

**Studien zur Funktion der Koaktivatoren ZIP-Kinase, AATF  
und TSG101 in der Androgenrezeptor-vermittelten  
Transkription**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Andrea Felten**

aus

Troisdorf

Bonn, im September 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann.

<b>Erstgutachter:</b>	Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann
<b>Zweitgutachter:</b>	Prof. Dr. Walter Witke
<b>Fachnaher Gutachter:</b>	Prof. Dr. Norbert Koch
<b>Fachangrenzender Gutachter:</b>	Prof. Dr. Martin Reuter

Tag der Promotion: 17.12.2010

Erscheinungsjahr: 2011

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nuklearrezeptoren.....	1
1.1.1 Die Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren.....	1
1.1.2 Struktur der Nuklearrezeptoren.....	2
1.1.3 Mechanismus der Aktivierung der Steroidhormonrezeptor-abhängigen Transkription.....	3
1.1.3.1 Regulation der Transkriptionsinitiation.....	4
1.1.3.2 Histonmodifikationen und Chromatinremodelling.....	7
1.1.3.3 Posttranslationale Modifikationen des AR.....	9
1.2 Die AR-Koaktivatoren ZIPK und AATF.....	11
1.2.1 Die ZIPK.....	11
1.2.1.1 Substrate und Interaktionspartner der ZIPK.....	14
1.2.1.2 Funktionen der ZIPK.....	15
1.2.2 Der Transkriptionsfaktor AATF.....	17
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
<b>2 Material</b> .....	<b>23</b>
2.1 Chemikalien, Isotope und Enzyme.....	23
2.2 Allgemeine Stammlösungen und Puffer.....	23
2.2.1 Lösungen für DNA-Analysen.....	23
2.2.2 Lösungen für die Aufreinigung und Auftrennung von Proteinen.....	24
2.3 Medien.....	24
2.3.1 Medien für die Bakterienkultur.....	24
2.3.2 Medien für die Kultur von Säugerzellen.....	25
2.4 Bakterienstämme und Zelllinien.....	25
2.4.1 Bakterienstämme.....	25
2.4.2 Zelllinien.....	26
2.5 Verwendete Reagenzien für die Zellkultur.....	26
2.6 Oligonukleotide und siRNA.....	26
2.7 Antikörper.....	28
2.8 Plasmide.....	30
2.9 Reagenzien für die Immunfluoreszenz.....	31
<b>3 Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1 Allgemeine molekulargenetische Methoden.....	32
3.1.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese.....	32
3.1.2 Präparative Agarosegele.....	32
3.1.3 Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren.....	32
3.1.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
3.1.5 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	33
3.1.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	33
3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
3.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien.....	34
3.1.9 Transformation von Bakterien.....	34
3.1.10 Präparation von Nukleinsäuren.....	35
3.1.10.1 Analytische Plasmidisolierung.....	35
3.1.10.2 Präparative Plasmidisolierung.....	35
3.1.10.3 Präparation von Gesamt-RNA mit TRIzol aus Säugerzellen.....	36
3.1.10.4 Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen.....	36
3.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36

3.1.12	RT-PCR .....	38
3.2	Proteinbiochemische Methoden .....	39
3.2.1	Herstellung von Zellextrakten .....	39
3.2.2	Immunpräzipitation .....	39
3.2.3	<i>In-vitro</i> -Kinaseassay .....	40
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3.2.5	Western Blot und Immunfärbung .....	41
3.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford .....	42
3.2.7	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	42
3.3	Zellkultur .....	43
3.3.1	Kultur von Säugerzellen .....	43
3.3.2	Zellzahlbestimmung.....	44
3.3.3	Transiente Transfektion von Säugerzellen mit DNA oder RNA .....	44
3.3.3.1	Lipofektion .....	45
3.3.3.2	Transfektion mittels Calciumphosphat .....	45
3.3.4	Transiente Expressionsexperimente zur Untersuchung der Luciferaseaktivität.....	46
3.3.4.1	Herstellung von Zellextrakten für den Luciferasenachweis .....	46
3.3.4.2	Messung der Luciferaseaktivität.....	46
3.4	In vivo-Nachweis ubiquitiniertes Proteine .....	47
3.5	Fluoreszenzmikroskopische Analysen .....	47
3.5.1	Fixierung und Permeabilisierung der Zellen .....	47
3.5.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	48
3.5.3	DAPI/DRAQ5-Färbung.....	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1	Koaktivierende Eigenschaften der humanen ZIPK .....	49
4.1.1	Effekt der ZIPK auf AR-abhängige Reportergerkonstrukte.....	49
4.1.2	Kolokalisiert die ZIPK mit dem AR? .....	54
4.1.3	Einfluss der ZIPK auf andere Steroidhormonrezeptoren.....	55
4.1.4	Effekt der ZIPK auf die p53-abhängige Transkription .....	55
4.1.5	Zusammenspiel von ZIPK mit AATF, TSG101 und Par-4 bei der AR-abhängigen Transkription.....	56
4.2	Ist die ZIPK essentiell für die AR-abhängige Transkription?.....	58
4.2.1	Etablierung der siRNAs gegen ZIPK, AATF, TSG101 und Par-4.....	58
4.2.2	Einfluss von endogener ZIPK, AATF und TSG101 auf die AR-abhängige Reporterexpression.....	62
4.2.3	Einfluss der Koaktivatoren auf die Expression endogener AR-Zielgene .....	64
4.3	Assoziation des AR und der Koaktivatoren an regulatorische Bereiche von AR-Zielgenen .....	67
4.3.1	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	67
4.3.2	Standardisierung der ChIP .....	68
4.3.3	Androgenabhängige Assoziation von AR und Koaktivatoren an ARE.....	69
4.3.4	Dynamik der Assoziation von AR und Koaktivatoren an ARE .....	73
4.3.5	Lässt sich das zyklische Verhalten des AR und der Koaktivatoren durch Inhibition des Proteasoms oder der Transkription unterbrechen?.....	74
4.3.5.1	Konzentrationsaustestung der Inhibitoren DRB und MG132.....	75
4.3.5.2	Assoziation von AR und Koaktivatoren an ARE nach Inhibitorbehandlung.....	76
4.3.6	Der AR und die Koaktivatoren ZIPK, AATF und TSG101 sind im selben Komplex an regulatorische DNA-Bereiche gebunden .....	78
4.3.7	Effekt der Herunterregulation von ZIPK oder AATF auf das Komplex-Assembly.....	79
4.3.7.1	Die Herunterregulation der ZIPK bewirkt eine Akkumulation des AR.....	79
4.3.7.2	Welche Auswirkung hat die Reduktion von AATF auf das Komplexassembly?.....	80
4.3.8	Erfolgt die Formation des AR-Transkriptionskomplexes zwischen Enhancer und Promotor durch „Looping“ oder „Tracking“?.....	81
4.4	Was ist der Mechanismus der Koaktivierung durch die ZIPK? .....	83
4.4.1	Mögliche Phosphorylierungssubstrate der ZIPK.....	83
4.4.1.1	Wird der AR durch die ZIPK phosphoryliert?.....	83
4.4.1.2	Ist unter bekannten AR-Koaktivatoren oder Interaktionspartnern der ZIPK ein Substrat zu finden? .....	84
4.4.1.3	Phosphoryliert die ZIPK Histon H3 an Threonin11 während der Transkriptionsinitiation?.....	85

4.4.2	Ist die ZIPK an der Ubiquitinierung des AR beteiligt? .....	90
4.4.2.1	ZIPK und Mdm2 kooperieren in der Koaktivierung der AR-abhängigen Transkription von Reportergenen .....	90
4.4.2.2	Wird Mdm2 durch die ZIPK phosphoryliert?.....	91
4.4.2.3	Nachweis von ubiquitiniertem AR nach Androgen-Stimulation.....	92
4.4.2.4	Ist die ZIPK an der <i>in vivo</i> -Ubiquitinierung des AR beteiligt? .....	94
4.4.2.5	Endogene ZIPK ist an der Ubiquitinierung des AR beteiligt .....	96
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>98</b>
5.1	Koaktivierende Eigenschaften der humanen ZIPK .....	99
5.1.1	Die ZIPK zeigt eine partielle Kollokalisierung mit aktiviertem AR .....	100
5.1.2	Die ZIPK wirkt auch auf andere Transkriptionsfaktoren koaktivierend .....	101
5.2	Kooperation von ZIPK mit AATF, Par-4 und TSG101 in der AR-abhängigen Transkription .....	102
5.3	Signifikanz der endogenen Koaktivatoren für die AR-abhängige Transkription .....	104
5.4	Dynamik der Assoziation des AR und der Koaktivatoren ZIPK, AATF und TSG101 mit regulatorischen Bereichen von AR-Zielgenen .....	105
5.5	Das zyklische Verhalten des AR beruht auf dessen Abbau nach einem Transkriptionszyklus.....	107
5.6	Gegenseitige Abhängigkeiten im Assembly zwischen ZIPK, AATF, TSG101 und dem AR.....	109
5.7	Was ist das Substrat durch welches die ZIPK koaktivierend wirkt? .....	110
5.7.1	Phosphoryliert die ZIPK Histon H3 an Threonin 11 während der Transkriptionsinitiation?.....	111
5.7.2	Ausprägung und Bedeutung der H3T11-Phosphorylierung.....	112
5.8	Die ZIPK ist an der Regulation der Ubiquitinierung des AR beteiligt.....	114
5.9	Ausblick .....	118
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>122</b>
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>133</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>134</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>135</b>
	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>136</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AATF	<i>Apoptosis-antagonizing transcription factor</i>	NiNTA	Nickel-Nitrilotriacetat
Abb.	Abbildung	NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>	NP-40	Nonidet P-40
AK	Antikörper	OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
APS	Ammoniumpersulfat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
AR	Androgenrezeptor	Par-4	<i>Prostate apoptosis response gene-4</i>
ARE	Androgen-Response-Element	PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
AS	Aminosäure	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	PEG	Polyethylenglykol
bp	Nukleotid-Basenpaar	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
BSA	Rinderserumalbumin	PFA	Paraformaldehyd
bzw.	beziehungsweise	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
C-	carboxy-	PLP	Phosphatlysispuffer
cDNA	<i>copy DNA</i> , komplementäre DNA	PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
CMV	Cytomegalievirus	PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid	PR	Progesteronrezeptor
DAPK	<i>Death associated protein kinase</i>	Rb	Retinoblastomprotein
DBD	DNA-Bindedomäne	rpm	Umdrehungen pro Minute
Dlk	<i>DAP-like kinase</i> = ZIPK aus der Ratte	RLU	relative Luciferaseaktivität
DHT	Dihydrotestosteron	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
DTT	Dithiothreitol	siC <sub>x</sub>	Kontroll-siRNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	siRNA	<i>short interfering RNA</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SV40	<i>Simian Virus 40</i>
ER	Estrogenrezeptor	TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>et al.</i>	<i>et alteri (und Mitarbeiter)</i>	TE	Tris-EDTA
FCS	fötales Kälberserum	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	TF	Transkriptionsfaktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein	TR	Thyroidhormonrezeptor
GR	Glucocorticoidrezeptor	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
IF	Immunfluoreszenzanalyse	TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
IP	Immunpräzipitation	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
kb	Kilobasenpaar	Ub	Ubiquitin
kDa	Kilodalton	ün	über Nacht
KLK2	Kallikrein-2	UV	Ultraviolett
LBD	Liganden-Bindedomäne	(v/v)	Volumen pro Volumen
LB-Medium	Flüssigmedium nach Luria-Bertani	WB	Western Blot
LT	<i>Large T-Antigen</i> , großes T-Antigen von SV40	wt	Wildtyp
LZ	Leuzin-Zipper	(w/v)	Masse pro Volumen
Luc	Luciferase	ZIPK	<i>Zipper-interacting protein kinase</i>
M	Molarität		
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>		
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>		
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure		
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA		
N-	amino-		
NEM	N-Ethylmaleinimid		

Die gängigen SI-Einheiten sowie Symbole für chemische Elemente wurden in dieses Abkürzungsverzeichnis nicht mit aufgenommen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Nuklearrezeptoren

### 1.1.1 Die Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren

Nukleäre Hormonrezeptoren, kurz Nuklearrezeptoren (NR), sind Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die im Zusammenspiel mit Koaktivatoren und Korepressoren die Genexpression regulieren und eine wichtige Rolle bei Entwicklung, Differenzierung, Homöostase sowie in verschiedenen Stoffwechselwegen spielen (Evans, 1988; Mangelsdorf *et al.*, 1995). Die NR-Superfamilie umfasst in Säugetieren etwa 50 Gene, mit 48 Genen beim Menschen, 49 in der Maus und 47 in der Ratte (Zhang *et al.*, 2004). Die offizielle Nomenklatur teilt die Superfamilie in sieben Unterfamilien (NR0-6) ein, die ihrerseits wieder aus mehreren Gruppen bestehen (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999; Bertrand *et al.*, 2004):

NR1: Thyroidhormonrezeptor-ähnliche: z.B. Thyroidhormonrezeptor (TR), Vitamin D-Rezeptor (VDR)

NR2: Retinsäure X Rezeptor-ähnliche: z.B. Retinsäure X-Rezeptor (RXR)

NR3: Estrogenrezeptor-ähnliche: z.B. Estrogenrezeptor (ER), Androgenrezeptor (AR)

NR4: Nervenwachstumsfaktor IB-ähnliche: z.B. Nervenwachstumsfaktor IB (NGFI-B)

NR5: Steroidogenic Factor-ähnliche: Steroidogenic Factor 1 (SF1), Leberrezeptor Homolog-1 (LRH-1)

NR6: Germ Cell Nuclear Factor-ähnliche: Germ cell nuclear factor (GCNF)

NR0: Verschiedene: z.B. NR mit zwei DNA-Bindedomänen oder NR ohne DNA- oder Liganden-Bindedomänen

Im Allgemeinen ist allerdings eine einfachere Einteilung in drei funktionell unterschiedliche Hauptgruppen akzeptiert: Die Typ I-Rezeptoren bilden dabei die Steroidhormonrezeptoren zu denen der Androgenrezeptor (AR), Estrogenrezeptor (ER), Glucocorticoidrezeptor (GR), Mineralocorticoidrezeptor (MR) und Progesteronrezeptor (PR) gehören. Zu den Typ II-Rezeptoren (Nicht-Steroidhormonrezeptoren) zählt z.B. der Vitamin D3-Rezeptor (VDR), Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und Thyroidhormonrezeptor (TR). Die dritte Gruppe wird von den sogenannten Waisen-Rezeptoren (Orphan-Rezeptoren) gebildet, für die die Liganden oder ihre physiologische Funktion noch teilweise unbekannt sind (McKenna *et al.*, 1999; Giguere 1999).

### 1.1.2 Struktur der Nuklearrezeptoren

Sequenz- und funktionelle Analysen haben gezeigt, dass allen Mitgliedern der NR-Superfamilie eine modulare Struktur gemeinsam ist, die sich in vier Domänen unterteilen lässt: die N-terminale Transaktivierungsdomäne (NTD), die DNA-Bindedomäne (DBD), die „Hinge“-Region und die Liganden-Bindedomäne (LBD) (Evans, 1988). Eine schematische Darstellung der Domänen des AR befindet sich in Abb.1.1.

Die in Größe und Struktur variable N-terminale Transaktivierungsdomäne enthält einen autonomen, Liganden-unabhängigen Transaktivierungsbereich AF-1 (activating function-1). AF-1 besteht aus zwei distinkten Transaktivierungseinheiten TAU1 und TAU5 (transcription activation unit), die für die Transaktivierung des AR essentiell sind. Es konnte gezeigt werden, dass sie mit basalen Transkriptionsfaktoren interagieren und dadurch eine kompaktere und aktivere Konformation des Rezeptors induzieren (Jenster *et al.*, 1995; Lavery *et al.*, 2006).

Die hochkonservierte zentrale DNA-Bindedomäne enthält zwei Zinkfinger-Motive, wobei jedes Zinkatom von zwei Cystein-Paaren koordiniert ist (Gronemeyer und Moras, 1995). Dies führt zur Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix im ersten Zinkfinger-Motiv, über deren sogenannte P-Box die spezifische DNA-Bindung im Bereich der großen Furche der DNA des entsprechenden Hormon-Response-Elementes erfolgt. Das zweite Zinkfinger-Motiv der DBD vermittelt die Dimerisierung des Rezeptors über die sogenannte D-Box (Zilliacus *et al.*, 1995).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Androgenrezeptors als Beispiel für Steroidhormonrezeptoren.**

Der humane AR umfasst 919 Aminosäuren (AS) und codiert für ein 110 kDa großes Protein. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne (NTD) beinhaltet die aus zwei Bereichen bestehende Transaktivierungsfunktion 1 (AF-1, schwarz). Die zentrale DNA-Bindedomäne (DBD) ist über die flexible „Hinge“-Region mit der C-terminalen Liganden-Bindedomäne (LBD) verbunden. Die LBD enthält die Transaktivierungsfunktion 2 (AF-2).

Die variable „Hinge“-Region stellt eine flexible Verbindung zwischen DNA-Bindedomäne und C-terminaler Liganden-Bindedomäne (LBD) dar. Sie enthält ein Kernlokalisierungssignal und ist damit an der Regulation der subzellulären Lokalisation beteiligt (Evans, 1988; Zhou *et al.*, 1994). Daneben enthält die „Hinge“-Region eine putative PEST-Sequenz (AS-Sequenz, reich an Prolin, Glutamin, Serin, Threonin), für die eine Funktion beim Abbau des Rezeptors mittels Deletion jedoch nicht bestätigt werden konnte (Haelens *et al.*, 2007).

Die LBD besteht aus zwölf amphipatischen  $\alpha$ -Helices mit einer zentralen hydrophoben Liganden-Bindetasche (Matias *et al.*, 2000). Die Bindung des Agonisten induziert die Ausbildung der Liganden-abhängigen Transaktivierungsfunktion AF-2, die die Interaktion von

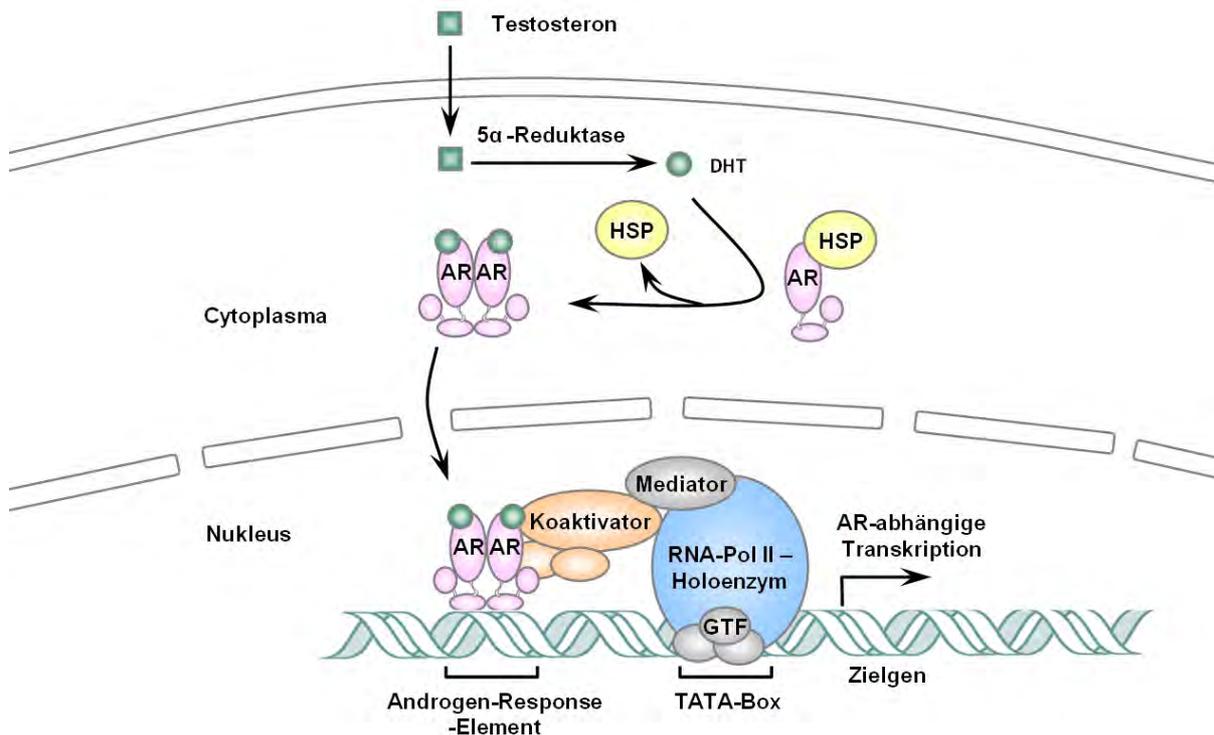
Koaktivatoren mittels LxxLL- oder FxxLF-Motiven mit der LBD ermöglicht (Danielian *et al.*, 1992; Heery *et al.*, 1997; van de Wijngaart *et al.*, 2006). Neben der Ligandenbindung und der Rekrutierung von Koaktivatoren, ist sie an der Dimerisierung des Rezeptors und der Bindung von Hitzeschockproteinen beteiligt.

### **1.1.3 Mechanismus der Aktivierung der Steroidhormonrezeptor-abhängigen Transkription**

Typ I-Rezeptoren liegen generell in inaktiver Form im Cytoplasma an einen dynamischen Komplex aus Hitzeschockproteinen (Hsp), Co-Chaperonen und Tetratricopeptide-Repeat (TPR)-enthaltenden Proteinen gebunden vor. Hsp90 und Hsp70 komplexieren den Rezeptor und verdecken dabei das Kernimportsignal und den Dimerisierungsbereich und halten den Rezeptor dadurch in einem inaktiven aber zugleich für Hormone hoch responsiven Zustand (Pratt und Toft, 1997). Der Rezeptor kann dadurch ohne große Verzögerung Signale, die zu seiner Aktivierung führen, in die Expression seiner Zielgene umwandeln (Pratt *et al.*, 2004). Nach Liganden-Bindung migriert der dimerisierte Rezeptor in den Kern, bindet an seine Response-Elemente und aktiviert die Transkription durch Rekrutierung von Koaktivatoren. Typ II-Rezeptoren wie der TR oder RXR sind in Abwesenheit des Liganden bereits am Response-Element gebunden. Durch die Rekrutierung von Korepressorkomplexen wirken sie solange repressorisch auf die Genexpression, bis die Anwesenheit des Liganden zur Abdissoziation der Korepressoren, der Rekrutierung von Koaktivatoren und damit folglich zur Aktivierung der Transkription führt.

Im Folgenden wird am Beispiel des AR die Aktivierung der Genexpression durch Steroidrezeptoren beschrieben (siehe Abb. 1.2): Der spezifische Ligand des AR ist Testosteron bzw. Dihydrotestosteron (DHT), welches von der 5- $\alpha$ -Reduktase im Zielgewebe aus Testosteron gebildet wird. Der Gebrauch von DHT im Zellkulturmodell weist einige Vorteile auf: So kann es durch die Aromatase nicht wie Testosteron weiter in Estradiol aromatisiert werden, welches wiederum den ER aktivieren würde und es ist in den meisten Geweben das eigentlich wirksame Androgen. Die biologische Aktivität ist dabei zehnfach größer als die von Testosteron (Deslypere *et al.*, 1992). Testosteron ist ein kleines, lipophiles Molekül und kann problemlos durch die Plasmamembran diffundieren. Nach der Umwandlung in DHT und der Bindung in die hydrophobe Tasche der LBD erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die das Abdissoziieren einiger Hitzeschockproteine bewirkt. Der AR bildet jetzt ein Homo- oder Heterodimer aus und kann aufgrund der freigegebenen Kernimportsequenz in den Kern translozieren (Black *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1997). Der Kernimport wird über Importin- $\alpha$ - $\beta$  und RanGTP vermittelt, sowie einem von den Kernimportrezeptoren unabhängigen Weg (Kaku *et al.*, 2008; Cutress *et al.*, 2008). Im Kern bindet das Rezeptordimer über seine DBD an die palindromischen Androgen-Response-

Elemente (ARE) in Promotor- und Enhancerbereichen seiner Zielgene. Dabei nimmt der Rezeptor eine Konformation ein, bei der die Transaktivierungsbereiche von NTD und LBD interagieren und dadurch eine Plattform für die Rekrutierung von Koaktivatoren ausbilden (He *et al.*, 1999; Prescott und Coetzee, 2006). Die Bindung der Koaktivatoren und deren Aktivitäten führen zur Auflockerung der Chromatinstruktur. Dies erleichtert die Bindung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (TF) und damit die Ausbildung des Transkriptions-initiationskomplexes. Die Rekrutierung der RNA-Polymerase II führt dann zur Expression des Gens.



**Abb.1.2: Schematische Darstellung der Aktivierung der AR-abhängigen Transkription.**

Als Typ-1 Rezeptor liegt der AR in Abwesenheit seines Liganden in inaktiver Form im Cytoplasma vor. Diffundiert Testosteron durch die Cytoplasmamembran wird es durch die 5α-Reduktase in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Die Hormonbindung führt zur Dissoziation der Hitzeschockproteine (HSP), der Dimerisierung des Rezeptors und der Translokation in den Kern. Dort bindet das AR-Dimer an Androgen-Response-Elemente im Promotorbereich seiner Zielgene. Die Rekrutierung von Koaktivatoren unterstützt die Anlagerung von allgemeinen/generellen TF (GTF), dem Mediator-Komplex und dem RNA-Pol II-Holoenzym. Dies resultiert in der Aktivierung der Transkription des Zielgens.

### 1.1.3.1 Regulation der Transkriptionsinitiation

Die Transkriptionsinitiation beginnt mit der Ausbildung des Initiationskomplexes. Dazu interagiert das an das „Response-Element“ gebundene Rezeptordimer (Transkriptionsaktivator) mit einer Vielzahl an Koaktivatoren sowie allgemeinen TF.

Die allgemeinen (auch basale oder generelle) TF sind ubiquitär exprimiert und bilden den basalen Initiationskomplex aus, der die Rekrutierung der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II)

ermöglicht. TFIID, welcher aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) besteht, bindet innerhalb des Core-Promotors an die TATA-Box. TFIIA und TFIIB binden dann an TBP, vervollständigen die Plattform und die RNA-Pol II wird durch TFIIF und TFIIE an den Promotor geleitet. TFIIH wird rekrutiert und dessen DNA-Helikaseaktivität bewirkt die DNA-Doppelstrang-Aufwindung am Transkriptionsstart. Die Proteinkinaseaktivität von TFIIH führt zur Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Pol II, wodurch die Lösung der Polymerase vom Promotor und der Übergang von der Transkriptionsinitiation zur Elongation erfolgt.

### **Rolle von Koaktivatoren bei der AR-vermittelten Transkription**

Die Interaktion des AR mit der basalen Transkriptionsmaschinerie findet direkt oder über Koregulatoren vermittelt statt (Roeder, 1996). Mittlerweile sind über 200 Koregulatoren für den AR beschrieben (Übersicht bei Heemers und Tindall, 2007). Aufgrund der großen Anzahl an Koregulatoren und ihren vielfältigen Funktionen deutet sich an, wie komplex die AR-abhängige Transkription reguliert sein muss. Definitionsgemäß sind Koregulatoren Proteine, die durch einen TF rekrutiert werden und aktivierend (Koaktivator) oder inhibierend (Korepressor) auf dessen Transaktivierung wirken, aber selbst nicht transaktivierend sind. Koaktivatoren bewirken einerseits eine Auflockerung der Chromatinstruktur durch posttranslationale Modifikationen der Histone und ATP-abhängige Chromatinremodelling-Prozesse und erleichtern so die Bindung der TF für folgende Transkriptionsrunden (siehe 1.1.3.2). Die Auflockerung der Chromatinstruktur ist außerdem eine Voraussetzung für die DNA-Bindung der allgemeinen TF und ermöglicht dadurch die Rekrutierung der RNA-Pol II und des Mediator-Komplexes. Dieser stellt eine Verbindung zwischen dem RNA-Pol II-Holoenzym und den Koaktivatoren oder dem Transkriptionsaktivator her und sorgt so für die Ausbildung des Transkriptions-initiationskomplexes. Dabei wirkt der Mediator-Komplex regulierend auf die Initiation, indem er z.B. Enhancer- und Promotorbereiche verbindet (Kornberg, 2005). Koaktivatoren können außerdem die Faltung, Stabilität und subzelluläre Lokalisation des AR über Interaktion oder posttranslationale Modifikationen regulieren (Heinlein *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). So konnte gezeigt werden, dass der AR Ziel von Acetylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung ist (siehe 1.1.3.3) (Faus und Haendler, 2006).

Gleichzeitig stellen Koregulatoren eine Verbindung zu anderen Signaltransduktionswegen her und binden die AR-abhängige Transkription in den zellulären Kontext ein. Vor allem in der Entwicklung von Prostatakarzinomen findet eine Beeinflussung der AR-vermittelten Genexpression durch Wachstumsfaktor-, MAPK-, Cytokin- und WNT-gesteuerte Signalwege statt (Übersicht bei Kaarbo *et al.*, 2007).

### **Atypische Response-Elemente des AR und Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren**

Neben der beschriebenen Transkriptionsinitiation des AR-Homodimers an kanonischen ARE von Zielgenen, können bei Zielgenen mit nicht-kanonischen ARE, die oft nur eine Halbseite oder ein untypisches AR-Bindemotiv aufweisen, zusätzliche spezifische TF über Bindung an die entsprechenden *cis*-Elemente bei der Aktivierung der AR-abhängigen Transkription eine Rolle spielen. Die spezifischen TF regulieren die AR-vermittelte Transkription dabei auf verschiedene Weisen: Sie können direkt mit dem AR interagieren und beeinflussen dadurch seine Bindung an das Response-Element oder aber sie binden innerhalb von Enhancer- oder Silencerbereichen an DNA-Bereiche nahe den Response-Elementen und wirken regulierend auf die Transkription, indem sie Koregulatoren rekrutieren oder an der Positionierung der allgemeinen TF und der RNA-Pol II beteiligt sind. Ein Zusammenspiel des AR findet sich mit spezifischen TF wie z.B. Foxa1 (Forkhead box protein A1), Oct1 (octamer-binding transcription factor), oder GATA2 (GATA binding protein 2) findet sich z.B. im Enhancerbereich des AR-Zielgen TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2), in dem einige untypische, aber keine kanonischen, AREs vorkommen (Wang *et al.*, 2007). Die Kooperation mit spezifischen TF stellt generell eine Möglichkeit dar, Zielgene in einem spezifischen Zell- oder Gewebekontext gezielt zu exprimieren.

### **Kommunikation zwischen Promotor und Enhancer**

Neben ihrer Rolle beim Chromatinremodelling kommt den Koaktivatoren eine Funktion bei der Kommunikation von Promotor- und Enhancer-Elementen zu. Durch Interaktion zwischen Enhancer- und Promotor-gebundenen Faktoren kommt es zu einer räumlichen Annäherung von Promotor- und Enhancer, vermutlich durch Schleifenbildung des dazwischen liegenden Chromatinbereichs.

Wie der Enhancer auf die vom Promotor ausgehende Transkription wirkt, ist letztlich nicht ganz verstanden. Ursprüngliche Annahmen gingen davon aus, dass die Polymerase hauptsächlich über die generellen TF an den Promotor rekrutiert wird und der Enhancer diesen Prozess verstärkt, evtl. durch Bildung einer Interaktionsplattform, welche dann die häufige Assemblierung eines Transkriptionsinitiationskomplexes am Promotor begünstigt. Neuere Befunde zeigen jedoch, dass die Polymerase auch an Enhancerelemente rekrutiert wird, offenbar durch die spezifischen TF und ihre Koaktivatoren. Es wird sogar diskutiert, dass die Polymerase hauptsächlich über den Enhancer rekrutiert wird und von dort an den Promotor gelangt, entweder durch „Looping“, d.h. direkte Translokation durch Ausbildung einer Schleife, oder durch sogenanntes „Tracking“, d.h. Entlanggleiten vom Enhancer über den Zwischenbereich zum Promotor. Im letzten Fall wäre keine direkte Interaktion zwischen Enhancer und Promotor erforderlich. Man könnte annehmen, dass über die Enhancer-

gebundenen Faktoren eine effizientere Rekrutierung der Polymerase erfolgt als über die Promotor-gebundenen basalen TF. Wang *et al.* (2005) postulieren ein kombiniertes „Looping/Tracking“-Modell, bei dem eine direkte Interaktion von Koaktivatoren an Promotor und Enhancer-Elementen stattfindet, die RNA-Pol II an den Enhancerbereich rekrutiert wird und von dort aus entlang des Chromatins zum Promotor gleitet.

Eine weitere Annahme war, dass Enhancer-gebundene Aktivatorproteine, wie der AR, mit ihren Koaktivatoren relativ statisch wirken, indem sie für die Dauer ihrer Aktivierung an ihren Response-Elementen gebunden bleiben und so die Basis für viele Transkriptionsinitiationsereignisse bilden (Hahn, 1998; Wang *et al.*, 2005). Neuere Befunde jedoch, die hauptsächlich durch die neue Technik der Chromatin-Immunpräzipitation erarbeitet wurden, zeichnen ein viel dynamischeres Bild. Danach zeigen zumindest einige der Steroidhormonrezeptoren eine zyklische Assoziation und Dissoziation, welche mit Transkriptionszyklen korreliert. So wurde für den ER und dessen Koaktivatoren eine zyklische Rekrutierung an den Cathepsin D- und pS2-Promotor beschrieben (Shang *et al.*, 2000; Metivier *et al.*, 2003). Shang *et al.* (2000) beobachteten, dass ca. 45 min nach Bindung des ER an Promotor- und Enhancerelemente seiner Zielgene eine Dissoziation des Transkriptionsinitiationskomplexes stattfand, gefolgt von weiteren Transkriptionszyklen. Ebenso zeigte der AR eine zyklische Rekrutierung an die regulatorischen Bereiche des PSA-Gens (Kang *et al.*, 2002 und 2004; Welsbie *et al.*, 2009). Diese Befunde werden als „Promotorclearing“ interpretiert, das dem Freimachen der regulatorischen Elemente für das Assembly neuer Transkriptionsinitiationskomplexe dient. Diese Daten lassen vermuten, dass pro Enhancer/Promotor-gebundenem Rezeptorkomplex nur ein oder wenige Transkriptionsinitiationsereignisse stattfinden.

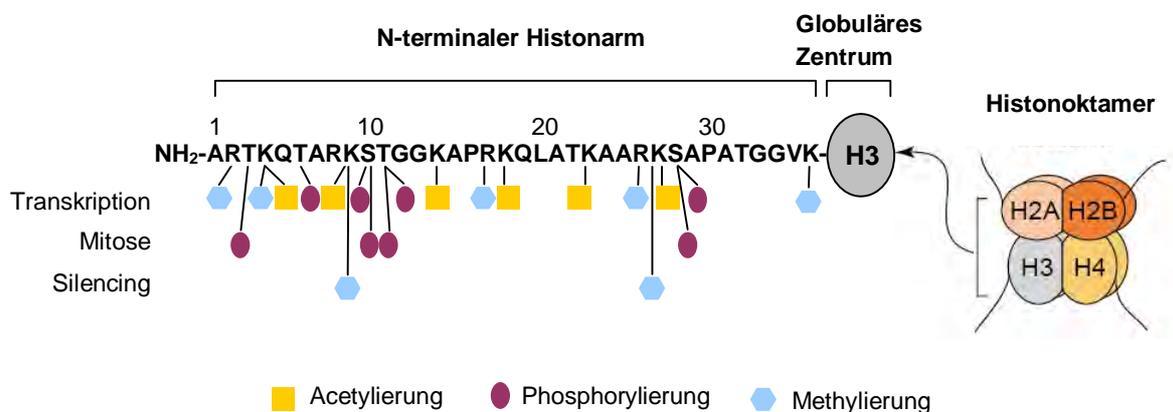
### 1.1.3.2 Histonmodifikationen und Chromatinremodelling

Koaktivatoren können über posttranslationale Histonmodifikationen und Chromatinremodelling-Prozesse dynamische Veränderungen der Chromatinstruktur bewirken, die der Transkriptionsmaschinerie einen Zugang zu regulatorischen Bereichen in Promotor- und Enhancerelementen von Genen ermöglicht.

Die über den Transkriptionsaktivator rekrutierten Koaktivatoren können die N-terminalen Arme aber auch die globulären Zentren der Histone durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, Prolin-Isomerisierung und ADP-Ribosylierung posttranslational modifizieren. Diese dynamischen Veränderungen führen zu einer Auflockerung oder Verdichtung der Chromatinstruktur und bilden Bindestellen für Chromatin-assoziierte Proteine aus (Spencer und Davie, 1999; Jenuwein *et al.*, 2001; Kouzarides, 2007). Zu diesen zählen neben weiteren Koaktivatoren auch ATP-abhängige Chromatinremodelling-Komplexe wie SWI/SNF (switch/sucrose nonfermentable), ISWI (imitation SWI/SNF) und NURD (nucleosome remodeling factor), die einen bestimmten

Bereich des Chromatins durch die Veränderung der Position oder Konformation eines Nukleosoms zugänglich machen (Vignali *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2000).

Aufgrund der zahlreichen möglichen Histonmodifikationen wurde die Histon-Code-Hypothese aufgestellt (Strahl und Allis, 2000). Diese besagt, dass eine spezifische Kombination der unterschiedlichen Modifikationen eine Art Code darstellen, der durch Chromatin-bindende Proteine erkannt wird und der Zelle so für unterschiedlichste Prozesse wie Genaktivierung oder Stilllegung, DNA-Reparatur, DNA-Replikation, Mitose/Meiose sowie der Formierung von Euchromatin und Heterochromatin einen entscheidenden Regulationsmechanismus zur Verfügung stellt. Ein Überblick über die bekannten Modifikationen des N-terminalen Bereichs von Histon H3 ist in Abb. 1.3 dargestellt:



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Histonmodifikationen des N-terminalen Bereichs von Histon H3.**

Dargestellt sind Acetylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen, die während der Transkription, Mitose und bei der Geninaktivierung (Silencing) am N-terminalen Bereich von Histon H3 auftreten. Methylierungen können als Mono-, Di-, oder Trimethylierungen auftreten. Modifiziert nach Nowak und Corces, 2004.

Im Zuge der Transkriptionsaktivierung erfolgt eine kumulative Anhäufung von Histonmodifikationen besonders von Histonacetylierungen (siehe Abb. 1.3). Die Histonacetylierung ist durch Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) reguliert und korreliert im Allgemeinen mit aktiv transkribierten Genen. Die Acetylierung entfernt positive Ladungen von den Lysin-Resten und reduziert dadurch die Affinität zwischen Histonen und der negativ geladenen DNA. Dies führt zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur und gewährt der Transkriptionsmaschinerie einen leichteren Zugang zu Promotorregionen. Die Histonacetylierung und die Acetylierung des AR durch die Histonacetylasen SRC/p160, Tip60 (Tat-interacting protein 60 kDa), p300/CBP (E1A binding protein p300/CREB-binding protein) und PCAF (p300/CBP-associated factor) zählen zu den bisher am besten verstandenen Funktionen von Koaktivatoren (Gaughan *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2000).

Die Methylierung kann entweder aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken, abhängig von der Position und dem Methylierungsgrad (mono-, di- oder trimethyliert) (Ruthenburg *et al.*, 2007). Die Methylierung von H3 an Lysin (K)9 und K27 ist eine

repressorische Modifikation, die zur Geninaktivierung führt und vor allem in dicht gepacktem Heterochromatin zu finden ist (Kouzarides *et al.*, 2002). Dagegen wirkt die Di- und Trimethylierung von H3 an K4 (Santos-Rosa *et al.*, 2002) und die Arginin-Methylierung von H3 an R2, 17 und 26 sowie von Histon H4 an R3 (Wang *et al.*, 2001; Schurter *et al.*, 2001) transkriptionsaktivierend.

Die Phosphorylierung von H3 an Serin (S)10 wirkt ebenfalls aktivierend. Die Phosphorylierung von H3S10 durch MSK1/2 (Nuclear mitogen-and stress-activated protein kinase 1/2) und RSK2 (Ribosomal S6 kinase 2) konnte im Zusammenhang mit der Aktivierung von NFκB-regulierten Genen und den „immediate early“-Genen *c-fos* und *c-jun* nachgewiesen werden (Clayton *et al.*, 2000; Sassone-Corsi *et al.*, 1999). Für die AR-abhängige Transkription konnte eine Phosphorylierung von H3S10 am PSA-Enhancer und Promotor detektiert werden, die mit der Acetylierung von H3K9 und K14 sowie der Rekrutierung der RNA-Pol II korreliert (Kang *et al.*, 2004).

Alle anderen Histonmodifikationen sind in Bezug zur Transkriptionsaktivierung wenig untersucht. So stellt die Ubiquitinierung eine Modifikation dar, die für H2AK119 als reprimierend, für H2BK120 je nach Kontext als aktivierend oder reprimierend beschrieben ist. Für die Monoubiquitinierung von H2BK120 wird ein Zusammenhang mit der Methylierung von H3K4 und K79 postuliert, die mit aktiv transkribiertem Chromatin korreliert (Osley, 2006; Weake und Workman, 2008).

### 1.1.3.3 Posttranslationale Modifikationen des AR

Posttranslationale Modifikationen des AR wie Acetylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung stellen neben dem Zelltyp-spezifischen Kofaktor-Repertoire und den unterschiedlichen Chromatinmodifikationen an den regulatorischen Elementen der Zielgene einen wichtigen Regulationsmechanismus für die Spezifität und Aktivität des Liganden-abhängigen AR dar (Übersicht bei Faus und Haendler, 2006). Die Modifikationen des Rezeptors verändern dessen Aktivität, Stabilität, subzelluläre Lokalisation sowie Interaktion mit anderen Proteinen.

#### Phosphorylierung, Acetylierung und Sumoylierung

Die Phosphorylierung ist dabei die am besten untersuchte posttranslationale Modifikation des AR. Gioeli *et al.* (2002) konnten sieben *in vivo* Phosphorylierungsstellen (AS 16, 81, 94, 256, 308, 424, 650) des AR identifizieren, die auf Behandlung mit unterschiedlichen Agonisten hin, alle bis auf AS 94 Androgen-abhängig phosphoryliert wurden. Sie folgerten daraus, dass der AR ein Knotenpunkt innerhalb der Signaltransduktionswege darstellt, der durch unterschiedliche äußere Signale und die entsprechenden Kinasen, Phosphatasen und Effektorproteine reguliert wird. Mittels *in-vitro*-Kinaseassays konnten die MAPK (ERK2,

Extracellular signal-regulated kinase 2) (Yeh *et al.*, 1999), Akt (Lin *et al.*, 2001) und CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) (Chen S. *et al.*, 2006) als AR-Kinasen identifiziert werden.

Die Acetylierung des AR erfolgt in der „Hinge“-Region an AS 630-633 durch die Histonacetyltransferasen Tip60, P/CAF und p300 (Fu *et al.*, 2000). Sie beeinflusst die subzelluläre Lokalisation, Interaktion mit weiteren Koaktivatoren und wirkt stimulierend auf die Aktivität des AR (Thomas *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2003).

Die Sumoylierung des AR erfolgt Hormon-abhängig an K386 und K520 durch Ubc9 (Ubiquitin conjugating enzyme 9) und E3-Ligasen der PIAS (Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription)-Familie (Poukka *et al.*, 2000; Nishida *et al.*, 2002). Die Sumoylierung wirkt hauptsächlich reprimierend auf die Aktivität des AR. So ist z.B. die Korepressor-Funktion von Daxx (death-associated protein 6) abhängig von der Sumoylierung des AR (Lin *et al.*, 2004). Entsprechend erhöht die Desumoylierung des AR durch die SUMO-spezifische Protease SENP1 die AR-abhängige Transkription der FKBP51- und Probasin-Gene (Kaikkonen *et al.*, 2009).

### **Ubiquitinierung**

Abhängig von der Länge und der Verzweigung der angefügten Ubiquitinkette kann der AR zum proteasomalen Abbau markiert oder aber in seiner Aktivität reguliert werden. So stellen K48-verknüpfte Ubiquitinketten das Signal zum Abbau dar, während K6-angeheftete Ubiquitinketten den proteasomalen Abbau verhindern können (Shang *et al.*, 2005). K63-Verknüpfungen konnten Funktionen in DNA-Reparatur (Spence *et al.*, 1995), Kinaseaktivierung (Deng *et al.*, 2000) und Endozytose (Bonifacino und Weissman, 1998) zugeschrieben werden. Die Anheftung der Ubiquitin-Moleküle erfolgt dabei über einen Dreischritt Mechanismus der die sequentielle Aktivität von E1-, E2- und E3-Enzymen voraussetzt (Ciechanover *et al.*, 2000): Das E1-Enzym bindet und aktiviert ATP-abhängig das Ubiquitin-Molekül, die E2-Ubiquitin-Konjugase übernimmt dieses vom E1-Enzym und überträgt es auf einen Lysinrest im Zielprotein. Die E3-Ubiquitin-Ligase vermittelt die Substratspezifität, indem sie die Verbindung zwischen dem Substratprotein und der E2-Ubiquitin-Konjugase vermittelt. Abhängig von der Anzahl angefügter Ubiquitin-Moleküle unterscheidet man zwischen Mono-, Oligo- und Polyubiquitinierung. Die Monoubiquitinierung des AR beeinflusst dessen intrazelluläre Verteilung und stellt vermutlich die transkriptionsaktive Form des AR dar (Burgdorf *et al.*, 2004). Demgegenüber markieren Lysin48-verknüpfte Polyubiquitin-Ketten den AR zum proteasomalen Abbau.

Für den AR sind mit E6-AP, Mdm2, PIRH2, SNURF/RNF4, RNF6 und CHIP diverse E3-Ligasen beschrieben (Übersicht bei Heemers und Tindall, 2007). Für Mdm2 konnte gezeigt werden, dass es Phosphorylierungs-abhängig die Polyubiquitinierung des AR induziert und dadurch dessen Abbau bewirkt (Lin *et al.*, 2002). Eine andere Studie konnte Mdm2 am PSA-

Promotor in Assoziation mit AR und HDAC1 detektieren, wobei die Deacetylaseaktivität von HDAC1 die Ubiquitinierung des AR durch Mdm2 erleichtert (Gaughan *et al.*, 2005). Die Ubiquitinierung des AR an K845 und K847 durch die E3-Ligase RNF6 (RING finger protein 6) ermöglicht eine selektive Bindung des AR an spezifische Promotorbereiche und dient gleichzeitig als Bindestelle für Koaktivatoren, so dass die Aktivität des AR erhöht wird (Xu *et al.*, 2009). Da gezeigt werden konnte, dass die Inhibition des Proteasoms durch MG132 produktive Runden der AR-abhängigen Transkription am PSA-Promotor verhindert und die S1-Untereinheit des 19S Proteasoms mit einer ähnlichen Assoziationskinetik wie die des AR am aktiven PSA-Promotor nachgewiesen wurde, scheint der Abbau des Rezeptors für die Aufrechterhaltung der Transkription erforderlich zu sein (Kang *et al.*, 2002). Der Ubiquitinierungsstatus des AR wirkt sich somit auf Aktivität und Abbau sowie die Spezifität für bestimmte Zielgene aus.

## **1.2 Die AR-Koaktivatoren ZIPK und AATF**

Von unserer Arbeitsgruppe wurde mit AATF (apoptosis-antagonizing transcription factor) zunächst ein TF identifiziert, der aktivierend auf die AR-abhängige Transkription wirkte (Leister *et al.*, 2003). In weiteren Studien wurden Interaktionspartner von AATF auf ihr transaktivierendes Potential untersucht und mit ZIPK (zipper interacting protein kinase), TSG101 (tumor susceptibility gene 101) und Blos2 (Kurzform von BLOC1S2, biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 2) konnten neue Koaktivatoren des AR beschrieben werden (Leister *et al.*, 2008; Burgdorf *et al.*, 2004; Felten *et al.*, 2008). Alle Versuche basierten dabei auf der ektopischen Expression von Proteinen der Ratte.

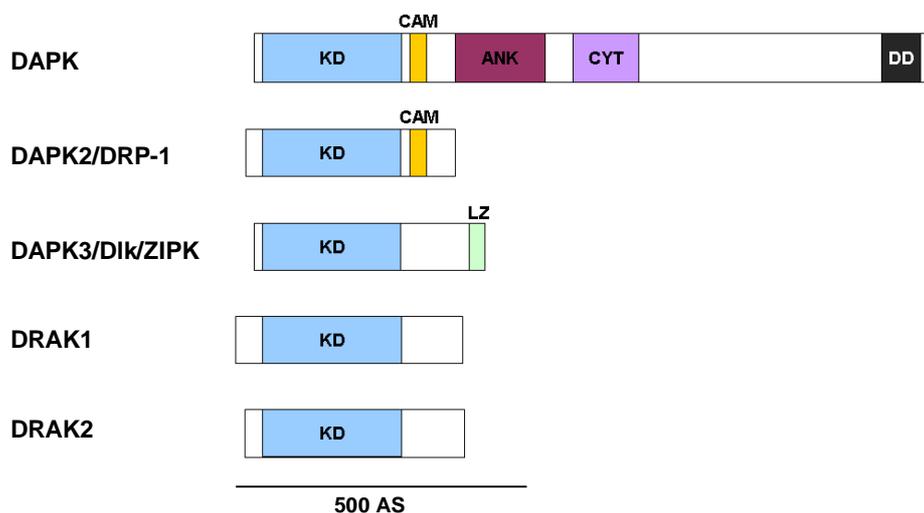
### **1.2.1 Die ZIPK**

Die ZIPK wurde 1998 unabhängig von zwei Arbeitsgruppen entdeckt. Die humane ZIPK wurde über das Hefe-Zwei-Hybrid-System als Interaktionspartner des TF ATF4 (Activating transcription factor 4), einem Mitglied der ATF/CREB (cAMP-response element binding proteins)-Familie entdeckt und aufgrund der Interaktion über das C-terminale Leucin-Zipper-Motiv als „Zipper Interacting Protein Kinase“ (ZIPK) bezeichnet (Kawai *et al.*, 1998). Zeitgleich wurde auf der Suche nach Proteinkinasen, die an der Wachstumskontrolle beteiligt sind und durch den Transformationsprozess von SV40 aktiviert werden, aus einer Ratten cDNA-Bank die Dlk (DAP-like kinase) isoliert. Sie erhielt ihren Namen aufgrund der 80 % Homologie zur katalytischen Domäne der DAP-Kinase (Kögel *et al.*, 1998).

Bei der Familie der ubiquitär exprimierten DAP-Kinasen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie der N-terminalen katalytischen Domäne einer

Familie zugeordnet werden (siehe Abb. 1.4). Die Benennung erfolgte nach der zuerst entdeckten DAPK (Death associated Protein Kinase) (Deiss *et al.*, 1995). Die DAPK ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin (CaM)-abhängige Kinase, die eine Rolle im INF (Interferon)- $\gamma$ -, TNF (Tumor necrosis factor)- $\alpha$ - und TGF (Transforming growth factor)- $\beta$ -induzierten Zelltod spielt (Cohen *et al.*, 1997; Inbal *et al.*, 1997). Neben der DAPK umfasst die Familie vier weitere Mitglieder: die in unserer Arbeitsgruppe entdeckte DIK auch als DAPK3 oder ZIPK bezeichnet (Kögel *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 1998), die DAPK2 (DAP kinase 2) oder DRP-1 (DAP-related kinase) (Kawai *et al.*, 1999; Inbal *et al.*, 2000), DRAK1 und DRAK2 (DAPK related apoptosis-inducing kinase 1 und 2) (Sanjo *et al.*, 1998).

DAPK2 und ZIPK weisen gegenüber der DAPK eine 83,3 % bzw. 79,8 % Sequenzhomologie der katalytischen Domänen auf. Die entfernter verwandten Kinasen DRAK1 und DRAK2 sind dagegen nur zu 48,5 % bzw. 51,9 % homolog zur Kinasedomäne der DAPK (Sanjo *et al.*, 1998).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der fünf Mitglieder der DAP-Kinase Familie.**

KD bezeichnet die unter allen Familienmitgliedern hoch konservierte katalytische Domäne. CAM stellt die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Binderegion dar. Die DAPK besitzt zusätzlich eine Domäne mit mehreren Ankyrin-Repeats (ANK), eine Cytoskelett-bindende Region (CYT) und eine Todesdomäne (DD). Die ZIPK besitzt als einziges Familienmitglied ein C-terminales Leucin-Zipper-Motiv (LZ). Modifiziert nach Kögel *et al.*, 2001.

