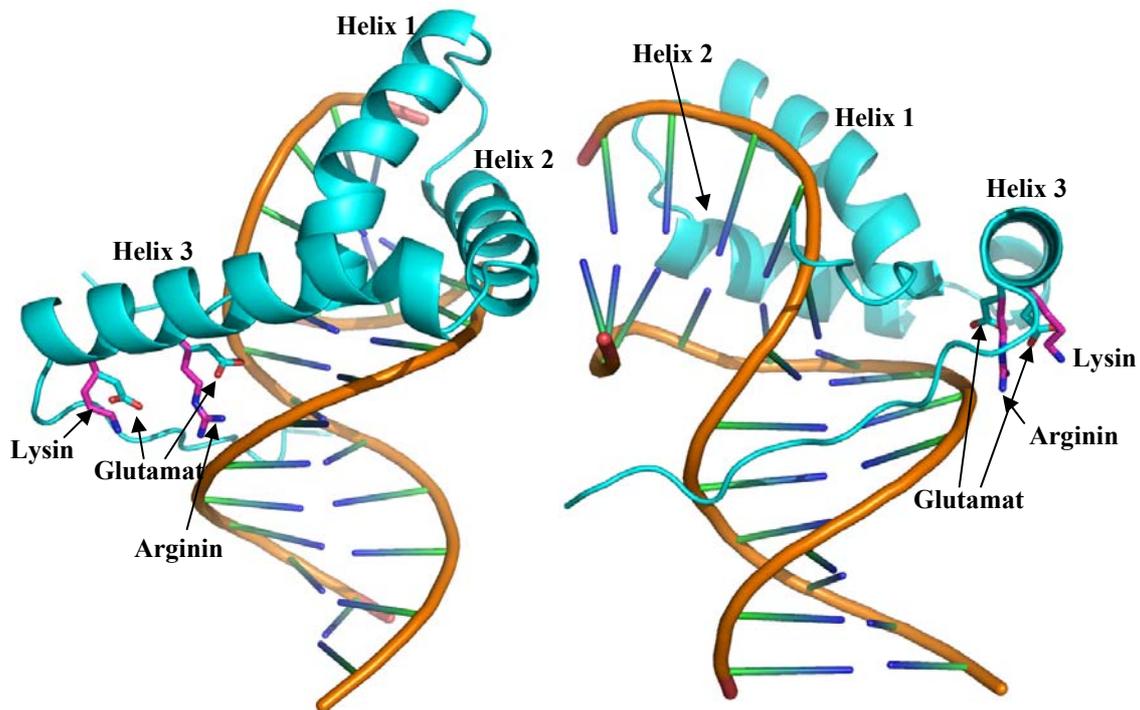


Abb. 4.2: HMG-Domäne von m2-Sox10 am *FGF4*-Enhancer mit den Mutationen R161E, K165E aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. Das mutierte Protein ist blau dargestellt, während die ursprünglichen Reste Arginin 161 und Lysin 165 lila eingefärbt wurden. Beachte, dass dieses Modell aufgrund von Homologievergleichen erstellt wurde und keine Kristallstruktur zugrunde liegt, die nach der Mutation der Reste eine möglicherweise entstehende andere Konformation der Helices bzw. des gesamten Modells anzeigen würde.

hingegen könnte die Mutation durch Abstoßung von der DNA die Ausbildung einer stabilen Proteinkonformation und so der DNA-Bindung verhindern.

Dass diese Stelle kritisch für die DNA-Bindung von Sox10 ist, kann auch aufgrund der Tatsache geschlossen werden, dass die Sox10-Mutante 095, die in einem menschlichen Patienten mit Waardenburg-Hirschsprung-Syndrom gefunden wurde, nicht mehr an DNA bindet (Kuhlbrodt et al., 1998c). Bei dieser Mutation liegt eine Insertion von sechs bp vor (482ins6), was im Protein zu zwei zusätzlichen AS (Leucin und Arginin) zwischen AS 161 und 162 führt, ohne jedoch den Leserahmen zu stören oder weitere Veränderungen in der Aminosäuresequenz zu bewirken. Man kann also annehmen, dass ein für die Stabilität des Sox10-Proteins essentieller Teil im Bereich der AS 161 liegt.

### 4.3.3 Luziferase-Aktivitätstests mit m1-Sox10 und weiteren Transkriptionsfaktoren

Aufgrund der fehlenden DNA-Bindung war das m2-Sox10-Protein für weitere Experimente zur Untersuchung der Transaktivierungsfähigkeit unbrauchbar. Da m1-Sox10 noch an DNA

band, konnten weitere Untersuchungen mit diesem Protein durchgeführt werden. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die veränderte zelluläre Lokalisation der m1-Mutante Auswirkungen auf die Ergebnisse haben könnte. Für die *GST-Pulldown*-Studien kann dies ausgeschlossen werden, da die Expression der Sox-Konstrukte in Bakterien erfolgte. Auch für die Gelshifts ergeben sich keine direkten Auswirkungen, da die verwendeten Proteinextrakte mittels Westernblot nachgewiesen wurden. Für die Luziferase-Aktivitätstests ist das Ergebnis der Immunlokalisation allerdings wichtig: So kann ein nicht ausreichend im Kern vorhandener Transkriptionsfaktor zu einer verminderten Transaktivierung des Reportergens führen. Bei den in Abschnitt 3.4.5 untersuchten Promotoren ist nur mit allein transfiziertem m1-Sox10 eine verminderte Transaktivierung festzustellen. Zusammen mit einem weiteren Transkriptionsfaktor ist die Transaktivierung jedoch genauso stark wie mit wt-Sox10. Wäre die veränderte Kernlokalisation des Proteins Ursache für die verminderte Transaktivierung, müsste sich dies auch zusammen mit dem zweiten Faktor bemerkbar machen. Da dies nicht der Fall war, kann eine Auswirkung der veränderten Kernlokalisation auf die Luziferase-Aktivitätstest-Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Wichtig ist in diesem Kontext auch, die *in vivo*-Auswirkungen solcher Mutationen in Betracht zu ziehen. Für einen Organismus hätte der Verlust der DNA-Bindung, wie sie mit m2-Sox10 beobachtet wurde, erhebliche Auswirkungen auf die Aktivierung von Sox10-Zielgenen. Dies könnte zu Missbildungen und gegebenenfalls auch zum Absterben des Embryos führen, da Sox10 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielt (Kuhlbrodt et al., 1998b; Britsch et al., 2001). Im Fall der Sox10-Mutation 095 litt der betroffene Patient am Waardenburg-Hirschsprung-Syndrom (Kuhlbrodt et al., 1998c). Ähnliche Symptome könnten auch mit der hier beschriebenen m2-Mutante auftreten, da alle Zielgene, die eine direkte Bindung von Sox10 zur Expression benötigen, nicht aktiviert werden könnten. Nur an Promotoren, bei denen ein weiterer Faktor m2-Sox10 an die DNA rekrutieren könnte, würde die Transkription stattfinden. Mit m1-Sox10 könnten dagegen unabhängig vom Abstand der Bindestellen zumindest eine additive Aktivierung des Promotors erreicht werden; falls die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren nicht über die durch die Mutation veränderte Stelle vermittelt wird, könnte die Transaktivierung der des wt-Sox10-Proteins entsprechen.

Mit Hilfe von Luziferase-Aktivitätstests sollte die Transaktivierungsfähigkeit des mutierten Proteins m1 im Vergleich zu wt-Sox10 untersucht werden (Abschnitt 3.4.5). Dazu wurden der *3xMWL*-Promotor, der künstliche Sox-Bindestellen enthält, sowie der 3,7 kb-*Trp2*-Promotor und der *Connexin32-416*-Promotor, die zusätzliche Mitf- bzw. Krox20-Bindestellen enthalten, verwendet.

Alle Versuche zeigten, dass m1-Sox10 den jeweiligen Promotor nur etwa halb so stark wie wt-Sox10 zu aktivieren vermag. Zusammen mit einem weiteren Transkriptionsfaktor wie Mitf oder Krox20 erreichte das mutierte Sox-Protein aber die Transaktivierungsraten des wt-Sox10.

Die erste Frage, die sich stellt, ist, wodurch die schwächere Transaktivierung von m1-Sox10 zustande kommt. Aus den vorhergehenden Versuchen hätte man für m1-Sox10 eine gleich starke Transaktivierung erwartet, da die Bindung an DNA in Gelshifts ebenso stark wie die von wt-Sox10 war. Zusammen mit einem weiteren Transkriptionsfaktor hätte das mutierte Sox-Protein dann eine verringerte Transaktivierung gegenüber dem wt-Protein zeigen müssen, da die zumindest in freier Lösung für die Interaktion der Transkriptionsfaktoren benötigte AS mutiert ist.

Eine schwächere DNA-Bindung von m1-Sox10 in Vergleich zum wt-Protein kann also durch die Gelshifts weitgehend ausgeschlossen werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass m1-Sox10 eine schwächere Transaktivierung bewirkt, möglicherweise bedingt durch eine eingeschränkte Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie. Da die Transaktivierungsdomäne des Sox-Proteins durch die Mutation von R176E nicht verändert wurde und somit die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie an den Promotor weiterhin funktionieren sollte, muss eine andere Möglichkeit in Betracht gezogen werden: Da für die Interaktion mit anderen Proteinen, zumindest Transkriptionsfaktoren in freier Lösung, die AS Arginin 176 eine wichtige Rolle spielt, die bei m1 ja mutiert ist, wäre im Hinblick auf die im Abschnitt 3.1 diskutierte Interaktion der Sox-Proteine mit Chromatin-Remodelling-Faktoren eine fehlerhafte Umstrukturierung des Chromatins denkbar. Dies setzt voraus, dass die Interaktion mit diesen Faktoren ebenfalls über die C-terminale Region erfolgt. Fehlerhafte Chromatin-Umstrukturierung würde zu einer stark verminderten DNA-Bindung des Sox-Proteins und somit auch zu einer eingeschränkten Transaktivierung des Reporters führen. (Dies steht nicht im Widerspruch zur Beobachtung, dass m1-Sox10 in Gelshifts genauso stark an DNA bindet wie wt-Sox10, da die hier verwendete DNA, im Gegensatz zur Chromatinstruktur in der Zelle, frei von Proteinen vorliegt.)

Zusammen mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, wie Mitf oder Krox20, erreicht m1-Sox10 annähernd die gleichen Transaktivierungsraten wie das wt-Sox10-Protein. Offenbar gleichen diese Faktoren den Unterschied zwischen dem wt- und dem mutierten Sox10-Protein aus. Hier stellt sich die zweite Frage, nämlich nach dem Mechanismus dieses Ausgleichs. Da die Transkriptionsfaktoren Mitf und Krox20 bei der alleinigen Bindung an den Promotor nur geringe Transaktivierungsraten aufweisen, muss der Mechanismus darin begründet sein, dass

die Sox-Proteine und anderen Transkriptionsfaktoren in irgendeiner Weise miteinander kooperieren, um die starke Transaktivierung des Promotors zu erreichen.

Eine direkte Interaktion der Proteine über die HMG-Domäne von m1-Sox10 wird aufgrund der Mutation ausgeschlossen (Abschnitt 2.3.2). Außerdem liegen die Bindestellen in den verwendeten Promotoren für eine direkte Interaktion über die DNA-BD der Proteine wahrscheinlich zu weit auseinander. Möglicherweise erfolgt eine Protein-Protein-Interaktion außerhalb der HMG-Domäne über andere Teile der Proteine oder über Kofaktoren. Denkbar wäre auch ein indirekter Effekt, der nicht auf einer Interaktion der Proteine miteinander beruht. Dieser könnte in einer Umstrukturierung des Chromatins durch Mitf bzw. Krox20 bestehen, wodurch auch m1-Sox10 an die DNA binden könnte. Es ist bekannt, dass zumindest bHLH-Proteine wie Mitf mit Histon-Acetyltransferase-Komplexen zur Umstrukturierung des Chromatins interagieren können (Massari und Murre, 2000). Dazu müssen die Bindestellen für Sox-Proteine und die anderen Transkriptionsfaktoren zwar nicht direkt nebeneinander, aber in relativer räumlicher Nähe liegen.

Dies ist bei den verwendeten Promotoren auch der Fall. Die Mitf-Bindestelle im *Trp2*-Promotor befindet sich zwischen den Sox-Bindestellen S1 und S2, die nur 20 bp auseinander liegen (vgl. Ludwig et al., 2004). Wenn also der Transkriptionsfaktor Mitf die Umstrukturierung des Chromatins an seiner Bindestelle bewirkt, käme dies gleichzeitig dem m1-Sox-Protein zugute. Zieht man in Betracht, dass die Länge der DNA in einem Nukleosom je nach Zelltyp und Organismus zwischen 165 und 220 bp liegt (Knippers, 1997), kann man davon ausgehen, dass bei einer Umorganisation des Chromatins nicht nur die Sox-Bindestellen S1 und S2, sondern wahrscheinlich alle bis zu S4/S4', möglicherweise bis S5, frei zugänglich werden. Nach diesem Modell würde die Induktion des Reportergens also nicht ganz die des wt-Sox10 erreichen, da die letzte(n) Sox-Bindestelle(n) S5 und/oder S6 für das mutierte Protein m1-Sox10 nicht frei zugänglich ist/sind. In der Tat ist die Transaktivierung mit mutiertem Sox10-Protein geringfügig schwächer als mit wt-Sox10. Dieses Modell schließt damit die Möglichkeit aus, dass die im *Trp2*-Promotor zwischen S5 und S6 gelegenen E-Boxen (Bertolotto et al., 1998) von Mitf besetzt werden, da dies mit wt-Sox10 und m1-Sox10 zu gleich starker Aktivierung hätte führen müssen.

Auch im Fall des *Connexin32*-416-Promotors liegen die Krox20-Bindestelle E3 und die Sox-Bindestelle S1 nur 57 bp auseinander. Durch eine mögliche Remodelling-Aktivität von Krox20 wäre die Sox-Bindestelle frei zugänglich. In der Tat zeigte sich kein Unterschied bei der Transaktivierung des Promotors zwischen wt-Sox10 und m1-Sox10 zusammen mit

Krox20. Da hier nur eine Sox-Bindestelle vorhanden ist, entfällt ein „dosisabhängiger“ Effekt der Sox10-Bindung wie beim *Trp2*-Promotor.