Die C-terminalen Regionen der Kinasen sind nicht konserviert. DAPK und DAPK2 enthalten eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Binderegion. Zusätzlich besitzt die DAPK acht Ankyrin-Repeats, eine Cytoskelett-bindende Region und eine sogenannte Todesdomäne, auf der unter anderem ihre pro-apoptotische Funktion beruht. Die ZIPK weist als einziges Mitglied dieser Familie ein C-terminales Leucin-Zipper-Motiv auf, über welches eine Homo- sowie Heterodimerisierung erfolgen kann. Die Kinasen DRAK1 und DRAK2 besitzen im C-Terminus keine bekannten Struktur motive.

Die humane ZIPK umfasst 454 AS, die murine 448 AS. Die 52 kDa großen Proteine bestehen aus einer N-terminalen katalytischen Domäne (AS 13-275), einer Argininreichen C-terminalen Region mit Leucin-Zipper-Motiv (AS 427-441(human) bzw. AS 411-448 (murin)) und vier putativen Kernlokalisationssequenzen. Es konnte für die murine ZIPK gezeigt werden, dass die Kernlokalisationssequenz 4 (AS 405-410) für den Kerntransport verantwortlich ist (Kögel *et al.*, 1999).

Evolutionär betrachtet handelt es sich bei der ZIPK um ein hochkonserviertes Protein vom Zebrafisch bis hin zum Menschen mit Sequenzdivergenzen des murinen Orthologs (Shoval *et al.*, 2007). Einer der sequenzspezifischen Unterschiede beeinflusst die subzelluläre Lokalisation der Kinasen. So wurde für die humane ZIPK eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation, mit einem geringen Anteil an Zellen mit diffuser Kernlokalisierung beschrieben (MacDonald *et al.*, 2001b; Komatsu & Ikebe, 2004; Shoval *et al.*, 2007). Die Mutation der Phosphorylierungsstellen T299 und T300 zu Alanin führte zu einer Relokalisation der humanen Kinase aus dem Cytoplasma in den Kern (Graves *et al.*, 2005). In der murinen Kinase sind diese Aminosäuren nicht konserviert, so dass die murine Kinase eine überwiegende Kernlokalisierung aufweist. Dort assoziiert sie mit diskreten Punkten, sogenannten „Speckles“, welche wiederum partiell mit PML-NBs (promyelocytic leukemia nuclear bodies) kolokalisieren (Kögel *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2003). PML-NBs sind dynamische subnukleäre Mikrodomänen, denen eine Funktion in der Apoptoseregulation, Transkriptionsregulation, Tumorsuppression, Wachstumskontrolle und Chromatinstrukturierung zugeschrieben wird (Übersicht bei Salomoni und Pandolfi, 2002). Die Ubiquitinierung der ZIPK durch die Ubiquitin-Konjugase UbcH5 führt zu einer gesteigerten Akkumulation in PML-NBs, ohne die Proteinlevel der ZIPK zu beeinflussen (Ohbayashi *et al.*, 2008).

Die Regulation der Aktivität der ZIPK erfolgt hauptsächlich durch Phosphorylierung und zwar sowohl durch Autophosphorylierung als auch durch andere Kinasen. Es sind sechs Autophosphorylierungsstellen beschrieben, von denen T180, T225 und T265 für eine vollständige Aktivität notwendig sind (Haystead 2005; Graves *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von T299 reguliert die subzelluläre Lokalisation der ZIPK. Der T306- und S311-Autophosphorylierung konnte noch keine Funktion zugeordnet werden. Neben der Autophosphorylierung wird die ZIPK als Substrat der DAPK an mindestens sechs Stellen (T299 und S309, 311, 312, 318, 326) von dieser phosphoryliert (Shani *et al.*, 2004). Ein funktionaler Aspekt der Phosphorylierung der ZIPK durch die DAPK findet sich in der Regulation der Expression von Entzündungsgenen. IFN- $\gamma$  aktiviert eine Kinase-Kaskade, in deren Verlauf die DAPK die ZIPK phosphoryliert, welche wiederum das ribosomale Protein L13a phosphoryliert. L13a wird vom Ribosom freigesetzt und es folgt die translationale Stilllegung von GAIT-Element (IFN-gamma-activated inhibitor of translation)-enthaltenden

mRNAs. Da die mRNAs beider Kinasen 3'UTR-GAIT-Elemente aufweisen, werden sie mittels Rückkopplungshemmung inhibiert, wodurch der Zelle ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der Entzündungsantwort zur Verfügung steht (Mukhopadhyay *et al.*, 2008).

Eine weitere Regulation der Aktivität der ZIPK erfolgt durch ROCK1 (Rho kinase 1). ROCK1 phosphoryliert die ZIPK *in vitro* an T265 und 299. Dies führt zu einer gesteigerten Aktivität der ZIPK (Hagerty *et al.*, 2007).

### 1.2.1.1 Substrate und Interaktionspartner der ZIPK

Zu den Substraten der ZIPK zählen *in vitro* die leichte Kette von Myosin II (MLC, myosin light chain) (Komatsu und Ikebe, 2004), die Histone H2A, H3 und H4 (Kögel *et al.*, 1998; Preuss *et al.*, 2003b), sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (Preuss *et al.*, 2003a). Außerdem gehören das proapoptotische Protein Par-4 (prostate apoptosis response-4) (Page *et al.*, 1999a), der TF STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) (Sato *et al.*, 2005), das Myosin-Phosphatase-Bindeprotein MYPT1 (myosin phosphatase targeting protein-1) (MacDonald *et al.*, 2001), der Myosin-Phosphataseinhibitor CPI-17 (MacDonald *et al.*, 2001), das ribosomale Protein L13a (Mukhopadhyay *et al.*, 2008) und die Spleißingfaktoren SC35 und ASF/SF2 (Engemann *et al.*, 2002; Engemann Dissertation, 2006) zu den *in-vitro*-Substraten der ZIPK. Weiterhin sind Peptide des p53-Regulators Mdm2 (murine double minute 2) und des Cdk-Inhibitors p21<sup>CIP1</sup> als *in-vitro*-Substrate beschrieben (Burch *et al.*, 2004).

Aufgrund der wachsenden Zahl an bekannten Phosphorylierungsstellen in Substraten der ZIPK lässt sich die Konsensussequenz (R/K)XY(S/T)Y ableiten, wobei X für eine beliebige Aminosäure, aber bevorzugt Arginin oder Lysin und Y für eine beliebige Aminosäure, außer Prolin oder saure Reste steht (Scheidtmann, 2007). Am Beispiel von Mdm2 und STAT3 zeigt sich jedoch, dass die Substrat-Spezifität auch von strukturellen Gegebenheiten beeinflusst wird. So werden Mdm2-Peptide stark phosphoryliert, das Protein jedoch nur sehr schwach (Burch *et al.*, 2004) und in STAT3 entspricht die Phosphorylierungsstelle S727 nicht der Konsensussequenz, wird aber durch die ZIPK phosphoryliert (Sato *et al.*, 2005).

Bisher bekannte Interaktionspartner der murinen ZIPK sind die Transkriptionsfaktoren AATF (apoptosis antagonizing transcription factor) (Page *et al.*, 1999b), STAT3 (Sato *et al.*, 2005) und ATF4 (Kawai *et al.*, 1998). Daneben sind MYPT1 (MacDonald *et al.*, 2001; Endo *et al.*, 2004), Daxx (death-associated protein 6) (Kawai *et al.*, 2003), CDC5 (cell division cycle 5) (Engemann *et al.*, 2002),  $\gamma$ -Tubulin (Preuss *et al.*, 2003a), der AR (Leister *et al.*, 2008) und die Ubiquitin-Konjugase UbcH5c (Ohbayashi *et al.*, 2008) beschrieben. Par-4 wurde als Interaktionspartner der murinen ZIPK identifiziert (Page *et al.*, 1999a), jedoch konnte diese Interaktion für die humane Kinase nicht bestätigt werden (Shoval *et al.*, 2007). Für die humane Kinase wurden Interaktionen mit dem AR (Leister *et al.*, 2008), DAPK (Shani *et al.*,

2004), ROCK1 (Hagerty *et al.*, 2007), ATF4 (Kawai *et al.*, 1998) und p21<sup>CIP1</sup> (Burch *et al.*, 2004) beschrieben.

### 1.2.1.2 Funktionen der ZIPK

Anhand der bekannten Interaktionspartner und Substrate können der ZIPK Funktionen in der Apoptoseregulation, Zellmotilität, Immunantwort (siehe 1.2.1), Mitose und Transkriptionsregulation zugeordnet werden (Übersicht bei Scheidtmann, 2007):

#### **Apoptose**

Die Koexpression der murinen ZIPK mit dem pro-apoptische Protein Par-4 löst Apoptose aus. Par-4 rekrutiert die kernständige murine ZIPK ins Cytoplasma, wo beide Proteine am Aktincytoskelett kolokalisieren. Die Assoziation mit den Aktinfilamenten bewirkt eine starke Kontraktion und Umstrukturierung der Aktomyosinfilamente (Page *et al.*, 1999a). Die Apoptoseauslösung ist dabei abhängig von der Phosphorylierung von Par-4 an T155 durch die ZIPK (Boosen *et al.*, 2009). Der Transkriptionsfaktor AATF wurde als Gegenspieler der durch Par-4 und muriner ZIPK-vermittelten Apoptose beschrieben, wobei der zugrunde liegende Mechanismus unbekannt ist. Es wurde vermutet, dass AATF direkt oder indirekt an der Regulation des pro-apoptische Potentials von Par-4 beteiligt ist (Page *et al.*, 1999b). Ferner konnte gezeigt werden, dass die murine ZIPK im Kern zusammen mit den pro-apoptische Proteinen Daxx und Par-4 in PML-NBs kolokalisiert und von dort durch Aktivierung von Caspasen Apoptose auslösen kann (Kawai *et al.*, 2003).

Die humane ZIPK kann Par-4-unabhängig Apoptose auslösen. Möglicherweise wird sie durch die DAPK aktiviert und phosphoryliert dann, wie auch die murine ZIPK, die regulatorische leichte Kette von Myosin II (MLC). Die MLC Phosphorylierung wird dabei in Zusammenhang mit dem „membrane blebbing“ in apoptotischen Zellen gebracht (Mills *et al.*, 1998; Haystead, 2005).

Da sowohl für ZIPK (Sato *et al.*, 2005; Leister *et al.*, 2008) als auch für Par-4 (Gao *et al.*, 2006), AATF (Leister *et al.*, 2003) und Daxx (Lin *et al.*, 2004) Funktionen als Koregulatoren von Transkriptionsfaktoren beschrieben sind, wäre auch eine Regulation über eine gezielte Aktivierung oder Repression von Apoptose-relevanten Genen denkbar.

#### **Assoziation mit dem Cytoskelett und mitotischen Strukturen**

Die ZIPK ist an der Regulation des Aktincytoskeletts, der Zellpolarität, der Zellmotilität und Cytokinese beteiligt (Murata-Hori *et al.*, 2001; Komatsu und Ikebe, 2004). Hierbei scheint der Einfluss der ZIPK über den Phosphorylierungsstatus von MLC auszugehen. Sie kann zum einen MLC direkt phosphorylieren oder aber die Dephosphorylierung von MLC verhindern. Dazu interagiert die ZIPK mit MYPT1, einer Untereinheit der Protein Phosphatase 1c (PP1c)

und phosphoryliert MYPT1 an T696, wodurch die Phosphataseaktivität inhibiert und dadurch die MLC Phosphorylierung erhöht wird (MacDonald *et al.*, 2001a; Endo *et al.*, 2004). Parallel wird CPI-17, ein Inhibitor der Myosin-Phosphatase, durch Phosphorylierung durch die ZIPK aktiviert (MacDonald *et al.*, 2001b). Dies führt in glatten Muskelzellen zu einer erhöhten Kontraktion.

Während der Mitose assoziiert die ZIPK mit unterschiedlichen mitotischen Strukturen und zeigt dabei ein ähnliches Lokalisationsmuster wie die Mitglieder des „Chromosomal Passenger“ Komplexes. Murine ektopisch exprimierte GFP-ZIPK kolokalisiert während des gesamten Zellzyklus mit den Centrosomen, wo sie mit  $\gamma$ -Tubulin interagiert. Von der frühen Prophase bis zur Anaphase assoziiert sie mit Centromeren. Hier liegt sie kolokalisiert mit phosphoryliertem CENP-A und an T11 phosphoryliertem Histon H3 vor (Preuss *et al.*, 2003b). Von der Telophase bis zur Cytokinese kolokalisiert die ZIPK mit dem kontraktilen Ring speziell mit an S19 phosphorylierter MLC. Die Expression von Deletionsmutanten oder die Herunterregulation durch siRNA führt jeweils zu mehrkernigen Zellen, was der ZIPK eine wichtige Funktion in der Cytokinese, vermutlich bei der MLC-Phosphorylierung, zukommen lässt (Manderscheid und Scheidtman, in Vorbereitung). Für die endogene humane ZIPK konnte die Lokalisation an den Centrosomen, den Centromeren, der mitotischen Spindel sowie am kontraktilen Ring und Mittelkörperchen bestätigt werden (Brinckmann, Diplomarbeit 2007; Conradi, Dissertation 2009).

### **Transkriptionsregulation**

Für eine Beteiligung der ZIPK an der Transkriptionsregulation spricht ihre Interaktion mit verschiedenen Koregulatoren, Transkriptions- und Spleißfaktoren.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Befund, dass die murine ZIPK einen koaktivierenden Einfluss auf die AR-vermittelte Transkription ausübt. Dabei wird die Hormon-abhängige Interaktion mit dem AR durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor AATF stabilisiert. Auf AATF wird im folgenden Abschnitt (1.2.2) aufgrund seiner Relevanz für diese Arbeit ausführlich eingegangen. In Reporterstudien konnte neben ihrem koaktivierenden Effekt auf die AR-abhängige Transkription auch ein aktivierender Effekt auf p53-abhängige Promotoren nachgewiesen werden. Der Mechanismus, wie die ZIPK ihre Koaktivatorfunktion ausübt, ist unbekannt bis auf die Tatsache, dass dafür ihre Kinaseaktivität essentiell ist. Da weder der AR noch AATF Substrate der ZIPK sind (Leister *et al.*, 2008; Page *et al.*, 1999b) übt sie möglicherweise durch Phosphorylierung von Chromatinproteinen einen Einfluss auf die Transkriptionsinitiation aus. Als potentiell Substrat kommt Histon H3T11 in Frage, welches *in vitro* durch ZIPK phosphoryliert wird (Preuss *et al.*, 2003b).

Die erste funktionelle Beteiligung der murinen ZIPK an Transkriptionsprozessen wurde für den TF STAT3 beschrieben, der sowohl Interaktionspartner als auch Substrat der ZIPK ist.

STAT3 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Apoptose und Transformationsprozessen. Es ist in vielen Tumoren konstitutiv aktiv und lässt sich somit als Onkogen klassifizieren. Interleukin-6 aktiviert den Jak/STAT-Signalweg in dessen Ablauf die ZIPK mit STAT3 interagiert, es an S727 phosphoryliert und dadurch dessen transkriptionelle Aktivität verstärkt (Sato *et al.*, 2005). Da für den AR, p53 und STAT3 eine Beteiligung an der Regulation der p21-Expression beschrieben ist und alle drei TF durch ZIPK koaktiviert werden, könnte sich ein möglicher Konvergenzpunkt in der Regulation der p21-Expression abzeichnen (Tang *et al.*, 2009; Macleod *et al.*, 1995; Hawthorne *et al.*, 2009).

Der Interaktionspartner ATF4, über den die humane ZIPK isoliert wurde (Kawai *et al.*, 1998), ist ein Mitglied der ATF/CREB-Transkriptionsfaktor-Familie, die eine Rolle bei der ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Stressantwort spielt (Rutkowski *et al.*, 2004; Rzymiski *et al.*, 2009). Kawai *et al.* (1998) konnten die Interaktion *in vivo* zwar bestätigen, ein funktionaler Aspekt der Interaktion wurde aber nicht weiter untersucht.

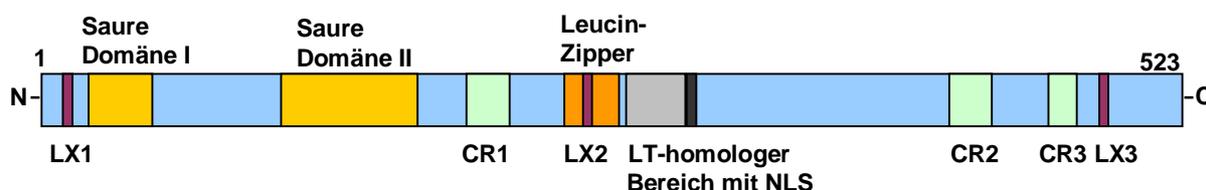
Der Interaktionspartner Par-4 wurde ursprünglich bei der Suche nach Genen identifiziert, die nach Apoptoseinduktion in Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzellen hochreguliert wurden (Sells *et al.*, 1994). Für Par-4 ist einerseits eine Funktion als Korepressor des TF WT1 (Wilms tumor 1) (Johnstone *et al.*, 1996) andererseits als Koaktivator des AR beschrieben (Gao *et al.*, 2006). Interessanterweise konnten Guo und Xie (2004) auch eine direkte Interaktion von AATF und Par-4 in Nervenzellen zeigen. AATF verhindert dabei die durch Par-4 induzierte Produktion und Sekretion des A $\beta$ 42-Peptids unter apoptotischen Bedingungen (Guo und Xie, 2004). Die untereinander stattfindenden Interaktionen sprechen für eine mögliche (funktionelle) Kooperation auch in Transkriptionsprozessen.

Der Transkriptions- und Spleißingfaktor CDC5 interagiert mit der ZIPK und kolokalisiert mit dieser in PML-NBs. CDC5 ist möglicherweise am G2/M-Übergang durch Spleißen von pre-mRNAs speziell der von  $\alpha$ -Tubulin beteiligt (Burns *et al.*, 2002). CDC5 wird zwar nicht von der ZIPK phosphoryliert, mit SC35 und SF2/ASF konnten jedoch weitere Spleißfaktoren identifiziert werden, die durch die ZIPK *in vitro* phosphoryliert werden (Engemann *et al.*, 2002).

## 1.2.2 Der Transkriptionsfaktor AATF

AATF wurde als Interaktionspartner der murinen ZIPK aus einer Rattenfibroblasten cDNA-Bank isoliert. Da AATF der durch Dlk und Par-4-vermittelten Apoptose entgegenwirkt, wurde es „Apoptosis Antagonizing Transcription Factor“ genannt (Page *et al.*, 1999b). AATF ist ein 523 Aminosäuren umfassendes, ubiquitär exprimiertes Protein, für das sich hoch konservierte Orthologe vom Menschen (Che1, 75 % homolog) über die Maus (Traube, 95 %) bis zur Hefe (37 % homolog) finden (Fanciulli *et al.*, 2000; Lindfors *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000).

Der N-terminale Bereich des Proteins enthält zwei extrem saure Bereiche (AS 20-49, 107-170), die durch eine Serin/Threonin-reiche Region getrennt werden. Außerdem weist AATF ein Leucin-Zipper-Motiv (AS 239-260), ein Kernlokalisierungssignal (um AS 300), mehrere putative Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen CKII, PKA und PKC, drei LxxLL-Motive (AS 11-15, 246-250, 483-487) und eine Sequenz, die zum Large-T-Protein des Polyomavirus SV40 homolog ist (AS 272-295), auf (siehe Abb. 1.5) (Page *et al.*, 1999b).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung von AATF.**

Das Polypeptid aus der Ratte umfasst 523 AS, das humane 558 AS. Gelb sind die beiden N-terminalen sauren Domänen eingezeichnet. Die drei LxxLL-Motive sind rosa markiert. Die Lage des Leucin-Zippers (orange), die Kernimportsequenz (schwarz), sowie der LT-homologe Bereich (grau) sind eingezeichnet. Die drei hochkonservierten Bereiche (CR1-3) sind in hellgrün dargestellt. Die Größe der jeweiligen Domäne ist proportional zur Länge in Aminosäuren. Modifiziert nach Leister *et al.* (2003).

Aufgrund der Strukturmerkmale und seiner nukleären Lokalisation wurde für AATF eine Funktion als TF postuliert. Dies ließ sich durch die starke Transaktivierungsaktivität eines Gal4-DBD-AATF-Fusionsproteins in einem Hefe-2-Hybrid-Versuch bestätigen (Page *et al.*, 1999b). Die sauren Domänen im N-Terminus sind charakteristisch für TF wie VP16 (Tumbar *et al.*, 1999) und BRCA (Hu *et al.*, 1999). Ihnen wird dabei eine Funktion im Chromatinremodelling zugeschrieben. Daneben weist AATF drei LxxLL-Motive auf, die charakteristisch für Koaktivatoren von Nuklearrezeptoren sind (Heery *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass AATF über die LxxLL-Motive 1 und 3 mit dem AR Hormon-abhängig interagiert und außerdem *in vitro* mit dem ER und GR interagieren kann. Auf die AR- und GR-vermittelte Reporterexpression wirkt AATF dabei aktivierend (Leister *et al.*, 2003 und 2008). Möglicherweise übt AATF im Zusammenspiel mit anderen Koaktivatoren wie der Histonacetyltransferase p300 (Leister *et al.*, 2003), oder als Adapter zwischen spezifischen und allgemeinen TF seine transaktivierende Wirkung aus.

Da das humane AATF als Interaktionspartner der RNA-Pol II Untereinheit 11 isoliert wurde, könnte AATF eine Rolle bei der Positionierung der RNA-Pol II übernehmen (Fanciulli *et al.*, 2000). Inwieweit es sich *in vivo* um eine funktionelle Interaktion von AATF mit der RNA-Pol II handelt ist allerdings fraglich, da die Deletion des Polymerase-Bindebereichs innerhalb von AATF keinen Effekt auf die koaktivierende Wirkung auf den AR aufwies (Sarah Appel, Diplomarbeit, 2004).

AATF interagiert außerdem mit den Transkriptionsfaktoren Rb/E2F (Fanciulli *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2002) und SP1 (Di Padova *et al.*, 2003). Es konkurriert mit der

Histondeacetylase HDAC1 um die Bindung an SP1 oder die Pocket-Region von Rb. Das Tumorsuppressorprotein Rb seinerseits wirkt als Repressor auf die Zielgene von E2F, solange es im Komplex mit der Histondeacetylase vorliegt (Brehm *et al.*, 1998). Durch Verdrängung der HDAC1, die eine Verdichtung des Chromatins durch Entfernung von Acetylresten von Histon H3 bewirkt, kann die Repression der E2F-abhängigen Gene aufgehoben werden. AATF spielt somit eine wichtige Rolle bei der Restriktionspunkt-Steuerung und damit beim Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus (Fanciulli *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2002). Die Herunterregulierung von AATF bei der TGF- $\beta$ -induzierten Differenzierung (Lindfors *et al.*, 2000), sowie in bestimmten Tumorzelllinien (Di Padova *et al.*, 2003) sind weitere Aspekte, die für eine Beteiligung von AATF an der Zellzykluskontrolle sprechen.

Für AATF wurde auch eine wichtige Rolle in der DNA-Schadenskontrolle gefunden (Bruno *et al.*, 2006 und 2008; De Nicola *et al.*, 2007; Di Certo *et al.*, 2007). Nach UV-Bestrahlung erfolgt eine Interaktion und Phosphorylierung von AATF mit den Checkpoint-Kinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) und Chk2 (checkpoint kinase 2). Die Hyperphosphorylierung führt zur Akkumulation von AATF, welches von E2F-abhängigen Promotoren abgezogen wird und stattdessen an die Promotoren von p53 und p21 rekrutiert wird. Durch die Expression des CDK-Inhibitors p21<sup>CIP1</sup> und die Repression von CDC25 durch p53 nimmt AATF Einfluss auf den G2/M-Kontrollpunkt. Die AATF-Proteinlevel werden nach Apoptose-Induktion durch Pin-1 (peptidyl-prolyl isomerase 1) reguliert, welches die Struktur von AATF modifiziert, wodurch AATF mit Mdm2 interagieren kann und durch dieses für den proteasomalen Abbau markiert wird (De Nicola *et al.*, 2007).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Maus Ortholog „Traube“ essentiell für die Proliferation während der frühen Embryogenese ist (Thomas *et al.*, 2000). Ein Knockout des murinen AATF ist embryonal letal mit dem Tag 3,5. Thomas *et al.* (2000) vermuten, dass AATF an der Auflockerung der Chromatinstruktur beteiligt sein könnte und somit bei zerstörtem AATF-Lokus keine eigene Transkriptionssteuerung erfolgen kann. Zum Phänotyp der Mutante gehört außerdem ein Mangel an Ribosomen, stark vergrößerte Vesikel, sowie ein fehlendes intaktes Aktinfilamentsystem.

### **Interaktion und Kooperation von AATF mit TSG101**

Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern von AATF wurden von Sven Burgdorf mit TSG101 (tumor susceptibility gene 101) und Blos2 (Kurzform von BLOC1S2, biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 2) Interaktionspartner isoliert, die einen aktivierenden Einfluss auf die AR-vermittelte Transkription ausüben (Burgdorf *et al.*, 2004; Felten *et al.*, 2007).

TSG101 wurde erstmals auf der Suche nach putativen Tumorsuppressorproteinen identifiziert. Die Inaktivierung von TSG101 führte zur Transformation von NIH3T3-Zellen (Li und Cohen, 1996). TSG101 enthält an seinem N-Terminus eine UEV (Ubiquitin E2 variant)-Domäne, die eine hohe Homologie zu Ubiquitin-Konjugasen aufweist. Da in der UEV-Domäne ein Cysteinrest des aktiven Zentrums durch Tyrosin ersetzt ist, kann jedoch kein Ubiquitintransfer erfolgen (Koonin und Abagyan, 1997). Somit handelt es sich bei TSG101 um eine katalytisch inaktive E2-Ubiquitin-Konjugase. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die inaktive UEV-Domäne eine Affinität für Ubiquitin aufweist und dieses auch direkt binden kann (Bishop *et al.*, 2002). Für TSG101 wurde daher eine Funktion als (negativer) Regulator Ubiquitin-abhängiger Prozesse postuliert (Koonin und Abagyan, 1997). Als Komponente des ESCRT-I Komplex (endosomal sorting complexes required for transport) ist TSG101 an Ubiquitin-vermittelten Prozessen der Virusvermehrung, der Endosomenreifung, der Proteinsortierung, dem Abbau von endozytierten Membranproteinen und der Biogenese von MVBs (multivesicular bodies) beteiligt. Dabei erfolgt durch die UEV-Domäne von TSG101 die Bindung monoubiquitinerter Proteine (Übersicht bei Slagsvold *et al.*, 2006). Außerdem reguliert TSG101 die Proteinlevel der Zellzyklusregulatoren p53 und p21. TSG101 führt zur Reduktion der p53-Proteinlevel, indem es den proteasomalen Abbau durch die Ubiquitin-Ligase Mdm2 stimuliert (Li *et al.*, 2001; Ruland *et al.*, 2001). Die UEV-Domäne von TSG101 bindet und stabilisiert dabei die monoubiquitinierte Form von Mdm2, wodurch es vor Polyubiquitinierung und daraus resultierendem Abbau geschützt wird. Dies führt zur Erhöhung des Mdm2-Spiegels und damit zum vermehrten Abbau von p53.

Von diesen Befunden wurde die Modellvorstellung für die Koaktivatorfunktion von TSG101 in der AR-vermittelten Transkription abgeleitet: Der funktionellen Kooperation von AATF und TSG101 wurde zunächst eine Rekrutierungsfunktion von AATF für TSG101 zu Grunde gelegt, da bei Koexpression von AATF und TSG101 eine Rekrutierung von TSG101 in den Kern beobachtet werden konnte. AATF, welches über seine LxxLL-Motive mit dem AR interagiert, kann somit TSG101 in die Nähe des AR bringen. Dies ermöglicht es TSG101, die im Zuge der Transkriptionsaktivierung erfolgende Monoubiquitinierung des AR, über seine UEV-Domäne zu binden und vor weiterer Ubiquitinierung zu schützen. Die monoubiquitinierte, vermutlich aktive, Form des Rezeptors wird so lange stabilisiert, bis ein Signal die Ablösung von TSG101 bewirkt. Dies ermöglicht die Polyubiquitinierung und damit den Abbau des AR (Burgdorf *et al.*, 2004).

### **Interaktion mit Blos2**

Blos2 ist eine Untereinheit des ubiquitär exprimierten Multiproteinkomplexes BLOC-1, der für die Biogenese spezialisierter Organellen des Endosomal-Lysosomalen-Systems, wie Melanosomen und Blutplättchen benötigt wird (Starcevic und Dell'Angelica; 2004). Daneben werden Funktionen in der Entstehung chronischer Nervenschmerzen (Wang X. *et al.*, 2005) und an der Regulation des Zellzyklus beim Übergang von der G1 in die S-Phase (Wang Z. *et al.*, 2004) postuliert. Für Blos2 wurde unter anderem eine koaktivierende Funktion auf die AR-, GR- und p53-vermittelte Transkription nachgewiesen. Die Koaktivatorfunktion hing dabei vom TF und vom Leucin-Zipper von Blos2 ab, über welchen seitens Blos2 die Interaktion mit AATF stattfindet. Außerdem konnte eine Interaktion mit der murinen ZIPK jedoch keine Enzym-Substrat-Beziehung detektiert werden (Felten, Diplomarbeit 2006; Felten *et al.*, 2007).

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Assemblierung von AR, AATF, ZIPK und TSG101 an Enhancer- und Promotorbereichen verschiedener Zielgene des AR auf die zeitliche Abfolge und gegenseitigen Abhängigkeiten untersucht werden. Dabei galt dem Zusammenspiel der Koaktivatoren untereinander sowie dem Mechanismus, der dem Koaktivatorpotential der ZIPK zugrunde liegt, das Hauptinteresse.

Da in vorausgegangenen Studien, die zur Identifikation der Koaktivatorfunktion von ZIPK, AATF und TSG101 auf die AR-abhängige Transkription führten, mit den murinen Orthologen der Proteine gearbeitet wurde (Leister *et al.*, 2003 und 2008; Burgdorf *et al.*, 2004), sollte zunächst die Funktion als Koaktivatoren für die humanen Proteine bestätigt werden. Hier lag aufgrund der Divergenzen zwischen ZIPK und Dlk der Fokus auf der Analyse der Koaktivatorfunktion der humanen ZIPK. Zusätzlich sollte der Einfluss auf die Expression von endogenen Zielgenen des AR nach siRNA-vermittelter Herunterregulation der ZIPK und weiterer Koaktivatoren mittels RT-PCR untersucht werden.

Eine eingehende Analyse der Assoziation von AR, ZIPK, AATF und TSG101 an ARE in Promotor- und Enhancerbereichen von Zielgenen des AR mittels Chromatin-Immunpräzipitationen sollte Aufschluss über die Dynamik der Rekrutierung liefern. Sequentielle ChIP-Analysen sollten einen Einblick in die Zusammensetzung der Transkriptionsinitiationskomplexe liefern und die Herunterregulation von ZIPK und AATF sollte eine mögliche Abhängigkeit der Faktoren im Assembly untereinander darstellen.

Um den Mechanismus der Koaktivatorfunktion der ZIPK zu hinterfragen, wurden mit Hilfe von *in-vitro*-Kinaseassays potentielle Substrate auf eine Phosphorylierung durch die ZIPK hin untersucht. Es war bekannt, dass die murine ZIPK *in vitro* H3T11 phosphoryliert und während der Mitose eine Kolokalisation von Dlk und an T11 phosphoryliertem Histon H3 stattfindet (Preuss *et al.*, 2003b). Daher sollte analysiert werden, ob im Zuge der AR-abhängigen Transkription die H3T11-Phosphorylierung an Promotor- und Enhancerbereichen detektierbar ist und die ZIPK möglicherweise über diese Histonmodifikation koaktivierend wirkt.

Da über den AATF Interaktionspartner TSG101 eine Verbindung zur Regulation der Ubiquitinierung des AR vorlag (Burgdorf *et al.*, 2004), sollte auch hier ein Einfluss der ZIPK, abhängig von ihrer Phosphorylierungsaktivität, untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Isotope und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Herstellerfirmen Merck (München), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen. Radiochemikalien, [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP, stammten von GE Healthcare (Freiburg) und Hartmann (Braunschweig). Enzyme von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Karlsruhe) oder Roche Molecular Biochemicals (Mannheim). Spezielle Chemikalien und Lösungen werden gesondert bei der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt.

### 2.2 Allgemeine Stammlösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden in A. bidest angesetzt und wenn erforderlich 20 min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert.

<b>PBS<sup>-</sup> (pH 7,2)</b>	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl

**PBS<sup>+</sup>** wie PBS<sup>-</sup> mit 0,7 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### 2.2.1 Lösungen für DNA-Analysen

<b>TE-Puffer</b>	10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM	EDTA

<b>TAE-Puffer (50x)</b>	2 M	Tris
	1 M	NaAc
	50 mM	EDTA
		pH 7,9 mit Essigsäure (96%) eingestellt

<b>6x Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanolblau
	15 % (w/v)	Ficoll 400
	30 % (v/v)	Glycerin
	50 mM	EDTA

## 2.2.2 Lösungen für die Aufreinigung und Auftrennung von Proteinen

<b>Phosphatlysispuffer (PLP)</b>	20 mM	NaPO <sub>4</sub> (pH 8)
	140 mM	NaCl
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 % (w/v)	NP-40
	1 mM	DTT
	1x	Proteaseinhibitor Cocktail (complete <sup>®</sup> , Roche)
<b>BufferJ</b>	10 mM	Tris (pH 7,5)
	140 mM	NaCl
	1 %	DOC
	1 %	NP40
	0,1 %	SDS
	1 mM	DDT
	1 µg/ml	Aprotinin
<b>2x-Probenpuffer</b>	6,6 %	SDS
	250 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	40 mM	DTT
<b>NEM-Lösung</b>	109 mM	NEM (25 mg/ml)
	33 %	Glycerin, gesättigt mit 0,1 % Bromphenolblau
<b>SDS-Laufpuffer (10x)</b>	250 mM	Tris
	1,92 M	Glycin
	35 mM	SDS
<b>Blotpuffer (10x):</b>	250 mM	Tris
	1,91 mM	Glycin
	20%	Methanol (optional)
<b>Protein-G/A-Agarose:</b>	50 %	in PBS <sup>-</sup>
	3 mM	Azid

## 2.3 Medien

### 2.3.1 Medien für die Bakterienkultur

Die Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Bei Bedarf wird nach dem Abkühlen auf 60°C ein entsprechendes Selektionsantibiotikum zugesetzt.

<b>LB-Medium</b> (pH 7,4) (add 1 l H <sub>2</sub> O)	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	NaCl

<b>LB-Agar</b> (add 1 l H <sub>2</sub> O)	32 g	LB-Agar
<b>2x YT-Medium</b> (add 1 l H <sub>2</sub> O)	0,5 % 1 % 1,6 %	NaCl Hefe-Extrakt Trypton
<b>YB-Medium</b>	98 % 10 mM 20 mM	2x YT Medium KCl MgSO <sub>4</sub>
<b>Ampicillin</b>	100 µg/ml Endkonzentration (Stammlsg: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O)	
<b>Kanamycin</b>	50 µg/ml Endkonzentration (Stammlsg: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O)	

### 2.3.2 Medien für die Kultur von Säugerzellen

Alle Säugerzellen wurden in DMEM (Gibco) oder RPMI-1640 kultiviert, die je nach Zelllinie mit 5, 10 oder 15 % fötalem Kälberserum (Gibco), sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) komplementiert wurden. Durch Aktivkohlereinigung und Dialyse hormonfreies Serum, sowie phenolrotfreies DMEM bzw. RPMI wurden von PAN (Aidenbach) bezogen.

<b>Trypsin-Lösung</b>	8 g/l 0,4 g/l 1 g/l 0,2 g/l 0,35 g/l 6 ml	NaCl KCl Glucose EDTA NaHCO <sub>3</sub> Trypsin (2,5 % w/v in PBS <sup>-</sup> )
<b>Pen/Strep (100x)</b>	0,6 % 1 %	Penicillin Streptomycin in PBS <sup>+</sup> ; pH 8,2

## 2.4 Bakterienstämme und Zelllinien

### 2.4.1 Bakterienstämme

Es handelt sich bei den verwendeten Bakterienstämmen um *Escherichia coli* K-12 Derivate.

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
<i>E.coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ80d, <i>lacZ</i> ΔM15, <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>-</sup></i> ), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E.coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , Δ ( <i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i> ), <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , Φ 80d, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , Δ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> )	Invitrogen

## 2.4.2 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Spezies</b>	<b>Histologische Herkunft</b>
HEK293	human	Embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus 5 DNA
HeLa	human	Cervikales Adenokarzinom
LNCaP	human	Prostatakarzinom
MCF-7	human	Adenokarzinom, Brust
PC3	human	Adenokarzinom, Prostata
Rat1	Ratte	Immortale Rattenfibroblasten

## 2.5 Verwendete Reagenzien für die Zellkultur

Folgende Reagenzien kamen in der Zellkultur zum Einsatz:

<b>Reagenz</b>	<b>Inhibiert/aktiviert</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Quelle</b>
MG132	Proteasomeninhibitor	2 - 10 $\mu$ M	Sigma
DRB	Transkriptionsinhibitor	50 $\mu$ M	Sigma
Dihydrotestosteron	Ligand des Androgenrezeptors	10 - 100 nM	Sigma
Dexamethason	Ligand des Glucocorticoidrezeptors	10 nM	Sigma
Progesteron	Ligand des Progesteronrezeptors	100 nM	Sigma
$\beta$ -Estradiol	Ligand des Östrogenrezeptors	10 nM	Sigma

## 2.6 Oligonukleotide und siRNA

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Nachfolgend sind alle Sequenzen der Oligonukleotide, die für CHIP-, RT-PCR- bzw. Klonierungs-Experimente eingesetzt wurden, mit Angabe ihrer Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und ihrer Position in der cDNA oder in Bezug zum Transkriptionsstartpunkt aufgelistet.

<b>Oligonukleotid</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Position</b>	<b><math>T_m</math> in °C</b>
<b>Oligonukleotide für CHIP-Analysen:</b>			
PSA I 121 up	CCTAGATGAAGTCTCCATGAGCTACA	(-121)-(-146)	64
PSA I 459 down	GGGAGGGAGAGCTAGCACTTG	(-459)-(-439)	64
PSAIII 3922 up	GGGAGGCAATTCTCCATGGTT	(-3922)-(-3942)	63
PSAIII 4288 down	GGGGTTTGTGCCACTGGTGAG	(-4288)-(-4268)	63
KLK2-Promoter f	ACCCCTGTTGCTGTTTCATCCTG	(-342)-(-320)	62
KLK2-Promoter r	CCGCCCTTGCCCTGTTGG	(-89)-(-106)	62
TMPRSS2 AREV+	AGCCCAGGATGTGAGCTTG	(-13658)- (-13639)	61
TMPRSS2 AREV-	GACATACGCCCCACAACAGA	(-13364)- (-13384)	61
PSAmittefw	CTGGTGATCCACCTGCCTCAG	(-1529)-(-1540)	63

PSAmitterev	CTCTTAAGAGCCCTGGTACCTC	(-1737)-(-1715)	63
PSA-Gen+1615 f	ATCCATCTCCTATCCGAGTCC	1615-1635	61
PSA-Gen+1918	CTGGCCTTAGAGGTTATCCTG	1918-1898	61
<b><u>Oligonukleotide für mRNA-Expressionsanalysen:</u></b>			
PSA s for	CTTGACCCCAAAGAAA	495-510	52
PSA s rev	AAGCACACCATTACAGAC	652-669	52
PSA I 1	GAGGTCCACACACTGAAGTT	509-528	56
PSA I 2	CCTCCTGAAGAATCGATTCTT	312-332	56
TMPRSS2 mRNA+	ACTGTCTACGAGGTGCATC	103-121	56
TMPRSS2 mRNA-	TGAACTTCCAGAGTAGGCC	307-325	56
KLK2mRNAfw	TGCTCACAGCTGCCATTGC	179-198	59
KLK2mRNArev	ACAACATCTGTGATCTTGGC	388-407	59
ZIPK-cDNA-f	GGTGTTCATCACCTATATCCTCC	610-631	54
ZIPK-cDNA-r	GGGCAATGGTCATTCTCCGC	802-782	54
Par4-mut-T164	AAGCGCCGCTCCGCTGGCGTGGTCAA C	475-501	56
Par4-795-775 rev	GAAGCCACTTCTATCTGTTCG	727-747	56
GAPDH-for	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	884-861	52
GAPDH-rev	CGGTGTGAACGGATTTGGCCGTAT	1167-1144	52
β-Aktin-for	CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAG	182-203	60
β-Aktin-rev	TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG	424-403	60
<b><u>Oligonukleotide für Klonierungen:</u></b>			
TMPRSS2 Kpn	CGGGTACCAACCATGGAAAGCAGGTG C	(-13811)- (-13792)	60
TMPRSS2 Nhe	CTAGCTAGCAGGGAGGCAGTTGCA	(-12771)- (-12786)	60
Xho KLK2-Prom	AGCTCGAGTGGGAGTTCAAGG	(-451)-(-439)	61
Hind KLK2-Prom	AAGCTTTCCTGAGGAGCCCT	(-50)-(-64)	61

Für die Herunterregulation von endogener ZIPK, Che1/AATF, TSG101 und Par4 in der Zellkultur wurden verschiedene synthetisch hergestellte siRNA-Moleküle verwendet. Diese waren bereits hybridisiert und trugen in ihrem 3'-Bereich 2 nt lange Uridin-Überhänge. Die siRNA gegen Par-4 war in ihrem 5'-Bereich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Anhand der Markierung konnten transfizierte Zellen mikroskopisch identifiziert werden. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 keinen Einfluss auf die Aktivität der siRNA ausübt (Dunne *et al.*, 2003). Die nachfolgend angegebene Position bezieht sich auf den Bereich der cDNA des Proteins, zu dem die Sequenz der siRNA in Sinnrichtung homolog ist. Die verwendeten siRNA-Hybride setzen sich zusätzlich noch aus dem jeweils entsprechenden Strang in Gegensinnrichtung zusammen.

Als unspezifische Kontrolle wurde ein Pool aus vier siRNAs gegen Connexin43 (Dharmacon) eingesetzt. Außerdem wurde siGlo „RISC-Free Control-siRNA“ (Dharmacon) verwendet. Hier

lies sich aufgrund der Fluoreszenzmarkierung mit Dy-547 die Transfektionseffizienz der siRNA bestimmen.

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Position</b>	<b>Quelle</b>
ZIPK Kawai	CAUCCUGCGGGAGAUCGGUU	197-218	Kawai <i>et al.</i> , 2003
ZIPK-1	GAACAUUCCUGGAUUAAGGUU	810-829	Dharmacon
ZIPK-2	CCACGCGUCUGAAGGAGUAUU	895-914	Dharmacon
ZIPK-3	GAGCCAGGCCCGUAAGUUCUU	3'-UTR	Dharmacon
ZIPK-4	GAGGAGUACUUCAGCAACAUU	711-730	Dharmacon
ZIPK #128	GGAGUACACCAUCAAGUCGUU	909-927	Ambion
ZIPK #129	GGAGUACGCAGCCAAGUUCUU	110-139	Ambion
Che1	UGGCUUGCAAUCCAGAAGUUACGUU	1472-1492	Fanciulli, unveröffentlicht
AATF-1	GGACUUGGAUGAAGAAAUCUU	1153-1171	Dharmacon
AATF-2	AAAGAGAGAUUACUUCGAAUU	1207-1225	Dharmacon
AATF-3	GGAAGGAUCAAAACUACAAAUU	718-736	Dharmacon
AATF-4	CCAGGGUGAUUGACAGGUUUU	101-119	Dharmacon
TSG101-1	AAACUGAGAUGGCGGAUGAUU	709-727	Dharmacon
TSG101-2	GAACCUCACUGGAACAAUCUU	159-177	Dharmacon
TSG101-3	CCGUUUAGAUCAAGAAGUAUU	825-844	Dharmacon
TSG101-4	UCCACAGCUCCUUAUACUU	957-975	Dharmacon
Par-4	Cy3-GAUGCAAUUACACAACAGAUU	857 -875	Kawai <i>et al.</i> , 2003
Connexin43	Pool von vier unbekanntenen Sequenzen		Dharmacon

## 2.7 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind neben ihrer Bezugsquelle nachfolgend aufgeführt. Die verwendeten Verdünnungen für Western-Blot (WB)-Analysen sind angegeben. Für die Immunpräzipitation (IP) ist die pro mg Gesamtprotein und für die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) die pro 150 µg Chromatin eingesetzte Antikörpermenge aufgeführt.

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>WB</b>	<b>IP</b>	<b>ChIP</b>	<b>Quelle</b>
AATF	Maus monoklonal	1:750	2 µl	2 µl	Abnova
Aktin	Maus monoklonal	1:1000	-/-	-/-	Sigma
AR	Kaninchen polyklonal	1:5000	1 - 2 µl	2,5 µl	Santa Cruz
AR	Maus monoklonal	1:2000	1 µl	-/-	BD Pharmingen
CBP	Kaninchen polyklonal	1:1500	2 µl	2,5 µl	Santa Cruz

Che1	Kaninchen polyklonal	1:900	1 µl	0,4 µl	Fanciulli et al., 2000
Connexin 43	Kaninchen polyklonal	1:1500	-/-	-/-	Ch. Schliecker, 2000
Flag-M2	Maus monoklonal	1:4000	1 µl	-/-	Sigma-Aldrich
GFP	Maus monoklonal	1:2000	0,5 µl	2 µl	Roche
Histon H3	Kaninchen polyklonal	1:3000	-/-	6 µl	Abcam
Histon H3K4me2	Kaninchen polyklonal	-/-	-/-	8 µl	Abcam
Histon H3K9me2	Maus monoklonal	-/-	-/-	4 µl	Abcam
Histon H3pS10	Maus monoklonal	-/-	-/-	1,2 µl	upstate
Histon H3pS10/T11	Kaninchen polyklonal	-/-	-/-	1 µl	Pineda
Histon H3pT11	Kaninchen polyklonal	1:5000	-/-	3 µl	Pineda
IgG unspezifisch	Maus polyklonal	-/-	1 µl	1,25 µl	Santa Cruz
IgG unspezifisch	Kaninchen polyklonal	-/-	1 µl	1,25 µl	Santa Cruz
Mdm2	Maus monoklonal	1:1500	10 µl	-/-	Santa Cruz
Myc	Maus monoklonal	1:2000	7 µl	-/-	Biomol
Par-4	Kaninchen polyklonal	1:5000	-/-	2,5 µl	Santa Cruz
RNA-Pol II (N-20)	Kaninchen polyklonal	1:2000	-/-	2,5 µl	Santa-Cruz
RNA-Pol II CTD	Maus monoklonal	-/-	-/-	1 µl	Abcam
PRK1	Maus monoklonal	1:3000	2 µl	4 µl	BD Bioscience
SRC1	Maus monoklonal	1:1000	1 µl	1 µl	Upstate
TSG101	Maus monoklonal	1:500	2 µl	2,5 µl	Santa Cruz
TSG101	Kaninchen polyklonal	1:6000	-/-	-/-	Sigma-Aldrich
Alpha-Tubulin	Maus monoklonal	1:50000	-/-	-/-	Sigma-Aldrich
Ubiquitin	Kaninchen polyklonal	1:1500	-/-	-/-	Santa Cruz
ZIPK	Kaninchen polyklonal	1:4000	0,5 µl	1 µl	Calbiochem
ZIPK	Kaninchen polyklonal	1:6000	-/-	-/-	Biomol
Kaninchen IgG HRP konjugiert	Ziege	1:15000	-/-	-/-	Nordic
Maus IgG HRP konjugiert	Kaninchen	1:10000	-/-	-/-	Nordic

## 2.8 Plasmide

Folgende Klonierungs- und Expressionsvektoren wurden in dieser Arbeit verwendet:

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pCMV-Tag-2B	Eukaryontischer Expressionsvektor mit N-terminalem FLAG-Epitop (MDYKDDDDK)	Stratagene
pEGFP-C2, C3	Eukaryontischer Expressionsvektor mit N-terminalem GFP-Gen	Clontech
pDrive cloning vector	Linearisierter prokaryontischer Klonierungsvektor mit U-Überhängen zur direkten Ligation von PCR-Produkten mit A-Überhängen	Quiagen
pGL3-Basic	Reporterkonstrukt mit dem <i>Firefly Luciferase</i> Gen ohne Promotor	Promega
pGL3-Promoter	Reporterkonstrukt mit dem <i>Firefly Luciferase</i> Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors	Promega
GFP-AR	Expression von humanem GFP-AR	Burgdorf, 2003
Flag-AR	Expression von humanem FLAG-AR	Leister, 2007
GFP-ZIPK	Expression humaner GFP-ZIPK	Diese Arbeit
GFP-ZIPKD161A	Expression humaner kinaseinaktiver GFP-ZIPK	Diese Arbeit
Flag-ZIPK	Expression humaner FLAG-ZIPK	Brinckmann, 2007
GFP-TSG101	Expression von Ratten GFP-TSG101	Burgdorf, 2003
HA-TSG101	Expression von humanem HA-TSG101	Dr. S. Cohen (Stanford)
Flag-Che1	Expression von humanem FLAG-AATF/Che1	Heinzel, 2003
Flag-SRC3	Expression von FLAG-SRC3	Leister, 2007
Flag-Par4	Expression von FLAG-Par4	Boosen, 2001
GFP-Blos2	Expression von Ratten GFP-Blos2	Burgdorf, 2003
Flag-PRK1K644E	Expressionsvektor für kinaseinaktive PRK1 mit N-terminalem FLAG-Epitop	Dr. E. Metzger, (Freiburg)
MMTV-Luc	Reporterkonstrukt mit dem Firefly-Luciferasegen unter Kontrolle des MMTV-Promotors	Burgdorf, 2003
PSA-Promotor-Luc	Reporterkonstrukt mit dem Firefly-Luciferasegen unter Kontrolle des PSA-Promotors	Leister, 2007
KLK2-Promotor-Luc	Reporterkonstrukt mit dem Firefly-Luciferasegen unter Kontrolle des KLK2-Promotors	Diese Arbeit
TMPRSS2-Enhancer-Luc	Reporterkonstrukt mit dem Firefly-Luciferasegen unter Kontrolle des TMPRSS2-Enhancers	Diese Arbeit
Mdm2-Luc	Reporterkonstrukt mit dem Firefly-Luciferasegen unter Kontrolle des Mdm2-Promotors (Intron1 des Mdm2-Gens)	Moshe Oren
pRL-CMV	Reporterkonstrukt mit dem Renilla-Luciferase Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors	Promega
pRL-SV40	Reporterkonstrukt mit dem Renilla-Luciferase Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors	Promega

ERE-Luc	Reporterkonstrukt mit Firefly-Luciferase hinter TK-Promotor und vorgeschaltetem doppeltem Estrogenresponselement	F. Gannon, (Heidelberg)
SV-ER	Expression von humanem ER unter Kontrolle des SV40-Promotors	F. Gannon
GFP-Dlk	Expressionsvektor von GFP-Dlk	Kögel, 1998
GFP-DlkK42A	Expression von kinaseinaktiver GFP-Dlk	Kögel, 1999
Flag-Daxx	Expression von Flag-Daxx	R. Brinker, 2004
FLAG-GR	Expression von Ratten FLAG-Glucocorticoidrezeptor	Leister, 2007
PR	Expression des humanen Progesteronrezeptors	Dr. E. Metzger
pCMV-Mdm2	Expression von humanem Mdm2	Moshe Oren
pHis-Ubiquitin	Expression von 6xHistidin-markiertem Ubiquitin	Dr. R. Kopito (Stanford)

## 2.9 Reagenzien für die Immunfluoreszenz

<b>DAPI</b>	4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid, eingesetzt zur spezifischen Färbung der Zellkerne (Sigma-Aldrich).
<b>DRAQ5™</b>	[1,5 - Bis [[ 2 - (dimethylamino) ethyl] amino] - 4,8 - dihydroxy - antracene - 9,10 - dione] zur Färbung der Zellkerne für die konfokale Laserscanningmikroskopie (Biostatus, Shepshed, UK)
<b>Einbettmedium</b>	Permafluor, Aqueous Mounting Medium (Immunotech, Marseille, FR)

## 3 Methoden

### 3.1 Allgemeine molekulargenetische Methoden

#### 3.1.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von RNA und DNA werden Agarose-Gelelektrophoresen nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Eine elektrophoretische Trennung der negativ geladenen Nukleinsäuren erfolgt dabei nach Unterschieden in der Molekülgröße und Molekülform (linearisiert/zirkulär). Die Laufstrecke ist dabei umgekehrt proportional zur Fragmentgröße. Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden 0,7-4 % (w/v) Agarosegele verwendet. Hierzu wurde 1x TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose kurz aufgeköcht und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit 1/6 (v/v) Ladepuffer versetzt, um sie durch enthaltenes Glycerin und Ficoll zu beschweren und um die Lauffront durch Bromphenolblau sichtbar zu machen.

Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 10-15 V/cm Lauffront. Als Größenstandard wurde die 100 bp DNA-Leiter und die 1 kb DNA-Leiter von Peqlab (Erlangen) verwendet. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde auf einem UV-Leuchttisch bei 302 nm sichtbar gemacht und zur Auswertung mittels Gel-Dokumentationssystem (Herolab, Wiesloch) dokumentiert. Die Quantifizierung der Intensität der einzelnen Banden erfolgte mit dem Programm EasyWin32 (Herolab).

#### 3.1.2 Präparative Agarosegele

Die präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte wie oben beschrieben. Um Beschädigungen der DNA durch UV-Strahlung möglichst gering zu halten, wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit einer UV-Handlampe ( $\lambda = 302$  nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung und Isolation der aus den präparativen Gelen ausgeschnittenen DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des „Nucleospin® Extract II PCR clean-up Gel extraction Kits“ von Machery-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

#### 3.1.3 Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von Nukleinsäuren wurde die Methode nach Sambrook *et al.* (1989) angewandt. Die DNA- oder RNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 5,5) und dem 2,5x Volumen Ethanol abs. für mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren

wurden durch Zentrifugation (13200 rpm, 10 min, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und die luftgetrocknete DNA/RNA in einem geeigneten Volumen 1x TE-Puffer oder A. bidest aufgenommen.

### 3.1.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt durch die photometrische Messung der Absorption der dsDNA und RNA bei 260 nm sowie von Proteinen bei 280 nm. Dabei entspricht ein Absorptionswert  $A_{260}$  von 1, bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm, etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Konzentration lässt sich mit folgender Formel ermitteln:  $A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNA-Konzentration} [\mu\text{g/ml}]$ .

Anhand des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  wird der Reinheitsgrad bestimmt. Reine Präparationen sollten einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 aufweisen. Werte unter 1,8 deuten auf die eine Verunreinigung durch Proteinen oder Phenol hin, wohingegen die Anwesenheit von RNA den Quotienten erhöht.

### 3.1.5 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA erfolgt in der Regel mit 1 - 5 U Enzym pro µg DNA bei 37°C für 1 bis 2 h. Die Reaktion findet mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einfacher Endkonzentration unter dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms statt.

Es werden hauptsächlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, da diese durch Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung innerhalb ihrer meist palindromischen Erkennungssequenz schneiden. Die Spaltung der doppelsträngigen DNA liefert entweder glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) 5' bzw. 3' überhängende Strangenden mit jeweils einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende. Auf diese Weise linearisierte Vektoren oder Fragmente lassen sich mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüfen und für weitere Klonierungsarbeiten verwenden.

### 3.1.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Die durch die Linearisierung entstehende 5'-Phosphatgruppe begünstigt die Religation des Vektors. Um dies zu verhindern und um den Einbau von DNA-Fragmenten, die noch Phosphatgruppen am 5'-Ende tragen zu erleichtern, wird die Dephosphorylierung durch die alkalische Phosphatase (Antarctic Phosphatase, New England Biolabs) katalysiert. Die Reaktion erfolgte unter Zugabe von 1 U Enzym/µg DNA für 15 min bei 37°C. Anschließend wurde das Enzym für 5 min bei 65°C inaktiviert.

### 3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Veresterung einer endständigen 5'-Phosphatgruppe mit einer endständigen 3'-Hydroxylgruppe. Vektor und zu inserierende DNA werden somit kovalent über eine Phosphodiesterbindung verknüpft.

Für die Ligation sollte das molare Verhältnis von Vektor zu Insert zwischen 1:3 und 1:6 liegen. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von maximal 20 µl mit 0,5 U T4-DNA-Ligase (Roche) und 1x Ligasepuffer. Der Ligationsansatz wurde (bei kohäsiven Enden) 2 h bei Raumtemperatur sonst ÜN im Wasserbad bei 16 °C inkubiert.

### 3.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wird die Methode nach Hanahan *et al.* (1983) angewendet. Sie dient der künstlichen Erhöhung der Kompetenz von *E.coli*-Zellen freie DNA aufzunehmen.

Mit einer Einzelkolonie des Bakterienstammes wurde 2x YT-Medium angeimpft und ÜN im Schüttler bei 37°C inkubiert. 100 ml vorgewärmtes YB-Medium wurden aus der Vorkultur 1/100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45 – 0,55 kultiviert. Die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindende Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 4°C und 2500 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml TFB I Puffer (1/5 Volumen der Kultur) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 2500 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB II Puffer (1/25 Ausgangsvolumen der Kultur) resuspendiert und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff oder im Ethanol-Trockeneisbad schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<b>TFB I:</b>	30 mM	NaAc, pH 6
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	100 mM	NaCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v)	Glyzerin

<b>TFB II:</b>	10 mM	MOPS, pH 7
	10 mM	NaCl
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v)	Glyzerin

### 3.1.9 Transformation von Bakterien

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA aus einer Midi-Präparation oder dem Ligationsansatz versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis folgte für 60 sec ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad nach dem die Bakterien sofort auf Eis abgekühlt wurden. Der Transformationsansatz wurde mit 900 µl LB-

Medium aufgefüllt und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1h bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Entsprechend der Antibiotikaresistenz der transformierten Plasmide werden 100 µl der Transformationsansätze auf Antibiotika-haltige LB-Agarplatten ausplattiert und ÜN im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### **3.1.10 Präparation von Nukleinsäuren**

#### **3.1.10.1 Analytische Plasmidisolierung**

Bei der analytischen Plasmidisolierung wird die Methode der alkalischen Lyse (abgewandelt nach Birnboim und Doly, 1979) angewandt. Sie dient der Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA und ermöglicht eine schnelle Charakterisierung von Klonen durch Restriktionsverdau.

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1 ml der Kultur wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 sec bei 13200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl kalter Lösung I (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA, pH 8,0) resuspendiert und anschließend mit 200 µl Lösung II (1 % SDS (w/v), 0,2 M NaOH) versetzt, vorsichtig invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Hierdurch wurden alkalische Bedingungen geschaffen, die zur Zelllyse und zur Denaturierung von DNA und Proteinen führen. Durch Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M KAc, pH 5,5) und sofortiges Invertieren wurde eine Neutralisation der Lösung erreicht, so dass die DNA während der folgenden 5 min Inkubationszeit auf Eis renaturieren konnte. Denaturierte Proteine, genomische DNA, sowie Bakterienzelltrümmer wurden für 5 min bei 13200 rpm (4°C) entfernt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe des 2x Volumens an Ethanol abs. präzipitiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 13200 rpm (4°C) zentrifugiert und mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen bevor das Pellet bei 56°C getrocknet wurde. Die Aufnahme der isolierten Plasmide erfolgte in 30 µl 1x TE-Puffer.

#### **3.1.10.2 Präparative Plasmidisolierung**

Um größere Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad für Transfektionen zu isolieren erfolgte eine präparative Plasmidisolierung mittels „JETstar Plasmid Purification MIDI Kit“ von Genomed (St. Louis USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Methode der alkalischen Lyse wird durch einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt der DNA über eine Anionenaustauschersäule erweitert. Aus 30 ml Bakterienkultur können zwischen 100 – 300 µg Plasmid-DNA isoliert werden.

### 3.1.10.3 Präparation von Gesamt-RNA mit TRIzol aus Säugerzellen

Die Präparation der RNA aus Säugerzellen erfolgte mit TRIzol (Invitrogen) nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Eine Zellkulturschale (MP, 3 cm Durchmesser) wurde 3x mit kaltem PBS<sup>+</sup> gewaschen, abgeschabt und in 100 µl TRIzol resuspendiert und für 5 min bei RT lysiert. Die Extraktion von Proteinen und genomischer DNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl Chloroform, gründliches Mischen und nachfolgender Phasentrennung durch 3 min Inkubation bei RT und 5 min Zentrifugation bei 13200 rpm. Die obere farblose, wässrige Phase wurde zur Fällung der RNA abgenommen und 1:1 mit Isopropanol gemischt und bei 13200 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und die luftgetrocknete RNA bei 55°C in RNase-freiem A. bidest gelöst. Als Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurde neben der Reinheitsbestimmung auch 1 µl auf ein Agarosegel aufgetragen um zu überprüfen, ob die 28S und 18S rRNA als Hauptbanden auftraten. Um auszuschließen, dass auch genomische DNA isoliert wurde, wurde mit Hilfe der aus der RNA hergestellten cDNA (siehe 3.1.12) eine Aktin-PCR durchgeführt, die bei Kontamination aufgrund Amplifikation eines Introns eine größere Bande erzeugt.

Zur Entfernung genomischer DNA-Kontaminationen wurde die isolierte Gesamt-RNA vor der cDNA-Synthese mit DNaseI (Roche) behandelt. Hierzu wurde 1U RNase-freie DNaseI pro µg RNA für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inaktivierung der DNaseI für 10 min bei 72°C wurde die Konzentration erneut photometrisch bestimmt und die Qualität der RNA mittels nativer Gelelektrophorese überprüft.

### 3.1.10.4 Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen

Die Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen diente der späteren Amplifikation von Promotor und Enhancer-Elementen AR-abhängiger Gene, welche in ein Reporterkonstrukt mit Firefly-Luciferase-Gen (siehe Material 2.8) kloniert wurden. Eine konfluente 6 cm Zellkulturschale (SP) wurde 2x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, abgeschabt, zentrifugiert und in 400 µl Laird-Lysispuffer (0,1 M Tris pH 7,5; 5 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 0,2 % SDS) und 3 µl Proteinase K (Roche) resuspendiert. Nach erfolgter Lyse ÜN im 55°C Wasserbad wurde die Probe kurz geschüttelt und unlösliche Bestandteile 5 min bei 13200 rpm abzentrifugiert. Die genomische DNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol ausgefällt und durch 10 min Zentrifugation bei 13200 rpm pelletiert. Die genomische DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 55°C getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

### 3.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wurde für die exponentielle Amplifikation definierter DNA-Abschnitte aus einer geringen DNA-Ausgangsmenge *in vitro* verwendet. Bei den Primern für die Vervielf-

fältigung von DNA-Abschnitten handelt es sich um synthetische Oligonukleotide, die über einen Bereich von ca. 15-30 Basen zu den 5'- bzw. 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA homolog sind. Bevorzugt wurde ein Bereich mit einem GC-Gehalt von ungefähr 40-60 % gewählt. Einige der verwendeten Oligonukleotide enthielten an ihrem 5'-Überhang zusätzlich eine Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen, wodurch die nachfolgende Klonierung der amplifizierten PCR-Produkte in ein Plasmid ermöglicht wurde. Die Hybridisierungstemperatur ( $T_H$ ) der Oligonukleotide lässt sich nach folgender vereinfachter Formel bestimmen:  $T_H = [(A/T \times 2) + (G/C \times 4)] - 5^\circ\text{C}$ .

Die Hybridisierungstemperatur eines Oligonukleotids sollte zwischen 50 und 60°C liegen, vor allem aber sollte ein Oligonukleotid-Paar sich möglichst wenig in seinen Hybridisierungstemperaturen unterscheiden. Generell müssen für jede PCR verschiedene Parameter neu ausgetestet und optimiert werden, um ein spezifisches Produkt in ausreichender Menge zu erhalten. Die Spezifität und Effizienz einer PCR ist zum Beispiel abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, dem  $\text{MgCl}_2$ -Gehalt, dem GC-Gehalt des Gesamtbereichs, der Zyklenzahl oder dem Zusatz von Detergenzien. Die PCR wurde in einem *TGradient*-Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Je nach Anwendung wurde die *Go Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Promega), die *Hot Star Taq* (Quiagen) oder die *Phusion*-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich im Allgemeinen wie folgt zusammen und wurde nach den angegebenen Bedingungen durchgeführt:

<b>PCR-Ansatz:</b>	1 - 50 ng	Matrizen-DNA (0,5 µl cDNA)
	0,5 - 1 pmol	je Oligonukleotid
	1,5 mM	$\text{MgCl}_2$
	2,5 mM	je dNTP
	1x	Reaktionspuffer
	0,5-2 U	DNA-Polymerase
		add 50 µl A. bidest

**PCR-Programm:**

	94°C	5-15 min	DNA-Initialdenaturierung	
25 - 40 Zyklen	{	94°C	45 sec	DNA-Denaturierung
		x°C	1 min	Oligonukleotid-Anlagerung ( $x = T_H$ )
		72°C	1 min/kb	Elongation (für <i>Go Taq</i> -Polymerase)
		72°C	7 min	Abschlusselongation
		4°C	10 min	

Abschließend wird das Produkt mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese und „Nucleospin Extract II-Kit“ (Machery und Nagel) oder „JETquick PCR Purification Spin Kit“

(Genomed) nach Herstellerangaben aufgereinigt oder es erfolgte eine densitometrische Auswertung der RT-PCR-Proben nach Agarose-Gelelektrophorese.

Die semiquantitative PCR der Chromatin-Immunpräzipitations-Proben wurde standardisiert durchgeführt um eine hohe Vergleichbarkeit der Bandenstärke zu ermöglichen. Der Standardansatz für eine semiquantitative PCR setzte sich wie folgt zusammen:

<b>PCR-Ansatz:</b>	0,5 – 2 $\mu$ l	Eluat der Chromatin-Immunpräzipitation
	2 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	2 $\mu$ l	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
	4 $\mu$ l	5x Puffer (Promega)
	2 $\mu$ l	Oligonukleotide (je 1 $\mu$ M)
	0,1 $\mu$ l	GoTaq DNA-Polymerase (Promega)
		add 20 $\mu$ l A. bidest

<b>PCR-Programm:</b>	95°C	5 min	DNA-Initialdenaturierung	
30 - 35 Zyklen	{	95°C	45 sec	DNA-Denaturierung
		x°C	1 min	Oligonukleotid-Anlagerung (x = T <sub>H</sub> )
		72°C	1 min/kb	Elongation
		72°C	7 min	Abschlusselongation

Abschließend wurden von jedem Ansatz 10  $\mu$ l in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die relativen Bandenstärken verglichen.

### 3.1.12 RT-PCR

Zur Expressionsanalyse von Genen im Zellkulturmodell wurde die RT-PCR angewendet. Die präparierte Gesamt-RNA (siehe 3.1.10.3) wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase SuperScript<sup>®</sup> III (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Um zu überprüfen, ob die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen war, wurde eine Kontroll-PCR mit den Oligonukleotiden  $\beta$ -Aktin-for und  $\beta$ -Aktin-rev durchgeführt. Die Oligonukleotide flankieren eine Intron-Sequenz des  $\beta$ -Aktin-Gens, welche nach erfolgtem Spleißen in der mRNA nicht mehr vorhanden ist und somit ein Produkt von 243 bp ergibt. Ein PCR-Produkt von 377 bp Länge entsteht dagegen, wenn die cDNA genomische Verunreinigungen aufweist. War die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen, wurde sie für die RT-PCR eingesetzt. Als Mengenabgleich wurde das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in einem vom Gen, dessen Expression untersucht werden sollte, getrennten PCR-Ansatz mitgeführt.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wird ein detergentenhaltiger Phosphatlysispuffer (PLP) verwendet. Dieser enthält das nichtionische Detergenz NP-40, das die Cytoplasma- und nach längerer Inkubation auch die Kernmembran zerstört. Lösliche Proteine aus Cytoplasma und Kern werden extrahiert, wobei Cytoskelett und Chromatin erhalten bleiben. Durch die hohe Konzentration an Phosphationen im Puffer werden Phosphatasen gehemmt, so dass die Proteine in ihrem natürlichen Phosphorylierungszustand verbleiben (Scheidtmann *et al.*, 1982). Der PLP enthält zusätzlich DTT als reduzierendes Agens, sowie einen Protease-Inhibitor-Cocktail, der den Abbau der Proteine durch Proteasen während des Zellaufschlusses verhindert.

Die Säugerzellen wurden 2x mit kaltem PBS<sup>+</sup> gewaschen und in 1 ml PBS<sup>+</sup> mit Hilfe eines Gummischabers von der Kulturschale abgeschabt und bei 1800 rpm für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200-400 µl PLP für 15 min auf Eis lysiert, bevor unlösliche Zellstrukturen für 10 min bei 13200 rpm und 4°C sedimentiert wurden. Im Überstand sind alle löslichen Proteine aus Cytoplasma und Kern enthalten.

Sollte sich eine weitere Extraktion ans Chromatin gebundener Proteinen anschließen, erfolgte die Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min. Dem Kernpellet wurden zum weiteren Aufschluss 100 µl PLP und 5U/LP Benzonase (Novagen, München) für weitere 15 min zugegeben. Benzonase ist eine Nuklease, die auch bei 4°C sehr effizient arbeitet. Dadurch wurde das Chromatin in kurze Fragmente zerlegt und löslich. Die Dissoziation von Kernstrukturen wie Lamine und der Kernmatrix erfolgte anschließend mit 500 mM NaCl für weitere 10 min auf Eis. Nach Zentrifugation von 10 min bei 13200 rpm und 4°C entspricht der Überstand dem Kernextrakt. Für eine Immunpräzipitation wurde dieser zur Verringerung der Salzkonzentration 1:1 mit A. bidest verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Extrakte bei -70°C gelagert oder standen für eine Immunpräzipitation (siehe 3.2.2) oder eine SDS-Page (siehe 3.2.4) zur Verfügung.

### 3.2.2 Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation lassen sich bestimmte Proteine oder Proteinkomplexe (Co-Immunpräzipitation) aus Zellextrakten über spezifische Antikörper isolieren und durch nachfolgende SDS-Page und Western-Blot Analyse nachweisen. Dazu wurde der Zellextrakt mit einer für jeden Antikörper spezifisch zu ermittelnden Menge für 60 bis 90 min auf Eis inkubiert. Um die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe an eine Matrix zu binden, wurde Protein-A-Sepharose oder Protein-G-Agarose zum Zellextrakt gegeben und für weitere 90 min bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die an die Matrix gebundenen

Immunkomplexe 1 min bei 5000 rpm sedimentiert und anschließend mit in ihrer Stringenz abnehmenden Waschpuffern (BJ, PLP/BJ 1/1, PLP/BJ 5/1, PLP) für jeweils 30 sec bei 5000 rpm gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zuletzt wurde einmal mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Die an die Matrix gebundenen Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 30 µl 2x Probenpuffer und Erhitzen auf 100°C reduziert und denaturiert, wodurch sie von der Matrix eluiert wurden. Nach Zugabe von 1/3 Volumen NEM-Lösung, welches eine Reoxidation verhindert wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgt dann mittels Antikörper im Western-Blot.

### 3.2.3 *In-vitro*-Kinaseassay

Mittels *In-vitro*-Kinaseassay konnte die Phosphorylierung eines Proteins an einer potentiellen Phosphorylierungsstelle durch die entsprechende Kinase überprüft werden. Ausgehend von in Kinasepuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl, 1 mM DDT, 1 mM Leupeptin) äquilibrierten immunpräzipitierten Proteinen wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl Kinasepuffer, 10 µCi [<sup>32</sup>P]-γ-ATP, sowie rekombinanter oder immunpräzipitierter Kinase für 30 bis 45 min bei 37°C gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2x Probenpuffer mit 10 mM EDTA und anschließender Denaturierung der Proteine bei 100°C für 3 min abgestoppt. Nach Zugabe von 1/3 Volumen NEM-Lösung wurden die Proben mittels SDS-Page aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels erfolgte der Nachweis phosphorylierter Proteine über Autoradiographie auf einem Röntgenfilm (CRONEX 5, AGFA, Köln).

### 3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient dem Auftrennen von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes (Laemmli, 1970). Die Denaturierung der Proteine erfolgt durch Anlagerung von SDS (Natriumdodecylsulfat). Das angelagerte anionische Detergenz überlagert die Eigenladung der Proteine und bewirkt eine konstante negative Ladung pro Masseneinheit. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung (DTT) während der Probenvorbereitung aufgespalten. Die Proteinproben wurden dazu mit 2x Probenpuffer versetzt und für 3 min gekocht. Anschließend wurde 1/3 Volumen NEM-Lösung zugegeben. Die Proteine wurden bei der SDS-PAGE zunächst im Sammelgel (pH 6,8) bei 17 mA auf eine Lauffront konzentriert. Die eigentliche Auftrennung erfolgte im Trenngel mit Polyacrylamidkonzentrationen von 7,5 - 20 %, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, bei pH 8,8 mit 34 mA. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Protein-Marker („PageRuler Prestained Protein Ladder“ oder „PageRuler Prestained Protein Ladder Plus“ Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

<b>Sammelgel:</b>	0,82 ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 6,8)
	2 ml	H <sub>2</sub> O
	0,5 ml	Acrylamidlösung (30 %)
	10 µl	APS (10 %)
	3,5 µl	TEMED
<b>Trenngel (10%):</b>	3,4 ml	Trenngelpuffer (1,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 8,8)
	5,7 ml	H <sub>2</sub> O
	4,5 ml	Acrylamidlösung (30 %)
	68 µl	APS (10 %)
	3,4 µl	TEMED

### 3.2.5 Western Blot und Immunfärbung

Nach der SDS-PAGE erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (porablot 0,45 µm, MACHEREY-NAGEL) im Nass-Blot-Verfahren. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 300 mA für 60 – 120 min in vorgekühltem 1x Blotpuffer oder bei konstanten 80 V für 3 h in 1x Blotpuffer mit 20 % Methanol in einer Blotting-Kammer (Bio-Rad). Zur Kontrolle des Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese mit Ponceau S-Lösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure, AppliChem) angefärbt. Nach Entfärbung durch Inkubation in TBS-Tween (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20) erfolgt der spezifische immunologische Proteinnachweis. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran für 1 h bei RT oder ÜN im Kühlraum mit einer Blockierlösung (5% Magermilchpulver (Cell Signaling) in TBS-Tween) abgesättigt. Die Membran wurde 2x für 5 min mit TBS-Tween gewaschen und dann für 1 h (RT) oder ÜN (4°C) mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS-Tween gewaschen und für 30 min mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Abschließend wurde 2x für 10 min und einmal für 20 min mit TBS-Tween gewaschen.

Beim anschließenden Chemilumineszenz-Nachweis wurde der abgetropfte Blot mit frischem ECL-Reagenz inkubiert. Dazu wurden 1 ml Lösung A (100 mM Tris/HCl (pH 8,6), 0,0125 mM Luminol (Sigma)), 100 µl Lösung B (0,27 mM Coumarinsäure (Sigma) in DMSO) und 0,33 µl 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt. Die Membran wird für eine Minute mit der Entwicklerlösung inkubiert. Die Peroxidase katalysiert dabei in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Oxidation des chromogenen Substrates Luminol. Das dabei entstehende aktive Zwischenprodukt emittiert bei seiner Rückkehr in den Grundzustand Licht. Dieses wurde mittels aufgelegtem Röntgenfilm und einer Exposition von 10 sec bis 1h je nach Signalstärke detektiert. Um die Intensität von Proteinbanden zu quantifizieren, wurden die entsprechenden Autoradiographien mit Hilfe eines Computerprogramms digitalisiert. Anschließend wurde die Intensität der Proteinbanden mit dem Programm EasyWin32 ermittelt. Sofern die Blot-Membran mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert werden sollte, wurden die Antikörper der vorherigen Immun-

färbung von der Membran mit dem Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, USA) für 30 min bei 37°C entfernt. Nach einem anschließenden Waschschriff mit TBS-Tween stand die Membran für weitere Analysen zur Verfügung.

### 3.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Mittels der Methode nach Bradford (1976) lässt sich die Proteinkonzentration von Lösungen bestimmen. Dazu wird eine Farbänderung, die auf der Reaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit basischen Aminosäuren beruht und eine Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu 595 nm bewirkt, gemessen. Es wurde 1 µl Zellextrakt in 800 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 200 µl Roti-Quant (Roth) vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei  $\lambda = 595$  nm. Die Proteinkonzentration des Zellextraktes ergab sich durch rechnerischen Vergleich der optischen Dichte der Probe mittels einer zuvor erstellten Eichreihe.

### 3.2.7 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Diese Methode dient dem Nachweis von DNA-gebundenen Proteinkomplexen und im Zuge der Genaktivierung auftretenden Histonmodifikationen. Dazu wurden in dieser Arbeit LNCaP-Zellen verwendet, die bei 80 bis 90 % Konfluenz für mindestens 48 h in farbstoff- und hormonfreiem Medium gehalten wurden. Je nach Fragestellung erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Proteasomeninhibitor MG132 oder dem CDK7/9-Inhibitor DRB bevor sie für unterschiedliche Zeitintervalle zwischen 15 min und 24 h mit 100 nM Dihydrotestosteron (DHT) induziert wurden.

Die Zellen wurden mit PBS<sup>-</sup> (37°C) gewaschen und für 10 min mit 1,4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS<sup>-</sup> bei RT fixiert. Die Fixierung wurde durch eiskaltes 125 mM Glycin gestoppt. Dann wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS<sup>-</sup> (4°C) gewaschen und in 1 ml PBS<sup>-</sup> von der Kulturschale abgeschabt. Die Zellen wurden in ChIP-Verdünnungspuffer (1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1x Protease-Inhibitor-Cocktail) gewaschen um noch lösliche Proteine zu entfernen und bei 1800 rpm für 2 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 300 µl ChIP Lysispuffer (1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1x Protease-Inhibitor-Cocktail) resuspendiert. Anschließend wurde das Chromatin durch Ultraschall in Fragmente von 0,5 bis 1 kb zerkleinert. Dazu waren sechs Pulse von jeweils 15 sec bei 40 % Leistung mit der „Microtip“ des Branson Sonicators (New Brunswick, NJ) notwendig. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation bei 13200 rpm für 15 min sedimentiert. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt und auf 1 µg/µl mit ChIP-Lysispuffer eingestellt. Pro Immunpräzipitation wurden 150 µg Chromatin eingesetzt, die mit ChIP-Verdünnungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 1

ml aufgefüllt und mit 0,5 - 1 µg Antikörper (Ak) bzw. 3 µl Serum versetzt wurden. Die Proben wurden bei 4°C im Rollinkubator ÜN inkubiert, 1 min scharf abzentrifugiert und nach Zugabe von 25 µl vorblockierter Protein-A-Sepharose bzw. Protein-G-Agarose und 2 µg gescherter Lachssperma-DNA für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Das Blockieren der Matrix erfolgte ÜN in CHIP-Verdünnungspuffer mit 2 µg gescherter Lachssperma-DNA pro 25 µl Matrix.

Die Proben wurden dann sukzessive gewaschen in: TSE1 (1 % Triton x-100, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8), TSE2 (1 % Triton x-100, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8), Puffer III (250 mM LiCl, 1 % NP40, 1 % Deoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8) und dreimal in 1x TE-Puffer (pH 8).

Die Elution der gewaschenen Komplexe erfolgte in 100 µl Chelex100 (10 % Suspension in A. bidest, BIO-RAD) durch 12 min Kochen bei 1300 rpm im Thermoschüttler. Die Hitzezufuhr löst dabei die PFA-Fixierung wieder auf und das Chelex schützt die DNA vor Strangbrüchen. Matrix und Chelex wurden durch 5 min Zentrifugation sedimentiert und der Überstand diente als Template für die semiquantitative PCR.

Parallel zu den Waschschritten wurde eine Input-Kontrolle mitgeführt, die dem Mengenabgleich dient. Hierzu wurden 15 µg Chromatin mittels 0,75x Isopropanol und 2 M NH<sub>4</sub>Ac gefällt und nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol in 50 µl TE gelöst. Die Elution der Komplexe erfolgte dann nach Zugabe von 100 µl Chelex100.

Bei der ReChIP erfolgte eine zweite Präzipitationsrunde. Hier konnte untersucht werden, ob zwei Proteine zur gleichen Zeit am selben regulatorischen DNA-Element gebunden vorlagen. Vor der ersten IP erfolgte hier ein Preclearing für 2 h: 600 µg Chromatin wurden mit 8 µg Lachssperma-DNA, 100 µl Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und 3,3 ml CHIP-Verdünnungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit der vierfachen Menge Primärantikörper ÜN inkubiert und bis einschließlich des Waschschriffs in TSE2 wie oben beschrieben weiterbehandelt. Für die zweite Präzipitationsrunde wurde nach dem Waschen in TSE2 direkt zwei Mal mit TE-Puffer gewaschen, das Pellet trocken gesaugt und die Elution der Komplexe von den Antikörpern erfolgte in 10 mM DTT bei 37°C im Schüttler. Der Überstand wurde 1/50 in CHIP-Verdünnungspuffer verdünnt und konnte für eine zweite Immunpräzipitations-Runde mit bis zu drei verschiedenen Ak eingesetzt werden.

### **3.3 Zellkultur**

#### **3.3.1 Kultur von Säugerzellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer Wasserdampf gesättigten 5 % bzw. 10 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Inkubator (Heraeus). Die Zelllinien HEK293 und HeLa

wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Rat1-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen mit 5 % FCS gehalten. Die Kultivierung von PC3 und MCF7-Zellen erfolgte in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % P/S bei 5 % CO<sub>2</sub> Konzentration. LNCaP-Zellen wurden in 15 % FCS, 1 % P/S bei 5 % CO<sub>2</sub> Konzentration kultiviert.

Säugerzellen wachsen als adhärente Monolayer und werden passagiert bevor sie eine Konfluenz von 100 % erreicht haben. Die Zellen wurden dazu zweimal mit vorgewärmtem PBS<sup>-</sup> gewaschen und mittels Trypsin vom Boden der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen. Hierbei wird durch im Medium enthaltenes FCS das Trypsin gestoppt. Nach Abzentrifugation der Zellen für 3 min bei 1000 rpm können diese in einem Verhältnis von 1/3 bis 1/10 in frischem Medium aufgenommen und neu ausplattiert werden. Zur langfristigen Lagerung wurden exponentiell wachsende Zellen nach Trypsinierung in vorgekühltem Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und schrittweise abgekühlt (2h -20°C, ÜN -70°C), bevor sie in flüssigem Stickstoff dauergelagert wurden.

### 3.3.2 Zellzahlbestimmung

Um definierte Zelldichten bei der Transfektion von siRNA (siehe 3.3.3.1) zu erhalten, erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl. Dazu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:2 bis 1:10 verdünnt und ein Tropfen in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop wird dann die Zellzahl in vier Großquadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl pro ml ergibt sich dann nach folgender Berechnung:  $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ .

### 3.3.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen mit DNA oder RNA

Die Einschleusung von Fremd-DNA in höhere eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es wird unterschieden zwischen stabiler und transienter Transfektion. Bei der stabilen Transfektion wird die Fremd-DNA in das Genom der Zelle integriert, während bei der transienten Transfektion keine Integration erfolgt. Hier wird das Protein direkt vom eingeschleusten Plasmid aus vorübergehend stark überexprimiert. Es existieren verschiedene Transfektionsverfahren: Elektroporation, Mikroinjektion, Lipofektion, Viral- oder Rezeptorvermittelte und Calcium-Phosphat-Transfektion. Die Methoden unterscheiden sich hinsichtlich Effizienz, Handhabung, sowie Kosten. Für jede Zelllinie ist die optimale Methode daher gesondert zu ermitteln.

### 3.3.3.1 Lipofektion

Zur Transfektion von Säugerzellen wurde entweder das kationische Polymer JetPEI (Polyplus-transfection INC, New York, USA) für die Einschleusung von DNA in MCF7 und PC3-Zellen oder das Liposomen-bildende Reagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) für die Einschleusung von DNA und siRNA in LNCaP, HeLa und HEK293-Zellen verwendet.

Folgende Angaben beziehen sich auf die Transfektion eines Wells einer 24 Well-Platte mit JetPEI:

In einem Reaktionsgefäß wurden 50 µl 150 mM NaCl und 0,2 - 1 µg DNA gemischt. Parallel dazu wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß 50 µl 150 mM NaCl und 0,5 - 1 µl JetPEI zusammengegeben. Die beiden Ansätze wurden gemischt und 30 min bei RT inkubiert und danach wurden 100 µl des Transfektionsansatzes zu den Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgten ein Mediumwechsel und gegebenenfalls die Induktion durch Steroidhormone.

Die Transfektion von siRNA sowie siRNA/DNA-Gemischen erfolgte mit Lipofectamine 2000. 20 bis 200 nM siRNA oder ein siRNA/DNA-Gemisch wurden in 50 µl OPTIMEM (serumfreies Medium, Gibco) verdünnt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 50 µl OPTIMEM und 1 µl Lipofectamine 2000 gemischt und für 5 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min inkubiert bevor sie tropfenweise auf die Zellen gegeben wurden, die jeweils 400 µl OPTIMEM je Vertiefung der 24-Well-Platte vorgelegt bekamen. Für eine MP wurde der dreifache und für eine LP der 10-fache Ansatz verwendet.

### 3.3.3.2 Transfektion mittels Calciumphosphat

Bei der Calciumphosphat-vermittelten Transfektion werden  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in Anwesenheit der DNA gemischt. Sich bildende Calciumphosphat-Kristalle schließen die DNA ein und werden durch Endozytose von den Zellen aufgenommen. Diese Methode wurde für die Transfektion von HEK293 und Rat-1-Zellen mit DNA angewandt.

Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion einer 6 cm Platte (SP) und sind bei Bedarf an kleinere und größere Kulturgefäße anzupassen.

1 bis 2 h vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und pro SP wurden 2,5 ml Medium vorgelegt. In der Zwischenzeit wurden die Transfektionsansätze vorbereitet. Hierzu wurden 216 µl  $\text{H}_2\text{O}$ , 24 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  und 2 bis 4 µg DNA in einem Reaktionsgefäß gut vermischt. In ein Rundbodenröhrchen wurden 240 µl 2x BBS (280 mM NaCl, 50 mM BES, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0) pipettiert durch den ein kontinuierlicher Luftstrom geblasen wurde. Die DNA-Lösung wurde langsam zugetropft und um möglichst feine Kopräzipitate zu erhalten wurde für 1 min Luft eingeblasen. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 20 h wurden die Zellen gewaschen und je nach Anwendung mit frischem Medium versetzt. Hier erfolgte gegebenenfalls eine Induktion mit Steroidhormonen.

### 3.3.4 Transiente Expressionsexperimente zur Untersuchung der Luciferaseaktivität (Reportergenstudien)

Mittels des Reportergens Luciferase können transaktivierenden Eigenschaften von Proteinen untersucht werden. Dazu wurden 3 cm Kulturschalen (MP) mit bis zu 1,8 µg DNA transfiziert. Um Transfektionsstress und unterschiedliche Transfektionseffizienzen auszugleichen wurde die transfizierte DNA-Menge durch das Plasmid pCMV-Tag2b konstant gehalten und es wurden für jeden Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt. Außerdem wurde eine konstante Menge pCMV-Renilla transfiziert, welches bei der Messung ein eigenes Luciferase-Substrat umsetzt und somit als interner Abgleich herangezogen werden konnte.

#### 3.3.4.1 Herstellung von Zellextrakten für den Luciferasenachweis

Die transfizierten und gegebenenfalls zuvor für 18 h induzierten Zellen wurden zweimal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen bevor sie mittels 150 µl Lysispuffer (77 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 23 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 % Triton X-100, 1 mM DTT; pH 7,8) für 15 min auf einer Wippe bei RT lysiert wurden. Anschließend wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 13200 rpm abzentrifugiert.

#### 3.3.4.2 Messung der Luciferaseaktivität

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 10 µl der Proteinextrakte durch Zugabe des jeweiligen Luciferasereagenzes vermessen. Die Proben wurden einmal mit Firefly-Luciferase-Substrat und in einem weiteren Well/Ansatz mit Renilla-Substrat vermessen. Die Messung der Lumineszenzreaktion erfolgte in einem Luminometer (Berthold) in 96-Well-Microplatten für jeweils 10 sec nach Zugabe von 60 µl des jeweiligen Luciferase-Reagenzes.

<b>Firefly-Substrat</b>	20 mM	Tricin pH 7,8
	297 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,1 mM	EDTA
	33,3 mM	DTT
	544,33 µM	ATP
	270 µM	Coenzym A
	470 µM	Luciferin
<b>Renilla-Substrat</b>	25 mM	Tris/HCl pH 7,5
	0,1 M	NaCl
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,9 µM	Coelenterazin

### **3.4 *In vivo-Nachweis ubiquitiniertes Proteine***

Ubiquitinierte Proteine sind nach dem Aufschluss der Zelle sehr instabil und werden sehr schnell von den Proteasomen abgebaut. Deswegen wurde ein System benutzt, mit dem ubiquitinierte Proteine unter denaturierenden Bedingungen isoliert und analysiert werden können (Treier *et al.*, 1994). Dazu wird Ubiquitin, das mit einem 6xHistidin-Epitop versehen ist, ektopisch exprimiert. Die ubiquitinierten Proteine können dann mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie auch unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden.

Pro Ansatz wurde eine 10 cm Kulturschale HEK293-Zellen mit 9 - 15 µg DNA transfiziert. Nach 24 h wurde der Transfektionsansatz abgenommen, die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 2 µM des Proteasomeninhibitors MG132 versehen und mit 100 nM DHT für 16 h induziert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen, in 1 ml PBS<sup>-</sup> von der Platte abgeschabt, sedimentiert und das Pellet in 500 µl denaturierendem Lysispuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) aufgeschlossen. Nach einer Ultraschallbehandlung von 2x 15 sec bei 40 % Leistung im Eiswasserbad wurde das Lysat für 15 min und 13200 rpm abzentrifugiert. Parallel wurden 30 µl NiNTA-Agarose (Qiagen) in 300 µl Lysispuffer äquilibriert und anschließend gewaschen. Das Zelllysat wurde dann für 2 h mit der NiNTA bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Matrix 3x mit Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 6,2) und einmal mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen bevor die isolierten ubiquitinierten Proteine mit 2x Probenpuffer für 3 min bei 100°C von der Matrix eluiert wurden. Nach Zugabe von 1/3 NEM wurden die Proben mittels SDS-Page aufgetrennt und ubiquitinierte Proteine im Western Blot analysiert.

### **3.5 *Fluoreszenzmikroskopische Analysen***

Mittels Fluoreszenzmikroskopie lässt sich die subzelluläre Lokalisation verschiedener Proteine in Zellen untersuchen. GFP-Fusionsproteine können dabei aufgrund ihrer eigenen Fluoreszenz nach Bestrahlung mit UV-Licht direkt nachgewiesen werden, wohingegen andere Proteine indirekt über einen Antikörper vermittelten Nachweis detektiert werden. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte mit dem Axiophot (Zeiss) oder mittels der konfokalen Mikroskopie über ein Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss).

#### **3.5.1 *Fixierung und Permeabilisierung der Zellen***

Die Fixierung erfolgte nach Honda [Honda *et al.*, 2003]. 24 – 48 h nach der Transfektion wurden die MCF7-Zellen nach zweimaligem Waschen für 5 min mit PBS<sup>+</sup> durch Zugabe von 300 µl "Hondapuffer" für 10 min fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde für 10 min

mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und entweder direkt eingebettet oder die Zellen wurden einer Immunfärbung unterzogen.

<b>Hondapuffer</b>	20 mM	PIPES
	0,2 %	Triton X-100
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	EGTA
	4 %	Formaldehyd

### 3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die fixierten Zellen wurden zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen für 1 h mit 3 % BSA in PBS<sup>+</sup> blockiert, bevor der primäre Antikörper für 1 h zugegeben wurde. Nachdem 3x für 10 min mit PBS<sup>+</sup> gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Cy<sup>3</sup>-gekoppelten Antikörper für 30 min. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Zellen für 10 min mit PBS<sup>+</sup> wurden sie einer DraqV und/oder DAPI-Färbung unterzogen, einmal mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in einen Tropfen Einbettmedium eingebettet. Zum Aushärten des Einbettmediums werden die Objektträger ÜN bei 4°C gelagert.

Antigen	Spezies	Verdünnung in PBS <sup>+</sup>	Quelle
α-Flag	Maus monoklonal	1:2000	Sigma-Aldrich
α-Tubulin	Maus monoklonal	1:50000	Sigma-Aldrich
α-mouse Alexa488	Ziege	1:2000	Invitrogen
α-mouse Cy <sup>3</sup>	Ziege	1:4000	Dianova

### 3.5.3 DAPI/DRAQ5-Färbung

Der Farbstoff 4',6'-Diamino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) färbt spezifisch chromosomale DNA und somit die Zellkerne an. Die Zellen wurden entweder direkt nach der Fixierung oder nach der Immunfärbung für 5 min mit 0,05 µg/ml DAPI in PBS<sup>+</sup> inkubiert. Vor dem Einbetten wurden die Zellen dreimal für 10 min in PBS<sup>+</sup> und einmal mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Anthrachinon DRAQ5 färbt ebenfalls chromosomale DNA an und wurde für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie parallel zur DAPI-Färbung verwendet. DRAQ5 wurde in einer 1/10000 Verdünnung zusammen mit dem sekundären Antikörper mit den Zellen inkubiert.

## 4 Ergebnisse

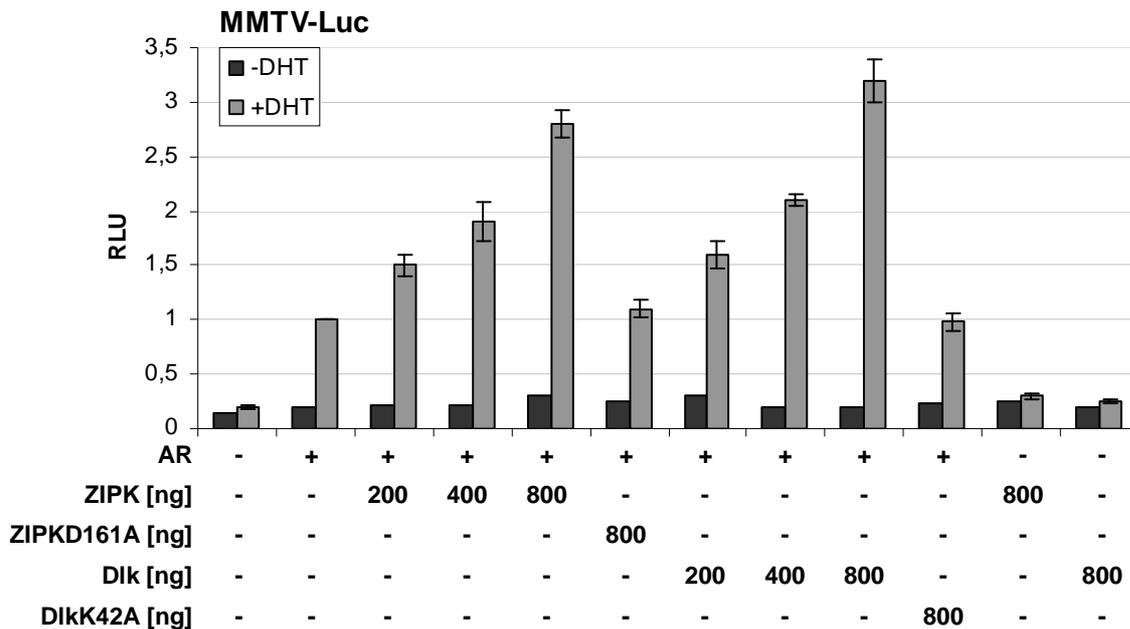
### 4.1 Koaktivierende Eigenschaften der humanen ZIPK

In vorhergegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss der ZIPK auf die AR-abhängige Transkription wurde mit ektopisch exprimierter ZIPK der Ratte gearbeitet. Aufgrund der oben (siehe Einleitung 1.2.1) aufgezeigten Unterschiede humaner gegenüber muriner ZIPK waren Unterschiede in ihren koaktivierenden Eigenschaften nicht auszuschließen. Vor allem die überwiegend cytoplasmatische Lokalisation der humanen ZIPK gegenüber der überwiegend nukleären Lokalisation der murinen ZIPK (Shoval *et al.*, 2007) gaben Anlass, die humane ZIPK auf ihre koaktivierenden Eigenschaften und subzelluläre Lokalisation zu überprüfen. Im Folgenden wird das humane Ortholog als ZIPK und das Ratten Ortholog als Dlk bezeichnet.

#### 4.1.1 Effekt der ZIPK auf AR-abhängige Reporterengenkonstrukte

Zunächst sollte der Einfluss der ZIPK im Vergleich zur Dlk auf die AR-abhängige Transkription untersucht werden. Dazu wurde eine konstante Menge AR transfiziert, die Dihydrotestosteron (DHT)-abhängig eine fünffache Aktivierung der Reporterexpression bewirkt. Anhand der Kotransfektion steigender Mengen GFP-ZIPK bzw. GFP-Dlk lässt sich der Einfluss der ZIPK-Orthologen auf die Expression des Reportergens messen. Als Reporterengenkonstrukt diente das „Firefly“-Luciferasegen unter der Kontrolle des MMTV-Promotors (mouse mammary tumor virus). Der MMTV-Promotor stellt das gängigste Modellsystem zur Untersuchung von Steroidhormonrezeptoren dar und wird hormonabhängig durch den AR, GR, PR und MR aktiviert (Lambert und Nordeen, 1998). Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Transaktivierungsstudien generell in HEK293-Zellen durchgeführt, da diese keinen endogenen AR exprimieren (Chesire *et al.*, 2002). Als interner Standard wurde in jedem Ansatz das „Renilla“-Luciferasegen unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Cytomegalievirus) als Abgleichsplasmid eingesetzt. Somit ließen sich Unterschiede in der Transfektionseffizienz und Zellzahl ausgleichen, da als Maß für die Transaktivierung der Quotient aus der Aktivität der induzierbaren Firefly-Luciferase und der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase gebildet wurde. Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz aufgrund unterschiedlicher DNA-Mengen auszuschließen, wurden die Ansätze mit pCMV-Tag2b-Vektor auf konstante DNA-Mengen aufgefüllt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DHT induziert und nach weiteren 20 h wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Die Luciferaseaktivität ist dabei proportional zur Aktivität des Promotors.

Abb. 4.1 zeigt die relative Steigerung der MMTV-Promotoraktivität nach Expression der ZIPK-Orthologen.



**Abb. 4.1: Steigerungseffekt der ZIPK-Orthologen auf die AR-abhängige Transkription.**

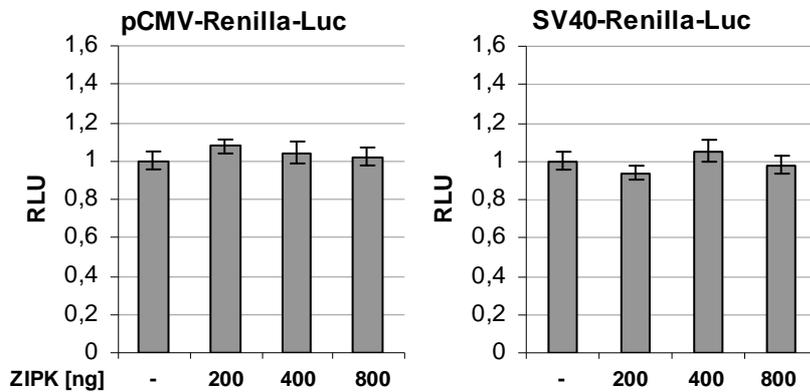
HEK293-Zellen wurden mit 500 ng MMTV-Luciferase-Reportergenkonstrukt (MMTV-Luc), 100 ng pCMV-Renilla, 50 ng Flag-AR und steigenden Mengen GFP-ZIPK bzw. GFP-Dik sowie den kinaseinaktiven Expressionsplasmiden (GFP-ZIPKD161A, GFP-DikK42A) kotransfiziert. Die Induktion der Zellen erfolgte für 20 h mit 100 nM Dihydrotestosteron (DHT). Die jeweilige Transaktivierung ist als relative Luciferaseaktivität (RLU) aufgetragen, normiert auf die Aktivität des induzierten AR. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und zweimal wiederholt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Abbildung 4.1 zeigt, dass der AR als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor erst nach Induktion der Zellen mit DHT durch dieses aktiviert wird und daraufhin die Transkription des Luciferasegens bewirkt. Die hormonabhängige Aktivierung des AR resultierte in einer fünffachen Steigerung der relativen Luciferaseaktivität (RLU) gegenüber dem uninduzierten Ansatz.

Steigende Mengen ZIPK bewirkten in Koexpression mit dem AR eine bis zu 2,8-fache Steigerung der Luciferaseaktivität. Die Dik führte zu einer 3,2-fachen Steigerung. Somit zeigte die ZIPK eine ähnlich starke Aktivierung wie die Dik. Um auszuschließen, dass die ZIPK für sich transaktivierend oder AR-unabhängig wirkt, wurden Ansätze mit ZIPK aber ohne AR transfiziert. Da die Werte auf dem Basislevel ohne ektopisch exprimiertem AR lagen, erfolgte keine direkte Transaktivierung des Promotors durch die ZIPK. Die ZIPK wirkt somit verstärkend auf die AR-abhängige Transkription, was sie als Koaktivator klassifiziert.

Um zu bestätigen, dass die ZIPK spezifisch auf bestimmte Transkriptionsfaktoren und keinen generellen Einfluss auf die Transkription ausübt, wurde zusätzlich ein möglicher Effekt der ZIPK auf den CMV- und SV40-Promotor untersucht. Somit stellt dieser Versuch auch eine

Kontrolle für das Abgleichsplasmid pCMV-Renilla dar, welches unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht. Die Abgleichsplasmide pCMV-Renilla und SV40-Renilla wurden als Reporterplasmide verwendet und mit steigenden Mengen ZIPK kotransfiziert.



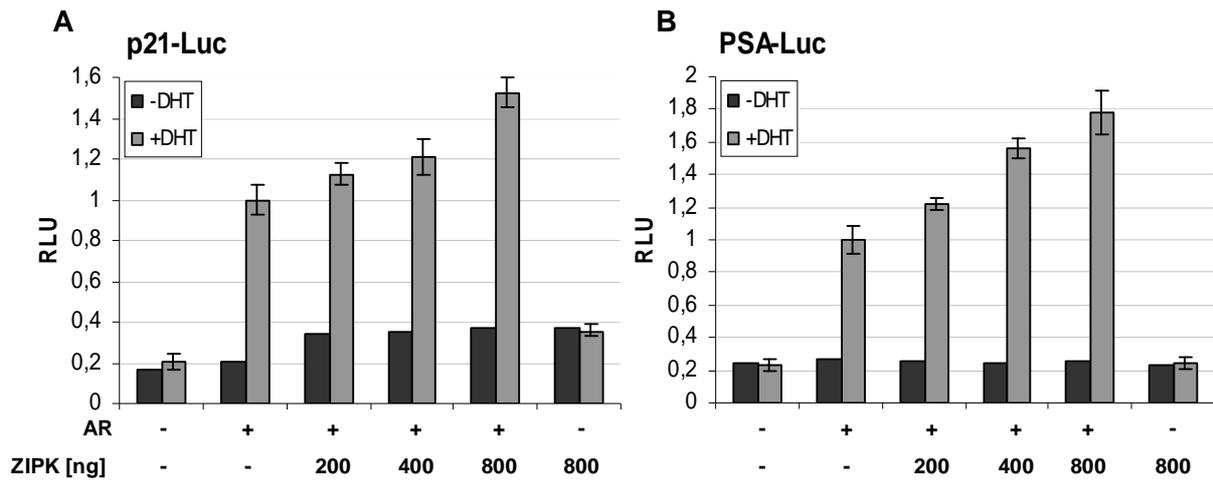
**Abb. 4.2: Die Expression der ZIPK hat keinen Einfluss auf die basale Transkription.**

HEK293-Zellen wurden mit 200 ng pCMV-Renilla-Luc oder SV40-Renilla-Luc und steigenden Mengen ZIPK transfiziert. Die RLU ist normiert auf die basale Aktivität von SV40-/pCMV-Renilla-Luc.