Da die Bindestellen für Sox10 und Mitf bzw. Krox20 sowohl im *Trp2*- als auch im *Connexin32*-Promotor zwar in relativer räumlicher Nähe liegen, aber nicht direkt benachbart sind, kann durch diese Versuche keine Aussage über eine direkte Interaktion der DNA-BD der Proteine getroffen werden. Eine direkte Interaktion konnte somit nur mit *GST-Pulldown*-Studien nachgewiesen werden.

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass verwandte Transkriptionsfaktoren zwar oftmals gleich gut an DNA binden können, die kooperative Aktivierung eines Promotors aber nur mit einer bestimmten Kombination von Faktoren erreicht wird. Z. B. bindet Sox11 mit Brn-1 oder Sox10 mit Tst-1 ebenso gut an DNA wie Sox11 zusammen mit Tst-1 oder Sox10 mit Brn-3, eine synergistische Aktivierung konnte in Luziferase-Assays aber nur mit mit Sox11/Tst-1 und Sox10/Brn-3 beobachtet werden (Kuhlbrodt et al., 1998c). Di Rocco et al. (2001) berichten von der Bildung ternärer Komplexe zwischen Sox2 und Oct-1 bzw. Sox2 und Oct-3/4, jedoch konnten nur Sox2 und Oct-1 den *Hoxb1*-Enhancer aktivieren. Ebenso aktiviert die Kombination von Sox2 mit Brn-2 den *Nestin neural enhancer* deutlich besser als Sox2 zusammen mit Brn-1, obwohl *in vitro* kein Unterschied in der DNA-Bindung festgestellt werden konnte (Tanaka et al., 2004). Wie unterscheidet also ein Zielgen zwischen den möglichen Kombinationen von Transkriptionsfaktoren, und was ist die molekulare Basis für die funktionelle Spezifität der Komplexe? Alle genannten Beispiele sind Sox-POU-Komplexe, für die bereits ein regulatorischer Kode postuliert wurde (Kuhlbrodt et al., 1998c). Dailey und Basilico (2001) schlagen ein Modell vor, nach dem benachbarte Bindestellen in Enhancern direkten Kontakt zwischen den Proteinen an DNA ermöglichen, dadurch die Protein-Protein-Interaktion stabilisieren und die Konformation der Proteine so verändern, dass die Transaktivierungsdomänen beider Proteine in eine optimale Position gebracht werden. Ähnliche Proteine könnten so zwar an DNA binden, die synergistische Aktivierung des Promotors jedoch nicht auslösen. Auch für Hox-Proteine wurde ein solches Protein-Protein-Interaktionsmodell vorgeschlagen (Li et al., 1999). Wie bereits in der Einleitung unter Punkt 1.2.4.1.1 beschrieben, werden Hox-Proteine vermutlich durch andere Faktoren bei der Aktivierung von Zielgenen reguliert. Dabei binden Exd und Pbx kooperativ mit anderen Hox-Proteinen und verstärken die Spezifität und Affinität der Hox-DNA-Bindung.

Der Synergismus zur Aktivierung von Zielgenen scheint dabei nicht in allen Fällen von einer direkten Bindung an DNA abhängig zu sein, sondern auf der Anwesenheit der

Transaktivierungsdomänen der Faktoren zu beruhen. So wird von Wei et al. (2004) von einer Aktivierung des *MBP*-Promotors berichtet, bei dem Sox10 aufgrund einer mutierten Bindestelle nicht an die DNA binden konnte, jedoch zusammen mit Sp1 eine synergistische Aktivierung des Promotors bewirkte. Dagegen ist am *Trp2*-Promotor zur synergistischen Aktivierung durch Sox10 und Mitf die Bindung von Sox10 an den Promotor nötig, ebenso wie die intakte TA des Proteins (Ludwig et al., 2004).

Für den direkten Kontakt der Proteine spielt der Abstand der Bindestellen eine entscheidende Rolle, da hierdurch die räumliche Lage der Proteine zueinander und somit auch die mögliche Interaktionsfläche festgelegt werden, wie bei Rémenyi et al. (2003) und Williams et al. (2004) mit Sox2 und Oct-3/4 bzw. Oct-1 am *UTF1* bzw. *Hoxb1*- und am *FGF4*-Enhancer gezeigt wird. Durch den unterschiedlichen Abstand der Bindestellen findet die Interaktion einmal über die Helix drei der HMG-Domäne von Sox2 statt und einmal mit dem C-terminal davon liegenden Proteinfragment.

## 4.4 Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen erfüllt in der Zelle wichtige Aufgaben. Sie dient nicht nur der Übertragung von Energie oder der Signalübermittlung, sondern reguliert auch die Lokalisation von Proteinen. So wurde für Sox9 gezeigt, dass eine Phosphorylierung die Verlagerung des Proteins vom Cytoplasma in den Kern bewirkt (Malki et al., 2005a). Auch die Phosphorylierung von SRY konnte bereits nachgewiesen werden. Für Sox10 war nach Vorarbeiten von S. Lang nur bekannt, dass Sox10 an Serin- und möglicherweise Threonin-Resten phosphoryliert werden kann, und dass die phosphorylierte Stelle wahrscheinlich zwischen den AS 1 und 101 liegt. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass Dephosphorylierung von Sox10 die DNA-Bindung verstärkt bzw. Phosphorylierung die DNA-Bindung hemmt.

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden wurden in der MIC-Kurzform zehn mögliche Phosphorylierungsstellen vorhergesagt (Abschnitt 3.5.1). Die betreffenden AS sind zwischen Maus, Mensch und Ratte konserviert. Im Bereich der schon untersuchten Deletion von AS 61 bis 101 liegen die drei Serine 77, 81 und 98. Diese waren also wahrscheinlichere Ziele einer Phosphorylierung als die anderen AS. Mit Einfachmutanten konnte jedoch kein Unterschied der DNA-Bindung im Vergleich zu Wildtyp-Sox10 festgestellt werden. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass Sox10 an mindestens zwei Stellen phosphoryliert wird. Durch neue Experimente konnte gezeigt werden, dass neben anderen AS Serin 45 phosphoryliert

wird, wahrscheinlich aber keine weiteren Phosphorylierungsstellen zwischen den AS 61 und 101 liegen (T. Kosian, unveröffentlichte Daten). Mit Hilfe von 2D-Gelen wurden vier Punkte als mögliche Varianten von Sox10 identifiziert, von denen drei modifiziertes Protein darstellen würden (Abb. 3.19). Man kann davon ausgehen, dass die Punkte 1 und 2 nichtphosphoryliertes bzw. phosphoryliertes Protein darstellen. Die Punkte 3 und 4 liegen hingegen bereits sehr weit am Rand des Gels in einem hohen pH-Bereich, was darauf hindeuten kann, dass hier zusätzliche Modifikationen vorliegen könnten. Eine Aussage darüber kann nur nach massenspektroskopischer Untersuchung der betreffenden Punkte bzw. Proteine getroffen werden. Allerdings würde für nur eine phosphorylierte Form von Sox10 unabhängig von der Anzahl tatsächlich vorkommender Phosphorylierungsstellen die Tatsache sprechen, dass auch im Western-Blot nur zwei Banden (phosphoryliertes und unphosphoryliertes Protein) beobachtet werden können. Mit anderen Worten, die Anzahl der Phosphorylierungen ist immer gleich.

Im nahe verwandten Protein SOX9 wurden die Phosphorylierungsstellen S64 und S211 identifiziert (Huang et al., 2000). Diese AS liegen vor und hinter der HMG-Domäne, sind jedoch zwischen SOX9 und Sox10 nicht konserviert. Bei Sox10 liegt die potentielle Phosphorylierungsstelle in der Region vor der HMG-Domäne, von der bereits gezeigt wurde, dass sie für die kooperative Bindung von Proteinen der Gruppe E wichtig ist (Peirano und Wegner, 2000). Allerdings bewirkte die Phosphorylierung keine verstärkte Monomerbindung von Sox10 bei gleichzeitiger Abschwächung der Dimerbindung, sondern die Bindung an DNA nahm an der C/C'-Bindestelle generell stark ab (Abb. 3.17).

Für SOX9 konnte außerdem gezeigt werden, dass Phosphorylierung zu einem verstärkten Transport in den Kern durch Importin  $\beta$  führt, was eine verstärkte Expression der Zielgene bewirkt (Malki et al., 2005b; Huang et al., 2000). Ebenso wurde von SRY berichtet, dass Phosphorylierung zu verstärkter DNA-Bindung führt (Desclozeaux et al., 1998). Für Sox10 gilt der umgekehrte Fall, nämlich dass Phosphorylierung zu verringerter DNA-Bindung führt. Möglicherweise besteht hier die Funktion der Phosphorylierung darin, die Aktivierung von Zielgenen zu verhindern. Dies wäre ein einfacher Mechanismus, bei einer Koexpression von Sox9 und Sox10 ohne weitere Partnerproteine oder eine Steuerung der Sox10-Expression eine differentielle Genregulation zu bewirken.

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die HMG-Domäne von Sox-Proteinen nicht nur der DNA-Bindung, sondern auch der Interaktion mit anderen Proteinen dient. Die dabei in Lösung beobachteten Protein-Protein-Interaktionen waren schwach. Deshalb wird folgendes

Modell der Interaktion von Transkriptionsfaktoren postuliert: Durch die Flexibilität der in Lösung teilweise ungefalteten Proteine kommen schwache Bindungen zustande, die leicht gelöst und neu gebildet werden können. Durch den größeren Radius von in Lösung ungefalteten Proteinen können mehr Interaktionspartner erreicht werden und mehr Proteine miteinander interagieren. Binden die Transkriptionsfaktoren dann an DNA, erfolgt die vollständige Faltung des Proteins und im Fall von Sox-Proteinen die Umstrukturierung der DNA. Bei diesem Schritt werden alle potentiellen Partner eliminiert, die nicht an die Erkennungssequenz binden können oder aufgrund von unpassendem Abstand der Bindestellen bzw. der Konformation der benachbarten Proteine an der DNA-Bindung gehindert werden. Hier spielen vermutlich Protein-Protein-Interaktionen sowohl innerhalb als auch außerhalb der DNA-BD eine Rolle. Die letzte Kontrolle erfolgt bei der Aktivierung der Zielgene. In direkter Nachbarschaft an die DNA gebundene Transkriptionsfaktoren können die Expression von Genen nur bewirken, wenn sie effektiv zusammenwirken und die Transkriptionsmaschinerie an den Promotor rekrutieren können. Dazu sind neben einer direkten Protein-Protein-Interaktion die TA beider Proteine wichtig, die eine passende Konformation einnehmen müssen. Für ein tieferes Verständnis der Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren müssen in Zukunft jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.



## 5 Material

### 5.1 Organismen

#### 5.1.1 Bakterienstämme *E. coli*

Stamm	bezogen von	Referenz
BL21 DE3 pLysS	Stratagene, La Jolla/USA	Studier und Moffat, 1986
XL1 Blue Gold	Stratagene, La Jolla/USA	Bullock et al., 1987

Tabelle 5.1: Bakterienstämme *E. coli*

#### 5.1.2 Hefestämme

Stamm	Marker	Reportergene	Referenz
AH109	MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4delta, gal80delta LYS2::Gal1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3 GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2 URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> - lacZ	his3 ade2 lacZ mel1	James et al., 1996
Y187	MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2- 101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4delta, gal80delta, met- URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> - lacZ	lacZ mel1	Harper et al., 1993

Tabelle 5.2: Hefestämme

### 5.1.3 Zelllinien

Linie	Herkunft	Referenz
Neuro2A	Neuroblastom-Zelllinie aus Maus	<i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>
HEK293	Humane Embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney</i> )	<i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>
COS-7	Nierenzellen aus Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	<i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>

Tabelle 5.3: Zelllinien

## 5.2 Chemikalien und allgemeine Reagenzien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, allgemeine Reagenzien und Materialien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Für die Zellkultur benötigte Materialien, Medien und Puffersubstanzen wurden von den Firmen Gibco/BRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Renner (Darmstadt) erworben.

Enzyme wurden von Gibco/BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim) und Roche Diagnostics (Darmstadt) erhalten.

## 5.3 Medien und Lösungen

Für die Herstellung aller Puffer, Lösungen und Verdünnungen wurde ausschließlich Reinstwasser aus einer Deionisierungsanlage der Firma Millipore (Eschborn) mit einem spezifischen Widerstand von  $18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}^3$  verwendet.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x DNA-Probenpuffer	49,8 % TE; 50 % Glycerin; 0,1 % Xylencyanol; 0,1 % Bromphenolblau

10x HeBS	1,4 M NaCl; 50 mM KCl; 50 mM Glukose; 7,25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 210 mM HEPES; pH 7,2 (mit NaOH); steril filtriert
10x <i>Mobility Shift Puffer</i>	100 mM HEPES pH 7,9; 50 % Glyzerin; 500 mM NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM DTT; 1 mM EDTA
10x SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glyzin; 0,1 % SDS
10x TBE	880 mM Tris-Base; 880 mM Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8,3
10x W/B-Puffer	42 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,4 M NaCl; 100 mM KCl
1x PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,3
2x Puffer C-KCl	40 mM HEPES pH 7,9; 0,6 M KCl; 0,4 M EDTA
3x Lämmli-Puffer	150 mM Tris pH 6,8; 6 % SDS; 0,3 % Bromphenolblau; 30 % Glyzerin; 3 % β-Mercaptoethanol
5x Hypotoner Puffer	50 mM HEPES pH 7,9; 50 mM KCl; 0,5 mM 0,5 M EDTA
5x TENS	10 mM Tris; 1 mM EDTA; 0,1 M NaOH; 0,5% SDS
<i>Displacing Solution</i>	0,375 M Tris pH 8,8; 50 % Glyzerin; einige Körnchen Bromphenolblau
DTT-SDS-Äquilibrierungspuffer	10 mg/ml DTT; 50 mM Tris pH 8,8; 6 M Urea; 30 % Glyzerin; 2 % SDS; einige Körnchen Bromphenolblau
ECL-Lösung A	0,025 % Luminol; 0,1 M Tris pH 8,6
ECL-Lösung B	0,11 % Para-Hydroxy-Cumarinsäure in DMSO
Entwicklerlösung	3 % Na-Carbonat; 0,05 % Formaldehyd; 0,0005 % Na-Thiosulfat
Gel-Retardations-Puffer	10 mM HEPES pH 8,0; 2 mM DTT; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1mM EDTA; 25 mM NaCl; 5 % Glyzerin
Glasperlen-Aufbruchpuffer	20 mM Tris pH 7,9; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM EDTA; 5 % Glyzerin; 1 mM DTT; 0,3 mM Ammoniumsulfat; 1 mM PMSF; Protease-Inhibitor Mix (0,1 mg/ml Pepstatin A; 0,03 mM Leupeptin; 145 mM Benzamidin; 0,37 mg/ml Aprotinin)
Hefe-Lysis-Puffer	2 % Triton-X-100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA
Iodoacetamid-SDS-Äquilibrierungspuffer	25 mg/ml Iodoacetamid; 50 mM Tris pH 8,8; 6 M Urea; 30 % Glyzerin; 2 % SDS; einige Körnchen Bromphenolblau
LB-Agar	LB-Medium; 1,5 % Agar

LB-Medium	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefe-Extrakt; 0,5 % NaCl;
<i>Lower</i> -Tris	1,5 M Tris pH 8,8; 0,4 % SDS
Luziferase-Lysis-Puffer	88 mM Tris pH 7,8; 88 mM MES pH 7,8; 12,5 mM MgOAc; 1 mM DTT; 0,1 % Triton-X-100; 2,5 mM ATP
Mowiol	6g Glycerin und 2,4 g Mowiol 4-88 in 6 ml Wasser geben, 2 h bei RT inkubieren, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 zugeben, 24 h bei 54°C rotieren, bei 4000 Upm zentrifugieren
PBST	PBS mit 0,1 % Tween-20
PFA (4 %)	20 g Paraformaldehyd (PFA) in 300 ml H <sub>2</sub> O (65°C) gelöst; 50 ml 10x PBS; ad 500 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,4; steril filtriert
Puffer A	10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 mM EGTA; 2 mM DTT; 5 µg/ml Aprotinin; 5 µg/ml Leupeptin
Puffer B	Puffer A mit zusätzlich 1 % Nonidet P-40 <sup>®</sup> und 400 mM NaCl
S1	50 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/µl RNase A
S2	0,2 M NaOH; 1 % SDS
S3	3 M KAc pH 4,8
SD-Medium	0,17 % Yeast nitrogen base w/o aminoacids, 0,5 % Ammoniumsulfat, 2 % Agar, 2 % Glukose, Aminosäuren
SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris pH 8,3, 1,92 M Glyzin, 1 % SDS
Silbernitrat-Lösung	0,2 % Silbernitrat; 0,02 % Formaldehyd
Sonifizierungspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 1/1000 Leupeptin; 1/1000 Aprotinin; 1/750 DNase; 1/20.000 Lysozym
Stopreagenz	0,5 % Glyzin
TBE (1x)	90 mM Tris-Base; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,3
TB-Medium	Für 1 l 12 g Bactotrypton, 24 g Bacto Yeast und 0,4 % Glycerin mit Wasser auf 800 ml auffüllen, nach dem Autoklavieren 200 ml 0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> zugeben.
TE-Puffer (10/1)	10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 8,0
Thiosulfat-Reagenz	0,02 % Na-Thiosulfat
<i>Upper</i> -Tris	0,5 M Tris pH 6,8; 0,4 % SDS
Wassergesättigtes 1-Butanol	10 ml Wasser mit 25 ml 1-Butanol in einem 50 ml-Röhrchen kräftig schütteln, dann abstellen, bis sich die Phasen trennen. In

	der oberen Phase befindet sich nun das wassergesättigte 1-Butanol, in der unteren Phase Wasser.
Western-Transfer-Puffer	192 mM Glyzin; 25 mM Tris pH 8,3; 1 mM SDS; 20 % Methanol
YPD-Agar	2 % Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, 2 % Glukose, 2 % Agar
YPDA-Medium oder -Agar	YPD-Medium oder -Agar mit 0,003 % Adenin
YPD-Medium	2 % Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, 2 % Glukose
Z-Puffer/X-Gal-Färbelösung	Für 50 ml 50 ml Z-Puffer, 135 µl β-Mercaptoethanol und 835 µl X-Gal (40 mg/mg) mischen.
Z-Puffer/X-Gal-Lösung	Pro Liter 16,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 5,5g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 0,75 g KCl und 0,246 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O einwiegen, pH auf 7,0 einstellen.

Tabelle 5.4: Medien und Lösungen

## 5.4 Oligonukleotide für PCR und Gelshifts

### 5.4.1 Oligonukleotide für *overlap*-PCR

Name	Sequenz
Sx10-63 (S8A)	5' - G CAA GAC CTA GCA GAG GTG GAG CTG AGC -3'
Sx10-64 (S8A)	5' - G CTC CAC CTC TGC TAG GTC TTG CTC CTC -3'
Sx10-65 (S13A)	5' - G GTG GAG CTG GCC CCC GTG GGC TCG GAG -3'
Sx10-66 (S13A)	5' - A GCC CAC GGG GGC CAG CTC CAC CTC TGA -3'
Sx10-67 (S24A)	5' - T CGC TGC CTG GCC CCA AGC AGC GCG CCG -3'
Sx10-69 (S30A)	5' - C AGC GCG CCG GCG CTG GGA CCC GAC GGC -3'
Sx10-70 (S30A)	5' - C GGG TCC CAG CGC CGG CGC GCT GCT TGG -3'
Sx10-71 (S45A)	5' - C CTG CGA GCC GCC CCA GGG CCC GGC GAA -3'
Sx10-72 (S45A)	5' - C GGG CCC TGG GGC GGC TCG CAG GCC TGA -3'
Sx10-73 (S77A)	5' - C GAG GCG GTC GCC CAG GTG CTC AGC GGC -3'
Sx10-74 (S77A)	5' - T GAG CAC CTG GGC GAC CGC CTC GCG GAT -3'
Sx10-75 (S81A)	5' - C CAG GTG CTC GCC GGC TAC GAC TGG ACG -3'

Sx10-76 (S81A)	5' - A GTC GTA GCC CGG GAG CAC CTG GCT GAC -3'
Sx10-77 (S98A)	5' - C AAC GGT GCC GCC AAG AGC AAG CCG CAC -3'
Sx10-78 (S98A)	5' - G CTT GCT CTT GGC GGC ACC GTT GAC CCG -3'
Sx10-79 (S148A)	5' - G CTG AAC GAG GCG GAC AAG CGC CCC TTC -3'
Sx10-80 (S148A)	5' - G GCG CTT GTC CGC CTC GTT CAG CAA CCT -3'
Sx10-81 (Y171F)	5' - C CAT CCG GAC TTC AAG TAC CAA CCT CGG -3'
Sx10-82 (Y171F)	5' - G TTG GTA CTT GAA GTC CGG ATG GTC TTT -3'
Sx10-83 (S24A)	5' - C GCT GCT TGG GGC CAG GCA GCG AGG TTC -3'

Tabelle 5.5: Oligonukelotide für *overlap*-PCR

#### 5.4.2 PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der *baits* für *Yeast two-hybrid Screens*

Name	Sequenz
Sox8 bait A kurz rev	5' - GGC CTC GAG CTA GAG ATG CGG GTA CTG GTC C -3'
Sox8 bait B kurz fwd	5' - CAT GCC ATG GCG CAT CTC CAT AAC GCA G -3'
Sox8 bait B kurz rev	5' - GGC CTC GAA CTA ACT CTT CCT TCG CCT TGG - 3'
SRY bait A kurz fwd	5' - CAT GCC ATG GAG GAT AGA GTG AAG CGA CCC - 3'
SRY bait A kurz rev	5' - GGC CTC GAG CTA TCT GGG ATTC TCT AGA GCC -3'
SRY bait B kurz fwd	5' - CAT GCC ATG GGA ATG CGA AAC TCA GAG ATC AG -3'
SRY bait B kurz rev	5' - GGC CTC GAG CTA CCG ACG AGG TCG ATA CTT A -3'

Tabelle 5.6: PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der *baits* für *Yeast two-hybrid Screens*

### 5.4.3 PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der DNA-BD verschiedener Transkriptionsfaktoren

Name	Oligonukleotid
Oct3/4 POU's fwd	5' - CGC GGA TCC CCG AGG AGT CCC AGG -3'
Oct3/4 POU's rev	5' - CCG CTT AAG TGT CGG CTT CCT CCA CC -3'
bHLH REB f	5' - CGC GGA TCC AGG AAA GGC GGA TGG -3'
bHLH REB r	5' - CCG CTT AAG TTC TAG ACT AAG GAT GAC TGC -3'
bHLH Olig2 f	5' - CGC GGA TCC AGC TGC GCC TGA AGA TCA AC -3'
bHLH Olig2 r	5' - CCG CTT AAG GGT GAG CAT GAG GAT GTA GTT TC- 3'
bZIP c-Jun f	5' - CGC GGA TCC AGA TCC CGG TGC AG -3'
bZIP c-Jun rev	5' - CCG CTT AAG CCC ACT GTT AAC GTG GTT C -3'
bZIP C/EBP f	5' - CGC GGA TCC CGG TGG ATA AGA ACA GCA AC -3'
bZIP C/EBP r	5' - CCG CTT AAG GCT CTC AGG CAG CTG G -3'
Zn-F Krox20 f	5' - CGC GGA TCC CGT ACC CCT GCC CAG -3'
Zn-F Krox20 r	5' - CCG CTT AAG GTG GAT CTT GGT GTG GCG -3'
Zn-F Spl f	5' - CGC GGA TCC AGC ATA TTT GCC ACA TCC AAG -3'
Zn-F Spl r	5' - CCG CTT AAG GTG GGT CTT GAT ATG TTT TGA -3'
Zn-F hER fwd	5' - CGC GGA TCC CTC GCT ACT GTG CAG T -3'
Zn-F ER rev	5' - CCG CTT AAG GTC TTT TCG TAT CCC ACC -3'
Zn-F T3Rβ fwd	5' - CGC GGA TCC ACG AGC TCT TGT AGT G -3'
Zn-F T3Rβ rev	5' - CCG CTT AAG GTC ATC CAG CAC CAA ATC -3'
PB Pax3 f	5' - CGC GGA TCC TCG GCC AGG GCC G -3'
PB Pax3 r	5' - CCG CTT AAG CCT CAG GAT GCG ACT GAT GGA AC -3'

Tabelle 5.7: PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der DNA-BD verschiedener Transkriptionsfaktoren

### 5.4.4 PCR-Oligonukleotide zur Klonierung von DNA-BD für Gelshifts

Name	Sequenz
c/EBP bp370 fwd	5' - GGA TCC GGA CCC CCT CCC GG -3'

c/EBPbp1077 stp fwd	5' - GTC GAC TCA CGC GCA GTT GCC C -3'
Krox20 bp709 fwd	5' - GGA TCC GAT CCA CAT GGC GCG G -3'
Krx20bp1413 stp rev	5' - GTC GAC TCA CGG GGT CCT GGT CC -3'
Pax3 bp1 fwd	5' - GGA TCC ATG GCC CAT CTG CTG TAT CC -3'
Pax3bp1001 stop rev	5' - GTC GAC TTA GGC GGT GGG AGG GAA TC -3'
Pax6 bp1 fwd	5' - CGC GGA TCC ATG CAG AAC AGT CAC AGC GG - 3'
Pax6 bp879 stop rev	5' - ACG CGT CGA TTA GGT GCT GAA ACT ACT GCT GAT AG -3'
Sp1 bp1468 fwd	5' - GTC GAC GTT TCC TTG GGG CAG ACC -3'
Sp1 bp2358 stop rev	5' - GCG GCC GCT CAG AAG CCA TTG CCA CTG -3'

Tabelle 5.8: PCR-Oligonukleotide zur Klonierung der DNA-BD und umgebender Stücke für Gelshifts

### 5.4.5 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Name	Sequenz
CMV	5' - AGG TCT ATA TAG CAG AGC TC -3'
CMV-F	5' - CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG -3'
GST-Seq	5' - CAA TGT GCC TGG ATG CGT TC -3'
M13 universal	5' - GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'
pGAD10-F	5' - TAC CAC TAC AAT GGA TGA TG -3'
pGEX-rev, GEX-R	5' - GAG CTG CAT GTG TCA GAG G -3'
Sp6	5' - GAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3'
Sx10-12	5' - TGC TGA ACG AGA GTG ACA AGC -3'
Sx10-13	5' - CAG CGT CCA GTC GTA GCC G -3'
Sx10-58	5' - TAG GAT CCC TAT GCC TCC CCC TGG GCT GC -3'
T3	5' - AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA -3'
T7 prom	5' - GTA ATA CGA CTC ACT ATA G -3'
VP1	5' - GAG TTT GAG CAG ATG TTT AC -3'

Tabelle 5.9: Oligonukleotide zur Sequenzierung

### 5.4.6 Oligonukleotide für Gelshifts

Name	Sequenz
MBP fwd	5' - GGG CCT CGC ACA GGC CCA CAT TCA TAT CTC ATT GTT GTT GC -3'
MBP rev	5' - C CCG TTG TTG TTA CTC TAT ACT TAC ACC CGG ACA CGC TCC -3'
P0 fwd	5' - GGG GTA TAC ACA AAG CCC TCT GTG TAA GGG GTG GTA TGT GTC C -3'
P0 rev	5' - C CCC CTG TGT ATG GTG GGG AAT GTG TCT CCC GAA ACA CAT ATG -3'
Trp2 fwd	5' - GGG GAA GTA CTT AGC AAT GCA CAG GTC TAT AAA GGG CCT TTG ACG GAA T -3'
Trp2 rev	5' - C CCT AAG GCA GTT TCC GGG AAA TAT CTG GAC ACG TAA CGA TTC ATG AAG -3'

Tabelle 5.10: Oligonukleotide für Gelshifts

### 5.4.7 Oligonukleotide zur Mutagenese von Sox10 (Ratte)

Name	Oligonukleotid
m1_sx10_R75E_fwd	5' - CGG ACT ACA AGT ACC AAC CTG AGC GGC GGA AGA ATG GGA AGG -3'
m1_sx10_R75E_rev	5' - CCT TCC CAT TCT TCC GCC GCT CAG GTT GGT ACT TGT AGT CCG -3'
m3_sx10_R60E_fwd	5' - GAG GAG GCC GAG CGG CTC GAG ATG CAG CAC AAA AAA G-3'
m3_sx10_R75E_rev	5' - CTT TTT TGT GCT GCA TCT CGA GCC GCT CGG CCT CCT C -3'
m3_sx10_R60E_ K64E_fw	5' - GCG GCT CGA GAT GCA GCA CGA AAA AGA CCA TCC GGA CTA C-3'
m3_sx10_R60E_ K64E_re	5' - GTA GTC CGG ATG GTC TTT TTC GTG CTG CAT CTC GAG CCG C-3'

Tabelle 5.11: Oligonukleotide zur Mutagenese von Sox10 (Ratte)

## 5.5 Antikörper

### 5.5.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezeichnung	bezogen von
$\alpha$ -Sox10	Kaninchen Antiserum	1:3000	$\alpha$ -Sox10, 3°	K. Kuhlbrodt/ Eurogentec
$\alpha$ -Sox10	Maus Monoklonal	1:100	SoxE	M. Wegner
$\alpha$ -T7	Maus monoklonal	1:10.000	$\alpha$ -T7	Novagen (Merck, Darmstadt)

Tabelle 5.12: Primärantikörper

### 5.5.2 Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Bezeichnung	bezogen von
$\alpha$ -Maus	Ziege	Cy3- Farbstoff	1:200	gout $\alpha$ mouse Cy3	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Maus	Ziege	HRP	1:10.000	gout $\alpha$ mouse HRP	BioRad, München
ProteinA	/	HRP	1:3000	Prot A HRP	BioRad, München

Tabelle 5.13: Sekundärantikörper

## 6 Methoden

### 6.1 Nukleinsäuremethoden

#### 6.1.1 Standardmethoden

Standardmethoden wie die Isolierung von Plasmid-DNA in analytischem und präparativem Maßstab, Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Hybridisierung von (synthetischen) Oligonukleotiden, Gelelektrophorese von Nukleinsäuren, Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen, Restriktionsspaltung von DNA-Fragmenten und Transformation in *E. coli* wurden allgemeinen Laborhandbüchern entnommen (Ausubel et al., 1993; Sambrook et al., 1989).