Wie erwartet hatte die Überexpression der ZIPK keinen Einfluss auf die basale Expression der Abgleichsplasmide (Abb. 4.2). Dies bestätigt, dass sie ihre Koaktivatorfunktion über einen spezifischen Transkriptionsfaktor ausübt.

Da die Koaktivatorfunktion der Dlk von ihrer enzymatischen Aktivität abhängt (Leister *et al.*, 2008), wurde eine kinaseinaktive Punktmutante (GFP-ZIPKD161A) der ZIPK erzeugt und auf ihr Transaktivierungspotential untersucht. Es zeigte sich, dass die Aktivierung der AR-abhängigen Transkription auf ihrer Kinaseaktivität beruht (Abb. 4.1).

Nachdem am MMTV-Promotor die koaktivierende Wirkung der humanen ZIPK bestätigt wurde, sollten weitere AR-abhängige Promotoren auf ihre Koaktivierung durch die ZIPK untersucht werden. Dazu wurden mit dem PSA (Prostata-spezifisches Antigen)-Promotor und dem p21-Promotor weitere AR-abhängige Reporterplasmide mit steigenden Mengen ZIPK transfiziert. Das PSA-Luciferase-Reporterplasmid (PSA-Luc) enthält die Sequenz des proximalen PSA-Promotors, der zwei ARE beinhaltet. Der Effekt der ZIPK auf das PSA-Gen ist von besonderem Interesse, da das PSA-Gen als Tumormarker des Prostatakarzinoms gilt und daher das wohl bestuntersuchte AR-abhängige Zielgen darstellt. Das p21-Luciferase-Reporterplasmid (p21-Luc) enthält den p21-Promotorbereich, der je eine Bindestelle für den AR und p53 aufweist. Das p21-Protein ist ein CDK-Inhibitor und essentiell für die Regulation des Zellzyklus.



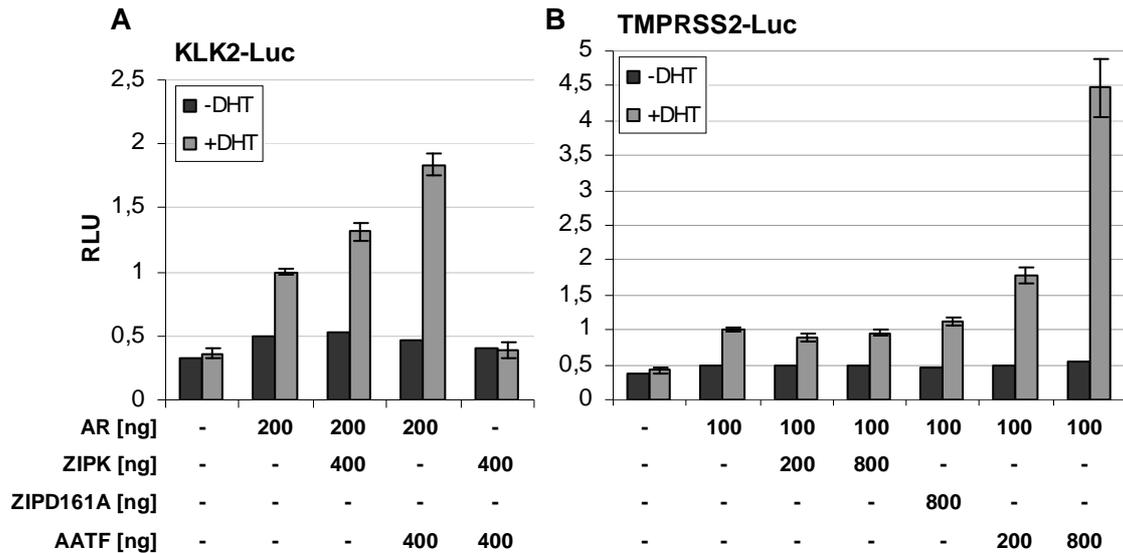
**Abb. 4.3: Die ZIPK wirkt auch auf weitere AR-abhängige Reporter-genkonstrukte koaktivierend.**

A) HEK293-Zellen wurden mit 700 ng p21-Luc, 100 ng pCMV-Renilla, 200 ng AR und steigenden Mengen ZIPK transfiziert. B) HEK293-Zellen wurden mit 600 ng PSA-Luc, 100 ng pCMV-Renilla, 200 ng AR und steigenden Mengen ZIPK transfiziert. Die Induktion erfolgte jeweils für 20 h mit 100 nM DHT. Die RLU ist auf die Aktivität des induzierten Rezeptors normiert.

Steigende Mengen ZIPK führten zu einer mengen- und hormonabhängigen Aktivierung der AR-vermittelten Transkription am p21- und PSA-Promotor. Beim p21-Promotor fällt jedoch auf, dass die ZIPK auch ohne Induktion des AR eine Steigerung der Aktivität von 0,2 auf 0,4 bewirkte. Hier deutet sich ein Effekt auf andere TF, vermutlich endogenes p53 an (siehe 4.1.4).

Die Befunde der koaktivierenden Eigenschaften der ZIPK wurden auf weitere regulatorische Bereiche von bekannten AR-Zielgenen ausgedehnt. Dazu wurde aus genomischer DNA von LNCaP-Zellen zum einen die Promotorregion des KLK2 (Kallikrein 2)-Gens und zum anderen der Enhancer des TMPRSS2 (Transmembran Protease Serin 2)-Gens amplifiziert und in den pGL3-Luciferase Vektor kloniert. KLK2 codiert, wie PSA, für eine Serin-Protease, die in verschiedenen Geweben exprimiert und an diversen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist. Die veränderte Expression in Prostata- und Brustkrebs lässt KLK2 eine Rolle als Tumormarker zukommen (Clements *et al.*, 2004). Das TMPRSS2-Gen ist von Interesse, da die Genfusion mit den ETS-Transkriptionsfaktoren ERG, ETV1 und ETV4 als frühes Ereignis in der Entstehung des Prostatakarzinoms gilt. Die damit unter die Kontrolle des AR-responsiven regulatorischen Bereichs des TMPRSS2-Gens gelangten ETS-TF sind an Zellwachstum, Differenzierung und Transformation beteiligt (Tomlines *et al.*, 2005; Oikawa und Yamada, 2003).

Zunächst wurde nachgewiesen, dass sowohl der Enhancer des TMPRSS2-Gens als auch der Promotor des KLK2-Gens durch den AR dosis- und hormonabhängig aktiviert werden (ohne Abb.). Als nächstes wurde der Effekt der ZIPK auf die AR-abhängige Transaktivierung der beiden Konstrukte untersucht:



**Abb. 4.4:** Die ZIPK wirkt koaktivierend auf die AR-abhängige Transaktivierung des KLK2-Promotors, weist aber keinen Einfluss auf den TMPRSS2-Enhancer auf.

A) HEK293-Zellen wurden mit 600 ng KLK2-Luc, 100 ng pCMV-Renilla, 200 ng AR und den angegebenen Mengen ZIPK und AATF transfiziert. B) HEK293-Zellen wurden mit 600 ng TMPRSS2-Luc, 100 ng pCMV-Renilla, 100 ng AR und den angegebenen Mengen ZIPK, kinaseinaktiver ZIPK und AATF transfiziert. Die Induktion mit 100 nM DHT erfolgte jeweils für 24 h. Die RLU ist normiert auf die Aktivität des induzierten AR.

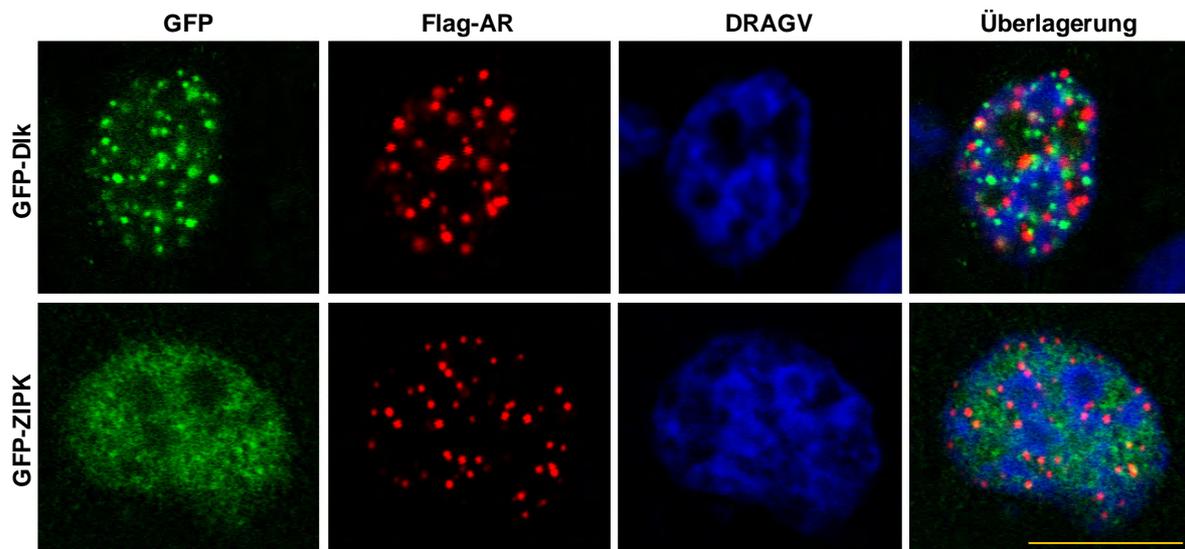
Die Aktivität des KLK2-Promotors konnte wiederum abhängig vom AR, durch die ZIPK erhöht werden. Überraschenderweise zeigte die ZIPK keinen aktivierenden Effekt auf die Transaktivierung des TMPRSS2-Enhancers (Abb. 4.4.B). Um die Funktionalität des klonierten Reportersystems und für das humane Ortholog von AATF die Koaktivatorfunktion für den AR zu bestätigen, wurde AATF in die Analysen einbezogen.

AATF führte sowohl am KLK2-Promotor als auch am TMPRSS2-Enhancer zu einer deutlichen Steigerung der AR-abhängigen Transkription. Diese Ergebnisse deuten an, dass die ZIPK eine gewisse Spezifität in der Koaktivierung von AR-Zielgenen aufweist.

Um einen zelltypspezifischen Effekt auszuschließen, wurde die koaktivierende Wirkung der ZIPK auf die AR-vermittelte Transkription auch in anderen Zelllinien nachgewiesen. Dazu wurden zwei Prostatakarzinom-Zelllinien verglichen: Androgen-abhängig wachsende LNCaP-Zellen, die sehr hohe endogene AR-Proteinlevel aufweisen und PC3-Zellen, die keinen endogenen AR exprimieren. Ferner wurde die Brustkrebszelllinie MCF7 verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die ZIPK in allen drei Zelllinien eine vergleichbare Koaktivatorfunktion aufweist (ohne Abb.). Die Transkription wurde durch die ZIPK mengen- und hormonabhängig aktiviert und war dabei abhängig von der enzymatischen Aktivität der ZIPK. Somit lässt sich festhalten, dass die ZIPK aktivierend auf AR-regulierte Zielgene wirkt, mit Ausnahme des TMPRSS2-Gens. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem humanen und dem murinen Ortholog konnte nicht festgestellt werden.

#### 4.1.2 Kolokalisiert die ZIPK mit dem AR?

Nachdem eine Beteiligung der ZIPK an Transkriptionsprozessen nachgewiesen wurde, sollte mittels Immunfluoreszenz-Analysen überprüft werden, ob evtl. hormonabhängig eine Translokation in den Kern und eine Kolokalisation mit dem AR stattfindet. Dazu wurden MCF7-Zellen mit Flag-AR und den GFP-ZIPK-Orthologen transfiziert und nach Hormonstimulation einer Immunfärbung unterzogen.



**Abb. 4.5: Immunfluoreszenzanalyse der Koexpression von AR und ZIPK-Orthologen.**

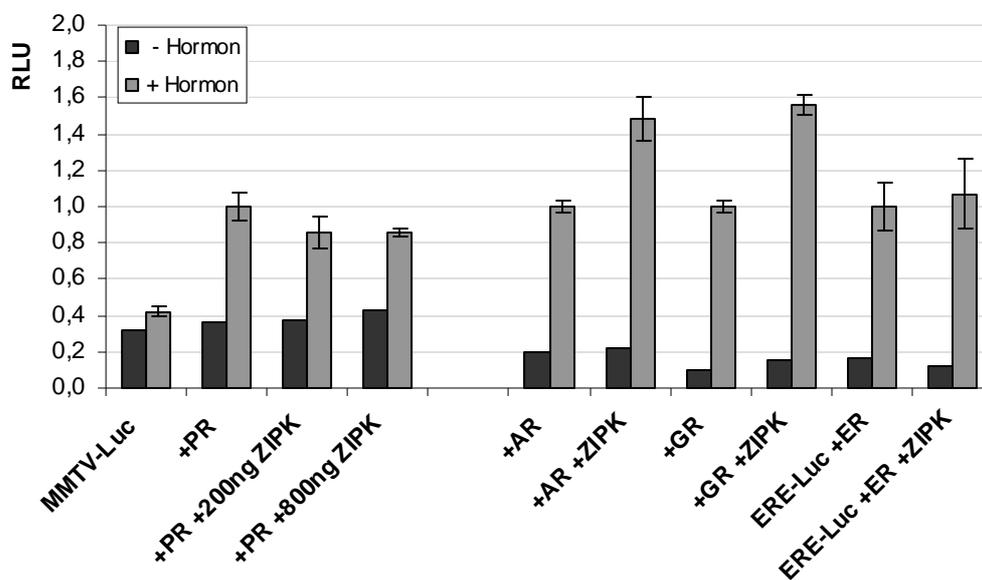
MCF7-Zellen wurden für 20 h mit Flag-AR und GFP-DIk bzw. GFP-ZIPK transfiziert. Nach 60 min Induktion mit DHT wurden die Zellen fixiert und mit anti-Flag-AK immungefärbt. Die DNA wurde mit DRAGV angefärbt und mittels „AxioVision LE“-Software in Blau dargestellt. Balken = 10 µm.

Eine hormonabhängige Translokation der ZIPK in den Kern konnte nicht beobachtet werden. Die ZIPK lag in etwa 60 % der Zellen ausschließlich cytoplasmatisch vor. In den restlichen 40 % der Zellen ließ sich auch ohne Hormonstimulation zusätzlich zur cytoplasmatischen Lokalisation eine unterschiedlich stark ausgeprägte Kernlokalisierung beobachten, dabei lag die ZIPK bei 10 % der Zellen überwiegend nukleär vor. Dies stimmt mit vorausgegangen Immunfluoreszenz-Analysen überein, in denen für die überwiegend cytoplasmatisch lokalisierte ZIPK bei etwa 40 % der Zellen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Kernlokalisierung beobachtet wurde (Brinckmann, Diplomarbeit 2007).

In der abgebildeten Zelle (Abb. 4.5) zeigte die ZIPK eine fast vollständige Kernlokalisierung. Im Gegensatz zur DIk, deren Expression in der Ausbildung von punktförmigen Anreicherungen, den sog. „Speckles“, im Kern resultierte, waren die ZIPK Anreicherungen deutlich diffuser. Der AR zeigte hormonabhängig auftretende punktförmige Anreicherungen im Kern, die möglicherweise die Orte AR-abhängiger Transkription repräsentieren (Sutherland und Bickmore, 2009). Für beide ZIPK-Orthologen fand sich eine partielle Kolokalisation mit dem AR, die im überlagerten Bild als gelbe Bereiche sichtbar werden. Dies untermauert eine Funktion der ZIPK in AR-abhängigen Transkriptionsprozessen.

### 4.1.3 Einfluss der ZIPK auf andere Steroidhormonrezeptoren

Weiterhin stellte sich die Frage, inwieweit es sich bei der ZIPK um einen generellen Koaktivator von Nuklearrezeptoren handelt, oder ob ihre Funktion auf den AR beschränkt ist. Aus vorhergegangenen Experimenten war bekannt, dass die Dlk auch die GR-abhängige Transkription aktivieren kann, allerdings keinen Effekt auf die ER-abhängige Transaktivierung ausübt (Leister, Diplomarbeit 2003). Diese Befunde sollten für die humane Kinase überprüft und auf den PR ausgedehnt werden. Dazu wurden der AR, GR und PR mit dem MMTV-Promotor, der ER mit dem ERE-Luc-Reportergenkonstrukt und dem ZIPK-Expressionsplasmid kotransfiziert.



**Abb. 4.6: Einfluss der ZIPK auf die Steroidhormonrezeptoren PR, AR, GR und ER**

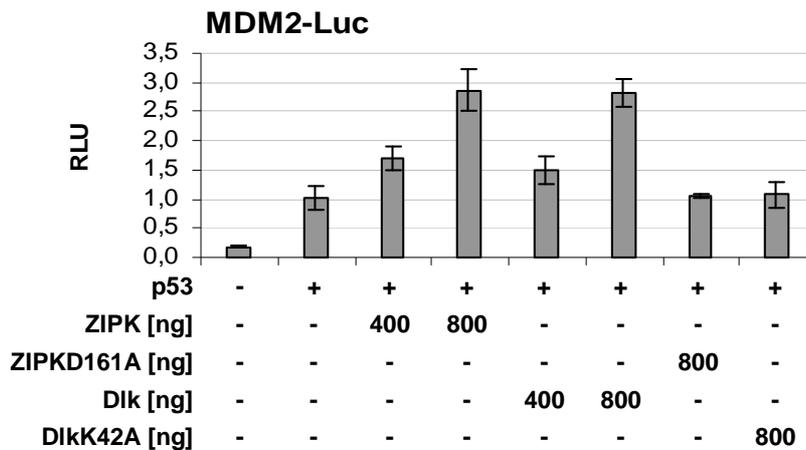
HEK293-Zellen wurden mit 500 ng MMTV-Luc, 150 ng pCMV-Renilla und PR (300 ng), AR (50 ng), GR (100 ng) bzw. 500 ng ERE-Luc und 200 ng ER transfiziert. ZIPK für PR wie angegeben, sonst 400 ng. Die Induktion erfolgte für 20 h mit 100 nM Progesteron für PR, 100 nM DHT für AR, 10 nM Dexamethason für GR und 10 nM Estradiol für ER. Die Luciferaseaktivität wurde auf die Aktivität der induzierten Rezeptoren ohne ZIPK normiert.

Es zeigte sich, dass die GR-vermittelte Transkription in etwa gleichem Maße wie die AR-abhängige Transkription durch die ZIPK koaktiviert wurde (Abb. 4.6). Dagegen wies die ZIPK keinen koaktivierenden Effekt auf die ER- und PR-vermittelte Reporterexpression auf. Die ZIPK scheint somit innerhalb der Steroidhormonrezeptoren eine gewisse Spezifität zu besitzen.

### 4.1.4 Effekt der ZIPK auf die p53-abhängige Transkription

Es sollte analysiert werden, inwieweit der koaktivierende Effekt auf Steroidhormonrezeptoren beschränkt ist, oder ob die ZIPK auch auf weitere Transkriptionsfaktoren koaktivierend wirkt. Anhand der am p21-Promotor erzielten Werte erschien ein Einfluss der ZIPK auf die p53-

abhängige Transkription möglich. Dies wurde mittels des p53-abhängigen Mdm2-Luciferase-Reportergenkonstrukts, der Expression von p53 sowie steigenden Mengen ZIPK untersucht.



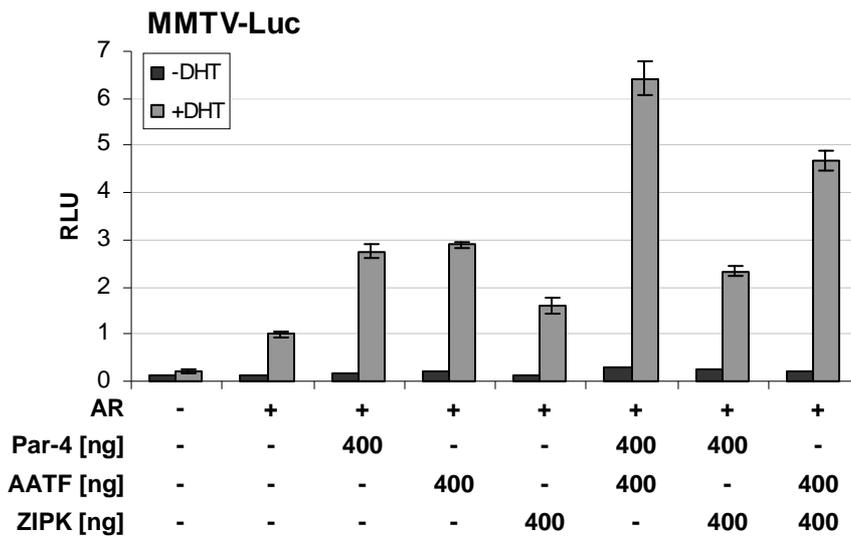
**Abb. 4.7: Die ZIPK wirkt auch auf die p53-abhängige Transkription koaktivierend.**

HEK293-Zellen wurden mit 600 ng MDM2-Luc, 150 ng pCMV-Renilla, 150 ng p53 und steigenden Mengen ZIPK bzw. Dlk oder den kinaseinaktiven Mutanten kotransfiziert. Die RLU ist normiert auf die Aktivität von p53.

Abbildung 4.7 zeigt, dass die ZIPK auch auf die p53-abhängige Reporterexpression koaktivierend wirkt. Dabei verhielten sich die ZIPK-Orthologen mit einer jeweils 2,8-fachen Steigerung der Luciferaseaktivität gleich. Ohne Phosphorylierungsaktivität wirkten die Kinasen nicht aktivierend auf das System.

#### 4.1.5 Zusammenspiel von ZIPK mit AATF, TSG101 und Par-4 bei der AR-abhängigen Transkription

Unter den Interaktionspartnern der ZIPK-Orthologen sind mit AATF und Par-4 (interagiert nur mit der Dlk) Proteine mit einer bereits nachgewiesenen koaktivierenden Wirkung auf die AR-vermittelte Transkription beschrieben. Dabei interagiert AATF sowohl mit der Dlk als auch mit dem AR und in Koexpression zeigen sie einen kooperativen Effekt auf die AR-abhängige Transkription (Leister *et al.*, 2008). TSG101 wirkt aktivierend auf die AR-abhängige Transkription, indem es vermutlich über AATF an den AR rekrutiert wird und diesen in seiner monoubiquitinierten, vermutlich aktiven Form stabilisiert (Burgdorf *et al.*, 2004). Für Par-4 ist eine koaktivierende Wirkung auf die AR-abhängige Transkription am c-FLIP-, MMTV-Promotor und PSA-Enhancer beschrieben (Gao *et al.*, 2006). Aufgrund der bekannten Zusammenhänge der Proteine in Bereichen der Apoptoseregulation, hier wirkt AATF der Par-4 und Dlk-vermittelten Apoptoseinduktion entgegen (Page *et al.*, 1999b), lag es nahe ein Zusammenspiel in der Transkription zu untersuchen. Außerdem sollten die bekannten funktionellen Zusammenhänge von den murinen auf die humanen Orthologen übertragen werden. Daher wurden verschiedene Kombinationen der humanen Proteine auf ihren Effekt auf die AR-vermittelte Transkription zunächst am MMTV-Promotor untersucht.

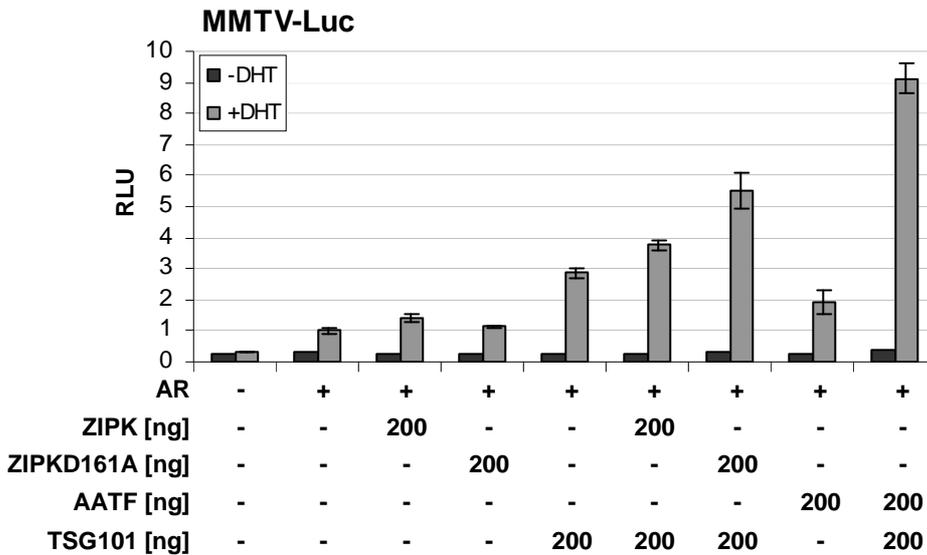


**Abb. 4.8: Effekt der Koexpression von ZIPK mit AATF und Par-4 auf die AR-abhängige Transkription.**

HEK293-Zellen wurden mit 600 ng MMTV-Luc, 100 ng pCMV-Renilla, 50 ng AR und je 400 ng Par-4, AATF und ZIPK in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Induktion des AR für 18 h mit 100 nM DHT. Die RLU ist auf die Aktivität des induzierten AR normiert.

Abbildung 4.8 zeigt, dass AATF, Par-4 und die ZIPK als Koaktivatoren auf die AR-abhängige Transkription wirken. AATF und Par-4 waren dabei mit einer 2,8- bzw. 3-fachen Steigerung deutlich stärker aktivierend als die ZIPK mit einer 1,6-fachen Steigerung. Bei Koexpression von AATF und ZIPK konnte der von den Orthologen der Ratte bereits bekannte additive Effekt auch für die humanen Proteine beobachtet werden. Die Koexpression von AATF mit Par-4 zeigte interessanter Weise mit einer 6,4-fachen Steigerung der RLU einen mehr als additiven Effekt. Demgegenüber fand sich mit einer 2,3-fachen Aktivitätssteigerung bei Koexpression von Par-4 und ZIPK ein deutlich unter der Summe der Einzelaktivitäten liegender Wert.

Da AATF sowohl mit der ZIPK als auch mit TSG101 interagiert, wurde eine mögliche Kooperation zwischen TSG101 und ZIPK untersucht. Zunächst erfolgte der Nachweis der koaktivierenden Wirkung von humanem TSG101. Dabei konnte in allen untersuchten Zelllinien eine Koaktivatorfunktion beobachtet werden (ohne Abb.). Anschließend wurden Kombinationen von TSG101 mit der ZIPK und der kinaseinaktiven Mutante, sowie AATF als Kontrolle, untersucht.



**Abb. 4.9: Effekt der Koexpression von TSG101 mit ZIPK und AATF auf die AR-abhängige Transkription.**

HEK293-Zellen wurden mit 500 ng MMTV-Luc, 150 ng pCMV-Renilla, 20 ng AR und den angegebenen Mengen an ZIPK, kinaseinaktiver Mutante, TSG101 und AATF transfiziert. Die Induktion des AR erfolgte für 18 h mit 100 nM DHT. Die RLU wurde auf die Aktivität des induzierten Rezeptors normiert.

Die ektopische Koexpression von AR und TSG101 bewirkte eine 3-fache Steigerung der Luciferaseaktivität. In Kombination mit der ZIPK ergab sich ein etwas höherer Wert. Interessanterweise führte die Koexpression mit der kinaseinaktiven ZIPK zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität auf das 5,5-fache. Die Expression von TSG101 zusammen mit AATF resultierte in einem 9-fachen Anstieg und zeigte somit einen deutlich kooperativen Effekt, der die funktionelle Interaktion der beiden humanen Proteine in der AR-vermittelten Transkription widerspiegelt.

## 4.2 Ist die ZIPK essentiell für die AR-abhängige Transkription?

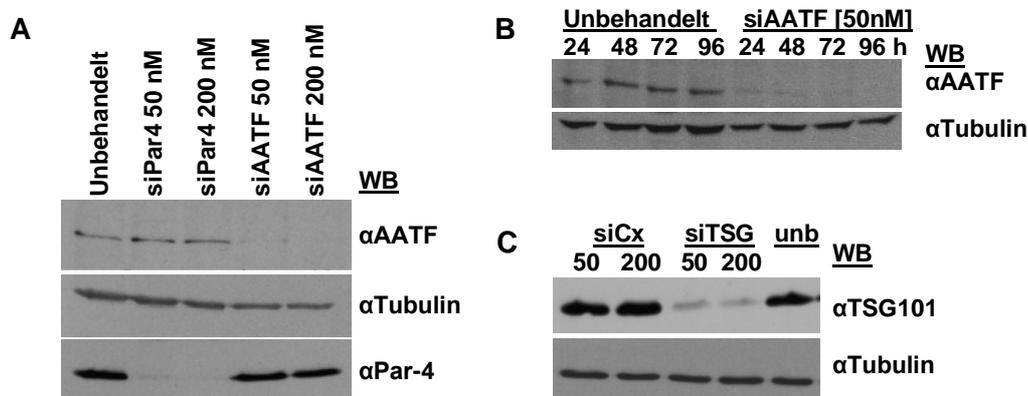
Die mittels ektopischer Expression ermittelte Funktion als Koaktivatoren für ZIPK, AATF und TSG101, sollte für die endogenen Proteine verifiziert werden. Dazu wurde zunächst ein siRNA-basiertes System zur effizienten Ausschaltung der Expression etabliert.

### 4.2.1 Etablierung der siRNAs gegen ZIPK, AATF, TSG101 und Par-4

Die Herunterregulation der endogenen Proteine erfolgte mittels RNA-Interferenz (RNAi). Der Wirkmechanismus von RNAi beruht auf der posttranskriptionellen Genstilllegung und dient eukaryontischen Zellen unter anderem der Abwehr von Viren und Transposons, gewinnt aber zunehmend an Bedeutung als Regulationsmittel. In der Molekularbiologie erlangt die RNAi große Bedeutung, da sich fast jedes Gen in der Zellkultur vorübergehend mittels RNAi ausschalten lässt. Dabei wird entweder die direkte Inhibierung der Translation der Ziel-mRNA bewirkt (Wightman *et al.*, 1993) oder kleine doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA)

führen zum Abbau der mRNA eines bestimmten Zielgens (Übersicht bei Hannon, 2002). Diese kleinen dsRNA-Moleküle sind 21 bis 25 nt lang und werden auch als siRNA (small interfering RNA) bezeichnet. Sie entstehen durch Prozessierung von dsRNA-Vorläufern durch den DICER, einer Endonuklease der RNaseIII-Familie (Carmell und Hannon, 2004). Die siRNA wird in den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) geladen und von Ago-2 (Argonaute-2) zu einem einzelsträngigen siRNA-Molekül prozessiert. Der aktivierte RISC-Komplex wird durch die siRNA an die Zielsequenz geführt und bewirkt dort den Abbau der mRNA (Tang, 2005). Dabei hängt die Effizienz der Herunterregulation des Zielgens von der Sekundärstruktur der Zielsequenz ab, da diese die Anlagerung der komplementären siRNA verhindern kann (Holen *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde durch Transfektion von synthetisch hergestellten siRNA-Molekülen der spezifische Abbau der Ziel-mRNA induziert. Dabei hängt die Effizienz der siRNA stark von der Transfektionseffizienz ab. Die siRNA gegen humanes Par-4 (Kawai *et al.*, 2004) wurde als Positivkontrolle verwendet, da die Transfektion von 50 nM siPar4 bereits nach 24 h zu einer fast vollständigen Reduktion der Par-4-Proteinlevel in HEK293- (Abb. 4.10 A) und LNCaP-Zellen führte (ohne Abb.). Nach 48 h siRNA gegen Par-4 ergab die densitometrische Messung eine Reduktion auf 3 % bei 50 nM und auf 1,2 % bei 200 nM siRNA (Abb. 4.10 A).



**Abb. 4.10: Überprüfung der Funktionalität der siRNAs gegen humanes AATF, TSG101 und Par-4.**

A) HEK293-Zellen wurden für 48 h mit 50 bzw. 200 nM siRNA gegen AATF und Par-4 transfiziert oder unbehandelt belassen. Je 50 µg Gesamtprotein wurden mittels 8,5 % SDS-Page aufgetrennt und mit AK gegen AATF, Par-4 und α-Tubulin immungefärbt. B) Western-Blot (WB)-Analyse von HEK293-Zellen, die für 24, 48, 72 und 96 h mit 50 nM siRNA gegen AATF transfiziert wurden. Mittels 8,5 % SDS-Page wurden 50 µg der Gesamtextrakte aufgetrennt und mit AK gegen AATF oder α-Tubulin immungefärbt. C) WB-Analyse von HEK293-Zellen, die nach 48 h Transfektion mit siRNA gegen TSG101 (50 und 200 nM), unspezifischer Kontroll-siRNA (siCx, 50 und 200 nM) oder unbehandelt geerntet wurden. Mittels 10 % SDS-Page erfolgte die Auftrennung von 20 µg Cytoplasmaextrakt. Die Immunfärbung erfolgte mit anti-TSG101 und anti-α-Tubulin AK.

Die siRNA zur Herunterregulation von AATF bestand aus einem Pool von vier Sequenzen. Zunächst wurden 50 nM und 200 nM siAATF, sowie siPar4 als Positivkontrolle, auf ihre Effizienz untersucht. Nach 48 h Inkubation der siRNA wurden die HEK293-Zellen lysiert und

einer Western-Blot (WB)-Analyse unterzogen. Wie in Abb. 4.10 A zu erkennen, führten beide Konzentrationen zu einer effizienten Reduktion der Proteinlevel auf 9 bzw. 4 %. Um zu untersuchen, wie lange die Herunterregulation bestehen bleibt, wurden nach Transfektion von 50 nM siAATF über einen Zeitraum von 96 h Proben entnommen und mittels Western-Blot analysiert. Die bereits nach 24 h vorliegende effiziente Reduktion der AATF-Proteinlevel, blieb über einen Zeitraum von 96 h konstant unter 5 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 4.10 B).

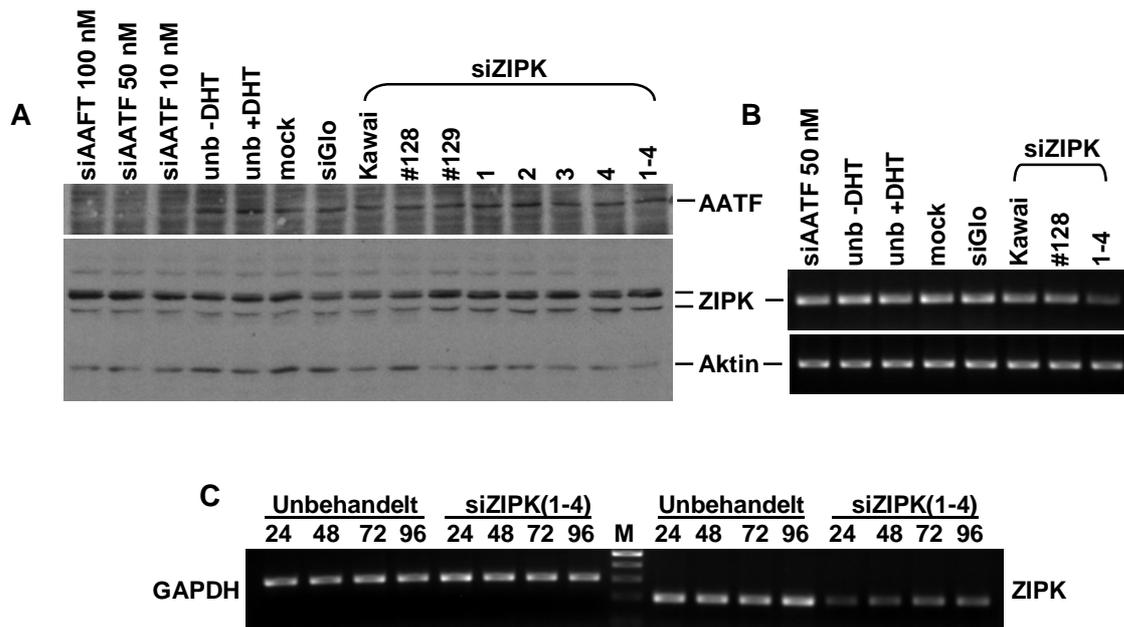
Gegen TSG101 wurde ebenfalls ein Pool aus vier Sequenzen eingesetzt. Bei der in Abb. 4.10 C dargestellten WB-Analyse ergab die Intensitätsmessung eine Reduktion der TSG101-Proteinlevel auf 10 % bei 50 nM und auf 6 % bei 200 nM siRNA. Die Kontroll-siRNA zeigte im Vergleich zu unbehandelten Zellen auch hier keinen negativen Effekt auf die Expression von TSG101.

Die Herunterregulation der ZIPK gestaltete sich wesentlich schwieriger, da diverse siRNA-Sequenzen und der Einsatz von plasmidbasierter shRNA (short hairpin RNA) in WB-Analysen keine Verminderung der Proteinlevel der ZIPK detektierten (Conradi, Dissertation 2009). Da in dieser Arbeit die Stilllegung der ZIPK für zahlreiche Fragestellungen von besonderem Interesse war, wurden die vorhandenen siRNA-Sequenzen erneut auf ihre Effizienz untersucht. Dabei sollten neben den Protein- auch die mRNA-Level detektiert werden.

LNCaP-Zellen wurden mit je 50 nM nachfolgender siRNAs gegen die ZIPK transfiziert: „Kawai“ (Kawai *et al.*, 2003), #128 und #129 von der Firma Ambion und SMARTpool von der Firma Dharmacon. Dieser besteht aus vier Sequenzen, die einzeln oder im Gemisch (1-4) eingesetzt wurden. Als Kontrollen wurden zwei Ansätze mit unbehandelten Zellen mitgeführt, von denen einer mit DHT induziert wurde. Hier sollte ein Einfluss der hormonbedingten Aktivierung der AR-abhängigen Transkription auf die Effizienz der siRNA ausgeschlossen werden. Weitere Kontrollen waren Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (mock), Ansätze mit siGlo, über welches im Fluoreszenzmikroskop die Transfektionseffizienz bestimmt werden konnte und Ansätze mit siRNA gegen AATF (10, 50 und 100 nM) als Positivkontrolle.

Nach 48 h wurde die Effizienz der verschiedenen siRNAs mittels WB-Analyse und RT-PCR bestimmt. Abb. 4.11 A zeigt, dass in keinem Ansatz eine Reduktion der ZIPK-Proteinlevel zu beobachten war. Die AATF-Proteinlevel wurden jedoch deutlich reduziert und im Fluoreszenzmikroskop konnte mit 80 % eine hohe Transfektionseffizienz bei den siGlo-Ansätzen beobachtet werden. Überraschenderweise konnte auf mRNA-Ebene (Abb. 4.11 B) eine schwache Herunterregulation der ZIPK-mRNA bei den „Kawai“ (79 %) und #128 (74 %) sowie eine starke Reduktion bei dem SMARTpool Ansatz (1-4, 36 %) detektiert werden.

Um dies zu bestätigen und möglicherweise durch eine veränderte Inkubationszeit eine noch stärkere Herunterregulation auf mRNA-Ebene zu erzielen, wurden Ansätze mit 50 nM SMARTpool (1-4) transfiziert und nach 24, 48, 72 und 96 h auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Auf Proteinebene wurde erneut keine Reduktion detektiert (ohne Abb.), auf mRNA-Ebene konnte eine deutliche Verminderung der ZIPK-mRNA festgestellt werden (Abb. 4.11 C), die nach 24 h siRNA-Behandlung mit einer Reduktion auf 22 % am deutlichsten ausfiel. Über den untersuchten Zeitraum stiegen die mRNA-Level wieder an, blieben jedoch deutlich unter dem Level der unbehandelten Zellen. Für die folgenden Versuche wurde nur noch der SMARTpool verwendet.

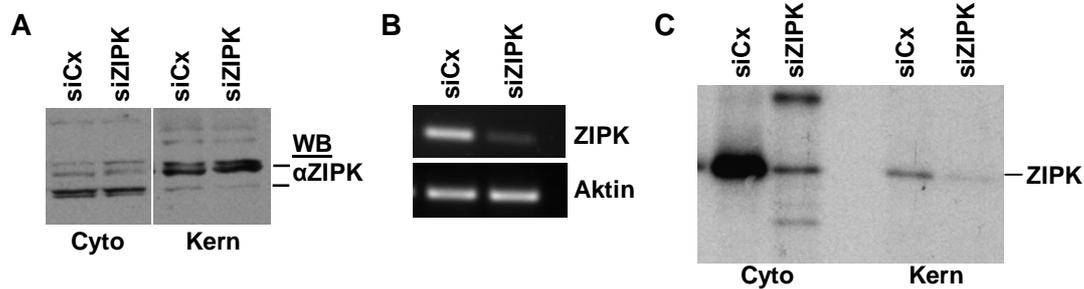


**Abb. 4.11: Die siRNA (1-4) gegen die ZIPK führt zu einer Reduktion der mRNA-Level in LNCaP-Zellen.**

A) WB-Analyse von LNCaP-Zellen, die nach 48 h siRNA gegen AATF (10, 50 und 100 nM), ZIPK (je 50 nM: „Kawai“, #128 und #129 von Ambion, SMARTpool Sequenzen 1-4 von Dharmacon), siGlo, Lipofectamine2000 (mock) und unbehandelt (uninduziert, induziert mit DHT) lysiert wurden. 35 µg Benzonsäure-Extrakt wurden mittels 10 % SDS-Page aufgetrennt und mit AK gegen AATF, ZIPK und Aktin immungefärbt. B) Ein Teil der Zellpellets aus A) wurde einer RNA-Isolation und RT-PCR unterzogen, um die mRNA-Level von ZIPK (193 bp) und Aktin (243 bp) durch PCR und Agarose-Gelelektrophorese bestimmen zu können. C) LNCaP-Zellen wurden mit 50 nM siZIPK (SMARTpool, Sequenzen 1-4) transfiziert und nach 24, 48, 72 und 96 h geerntet. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurden die mRNA-Level von GAPDH (309 bp) und ZIPK mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese detektiert. M = 100 bp Marker.

Aufgrund der Diskrepanz zwischen WB-Analyse und RT-PCR sollte durch Überprüfung der Kinaseaktivität nach siRNA eine Aussage über die Effizienz der siRNA getroffen werden. Dazu wurden LNCaP-Zellen mit je 100 nM unspezifischer siRNA oder dem SMARTpool für 48 h transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde für die RNA-Isolation, RT-PCR und anschließende Analyse der ZIPK-mRNA verwendet. Mit Cytoplasma- und Kernextrakt von den restlichen Zellen wurde eine Immunpräzipitation gegen ZIPK durchgeführt und die Aktivität der

präzipitierten Kinase wurde anhand der Autophosphorylierung im *in-vitro*-Kinaseassay detektiert.



**Abb. 4.12: Effektive Reduktion der Autophosphorylierung der ZIPK durch siRNA.**

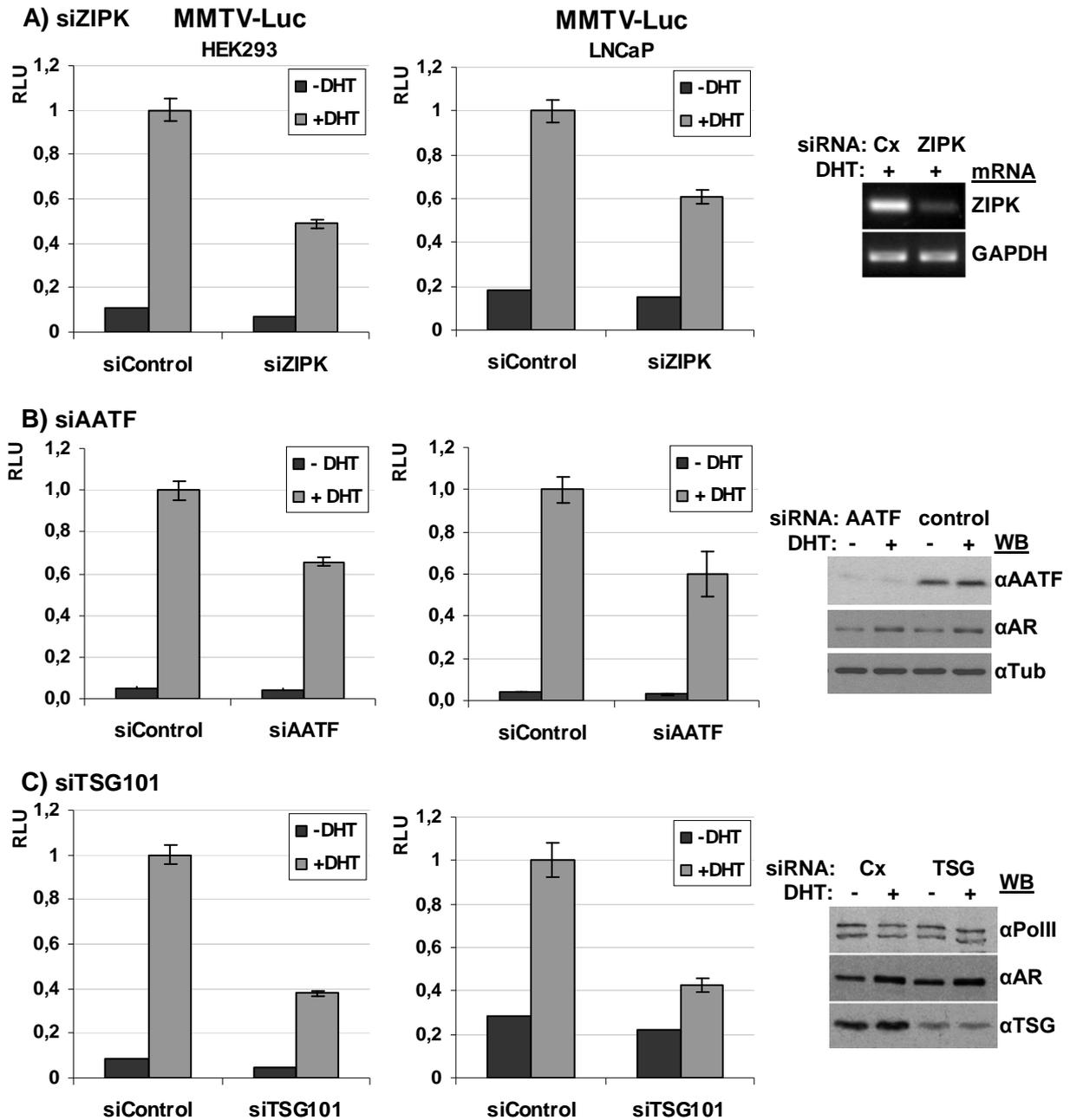
LNCaP-Zellen wurden mit 100 nM unspezifischer siRNA (siCx) oder SMARTpool gegen ZIPK transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteinlevel der ZIPK im Cytoplasma (Cyto)- und Kernextrakt mittels WB-Analyse und ZIPK-AK bestimmt (A). Die mRNA-Level von ZIPK und Aktin wurden nach RNA-Isolation, cDNA-Synthese und spezifischer PCR durch Agarose-Gelelektrophorese detektiert (B). Von Cytoplasma- und Kernextrakten wurde eine IP mit anti-ZIPK-AK durchgeführt. Für den *in-vitro*-Kinaseassay erfolgte eine 30 min Inkubation der IPs mit [<sup>32</sup>P]-γ-ATP. Nach Auftrennung der Proben mittels 10 % SDS-Page wurde die Autophosphorylierung der ZIPK autoradiographisch sichtbar gemacht (C).

Abb. 4.12 zeigt, dass auf Proteinebene erneut keine Reduktion der ZIPK zu detektieren war. Demgegenüber war die mRNA der ZIPK effektiv auf 12 % reduziert. Die Autoradiographie des *in-vitro*-Kinaseassays zeigte eine deutlich verminderte Autophosphorylierung und damit Aktivität der ZIPK. Für die Autophosphorylierung der ZIPK aus dem cytoplasmatischen Extrakt ergab sich eine Reduktion auf 6,7 % und für den Kernextrakt auf 10 % nach siZIPK. Somit korrelieren die reduzierten mRNA-Level mit einer effektiv verminderten Kinaseaktivität. Die Effektivität der Herunterregulation der ZIPK wurde in nachfolgenden Versuchen daher über die Analyse der mRNA-Level der ZIPK bestimmt.

#### 4.2.2 Einfluss von endogener ZIPK, AATF und TSG101 auf die AR-abhängige Reporterexpression

Reporterstudien nach siRNA-basierter Herunterregulation von ZIPK, AATF und TSG101, sollten eine Beteiligung der endogenen Proteine an der AR-vermittelten Transkription am MMTV-Promotor und PSA-Enhancer in HEK293- und LNCaP-Zellen nachweisen. Da beide Reportergenkonstrukte annähernd gleiche Werte lieferten, sind nachfolgend nur die am MMTV-Promotor gemessenen Werte graphisch dargestellt.

Anhand Abbildung 4.13 A lässt sich erkennen, dass die Reduktion der ZIPK mRNA-Level auf 15 % eine Verminderung der AR-abhängigen Transkription des MMTV-Reportergenkonstruktes in HEK293-Zellen auf 49 % und in LNCaP-Zellen auf 61 %, im Vergleich zu den mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen, bewirkte.



**Abb. 4.13: Die Herunterregulation von endogener ZIPK, AATF und TSG101 führt zu einer verminderten Aktivierung der AR-abhängigen Transkription.**

HEK293-Zellen bzw. LNCaP-Zellen wurden mit 75 nM siRNA gegen die ZIPK (A), 50 nM siRNA gegen AATF (B), 75 nM siRNA gegen TSG101 (C) und jeweils unspezifischer Kontroll-siRNA, sowie den Plasmiden MMTV-Luc und pCMV-Renilla transfiziert. HEK293 wurden zusätzlich mit GFP-AR transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Induktion der Zellen mit 100 nM DHT für weitere 24 h. Anschließend erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Die RLU ist auf den Wert der induzierten Kontrolle normiert. Die siRNA-Effizienz wurde mittels WB-Analyse über die angegebenen AK oder RT-PCR ermittelt.

Auch nach Herunterregulation von AATF wurde die AR-abhängige Transkription vermindert (Abb. 4.13 B). Im Vergleich zur Kontroll-siRNA erfolgte eine Reduktion der relativen Luciferaseaktivität auf 65 % in HEK293- bzw. 59 % in LNCaP-Zellen. In der WB-Analyse ist

eine effiziente Herunterregulation von endogenem AATF auf 7 % in HEK293-Zellen zu erkennen. Als Kontrolle wurden die Proteinlevel von AR und Tubulin analysiert. Diese waren unbeeinflusst von der siRNA-Behandlung, da die Banden in behandelten und unbehandelten Zellen gleichstark ausfielen. Die höhere Intensität der AR-Banden in den induzierten Ansätzen ist darauf zurückzuführen, dass der AR seine eigene Transkription autoregulatorisch aktiviert.

Die Herunterregulation von TSG101 wies den stärksten Effekt auf die AR-abhängige Transkription (Abb. 4.13 C) auf. Sie führte zu einer Reduktion auf 38 % in HEK293-Zellen bzw. 42 % in LNCaP-Zellen. Auffallend war, dass die Reduktion der TSG101-Proteinlevel auch auf die uninduzierten Proben einen schwach reprimierenden Effekt zeigte. Mittels WB-Analyse konnte die effiziente Herunterregulation von TSG101, bei gleichzeitig unbeeinflussten Proteinleveln von AR und RNA-Polymerase II nachgewiesen werden.