#### 6.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### 6.1.2.1 Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Reaktionsansätze zur Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR (*polymerase chain reaction*) setzten sich wie folgt zusammen:

2 µl Matrizen-DNA  
2 µl 10x Reaktionspuffer  
1 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM)  
1 µl *forward*-Primer (40 pmol/µl)  
1 µl *reverse*-Primer (40 pmol/µl)  
0,3 µl DeepVent-Polymerase  
12,7 µl H<sub>2</sub>O

Die Proben wurden in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) für vier min bei 95°C denaturiert und durchliefen 25 bis 30 Zyklen von Denaturierung (95°C, 30 sec), *Annealing* (30 sec bei geeigneter Temperatur) und Elongation (72°C, 30 sec). Um die Verlängerung aller

DNA-Fragmente sicherzustellen, wurde der Ansatz zum Abschluss für vier min bei 72°C inkubiert und schließlich auf 4°C abgekühlt. Die auf diese Weise hergestellten DNA-Fragmente konnten nach Restriktionsverdau in den gewünschten Vektor kloniert werden.

#### 6.1.2.1 Gezielte Mutagenese: *overlap*-PCR und site-directed mutagenesis

Zur Einführung gezielter Mutationen in Plasmid-DNA wurde entweder der „QuikChange<sup>®</sup>XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet, oder eine *overlap*-PCR durchgeführt. Die Mutagenese mit Hilfe des Stratagene-Kits erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers:

2,5 µl Reaktions-Puffer  
5 ng Template-DNA  
62,5 ng Primer 1  
62,5 ng Primer 2  
0,5 µl dNTPs  
1,5 µl QuikSolution  
@ 25µl H<sub>2</sub>O  
+ 0,5 µl PfuTurbo DNA Polymerase

Die PCR-Parameter entsprachen den Herstellerangaben; die Amplifikation erfolgte für acht Minuten.

Die *overlap*-PCR bestand aus zwei PCR-Teilschritten. Im ersten Schritt wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen mit jeweils einem Mutagenese-Primer und einem außerhalb der Mutagenese-Region liegenden Primer durchgeführt. Als *template*-DNA diente jeweils die zu mutierende Plasmid-DNA. Anschließend wurden die beiden Produkte aus dem ersten Schritt in einer *Annealing*-Reaktion hybridisiert. Im zweiten Schritt erfolgte dann eine PCR mit den beiden äußeren Primern, wobei als *template*-DNA das *Annealing*-Produkt verwendet wurde. Die *overlap*-PCR-Reaktionen wurden bei entsprechenden *Annealing*-Temperaturen mit 15 Zyklen durchgeführt.

### 6.1.3 Radioaktive Markierung von DNA

Um Oligonukleotide für den Einsatz im Gelshift radioaktiv zu markieren, wurden deren G-haltige 5'-Überhänge durch Klenow-Polymerase aufgefüllt. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µl Oligonukleotid (50 ng/µl)  
0,5 µl dATP (10mM)  
0,5 µl dGTP (10mM)  
0,5 µl dTTP (10mM)  
2,5 µl 10x Reaktionspuffer 2 (Gibco/BRL, Eggenstein)  
1,25 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (25 µCi)  
0,5 µl Klenow-Enzym (2,5 U/µl)  
18,25 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde eine Stunde bei RT inkubiert und zum Abstoppen der Reaktion und zur Abtrennung der freien (radioaktiven) Nukleotide durch *mini Quick Spin* Sephadex-Säulchen (Roche Diagnostics, Mannheim) zentrifugiert. 1 µl der Sonde wurden im Szintillationszähler (Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer) vermessen.

## 6.2 Zellkulturmethoden

### 6.2.1 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

Für die transiente Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurden COS- (Affennieren-Zelllinie), HEK 293- (embryonale Nieren-Zelllinie) und N2A- (Neuroblastom-Zelllinie) Zellen verwendet. Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert und je nach Zelllinie alle drei bis fünf Tage 1:3 bis 1:10 verdünnt (gesplittet). Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurde Trypsin-EDTA (Gibco/BRL, Eggenstein) verwendet. Die Inkubation der Zellkulturplatten erfolgte bei 37°C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### **6.2.1.1 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen durch Calciumphosphat-Präzipitation**

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen auf 9 cm Zellkulturplatten ausgesät (Renner, Darmstadt). Zur Herstellung des Calciumphosphat-DNA-Präzipitats wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 10 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  gemischt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 125 µl aufgefüllt. Unter Vortexen wurde tropfenweise 125 µl 2x HeBS pH 7,0 zugetropft und das Gemisch 30 min bei RT stehen gelassen. Während dieser Zeit bildete sich das Präzipitat aus. Das Gemisch wurde zu den Zellen ins Medium gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h im Brutschrank wurden 75 µl Chloroquin zugegeben und erneut 2 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium versetzt. Die transfizierten Zellen wurden nach 48 h zur Herstellung von Zellextrakten geerntet.

### **6.2.1.2 Transiente Transfektion von COS-Zellen mit DEAE-Dextran**

COS-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen auf 9 cm Zellkulturplatten ausgesät (Renner, Darmstadt). Zur Transfektion wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 187 µl PBS und 375 µl DEAE-Dextran (10 mg/ml) gemischt, zu den Zellen ins Medium gegeben und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt und durch neues ersetzt, dem 75 µl Chloroquin zugesetzt wurden. Nach weiteren 2 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel, in dem die Zellen für weitere 48 h bis zur Ernte kultiviert wurden.

### **6.2.1.3 Transiente Transfektion von N2A-Zellen mit SuperFect**

Für Luziferase-Aktivitätstests wurden N2A-Zellen mit SuperFect (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers in 24-well-Platten transfiziert. Ab der Transfektion wurden die Zellen 4 h in DMEM mit 5 % FKS kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM mit 10 % FKS. Die mit den entsprechenden Mengen Luziferase-Reporter- und Effektor-Plasmid transfizierten Zellen wurden nach 48 h für Luziferase-Aktivitätstests geerntet.

## 6.2.2 Luziferase-Aktivitätstests

Nach Absaugen des Mediums von den Zellen wurden pro *well* (24-*well*-Platten) 200 µl Luziferase-Lysis-Puffer zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden je 150 µl der Zellextrakte in ein Luminometerröhrchen überführt. Die Messung erfolgte mit dem Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold, Bad Wildbach) und 0,5 mM Luziferin (Serva, Heidelberg) in 5 mM Kaliumphosphat, pH 7,8. Nach automatischer Injektion von 100 µl Luziferinlösung konnten die relativen Lichteinheiten direkt abgelesen werden.

## 6.3 Proteinanalytische Methoden

### 6.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung proteinhaltiger Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dabei wurden 800 µl 1x PBS mit 10 µl der zu analysierenden Proteinlösung versetzt und anschließend 200 µl Protein-Färbereagenz (Biorad, München) zugegeben. Nach gutem Mischen wurde der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert. Aus der Extinktionsmessung bei 595 nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgerade berechnet werden.

### 6.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

Zur Herstellung von Kernextrakten wurden die Zellen zuerst zweimal mit 1x PBS gewaschen, bevor pro 10 cm Zellkulturplatte 300 µl kalter Puffer A zugegeben wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellkulturspatels abgeschabt und mit dem Puffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zu den geernteten Zellen wurden 30 µl 20 % Nonidet P-40<sup>®</sup> zugegeben, der Ansatz für 10 sec gevortext und anschließend 30 sec bei 4°C mit 14.000 Upm zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in 150 µl Puffer B resuspendiert und für 15 min bei 4°C unter Rotation extrahiert, wohingegen der Überstand als cytoplasmatischer Proteinextrakt verwendet werden konnte. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 4°C, 14.000 Upm) wurde

der Überstand als Kernextrakt abgenommen und zur Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu einer Endkonzentration von 10 % mit Glycerin versetzt.

Die Herstellung von Gesamtzellextrakten erfolgte bis zur Zugabe von Nonidet P-40<sup>®</sup> analog. Nach Vortexen wurden 20  $\mu\text{l}$  5M NaCl zugegeben und nochmals 10 sek gevortext. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert und 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 14.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand war der Gesamtzellextrakt.

Für die Herstellung von Kernextrakten für die Phosphorylierungsexperimente wurden die Zellen zweimal mit je 8 ml 1x PBS gewaschen, dann pro 10 cm-Platte 500  $\mu\text{l}$  hypotoner Puffer mit oder ohne Phosphatase-Inhibitoren zugegeben und 5 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und in einen Glaskolben mit Stößel überführt, wo sie durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch die Scherkräfte aufgebrochen wurden. Die Extrakte von je zwei Platten wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 30 sek bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50  $\mu\text{l}$  Puffer C-KCl mit oder ohne Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen und für 1,5 h rotiert. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min wurde der Überstand als Kernextrakt abgenommen. Alle Schritte wurden im Kühlraum bei  $4^{\circ}\text{C}$  ausgeführt.

### **6.3.3 Immunchemischer Nachweis von Proteinen**

#### **6.3.3.1 Elektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe wurden denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Sie setzten sich aus einem Trenngel mit an die Proteingröße angepasster Prozentigkeit und einem Sammelgel aus 5 % Polyacrylamid zusammen (Laemmli, 1970). Zum Gießen der Gele und für die Elektrophorese wurden Mini-PROTEAN 3-Apparaturen oder Minigel-Twin-Apparaturen (Biorad, München) verwendet. Die Lösung für das Trenngel wurden analog Tabelle 6.1 zusammenpipettiert, in die Apparatur gegossen und zur Ausbildung einer geraden Oberfläche mit Wasser oder Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit Sammelgel-Lösung überschichtet. Zum Auftragen wurden die Proben in 3x Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120V und wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Front die untere Grenze des Gels erreicht hatte und auszulaufen begann.

Trenngel	10 %	12 %	Sammelgel	5 %
PAA 40 %	3 ml	3,75 ml	PAA 40 %	850 µl
Lower Tris	3 ml	3 ml	Upper Tris	1,25 ml
Wasser	6 ml	5,25 ml	Wasser	3 ml
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	4 µl
APS 20 %	45 µl	45 µl	APS 20 %	10 µl

Tabelle 6.1: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen

### 6.3.3.2 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Für den Transfer von Proteinen aus einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA 85, Schleicher & Schuell, Dassel) wurde die *Semi-Dry* Transfer-Methode angewandt. Dazu wurde entweder eine Graphit-Blot-Apparatur (Pharmacia LKB NovaBlot) oder eine Fastblot B 44-Apparatur (Biometra) verwendet. Auf die Gelgröße zugeschnittene Whatman 3MM Papiere (Whatman, Maidstone, USA) und die Nitrozellulosemembran wurden in Western-Transferpuffer getränkt. Anschließend wurden zuerst zwei Whatman-Papiere, dann die Membran, darauf das Gel und zum Schluß nochmals zwei Whatman-Papiere auf die Blot-Apparatur gelegt, so dass die Membran zur Anode hin orientiert war. Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 1 h bei 200 mA / 90 V bzw. 270 mA für 30 min.

### 6.3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese mit 5 % Magermilchpulver in PBST für 1h abgesättigt. Alle Schritte erfolgten bei RT. Nach kurzem Waschen mit PBST erfolgte die Zugabe des entsprechend in PBST verdünnten Primärantikörpers, der gegen das Zielprotein gerichtet war. Dieser Inkubationsschritt erfolgte ebenfalls für 1 h. Dann wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 5 min in PBST gewaschen und anschließend mit dem in PBST entsprechend verdünnten Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 5 min wurde der Protein-Antikörper-Komplex mit ECL-Reagenz detektiert. Nach der Inkubation mit dem Reagenz wurde ein Röntgenfilm (Fuji Super RX) auf die Membran aufgelegt und anschließend mit dem Filmentwickler entwickelt.

### 6.3.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in Zellen

Dazu wurden bei der Aussaat von COS-Zellen Deckgläschen in die Zellkultur-Schalen gelegt, auf denen sich die Zellen absetzten.

Die Deckgläschen mit den Zellen wurden dreimal mit 1x PBS gespült und dann 20 min in 3 % PFA fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen 5 min mit 100 mM NH<sub>4</sub>Cl pH 8,0 in 1x PBS inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1x PBS. Die Zellen wurden dann 4 min mit 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS permeabilisiert, und anschließend nochmals dreimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Absättigung wurde dann mit 1 h mit 1 % BSA, 10 % FKS in 1x PBS blockiert, bevor der erste Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in 1 % BSA, 10 % FKS in 1x PBS für 1 h zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln. Nach fünf- bis sechsmaligem Waschen mit 1x PBS für insgesamt 20 min wurde der Sekundärantikörper zugegeben, ebenfalls in 1 % BSA, 10 % FKS in 1x PBS verdünnt und im Dunkeln inkubiert. Die Inkubation wurde nach 1 h beendet und die Zellen nochmals fünfmal mit 1x PBS und dann ein letztes Mal mit 1x PBS mit DAPI gewaschen. Das Einbetten auf Objektträger erfolgte mit Mowiol. Die Objektträger wurden dunkel bei 4°C aufbewahrt.

## 6.3.4 Detektion von Protein-DNA-Komplexen

### 6.3.4.1 Gelshifts

Zur Detektion von Protein-DNA-Komplexen im Gelshift wurden 4-5 %ige native Polyacrylamidgele verwendet. Dazu wurden die Reagenzien gemischt und zum Polymerisieren in eine Vertikal-Gelapparatur gegossen (12 x 11 x 0,1 cm<sup>3</sup>). Nachdem die Polymerisation beendet war, wurde das Gel für 1,5 h bei 110V in 0,5x TBE-Puffer vorelektrophoretisiert.

In der Zwischenzeit erfolgte die Probenvorbereitung:

2 µl 10x Mobility Shift Puffer  
1 µl DTT (100 mM)  
2,5 µl BSA (1,4 µg/µl)  
2 µl poly-dGdC (0,5 µg/µl)  
2 µl Oligonukleotid (20.000 cpm)  
je 2 µl Proteinextrakt; @ 20 µl H<sub>2</sub>O

Die Proben wurden auf Eis zusammenpipettiert und dann 30 min auf Eis inkubiert. Zum Auftragen wurden den Ansätzen je 2  $\mu\text{l}$  DNA-Ladepuffer für Gelshifts zugegeben. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 V für ca. 1,5 h. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3MM-Papier (Whatman, Maidstone, USA) auf einem Vakuum-Geltrockner bei 80°C für 1 h getrocknet. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Fuji Super RX) aufgelegt und das Gel  $\ddot{u}\text{N}$  bei RT exponiert.

Für die Phosphorylierungsexperimente wurden neben 0,5  $\mu\text{l}$  1 M DTT, 1  $\mu\text{l}$  10x MSP, 1  $\mu\text{l}$  0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dGdC und 1,25  $\mu\text{l}$  1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA zu den Proben, in denen der Phosphorylierungsstatus der Kernproteine erhalten werden sollte, noch ein Phosphatase-Inhibitoren-Mix, bestehend aus 0,46  $\mu\text{l}$  1 M NaF, 0,46  $\mu\text{l}$  0,2 M  $\text{NaVO}_3$ , 0,02  $\mu\text{l}$  0,1 M PMSF und 0,37  $\mu\text{l}$  0,5M  $\beta$ -Glycerophosphat, zugegeben. Zu allen auf 8  $\mu\text{l}$  aufgefüllten Proben wurde 1  $\mu\text{l}$  Kernextrakt (mit oder ohne Phosphatase-Inhibitoren) und gegebenenfalls 1  $\mu\text{l}$   $\lambda$ -Phosphatase (20 U/ $\mu\text{l}$ ) gegeben und die Proben bei 30°C 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend 10 min auf Eis abgestoppt, bevor 1  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid zugegeben wurde. Nach Inkubation für 20 min auf Eis wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

### 6.3.4.2 2D-Gele

#### 6.3.4.2.1 Vorbereitung der Proteinextrakte

Die Herstellung von Proteinextrakten erfolgte wie unter Punkt 6.3.2. Dann wurden 1/100 Vol RNase und DNase zugegeben und  $\ddot{u}\text{N}$  bei 4°C inkubiert. Nach einer Dialyse von 14 h in 5 Litern autoklaviertem deionisiertem Wasser wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test (Abschnitt 6.3.1) gemessen und das Protein im Western-Blot detektiert.

Zu 500  $\mu\text{l}$  Proteinlösung mit einer Konzentration von 1,41  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  wurden mit 480 mg Urea, 195,6 mg Thiourea und 20  $\mu\text{l}$  Triton-X-100 versetzt und die Chemikalien durch Invertieren gelöst. Das Endvolumen betrug 1 ml. Für einen Ansatz wurden 480  $\mu\text{l}$  verwendet.

#### 6.3.4.2.2 Rehydrierung der IPG-Streifen

Die vorbehandelte Proteinlösung wurde in die Reservoir-Spur der Trägerplatte eingefüllt und der auf -20°C vorgekühlte IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten auf die Lösung gelegt. Anschließend wurde mit 4 ml *Cover-Fluid* überschichtet. Die Rehydrierung erfolgte bei RT für 12-18 h.

### 6.3.4.2.3 Isoelektrische Fokussierung

Der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach oben in die Streifenhalter überführt. Zwei Streifen Whatman-Papier wurden kurz in 10 mM DTT äquilibriert, leicht getrocknet und an die Enden des IPG-Streifens gelegt. Daran wurden die Anoden- und Kathodenklemmen angebracht. Der IPG-Streifen wurde mit 1,5 ml *DryStrip Cover Fluid* überschichtet, der Deckel aufgelegt und die Anzahl der Proben eingestellt. Anschließend wurde das Programm so gewählt, dass insgesamt 80.000 bis 85.000 Voltstunden erreicht wurden.

<i>Step and Hold</i>	200V	1 h
Gradient	1000V	1 h
<i>Step and Hold</i>	1000V	1 h
Gradient	4500 V	2 h
<i>Step and Hold</i>	4500 V	ca. 16 h

### 6.3.4.2.4 SDS-Gele

Die Reagenzien für das PAA-Gel ohne TEMED und APS wurden nach Tabelle 6.2 in einem Becherglas zusammengeschüttet und auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde die *Displacing Solution* hergestellt. Nach dem Zusammenbau der Apparatur (Folie, *Spacer*-Platte, Glasplatten, Folien) und der Abdichtung mit Vaseline wurde mit Hilfe eines Trichters die *Displacing Solution* in das Kästchen eingefüllt. Zu der PAA-Lösung wurde TEMED und APS zugesetzt, kurz gemischt und sofort durch den Trichter bis etwa 3 mm unter den Rand gegossen. Durch Ziehen des Trichters floss *Displacing Solution* nach. Die Gele wurden mit wassergesättigtem 1-Butanol überschichtet und für eine Stunde auspolymerisiert.

<b>Chemikalien</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>
<b>Rotiphenol PAA 40 %</b>	33,3 ml	41,7 ml
<b>4x resolving gel buffer</b>	25 ml	25 ml
<b>20 % SDS</b>	0,5 ml	0,5 ml
<b>deionisiertes Wasser</b>	40,2 ml	31,8 ml
<b>10 % APS</b>	0,5 ml	0,5 ml
<b>TEMED</b>	33 µl	33 µl
<b>Endvolumen</b>	100 ml	100 ml

Tabelle 6.2: Zusammensetzung von 2D-Gelen

#### 6.3.4.2.5 Vorbereitung für SDS-PAGE

Der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach oben in ein Röhrchen gelegt und mit 10 ml DTT-SDS-Äquilibrationpuffer 15 min auf der Wippe inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und der Streifen dann 15 min in 10 ml Iodoacetamid-SDS-Äquilibrationpuffer inkubiert. Danach wurde der IPG-Streifen mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer gewaschen und auf das Gel gelegt. Zur Überschichtung des Streifens wurde ein mit Bromphenoblau gefärbtes 0,8 %iges Agarose-SDS-Elektrophoresepuffer-Gemisch verwendet.

#### 6.3.4.2.6 SDS-PAGE

Die Kammer wurde mit den Gelen bestückt und mit 950 ml 10x SDS-Elektrophoresepuffer und VE-Wasser auf 9,5 Liter aufgefüllt. Der Deckel wurde aufgesetzt und die Pumpe angeschaltet. Die Elektrophorese erfolgte mit 5 Watt pro Gel für 1 h und dann mit 100 Watt für 6 h.

#### 6.3.4.2.7 Silbernitratfärbung

Das Gel wurde für mindestens 1 h in Fixierreagenz inkubiert und anschließend zweimal 20 min in 30 % Ethanol und einmal 20 min in destilliertem Wasser gewaschen. Nach einer einminütigen Inkubation mit Thiosulfatreagenz wurde dreimal 20 sek mit deionisiertem Wasser gewaschen, bevor das Gel für 20 min in Silbernitratlösung gefärbt wurde. Nach nochmaligem Waschen für dreimal 20 sek wurde das Gel für drei bis fünf min in Entwicklerlösung inkubiert, bevor die Reaktion nach nochmaligem Waschen für 20 sek mit deionisiertem Wasser in Stopreagenz abgebrochen wurde. An diesen fünfminütigen Schritt schloss sich noch dreimaliges Waschen mit deionisiertem Wasser für jeweils 10 Minuten an.

## 6.4 Bakterielle Expression von Genen

### 6.4.1 Synthese und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Ein für das GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsprotein kodierender induzierbarer Expressionsvektor (pGEX-KG) wurde in einen geeigneten *E. coli*-Stamm (BL21 DE3 pLysS) transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Einzelklone wurden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) üN bei 37°C geschüttelt. Am nächsten

Morgen wurde die Vorkultur zu 200 ml TB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37°C geschüttelt. Sobald die passende optische Dichte erreicht war, wurden der Kultur zur Induktion der Genexpression IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt und diese für weitere 4 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 4°C mit 6.000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge RC 5B Plus, Rotor SLA 1500, Sorvall) und das Pellet in 4 ml Sonifizierungspuffer resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde zur Lyse der Zellen zusätzlich sechsmal für je 10 sec auf Eis sonifiziert. Dem Lysat wurde anschließend Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugesetzt und für 45 min bei 4°C und 9.500 Upm zentrifugiert (Zentrifuge RC 5B Plus, Rotor SS-34, Sorvall). In der Zwischenzeit wurden 100 µl Glutathion-Sepharose 4B (50% v/v, Amersham) dreimal mit je 1 ml 1x W/B-Puffer gespült und die Sepharose dann bei 2000 Upm bei 4°C 4 min abzentrifugiert. Zu der gewaschenen Glutathion-Sepharose wurde der Überstand des Bakterienlysats gegeben und der Ansatz für 2 h bei 4°C rotiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4°C, 4000 Upm) wurde dreimal mit 1x W/B-Puffer gewaschen. Die Sepharose mit dem daran gekoppelten GST-Fusionsprotein wurde in 1 ml 1x W/B-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -80°C

#### **6.4.2 GST-Pulldown-Studien**

Für die GST-Pulldown-Studien wurden an Sepharose gekoppelte GST-Fusionsproteine mit einem Zehntel Gesamtzellextrakt von einer 10 cm-Platte in 1x W/B-Puffer für 2 h bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C mit 2000 Upm wurden die Proteine dreimal vorsichtig mit 1x W/B-Puffer gewaschen und danach wieder wie oben abzentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet aus Sepharose und daran gebundenen interagierenden Proteinen in 10 µl 1x W/B-Puffer aufgenommen, mit 5 µl 3x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden auf SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und mittels Western-Blot auf Nitrozellulose übertragen. Der Nachweis der gebundenen Proteine erfolgte immunchemisch.

## 6.5 Methoden zur Arbeit mit Hefezellen

### 6.5.1 Transformation von Hefezellen mit Lithiumacetat in kleinem Maßstab

Zur Transformation von Hefezellen wurden Einzelkolonien von Platten gepickt und für ein bis zwei Tage bei 30°C in Selektionsmedium angezogen. Die Kultur wurde dann auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in Vollmedium überimpft und bis zu einer optischen Dichte von 1,0 inkubiert. Pro Transformation wurden 5 OD Zellen abzentrifugiert (5 min, RT, 1000 Upm), das Pellet in H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1x Lithiumacetat gelöst, erneut abzentrifugiert und dann pro Transformation 240 µl PEG, 36 µl 10x Lithiumacetat, 70 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Carrier-DNA zugegeben. Das Pellet wurde in den Reagenzien gelöst und anschließend 0,1 µg DNA zugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt von 30 min bei 30°C und 800 Upm im Thermomixer. Dann wurden 75 µl DMSO zugegeben und die Proben 15 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, bevor sie auf Eis abgekühlt wurden. Die Zellen wurden pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 150 µl H<sub>2</sub>O gelöst und die Zellen dann auf Selektionsmedium ausplattiert.

### 6.5.2 Transformation von Hefezellen im *Screen*-Maßstab

200 ml Kultur in Selektionsmedium wurden üN bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in Vollmedium überimpft und bis zu einer optischen Dichte von 1,0 inkubiert. Die Kultur wurde in 50 ml-Röhrchen überführt und nach Pelletierung einmal mit H<sub>2</sub>O und einmal mit TE/Lithiumacetat gewaschen. Dazwischen wurde immer 5 min bei RT mit 1000 g abzentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in 3 ml TE/Lithiumacetat resuspendiert. Die Transformation erfolgte mit 30 µg cDNA-Bank, 300 µl Carrier-DNA und 36 ml PEG/Lithiumacetat/TE. Die Zellen wurden gevortext und dann 30 min bei 30°C mit 800 Upm geschüttelt, bevor 2,1 ml DMSO zugegeben wurde. Danach wurden die Hefen 15 min bei 42°C inkubiert, wobei sie dreimal zum Mischen umgedreht wurden. Es folgten 5 min Abkühlung auf Eis und Pelletierung bei fünfminütiger Zentrifugation bei RT mit 1000 g. Das Pellet wurde mit 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, erneut zentrifugiert und die Hefen dann in 6 ml TE aufgenommen, bevor sie auf die Selektionsplatten ausgebracht wurden.