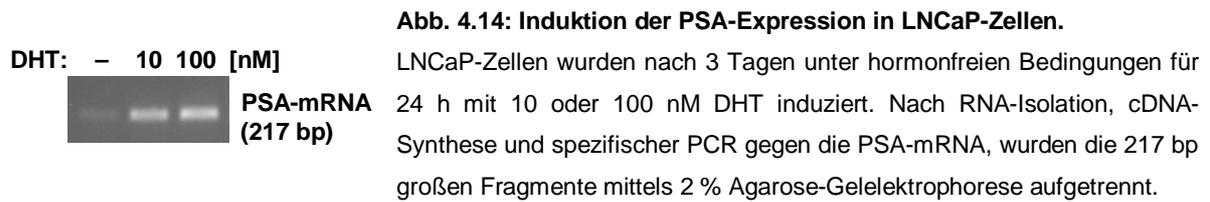
Somit konnte die koaktivierende Funktion von ZIPK, AATF und TSG101 auf die AR-abhängige Reporterexpression auch für die endogenen Proteine bestätigt werden.

#### **4.2.3 Einfluss der Koaktivatoren auf die Expression endogener AR-Zielgene**

Expressionsanalysen von endogenen Zielgenen des AR nach Herunterregulation von ZIPK, AATF, TSG101 und Par-4, sollten die in den Reporterstudien ermittelten Daten auch für endogene Zielgene des AR bestätigen. Als Zielgene wurden PSA, KLK2 und TMPRSS2 ausgewählt, deren regulatorische Bereiche auch als Reportergenkonstrukte eingesetzt wurden. LNCaP-Zellen, als Androgen-abhängig wachsende Prostatakarzinomzellen, exprimieren die Zielgene des AR konstitutiv. Durch Etablierung von Androgen-freien Bedingungen, sollte die Androgen-abhängige Transkription zunächst auf ein Mindestmaß reduziert werden. Dazu wurden LNCaP-Zellen drei Tage in einem hormonfreien Medium (phenolrotfrei und mit dialysiertem, aktivkohlegereinigtem FCS) kultiviert, um eine Synthese von Androgenen aus anderen Hormonen zu unterbinden. Dies ermöglicht es, die AR-abhängige Transkription zu einem definierten Zeitpunkt zu aktivieren, also ein induzierbares System zu schaffen. Das hat den Vorteil, dass in nachfolgenden Analysen bereits nach sehr kurzen Induktionszeiten die initiale Rekrutierung der Koaktivatoren an ARE detektiert werden konnte. Außerdem lassen sich kleine Unterschiede in der Genexpression erfassen, die durch das Fehlen eines Koaktivators verursacht werden.

Die Kultivierung in hormonfreiem Medium resultierte in einem deutlich verlangsamtem Wachstum und einer deutlichen Reduktion der PSA-Expression. Die Induktion mit 10 nM DHT bewirkte eine 5-fache, mit 100 nM eine 7,9-fache Erhöhung der PSA-mRNA-Level im Gegensatz zu den uninduzierten Zellen (Abb. 4.14). Die Induktion mit 10 nM entspricht dabei der physiologischen Konzentration. Da allerdings bei 100 nM eine weitere Erhöhung der Transkription stattfand und diese Konzentration üblicherweise in der Literatur verwendet

wird, wurde die AR-abhängige Transkription in allen folgenden Experimenten mit 100 nM DHT induziert, nachdem die Zellen drei Tage hormonfrei kultiviert wurden.

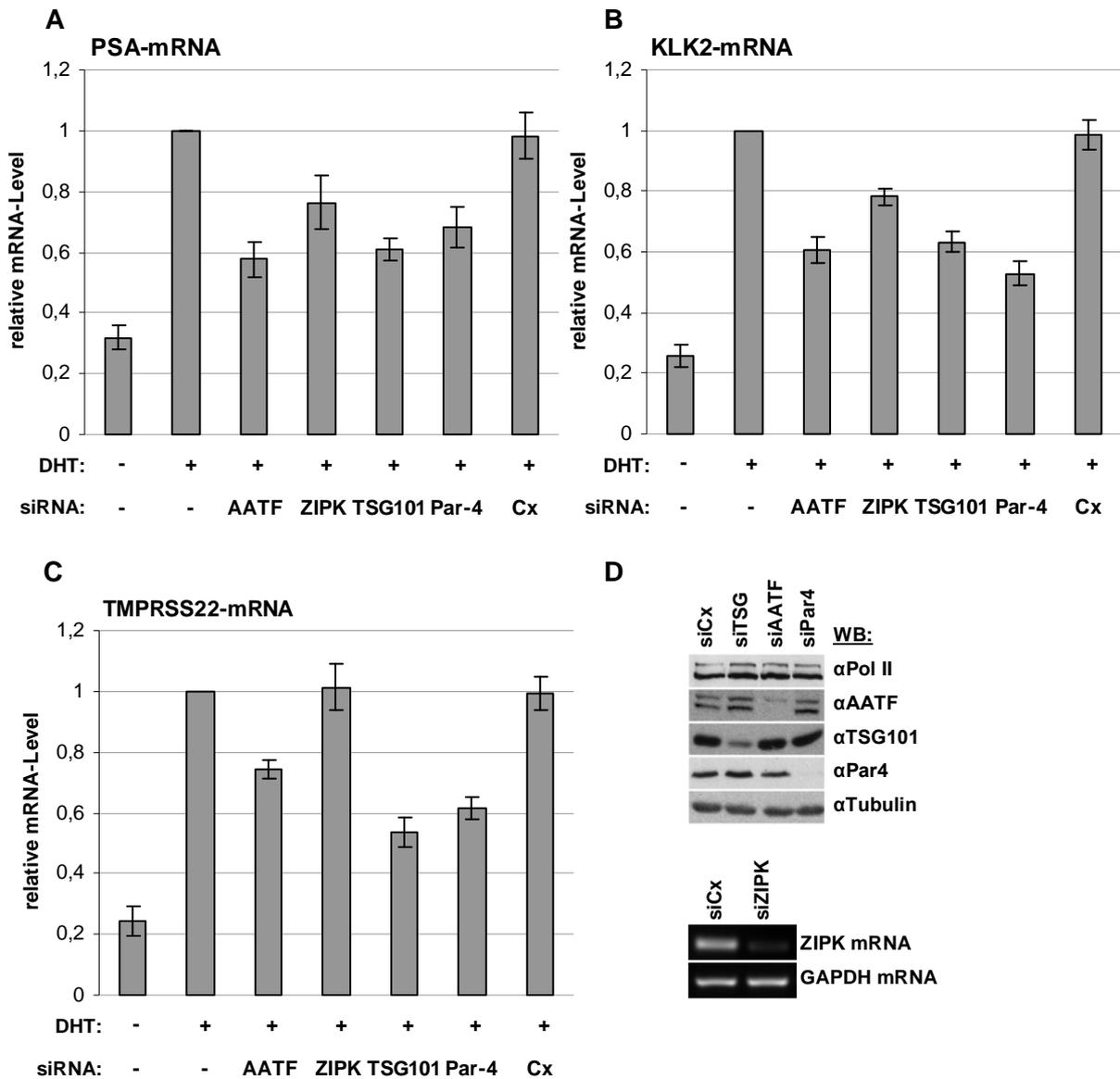


Um den Effekt der Herunterregulation der einzelnen Faktoren auf die AR-vermittelte Transkription von PSA-, TMPRSS2- und KLK2-Genen zu untersuchen, wurden LNCaP-Zellen mit siRNA gegen die einzelnen Faktoren transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DHT für 24 h induziert. Nach Qualitätskontrolle der isolierten RNA erfolgte die cDNA-Synthese, der sich die semiquantitative PCR mit spezifischen Primern anschloss. Die mRNA-Level der AR-Zielgene PSA, KLK2 und TMPRSS2 wurden nach Agarose-Gelelektrophorese densitometrisch ausgemessen. Dabei diente die PCR gegen GAPDH als Mengenabgleich. Der Quotient aus Zielgen/GAPDH wurde für vier unabhängige Experimente berechnet und auf den Wert der induzierten Probe ohne siRNA-Behandlung normalisiert. Die jeweiligen Mittelwerte wurden graphisch dargestellt (siehe Abb. 4.15).

Die Induktion der Transkription ließ sich anhand des erzielten 4-fachen Anstiegs der mRNA von KLK2 und TMPRSS2 und des 3-fachen Anstiegs der PSA-mRNA nachweisen. Die Auswertung der mRNA-Expressionslevel nach siRNA gegen die einzelnen Faktoren (Abb. 4.15), wies AATF, TSG101 und Par-4 als Koaktivatoren der AR-abhängigen Transkription des PSA-, KLK2- und TMPRSS2-Gens aus. Die Werte für die einzelnen Faktoren zeigen, dass PSA und KLK2 durch die gleichen Koaktivatoren in ähnlichem Ausmaß reguliert werden. So wurde die Transkription nach Ausschaltung von AATF auf 0,57 (PSA) bzw. 0,61 im Vergleich zu 0,74 für TMPRSS2 vermindert. Die Herunterregulation von TSG101 ließ mit 0,61 (PSA) bzw. 0,63 (KLK2) einen etwas stärkeren Effekt auf TMPRSS2 (0,53) erkennen. Für Par-4 lagen die Werte bei 0,68 (PSA), 0,52 (KLK2) und 0,61 (TMPRSS2).

Für die ZIPK konnte nach Herunterregulation eine Reduktion der AR-abhängigen Transkription des PSA-Gens auf 0,76 bzw. auf 0,78 für das KLK2-Gen detektiert werden. Demgegenüber konnte für die TMPRSS2-mRNA mit einem Wert von 1,01 keine Änderung beobachtet werden. Dies korreliert mit den bereits in den Reporterstudien ermittelten Daten (siehe Abb. 4.4). Dort wurde die Transkription der PSA- und KLK2-Reportergenkonstrukte durch die ZIPK koaktiviert, das TMPRSS2-Konstrukt dagegen nicht. Der Wert für die relativen mRNA-Level nach Transfektion von Kontroll-siRNA (siCx) lag bei den drei untersuchten mRNAs zwischen 0,98 und 0,99. Die verminderte Expression beruht also nicht auf einem unspezifischen Effekt der siRNA. Ferner blieb die als Mengenabgleich verwendete

GAPDH-mRNA unbeeinflusst von der Induktion mit DHT und der Transfektion der unterschiedlichen siRNAs (ohne Abb.).



**Abb. 4.15: Einfluss von AATF, ZIPK, TSG101 und Par-4 auf die Transkription endogener Zielgene des AR.** LNCaP-Zellen wurden drei Tage unter hormonfreien Bedingungen kultiviert bevor sie für 48 h mit siRNA gegen AATF, ZIPK, TSG101, Par-4 oder unspezifischer Kontroll-siRNA (siCx) transfiziert wurden. Zwei Ansätze wurden untransfiziert mitgeführt. Die Induktion erfolgte nach den 48 h mit 100 nM DHT für 24 h. Von den einzelnen Ansätzen wurde ein Teil für eine WB-Analyse zur Überprüfung der siRNA-Effizienz abgenommen. Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen AK gegen Pol II und Tubulin als interner Mengenabgleich, sowie AATF, TSG101 und Par-4 immungefärbt (D). Wurde eine effiziente Reduktion der einzelnen Faktoren detektiert erfolgte die RNA-Isolation vom Rest der Zellpellets. Nach der RT-PCR erfolgte die semiquantitative PCR mit spezifischen Primern gegen die mRNA von PSA (A), KLK2 (B) und TMPRSS2 (C). Die Effizienz der siRNA gegen die ZIPK wurde durch RT-PCR überprüft (D). Die Auswertung erfolgte nach Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese, durch Messung der jeweiligen Bandenintensitäten. Der Quotient aus Zielgen-/GAPDH-Intensität gibt die relativen mRNA-Level an. Die Anzahl der Versuche betrug n=4. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Somit lässt sich festhalten, dass es sich bei AATF, TSG101, ZIPK und Par-4 um echte Koaktivatoren des AR handelt, da die Herunterregulation der endogenen Proteine die Transkription von endogenen AR-abhängigen Zielgenen verminderte. Dabei konnte für die ZIPK die schon oben angedeutete Zielgenspezifität bestätigt werden.

### **4.3 Assoziation des AR und der Koaktivatoren an regulatorische Bereiche von AR-Zielgenen**

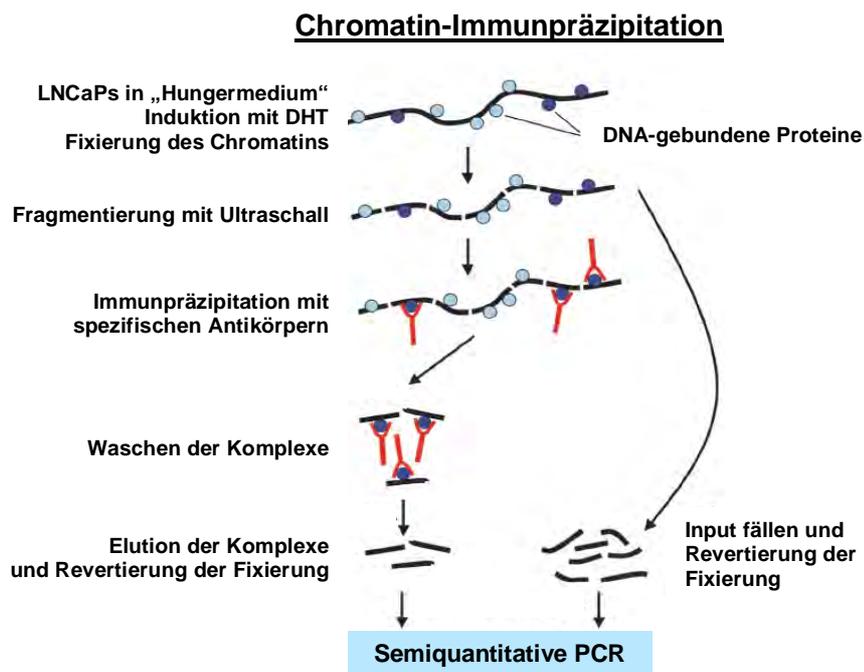
Eine Steigerung der Transkription bzw. Erhöhung der mRNA-Level durch ein bestimmtes Protein bedeutet nicht notwendigerweise, dass dieses direkt am Transkriptionsprozess beteiligt ist. Es könnte z. B. auch zur Prozessierung der prä-mRNA oder zur Stabilisierung der mRNA beitragen. Bei einer direkten Beteiligung an der Transkription sollte ein Protein im Transkriptionskomplex, gebunden an regulatorische Elemente des Chromatins, nachzuweisen sein. Dies lässt sich mit der Technik der Chromatin-Immunpräzipitation untersuchen. Erste Studien mit dieser Technik haben bereits für ZIPK und AATF eine hormonabhängige Rekrutierung an den PSA-Enhancer und Promotor nachweisen können (Leister *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen sollten auf die anderen Faktoren (TSG101, Par-4 und Blos2) ausgeweitet werden. Insbesondere aber sollte eine detaillierte Analyse der Rekrutierung der Koaktivatoren an regulatorische Elemente von verschiedenen AR-Zielgenen erfolgen. Dabei wurden die zeitliche Reihenfolge, die Dynamik der Assoziation und die Abhängigkeit der Proteine untereinander untersucht.

#### **4.3.1 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Abbildung 4.16 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf einer Chromatin-Immunpräzipitation. Mit Hilfe der ChIP lässt sich die Frage beantworten, ob ein bestimmtes Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt an einen bestimmten Bereich des Chromatins gebunden vorliegt. Die Assoziation mit Chromatin ist somit ein Indiz, dass untersuchte Koaktivatoren tatsächlich auf Transkriptionsebene regulierend wirken. Durch Einsatz von AK gegen verschiedene Proteine lässt sich die Zusammensetzung von Komplexen ermitteln. Anhand von Modifikations-spezifischen AK lassen sich zudem Modifikationen von Histonen oder anderen Chromatinproteinen im untersuchten Bereich erfassen.

Für die folgenden Analysen wurden LNCaP-Zellen für drei Tage unter hormonfreien Bedingungen gehalten und je nach Fragestellung mit spezifischen Inhibitoren vorbehandelt, bevor die Aktivierung der AR-abhängigen Transkription durch Induktion mit 100 nM DHT erfolgte. Die Fixierung der an die DNA gebundenen Proteine erfolgte mittels Formaldehyd.

Anschließend wurde das Chromatin durch Ultraschall-Behandlung in etwa 750 bp große Fragmente geschert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit spezifischen Antikörpern über Nacht. Nach einstündiger Inkubation mit Sepharose wurden die präzipitierten Komplexe mit stringenten Waschpuffern gewaschen und es folgte die Elution der Komplexe und die Revertierung der Fixierung durch Hitzezufuhr. Die mitgereinigte DNA wurde anhand spezifischer Primer in einer semi-quantitativen PCR amplifiziert (Details, siehe Methoden 3.2.7).



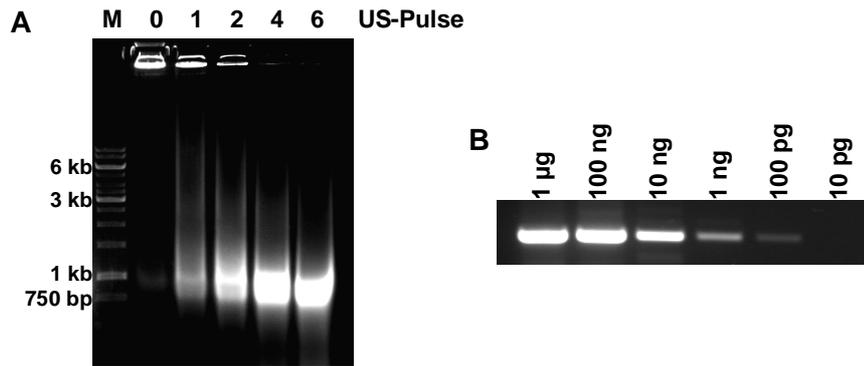
**Abb. 4.16: Schematische Darstellung der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).**

Nach Vorbehandlung der Zellen erfolgt die Fixierung des Chromatins. Dieses wird durch Ultraschall fragmentiert und mittels spezifischer AK immunpräzipitiert. Die präzipitierten Komplexe werden gewaschen und durch Hitzezufuhr erfolgen die Elution der Komplexe und die Revertierung der Fixierung. Die mitgereinigte DNA wird mittels spezifischer Primer in einer semiquantitativen PCR analysiert. Die Input-Proben beinhalten geschertes Chromatin ohne IP und dienen dem Mengenabgleich. Modifiziert nach Rieck (2005).

#### 4.3.2 Standardisierung der ChIP

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse waren mehrere Punkte essentiell: das hormonfreie Kultivieren der Zellen, die exakte Einhaltung der Induktionszeiten, die durch Ultraschall erzielte Fragmentgröße, Mengenabgleich des Chromatins, ChIP-Tauglichkeit der Antikörper, die Stringenz beim Waschen sowie die Linearität der PCR.

Mit zunehmender Anzahl an Ultraschall-Pulsen zu je 15 sec erfolgte eine zunehmende Chromatinfragmentierung. Nach sechs Pulsen war keine genomische DNA mehr in den Taschen zu erkennen und das gescherte Chromatin wies eine Größe um die 750 bp auf (Abb. 4.17 A).



**Abb. 4.17: Chromatinfragmentierung und semiquantitative PCR einer Verdünnungsreihe.**

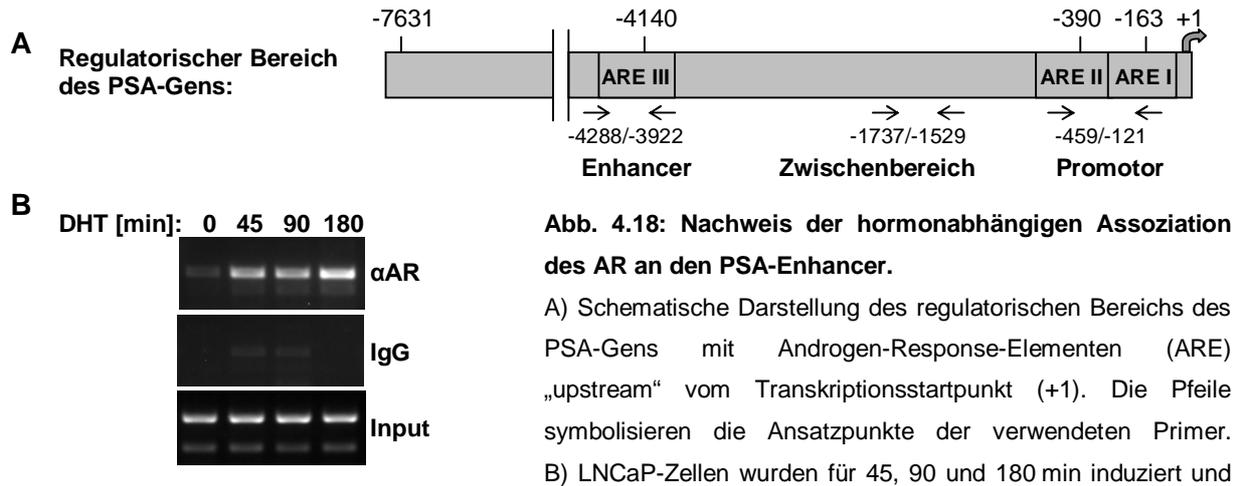
A) LNCaP-Zellen wurden für 2 h mit 100 nM DHT induziert, für 10 min fixiert und in 400 µl Lysispuffer einer Ultraschall-Behandlung (US) unterzogen. Vor der Ultraschall-Behandlung und nach 1, 2, 4 und 6 Pulsen wurden jeweils 5 µl Lysat entnommen und auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. B) Das Lysat nach 6 US-Pulsen aus A) wurde nach Standardprotokoll aufgereinigt, die DNA-Konzentration wurde bestimmt und es wurde eine Verdünnungsreihe in sechs Schritten zu jeweils 1/10 angefertigt. Unter standardisierten Bedingungen wurde eine PCR mit 35 Zyklen auf den PSA-Enhancer durchgeführt.

Die Linearität der PCR wurde durch eine Verdünnungsreihe überprüft (Abb. 4.17 B). Die dargestellte Verdünnungsreihe zeigt, dass im linear verlaufenden Bereich schon kleine Unterschiede in der „Template“-Menge abgebildet werden können. Damit wird deutlich, dass schon geringe Unterschiede in der Bandenstärke auf einem vielfachen Unterschied in der eingesetzten „Template“-Menge beruhen.

### 4.3.3 Androgenabhängige Assoziation von AR und Koaktivatoren an ARE

In der Literatur wird die Assoziationssdynamik des AR kontrovers diskutiert. Zum einen wurde gezeigt, dass der AR nach Androgenstimulation über einen Zeitraum von 4 h an seinen Response-Elementen akkumuliert, danach für 16 h relativ konstant assoziiert bleibt, bevor er dann langsam wieder abgebaut wird (Wang *et al.*, 2005). Zum anderen konnte ein dynamischeres Anlagerungsverhalten beobachtet werden, bei dem sich der AR in Zyklen anlagert und wieder abdissoziiert (Kang *et al.*, 2002), ähnlich dem für den ER beschriebenen zyklischen Assoziationsverlauf (Shang *et al.*, 2000) (siehe Einleitung 1.1.3.1).

Um die Assoziation des AR nach Hormonstimulation an das ARE im Enhancerbereich des PSA-Gens (siehe Schema Abb. 4.18 A) zu untersuchen, wurden LNCaP-Zellen für 45, 90 und 180 min mit 100 nM DHT induziert. Anschließend erfolgten die Chromatin-Immunpräzipitation und die semiquantitative PCR mit spezifischen Primern gegen den PSA-Enhancerbereich. Abb. 4.18 B zeigt das Ergebnis der PCR nach Agarose-Gelelektrophorese:



**Abb. 4.18: Nachweis der hormonabhängigen Assoziation des AR an den PSA-Enhancer.**

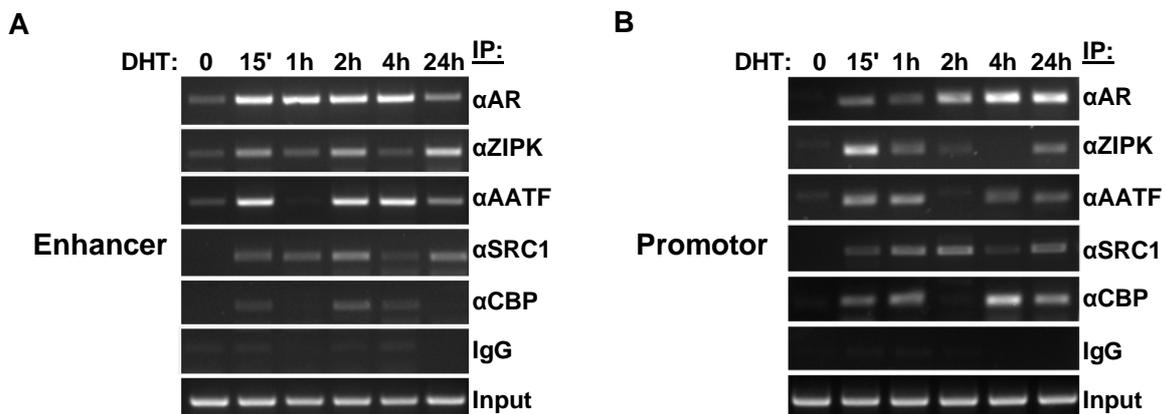
A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs des PSA-Gens mit Androgen-Response-Elementen (ARE) „upstream“ vom Transkriptionsstartpunkt (+1). Die Pfeile symbolisieren die Ansatzpunkte der verwendeten Primer.

B) LNCaP-Zellen wurden für 45, 90 und 180 min induziert und

anschließend einer ChIP mit den angegebenen AK unterzogen. Dargestellt ist das Produkt der semiquantitativer PCR, aufgetrennt im Agarosegel. Die ChIP mit unspezifischen AK (IgG) diente als Negativkontrolle und „Input“ dem Nachweis gleicher Chromatinmengen in der IP.

Eine Assoziation des AR am PSA-Enhancer konnte bereits nach 45 min Hormonstimulation beobachtet werden und wies nach 180 min nochmals einen deutlichen Anstieg auf. Die ChIP mit unspezifischen IgGs detektierte keine Hintergrundbindung und die Input-Proben zeigten gleichmäßig starke Banden, so dass vom Einsatz gleicher Mengen Chromatin in den einzelnen Ansätzen ausgegangen werden konnte.

Als nächstes wurde die Rekrutierung der Koaktivatoren ZIPK und AATF untersucht. Dabei wurden die bekannten AR-Koaktivatoren SRC1 und CBP, welche im Transkriptionskomplex des PSA-Gens koaktivierend wirken (Shang *et al.*, 2002), in die Analysen als Positivkontrollen miteinbezogen. Anhand der gewählten Induktionszeiten wurde eine sehr frühe Assoziation nach 15 min Hormonstimulation, über die ersten 4 h und nach 24 h untersucht:

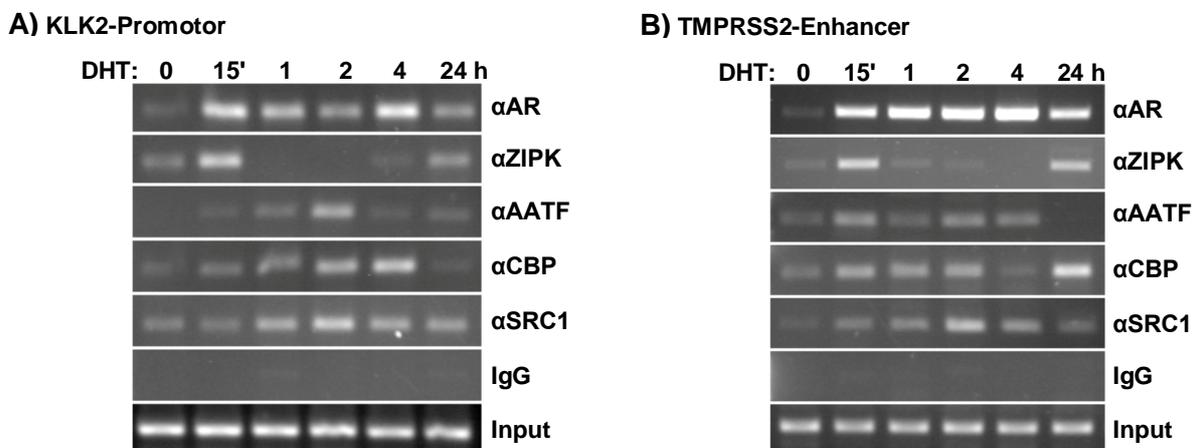


**Abb. 4.19: Dynamische Rekrutierung der Koaktivatoren ZIPK und AATF an PSA-Enhancer und Promotor.**

LNCaP-Zellen wurden nach Standardprotokoll einer ChIP unterzogen. Dabei erfolgte die IP mit AK gegen ZIPK, AATF, AR, CBP, SRC1 und unspezifischen IgGs. Die Agarose-Gelelektrophorese zeigt das Ergebnis der semiquantitativen PCR gegen den PSA-Enhancer (A) bzw. den PSA-Promotor (B).

Sowohl für ZIPK als auch AATF wurde eine Rekrutierung an die regulatorischen Regionen des PSA-Gens detektiert (siehe Abb. 4.19). Diese erfolgte bereits nach 15-minütiger Androgenstimulation. Beide Koaktivatoren zeigten, wie auch die bekannten AR-Koaktivatoren CBP und SRC1, deutliche Schwankungen in ihrer Assoziation. Am Enhancer war AATF nach einer Stunde abdissoziiert, die ZIPK lag deutlich schwächer gebunden vor. Nach zweistündiger Induktion konnte die Bindung von beiden wieder deutlich detektiert werden. Nach vier Stunden war AATF unverändert, die ZIPK deutlich schwächer im Komplex gebunden und nach 24 h Hormonstimulation lagen ZIPK und AATF immer noch mit dem PSA-Enhancer assoziiert vor. Auch am PSA-Promotor wurden für ZIPK, AATF, SRC1 und CBP Schwankungen in der Assoziation beobachtet, die ein vom Enhancer abweichendes Muster aufwiesen. Der AR lies sich am PSA-Enhancer und Promotor bereits nach 15 min Induktion zusammen mit den Koaktivatoren nachweisen. Dabei fiel die Assoziation des AR am Enhancer stärker aus. Am Promotor zeigten sich Schwankungen in der mit der Induktionsdauer zunehmenden Assoziation des AR, mit einem Maximum bei 4 h und einer abgeschwächten Intensität bei 24 h.

Um zu sehen, ob AATF und ZIPK an die regulatorischen Regionen weiterer AR-Zielgene rekrutiert werden, wurde die Assoziation auch für den KLK2-Promotor und TMPRSS2-Enhancer mittels ChIP untersucht:



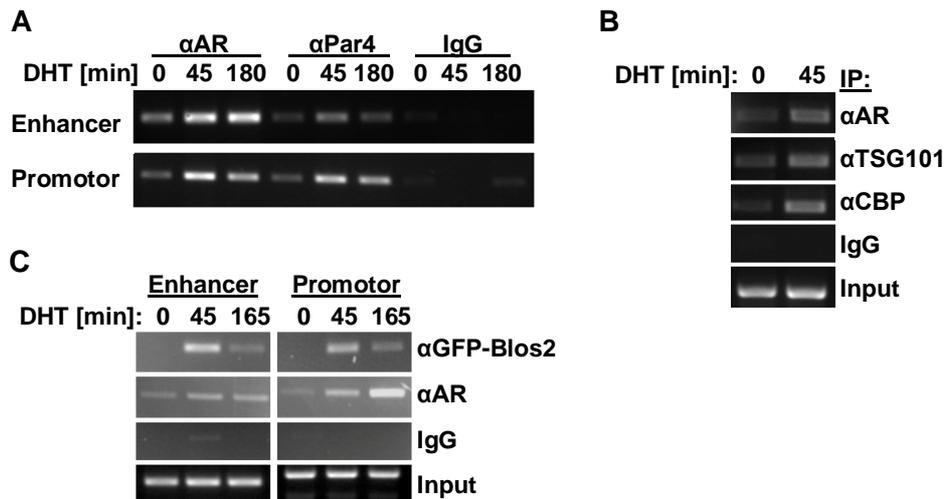
**Abb. 4.20: Dynamische Rekrutierung der Koaktivatoren ZIPK und AATF an weitere AR-Zielgene.**

Die mitgereinigte DNA aus der in Abb. 4.19 dargestellten ChIP wurde auf das Vorhandensein weiterer AR-Zielgene untersucht. Die Agarose-Gelelektrophorese zeigt das Ergebnis der semiquantitativen PCR gegen den KLK2-Promotor (A) bzw. den TMPRSS2-Enhancer (B).

ZIPK und AATF wurden auch am KLK2-Promotor und TMPRSS2-Enhancer nachgewiesen. Dabei fanden sich wiederum Schwankungen in der Anlagerung des AR, als auch von ZIPK, AATF, CBP und SRC1. Außerdem fiel ein vom PSA-Gen abweichendes Rekrutierungsmuster für die einzelnen Faktoren auf. Diese Ergebnisse untermauern eine direkte Funktion der ZIPK und von AATF in der AR-vermittelten Transkription. ZIPK und AATF lagen bereits

nach 15 min an allen untersuchten Response-Elementen gebunden vor, was andeutet, dass sie an frühen Transkriptionsinitiationsprozessen beteiligt sind.

Auch für die Koaktivatoren Par-4 und TSG101 wurde untersucht, ob sie an die regulatorischen Regionen des PSA-Gens rekrutiert werden. Dabei war für Par-4 bereits eine hormonabhängige Rekrutierung an den PSA-Enhancer beschrieben (Gao *et al.*, 2006). Das vor kurzem als Interaktionspartner von AATF und Koaktivator des AR identifizierte Blos2 (Felten *et al.*, 2007) wurde in die Analysen miteinbezogen.



**Abb. 4.21: Par-4, TSG101 und Blos2 werden an Enhancer und Promotor des PSA-Gens rekrutiert.**

LNCaP-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten induziert. Die ChIP erfolgte mit den angegebenen AK. Die präzipitierte DNA wurde mittels spezifischen Primern für den PSA-Enhancer und Promotor einer semiquantitativen PCR unterzogen. A) Nachweis der Par-4-Rekrutierung. B) Nachweis der TSG101- und CBP-Rekrutierung. C) LNCaP-Zellen wurden mit GFP-BLOS2 transfiziert und nach 24 h induziert. Zum Nachweis der Rekrutierung von überexprimiertem Blos2 wurde das fixierte und gescherte Chromatin mit AK gegen GFP, AR und mit unspezifischen IgGs immunpräzipitiert.

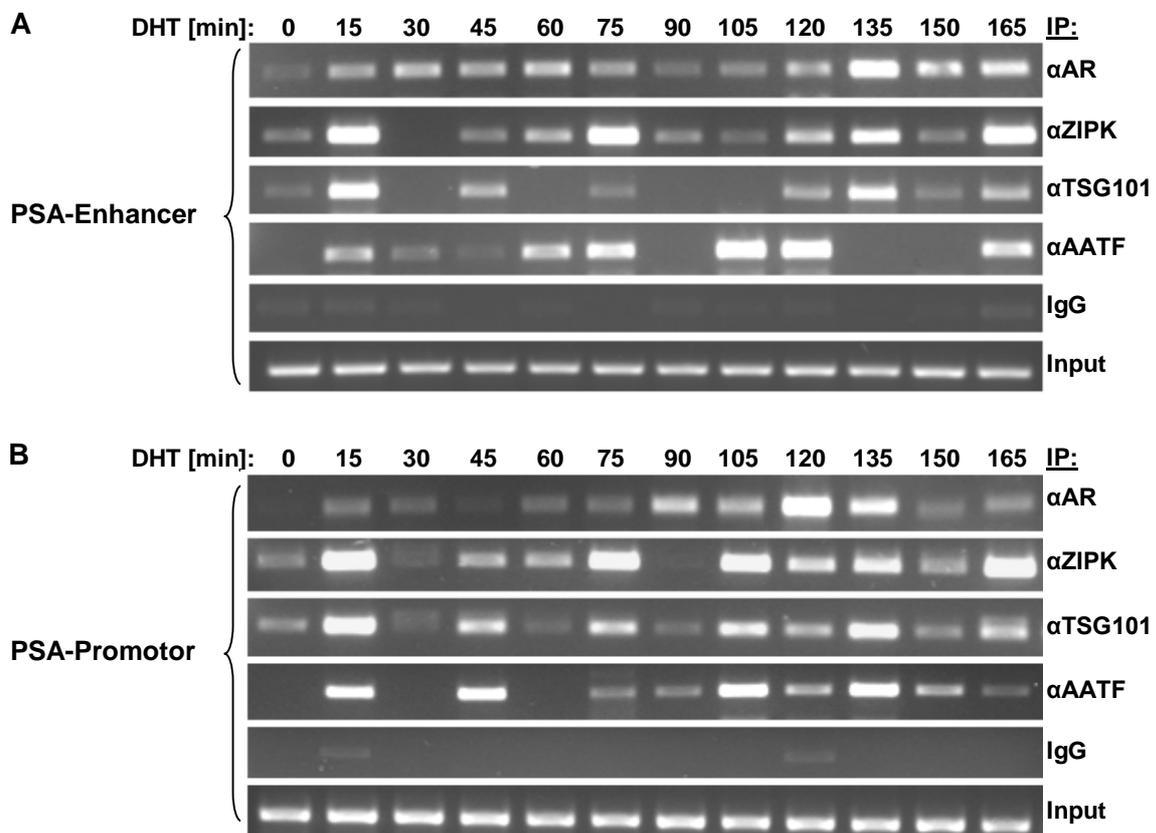
Die Rekrutierung von Par-4 an den Enhancer ließ sich bestätigen und auf den Promotor des PSA-Gens ausdehnen (Abb. 4.21 A). Dabei wurde Par-4 am PSA-Promotor im Vergleich zum Enhancer in stärkerem Maße detektiert. Der Nachweis von assoziiertem AR diente wie auch beim Nachweis der Rekrutierung von TSG101 und Blos2 als Positivkontrolle. Eine Bindung von TSG101 konnte erstmals für den PSA-Enhancer und Promotor nachgewiesen werden (Abb. 4.21 B). Diese fiel nach 45 min Induktion an beiden Elementen gleich stark aus, so dass hier nur der Besatz des Enhancers dargestellt wurde.

Der Nachweis der Rekrutierung von Blos2 erfolgte durch Präzipitation von ektopisch exprimiertem GFP-Blos2, da ein Antikörper gegen endogenes Blos2 zu diesem Zeitpunkt nicht vorlag. Eine starke Rekrutierung von Blos2 konnte nach 45 min Induktion sowohl am Enhancer als auch Promotor des PSA-Gens detektiert werden. Nach 165 min war Blos2 zwar schwächer, aber immer noch an die regulatorischen Regionen gebunden. Aufgrund des

nicht vorhandenen Antikörpers wurde von weiteren Versuchen mit Blos2 abgesehen, da eine Beeinflussung der Rekrutierung anderer Faktoren in den Komplex durch das angefügte GFP-Tag nicht auszuschließen war.

#### 4.3.4 Dynamik der Assoziation von AR und Koaktivatoren an ARE

Aufgrund der reproduzierbar beobachteten Schwankungen in der Assoziation des AR und der Koaktivatoren ZIPK und AATF, sollte eine eingehendere Analyse in einem kürzeren Zeitraster erfolgen. Dazu wurden LNCaP-Zellen in 15 min Intervallen über drei Stunden induziert. Die ChIP wurde mit Antikörpern gegen den AR, ZIPK, AATF, TSG101 und unspezifischen IgGs durchgeführt. Dargestellt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für den PSA-Enhancer und Promotor:



**Abb. 4.22: Zyklische Anlagerung von AR, ZIPK, AATF und TSG101 an PSA-Enhancer und Promotor.** LNCaP-Zellen wurden in 15 min Intervallen über 3 h mit 100 nM DHT induziert. Die ChIP erfolgte mit AK gegen AR, ZIPK, AATF, TSG101 oder unspezifischen IgGs. Die PCRs wurden für den PSA-Enhancer (A) und den PSA-Promotor (B) durchgeführt und die Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Es zeigte sich (Abb. 4.22), dass sowohl der AR als auch die Koaktivatoren ein zyklisches Anlagerungsverhalten an Enhancer und Promotor des PSA-Gens aufweisen. Für den AR ließ sich am Enhancer ein erster Zyklus zwischen 0 und 90 min beobachten und ein zweiter, der bei 105 min begann und über die 165 min anhielt. Die Koaktivatoren waren nach 15 min

Induktion parallel mit dem AR am Enhancer nachweisbar, zeigten dann innerhalb der AR-Zyklen eine individuelle Rekrutierung. ZIPK und TSG101 wiesen untereinander ein ähnliches Rekrutierungsverhalten auf: Auf die Bindung nach 15 min Induktion folgte die Abdissoziation bei 30 min, gefolgt von einer erneuten Rekrutierung nach 45 min für 30 min im Fall von TSG101, welches daraufhin wieder abdissoziierte und bei 120 min für den Rest des zweiten AR-Zyklus erschien. Die ZIPK verblieb durchgehend mit einer dynamischen Anlagerung, die bei 90 und 105 min deutlich schwächer ausfiel. Die Rekrutierung von AATF nach 15 min Induktion am Enhancer blieb über den ersten AR-Zyklus durchgehend bestehen, allerdings mit einer deutlich schwächeren Intensität bei 45 min. Nach 90 min war AATF abdissoziiert, bevor es bei 105 und 120 min erneut gebunden vorlag. Interessanterweise waren also weder AATF noch TSG101 nach 90 min Induktion am PSA-Enhancer nachweisbar. Dieser Zeitpunkt korreliert mit einer verminderten Assoziation des AR und wahrscheinlich dem Ende des ersten Anlagerungszyklus.

Am PSA-Promotor ließ sich ein abweichendes Assoziationsverhalten des AR und der Koaktivatoren, hauptsächlich von AATF, beobachten. Eine erste Anlagerung des AR wurde bei 15 und 30 min Induktion beobachtet, die bei 45 min deutlich schwächer ausfiel. Der zweite Zyklus am PSA-Promotor war zwischen 60 und 150 min nachweisbar. Bei 165 min Induktion wurde erneut ein Anstieg der AR-Assoziation beobachtet. ZIPK und TSG101 zeigten untereinander wiederum ein ähnliches Assoziationsverhalten. Im Gegensatz zum Enhancer lagen sie nach 105 min rekrutiert vor. Die Rekrutierung von AATF entsprach im Gegensatz zum Enhancer der Rekrutierung von TSG101 und ZIPK.

Dieser Versuch wurde dreimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Dabei können kleine Abweichungen im Induktions- und Fixierungszeitraum, aufgrund der dynamischen Rekrutierung, zu einer veränderten Intensität der Banden führen.

#### **4.3.5 Lässt sich das zyklische Verhalten des AR und der Koaktivatoren durch Inhibition des Proteasoms oder der Transkription unterbrechen?**

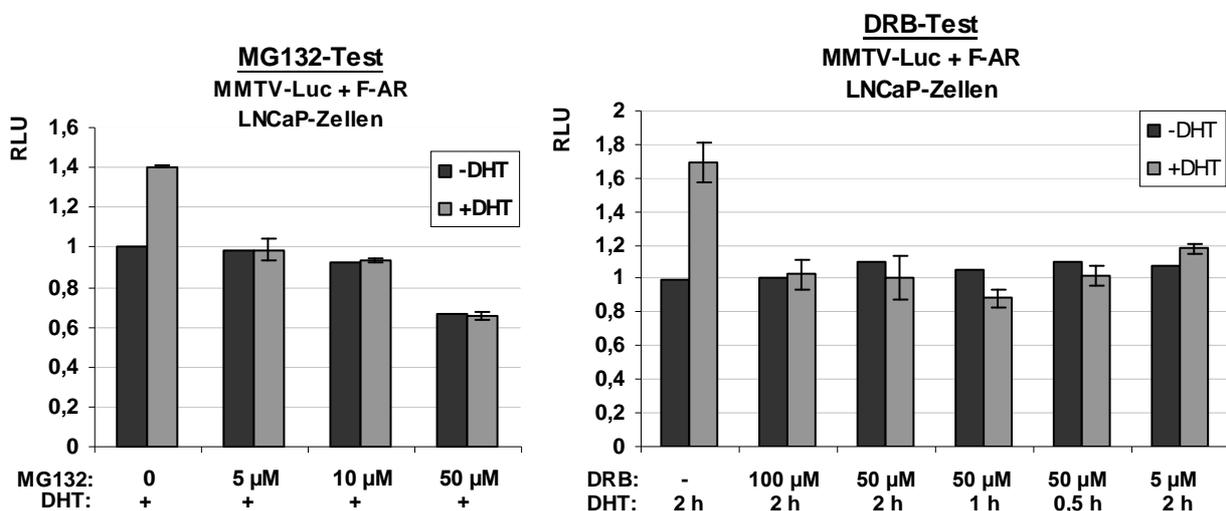
Es stellte sich die Frage, durch welches Ereignis das Abdissoziieren des AR ausgelöst wird. Zwei Möglichkeiten sind denkbar: Die zyklische Assoziation und Dissoziation könnte durch reversible posttranslationale Modifikationen des AR oder anderer Komponenten des Initiationskomplexes reguliert werden. Vorstellbar wäre auch, dass zunächst die Anlagerung des Rezeptors und nach erfolgter Elongation der Abbau erfolgt, woraufhin ein erneuter Zyklus stattfinden könnte. Für letztere Möglichkeit sprechen folgende Befunde: Für den ER konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II und damit der Start der Transkriptionselongation eine Voraussetzung für das zyklische Verhalten ist (Shang *et al.*, 2000). Für die Assoziationsdynamik des AR wurde beobachtet, dass die Inhibition des Proteasoms zu einer Akkumulation des AR nach dem ersten Zyklus führt

(Kang *et al.*, 2002). Um zu klären, ob das zyklische Verhalten des AR auf proteasomalem Abbau beruht und von zuvor erfolgtem Übergang in die Transkriptionselongation abhängt, wurde mit entsprechenden Inhibitoren gearbeitet.

#### 4.3.5.1 Konzentrationsaustestung der Inhibitoren DRB und MG132

Um zu analysieren, ob die Freisetzung des AR vom Promotor von der Transkriptionsinitiation abhängt, wurde der Transkriptioninhibitor 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) eingesetzt. DRB blockiert die Transkription, indem es CDK7 und CDK9 inhibiert, zwei Kinasen, die für die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Pol II zuständig sind (Yankulov *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1996). Dies verhindert die Trennung der RNA-Pol II vom Initiationskomplex und damit den Übergang in die Elongation.

Die Beteiligung des Proteasoms am Abbau des Rezeptors kann durch Inhibition des proteasomalen Abbaus durch Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucinal (MG132) untersucht werden. MG132 wirkt als spezifischer Inhibitor des 26S-Proteasoms. Da das Proteasomen-System für eine effiziente Transaktivierung des AR notwendig ist (Lin *et al.*, 2002), wurde mittels transienten Reporterstudien überprüft, ab welcher Konzentration, MG132 eine effiziente Blockierung der AR-abhängigen Transkription bewirkt. Der Transkriptioninhibitor DRB wurde ebenfalls, anlehnend an die in der Literatur veröffentlichten Konzentrationen, mittels Reporterstudien ausgetestet:



**Abb. 4.23: Die proteasomale Aktivität, sowie der Übergang in die Transkriptionselongation sind für die AR-abhängige Reporterexpression essenziell.**

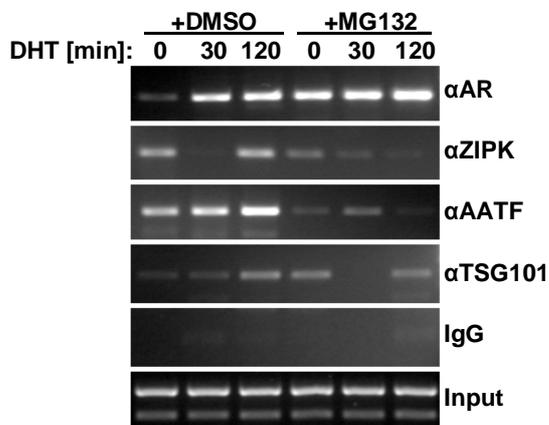
LNCaP-Zellen wurden mit 500 ng MMTV-Luc, 100 ng Flag-AR und 150 ng pCMV-Renilla für 24 h transfiziert. A) Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen MG132 für 2 h vorbehandelt, anschließend für 3 h mit 100 nM DHT induziert und der Luciferaseaktivitätsmessung unterzogen. Die RLU ist normiert auf die Aktivität des uninduzierten Rezeptors ohne MG132-Behandlung. B) Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen DRB für 1 h vorbehandelt und anschließend für die angegebene Zeit mit 100 nM DHT induziert. Die RLU ist normiert auf die Aktivität des uninduzierten Rezeptors ohne DRB-Vorbehandlung.

Die Auswertung der Inhibitorstudien ergab, dass MG132 bei 10  $\mu\text{M}$  und DRB bei 50  $\mu\text{M}$  eine vollständige Inhibition der Reporterexpression nach den kurzen Vorinkubationszeiträumen bewirken ohne dabei zytostatisch auf die Zellen zu wirken.

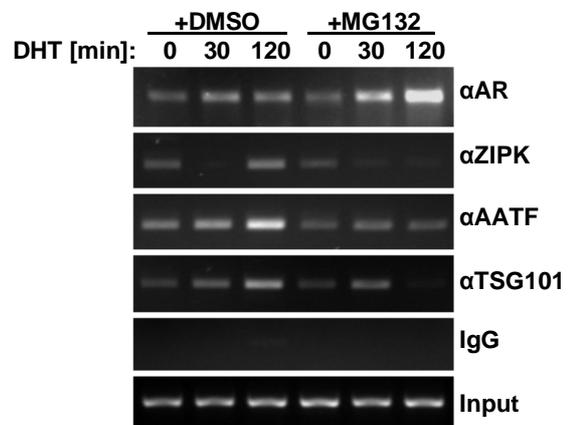
#### 4.3.5.2 Assoziation von AR und Koaktivatoren an ARE nach Inhibitorbehandlung

Um den Effekt der Proteasomen-Inhibition auf die Assemblierung des AR und der Koaktivatoren mit dem PSA-Gen zu untersuchen, wurden LNCaP-Zellen für 2 h mit 10  $\mu\text{M}$  MG132 vorbehandelt und nach Induktion einer ChIP mit anschließender PCR unterzogen. Die Anlagerung von AR, ZIPK, AATF und TSG101 an PSA-Enhancer und Promotor sind in Abbildung 4.24 dargestellt:

##### A) PSA-Enhancer



##### B) PSA-Promotor



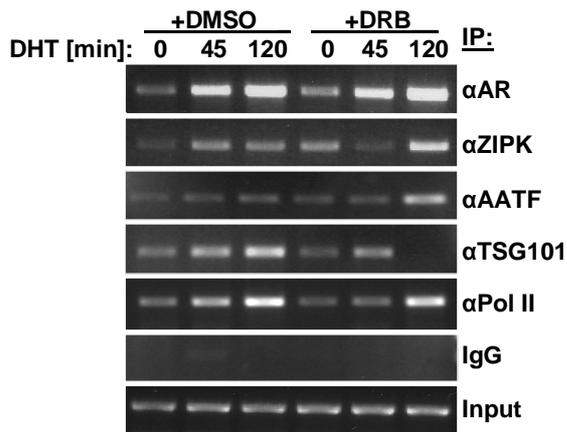
**Abb. 4.24: Die Proteasomen-Inhibition durch MG132 führt zur Akkumulation des AR und zur verminderten Rekrutierung der Koaktivatoren.**

LNCaP-Zellen wurden für 2 h mit MG132 oder DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Induktion für 30 und 120 min. Für die ChIP wurden AK gegen den AR, ZIPK, AATF, TSG101 oder unspezifische IgGs verwendet. Die PCR wurde mit Primer gegen Enhancer (A) oder Promotor (B) des PSA-Gens durchgeführt. Mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte.