### 6.5.3 Herstellung von Carrier-DNA für Hefetransformationen

10 mg/ml Heringssperma-DNA wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und 10 min in Intervallen zu 30 sec sonifiziert. Dazwischen wurde die Probe auf Eis gestellt. Dann wurde das Gemisch 10x mit einer Spritze aufgezogen, 1/15 Vol 5M NaCl und 2,5 Vol 96% Ethanol zugegeben und 5 min bei maximaler Drehzahl in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1x TE aufgenommen und für 10 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Die DNA wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 6.5.4 Plasmidisolierung aus Hefezellen

Von jedem bei den *Screens* isolierten Kandidaten wurden 5 ml Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und ein bis zwei Tage bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 5 min bei RT mit 1000 g pelletiert und das Pellet nach Abkippen der Überstands in der restlichen Flüssigkeit gelöst. Nach Überführen in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 200 µl Hefe-Lysis-Puffer und 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zusammen mit 0,3 g Glasperlen (Sigma *acid-washed glass beads* 425-600 microns) zugegeben und die Proben für 2 min gevortext. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei RT mit 14.000 Upm. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo 1/10 Vol 3M NaOAc pH 5,2 und 2,5 Vol 99% EtOH zur Präzipitation der DNA zugegeben wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet in 70% EtOH gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 6.5.5 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Hefen wurden Einzelkolonien von Platten in Vollmedium angeimpft und üN bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur abzentrifugiert (5 min, 4°C, 1500 g), der Überstand verworfen und das Gewicht des Pellets gemessen. Dies entsprach 1 Vol. Das Pellet wurde in 3 Vol eiskaltem Wasser gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 3 Vol Glasperlen-Aufbruchpuffer gelöst und 4 Vol Glasperlen (Sigma *acid-washed glass beads* 425-600 microns) zugegeben, bevor fünfmal 1 min gevortext wurde. Dazwischen wurden die Proben

auf Eis gestellt. Pro 100  $\mu\text{l}$  Vol wurden dann 1  $\mu\text{l}$  PMSF zugegeben. Nach dem Absetzen der Glaskugeln wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen gekippt und zu den Glaskugeln nochmals 3 Vol Glasperlen-Aufbruchpuffer gegeben, gemischt und der Überstand nach Absetzen der Glasperlen ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einer Zentrifugation von 1 h bei 4°C und 10.000 g konnte der Überstand abgenommen und aliquotiert werden. Die Aufbewahrung des Rohextrakts erfolgte mit 10 % Glycerin bei -80°C

### **6.5.6 Filterlift-Test**

Für Filterlift-Tests wurden zu untersuchende Einzelkolonien auf neue Platten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen und mindestens drei Tage bei 30°C inkubiert, so dass die Kolonien dick angewachsen waren. Auf die Platten wurde dann ein zurechtgeschnittenes Stück Nitrozellulosemembran (Protran BA 85, Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt, mit der flachen Seite einer Pinzette kräftig angedrückt, so dass die Hefen auf der Vorderseite an der Membran hängen blieben, und diese dann für 30 sek in flüssigen Stickstoff gelegt. Dies führt dazu, dass die Hefezellen aufbrechen. Die Membran wurde sofort anschließend mit den Hefen nach oben auf ein Whatman-Papier gleicher Größe gelegt, das mit 5 ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkt war, und üN inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Blaufärbung der Hefen dokumentiert werden.

### **6.5.7 Mating**

Jeder Hefestamm (AH109 bzw. Y187) wurde separat mit einem Plasmid transformiert. Von jedem Paarungstyp wurde eine Kolonie gepickt und zusammen mit dem entgegengesetzten Paarungstyp in ein Eppendorf-Gefäß mit 500  $\mu\text{l}$  YPD-Medium gegeben. Die Kultur wurde bei 200 Upm und 30°C üN inkubiert und dann auf geeignete Selektionsplatten ausgebracht.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
$\alpha$	anti; alpha
$\Delta$	Deletion
$\lambda$	lambda
$\mu$	Mikro ( $\times 10^{-6}$ )
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Adenin oder Adenosin; Ampere; Alanin
Abb.	Abbildung
ade	Adenin
AK	Antikörper
Alx	Aristaless
AMH	Anti-Müller-Hormon
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure(n)
ATC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	basische (Domäne)
BD	Bindedomäne(n)
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix (-Protein)
bp	Basenpaar(e)
Brn	Brain
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bZIP	basisches Leucinzipper (-Protein)
bzw.	beziehungsweise
c	zelleigen ( <i>cellular</i> )
C	Cytidin oder Cytosin; Cystein
ca.	circa
CBP	CREB-Bindeprotein ( <i>CREB binding protein</i> )
CD	Campomelische Dysplasie
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Bindeprotein ( <i>CCAAT/enhancer binding protein</i> )
cfu	<i>colony forming units</i>
CMV	Cytomegalovirus
Cntf	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
Col2a1	Kollagen Typ II $\alpha 1$ ( <i>collagen type II <math>\alpha 1</math></i> )
COS	Nierenzelllinie aus Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
cpm	gezählte Zerfälle pro min ( <i>counts per minute</i> )
CRE	<i>cyclic AMP response element</i>
CREB	CRE-Bindeprotein ( <i>CRE binding protein</i> )
c-ret	Tyrosinase-Kinase-Rezeptor

Csx	<i>cardiac specific homeobox</i>
CTE	C-terminale Verlängerung ( <i>C-terminal extension</i> )
C-terminal	Carboxyterminal
Cx	Connexin
Cy3	Carbocyan 3
D	Asparaginsäure
Da	Dalton (relative Masse)
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
DC	<i>delta crystallin</i>
dCTP	Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DEP	Disheveled, EGL-10, Pleckstrin
dGdC	<i>Polydeoxyguanylic-deoxycytidylic acid</i>
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
Dlx	<i>Distal-less homeobox</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DOM	<i>dominant megacolon</i>
dpc	Tag <i>post coitum</i> der Embryonalentwicklung ( <i>day post coitum</i> )
DSP	<i>dorsal repressor</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
E	Glutamat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraacetat
ER	Estrogenrezeptor
EtOH	Ethanol
Exd	Extradenticle
F	Phenylalanin
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FKS	Fötale Kälberserum
Fos	FBJ murines Osteosarkom-Virus
g	Gramm
G	Guanin oder Guanosin
gal	Galaktosidase
GATA-Protein	Protein, das an GATA-haltige DNA-Sequenzen bindet
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
H	Histidin
H <sub>2</sub> O	Wasser

Hcfc	<i>Host cell factor</i>
HeBS	HEPES, NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie ( <i>human embryonal kidney</i> )
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure
hER	Humaner Estrogenrezeptor
Hhex	<i>Hematopoietically expressed homeobox</i>
his	Histidin
HLH	<i>Helix-loop-Helix</i>
HMG	<i>high mobility group</i>
Hox	Homöobox
HRE	<i>hormone response element</i>
Hsp	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )
HTH	<i>Helix-turn-Helix</i>
IPG-Streifen	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-Galaktopyranosid
Jun	japanisch für 17
k	Kilo (x10 <sup>3</sup> )
K	Lysin
kb	Kilobasenpaar (e)
kDa	Kilo-Dalton (relative Masse)
Krox	Krüppel-box
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>
LB	<i>Luria broth</i>
LEF-1	<i>Lymphoid enhancer factor-1</i>
leu	Leucin
LHX	LIM-Homöobox
LIM	LIN-11, Islet1, MEC
m	Milli (x10 <sup>-3</sup> )
M	Molar; Methionin
m1, m2	Mutation 1 bzw. 2 (von Sox10)
Mad	<i>Max dimerization protein</i>
MAT	Paarungstyp ( <i>Mating type</i> )
Max	<i>Myc-associated X-factor</i>
MBP	Basisches Myelinprotein ( <i>myelin basic protein</i> )
mel	Melibiose
MeOH	Methanol
MES	2-N-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute(n)
Mitf	<i>Microphthalmia transcription factor</i>
MSP	Mobility Shift Puffer
Myc	Myelocytomatosis-Virus
MyoD	Myogener Faktor D
N	Asparagin
N2A	Neuroblastom-Zelllinie aus Maus

nACh	n-Acetylcholin
NES	Kernexportsignal ( <i>nuclear export signal</i> )
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
Nmi	<i>N-myc interacting protein</i>
N-terminal	Aminoterminal
Oct	Oktamer-Bindeprotein ( <i>octamer binding protein</i> )
OD	Optische Dichte
Olig	Oligodendrozytenspezifisches Protein
P	Prolin
P0	Myelin Protein Null
P2, P3	Palindromische Sequenzen mit 2 bzw. 3 dazwischenliegenden Basen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per, Arnt, Sim
Pax	<i>Paired box</i>
PB	<i>Paired-Box</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PBST	PBS mit Tween-20
Pbx	<i>Pre-B-Cell leukemia transcription factor</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PGC	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POU	Pit-2, Oct-1 oder Oct-2, Unc86
POU <sub>H</sub>	POU-Homöodomäne
POU <sub>S</sub>	POU-spezifische Domäne
Q	Glutamin
R	Arginin
RAG	<i>recombination activating gene</i>
REB	Ratten-Homolog des humanen E-box-Bindeproteins HEB
Ring	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SD-Medium	Synthetisches Selektionsmedium ( <i>synthetic dropout medium</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde (n)
SF	Steroidogener Faktor
sog.	sogenannt
Sox	Sry-box
Sp	<i>Specific protein</i>
SRA	<i>autosomal sex reversal</i>

Sry	<i>Sex determining region of Y chromosome</i>
SV	Simian-Virus
T	Thymin oder Thymidin; Threonin
T3R $\beta$	Thyroidhormonrezeptor $\beta$
TA	Transaktivierungsdomäne
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBE	Tris/Boratsäure/EDTA
TCF	<i>transcription factor</i>
TE	Tris-Puffer mit EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TFIIA	Transkriptionsfaktor IIA
TFIID	Transkriptionsfaktor IIID
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
trp	Tryptophan
Trp	<i>tyrosinase-related protein</i>
Tst	Testis
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaureat
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UBF	<i>upstream binding transcription factor</i>
Ubx	Ultrabithorax
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
UTF	<i>upstream transcription factor</i>
V	Volt; Valin
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
VP	Virus-codiertes Protein
W	Watt; Tryptophan
W/B-Puffer	Wasch-/Binde-Puffer
wt	Wildtyp
X	beliebige AS
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y	Tyrosin
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose</i>
YPDA	<i>yeast extract, peptone, dextrose, adenin</i>
ZIP	Leucinzipper
Zn-F	Zinkfinger



## 8 Literaturverzeichnis

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J. 3rd und Curran, T.** (1990): Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*, **249**(4973), 1157-1161
- Acampora, D., D'Esposito, M. D., Faiella, A., Pannese, M., Migliaccio, E., Morelli, F., Stornaiuolo, A., Nigro, V., Simeone, A. und Boncielli, E.** (1989): The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res*, **17**(24), 10385-10402
- Aidinis, V., Bonaldi, T., Beltrame, M., Santagata, S., Bianchi, M. E. und Spanopoulou, E.** (1999): The RAG1 homeodomain recruits HMG1 and HMG2 to facilitate recombination signal sequence binding and to enhance the intrinsic DNA-bending activity of RAG1-RAG2. *Mol Cell Biol*, **19**(10), 6532-6542
- Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J. F., Schedl, A. und de Crombrughe, B.** (2002): The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, **16**, 2813-2828
- Andersen, B. und Rosenfeld, M. G.** (2001): POU domain factors in the neuroendocrine system: Lessons from the developmental biology provide insights into human disease. *Endocrine Rev*, **22**(1), 2-35
- Argenton, F., Giudici, S., Deflorian, G., Cimbro, S., Cortelli, F. und Beltrame, M.** (2004): Ectopic expression and knockdown of a zebrafish *sox21* reveal its role as a transcriptional repressor in early development. *Mechanisms of Development*, **121**, 131-142
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K.** (1993): Current protocols in molecular biology. *New York, John Wiley & Sons*
- Bai, C. und Elledge, S. J.** (1996): Gene identification using the yeast two-hybrid system. *Methods Enzymol*, **273**, 331-347
- Barrera L. O. und Ren, B.** (2006): The transcriptional regulatory code of eukaryotic cells – insights from genome-wide analysis of chromatin organization and transcription factor binding. *Curr Opin Cell Biol*, **18**(3), 291-298.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. und Birchmeier, W.** (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**(6592), 638-642
- Bell, K. M., Western, P. S. und Sinclair, A. H.** (2000): Sox8 expression during chick embryogenesis. *Mech Dev*, **94**, 257-260
- Berg, J. M.** (1992): Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc Natl Acad Sci*, **89**, 11109-11110

- Bertolotto, C., Buscà, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.-P. und Ballotti, R.** (1998): Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of Microphthalmia. *Mol Cell Biol*, **18**(2), 694-702
- Bertrand, N., Castro, D. S. und Guillemot, F.** (2002): Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci*, **3**(7), 517-530
- Bewley, C. A., Gronenborn, A. M. und Clore, G.M.** (1998): Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 105-131
- Bondurand, N., Girard M., Pingault, V., Lemort, N., Dubourg, O. und Goossens, M.** (2001): Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet*, **10**, 2783-2795
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D. E., Lemort, N., Sock, E., LeCaignec, C., Wegner, M. und Goossens, M.** (2000): Interaction between SOX10, PAX3 and MITF, three genes implicated in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet*, **9**, 1907-1917
- Boras, K. und Hamel, P. A.** (2002): Alx4 binding to LEF-1 regulates N-CAM promoter activity. *J Biol Chem*, **277**(2), 1120-1127
- Bowles, J., Schepers, G. und Koopman, P.** (2000): Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, **227**, 239-255
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254
- Britsch, S., Goerich, D. E., Riethmacher, D., Peirano, R. I., Rossner, M., Nave, K.-A., Birchmeier, C. und Wegner, M.** (2001): The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev*, **15**, 66-78
- Bruun, J.-A., Thomassen, E. I. S., Kristiansen, K., Tylden, G., Holm, T., Mikkola, I., Bjorkoy, G. und Johansen, T.** (2005): The third helix of the homeodomain of paired class homeodomain proteins acts as a recognition helix both for DNA and protein interactions. *Nucleic Acids Res*, **33**(8), 2661-2675
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.** (1987): XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Bio Techniques*, **5**, 376-378
- Cary, P. D., Read, C. M., Davis, B., Driscoll, P. C. und Crane-Robinson, C.** (2001): Solution structure and backbone dynamics of the DNA-binding domain of mouse Sox-5. *Protein Science*, **10**, 83-98
- Chaboissier, M. C., Kobayashi, A., Vidal, V. I., Lutzkendorf, S., van de Kant, H. J., Wegner, M., de Rooij, D. G., Behringer, R. R., Schedl, A.** (2004): Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*, **131**(9), 1891-1901