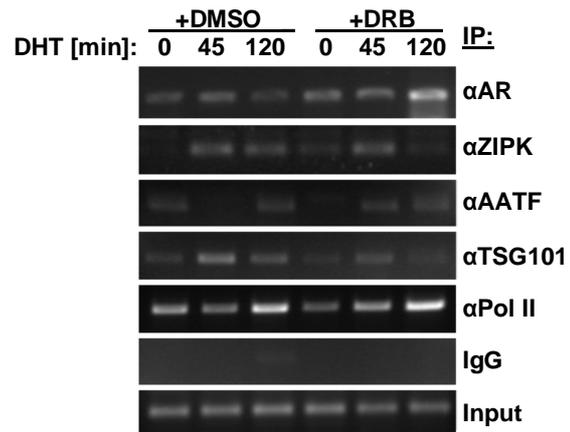
Die Inhibition des Proteasoms resultierte in einer Akkumulation des AR sowohl am PSA-Enhancer als auch am Promotor, wobei sie am Promotor stärker ausfiel. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass MG132 den Abbau, aber nicht die Assoziation des Rezeptors inhibiert (Kang *et al.*, 2002). Für die Koaktivatoren war dagegen eine abgeschwächte Assoziation nach 30 min und eine stark beeinträchtigte Rekrutierung an Enhancer und Promotor nach 120 min zu beobachten. Nur die Assoziation von TSG101 blieb am Enhancer im Gegensatz zum Promotor nach 120 min bestehen.

Die Assoziation des AR und der Koaktivatoren nach Inhibition der Transkription durch 50  $\mu\text{M}$  DRB ist nachfolgend dargestellt (Abb. 4.25):

## A) PSA-Enhancer



## B) PSA-Promotor

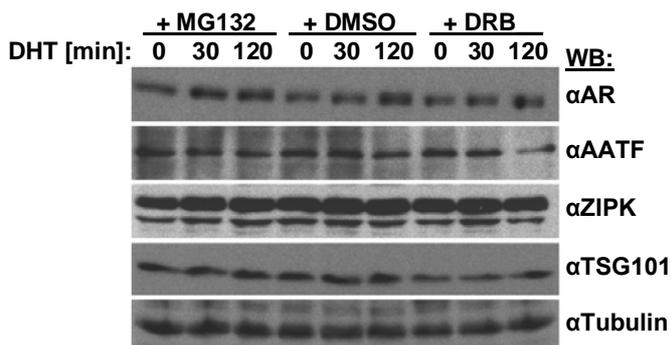


**Abb. 4.25: Die Transkriptions-Inhibition durch DRB resultiert in einer veränderten Anlagerungsdynamik.**

LNCaP-Zellen wurden für 1 h mit 50  $\mu$ M DRB oder DMSO (Vehikelkontrolle) vorinkubiert. Nach der Induktion für 45 oder 120 min wurde die CHIP mit AK gegen den AR, ZIPK, AATF, TSG101, RNA-Pol II oder unspezifische IgGs durchgeführt. Die PCR erfolgte mittels Primern gegen den PSA-Enhancer (A) und den PSA-Promotor (B). Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2 % Agarosegel.

Die Behandlung der Zellen mit DRB bewirkte eine Veränderung in der Anlagerungsdynamik der Proteine des Transkriptionskomplexes. Nach 120 min kam es zu einer etwas stärkeren Anlagerung des AR am Enhancer und zu einer deutlichen Akkumulation am Promotor. Somit verhindert die Inhibition der Transkription ebenfalls das Abdissoziieren oder den Abbau des Rezeptors. Für die ZIPK wurde, gegenüber den unbehandelten Zellen, nach 45 min eine schwächere und nach 120 min eine stärkere Rekrutierung am Enhancer beobachtet. Am Promotor war es umgekehrt. Ähnlich verhielt es sich mit AATF. Für TSG101 fand nach 45 min eine etwas schwächere Rekrutierung an Enhancer und Promotor statt und nach 120 min war es praktisch abwesend. Die Rekrutierung der RNA-Pol II am Enhancer blieb unbeeinflusst, am Promotor war sie dagegen stärker assoziiert.

Um auszuschließen, dass die Veränderungen in der Assemblierung der einzelnen Faktoren auf einer Beeinflussung ihrer Proteinlevel, durch die Inhibitoren beruht, wurde eine WB-Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Inhibitoren keine signifikanten Veränderungen der Proteinlevel verursachten.



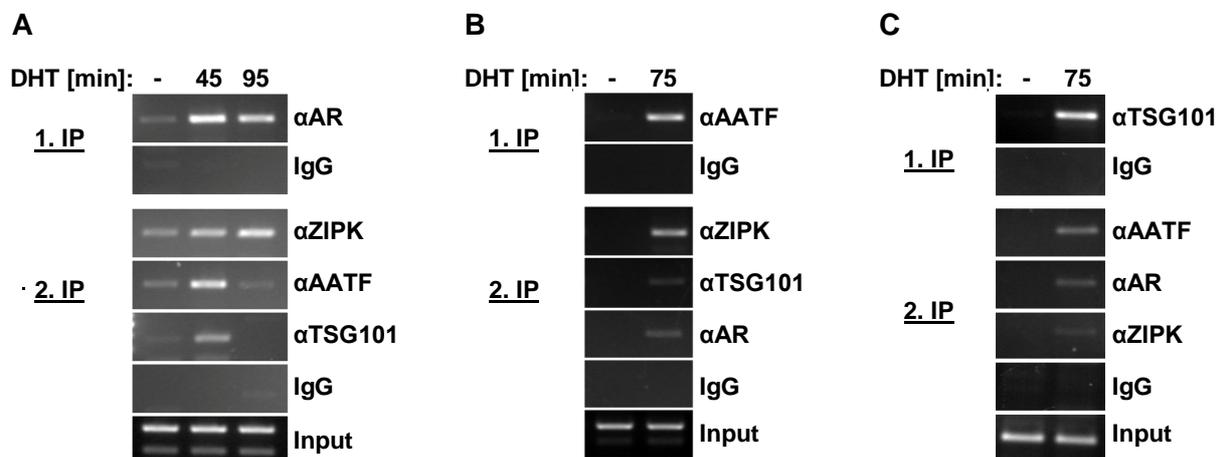
**Abb. 4.26: Konstante Proteinlevel nach MG132- und DRB-Behandlung.**

LNCaP-Zellen wurden für je 75 min mit MG132 [10  $\mu$ M], DRB [50  $\mu$ M] oder als Kontrolle mit DMSO vorinkubiert. Die Induktion erfolgte wie angegeben. 10 bzw. 60  $\mu$ g Gesamtprotein wurden mittels 10 % SDS-Page aufgetrennt und mit AK gegen den AR, AATF, ZIPK, TSG101 und  $\alpha$ -Tubulin einer WB-Analyse unterzogen.

Zusammenfassend ergaben die Inhibitorstudien, dass sowohl die Proteasomen- als auch die Transkriptions-Inhibition zu einer vollständigen Repression der Reporterexpression und auf Chromatinebene zu einer Akkumulation des AR an den ARE führten. Die Koaktivatoren wiesen dagegen eine überwiegend schwächere Rekrutierung auf, die an Enhancer- und Promotorbereich durch die Inhibition unterschiedlich beeinflusst wurde. Die Ergebnisse deuten somit an, dass die AR-abhängige (Reporter-)Transkription sowohl vom proteasomalen Abbau des AR als auch von erfolgter Transkription abhängt.

#### 4.3.6 Der AR und die Koaktivatoren ZIPK, AATF und TSG101 sind im selben Komplex an regulatorische DNA-Bereiche gebunden

Um zu untersuchen, ob der AR und die Koaktivatoren in einem gemeinsamen Komplex an die Promotorbereiche der Zielgene gebunden vorliegen, wurden induzierte LNCaP-Zellen einer sequentiellen ChIP (ReChIP) unterzogen. Bei der ReChIP wird zunächst, wie bei einer Standard-ChIP, die IP gegen das erste Protein z.B. den AR durchgeführt. Der Unterschied zur Standard-ChIP besteht in der Elution der Komplexe. Diese erfolgt mit DTT bei 37°C, damit die Fixierung des Chromatins erhalten bleibt, so dass die in der ersten IP präzipitierten Komplexe in einer zweiten IP mit einem weiteren AK z.B. gegen ZIPK präzipitiert werden können. Somit wird in der zweiten IP nur dann ein Signal bei der anschließenden PCR detektiert, wenn beide Proteine, also AR und ZIPK, im selben Komplex fixiert vorlagen.



**Abb. 4.27: AR, ZIPK, AATF und TSG101 assemblieren in einem gemeinsamen Komplex am PSA-Enhancer.** LNCaP-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit DHT induziert. Anschließend wurde mittels sequentieller ChIP-Analysen die Zusammensetzung der Transkriptionskomplexe untersucht. Die präzipitierte DNA wurde mit PSA-Enhancer-spezifischen Primern amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. A) Erste IP gegen AR. Nach Elution der präzipitierten Komplexe erfolgte die zweite IP mit AK gegen ZIPK, TSG101 und AATF. B) Erste IP mit AK gegen AATF, zweite mit AK gegen ZIPK, TSG101 und AR C) Erste IP gegen TSG101, zweite IP mit AK gegen ZIPK, AR und AATF.

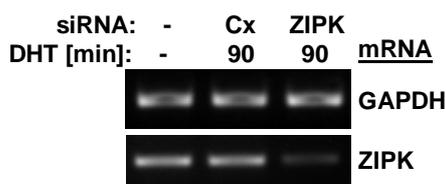
Nach der ersten IP gegen den AR (Abb. 4.27 A) konnten in der zweiten IP alle Koaktivatoren detektiert werden mit Ausnahme von TSG101, das beim 95 min Wert nicht nachgewiesen wurde. Auch die sequentiellen ChIPs mit der ersten IP gegen AATF bzw. TSG101 detektierten den AR und die anderen Koaktivatoren in den eluierten Komplexen (Abb. 4.27 B und C). Auffällig war eine deutlich schwächere Bindung von TSG101, im Gegensatz zur ZIPK, an AATF nach 75 min Induktion, also gegen Ende des AR-Zyklus am PSA-Enhancer. Die Daten sprechen somit für ein gemeinsames Vorliegen in den Transkriptionsinitiationskomplexen, was eine funktionelle Interaktion der Koaktivatoren während der Transkriptionsinitiation ermöglicht.

#### 4.3.7 Effekt der Herunterregulation von ZIPK oder AATF auf das Komplex-Assembly

Nachdem gefunden wurde, dass ZIPK, AATF und TSG101 in einem gemeinsamen Komplex mit dem AR an Promotor- und Enhancerbereichen vorliegen, sollte eine mögliche gegenseitige Abhängigkeit der Proteine in der Assemblierung oder dem Abbau des AR-Transkriptionskomplexes untersucht werden.

##### 4.3.7.1 Die Herunterregulation der ZIPK bewirkt eine Akkumulation des AR

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die ZIPK im Komplexassembly und dem zyklischen Verhalten des AR ausübt, wurde sie mittels siRNA herunterreguliert. Abbildung 4.28 zeigt die effiziente Reduktion der ZIPK mRNA-Level auf 12 % im Vergleich zur Kontroll-siRNA:

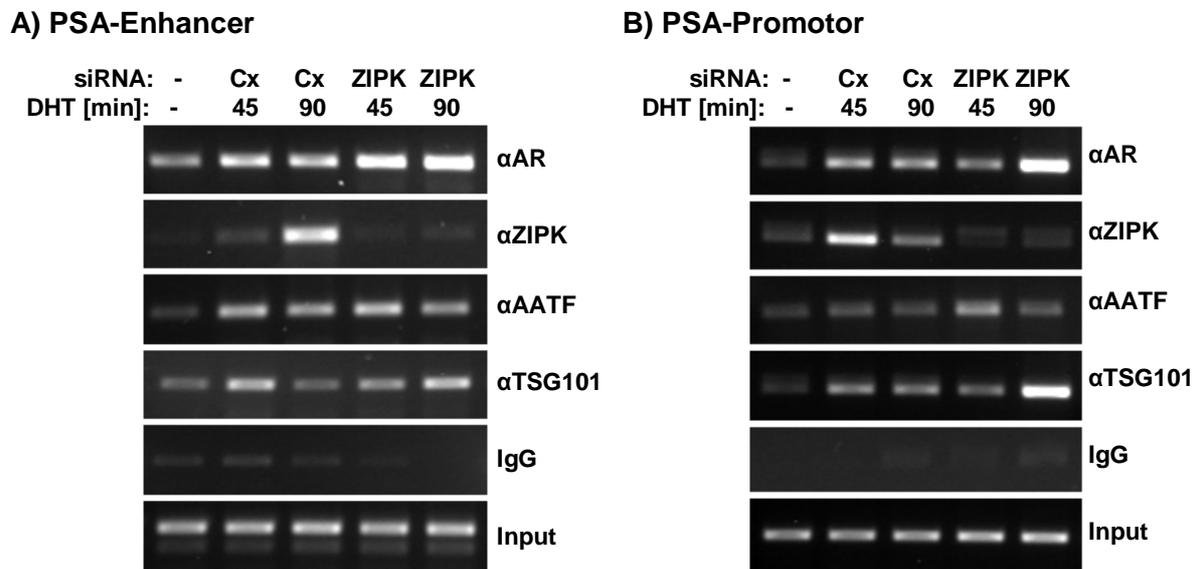


**Abb. 4.28: Die für die ChIP verwendeten Zellen zeigten eine effiziente Herunterregulation der ZIPK.**

LNCaP-Zellen wurden mit siZIPK oder siCx transfiziert und 90 min induziert. Vor der Fixierung der Zellen wurde ein kleiner Anteil abgeschabt und nach RNA-Isolation, RT-PCR einer PCR auf ZIPK und GAPDH mRNA-Level unterzogen.

Die LNCaP-Zellen wurden daraufhin einer ChIP mit Antikörpern gegen ZIPK, AR, AATF, TSG101 und unspezifischen IgGs unterzogen. Der Besatz der regulatorischen Regionen des PSA-Gens wurde mittels Enhancer- oder Promotor-spezifischer PCR analysiert (Abb. 4.29). Mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen wiesen am PSA-Enhancer und Promotor die übliche Rekrutierung der ZIPK auf, die bei den Ansätzen mit siZIPK ausblieb. Interessanterweise führte das Fehlen der ZIPK im Transkriptionsinitiationskomplex zu einer deutlichen Akkumulation des AR an Promotor und Enhancer des PSA-Gens, so dass die am Enhancer vorliegende Abnahme des AR nach 90 min Hormonstimulation nach siRNA gegen die ZIPK nicht mehr beobachtet werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die ZIPK am Abbau oder

der Dissoziation des Rezeptors beteiligt sein könnte, oder aber am Übergang in die Transkriptionselongation, da deren Blockierung ebenfalls zur Akkumulation des AR führte (siehe 4.3.5.2).



**Abb. 4.29: Die Herunterregulation der ZIPK führt zu einer Akkumulation des AR am Response-Element.**

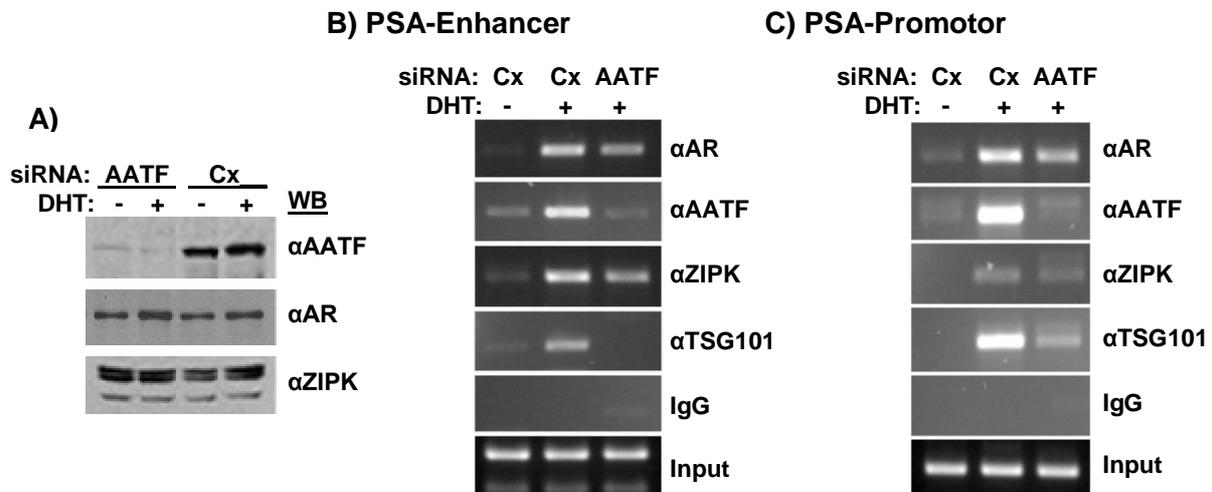
LNCaP-Zellen wurden für zwei Tage in hormonfreiem Medium kultiviert bevor sie mit 100 nM siRNA gegen die ZIPK oder Kontroll-siRNA (Cx) transfiziert wurden. Nach 48 h siRNA-Behandlung wurden die Zellen wie angegeben induziert. Anschließend wurde die ChIP nach Standardprotokoll durchgeführt. Die PCR erfolgte mit Primern gegen PSA-Enhancer (A) und PSA-Promotor (B). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels 2%-Agarose-Gelelektrophorese.

Die Rekrutierung von AATF wurde durch die Herunterregulation der ZIPK nur geringfügig beeinflusst, in Form einer schwachen Zunahme nach 45 min Induktion am Promotor (Abb. 4.29). Dies entspricht den bekannten Daten, dass AATF direkt mit dem AR interagieren kann (Leister *et al.*, 2003). Allerdings folgt AATF nicht einfach dem Assoziationsverhalten des AR. Dies ist eher bei TSG101 zu beobachten, welches parallel zum AR bei 90 min am Enhancer und Promotor akkumuliert.

#### 4.3.7.2 Welche Auswirkung hat die Reduktion von AATF auf das Komplexassembly?

Da AATF sowohl mit der ZIPK als auch mit TSG101 interagiert (Leister *et al.*, 2008; Burgdorf *et al.*, 2004) und für die humanen Proteine eine funktionelle Kooperation in Reporterstudien bestätigt wurde, sollte eine Funktion von AATF als Targetingfaktor für diese zwei Proteine untersucht werden. Dazu wurden LNCaP-Zellen mit siRNA gegen AATF oder Kontroll-siRNA transfiziert. Von den induzierten Zellen wurde, vor der Fixierung für die ChIP, ein Teil abgenommen und in einer WB-Analyse die Reduktion der AATF-Proteinlevel überprüft. Es wurde eine effiziente Reduktion von AATF auf 5,9 % uninduziert und 3,8 % induziert beobachtet (Abb. 4.30 A). Die Proteinlevel von AR und ZIPK blieben unbeeinflusst.

Die ChIP wurde daraufhin nach Standardprotokoll durchgeführt und nachfolgend sind die Ergebnisse der PCR für Enhancer und Promotor des PSA-Gens dargestellt:



**Abb. 4.30: Die Depletion von AATF führt zu einer schwächeren Assoziation von AR, ZIPK und TSG101.**

LNCaP-Zellen wurden zwei Tage unter hormonfreien Bedingungen kultiviert, bevor sie für 48 h mit 50 nM siRNA gegen AATF transfiziert wurden. Die Induktion erfolgte für 75 min. A) Vor der ChIP wurde ein Teil der Zellen auf die Effizienz der siRNA gegen AATF untersucht. Vom hergestellten Gesamtzellextrakt wurden 60  $\mu$ g mittels 8,5 % SDS-Page aufgetrennt und mit spezifischen AK gegen AATF, AR und ZIPK immungefärbt. Die ChIP wurde mit AK gegen AR, AATF, ZIPK, und TSG101 durchgeführt. Die PCR wurde mit Primern gegen den Enhancer (B) und Promotor (C) des PSA-Gens durchgeführt und anschließend mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

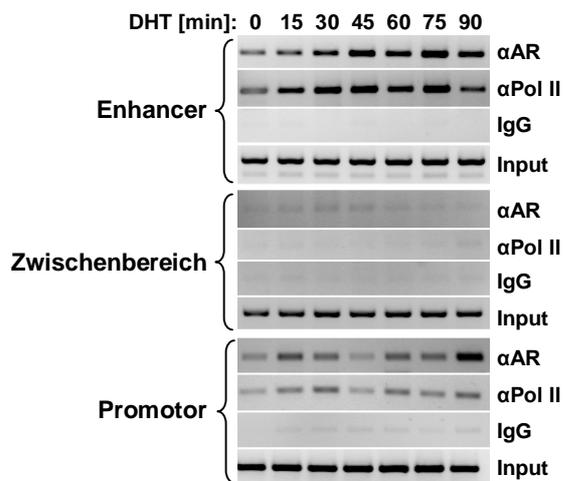
Sowohl am Enhancer- als auch am Promotorbereich konnte eine effiziente Verringerung an rekrutiertem AATF beobachtet werden. Das Fehlen von AATF führte zu einer schwächeren Assoziation des AR, der ZIPK und vor allem von TSG101 (Abb. 4.30 B und C). ZIPK und der AR zeigten eine ähnlich verminderte Anlagerung. Dies bestätigte frühere Befunde, wonach die ZIPK zum Teil über ihre Interaktion mit AATF, aber auch unabhängig über den AR in den Transkriptionskomplex rekrutiert werden kann. Die deutliche Abhängigkeit der TSG101-Rekrutierung von AATF, lässt AATF eine Funktion als Targetingfaktor für TSG101 zukommen.

#### 4.3.8 Erfolgt die Formation des AR-Transkriptionskomplexes zwischen Enhancer und Promotor durch „Looping“ oder „Tracking“?

Die Kommunikation zwischen regulatorischen Bereichen der Enhancer und Promoterregionen von Genen ist für eine effiziente Aktivierung der Transkription erforderlich. Nach allgemein akzeptierter Vorstellung gelangen Enhancer und Promotor durch Schleifenbildung des Chromatins in räumliche Nähe und erleichtern so die Ausbildung des Transkriptionsinitiationskomplexes. Für das PSA-Gen ist die Assoziation bekannter Koaktivatoren des AR-Transkriptionskomplexes an die regulatorischen Bereiche in mehreren Studien untersucht

worden. Die Koaktivatoren und der AR werden sowohl an Enhancer als auch Promotor rekrutiert und das Assembly des Transkriptionsinitiationskomplexes erfolgt durch gemeinsame Koaktivatoren. Für die Rekrutierung der RNA-Pol II an den Promotor werden drei Modelle postuliert: Das „Looping“-Modell sieht die Rekrutierung an Enhancer und Promotor vor, das „Tracking“-Modell sieht eine Rekrutierung an den Enhancer vor, von dem die Polymerase entlang des Chromatins des Zwischenbereichs zum Promoter wandert. Das kombinierte „Looping/Tracking“-Modell geht von einer unabhängigen Rekrutierung der Polymerase an beide Elemente aus, sieht jedoch vor, dass die Polymerase durch Gleiten entlang des Chromatins vom Enhancer zum Promoter gelangt (Shang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005).

Aufgrund der vorliegenden unterschiedlichen Modelle sollte der Bereich zwischen Promotor und Enhancer auf assoziierte RNA-Pol II untersucht werden. Dazu wurden LNCaP-Zellen über einen Zeitraum von 90 min in 15 min Abständen induziert und einer ChIP mit Antikörpern gegen den AR, RNA-Pol II und unspezifischen IgGs unterzogen. Die präzipitierte DNA wurde mittels spezifischen Primern für den Enhancer, Promotor und Zwischenbereich des PSA-Gens amplifiziert. Abb. 4.31 zeigt das Ergebnis der PCR-Analyse:

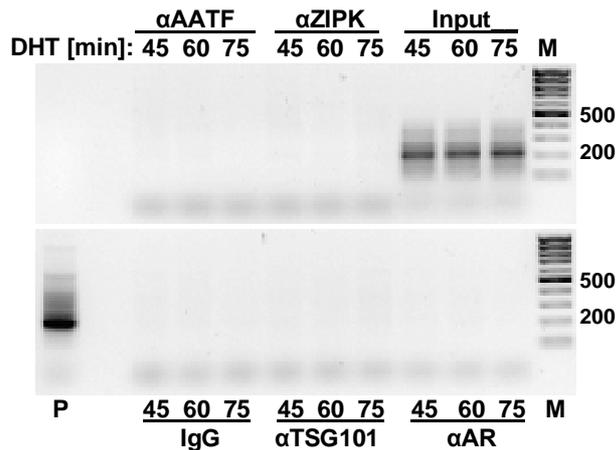


**Abb. 4.31: Die RNA-Pol II assembliert nicht im Bereich zwischen Enhancer und Promotor.**

LNCaP-Zellen wurden wie angegeben mit 100 nM DHT induziert. Die ChIP wurde mit AK gegen AR, RNA-Pol II und unspezifische IgGs durchgeführt. Die präzipitierte DNA wurde mit spezifischen Primern für Enhancer, Promotor oder den Zwischenbereich des PSA-Gens in einer PCR amplifiziert und mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Assoziationskinetik des AR entspricht den bereits zuvor ermittelten Daten. Der Besatz am Enhancer erfolgte in stärkerem Ausmaß als am Promotor. Dort ließ sich der erste schwache gefolgt von einem zweiten, stärkeren Anlagerungszyklus beobachten. Die Assoziation der RNA-Pol II entspricht der des AR. Im Zwischenbereich wurde weder eine Assoziation des AR noch der RNA-Pol II detektiert, so dass kein Gleiten der RNA-Pol II vom Enhancer zum Promotor erfolgt.

Mit dem Chromatin der in Abbildung 4.31 dargestellten Zeitreihe, wurde auch für die Koaktivatoren ZIPK, AATF und TSG101 eine Assoziation mit dem Zwischenbereich untersucht. Die PCR-Analyse ergab für alle drei Koaktivatoren ein negatives Ergebnis (Abb. 4.32).



**Abb. 4.32: Die Koaktivatoren und der AR assemblieren nicht im Bereich zwischen Enhancer und Promoter des PSA-Gens.**

Mit dem in Abb. 4.31 verwendeten Chromatin nach 45, 60 und 75 min DHT-Induktion erfolgte eine ChIP mit den angegebenen AK. Die PCR wurde mit spezifischen Primern für den Zwischenbereich des PSA-Gens durchgeführt. Das Amplifikat (208 bp) wurde mittels 1,5 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. P= IP gegen H3 als Positivkontrolle

#### 4.4 Was ist der Mechanismus der Koaktivierung durch die ZIPK?

Aus den Reportergergenstudien war bekannt, dass die Koaktivatorfunktion der ZIPK durch die kinaseinaktive Mutante aufgehoben wird. Daher sollte das Substrat identifiziert werden, welches von der ZIPK im Rahmen der Transkriptionsinitiation phosphoryliert wird. Außerdem sollte eine Funktion der ZIPK im Abbau des AR-Transkriptionskomplexes, möglicherweise abhängig von ihrer Kinaseaktivität, untersucht werden, da in ChIP-Analysen nach Herunterregulation der ZIPK, eine Akkumulation des AR an regulatorischen Bereichen seiner Zielgene detektiert wurde.

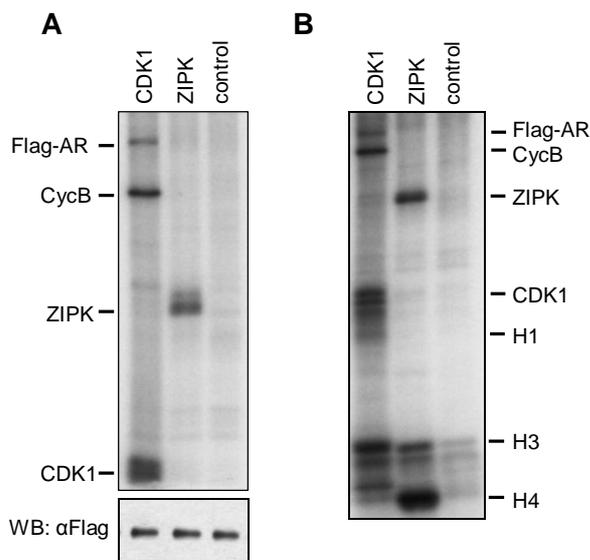
##### 4.4.1 Mögliche Phosphorylierungssubstrate der ZIPK

Als mögliche Substrate der ZIPK kamen der AR oder die Koaktivatoren in Betracht, des weiteren Chromatinproteine, insbesondere Histon H3, das von der ZIPK *in vitro* an Threonin11 phosphoryliert wird (Preuss *et al.*, 2003b).

###### 4.4.1.1 Wird der AR durch die ZIPK phosphoryliert?

Der AR ist ein Phosphoprotein und die Aktivierung der AR-abhängigen Transkription geht mit einer Phosphorylierung des AR einher (Wang *et al.*, 1999). Da der AR vier putative Phosphorylierungsstellen für die ZIPK besitzt, lag es nahe eine direkte Phosphorylierung des AR durch die ZIPK zu untersuchen. Mittels *in-vitro*-Kinaseassay wurden zunächst alle im Labor vorhandenen rekombinanten Kinasen auf eine Phosphorylierung des AR überprüft, um eine Positivkontrolle zu ermitteln. Getestet wurden PKA, PLK1, CDK1, CK II, ROCK1, ERK1 und ERK2. Immunpräzipitierter AR wurde effizient von CDK1 und schwach durch PLK1 und ERK2 phosphoryliert (ohne Abb.). Da die Phosphorylierung des AR durch CDK1 bereits

beschrieben war (Chen *et al.*, 2006), diente sie nachfolgend als Positivkontrolle. Um eine Phosphorylierung des AR durch die ZIPK nachzuweisen, wurde der AR aus HEK293- und LNCaP-Zellen immunpräzipitiert und mit steigenden Mengen gereinigter ZIPK inkubiert. Nachfolgend ist die Autoradiographie eines Kinaseassays dargestellt, die die effiziente Phosphorylierung des AR durch CDK1 belegt (Abb. 4.33 A und B). Eine Phosphorylierung des AR durch die ZIPK konnte dagegen nicht detektiert werden. Die Aktivität der ZIPK wurde dabei durch ihre Autophosphorylierung und die Zugabe eines Histonmixes (Abb. 4.33 B) überprüft. Da Histon H3 und H4 effizient durch ZIPK phosphoryliert wurden, stellt der AR zumindest *in vitro* kein Substrat der ZIPK dar.



**Abb. 4.33: Der AR wird *in vitro* nicht durch die ZIPK phosphoryliert.**

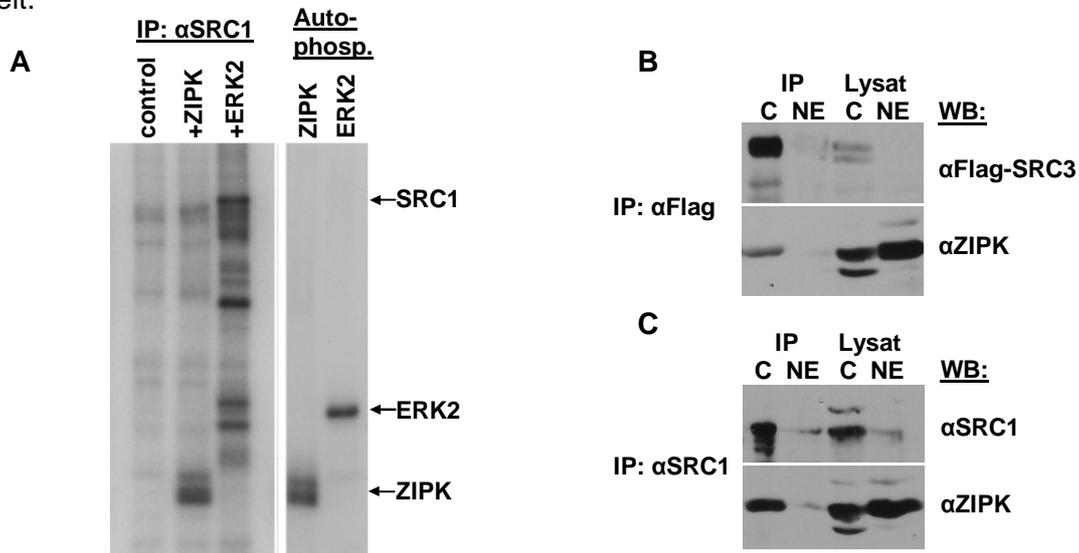
HEK293-Zellen wurden mit Flag-AR transfiziert und nach 24 h für 1 h mit 100 nM DHT induziert. Aus den hergestellten Kernextrakten wurde der AR mit anti-AR AK immunpräzipitiert und nach stringentem Waschen einem *in-vitro*-Kinaseassay mit exogener CDK1/Cyclin B (Positivkontrolle), mit ZIPK oder als Negativkontrolle ohne Kinase (control) unterzogen. Der WB detektiert den immunpräzipitierten AR. Die Autoradiographien zeigen identische Proben, die mittels 8,5 % (A) oder 13,5 % (B) SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass der AR nur im Komplex mit anderen Koaktivatoren phosphoryliert wird, wurden Versuche unternommen, in denen neben dem AR auch die Koaktivatoren AATF und TSG101 kotransfiziert wurden. Auch hier konnte keine Phosphorylierung des AR durch die ZIPK beobachtet werden (ohne Abb.). Eine Phosphorylierung *in vivo* innerhalb des Transkriptionskomplexes ist damit zwar nicht ausgeschlossen, allerdings ist es wahrscheinlicher, dass ein anderer Koaktivator oder aber Chromatinproteine durch die ZIPK phosphoryliert werden.

#### 4.4.1.2 Ist unter bekannten AR-Koaktivatoren oder Interaktionspartnern der ZIPK ein Substrat zu finden?

Als weitere Substrate wurden die bekannten AR Koaktivatoren SRC1, SRC3 und CBP auf eine Phosphorylierung durch die ZIPK untersucht. Aus dem näheren Umfeld der ZIPK wurden TSG101, Daxx und Blos2 getestet. Eine Phosphorylierung von AATF durch die ZIPK war bereits ausgeschlossen (Page *et al.*, 1999b). Für keines der untersuchten Proteine wurde *in vitro* eine Phosphorylierung durch die ZIPK detektiert. Interessanterweise fanden sich mit SRC1 und SRC3 neue Interaktionspartner der ZIPK. Die Interaktion erfolgte

hauptsächlich im cytoplasmatischen Extrakt, der allerdings auch die löslichen Kernproteine enthält. Die Koimmunpräzipitation der ZIPK über SRC1 und SRC3 ist in Abb. 4.34 B und C dargestellt. Der zugehörige *in-vitro*-Kinaseassay für SRC1 (Abb. 4.34 A) zeigt eine deutliche Phosphorylierung von SRC1 durch ERK2, aber nicht durch die ZIPK. Das bedeutet, dass es sich bei der Interaktion von ZIPK und SRC1/SRC3 nicht um eine Enzym-Substrat-Beziehung handelt.



**Abb. 4.34: SRC1 und SRC3 sind Interaktionspartner aber keine Substrate der ZIPK.**

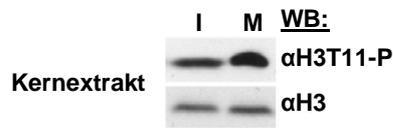
A) HEK293-Zellen wurden lysiert und endogenes SRC1 wurde aus Cytoplasma (C)- und Kernfraktion (NE) immunpräzipitiert. Präzipitiertes SRC1 wurde im *in-vitro*-Kinaseassay mit rekombinanter ZIPK, ERK2 (Positivkontrolle) und ohne zugesetzte Kinase (Negativkontrolle) mit [<sup>32</sup>P]-γATP inkubiert. Als Kontrolle wurden die Kinasen ohne SRC1-IP mitgeführt. Die Proben wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. Als Kontrolle wurde ¼ der IPs im WB mittels spezifischer AK gegen SRC1 und ZIPK immungefärbt (C). B) WB-Analyse wie in C) nur wurde hier überexprimiertes Flag-SRC3 aus HEK293-Zellen immunpräzipitiert. IPs und Lysate wurden mit anti-FLAG und anti-ZIPK AK immungefärbt.

#### 4.4.1.3 Phosphoryliert die ZIPK Histon H3 an Threonin11 während der Transkriptionsinitiation?

Ein Substrat der ZIPK ist *in vitro* unter anderem Histon H3, welches an Threonin11 (H3T11) phosphoryliert wird. Diese Modifikation wurde während der Mitose an der Centromerregion in Kolokalisation mit der Dlk beobachtet (Preuss *et al.*, 2003b). Da die Phosphorylierung z.B. von Histon H3 Serin10 (H3S10) als aktivierende Modifikation während der Transkription beschrieben war (Cheung *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2004), wurde untersucht, ob die ZIPK ihre koaktivierende Funktion möglicherweise über die Phosphorylierung von H3T11 während der Transkriptionsinitiation ausübt.

Zunächst wurde der Nachweis erbracht, dass die Modifikation auch in Interphasezellen auftritt. Dazu wurden PC3-Zellen mit Nocodazol über Nacht in der Prometaphase arretiert, so dass mitotische Zellen durch Abklopfen von den verbliebenen Restzellen getrennt werden

konnten. Nach Lyse der Zellen erfolgte mittels WB-Analyse der Nachweis von an T11 phosphoryliertem Histon H3:

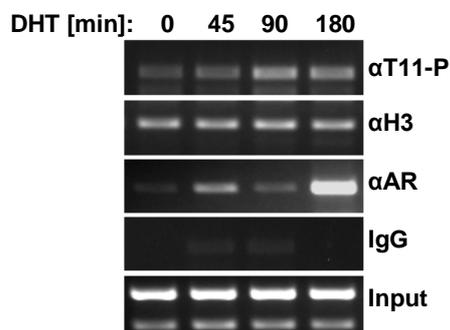


**Abb. 4.35: Nachweis der H3T11-Phosphorylierung in Interphase-Zellen.**

PC3-Zellen wurden für 16 h mit Nocodazol arretiert. Mitotische Zellen (M) wurden von Interphasezellen (I) durch Abschütteln getrennt. 10 µg der Kernextrakte wurden mittels 13,5 % SDS-Page aufgetrennt und mit anti-H3T11-P oder anti-H3-Antikörpern immungefärbt.

Die WB-Analyse ergab, dass die H3T11-Phosphorylierung sowohl in mitotischen als auch Interphasezellen auftritt. Dabei war die Phosphorylierung in den mitotischen Zellen etwa doppelt so stark. Die Immunfärbung von Histon H3 zeigte gleiche Mengen an Histon in den Extrakten.

Als nächster Schritt erfolgte mittels ChIP-Analyse der Nachweis einer möglichen T11-Phosphorylierung im regulatorischen Bereich des PSA-Gens. LNCaP-Zellen wurden für 45, 90 und 180 min mit DHT induziert und nach Standardprotokoll weiterbehandelt. Nachfolgend ist ein repräsentatives Beispiel dargestellt, bei dem als Kontrolle eine Immunpräzipitation gegen Histon H3 mitgeführt wurde, die dem Nachweis gleicher Mengen an Histon H3 in den einzelnen IPs diente.



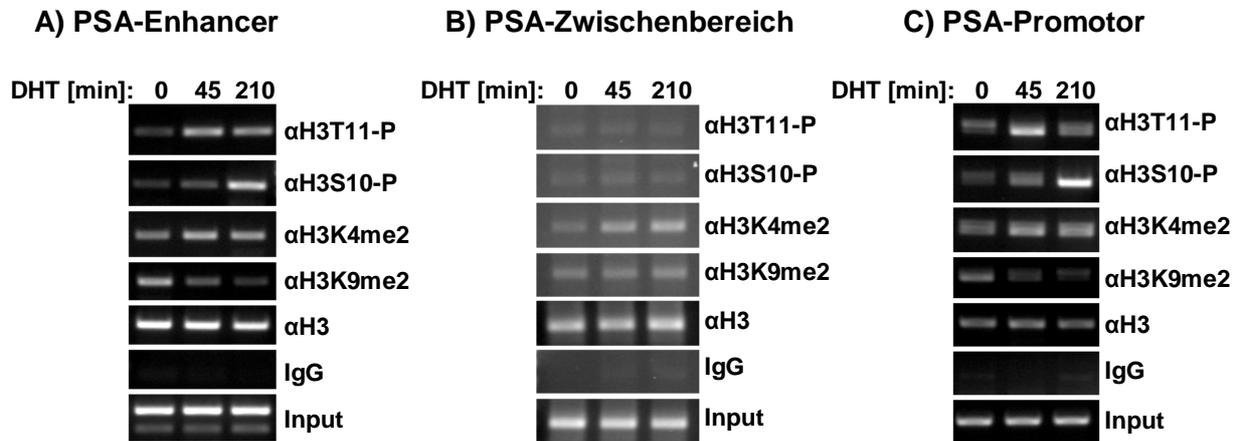
**Abb. 4.36: Histon H3 wird an Threonin11 im PSA-Enhancerbereich phosphoryliert.**

LNCaP-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 nM DHT induziert. Die ChIP erfolgte mit AK gegen Histon H3T11-P, H3, AR und unspezifische IgGs. Die PCR erfolgte mittels spezifischer Primer gegen den PSA-Enhancer.

Abbildung 4.36 zeigt, dass Histon H3 an T11 im Zuge der AR-abhängigen Genaktivierung zunehmend phosphoryliert wird. Bereits uninduziert war eine schwache Bande detektierbar. Die Intensität der Banden stieg bis 90 min deutlich an und wies bei 180 min eine leicht reduzierte Intensität auf. Die Kontroll-IP gegen Histon H3 detektierte in allen Ansätzen gleichmäßig präzipitiertes Histon H3 und die IP gegen den AR zeigte das für den Enhancer typische zyklische Verhalten. Die H3T11-Phosphorylierung konnte auch für den PSA-Promotor, KLK2-Promotor und TMPRSS2-Enhancer nachgewiesen werden (ohne Abb.).

Für den PSA-Promotor und Enhancer konnte bereits gezeigt werden, dass Histon H3 an S10 während der Transkriptionsinitiation phosphoryliert wird (Kang *et al.*, 2004). Daher sollte untersucht werden, ob sich die S10- und T11-Phosphorylierungen ausschließen, oder ob beide Modifikationen gleichzeitig auftreten. Als weitere bekannte Modifikationen des PSA-Gens wurden die Dimethylierung von Histon H3 Lysin9 (H3K9) und Lysin4 (H3K4) miteinbezogen. Die Methylierung kann sowohl aktivierender als auch reprimierender Natur

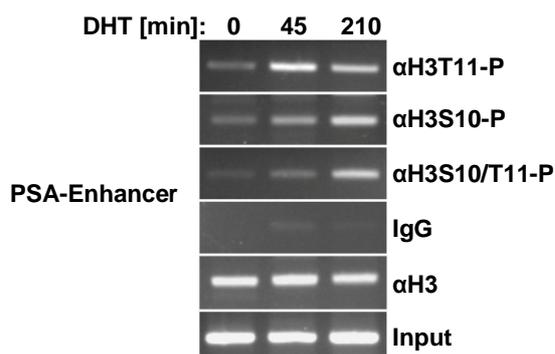
sein. Dabei steht die Trimethylierung von H3K9 für kompaktes Heterochromatin, die Dimethylierung findet sich in Euchromatin von inaktiven Genen. Demgegenüber steht di- und tri-methyliertes H3K4 für aktiv transkribiertes Chromatin bzw. generell für Euchromatin. Neben dem Vorkommen der Modifikationen an Enhancer und Promotor des PSA-Gens, wurde die Ausbreitung der Modifikationen im Zwischenbereich untersucht (Abb. 4.37):



**Abb. 37: Nachweis der an Histon H3 auftretenden S10- und T11-Phosphorylierungen für das PSA-Gen.**

LNCaP-Zellen wurden für drei Tage unter hormonfreien Bedingungen kultiviert bevor sie für die angegebenen Zeiten mit 100 nM induziert wurden. Die ChIP erfolgte mit AK gegen Histon H3 und die Modifikationen: S10- und T11-Phosphorylierung, K4- und K9-Dimethylierung. Unspezifische IgGs wurden als Kontrolle für die Hintergrundbindung verwendet. Die mitgereinigte DNA wurde mittels semiquantitativer PCR mit spezifischen Primern für Enhancer (A), Zwischenbereich (B) und Promotor (C) der regulatorischen Region des PSA-Gens amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels 2 %-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

An Enhancer und Promotor des PSA-Gens konnte nach 45 min Induktion eine starke H3T11- und eine schwache H3S10-Phosphorylierung beobachtet werden. Nach 210 min Androgenstimulation trat eine etwas abgeschwächte H3T11- gegenüber einer deutlich verstärkten H3S10-Phosphorylierung auf. Dass sich die beiden Phosphorylierungen, etwa aufgrund ihrer räumlichen Nähe, nicht ausschließen, ließ sich mit einem Antikörper, der spezifisch die H3S10/T11-Doppelphosphorylierung erkennt, bestätigen (Abb. 4.38). Dabei folgte das Signal der doppelt phosphorylierten Form, dem Signal von S10. Die Spezifität des Antikörpers wurde zuvor in Kompetitionsstudien bestätigt (Landsberg, unveröffentlicht)

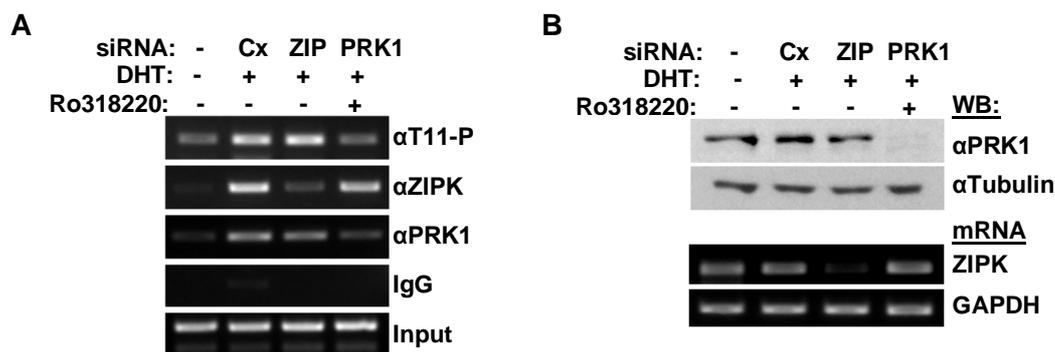


**Abb. 4.38: Die H3S10- und H3T11-Phosphorylierung treten parallel auf.**

LNCaP-Zellen wurden für 45 und 210 min mit 100 nM DHT induziert wurden. Die ChIP erfolgte mit AK gegen Histon H3 und die Modifikationen: S10-, T11-, oder S10/T11-Phosphorylierung. Die präzipitierte DNA wurde mittels PCR mit spezifischen Primern für den PSA-Enhancer amplifiziert.

Der Nachweis der Methylierungen ergab, dass die reprimierende H3K9me2 im uninduzierten Zustand der Zellen vorlag und nach Androgenstimulation durch Demethylierung entfernt wurde (siehe Abb. 4.37). Die Dimethylierung von H3K4 konnte ebenfalls uninduziert beobachtet werden, zeigte jedoch bei Androgenstimulation eine leichte Zunahme der Bandenintensität. Für den Bereich zwischen Enhancer und Promotor, wurde der Bereich -1737 bis -1529 bp vom Transkriptionsstartpunkt aus gesehen amplifiziert (siehe Abb. 4.18 A). Die Input-Proben und der Nachweis von Histon H3 detektierten gleiche Mengen Chromatin in den Proben. Eine über das Hintergrundsignal der IgGs hinausgehende Phosphorylierung von H3S10 oder H3T11 konnte nicht detektiert werden. Die H3K9me2 ergab ein schwaches Signal, sowohl im uninduzierten als auch induzierten Zustand. Die H3K4me2 zeigte einen schwachen, Androgen-abhängigen Anstieg in ihrer Intensität. Zu beachten bleibt, dass die Belichtung des Gels deutlich stärker erfolgte, um ein Signal zu detektieren.

Während der Arbeiten zur Charakterisierung der H3T11-Phosphorylierung wurden mit Chk1 und PRK1 zwei Kinasen beschrieben, die spezifisch H3T11 während der Interphase phosphorylieren (Shimada *et al.*, 2008; Metzger *et al.*, 2008). Metzger *et al.* (2008) wiesen die H3T11-Phosphorylierung im Kontext der Androgen-abhängigen Transkription des PSA- und KLK2-Gens nach, so dass die Rolle der ZIPK als H3T11-Kinase in diesem System in Frage zu stellen war. Zunächst konnte in Experimenten zur Etablierung der siRNA gegen PRK1 eine signifikante Reduktion der H3T11-Phosphorylierung bei minimaler Restmenge PRK1 beobachtet werden (ohne Abb.), aber erst die zusätzliche Inkubation mit spezifischem Inhibitor bewirkte eine Reduktion der H3T11-Phosphorylierung auf das Niveau der uninduzierten Zellen. Um zu untersuchen, ob die ZIPK direkt an der H3T11-Phosphorylierung beteiligt ist, wurde eine ChIP-Analyse nach siRNA gegen ZIPK und PRK1 durchgeführt:

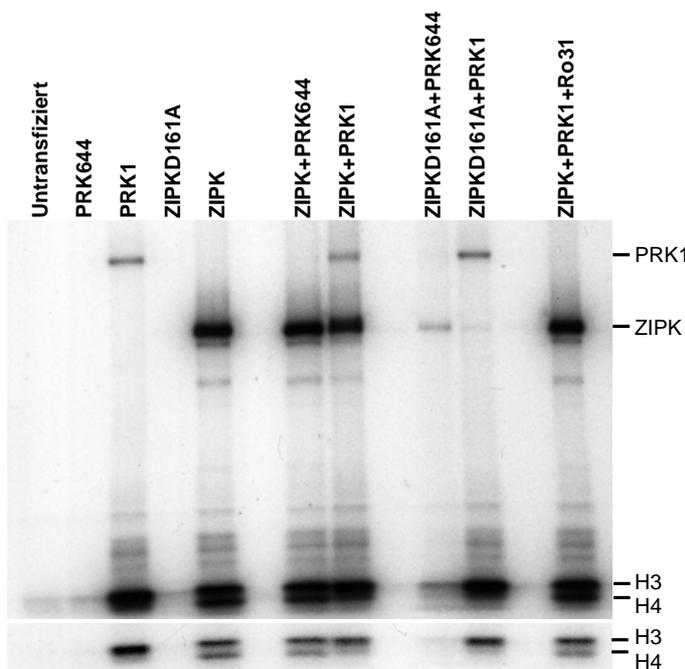


**Abb. 4.39: Die H3T11-Phosphorylierung wird durch die Herunterregulation der ZIPK nicht beeinflusst.**

A) LNCaP-Zellen wurden mit 75 nM siRNA gegen ZIPK, Kontroll-siRNA (siCx) oder 150 nM siRNA gegen PRK1 transfiziert. Nach 48 h siRNA-Behandlung erfolgte die Vorbehandlung des Ansatzes mit siPRK1 für 1 h mit 5 µM Ro318220 (PRK1-Inhibitor). Die Zellen wurden für 45 min induziert. Ein Teil der Zellen wurde vor der ChIP abgeschabt. Die PCR erfolgte mit Primern gegen den PSA-Enhancer. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels 2 %-Agarose-Gelelektrophorese. B) Die abgeschabten Zellen wurden lysiert und mittels WB-Analyse auf die effiziente Reduktion der PRK1-Proteinlevel mit PRK1- und αTubulin-AK überprüft. Die Reduktion der ZIPK-mRNA-Level wurde nach RNA-Isolation, RT-PCR und PCR mit Primern gegen ZIPK und GAPDH nachgewiesen.

Die in Abbildung 4.39 B dargestellten Kontrollen der siRNA-Effizienz zeigten eine effektive Herunterregulation von PRK1 auf Proteinebene und von ZIPK auf mRNA-Ebene. In der anschließend durchgeführten CHIP ließ sich entsprechend nur noch eine geringfügige Rekrutierung von ZIPK und PRK1 an den PSA-Enhancer nachweisen. Da der Ansatz mit siRNA gegen PRK1 zusätzlich mit PRK1-Inhibitor vorbehandelt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Restmenge an rekrutierter PRK1 inhibiert vorlag. Der Nachweis der H3T11-P ergab im Ansatz mit inhibierter, herunterregulierter PRK1 eine deutliche Reduktion der T11-Phosphorylierung, die im Bereich der uninduzierten Zellen lag. Ein Einfluss des PRK1-Inhibitors (Ro318220) auf die Aktivität der ZIPK konnte mittels *in-vitro*-Kinaseassay ausgeschlossen werden (siehe Abb. 4.40). Für die mit siRNA gegen die ZIPK behandelten Zellen konnte dagegen kein Rückgang der H3T11-P beobachtet werden. Also phosphoryliert die ZIPK zumindest im Zuge der AR-abhängigen Genaktivierung nicht Histon H3 an T11.