- Chauhan, B. K., Yang, Y., Cveklová, K. und Cvekl, A.** (2004): Functional interactions between alternatively spliced forms of Pax6 in crystallin gene regulation and in haploinsufficiency. *Nucleic Acids Res*, **32**(5), 1696-1709
- Chavrier, P., Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R. und Charnay, P.** (1988): Characterization of a mouse multigene family that encodes zinc finger structures. *Mol Cell Biol*, **8**(3), 1319-1326
- Chi, N. und Epstein, J. A.** (2002): Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *TRENDS Gen*, **18**(1), 41-47
- Cleary, M. A. und Herr, W.** (1995): Mechanisms for flexibility in DNA sequence recognition and VP16-induced complex formation by the Oct-1 POU domain. *Mol Cell Biol*, **15**(4), 2090-2100
- Court, R., Chapman, L., Fairall, L. und Rhodes, D.** (2005): How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep*, **6**(1), 39-45
- Czerny, T. und Busslinger, M.** (1995): DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: Three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol*, **15**(5), 2858-2871
- Dailey, L. und Basilico, C.** (2001): Coevolution of HMG domains and homeodomains and the generation of transcriptional Regulation by Sox/POU complexes. *J Cell Physiology*, **186**, 315-328
- Daulny, A., Rappailles, A., Landemarre, L., Locker, D. und Decoville, M.** (2003): DSP1 interacts with Bicoid for *knirps* enhancement. *Genesis*, **36**, 104-113
- Dawid, I. B., Breen, J. J. und Toyama, R.** (1998): LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet*, **14**(4), 156-161
- Dawid, I. B., Toyama, R. und Taira, M.** (1995): LIM domain proteins. *C R Acad Sci III*, **318**(3), 295-306
- Deane, J. E., Ryan, D. P., Sunde, M., Maher, M. J., Guss, J. M., Visvader, J. E. und Matthews, J. M.** (2004): Tandem LIM domains provide synergistic binding in the LMO4:Ldb1 complex. *EMBO*, **23**, 3589-3598
- de Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F. und Berta, P.** (1998); Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol*, **18**, 6653-6665
- Desclozeaux, M., Poulat, F., de Santa Barbara, P., Capony, J.-P.; Turowski, P., Jay, P., Méjan, C., Moniot, B., Boizet, B. und Berta, P.** (1998): Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem*, **14**, 7988-7995
- Di Rocco, G., Gavalas, A., Popperl, H., Krumlauf, R., Mavilio, F. und Zappavigna, V.** (2001): The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and

HOXB1 modulate the Hoxb1 auto-regulatory enhancer function. *J Biol Chem*, **276**(23), 20506-20515

**D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Maschetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E. und Soddu, S.** (2002): Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 45 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*, **4**, 11-19

**Dragan, A. I., Klass, J., Read, C., Churchill, M. E. A., Crane-Robinson, C. und Privalov, P. L.** (2003): DNA binding of a non-sequence-specific HMG-D protein is entropy driven with a substantial non-electrostatic contribution. *J Mol Biol*, **331**, 795-813

**Dragan, A. I., Read, C. M., Makeyeva, E. N., Milgotina, E. I., Churchill, M. E. A., Crane-Robinson, C. und Privalov, P. L.** (2004): DNA binding and bending by HMG boxes: Energetic determinants of specificity. *J Mol Biol*, **343**, 371-393

**Dreosti, I. E.** (2001): Zinc and the gene. *Mutation Res*, **475**, 161-167

**Dyson, H. J. und Wright, P. E.** (2002): Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Op Structural Biol*, **12**, 54-60

**Eisen, J. A., Sweder, K. S. und Hanawalt, P. C.** (1995): Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*, **23**(14), 2715-2723

**Emsley, P. und Cowtan, K.** (2004): Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**(Pt 12 Pt 1), 2126-2132.

**Fields, S. und Song, O.** (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**(6230), 245-246

**Fields, S. und Sternglanz, R.** (1994): The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, **10**(8), 286-292

**Forwood, J. K., Harley, V. und Jans, D.A.** (2001): The C-terminal nuclear localization signal of the sex-determining region Y (SRY) high mobility group domain mediates nuclear import through importin  $\beta$ 1. *J Biol Chem*, **276**, 46575-46582

**Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., Brook, J. D. et al** (1994): Campomelic Dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, **372**, 525-530

**Furumatsu, T., Tsuda, M., Yoshida, K., Noboru, T., Ito, T., Hashimoto, M., Ito, T. und Asahara, H.** (2005): Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J Biol Chem*, **280**(42), 35203-35208

**Ghislain, J. und Charnay, P.** (2006): Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep*, **7**(1), 52-58

- Gietz, R. D., Triggs-Raine, B., Robbins, A., Graham, K. C. und Woods, R. A.** (1997): Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol Cell Biol*, **17**(1-2), 67-79
- Gottlieb, P.D., Pierce, S.A., Sims, R.J., Yamagishi, H., Weihe, E.K., Harriss, J.V., Maika, S.D., Kuziel, W.A., King, H.L., Olson, E.N., Nakagawa, O. und Srivastava, D.** (2002): Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat Genet*, **31**(1), 25-32
- Grosschedl, R., Giese, K. und Pagel, J.** (1994): HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*, **10**, 94-99
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. und Lovell-Badge, R.** (1990): A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, **346**, 245-250
- Gullapalli, A., Garrett, T. A., Paing M. M., Griffin, C. T., Yang, Y. und Trejo, J.** (2004): A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking. *Mol Biol Cell*, **15**(5), 2143-2155
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J.** (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816
- Herbarth, B., Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Hermans-Borgmeyer, I., Puliti, A., Lemort, N., Goossens, M. und Wegner, M.** (1998): Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5161-5165
- Herr, W. und Cleary, M. A.** (1995): The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev*, **9**, 1679-1693
- Hobert, O. und Westphal, H.** (2000): Function of LIM-homeobox genes. *Trends Genet*, **16**(2), 75-83
- Hsiao, N.-W., Samuel, D., Liu, Y.-N., Chen, L.-C., Yang, T.-Y., Jayaraman, G. und Lyu, P.-C.** (2003): Mutagenesis study on the zebra fish SOX9 high-mobility group: Comparison of sequence and non-sequence specific HMG domains. *Biochemistry*, **42**, 11183-11193
- Huang, W., Zhou, X., Lefebvre, V. und de Crombrughe, B.** (2000): Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol*, **20**(11), 4149-4158
- Ito, Y., Wiese, S., Funk, N., Chittka, A., Rossoll, W., Bömmel, H., Watabe, K., Wegner, M. und Sendtner, M.** (2006): Sox10 regulates ciliary neurotrophic factor gene expression in Schwann cells. *PNAS*, **103**(20), 7871-7876
- James, P., Haliaday, J. und Craig, E. A.** (1996): Genomic libraries and host strains designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436

- Jantzen, H.-M., Admon, A., Bell, S. P., Tjian, R.** (1990): Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*, **344**, 830-836
- Jiang, X., Newell, E. W. und Schlichter, L. C.** (2003): Regulation of a TRPM7-like current in rat brain microglia. *J Biol Chem*, **278**(44), 42867-42876
- Kadmas, J. L. und Beckerle, M. C.** (2004): The LIM domain: From the cytoskeleton to the nucleus. *Mol Cell Biol*, **5**, 920-931
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. und Kondoh, H.** (2000): Pairing SOX off with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*, **16**(4), 182-187
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R. und Kondoh, H.** (2001): Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev*, **15**, 1272-1286
- Kamaraju, A. K., Bertolotto, C., Chebath, J. und Revel, M.** (2002): Pax3 down-regulation and shut-off of melanogenesis in melanoma B16/F10.9 by interleukin-6 receptor signaling. *J Biol Chem*, **277**(17), 15132-15141
- Kawakami, Y., Tsuda, M., Takahashi, S., Taniguchi, N., Esteban, C. R., Zemmyo, M., Furumatsu, T., Lotz, M., Belmonte, J. C. I. und Asahara, H.** (2004): Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  regulates chondrogenesis via association with Sox9. *PNAS*, **102**(7), 2414-2419
- Kellerer, S., Schreiner, S., Stolt, C. C., Scholz, S., Bosl, M. R. und Wegner, M.** (2006): Replacement of the Sox10 transcription factor by Sox8 reveals incomplete functional equivalence. *Development*, **133**(15), 2875-2886
- Kim, E. A., Noh, Y. T., Ryu, M.-J., Kim, H.-T., Lee, S.-E., Kim, C.-H., Lee, C., Kim, Y. H. und Choi, C. Y.** (2006): Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem*, **281**(11), 7489-7497
- Kim, Y. H., Choi, C. Y., Lee, S. J., Conti, M. A. und Kim, Y.** (1998): Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J Biol Chem*, **273**, 25875-25879
- Knippers, R.** (1997): Molekulare Genetik. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Knower, K. C., Kelly, S. und Harley, V. R.** (2003): Turning on the male – SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet Genome Res*, **101**, 185-198
- Koopman, P.** (1999): Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci*, **55**(6-7), 839-856
- Koopman, P., Bullejos, M. und Bowles, J.** (2001): Regulation of male sexual development by *Sry* and *Sox9*. *J Exp Zoology*, **290**, 463-474

- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Enderich, J., Hermans-Borgmeyer, I. und Wegner, M.** (1998a): Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem* **273**(26), 16050-16057
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I. und Wegner, M.** (1998b): Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci*, **18**(1), 237-250
- Kuhlbrodt, K., Schmidt, C., Sock, E., Pingault, V., Bondurand, N., Goossens, M. und Wegner, M.** (1998c): Functional Analysis of Sox10 Mutations Found in Human Waardenburg-Hirschsprung Patients. *J Biol Chem*, **273**(36), 23033-23038
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(259), 680-685
- Landsman, D. und Bustin, M.** (1993): A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays*, **15**, 539-546
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L.** (1989): The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science*, **240**(17)
- Lang, D., Chen, F., Milewski, R., Li, J., Lu, M. M. und Epstein, J. A.** (2000): Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest*, **106**(8), 963-971
- Lang, D. und Epstein, J. A.** (2003): Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet*, **12**(8), 937-945
- Latchman, D. S.** (1999): POU family transcription factors in the nervous system. *J Cell Phys*, **179**, 126-133
- Laudet, V., Stehelin, D. und Clevers, H.** (1993): Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res*, **21**(10), 2493-2501
- Lee, Y., Shioi, T., Kasahara, H., Jobe, S. M., Wiese, R. J., Markham, B. E. und Izumo, S.** (1998): The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Cell Biol*, **18**(6), 3120-3129
- Lee, M., Goodall, J., Verastegui, C., Ballotti, R. und Goding, C. R.** (2000): Direct regulation of the microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *J Biol Chem*, **275**, 37978-37983
- Li, S. S.** (2005): Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*, **390**(Pt 3), 641-653
- Li, X., Murre, C. und McGinnis, W.** (1999): Activity regulation of a Hox protein and a role for the homeodomain in inhibiting transcriptional activation. *EMBO*, **18**, 198-211

- Liu, Q., Melnikova, I. N., Hu, M. und Gardner, P. D.** (1999): Cell type-specific activation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes by Sox10. *J Neurosci*, **19**(22), 9747-9755
- Love, J. J., Li, X., Chung, J., Dyson, J. und Wright, P. E.** (2004): The LEF-1 high-mobility group domain undergoes a disorder-to-order transition upon formation of a complex with cognate DNA. *Biochemistry*, **43**, 8725-8734
- Loy, C. J., Sim, K. S. und Yong, E. L.** (2003): Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *PNAS*, **100**(8), 4563-4567
- Ludwig, A., Rehberg, S. und Wegner, M.** (2004): Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS*, **556**, 236-244
- Ma, Y., Certel, K., Gao, Y., Niemitz, E., Mosher, J., Mukherjee, A., Mutsuddi, M., Huseinovic, N., Crews, S. T., Johnson, W. A. und Nambu, J. R.** (2000): Functional interactions between *Drosophila* bHLH/PAS, Sox, and POU transcription factors regulate CNS midline expression of the *slit* gene. *J Neurosci*, **20**(12), 4596-4605
- Mackay, J. P. und Crossley, M.** (1998): Zinc fingers are sticking together. *TIBS*, **23**, 1-4
- Maka, M., Stolt, C. C. und Wegner, M.** (2005): Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev Biol*, **277**(1), 155-169
- Malki, S., Berta, P., Poulat, F. und Boizet-Bonhoure, B.** (2005a): Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res*, **309**, 468-475
- Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjan, C., Berta, P., Poulat, F. und Boizet-Bonhoure, B.** (2005b): Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J*, **24**, 1798-1809
- Martemyanov, K.A., Lishko, P.V., Calero, N., Keresztes, G., Sokolov, M., Strissel, K.J., Leskov, I.B., Hopp, J.A., Kolesnikov, A.V., Chen, C.K., Lem, J., Heller, S., Burns, M.E., und Arshavsky, V.Y.** (2003): The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo. *J Neurosci*, **23**(32), 10175-10181
- Massari, M. E. und Murre, C.** (2000): Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, **20**(2), 429-440
- MATCHMARKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual** (1999), Clontech Laboratories
- Matthews, J. M., Kowalski, K., Liew, C. K., Sharpe, B. K., Fox, A. H., Crossley, M. und Mackay, J. P.** (2000): A class of zinc fingers involved in protein-protein interactions. *FEBS*, **267**, 1030-1038
- Matthews, J. M. und Sunde, M.** (2002): Zinc fingers - folds for many occasions. *IUBMB life*, **54**, 351-355

- Melnikova, I. N., Lin, H.-R., Blanchette, A. R. und Gardner, P. D.** (2000a): Synergistic transcriptional activation by Sox10 and Sp1 family members. *Neuropharmacology*, **39**, 2615-2623
- Melnikova, I. N., Yang, Y. und Gardner, P. D.** (2000b): Interactions between regulatory proteins that bind to the nicotinic receptor beta4 subunit gene promoter. *Eur J Pharmacol*, **393**(1-3), 75-83
- Melvin, V. S., Harrell, C., Adelman, J. S., Kraus, W. L., Churchill, M. und Edwards, D. P.** (2004): The role of the c-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB. *J Biol Chem*, **279**(15), 14763-14771
- Miller, J., McLachlan, A. D. und Klug, A.** (1985): Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA form *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, **4**, 1609-1614
- Miller, N., Shuman, J. D., Sebastian, T., Dauter, Z. und Johnson, P. F.** (2003): Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ . *J Biol Chem*, **278**(17), 15178-15184
- Mollaaghababa, R. und Pavan, W. J.** (2003): The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene*, **22**, 3024-3034
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A. und Lovell-Badge, R.** (1996): Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*, **14**(1), 62-68
- Murphy, E.C., Zhurkin, V.B., Louis, J.M., Cornilescu, G., Clore, G.M.** (2001): Structural basis for SRY-dependent 46-X,Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation. *J Mol Biol*, **312**, 481-499
- Murphy IV, F. V., Sweet, R. M. und Churchill, M. E. A.** (1999): The structure of a chromosomal high mobility group protein-DNA complex reveals sequence-neutral mechanisms important for non-sequence-specific DNA recognition. *EMBO*, **18**(23), 6610-6618
- Nye, J. A. und Graves, B. J.** (1990): Alkylation interference identifies essential DNA contacts for sequence-specific binding of the eukaryotic transcription factor C/EBP. *Proc Natl Acad Sci*, **87**, 3992-3996
- Oka, S., Shiraishi, Y., Yosida, T., Ohkubo, T., Sugiura, Y. und Kobayashi, Y.** (2004): NMR structure of transcription factor Sp1 DNA binding domain. *Biochemistry*, **43**, 16027-16035
- Passarge, E.** (1994): Taschenatlas der Genetik. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*
- Passner, J. M., Ryoo, H. D., Shen, L., Mann, R. S. und Aggarwal, A. K.** (1999): Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature*, **397**, 714-719