Abschließend wurde untersucht, ob die ZIPK möglicherweise als „downstream target“ der PRK1 in die H3T11-Phosphorylierung involviert ist, obwohl auch in diesem Fall ein Effekt der Herunterregulation der ZIPK auf die H3T11-Phosphorylierung zu erwarten gewesen wäre. Dazu wurde eine Enzym-Substrat-Beziehung der Kinasen überprüft. Endogene PRK1 sowie die kinaseinaktive Variante PRK1K644E wurden in Kombination mit ZIPK und kinaseinaktiver ZIPKD161A im *in-vitro*-Kinaseassay auf eine gegenseitige Phosphorylierung untersucht. Als Kontrollsubstrat wurden Histone zugesetzt (siehe Abb. 4.40).



**Abb. 4.40: *In-vitro*-Kinaseassay von ZIPK und PRK1.**

Dargestellt ist die Autoradiographie eines *in-vitro*-Kinaseassays von GFP-ZIPK, kinaseinaktiver GFP-ZIPKD161A, PRK1 und inaktiver Flag-PRKK644E, sowie die jeweilige Kombination aus aktiver und inaktiver Kinase. Aus HEK293-Zellen wurden endogene PRK1 bzw. überexprimierte ZIPK, ZIPD161A, PRKK644E immunpräzipitiert und zusammen mit einem Histon-Gemisch sowie [<sup>32</sup>P]-γ-ATP inkubiert und anschließend mittels SDS-Page (Stufengel: 8,5/13,5 %) aufgetrennt. Im unteren Ausschnitt ist eine kürzere Exposition zur besseren Unterscheidung der Histone dargestellt.

Die Autoradiographie zeigt, dass nur die aktiven Formen von PRK1 und ZIPK eine Auto- und Substratphosphorylierung aufwiesen. Dabei phosphorylierte PRK1 Histon H3 und die ZIPK Histon H3 und H4. Die kinaseinaktiven Mutanten zeigten, wie erwartet, weder Auto- noch

Substratphosphorylierung. Wurde ZIPK mit inaktiver PRK1 oder PRK1 mit inaktiver ZIPK inkubiert, konnte keine Änderung der Bandenintensitäten gegenüber den einzelnen Kinasen beobachtet werden. Wurden beide inaktive Kinasen inkubiert kam es zu einer minimalen Hintergrund-Phosphorylierung der ZIPK, vermutlich durch eine mitpräzipitierte Kinase, deren Relevanz für die Frage nach einer Beziehung zur PRK1 unerheblich ist, da PRK1 als inaktive Form zugegen war. Auch zwischen ZIPK und PRK1 besteht keine direkte Enzym-Substrat-Beziehung, so dass ein direktes Zusammenspiel der Kinasen bei der H3T11-Phosphorylierung unwahrscheinlich ist. Eine Beteiligung der ZIPK an der H3T11-Phosphorylierung im Rahmen der AR-abhängigen Genaktivierung ist damit ausgeschlossen.

Das Substrat durch dessen Phosphorylierung die ZIPK ihre Koaktivatorfunktion auf die AR-vermittelte Transkription ausübt, ist somit weiterhin unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

#### **4.4.2 Ist die ZIPK an der Ubiquitinierung des AR beteiligt?**

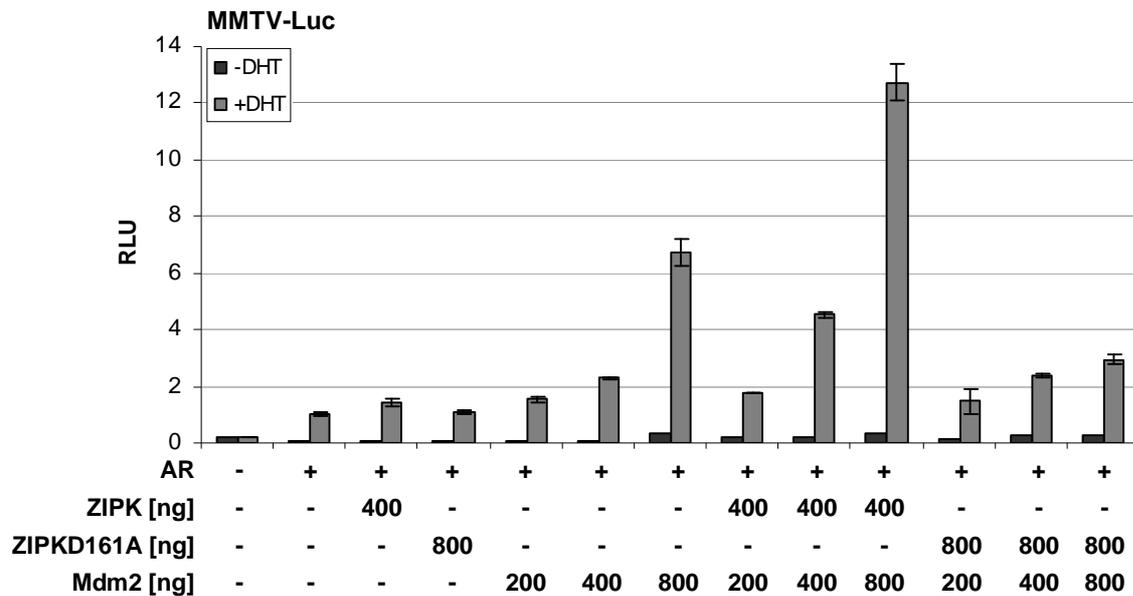
Ein weiterer Ansatzpunkt, um den Mechanismus der Koaktivierung durch die ZIPK zu hinterfragen, ergab sich durch das in den CHIP-Analysen gewonnene Ergebnis, dass der AR nach Herunterregulation der ZIPK am Response-Element akkumuliert. Dieser Effekt trat auch bei Inhibition des Proteasoms durch MG132 auf.

Es stellte sich somit die Frage, ob die ZIPK an der Regulation des Abbaus des AR beteiligt sein könnte. Da der Abbau des AR aber von vorheriger Aktivität und Transkription abhängt, könnte die ZIPK auch dort ansetzen. Vorstellbar war, dass die ZIPK die Stabilisierung der Monoubiquitinierung des AR durch TSG101 aufhebt. Hier kam über die Interaktionspartner AATF und TSG101 die E3-Ligase Mdm2 ins Spiel, da beide mit Mdm2 interagieren (De Nicola *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2001) und Mdm2 an der Ubiquitinierung des AR beteiligt ist (Lin *et al.*, 2002). Zudem wurde Mdm2 bereits als potentielles Substrat der ZIPK beschrieben (Burch *et al.*, 2004). Ein mögliches Zusammenspiel von ZIPK und Mdm2 in der AR-vermittelten Transkription, möglicherweise durch Beeinflussung des Ubiquitinierungszustandes des AR, wurde daher untersucht.

##### **4.4.2.1 ZIPK und Mdm2 kooperieren in der Koaktivierung der AR-abhängigen Transkription von Reportergenen**

Um einen ersten Eindruck einer möglichen Verbindung zwischen ZIPK und Mdm2 zu erhalten, wurden beide Proteine getrennt und in Koexpression in einem transienten Transaktivierungsassay auf ihren Effekt auf die AR-abhängige Transaktivierung des MMTV-Promotors in HEK293-Zellen untersucht. Für Mdm2 war ein reprimierender Effekt auf den AR

(Lin *et al.*, 2002; Gaughan *et al.*, 2005), aber ein aktivierender auf den ER $\alpha$  (Saji *et al.*, 2001) beschrieben.



**Abb. 4.41: ZIPK und Mdm2 kooperieren in der Aktivierung der AR-abhängigen Transkription.**

HEK293-Zellen wurden mit 600 ng MMTV-Luc, 100 ng Flag-AR, 100 ng pCMV-Renilla und den angegebenen Mengen GFP-ZIPK, GFP-ZIPKD161A und Mdm2-Expressionsplasmid transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Induktion mit 100 nM DHT für 20 h. Die RLU wurde auf den Ansatz des induzierten Rezeptors normiert. Der Versuch wurde in Dreifachansätzen zwei Mal durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

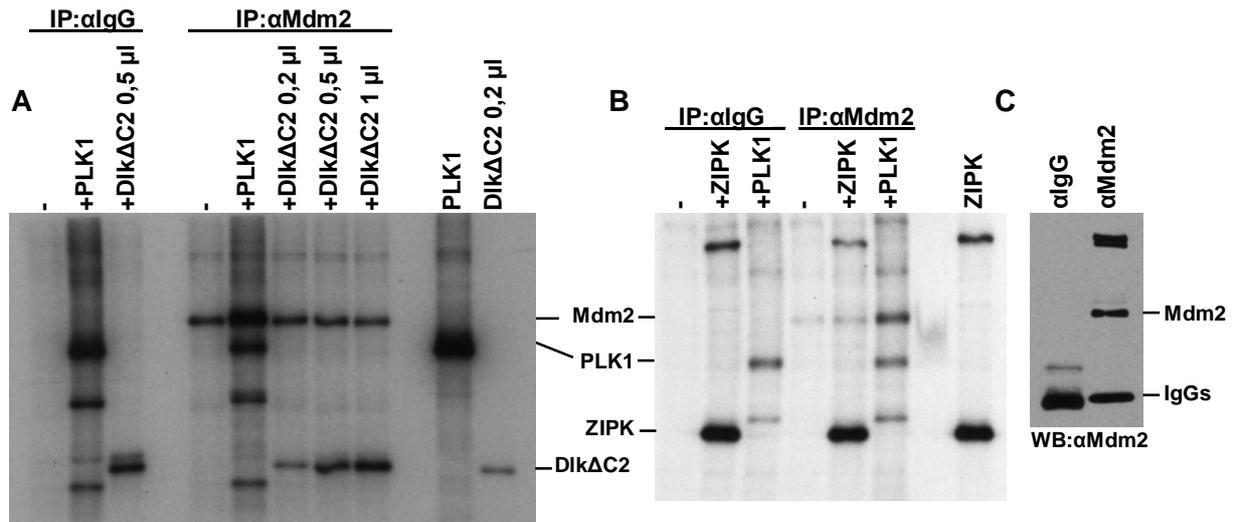
Überraschenderweise führte Mdm2 zu einer mengen- und hormonabhängigen Aktivierung der AR-abhängigen Transkription (Abb. 4.41). Mit einem bis zu 6,7-fachen Anstieg der RLU zeigte Mdm2 dabei eine deutliche Funktion als Koaktivator. In Koexpression von ZIPK und Mdm2 wurde mit einer RLU von 12,7 eine deutliche Steigerung gegenüber den einzelnen Aktivitäten erzielt, was auf einen kooperativen Effekt der beiden Proteine hindeutet. Interessanterweise wurde diese gegenseitige Verstärkung bei Koexpression von Mdm2 mit der kinaseinaktiven Mutante aufgehoben. Die kinaseinaktive ZIPK wirkte sogar reprimierend auf die aktivierende Wirkung von Mdm2.

Das Zusammenspiel von ZIPK und Mdm2 gab Anlass, eine funktionelle Kooperation beim Abbau des Rezeptors zu untersuchen. Außerdem sollte, aufgrund der für die kinaseinaktive Mutante ermittelten Daten, die Phosphorylierung von Mdm2 durch die ZIPK überprüft werden.

#### 4.4.2.2 Wird Mdm2 durch die ZIPK phosphoryliert?

Eine Studie identifizierte die ZIPK als Mdm2-Kinase. Es wurde gezeigt, dass die ZIPK Mdm2-Peptide phosphoryliert. Allerdings stellte das Mdm2-Protein ein sehr schwaches Substrat *in vitro* dar (Burch *et al.*, 2004). Die Enzym-Substrat-Beziehung zwischen ZIPK und Mdm2 sollte überprüft werden. Dazu wurde überexprimiertes Mdm2 aus HEK293-Zellen

präzipitiert und in einem *in-vitro*-Kinaseassay mit steigenden Mengen rekombinanter Dlk inkubiert (Abb. 4.42 A). Es zeigte sich, dass das präzipitierte Mdm2, bereits ohne zugesetzte Kinase, eine deutliche Phosphorylierung aufwies. Vermutlich bedingt durch eine kopräzipitierte Kinase. Die Phosphorylierung konnte durch steigende Mengen zugesetzter Dlk nicht mehr erhöht werden. Die als Positivkontrolle verwendete PLK1 (Dias *et al.*, 2009) bewirkte jedoch eine deutliche Phosphorylierung von Mdm2. Dies spricht gegen eine Enzym-Substrat-Beziehung von Dlk und Mdm2. Um eine Reduktion der Hintergrund-Phosphorylierung zu erreichen, wurde die IP stringenter gewaschen:



**Abb. 4.42: Mdm2 wird *in vitro* sehr schwach durch die ZIPK phosphoryliert.**

A) HEK293-Zellen wurden mit Mdm2-Expressionsplasmid transfiziert und nach 24 h geerntet. Von den hergestellten Gesamtextrakten wurden IPs mit AK gegen Mdm2 und mit unspezifischen IgGs durchgeführt. Die IPs wurden geteilt, so dass gleiche Mengen für einen Kinaseassay eingesetzt wurden und mit exogener PLK1, den angegebenen Mengen exogener DlkΔC2 oder ohne Kinase (-) mit [<sup>32</sup>P]-γATP inkubiert. Die phosphorylierten Proteine wurden mittels 8,5 % SDS-Page aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. B) Wie in A). Statt rekombinanter Dlk wurde hier die humane ZIPK aus HEK293-Zellen präzipitiert und im Kinaseassay eingesetzt. C) Ein Teil der IPs wurde in einer WB-Analyse mit AK gegen Mdm2 immungefärbt.

Die Hintergrund-Phosphorylierung fiel nur noch gering aus. Mit Zugabe der ZIPK war die Mdm2-Phosphorylierung deutlicher, wenn auch nur eine schwache Steigerung der Phosphorylierung erfolgte. Die Phosphorylierung durch PLK1 fiel drei bis vier Mal stärker aus (Abb. 4.42 B). Inwieweit *in vivo* im aktiven Transkriptionskomplex eine effiziente Phosphorylierung stattfindet, lässt sich mittels den *in vitro* erhobenen Daten nur schwer abschätzen.

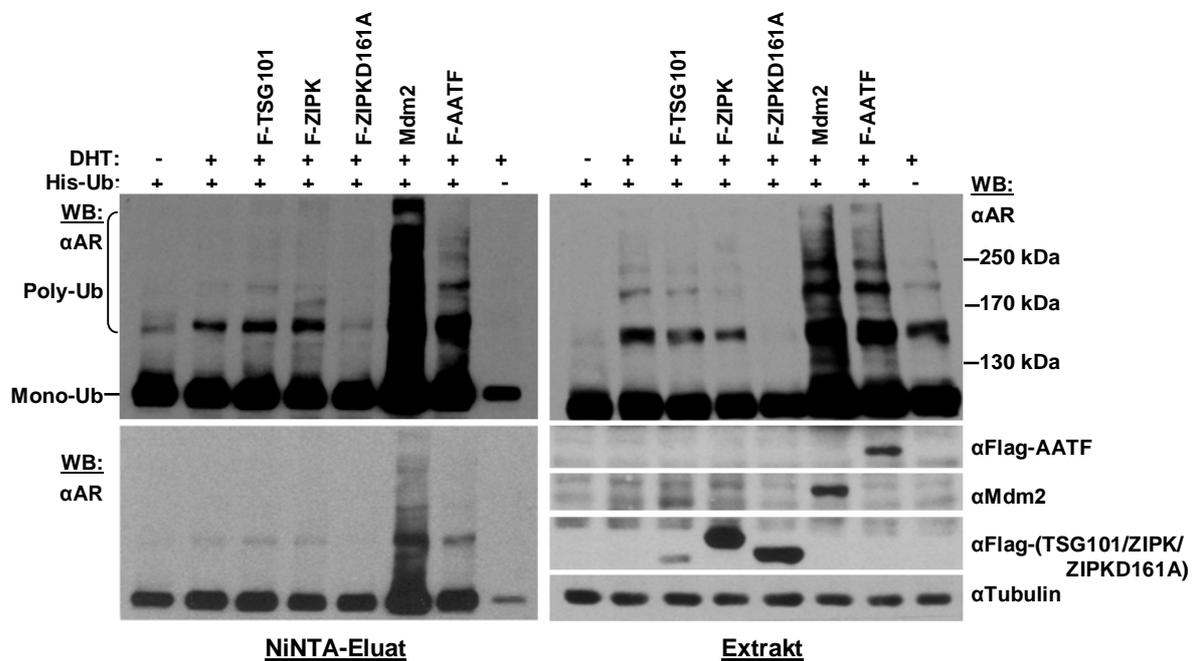
#### 4.4.2.3 Nachweis von ubiquitiniertem AR nach Androgen-Stimulation

Es ist bekannt, dass im Zuge der Androgen-abhängigen Aktivierung des Rezeptors eine Ubiquitinierung stattfindet (Gaughan *et al.*, 2005). Diese ist je nach Länge und Verknüpfung



#### 4.4.2.4 Ist die ZIPK an der *in vivo*-Ubiquitinierung des AR beteiligt?

Um zu überprüfen, ob die ZIPK einen Einfluss auf die Ubiquitinierung des AR ausübt, wurde ein *in-vivo*-Ubiquitinierungsversuch durchgeführt. Durch Überexpression eines 6x-Histidin-markierten Ubiquitins konnte eine Isolierung von ubiquitinierten Proteinen mittels NiNTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Da die Ubiquitinierung eines Proteins oftmals von einer zuvor stattfindenden Phosphorylierung abhängig ist, wurde die kinaseinaktive Mutante der ZIPK in die Analysen mit einbezogen. HEK293-Zellen wurden mit AR, His-Ubiquitin und ZIPK, ZIPKD161A, TSG101 oder Mdm2 transfiziert. Nach Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132 und Androgenstimulation üN wurden ubiquitinierte Proteine unter denaturierenden Bedingungen mittels NiNTA-Affinitätschromatographie isoliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.44 dargestellt:



**Abb. 4.44: Die Expression der ZIPK führt zu einer erhöhten Ubiquitinierung des AR.**

HEK293-Zellen wurden in hormonfreiem Medium mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Zum DNA-Mengenabgleich wurde GFP-Leervektor transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen über Nacht mit MG132 [2 µM] inkubiert und mit DHT [100 nM] induziert. Ubiquitinierte Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels NiNTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und nach Auftrennung mittels 7,5 % SDS-Page in einer WB-Analyse mit den angegebenen AK immungefärbt. Dargestellt sind eine starke (links oben) und eine schwache (links unten) Belichtung der NiNTA-Eluat und die Extrakte vor der Affinitätschromatographie (rechts).

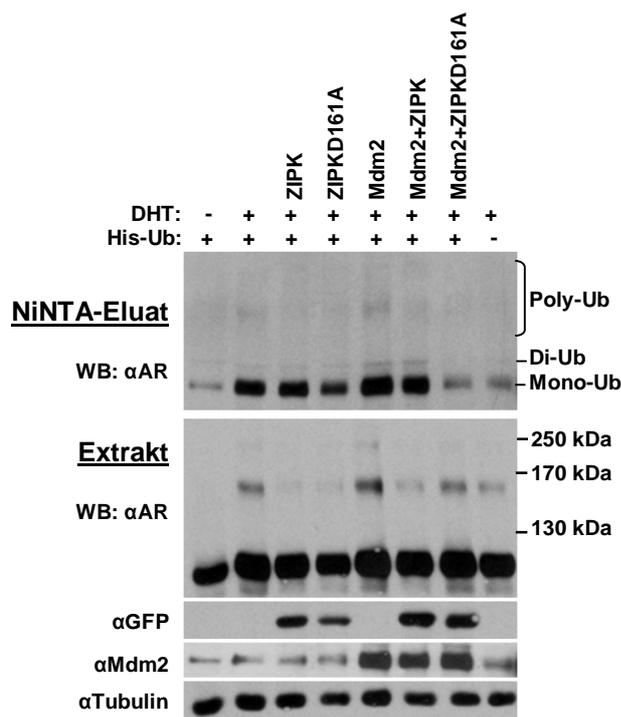
Die *in-vivo*-Ubiquitinierung zeigte deutlich die Hormonabhängigkeit der Ubiquitinierung des AR (Abb. 4.44). Die Monoubiquitinierung wurde durch Androgenstimulation verstärkt und die höher ubiquitinierten Formen traten sowohl im NiNTA-Eluat (linke Membran) als auch im Lysat (rechte Membran) Androgen-abhängig auf. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, der nicht mit His-Ubiquitin transfiziert wurde. Nach Androgen-Stimulation lies sich im Lysat durch endogenes Ubiquitin modifizierter AR erkennen. Demgegenüber wies das Eluat nach

Affinitätschromatographie, wie in dem schwach belichteten Abschnitt zu erkennen ist, nur eine minimal unspezifische Bindung im Bereich des monoubiquitinierten Rezeptors auf.

In dem abgebildeten Versuch ist, aufgrund der geringen Überexpression von TSG101, zwar eine Anreicherung an monoubiquitiniertem AR im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle zu erkennen, allerdings auch eine stärkere Polyubiquitinierung. Weitere NiNTA-Affinitätschromatographien mit ektopisch exprimiertem TSG101 bestätigten die stabilisierende Wirkung auf den monoubiquitinierten AR (Burgdorf *et al.*, 2004), allerdings wurden durchgehend auch polyubiquitinierte Banden nachgewiesen (ohne Abb.).

Die entscheidende Frage nach der Wirkung von ZIPK und dem Einfluss ihrer Kinaseaktivität ergab, dass die Überexpression der ZIPK eine leichte Erhöhung der Polyubiquitinierung des AR bewirkte. Vor allem im NiNTA-Eluat wurden mehr Banden detektiert und die im hochmolekularen Bereich auftretenden polyubiquitinierten Formen waren in einem stärker ausgeprägten „Schmier“ zu erkennen. Interessanterweise führte die Expression der kinaseinaktiven ZIPK zu einer deutlichen Reduktion der Ubiquitinierung des AR, vor allem der höher ubiquitinierten Formen. Dies lies sich bereits im Lysat deutlich beobachten (Abb. 4.44 rechts oben). Die Überexpression der E3-Ligase Mdm2 führte erwartungsgemäß zu einer starken Ubiquitinierung des AR. Auch AATF führte zu einer deutlichen Zunahme der Ubiquitinierung. Die ZIPK scheint somit an der Regulation der Ubiquitinierung des AR beteiligt zu sein. Dabei ist ihre Kinaseaktivität anscheinend von zentraler Bedeutung.

Eine mögliche Kooperation von ZIPK und Mdm2 in der Ubiquitinierung des AR wurde nach Koexpression von Mdm2 mit ZIPK oder der kinaseinaktiven Mutante, sowie AR und His-Ubiquitin mittels NiNTA-Affinitätschromatographie untersucht:



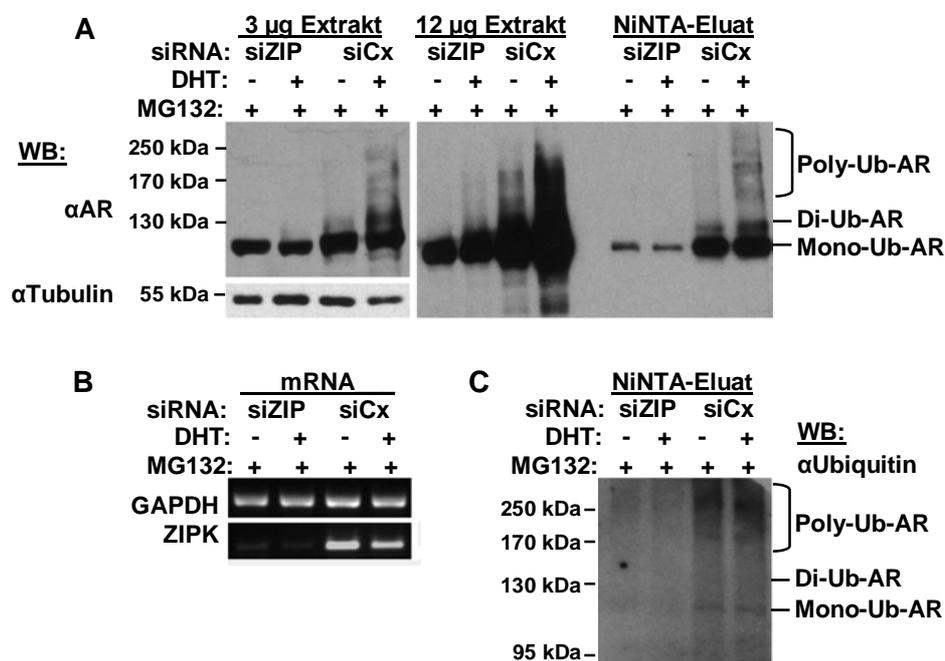
**Abb. 4.45: Kinaseinaktive ZIPK wirkt inhibierend auf die Mdm2-vermittelte Ubiquitinierung des AR.**

HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Zum DNA-Mengenabgleich wurde GFP-Leervektor transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen über Nacht mit MG132 [2 µM] inkubiert und mit DHT [100 nM] induziert. Ubiquitinierte Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels NiNTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und nach Auftrennung mittels 7,5% SDS-Page in einer WB-Analyse mit den angegebenen AK immungefärbt.

Die Aufreinigung von polyubiquitiniertem AR fiel trotz Zugabe des Proteasomeninhibitors gering aus (Abb. 4.45). Allerdings lies sich monoubiquitiniertes Rezeptor effektiv aufreinigen. Die kinaseinaktive Mutante der ZIPK führte zu einer verminderten Ubiquitinierung des AR im Vergleich zum induzierten Ansatz. Die ZIPK an sich wies in Einzelexpression keinen Einfluss auf die Monoubiquitinierung auf. Mdm2 bewirkte eine starke Monoubiquitinierung sowie eine leichte Erhöhung von di- und polyubiquitiniertem AR, die in Kombination mit ZIPK allerdings unbeeinflusst blieb. Die Koexpression der kinaseinaktiven ZIPK führte dagegen zu einer deutlichen Reduktion an aufgereinigtem, ubiquitiniertem AR, die im Bereich der uninduzierten Kontrolle lag. Als Kontrollen wurden die Expression von GFP-ZIPK und GFP-ZIPKD161A sowie Mdm2 und Tubulin, als interner Mengenabgleich, im Extrakt nachgewiesen. Die Probe ohne überexprimiertes His-Ubiquitin diente dem Nachweis, dass dieses spezifisch an den AR gekoppelt wird und dass sich der ubiquitinierte Rezeptor spezifisch mittels NiNTA-Affinitätschromatographie aufreinigen lässt.

#### 4.4.2.5 Endogene ZIPK ist an der Ubiquitinierung des AR beteiligt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ektopisch exprimierte ZIPK zu einer leichten Erhöhung der Polyubiquitinierung des AR führte und die kinaseinaktive ZIPK einen



**Abb. 4.46: Die Herunterregulation von endogener ZIPK wirkt reprimierend auf die Ubiquitinierung des AR.**

A) HEK293-Zellen wurden in hormonfreiem Medium mit Kontroll-siRNA (siCx) oder siRNA gegen die ZIPK (siZIP) sowie Expressionsplasmiden für den AR und His-Ub transfiziert. Nach 30 h wurde MG132 [2 µM] und DHT [100 nM] bzw. Ethanol als Vehikelkontrolle *in vivo* zugegeben. Histidin-markierte, ubiquitinierte Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels NiNTA-Affinitätschromatographie isoliert und im WB mittels anti-AR AK analysiert. B) Vor der Zellyse wurde ein Anteil Zellen abgenommen und nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels spezifischer Primer gegen die ZIPK, auf eine effiziente Reduktion der ZIPK mRNA untersucht. C) Die Membran des NiNTA-Eluates aus (A) wurde gestrippt und mit anti-Ubiquitin AK immungefärbt.

inhibitorischen Effekt auf die Ubiquitinierung aufwies, stellte sich die Frage, ob sich nach Herunterregulation der endogenen ZIPK ein Einfluss auf die Ubiquitinierung des AR nachweisen lässt. HEK293-Zellen wurden dazu nach einem Tag in hormonfreiem Medium mit siRNA gegen die ZIPK oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 30 h wurden die Zellen über Nacht mit 2  $\mu$ M MG132 und mit oder ohne DHT inkubiert.

Die effiziente Herunterregulation von endogener ZIPK (Abb. 4.46 B), führte zu einer deutlichen Abnahme an ubiquitiniertem AR sowohl im Lysat als auch im Eluat der NiNTA-Affinitätschromatographie (Abb. 4.46 A). Im Eluat ließ sich nur noch geringfügig monoubiquitiniertes AR beobachten. Der Ansatz mit Kontroll-siRNA zeigte dagegen nach Androgenstimulation eine deutliche Anreicherung an mono-, di- und polyubiquitiniertem AR. Auch die Gegenfärbung mit anti-Ubiquitin-Antikörper (Abb. 4.46 C) detektierte in den Ansätzen nach Herunterregulation der ZIPK deutlich weniger ubiquitinierten AR und Gesamtprotein als in den Ansätzen mit Kontroll-siRNA. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die ZIPK eine Rolle bei der Ubiquitinierung des AR spielt. Dies möglicherweise im Zusammenspiel mit Mdm2.

## 5 Diskussion

Der AR ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der an der Entwicklung und Homöostase der männlichen Geschlechtsmerkmale und an der Entstehung von Prostatakarzinomen beteiligt ist. Die AR-vermittelte Transkription erfolgt im Zusammenspiel mit einer Vielzahl von Koregulatoren. Mittlerweile sind über 200 Koregulatoren des AR beschrieben (Heemers und Tindall, 2007). Von unserer Arbeitsgruppe wurden mit AATF, ZIPK, TSG101 und Blos2 weitere neue Koaktivatoren identifiziert.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die murinen Orthologen dieser Proteine koaktivierend auf die Transkription von AR-abhängigen Reportergenen wirken. Weiterhin war bereits beschrieben, dass AATF und ZIPK an die Response-Elemente des PSA-Gens rekrutiert werden, direkt mit dem AR interagieren können und die Kinaseaktivität der ZIPK für ihr Koaktivatorpotential essentiell ist (Leister *et al.*, 2008). Für AATF und TSG101 wurde ein Modell postuliert, bei dem TSG101 durch AATF an den AR rekrutiert wird und diesen dann in seiner monoubiquitinierten, vermutlich aktiven Form stabilisiert (Burgdorf *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollte das Assembly von AR, AATF, ZIPK und TSG101 an Promotor- und Enhancerbereiche verschiedener Zielgene des AR auf seine zeitliche Abfolge und gegenseitige Abhängigkeit untersucht werden. Dabei galt dem Mechanismus, der dem Koaktivatorpotential der ZIPK zugrunde liegt, sowie dem Zusammenspiel der Koaktivatoren untereinander das Hauptinteresse.

Zunächst konnte der koaktivierende Effekt von ZIPK, AATF und TSG101 für die humanen Orthologen bestätigt und von ektopisch exprimierten Reportergenkonstrukten auf endogene AR-Zielgene ausgedehnt werden. Für ZIPK, AATF und TSG101 sowie Par-4 und Blos2 konnte eine Assoziation mit regulatorischen Bereichen von Zielgenen des AR nachgewiesen werden. Das Assembly der Koaktivatoren und des AR erfolgte dynamisch in einer zyklischen Abfolge. Dabei konnte eine Rekrutierungsfunktion von AATF für TSG101 und eine Anlagerung von ZIPK über AATF oder direkt über den AR nachgewiesen werden, wobei alle vier Proteine in einem gemeinsamen Komplex gebunden vorliegen. Für die ZIPK wurde die essentielle Rolle der Kinaseaktivität für ihr Koaktivatorpotential bestätigt. Die *in vitro* von der ZIPK durchgeführte H3T11-Phosphorylierung, welche bisher als Mitose- und Centromer-spezifisch galt (Preuss *et al.*, 2003b), konnte nach Androgenstimulation an Androgen-Response-Elementen als neue Histonmodifikation identifiziert, allerdings nicht der ZIPK zugeordnet werden. Interessanterweise führte eine Reduktion der ZIPK-Expression einerseits zu einer Reduktion der AR-vermittelten Transkription, andererseits zu einer Akkumulation des AR am Response-Element. Bei der Untersuchung einer Verbindung zum proteasomalen Abbau, konnte eine Beteiligung der ZIPK an der Regulation der Ubiquitinierung des AR nachgewiesen werden.

## 5.1 Koaktivierende Eigenschaften der humanen ZIPK

Bisherige Befunde unserer Arbeitsgruppe zur Rolle der ZIPK in der AR-abhängigen Transkription basierten auf der ektopischen Expression von ZIPK aus der Ratte (Leister *et al.*, 2008). Obwohl die ZIPK ein hochkonserviertes Protein darstellt, fanden sich in phylogenetischen Studien für die murinen Orthologen höhere Divergenzen als evolutionär zu erwarten war. Diese führen zu Unterschieden in der subzellulären Lokalisation und unter den Interaktionspartnern zwischen ZIPK und Dlk (Shoval *et al.*, 2007). Die Dlk ist ein kernständiges Protein, demgegenüber weist die ZIPK eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation mit einer Subpopulation an Zellen auf, die eine diffuse Kernlokalisierung zeigen (MacDonald *et al.*, 2001b; Brinckmann, Diplomarbeit 2007).

Es stellte sich somit die Frage, ob aufgrund der vorhandenen Unterschiede die koaktivierende Funktion der Dlk auf das humane Ortholog übertragbar ist. Es zeigte sich, dass sich die ZIPK in allen untersuchten Aspekten (Rezeptor-, Hormon- und Kinaseabhängigkeit) und in verschiedenen Zelllinien wie das Ortholog der Ratte verhielt, auch was das Maß der Koaktivierung anging.

Der virale MMTV-Promotor stellt ein gängiges Modellsystem für die Untersuchung der Steroidhormonrezeptor-abhängigen Transkription dar, da er Response-Elemente für den GR und AR enthält und auch durch den PR aktiviert werden kann. Gleichzeitig enthält er Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF-1, Oct1 und den TATA-Box-Bindefaktor (Archer *et al.*, 1995). Um die im artifiziellen Modellsystem erzielten Ergebnisse als direkten Effekt auf die AR-vermittelte Transkription zu belegen, wurden regulatorische Bereiche der AR-Zielgene PSA, p21, KLK2 und TMPRSS2 zunächst als Reportergenkonstrukte eingesetzt. Eine Steigerung der Luciferaseaktivität durch die ZIPK war an den Promotoren von PSA-, p21- und KLK2-Konstrukten messbar. Interessanterweise konnte am TMPRSS2-Enhancerkonstrukt kein Effekt der ZIPK gemessen werden. Damit deutete sich eine Zielgenspezifität für die Koaktivatorfunktion der ZIPK an. Dieser Aspekt wird unter 5.3 diskutiert, da die ZIPK auch auf die Expression der endogenen TMPRSS2-mRNA keinen Einfluss hatte.

Zu beachten bleibt, dass die Transkription von Reportergenkonstrukten von den *in vivo* Bedingungen der im Chromatin eingebundenen regulatorischen Regionen der Zielgene abweicht. So fehlt z.B. die Kommunikation von Enhancer- und Promotorelementen, da meistens nur eines der Elemente in den Vektor kloniert ist, oder es fehlen zusätzliche Bindestellen weiterer spezifischer Transkriptionsfaktoren, die am Aufbau des Transkriptionsinitiationskomplexes *in vivo* beteiligt sein können. Daneben erfolgt zwar ein Einbau von Nukleosomen in Reportergenplasmide, inwieweit Chromatinremodelling und Histonmodifikationen sowie die Lage der regulatorischen Bereiche dabei den Bedingungen der chromosomalen Zielgene entsprechen bleibt offen. Dennoch sind Reportergenkonstrukte wertvolle Systeme, um das Zusammenspiel verschiedener Faktoren zu untersuchen. Durch

den Einsatz von regulatorischen Bereichen spezifischer AR-Zielgene liegt eine Beteiligung der ZIPK an der Transkriptionsregulation dieser endogenen Zielgene nahe.

### 5.1.1 Die ZIPK zeigt eine partielle Kolokalisation mit aktiviertem AR

Die Funktion als Koaktivator setzt für die überwiegend cytoplasmatisch lokalisierte ZIPK eine Rekrutierung in den Kern an die Response-Elemente der Zielgene des AR voraus. Immunfluoreszenzanalysen zeigten für eine Subpopulation von 30 bis 40 % der Zellen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Kernlokalisation. Dieser Anteil änderte sich nicht nach Hormonstimulation. Möglicherweise erfolgt die Rekrutierung der ZIPK ans Chromatin aus dem Anteil kernständiger ZIPK. Die unterschiedliche Lokalisation der ZIPK könnte Ausdruck für „shuttelnde“ ZIPK sein, die abhängig von der Aktivierung des AR (oder anderer TF) an die Response-Elemente rekrutiert wird. Aktiv „shuttelnde“ ZIPK, könnte je nach Zellzyklusphase oder physiologischem Zustand der Zelle in ihrer Lokalisation variieren. Dies erscheint besonders im Hinblick auf die Funktion der ZIPK als Koaktivator interessant, da eine Subpopulation an kernständiger ZIPK eine schnelle Transkriptionsinitiation und damit Reaktion auf sich ändernde physiologische Bedingungen ermöglicht.

Das „Shutteln“ könnte z.B. durch Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklen reguliert werden. Hier bietet sich die T299-Phosphorylierung an, die die Cytoplasma-/Kernverteilung beeinflusst (Graves *et al.*, 2005). Alternativ vorstellbar ist ein Kotransport mit einem anderen Protein. Als Kandidaten kommen die Steroidhormonrezeptor-Koaktivatoren SRC1 und SRC3 in Frage, die in dieser Arbeit als neue Interaktionspartner der ZIPK identifiziert wurden. Sie bieten aufgrund der für sie nachgewiesenen „shuttelnden“ Subpopulation einen möglichen Ansatzpunkt für die Rekrutierung der ZIPK in den Kern. Es wurde gezeigt, dass eine Subpopulation von SRC3 zwischen Kern und Cytoplasma „shuttelt“, um dort eine transiente Interaktion mit einem cytoplasmatischen Protein einzugehen (Amazit *et al.*, 2007). Amazit *et al.* (2007) postulieren weiter, dass wenn die Interaktion von SRC3 mit dem cytoplasmatischen Protein stark genug ist, SRC3 mit dem assoziierten Protein in den Kern zurückkehren sollte. So konnten sie für eine Mutante des ER ohne Kernlokalisationssequenz die Rekrutierung durch SRC3 in den Kern nachweisen.

Unabhängig von dem Ablauf der Rekrutierung in den Kern sollte es zu einer Assoziation der ZIPK mit dem AR an Response-Elementen von AR-Zielgenen kommen. Die regulatorische Region des PSA-Gens weist z.B. drei Androgen-Response-Elemente auf (Cleutjens *et al.*, 1996 und 1997). Ein Nachweis der an einzelne Zielgenbereiche gebundenen AR-Dimere und von kolokalisierenden Proteinen ist aufgrund fehlender Auflösung mittels Immunfluoreszenz nicht möglich. Es konnte aber beobachtet werden, dass der AR nach Hormonstimulation im Zellkern in „Speckles“ angereichert vorliegt. Es wird spekuliert, dass diese punktuellen Anreicherungen Zentren aktiver Transkription sog. „transcription factories“ darstellen, in

denen es möglicherweise zu einer Zusammenlagerung mehrerer aktiv transkribierter Zielgene und der sie regulierenden Faktoren kommt (Sutherland und Bickmore, 2009). Es konnte allerdings nur für einen geringen Teil der „Speckles“ eine Kolo­kalisierung mit inkorporiertem BrUTP (5-Bromouridin-5'-triphosphat) nachgewiesen werden, welches naszierende mRNA markierte. Daher wird angenommen, dass ein Teil der „Speckles“ Lagerplätze darstellt, über die der Rezeptor durch Entlanggleiten am Chromatin zu seinen Response-Elementen gelangt (Van Royen *et al.*, 2007). Mittels Immunfluoreszenzanalysen nach Koexpression von AR und den ZIPK-Orthologen wurde eine partielle Kolo­kalisierung von aktiviertem AR und ZIPK bzw. Dlk im Kern beobachtet. Interessanterweise zeigte die kernständig lokalisierte, „Speckles“ ausbildende Dlk dabei keine stärkere Kolo­kalisierung mit den punktförmigen Anreicherungen des AR als die ZIPK. Somit konnte zum einen die für einen Koaktivator essentielle Kernlokalisation und zum anderen eine partielle Kolo­kalisierung mit den punktförmigen Anreicherungen des AR für die ZIPK gezeigt werden.

### **5.1.2 Die ZIPK wirkt auch auf andere Transkriptionsfaktoren koaktivierend**

Mittels Reporter­genstudien konnte der koaktivierende Effekt der humanen ZIPK auf weitere Steroidhormonrezeptoren und die p53-abhängige Transkription ausgedehnt werden. Dies klassifiziert die ZIPK als einen generelleren Koaktivator, dessen Wirkung nicht auf die Klasse der Steroidhormonrezeptoren beschränkt ist. Interessanterweise konnte innerhalb der Steroidhormonrezeptoren jedoch eine gewisse Spezifität der ZIPK beobachtet werden. So wirkte sie aktivierend auf die AR- und GR-vermittelte Transkription, zeigte aber keinen Effekt auf die ER- und PR-abhängige Transkription. Dass Kinasen innerhalb einer Klasse von TF eine Selektivität aufweisen ist bereits für andere Kinasen wie die PRK1 beschrieben. Diese wirkt koaktivierend auf den AR, MR und PR aber nicht auf den GR (Metzger *et al.*, 2003). Da jedoch innerhalb der analysierten Zielgene des AR bereits eine gewisse Spezifität der ZIPK auftrat (TMPRSS2-Luc wurde nicht beeinflusst), könnte es sein, dass mit den PR- oder ER-abhängigen Reporter­genen gerade solche analysiert wurden, die nicht koaktiviert werden. Hier sollten also weitere Zielgene untersucht werden, um zu klären, ob die Selektivität vom TF oder vom Zielgen abhängt. Ausschlaggebend war jedoch die Übertragbarkeit der Daten der Dlk auf das humane Ortholog und die Ausdehnung der Ergebnisse innerhalb der Steroidhormonrezeptoren.

Der TF p53 wurde in die Analysen miteinbezogen, da bereits ein Effekt der ZIPK-Interaktionspartner AATF und Blos2 auf die p53-abhängige Transkription des Mdm2-Promotors nachgewiesen werden konnte (Felten, Diplomarbeit 2006; Felten *et al.*, 2007). Außerdem wurde am p21-Reporter­genkonstrukt ein aktivierender Effekt der ZIPK auf die Ansätze ohne Hormonstimulation und ohne den AR als Aktivator beobachtet. Der vom AR unabhängige Effekt der ZIPK kann auf einer Aktivierung des p21-Promotors durch

endogenes p53 beruhen. Dieser weist neben dem Response-Element für den AR auch Bindestellen für p53 auf, so dass ein koaktivierender Effekt der ZIPK auf die p53-abhängige Transkription messbar wird. Mittels des p53-responsiven Mdm2-Promotors konnte eine Koaktivatorfunktion der ZIPK auf die p53-abhängige Transkription bestätigt werden. Der direkte Vergleich der ZIPK-Orthologen ergab eine annähernd gleiche Steigerung der p53-abhängigen Transkription, abhängig von der Kinaseaktivität.

Das p21-Gen ist in Bezug zur koaktivierenden Aktivität der ZIPK besonders interessant. Neben p53 und dem AR wird es auch durch STAT3 reguliert (Tang *et al.*, 2009; Hawthorne *et al.*, 2009; Barré *et al.*, 2003). STAT3 wird wiederum durch die ZIPK phosphoryliert und dadurch in seiner Aktivität reguliert (Sato *et al.*, 2005). Zusätzlich kann auch das p21-Protein von der ZIPK phosphoryliert werden, was in dessen Stabilisierung resultiert (Burch *et al.*, 2004).

Es ist zu erwarten, dass die ZIPK an weiteren Transkriptionsprozessen beteiligt ist. So stellt unter anderem die Interaktion der ZIPK mit den SRCs eine Verbindung zu weiteren TF her, da diese neben den Steroidhormonrezeptoren auch eine koaktivierende Wirkung auf STATs, E2F1, Ets und NF- $\kappa$ B ausüben (Arimura *et al.*, 2004; Louie *et al.*, 2004; Goel *et al.*, 2004; Werbajh *et al.*, 2000).

## **5.2 Kooperation von ZIPK mit AATF, Par-4 und TSG101 in der AR-abhängigen Transkription**

Die murinen Orthologen AATF und Par-4 sind als Interaktionspartner der Dlk beschrieben, außerdem interagieren Par-4 und TSG101 mit AATF (Page *et al.*, 1999b; Guo und Xie, 2004; Burgdorf *et al.*, 2004). Für alle vier Proteine war eine koaktivierende Funktion in der AR-abhängigen Reporterexpression nachgewiesen (Leister *et al.*, 2008 und 2003; Gao *et al.*, 2006; Burgdorf *et al.*, 2004), dabei konnte bei Koexpression von Dlk und AATF, sowie von AATF und TSG101 eine funktionelle Kooperation beobachtet werden. Der koaktivierende Einfluss und die beschriebenen funktionellen Kooperationen konnten in dieser Arbeit für die humanen Orthologen bestätigt werden.

### **Kooperation von ZIPK, AATF und Par-4**

Da AATF als Gegenspieler bei der durch Par-4 und Dlk vermittelten Apoptose auftritt (Page *et al.*, 1999b), sollte ein möglicher Antagonismus zwischen dem pro-apoptotischen Protein Par-4 und dem anti-apoptotischen AATF untersucht werden. Die Koexpression von AATF und Par-4 resultierte jedoch in einer mehr als additiven Steigerung der AR-abhängigen Transkription. Interessanterweise führte die Koexpression von ZIPK und Par-4 dagegen zu einer verminderten Transkription, die zwischen den Werten der Einzelaktivitäten lag.

In der Literatur finden sich für Par-4 neben seiner koaktivierenden Wirkung auf die AR-abhängige Transkription des c-FLIP-Promotors und damit eines anti-apoptotischen Gens auch eine koaktivierende Wirkung auf den MMTV-Promotor und PSA-Enhancer (Gao *et al.*, 2006). Guo und Xie (2004) spekulieren, dass das pro-apoptotische Potential von Par-4 durch seine Interaktion mit AATF reguliert werden kann. Interessanterweise zeigt auch AATF selbst einen Antagonismus zwischen anti- und pro-apoptotischen Transkriptionsprozessen. AATF unterläuft bei DNA-Schäden einen Wechsel vom wachstumsfördernden, die E2F-abhängige Transkription aktivierenden Faktor in einen Zellzyklusinhibitor, dadurch dass es an die Promotoren von p53 und p21 rekrutiert wird (Bruno *et al.*, 2002 und 2006). Die Hyperphosphorylierung von AATF moduliert dabei unter anderem die Interaktion mit der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 und damit die Bindung an den p53-Promotor. Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob die Interaktion von AATF und Par-4 unter apoptotischen Bedingungen durch Phosphorylierung von AATF oder Par-4 moduliert wird. Denkbar wäre, dass AATF eine funktionelle Einheit mit Par-4 darstellt und Par-4 je nach physiologischen Bedingungen entweder an anti-apoptotische, wachstumsfördernde Zielgene z.B. des AR oder von E2F (was noch zu untersuchen wäre) und erst nach Apoptoseauslösung an pro-apoptotische Gene rekrutiert wird. Inwieweit die ZIPK, möglicherweise über eine Phosphorylierung von Par-4 an Threonin 155 (Boosen, Dissertation 2007; Boosen *et al.*, 2009), dessen Interaktion mit AATF oder anderen TF moduliert bliebe zu untersuchen.

### **Kooperation von ZIPK, AATF, TSG101**

Die für die Interaktion des AR mit AATF und TSG101 postulierte Modellvorstellung sieht eine Funktion der inaktiven Ubiquitin-Konjugase TSG101 in der Stabilisierung des monoubiquitinierten, vermutlich aktiven Zustands des AR vor (Burgdorf *et al.*, 2004). Aufgrund der parallel vorliegenden funktionellen Interaktion von AATF und ZIPK stellte sich die Frage, ob es eine Beziehung zwischen ZIPK und TSG101 gibt. Dazu wurde zunächst eine mögliche Interaktion und Phosphorylierung von TSG101 durch die ZIPK untersucht, beides mit negativem Ergebnis (Felten, unveröffentlicht). In Reporterstudien führte die Koexpression von TSG101 mit der ZIPK zu einem Wert, der etwas unter der Summe der Einzelaktivitäten lag. Überraschenderweise bewirkte die Koexpression von TSG101 mit der kinaseinaktiven ZIPK dagegen eine deutliche Steigerung der AR-abhängigen Transkription. Vorstellbar wäre, dass die ZIPK die Interaktion von TSG101 mit AATF *in vivo* durch Phosphorylierung moduliert und dadurch ein Abdissoziieren von TSG101 bewirkt, welches wiederum zur Polyubiquitinierung des Rezeptors führen würde. Dies würde zu einem ständigen Auf- und Abbau des Transkriptionsinitiationskomplexes führen und damit das System in einem dynamischen Zustand halten. Demgegenüber könnte die kinaseinaktive ZIPK den Komplex aus AATF und TSG101 und damit den schützenden Effekt von TSG101 auf die aktive Form des Rezeptors

vorübergehend stabilisieren, was zumindest im Reportergensystem in einer stärkeren Transaktivierung der AR-abhängigen Transkription resultiert. Da nachfolgende Versuche für die Reportergenkonstrukte eine dynamische Assoziation des AR andeuteten, wird die Funktion der ZIPK wahrscheinlich von der endogenen ZIPK oder einer anderen Kinase kompensiert. Dies würde auch erklären, weshalb die kinaseinaktive ZIPK keinen (reprimierenden) Effekt auf die Transkription aufweist.

### **5.3 Signifikanz der endogenen Koaktivatoren für die AR-abhängige Transkription**

Um die Beteiligung der endogenen Koaktivatorproteine an der AR-abhängigen Transkription zu untersuchen und ihre Relevanz zu ermitteln, wurden die Koaktivatoren mittels siRNA herunterreguliert. Der Effekt der Depletion auf die AR-abhängige Transkription wurde zunächst anhand von Reportergenkonstrukten und anschließend an endogenen Zielgenen des AR analysiert.

Die Reduktion der ZIPK verminderte die Reportergenexpression auf 49 % und lag damit im Bereich der veröffentlichten Daten (Leister *et al.*, 2008). Ebenso führte die Herunterregulation von AATF und TSG101 zu einer Reduktion der Transkription auf 60 bzw. 40 %. Die Restaktivität beruht zum einen darauf, dass keine 100 % Reduktion der Proteine mittels siRNA erzielt werden kann und zum anderen auf der Tatsache, dass ein Koaktivator die Transkription verstärkt, diese aber nicht nur von ihm abhängt, so dass sich auch bei Fehlen eines Faktors ein funktioneller Transkriptionsinitiationskomplex ausbilden kann. Das Assembly des Komplexes und seine Effizienz bzgl. der Initiationsraten werden dabei durch die fehlende Funktion von ZIPK, AATF bzw. TSG101 herabgesetzt.

Aufgrund des Nachweises, dass endogene Proteine einen signifikanten Beitrag an der Transkription von Reportergenen leisten, müssen die bei ektopischer Expression eines bestimmten Faktors ermittelten Werte immer im Kontext des zellulär vorhandenen Kofaktorbestandes betrachtet werden und sollten daher in verschiedenen Zelllinien reproduziert werden.