- Peirano, R. I., Goerich, D. E., Riethmacher, D. und Wegner, M.** (2000): Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol Cell Biol*, **20**(9), 3198-3209
- Peirano, R. I. und Wegner, M.** (2000): The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res*, **28**(16), 3047-3055
- Pfeifer, D., Poulat, F., Holinski-Feder, E., Kooy, F. und Scherer, G.** (2000): The SOX8 gene is located within 700 kb of the tip of chromosome 16p and is deleted in a patient with ATR-16 syndrome. *Genomics*, **63**(1), 108-116
- Phillips, K. und Luisi, B.** (2000) : The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J Mol Biol*, **302**, 1023-1039
- Pierantoni, G. M., Fedele, M., Pentimalli, F., Benvenuto, G., Pero, R., Viglietto, G., Santoro, M., Chiariotti, L. und Fusco, A.** (2001): High mobility group 1 (Y) proteins bind HIPK2, a serine-threonine kinase protein which inhibits cell growth. *Oncogene*, **20**, 6132-6141
- Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Prehu, M.-O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G. et al.** (1998): Sox10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*, **18**, 171-173
- Pingault, V., Bondurand, N., LeCaignec, C., Tardieu, S., Lemort, N., Dubourg, O., LeGuern, E., Goossens, M. und Boespflug-Tanguy, O.** (2001): The SOX10 transcription factor: evaluation as a candidate gene for central and peripheral hereditary myelin disorders. *J Neurol*, **248**, 496-499
- Potterf, S. B., Mollaaghababa, R., Hou, L., Southard-Smith, E., M., Hornyak, T. J., Arnheiter, H. und Pavan, W. J.** (2001): Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Dev Biol*, **237**, 245-257
- Preiss, S., Argentaro, A., Clayton, A., John, A., Jans, D. A., Ogata, T., Nagai, T., Barroso, I., Schafer, A. J. und Harley, V. R.** (2001): Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J Biol Chem*, **276**(30), 27864-27872
- Prosser, J. und van Heyningen, V.** (1998): Pax6 mutations reviewed. *Human mutation*, **11**, 93-108
- Ramji, D. P. und Foka, P.** (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, **365**, 561-575
- Rehberg, S., Lischberg, P., Glaser, G., Stamminger, T., Wegner, M. und Rosorius, O.** (2002): Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol Cell Biol*, **22**(16), 5826-5834

- Rémenyi, A., Lins, K., Nissen, L. J., Reinbold, R., Schöler, H. R. und Wilmanns, M.** (2003): Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev*, **17**, 2048-2059
- Rémenyi, A., Scholer, H. R., Wilmanns, M.** (2004): Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol*, **11**(9), 812-815
- Rudnicki, M. A. und Jaenisch, R.** (1995): The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays*, **17**(3), 203-209
- Sambrook J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition, *Cold Spring Harbour Press*
- Sauvé, S., Tremblay, L. und Lavigne, P.** (2004): The NMR solution structure of a mutant of the Max b/HLH/LZ free of DNA: Insights into the specific and reversible DNA binding mechanism of dimeric transcription factors. *J Mol Biol*, **342**, 813-832
- Schepers, G. E., Bullejos, M., Hosking, B. M. und Koopman, P.** (2000): Cloning and characterization of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res*, **28**(6), 1473-1480
- Schepers, G., Teasdale, R. D. und Koopman, P.** (2002): Twenty pairs of Sox: extend, homology, and nomenclature of the mouse and human Sox transcription factor gene family. *Dev Cell*, **3**, 167-170
- Schepers, G., Wilson, M., Wilhelm, D. und Koopman, P.** (2003): SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J Biol Chem*, **278**(30), 28101-28108
- Schlierf, B., Lang, S., Kosian, T., Werner, T. und Wegner, M.** (2005): The high-mobility group transcription factor Sox10 interacts with the N-myc-interacting protein Nmi. *J Mol Biol*, **353**, 1033-1042
- Schlierf, B., Ludwig, A., Klenovsek, K. und Wegner, M.** (2002): Cooperative binding of Sox10 to DNA: requirements and consequences. *Nucleic Acids Res*, **30**(24), 5509-5516
- Schlierf, B., Werner, T., Glaser, G. und Wegner, M.** (2006): Expression of Connexin47 in Oligodendrocytes is regulated by the Sox10 transcription factor. *J Mol Biol*, **361**(1), 11-21
- Schmidt, K., Glaser, G., Wernig, A., Wegner, M. und Rosorius, O.** (2003): Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. *J Biol Chem*, **278**(32), 29769-29775
- Schmidt, K., Schinke, T., Haberland, M., Priemel, M., Schilling, A. f., Mueldner, C., Rueger, J. M., Sock, E., Wegner, M. und Amling, M.** (2005): The high mobility group transcription factor Sox8 is a negative regulator of osteoblast differentiation. *J Cell Biol*, **168**(6), 899-910
- Schoenemann, M. D., Ryan, A. K., Erkman, L., McEvelly, R. J., Bermingham, J. und Rosenfeld, M. G.** (1998): POU domain factors in neural development. *Adv Exp Med Biol*, **449**, 39-53

- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., und Peitsch, M.C.** (2003): SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3381-3385.
- Shen, J. H. und Ingraham, H. A.** (2002): Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol Endocrinol*, **16**(3), 529-540
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Ohima, Y. und Hakoshima, T.** (1997): Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *EMBO*, **16**(15), 4689-4697
- Shoemaker, B. A., Portman, J. J. und Wolynes, P. G.** (2000): Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *PNAS*, **97**(16), 8868-8873
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. und Goodfellow, P. N.** (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**, 240-244
- Sock, E., Schmidt, K., Hermanns-Borgmeyer, I., Bösl, M. R. und Wegner, M.** (2001): Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol Cell Biol*, **21**, 6951-6959
- Soullier, S., Jay, P., Poulat, F., Vanacker, J. M., Berta, P. und Laudet, V.** (1999): Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *J Mol Evol*, **48**(5), 517-527
- Southard-Smith, E. M., Kos, L. und Pavan, W. J.** (1998): Sox10 mutation disrupts neural crest development in *Dom* Hirschsprung mouse model. *Nat Genet*, **18**, 60-64
- Stolt, C. C., Lommes, P., Friedrich, R. P. und Wegner, M.** (2004): Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development*, **131**, 2349-2358
- Stolt, C. C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M.-C., Schedl, A. und Wegner, M.** (2003): The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*, **17**, 1677-1689
- Stolt, C. C., Rehberg, S., Ader, M., Lommes, P., Riethmacher, D., Schachner, M., Bartsch, U. und Wegner, M.** (2002): Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev*, **16**, 165-170
- Stolt, C. C., Schmitt, S., Lommes, P., Sock, E. und Wegner, M.** (2005): Impact of transcription factor Sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord. *Dev Biol*, **281**(2), 309-317
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned gene. *J Mol Biol*, **189**(1), 113-130
- Suzuki, M., Mizutani-Koseki, Y., Fujimura, Y., Miyagishima, H., Kaneko, T., Takada, Y., Akasaka, T., Tanzawa, H., Takihara, Y., Nakano, M., Masumoto, H., Vidal, M., Isono, K. und Koseki, H.** (2002): Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development*, **129**(18), 4171-4183

- Tanaka, S., Kamachi, Y., Tanouchi, A., Hamada, H., Jing, N. und Kondoh, H.** (2004): Interplay of SOX and POU factors in regulation of the *Nestin* gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol*, **24**(20), 8834-8846
- van Houte, L. P. A., Chuprina, V. P., van der Wetering, M., Boelens, R., Kaptein, R. und Clevers, H.** (1995): Solution structure of the sequence-specific HMG box of the lymphocyte transcriptional activator Sox-4. *J Biol Chem*, **270**(51), 305167-30524
- Varga-Weisz, P. D. und Becker, P. B.** (2006): Regulation of higher-order chromatin structures by nucleosome-remodelling factors. *Curr Opin Genet Dev*, **16**(2), 151-156
- Verastegui, C., Bille, K., Ortonne, J. P. und Ballotti, R.** (2000): Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *J Biol Chem*, **275**, 30757-30760
- Villard, J.** (2004): Transcriptional regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly*, **134**(39-40), 571-579
- Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A. A., Moll, J. R. und Bonovich, M.** (2002): Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol*, **22**(18), 6321-6335
- Voncken, J. W., Roelen, B. A., Roefs, M., de Vries, S., Verhoeven, E., Marino, S., Dechamps, J. und van Lohuizen, M.** (2003): Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**(5), 2468-2473
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E. et al.** (1994): Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, **79**(6), 1111-1120
- Wegner, M.** (1999): From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*, **27**(6), 1409-1420
- Wegner, M.** (2000): Transcriptional control in myelinating glia: Flavours and Spices. *Glia*, **31**, 1-14
- Wegner, M.** (2001): Expression of transcription factors during oligodendroglial development. *Microscopy research and technique*, **52**, 746-752
- Wegner, M.** (2005): Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes. *Pigment Cell Res*, **18**, 74-85
- Wegner, M., Drolet, D. W. und Rosenfeld, M. G.** (1993): POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr Op Cell Biol*, **5**, 488-498
- Wegner, M. und Stolt, C. C.** (2005): From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci*, **28**(11), 583-588

- Wehner, R. und Gehring, W.** (1995): Zoologie. 23. Auflage, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*
- Wei, Q., Miskimins, W. K. und Miskimins, R.** (2004): Sox10 acts as a tissue-specific transcription factor enhancing activation of the myelin basic protein gene promoter by p27Kip1 and Sp1. *J Neurosci Res*, **78**(6), 796-802
- Weiss, M. A.** (2005): Floppy SOX: Mutual induced fit in HMG (high mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinology*, **15**(3), 353-362
- Werner, M. H., Huth, J. R., Gronenborn, A. M. und Clore, G. M.** (1995): Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell*, **81**(5), 705-714
- Werner, M. H., Huth, J. R., Gronenborn, A. M. und Clore, G. M.** (1996): Molecular determinants of mammalian sex. *TIBS*, **21**, 302-308
- Williams, D. C. Jr, Cai, M. und Clore, G. M.** (2004): Molecular basis for synergistic activation by Oct1 and Sox2 revealed from the solution structure of the 42-kDa Oct1.Sox2.Hoxb1-DNA ternary transcription factor complex. *J Biol Chem*, **279**(2), 1449-1457
- Wilson, M. und Koopman, P.** (2002): Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Op Gen Dev*, **12**, 441-446
- Wißmüller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M. und Wegner, M.** (2006): The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res*, **34**(6), 1735-1744
- Xu, H. E., Rould, M. A., Xu, W., Epstein, J. A., Maas, R. L. und Pabo, C. O.** (1999): Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev*, **13**(10), 1263-1275
- Yao, X., Pérez-Alvarado, G. C., Louis, H. A., Pomiès, P., Hatt, C., Summers, M. F. und Beckerle, M. C.** (1999): Solution structure of the chicken cysteine-rich protein, CRP1, a double-LIM protein implicated in muscle differentiation. *Biochemistry*, **38**, 5701-5713
- Zappavigna, V., Falciola, L., Helmer-Citterich, M., Mavilio, F. und Bianchi, M. E.** (1996): HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J*, **15**(18), 4981-4991
- Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, P. und Varmus, H. E.** (1999): Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 $\alpha/\beta$  and XSox3 physically interact with  $\beta$ -Catenin. *Mol Cell*, **4**, 487-498
- Zwilling, S., König, H. und Wirth, T.** (1995): High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J*, **14**(6), 1198-1208





## Publikationen

**Wißmüller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finsch, M. und Wegner, M.** (2006): The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res*, **34**(6), 1735-1744



## Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Michael Wegner für die Vergabe des Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit danken. Die Vorschläge und Anregungen zur Bearbeitung neuer Aspekte des Themas waren stets hilfreich. Außerdem danke ich ihm für die Durchsicht der Arbeit und die Übernahme der Erstberichterstattung.

PD Dr. Robert Slany danke ich für die freundliche und bereitwillige Übernahme der Zweitberichterstattung.

Allen, die mir beim Korrekturlesen der Arbeit geholfen haben, möchte ich ebenfalls danken, vor allem Andrea Feuerstein und Elisabeth Sock. Ohne die kritischen Anmerkungen und die Hilfe bei allen Formatierungsproblemen, bei denen mir auch Sabine Guth zur Seite stand, hätte die Arbeit nicht die jetzige Form.

Den Mitarbeitern am Lehrstuhl möchte ich meinen Dank aussprechen für das gute Arbeitsklima und die entspannte Atmosphäre. Es hat Spaß gemacht, in dieser Gruppe zu arbeiten. Besonders hervorheben möchte ich dabei Steffi Scholz. Aber auch Thomas Kosian, dessen Beiträge einen wichtigen Teil der Arbeit darstellen, und allen anderen, die nicht namentlich genannt werden, vielen Dank für die kollegiale Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Fritz Titgemeyer, vor allem Maximilian Schlicht, danke ich für die bereitwillige Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung von 2D-Gelen. Besonderer Dank gilt Martin Stiebritz für das Angebot zum Erstellen der Homologiemodelle und die Hilfe bei der Ausführung.

Im privaten Bereich danke ich meinen Freunden für das Leben neben der Forschung (ja, das gibt es wirklich). Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich auch in schwierigen Situationen in jeder Weise unterstützt und jederzeit vollstes Vertrauen in mich gesetzt haben. Für sie war es eine Selbstverständlichkeit, sowohl mein Studium als auch die Doktorarbeit zu ermöglichen, wofür ich ihnen von ganzem Herzen danke.