Um die Relevanz von ZIPK, AATF, TSG101 und Par-4 als Koaktivatoren des AR zu erhärten, erfolgte der Nachweis der Beteiligung an der Transkription endogener Zielgene des AR durch Quantifizierung der transkribierten PSA-, KLK2- und TMPRSS2-mRNA nach Herunterregulation der einzelnen Faktoren. Eine Beteiligung von AATF, TSG101 und Par-4 an der AR-abhängigen Transkription konnte für alle drei Gene bestätigt werden. Die Reduktion der ZIPK führte zu einer verminderten Expression der PSA- und KLK2-mRNA, das TMPRSS2-Gen blieb dagegen unbeeinflusst. Damit korrelieren die Daten der mRNA-Expressionsanalysen mit den Ergebnissen der Reportergenstudien. Da es sich bei PSA

(auch KLK3) und KLK2 um Gene einer Familie handelt, die in annähernd gleichem Ausmaß von allen Faktoren beeinflusst wurden, deutet sich an, dass Gene einer Familie von gleichen Faktoren reguliert werden.

Für das TMPRSS2-Gen stellte sich die Frage, weshalb es nicht durch die ZIPK koaktiviert wird. Im Gegensatz zu den kanonischen ARE (AGAACAnnnTGTTCT, palindromisch mit einem 3 nt umfassenden „Spacer“) des PSA-Gens (Cleutjens *et al.*, 1996 und 1997) weist der Enhancer des TMPRSS2-Gens ein „untypisches“ nicht kanonisches ARE (AGGACAnnnnnnnnTGTTGT) mit einem 8 nt „Spacer“ auf (Wang *et al.*, 2007; Denayer *et al.*, 2010). Dies könnte dazu führen, dass der AR nicht mehr als Homodimer, sondern als Heterodimer mit einem anderen TF an das ARE bindet und dadurch durch ein anderes Kofaktorrepertoire in seiner Aktivität moduliert wird. Ein Beispiel für einen Zielgenspezifischen Koaktivator des AR ist die E3-Ligase RNF6. Sie wird an die ARE der AR-Zielgene RLN1, BMF und PSA (ARE III), aber nicht von TMPRSS2 oder PSA (ARE I/II) rekrutiert. Durch die von ihr durchgeführte Ubiquitinierung des AR reguliert sie die Rekrutierung weiterer Koaktivatoren in den Transkriptionsinitiationskomplex (Xu *et al.*, 2009). Dies könnte bedeuten, dass möglicherweise das Substrat über das die ZIPK ihren koaktivierenden Effekt ausübt nicht im Transkriptionsinitiationskomplex am TMPRSS2-Gen vorhanden ist. Inwieweit dies durch das „untypische“ ARE oder aber das Fehlen weiterer *cis*-Elemente moduliert wird bleibt offen.

#### **5.4 Dynamik der Assoziation des AR und der Koaktivatoren ZIPK, AATF und TSG101 mit regulatorischen Bereichen von AR-Zielgenen**

Die bereits beschriebene Assoziation von AATF und ZIPK mit Enhancer- und Promotorbereichen des PSA-Gens nach einem Induktionszeitraum von 45 und 90 min (Leister *et al.*, 2008) wurde in dieser Arbeit in ihrer zeitlichen Abfolge genauer analysiert und auf regulatorische Bereiche des KLK2-Promotors und TMPRSS2-Enhancers ausgedehnt. Außerdem konnte die für den PSA-Enhancer beobachtete Assoziation von Par-4 (Gao *et al.*, 2006) auf den PSA-Promotor erweitert werden. Für die AR-Koaktivatoren TSG101 und Blos2, welche ursprünglich als Interaktionspartner von AATF identifiziert wurden (Burgdorf *et al.*, 2004), konnte erstmals eine Rekrutierung an regulatorische Bereiche AR-abhängiger Zielgene nachgewiesen werden. Aufgrund der in unserer Arbeitsgruppe gefundenen Zusammenhänge zwischen ZIPK und AATF, sowie AATF und TSG101 wurde der Fokus auf das Rekrutierungsverhalten dieser Koaktivatoren gelegt.

In der Literatur werden zur Assoziation des AR an die ARE seiner Zielgene unterschiedliche Befunde beschrieben. In einer Studie wurde gezeigt, dass der AR über einen Zeitraum von

16 h an den Response-Elementen akkumuliert bevor er dann unter anhaltendem Hormonstimulus langsam wieder abgebaut wird (Wang *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu konnte in mehreren Studien ein dynamischeres Anlagerungsverhalten beobachtet werden, bei dem sich der AR, ähnlich wie es für den ER beschrieben ist, in Zyklen anlagert und wieder abdissoziiert (Kang *et al.*, 2002; Welsbie *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2000).

In ersten ChIP-Analysen mit nur grobem Zeitraster fielen immer wieder „Schwankungen“ in der Assoziation des AR und der Koaktivatoren an die Response-Elemente auf. Eingehende Analysen mit 15 min Induktionsintervallen über die ersten drei Stunden zeigten sowohl für den AR als auch ZIPK, AATF und TSG101 ein zyklisches Rekrutierungsverhalten an allen untersuchten regulatorischen Bereichen. Für den PSA-Enhancer konnte der erste Zyklus des AR auf die ersten 90 min und für den PSA-Promotor ein erster Zyklus innerhalb der ersten 30 min und ein zweiter auf die Zeit zwischen 60 und 150 min nach Androgenstimulation eingegrenzt werden. Der zweite Zyklus des AR fiel an Enhancer und Promotor jeweils durch eine deutlich stärkere Assoziation des Rezeptors auf. Damit korreliert die gefundene dynamische Assoziation mit Daten aus der Literatur: Für den AR wurde eine Zykluslänge von 80 bis 90 min beschrieben (Kang *et al.*, 2002; Welsbie *et al.*, 2009). Demgegenüber liegt die Assoziationskinetik des ER bei 40 bis 60 min (Shang *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2003).

Der am PSA-Promotor beobachtete erste verkürzte Zyklus des AR stimmt mit dem für den ER beschriebenen ersten verkürzten Zyklus in den ersten 30 min nach Hormonstimulation am pS2-Promotor überein (Métivier *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass der verkürzte Zyklus der Rekrutierung von Chromatinremodelling-Komplexen und damit der Vorbereitung des Promotors für die Transkription dient (Reid *et al.*, 2003). Die initiale Auflockerung der Chromatinstruktur während des ersten Zyklus führt dazu, dass im nachfolgenden Anlagerungszyklus ein optimaler Zugang zu den ARE und damit ein stärkerer Besatz erfolgen kann. Dieser wird durch die ebenfalls zyklisch erfolgenden Histonmodifikationen (Shang *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002) aufrechterhalten.

Da neben dem AR bereits für den ER, Thyroidhormonrezeptor (TR) und Vitamin-D-Rezeptor (VDR) ein zyklisches Rekrutierungsverhalten beschrieben ist (Kang *et al.*, 2002; Shang *et al.*, 2000; Sharma und Fondell, 2002; Vaisanen *et al.*, 2005), scheint dies zumindest unter den Liganden-gesteuerten Nuklearrezeptoren ein generelles Phänomen darzustellen. Es wird davon ausgegangen, dass die Zelle schnell auf Veränderungen des Hormonstatus reagieren kann, indem sie die Transkription nach einem Transkriptionszyklus weiterhin aktivieren oder aber reprimieren kann.

Die Rekrutierung der Koaktivatoren AATF, ZIPK und TSG101 an PSA-Enhancer und Promotor erfolgte nach 15 min zunächst abhängig vom AR, zeigte dann aber ein vom AR-Zyklus abweichendes Verhalten. Im Gegensatz zum AR wiesen die Koaktivatoren ein dynamischeres Assoziations- und Dissoziationsverhalten auf, welches für die einzelnen

Koaktivatoren unterschiedlich ausfiel. Auffällig in der Assoziationsdynamik von AATF und TSG101 war ihre Abwesenheit nach 90 min Hormonstimulation am PSA-Enhancer, die mit dem Ende des ersten Anlagerungszyklus des AR korreliert. Generell spricht die Assoziationsdynamik der Koaktivatoren dafür, dass sie u.a. durch Ausbildung von Bindestellen, Rezeptor-, Koaktivator- oder Chromatinmodifikationen die Voraussetzungen für das zyklische Verhalten des AR schaffen. Wahrscheinlich werden sie in einer definierten Reihenfolge für die im Verlaufe eines Transkriptionszyklus auftretenden posttranslationalen Modifikationen des AR rekrutiert, die ihn vom transkriptionsaktiven Zustand in einen inkompetenten zum Abbau markierten Zustand überführen und werden selbst auch durch Modifikationen zum Abdissoziieren oder Abbau markiert. In der Literatur finden sich Studien, die besagen, dass selbst kürzere Induktionszeiträume von 10 min nicht ausreichend sind, um die tatsächliche Dynamik des Assemblys und Disassemblys von Kofaktoren aufzulösen. So waren für den ER 5 min Intervalle notwendig, um die zyklische Rekrutierung aussagekräftig zu belegen (Reid *et al.*, 2003).

Die Assoziation von AR und Koaktivatoren an den KLK2-Promotor und TMPRSS2-Enhancer wies Unterschiede zum PSA-Gen auf. Beim KLK2-Promotor erfolgte die Assoziation des AR und der Koaktivatoren nach Androgenstimulation nach dem gleichen Muster aber deutlich schwächer, beim TMPRSS2-Enhancer zeigten sich Abweichungen in der Rekrutierung der Koaktivatoren. Die schwächere Assoziation an den KLK2-Promotor beruht möglicherweise auf Unterschieden in der Affinität des AR zu dem jeweiligen ARE und verursacht dadurch eine schwächere Aktivierung. Daneben können zusätzliche Bindestellen für weitere spezifische TF oder Abweichungen zum kanonischen ARE, wie es beim TMPRSS2-Enhancer der Fall ist, zu Unterschieden im Proteinbesatz und damit in der Regulation des sich aufbauenden Transkriptionskomplexes führen.

## **5.5 Das zyklische Verhalten des AR beruht auf dessen Abbau nach einem Transkriptionszyklus**

Um zu analysieren wie das zyklische Anlagerungsverhalten des AR zustande kommt, wurden ChIP-Analysen nach Vorbehandlung mit Proteasomen- oder Transkriptioninhibitor durchgeführt. Durch Inhibition des Proteasoms und damit des proteasomalen Abbaus sollte geklärt werden, ob das zyklische Verhalten des AR auf Dissoziation oder Abbau beruht. Die Inhibition der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Pol II, die in einer Transkriptioninhibition resultiert, sollte zeigen inwieweit das zyklische Verhalten von erfolgreicher Transkription abhängt.

Die Inhibition des proteasomalen Abbaus durch MG132 führte in Reportergerätenversuchen zu einer vollständigen Inhibition der AR-abhängigen Transkription und in ChIP-Analysen zu

einer deutlichen Akkumulation des AR sowohl am Enhancer als auch Promotor des PSA-Gens. Der akkumulierte AR wirkte also nicht zusätzlich aktivitätssteigernd, im Gegenteil er wirkte sogar reprimierend auf die Transkription. Daraus lässt sich schließen, dass der an den ARE gebundene AR nur ein bis wenige Transkriptionsrunden einleiten kann und er danach inaktiv ist und abgebaut werden muss, um neue Transkriptionsinitiationen zuzulassen. Da MG132 den Abbau, aber nicht die Rekrutierung des Rezeptors inhibiert (Kang *et al.*, 2002), erfolgt die weitere Akkumulation des AR vermutlich solange, bis alle Response-Elemente besetzt sind. Dies würde erklären, warum nach 120 min Androgenstimulation eine weitere Zunahme an assoziiertem AR detektiert wurde. Andererseits fiel auf, dass die Koaktivatoren deutlich schwächer rekrutiert wurden. Kang *et al.* (2002) erklären dies damit, dass MG132 die Verbindungen zwischen dem Holo-AR und dem RNA-Pol II-Transkriptionskomplex unterbricht, was die zyklische und geordnete Anlagerung der Koaktivatoren beeinträchtigt. Vorstellbar ist außerdem, dass posttranslationale Modifikationen, die den AR zum Abbau markieren, Bindestellen von Koaktivatoren so verändern, dass diese nicht mehr an den AR binden können und damit kein neuer Transkriptionskomplex mehr aufgebaut werden kann. Möglicherweise muss aber auch aufgrund der zeitlich versetzten transienten Rekrutierung der Koaktivatoren erst der Abbau von Kofaktor „eins“ erfolgen, damit Kofaktor „zwei“ binden kann, was wiederum durch MG132 verhindert würde.

Die effiziente Transkription beruht also auf dem zyklischen Verhalten des AR und dieses hängt von dessen Abbau ab. Dementsprechend konnte eine Rekrutierung der 19S-Untereinheit des Proteasoms an den PSA-Promotor (Kang *et al.*, 2002) und von diversen E3-Ligasen wie z.B. Mdm2 und RNF6 (Lin *et al.*, 2002; Gaughan *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009) an regulatorische Bereiche des PSA-Gens beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass der Rezeptor bereits am Response-Element zum Abbau markiert wird und auch bereits *in situ* abgebaut werden könnte.

In den durchgeführten Versuchen mit dem Transkriptionsinhibitor DRB konnte eine vollständige Inhibition der Reporterexpression, sowie eine Akkumulation sowohl von AR als auch RNA-Pol II am PSA-Promotor festgestellt werden. Die ausbleibende Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Pol II verhindert den Übergang in die Elongation und damit auch den Abbau des Transkriptionsinitiationskomplexes. Dies bedeutet, dass der Abbau des AR von erfolgter Transkription und damit von einem Ereignis abhängt, das mit dem Transkriptionsstart zusammenhängt.

Für die ER-vermittelte Transkription konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Inhibition der Phosphorylierung der CTD der RNA-Pol II das zyklische Verhalten unterbricht (Shang *et al.*, 2000). Kang *et al.* (2002) spekulieren, dass die Inhibition von CDK7 durch DRB (Yankulov *et al.*, 1995) auch Auswirkungen auf den Abbau des ER hat, da CDK7 neben der CTD auch direkt den ER phosphorylieren kann (Chen *et al.*, 2000), was

möglicherweise eine Markierung für die Ubiquitinierung und den Abbau des ER darstellt. Reid *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Inhibition der Transkription durch  $\alpha$ -Amanitin zu einer Inhibition der Ubiquitinierung des ER führte und dadurch dessen Abbau verhindert wurde (Reidt *et al.*, 2003). Somit ist die erfolgende Transkription eine Voraussetzung für nachfolgende Abbauprozesse und diese sind wiederum Voraussetzung für eine erneute effiziente Transkriptionsinitiation. Anhand der ermittelten Daten lässt sich dieses Modell auf die zyklische Rekrutierung des AR übertragen.

## **5.6 Gegenseitige Abhängigkeiten im Assembly zwischen ZIPK, AATF, TSG101 und dem AR**

Eine funktionelle Kooperation in der AR-abhängigen Transkription setzt eine Assoziation von AATF, ZIPK und TSG101 im selben Transkriptionskomplex voraus. Mittels sequentieller ChIP-Analysen konnte der Nachweis erbracht werden, dass der AR zusammen mit AATF, ZIPK und TSG101 in einem gemeinsamen Transkriptionskomplex gebunden vorliegt. Bei den sequentiellen ChIP-Analysen gegen den AR wurden die Fixierungszeiten so gewählt, dass sie das zyklische Verhalten des AR abbilden. Interessanterweise konnten bei 45 min Induktion alle Proteine im Komplex detektiert werden, dagegen zeigte sich am Ende des AR-Zyklus bei 90 min ein deutlicher Rückgang der Bindung von AATF und vor allem von TSG101. Dies passt zur Modellvorstellung, dass TSG101 den AR in einem aktiven Zustand stabilisiert und dadurch vor dem proteasomalen Abbau schützt: die Dissoziation von TSG101 würde den Rezeptor zum Abbau freigeben. Demgegenüber war die ZIPK stärker mit dem AR assoziiert. Dies korreliert mit der in weiteren Versuchen gefundenen Beteiligung der ZIPK an der Polyubiquitinierung und damit dem Abbau des Rezeptors (siehe 5.8). Entsprechend ließ sich in der sequentiellen ChIP mit der ersten IP gegen AATF, kurz vor dem stattfindenden Abbau des AR, über AATF deutlich mehr ZIPK als TSG101 präzipitieren.

Mittels siRNA-basiertem Knockdown von AATF oder ZIPK sollte eine mögliche Abhängigkeit der Koaktivatoren im Assembly und ein Einfluss auf die Anlagerung oder den Abbau des AR an regulatorischen Genbereichen untersucht werden.

Die Herunterregulation von AATF führte zu einer leicht verminderten Assoziation von AR und ZIPK am Enhancer und Promotor des PSA-Gens. TSG101 wurde am Enhancer nicht mehr und am Promotor nur noch schwach rekrutiert. Dies bestätigt zum einen die für AATF postulierte Targetingfunktion für TSG101 (Burgdorf *et al.*, 2004), zum anderen lassen sich die reduzierten AR-Level durch fehlendes TSG101 erklären. Da der monoubiquitinierte AR nicht mehr durch TSG101 stabilisiert wird, erfolgt ein schnellerer „Turnover“. Denkbar bleibt außerdem aufgrund der für AATF beschriebenen Interaktion mit der RNA-Pol II (Fanciulli *et al.*, 2000) eine Funktion als Mediator Komponente, wodurch AATF stabilisierend auf den AR-

Transkriptionskomplex wirken könnte. Der geringe Effekt auf die Rekrutierung der ZIPK beruht darauf, dass die Interaktion zwischen ZIPK und AR zwar durch ektopisches AATF verstärkt wird, aber auch nach Herunterregulation von AATF in abgeschwächter Form erfolgt (Leister *et al.*, 2008). Die Kartierung der Interaktionsdomäne ergab, dass die ZIPK über die AS 275-333 direkt mit dem AR interagiert und über ihren Leucin-Zipper möglicherweise eine indirekte Interaktion über AATF mit dem AR eingeht (Leister *et al.*, 2008). Die Annahme einer direkten und einer indirekten Interaktion der ZIPK mit dem AR wird durch die Ergebnisse der ChIP gestützt, da die ZIPK auch nach Herunterregulation von AATF in den AR-Transkriptionsinitiationskomplex rekrutiert wurde.

Die Herunterregulation der ZIPK führte zu einer Aufhebung des zyklischen Verhaltens des AR und zu einer Akkumulation des AR an seinen Response-Elementen sowohl an Enhancer als auch Promotor des PSA-Gens. Die Assoziation von AATF blieb dagegen unbeeinflusst, wohingegen TSG101 bei 90 min entgegen seiner üblichen Dissoziation stark gebunden vorlag. Letzteres spricht dafür, dass die ZIPK am Disassembly des AR und von TSG101 beteiligt ist. Aufgrund dieser Daten lag es nahe eine Beteiligung der ZIPK am Abbau des AR zu vermuten. Da in mehreren Studien eine Phosphorylierungsabhängige Ubiquitinierung des AR nachgewiesen werden konnte, die zum proteasomalen Abbau führte (Lin *et al.*, 2002), ist möglicherweise die ausbleibende Phosphorylierung des AR, oder eines anderen an der Ubiquitinierung des AR beteiligten Proteins, durch die ZIPK für die Akkumulation des AR verantwortlich. Entsprechend konnte in nachfolgenden Versuchen eine Beteiligung der ZIPK an der Regulation der Ubiquitinierung des AR, in Abhängigkeit von ihrer Kinaseaktivität, beobachtet werden.

### **5.7 Was ist das Substrat durch welches die ZIPK koaktivierend wirkt?**

Aus den Reporterstudien war bekannt, dass das Koaktivatorpotential der ZIPK von ihrer Kinaseaktivität abhängt. Die Identifikation des Substrats, welches im Zuge der AR-abhängigen Transkriptionsinitiation durch die ZIPK phosphoryliert wird, sollte einen Einblick in den Mechanismus der Koaktivierung liefern.

Als mögliche Substrate kamen der AR selbst sowie Koaktivator- oder Chromatinproteine in Betracht. Der AR ist ein Phosphoprotein, dessen Aktivität durch eine Vielzahl an Kinasen moduliert wird (Wang *et al.*, 1999; Gioeli *et al.*, 2002). Ebenso werden viele der bekannten AR-Koaktivatoren wie z. B. SRC1 und SRC3 an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert und können abhängig von den durchgeführten Phosphorylierungen weitere spezifische Koaktivatoren rekrutieren oder werden in ihrer Aktivität moduliert (Feng *et al.*, 2006). Weder der AR noch die untersuchten Koaktivatoren AATF (Page *et al.*, 1999b), TSG101, SRC1,

SRC3 oder Blos2 wurden *in vitro* durch die ZIPK phosphoryliert. Eine *in vivo* möglicherweise nur im Kontext des aktivierten Transkriptionsinitiationskomplexes stattfindende Phosphorylierung lässt sich jedoch nicht ausschließen.

Möglicherweise ist mit Par-4 das Substrat der ZIPK aber auch schon identifiziert. Par-4 wird durch die ZIPK phosphoryliert und weist eine koaktivierende Wirkung auf die AR-abhängige Transkription auf (Page *et al.*, 1999a; Gao *et al.*, 2006). Da jedoch die Koexpression von Par-4 und ZIPK zu einer Repression der aktivierenden Wirkung von Par-4 auf die AR-abhängige Reporterexpression führte, spricht dies dagegen.

Allerdings lagen mit den *in vitro* durch die ZIPK phosphorylierten Histonen H2A, H3 und H4 potentielle Kandidaten vor (Kögel *et al.*, 1998). Die *in vitro* gefundene Phosphorylierung von H4 an T81 würde *in vivo* eine interessante, neuartige Modifikation darstellen. Da H4T81 bereits im basischen Bereich des globulären Histonkerns liegt, könnte die Phosphorylierung die Interaktion des Histons mit der DNA beeinträchtigen und dadurch aktivierend auf Transkriptionsprozesse wirken. Diese Modifikation konnte allerdings bisher *in vivo* durch WB-Analysen nicht bestätigt werden (Volker Weinl, Diplomarbeit 2003). Bei H2A konnte die Phosphorylierungsstelle noch nicht identifiziert werden, weshalb dieses nicht weiter untersucht wurde. Die Phosphorylierung von H3T11 ließ sich Mitose-spezifisch an der Centromerregion in Kolokalisation mit der Dlk nachweisen (Preuss *et al.*, 2003b), so dass sie als mögliches Substrat in der AR-abhängigen Transkriptionsaktivierung untersucht wurde.

### **5.7.1 Phosphoryliert die ZIPK Histon H3 an Threonin 11 während der Transkriptionsinitiation?**

Da die Phosphorylierung von H3 an T11 als Mitose-spezifisch beschrieben war (Preuss *et al.*, 2003b) wurde zunächst untersucht, ob die Modifikation auch in Interphase-Zellen auftritt und damit als mögliches Substrat der ZIPK im Zuge der Transkriptionsinitiation an Androgen-abhängigen Promotoren in Frage kommt. Mittels WB-Analysen ließ sich die H3T11-Phosphorylierung in Interphase-Zellen detektieren und in ChIP-Analysen konnte sie an den regulatorischen Regionen des PSA-, KLK2- und TMPRSS2-Gens nach Androgenstimulation nachgewiesen werden. Sie folgte wie der AR und die Koaktivatoren einem zyklischen Muster und konnte auch nach 24 h Induktion noch detektiert werden (Felten, unveröffentlicht).

Während der Arbeiten zur H3T11-Phosphorylierung, wurden mit PRK1 und Chk1 zwei Kinasen beschrieben, die H3T11 während der Interphase phosphorylieren (Metzger *et al.*, 2008; Shimada *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung von H3T11 durch Chk1 führt dabei zur Aktivierung der Cyclin B1 und CDK1-Expression und zwar durch Rekrutierung der Histon-acetyltransferase GCN5, welche wiederum die Acetylierung von H3K9 und H3K14 bewirkt (Shimada *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung von H3T11 durch die PRK1 erfolgt im Zuge der AR-abhängigen Genaktivierung und stellt eine Voraussetzung für die Demethylierung von

H3K9 und die anschließende Acetylierung von H3 an K9 und K14 dar (Metzger *et al.*, 2008). Dies stellte die Relevanz der ZIPK als Threonin11-Kinase in der AR-abhängigen Transkription in Frage.

ChIP-Analysen nach Herunterregulation von PRK1 und ZIPK bestätigten PRK1 als verantwortliche H3T11-Kinase, da die Herunterregulation der PRK1 zur Reduktion der H3T11-Phosphorylierung führte, die Herunterregulation der ZIPK aber nicht. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die verbliebene Restmenge ZIPK ausreichend für die Phosphorylierung ist. So mussten die Ansätze mit siRNA gegen PRK1 zusätzlich mit spezifischem PRK1-Inhibitor behandelt werden, um eine vollständige Inhibition der Aktivität und dadurch bedingt eine signifikante Reduktion der H3T11-Phosphorylierung zu erzielen. Denkbar blieb eine Funktion der ZIPK als untergeordnetes Substrat der PRK1, ähnlich der Aktivierung der ZIPK durch ROCK1 bei der Regulation der Muskelkontraktilität (Hagerty *et al.*, 2007). Dies würde bedeuten, dass die Herunterregulation von PRK1 die Aktivierung der ZIPK verhindert und damit zum Ausbleiben der H3T11-Phosphorylierung führt, aber auch dann sollte die Reduktion der ZIPK einen Effekt aufweisen. Eine gegenseitige Phosphorylierung von ZIPK und PRK1 wurde mittels *in-vitro*-Kinaseassay untersucht, ergab allerdings keine Enzym-Substrat-Beziehung zwischen den Kinasen. Eine Beteiligung der ZIPK an der H3T11-Phosphorylierung im Zuge der AR-abhängigen Genaktivierung ist damit nicht vollkommen ausgeschlossen, erscheint jedoch eher unwahrscheinlich.

Für die ZIPK steht somit die Identifizierung des Substrates noch aus. Es deutet sich jedoch an, dass dieses evtl. nicht im direkten Zusammenhang zur Transkriptionsinitiation, sondern eher zur Ubiquitinierung und dem Abbau des AR stehen könnte (siehe 5.8).

### 5.7.2 Ausprägung und Bedeutung der H3T11-Phosphorylierung

Die während der Genaktivierung stattfindenden posttranslationalen Histonmodifikationen wie Methylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen bilden Bindestellen für die Rekrutierung Chromatin-modifizierender und Transkriptions-regulierender Faktoren aus und beeinflussen dadurch die Chromatinstruktur durch Verdichtung oder Auflockerung (Jenuwein *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von Histonen gilt dabei allgemein als Transkriptions-aktivierende Modifikation. So wurde im Zuge der Aktivierung von NFκB-regulierten Genen und der „immediate early“-Gene *c-fos* und *c-jun* die H3S10-Phosphorylierung beschrieben (Clayton *et al.*, 2000). Für die H3S10-Phosphorylierung während der AR-abhängigen Transkription liegen kontroverse Daten vor. So konnte an den regulatorischen Bereichen des PSA-Gens die H3S10-Phosphorylierung parallel mit der Acetylierung von H3K9 und H3K14 sowie der Rekrutierung der RNA-Pol II bereits nach 30 min Androgenstimulation als schwaches Signal, welches mit zunehmender Induktionsdauer anstieg, beobachtet werden (Kang *et al.*, 2004). Demgegenüber wurde von Metzger *et al.* (2008) nach 30 min Hormon-

stimulation keine H3S10-Phosphorylierung detektiert. In dieser Arbeit und von Metzger *et al.* (2008) konnte mit der Phosphorylierung von H3T11 eine für die AR-abhängige Transkription spezifische Modifikation nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von H3T11 durch die PRK1 ist dabei Voraussetzung für die Demethylierung von H3K9 und die anschließende Acetylierung von H3K9 und H3K14 (Metzger *et al.*, 2008). Vor kurzem wurde die Phosphorylierung von Histon H3T6 durch die PKC $\beta$ 1 (protein kinase C beta 1) beschrieben, die die Demethylierung von H3K4 durch LSD1 (lysine-specific demethylase 1) während der AR-abhängigen Genaktivierung zu verhindern scheint (Metzger *et al.*, 2010).

Es stellte sich aufgrund der Daten zur H3S10-Phosphorylierung die Frage, ob die H3T11- und H3S10-Phosphorylierungen parallel auftreten oder sich aufgrund der sterischen Anordnung gegenseitig ausschließen. Die Modifikationen wurden mittels ChIP nach Androgenstimulation beide gleichzeitig nachgewiesen. Auffällig war, dass die H3S10-Phosphorylierung nach 45 min Androgenstimulation sehr schwach ausfiel, wohingegen die H3T11-Phosphorylierung stark ausgeprägt war. Nach 210 min Induktion war eine deutliche Zunahme an S10 phosphoryliertem H3 zu verzeichnen, parallel mit einem starken H3T11-Signal. Die Phosphorylierung von T11 erfolgte also früher als die von S10. Hier stellte sich die Frage, ob die gleichzeitige Phosphorylierung an T11 und S10 am gleichen H3-Molekül erfolgt oder separat an jeweils einem der H3-Dimere innerhalb des Nukleosoms oder sogar separat an benachbarten Nukleosomen, da in den präzipitierten Chromatinfragmenten von etwa 700 nt drei bis vier Nukleosomen enthalten sind. Die gleichzeitige Phosphorylierung von H3S10 und T11 ließ sich mit einem AK bestätigen, der spezifisch doppelphosphoryliertes H3S10/T11 erkennt. Dabei folgte das Signal der Doppelphosphorylierung dem Signal der S10-Phosphorylierung.

Metzger *et al.* (2008) zeigen, dass die H3T11-Phosphorylierung Voraussetzung für die Demethylierung von H3K9 und die anschließende Acetylierung von H3K9 und H3K14 ist. Weiterhin gehen sie davon aus, dass die H3S10-Phosphorylierung die Demethylierung von H3K9 blockiert und deshalb nicht erfolgt. Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Daten lässt sich spekulieren, dass nachdem die H3T11-Phosphorylierung die Demethylierung von H3K9 bewirkt und damit zur Genaktivierung geführt hat, die H3S10-Phosphorylierung erfolgt, um das Chromatin in einem aktiven Zustand zu fixieren. Solange bis durch Dephosphorylierung von S10 eine Stilllegung durch Methylierung erfolgen kann. Dies würde die im Vergleich zur H3T11-Phosphorylierung verzögerte H3S10-Phosphorylierung erklären.

Als weiterer Aspekt wurde die Ausdehnung der Modifikationen innerhalb und zwischen den regulatorischen Bereichen des PSA-Gens untersucht. In ChIP-Analysen konnte die H3S10- und H3T11-Phosphorylierung im Bereich zwischen PSA-Enhancer und Promotor nicht nachgewiesen werden, so dass sie auf die regulatorischen Bereiche beschränkt bleiben. Demgegenüber konnte die reprimierende Dimethylierung von H3K9, die nach Hormon-

stimulation an den regulatorischen Bereichen entfernt wurde, im Zwischenbereich detektiert werden. Die aktiv transkribiertes Chromatin kennzeichnende H3K4-Dimethylierung wurde bereits im uninduzierten Zustand detektiert. Nach Hormonstimulation wurde sie nochmals deutlich verstärkt und konnte auch im Zwischenbereich nachgewiesen werden. Der Vergleich von Enhancer- mit Promotorbereich zeigte zu den untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der Modifikationen. Dies korreliert mit Daten aus der Literatur, die eine konstante Dimethylierung von Enhancer- und Promotorelementen im Genom detektieren konnten (Heintzmann *et al.*, 2007). Die Ausprägung der Modifikationen deutet an, dass die aktivierenden H3S10- und H3T11-Phosphorylierungen, sowie die H3K4-Dimethylierung um die Response-Elemente angereichert sind und der Zwischenbereich durch die transienten H3K9- und H3K4-Dimethylierungen in einem dynamischen Zustand gehalten wird, der sowohl eine schnelle Stilllegung als auch Aktivierung des Gens ermöglicht.

In diesem Zusammenhang sollte der Zwischenbereich auch auf eine Assoziation der RNA-Pol II untersucht werden. Dies war von Interesse, da für die Interaktion der RNA-Pol II mit Enhancer- und Promotorbereichen in der Literatur drei Modelle vertreten sind, die „Looping“, „Tracking“ oder eine Kombination aus beidem postulieren (Blackwood und Kadonaga, 1998; Shang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Da keine Assoziation der RNA-Pol II im Bereich zwischen Enhancer und Promotor des PSA-Gens detektiert werden konnte, gelangt die Polymerase durch die Schleifenbildung des Chromatins, die Enhancer und Promotor in direkte räumliche Nähe bringt („Looping“) und nicht durch Gleiten entlang des Chromatins („Tracking“) vom Enhancer zum Promotor.

## **5.8 Die ZIPK ist an der Regulation der Ubiquitinierung des AR beteiligt**

Da die Herunterregulation der ZIPK eine Akkumulation des AR an seinen Response-Elementen bewirkt, die zu einer Repression der Transkription führt und sie zum Ende eines Anlagerungszyklus des AR stark an diesen gebunden vorliegt, wäre eine Beteiligung der ZIPK am Abbau des AR vorstellbar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ihr Koaktivatorpotential von ihrer Kinaseaktivität abhängt. Dies erscheint im Hinblick auf eine Beteiligung an der Regulation des Abbaus des AR interessant, da für viele TF und Koaktivatoren wie AR, p53, und SRC3 gezeigt werden konnte, dass sie vor der Anheftung der Ubiquitinmoleküle durch eine Phosphorylierung zum Abbau markiert werden (Lin *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007).

Unserer Modelvorstellung für den AR besagt, dass TSG101 die monoubiquitinierte Form des AR stabilisiert und ihn dadurch in einem aktiven Zustand hält (Burgdorf *et al.*, 2004).

Möglicherweise bewirkt die ZIPK durch Phosphorylierung die Ablösung von TSG101, oder die Ausbildung einer Bindestelle für eine E3-Ligase. Sie könnte auch zur Phosphorylierung des Rezeptors oder der Phosphorylierung und Aktivierung einer E3-Ligase beitragen. Als Ubiquitin-Ligase kommt Mdm2 in Betracht, da sowohl AATF als auch TSG101 und der AR mit Mdm2 interagieren (De Nicola *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2001; Gaughan *et al.*, 2005) und Mdm2 als Substrat der ZIPK beschrieben ist (Burch *et al.*, 2004). Daher wurde ein funktioneller Zusammenhang zwischen ZIPK und Mdm2 untersucht.

In transienten Reporterstudien konnte ein aktivierender Effekt der E3-Ligase Mdm2 auf die AR-abhängige Transkription beobachtet werden. In Koexpression mit der ZIPK wurde nochmals eine deutliche Steigerung erzielt, die eine funktionelle Kooperation beider Proteine andeutet. Gleichzeitig wurde die Abhängigkeit von der Enzymaktivität durch den stark reprimierenden Effekt der kinaseinaktiven ZIPK auf die Mdm2-vermittelte Koaktivierung deutlich. Die Gründe für die Diskrepanz zu der in der Literatur beschriebenen reprimierenden Wirkung von Mdm2 auf die AR-abhängige Reporterexpression sind unklar (Lin *et al.*, 2002; Gaughan *et al.*, 2005). Allerdings konnte bereits ein aktivierender Effekt von Mdm2 auf die ER-abhängige Transkription nachgewiesen werden (Saji *et al.*, 2001). Auch für andere E3-Ligasen wie z.B. E6-AP wurde in transienten Reporterstudien ein aktivierender Effekt auf die AR-, GR-, ER-, TR- und PR-vermittelte Transaktivierung beschrieben (Nawaz *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2006). Eine Funktion im Abbau des Rezeptors und anderer TF deutete sich durch die Rekrutierung von Mdm2 an AR-abhängige Promotoren an (Gaughan *et al.*, 2005). Da die Inhibition des Proteasoms auch in Reporterstudien die AR-abhängige Transkription reprimiert, könnte Mdm2 möglicherweise durch Polyubiquitinierung des inaktiven AR dessen Abbau beschleunigen und dadurch zu einer effizienteren Transkription beitragen, dies anscheinend abhängig von der Kinaseaktivität der ZIPK.

Die E3-Ligase-Aktivität von Mdm2 wird unter anderem durch die Akt-Kinase reguliert. Diese phosphoryliert Mdm2 an S166 und S186 was eine Voraussetzung für die Ubiquitinierung und den Abbau des AR sowie p53 durch Mdm2 darstellt (Lin *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001). Burch *et al.* (2004) konnten S166 als Phosphorylierungsstelle der ZIPK identifizieren, wobei Peptide deutlich effizienter als das Protein phosphoryliert wurden. Anhand von *in-vitro*-Kinaseassays konnte eine, wenn auch extrem schwache, Phosphorylierung von Mdm2 durch die ZIPK bestätigt werden, so dass die ZIPK *in vivo* möglicherweise durch Phosphorylierung von Mdm2 den Abbau des AR einleiten kann.

Mittels NiNTA-Affinitätschromatographie von His-Ubiquitin-markiertem Rezeptor konnte eine Beteiligung der ZIPK an der *in vivo* stattfindenden hormonabhängigen Ubiquitinierung des AR beobachtet werden. Ektopisch exprimierte ZIPK führte zu einer Erhöhung an polyubiquitiniertem AR. Demgegenüber wurde nach Überexpression der kinaseinaktiven ZIPK eine deutlich verminderte Ubiquitinierung des AR detektiert. Möglicherweise wirkt die kinase-

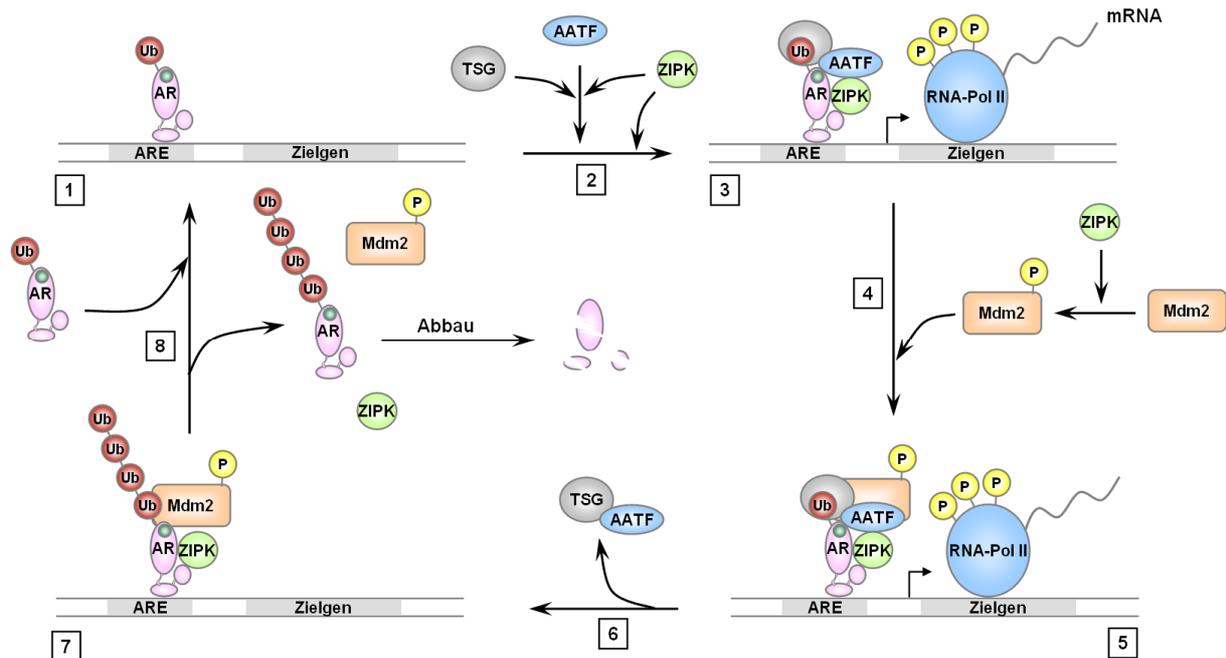
inaktive Mutante inhibierend auf die endogene ZIPK, die *in vivo* an der Ubiquitinierung beteiligt ist. Ein dominant-negativer Effekt der kinaseinaktiven DlkK42A auf die Apoptose-induktion ist bereits beschrieben (Kawai *et al.*, 2003; Scheidtmann, unveröffentlicht). Dass der inhibierende Effekt deutlicher ausfällt als die Erhöhung bei ektopischer Expression des Wildtyps, liegt möglicherweise an einer Sättigung des Systems, da die endogene ZIPK in ausreichender Konzentration in der Zelle vorhanden ist. Möglicherweise stellt ein Vermittler zwischen ZIPK und dem AR oder das Substrat, welches von der ZIPK phosphoryliert wird, den limitierenden Faktor dar. Interessanterweise verstärkte auch die Überexpression von AATF die Polyubiquitinierung des AR. Dies möglicherweise aufgrund der bereits beschriebenen Interaktion von AATF und Mdm2 (De Nicola *et al.*, 2007). Die E3-Ligase Mdm2 führte erwartungsgemäß zur stärksten Ubiquitinierung des AR.

Die Koexpression von Mdm2 und ZIPK führte zu keiner weiteren Erhöhung der Ubiquitinierung im Vergleich zu Mdm2 alleine. Demgegenüber bewirkte die Koexpression der kinaseinaktiven ZIPK mit Mdm2 eine auf das Niveau der uninduzierten Kontrolle reduzierte Ubiquitinierung des AR. Die Kinaseaktivität der ZIPK scheint somit essentiell für die Mdm2-vermittelte Ubiquitinierung des AR zu sein. Entsprechend führte die Herunterregulation der endogenen ZIPK zu einer deutlich verminderten Ubiquitinierung des AR.

Aufgrund der funktionellen Interaktionen von AATF mit ZIPK sowie AATF mit TSG101 und der bereits beschriebenen Interaktionen von AATF und TSG101 mit Mdm2 (De Nicola *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2001) deutet sich ein Zusammenspiel aller Faktoren in der Regulation der Ubiquitinierung des AR an. Anlehnend an das von Burgdorf *et al.* (2004) postulierte Modell und der in dieser Arbeit ermittelten Daten, wird ein erweitertes Modell vorgeschlagen (siehe Abb. 5.1): Nach Androgenstimulation werden unter anderem ZIPK und AATF über den AR in den Transkriptionsinitiationskomplex rekrutiert. AATF wiederum rekrutiert TSG101, welches den AR während früher Transkriptionsinitiationsprozesse durch die Stabilisierung der Mono-ubiquitinierung in einem aktiven Zustand hält. Dazu bindet TSG101 über seine UEV-Domäne das Ubiquitinmolekül und schirmt es so vor Polyubiquitinierung ab. Um den Rezeptor nach einer (oder limitierenden) Transkriptionsinitiation zum Abbau zu markieren, könnte die Rekrutierung von Mdm2 über AATF oder TSG101 erfolgen. TSG101 stellt zwar eine inaktive E2-Konjugase dar, die Interaktion mit E3-Ligasen sollte dadurch aber nicht beeinträchtigt sein. Mdm2 könnte daraufhin durch die ZIPK phosphoryliert und dadurch aktiviert werden, was die Bindung von Mdm2 an den AR und dadurch dessen Polyubiquitinierung und damit Abbau ermöglichen würde. Den Auslöser für die Mdm2-Phosphorylierung durch ZIPK stellt möglicherweise der Transkriptionsstart dar. Im Zuge der Phosphorylierung der CTD der RNA-Pol II erfolgen diverse Modifikationen, die den AR und die Koaktivatoren zum Abbau markieren oder eine Dissoziation bewirken. Da die ZIPK eine CDK-Phosphorylierungsstelle aufweist (Scheidtmann, unveröffentlicht), könnte sie durchaus von CDK7/8 (Untereinheit des

TFIIH) phosphoryliert und aktiviert werden, was das Signal für die Mdm2-Phosphorylierung darstellen könnte.

Da gezeigt wurde, dass Mdm2 auch am Abbau von AATF beteiligt ist (De Nicola *et al.*, 2007) könnte Mdm2 über den Abbau von AATF zur Ablösung von TSG101 führen. Dadurch würde die schützende Wirkung von TSG101 aufgehoben und der Rezeptor könnte durch Mdm2 polyubiquitiniert werden. Dies würde zum Abbau des AR-Transkriptionsinitiationskomplexes und damit zum „Promotorclearing“ führen, so dass bei weiterhin vorliegendem Stimulus ein neuer Zyklus des AR stattfinden könnte.



**Abb. 5.1: Modell zur funktionellen Kooperation von ZIPK, AATF und TSG101 in der Regulation der AR-Aktivität.**

Schritt 1: Die Aktivierung des AR durch DHT (siehe Einleitung Abb. 1.2) führt zur Dimerisierung und der Translokation in den Zellkern. Dort bindet das AR-Dimer (im Schema zur Vereinfachung als Monomer dargestellt) an die ARE in den Promotor- und Enhancerbereichen seiner Zielgene und rekrutiert eine Reihe von Koaktivatoren (Schritt 2), wie z.B. AATF und die ZIPK. AATF rekrutiert wiederum TSG101, welches den monoubiquitinierten AR bindet und dadurch dessen Polyubiquitinierung verhindert (Schritt 3). Es folgt die Initiation der Transkription. Schritt 4: Der Transkriptionsstart führt zu weiteren Modifikationen des AR und der Koaktivatoren. Diese führen dazu, dass die ZIPK Mdm2 phosphoryliert, welches möglicherweise über AATF oder TSG101 bereits in den Komplex rekrutiert wurde. Schritt 5: Mdm2 bindet an den Komplex und führt zur Dissoziation/Abbau von AATF und TSG101 (Schritt 6). Schritt 7: Die schützende Wirkung von TSG101 ist aufgehoben und Mdm2 kann den AR polyubiquitiniert und damit zum Abbau markieren. Schritt 8: Es kommt zum „Promotorclearing“ durch Abbau des AR im 26S-Proteasom. Dies ermöglicht eine erneute Anlagerung von aktiviertem AR.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Kooperation von AATF, TSG101 und ZIPK bei der Regulation der Ubiquitinierung des AR liefern eine mögliche Erklärung für die Aufrechterhaltung der zyklischen Transkriptionsprozesse. Ob die ZIPK dabei über die direkte Phosphorylierung von Mdm2 zum Abbau des Rezeptors beiträgt, oder ob die Phosphory-

lierung zur Ablösung von TSG101 führt und den Rezeptor damit für E3-Ligasen zugänglich macht bleibt offen. Weitere Untersuchungen werden zeigen, inwieweit die durch ZIPK, AATF und TSG101 vermittelte Aktivierung mit anschließendem Abbau des AR dabei Zielgenspezifisch je nach Zellzyklusphase, Hormonstimulus oder konvergierendem Signalweg reguliert werden kann. Die Übertragbarkeit der funktionellen Kooperation der Koaktivatoren auf andere TF wie p53, würde einen generellen Mechanismus bei der Regulation von Proliferation und Apoptose darstellen.

## 5.9 Ausblick

Die wichtigste Frage, die sich aus dieser Arbeit ergibt, gilt dem Mechanismus über den die ZIPK an der Phosphorylierungs-abhängigen Regulation des Ubiquitinierungszustandes des AR und damit an dessen Abbau beteiligt ist. In weiterführenden Experimenten sollten daher die Beteiligung und die Wechselwirkungen von ZIPK, AATF und TSG101 an der Regulation der Ubiquitinierung des AR weiter untersucht werden. Dazu sollte zunächst die Identifizierung des Substrates, welches im Zuge der Ubiquitinierung des AR durch die ZIPK phosphoryliert wird, erfolgen. Ein möglicher Ansatz ist die Etablierung eines GST-Pulldown-Assays, bei dem die ZIPK an eine Matrix gekoppelt und mit induziertem bzw. uninduziertem Zellextrakt aus Prostatakarzinomzellen inkubiert wird. Nach Elution der Komplexe könnten spezifisch aus dem induzierten Extrakt präzipitierte Proteinbanden mittels SDS-Page identifiziert und nach Isolierung und Anreicherung durch massenspektrometrische Analysen (MALDI-TOF) analysiert werden. In transienten Reportergenstudien könnte der Einfluss isolierter Interaktionspartner auf die AR-abhängige Transkription untersucht werden. Der Nachweis, ob es sich bei einem Interaktionspartner mit koaktivierenden Eigenschaften um das während der Ubiquitinierung oder um ein anderes während der Transkriptionsinitiation phosphoryliertes Substrat der ZIPK handelt, könnten *in vitro* durch Kinase- und Ubiquitinierungssassays erfolgen. Ließe sich ein potentielles Substrat identifizieren, so würde sich dann die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen anschließen. Danach würden Punktmutationen putativer Phosphorylierungsstellen erfolgen und die Mutanten könnten in Reportergenstudien auf ihr koaktivierendes Potential untersucht werden. Die Synthese von phosphospezifischen Antikörpern würde den Nachweis der Phosphorylierung durch die ZIPK an Promotoren von Zielgenen des AR ermöglichen. In Kombination mit siRNA gegen die ZIPK könnte die funktionelle Relevanz *in vivo* nachgewiesen werden.

Außerdem sollte die Übertragung, der für die Ubiquitinierung ermittelten Daten, auf andere Zelllinien und den endogenen AR aus LNCaP-Zellen erfolgen. Um eine generelle Funktion der ZIPK in Ubiquitinierungsprozessen nachzuweisen, sollte eine Beteiligung der ZIPK an der Regulation der Ubiquitinierung von weiteren TF wie zum Beispiel p53 analysiert werden.

Mittels sequentiellen ChIP-Analysen lässt sich überprüfen, ob Mdm2 durch die Interaktion mit AATF oder TSG101 (De Nicola *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2001) an den PSA-Promotor (Gaughan *et al.*, 2005) rekrutiert wird und ob es in einem Komplex mit der ZIPK vorliegt.

Um einen genaueren Überblick über die Zielgene des AR oder anderer TF zu erhalten, an deren Regulation die ZIPK und die anderen Koaktivatoren beteiligt sind, könnten ChIP-on-CHIP-Analysen nach unterschiedlichen Vorbehandlungen, wie siRNA gegen ZIPK, UV-Bestrahlung zur Apoptoseinduktion oder unterschiedlichen Hormonen zur Aktivierung verschiedener Steroidhormonrezeptoren, durchgeführt werden. Die in den ChIP-Analysen von den Koaktivatoren präzipitierten DNA-Bereiche würden mittels „Random“-Primern amplifiziert und anschließend mit einem DNA-Chip hybridisiert. Die Analyse, der nach den unterschiedlichen Stimuli von den Koaktivatoren präzipitierten Genen, würde Aufschluss über deren Beteiligung an weiteren Signalwegen und damit zu ihrer Funktion ermöglichen.

Die Verbindungen von AR und ZIPK, AATF sowie TSG101 zu p53 und p21 stellen einen weiteren interessanten Ansatzpunkt für nachfolgende Studien dar. Die ermittelten und in der Literatur beschriebenen Daten legen dabei eine Funktion der Koaktivatoren in der AR-abhängigen Regulation von p53 und p21 nahe, so dass eine Beteiligung an der Zellzyklus- und Apoptoseregulation zu untersuchen ist. Die Promotorregionen des p53- und p21-Gens könnten mittels ChIP auf eine Assoziation der Koaktivatoren und eine mögliche Abhängigkeit in der Rekrutierung untersucht werden. Um einen Einblick in die Relevanz von ZIPK, AATF und TSG101 für die Regulation des Zellzyklus und der Androgen-abhängigen Proliferation und damit letztendlich auch für die Krebsentstehung zu erhalten, könnten induzierbare shRNA-codierende Zelllinien erzeugt werden. Mit diesen ließen sich einerseits Wachstumskurven und FACS-Analysen und andererseits nach Synchronisation der Zellen effiziente ChIP-Analysen erstellen.

SRC1, SRC3 und Blos2 konnten als neue Interaktionspartner der ZIPK identifiziert werden. Aufgrund ihrer koaktivierenden Wirkung auf die AR-abhängige Transkription sollte eine eingehende Charakterisierung der Interaktionen erfolgen. Für Blos2 konnte die Interaktionsdomäne dazu bereits seitens der ZIPK auf den Leucin-Zipper eingegrenzt werden (Felten, unveröffentlicht). Das gemeinsame Vorkommen der Proteine innerhalb eines Komplexes mit dem AR an regulatorischen Bereichen von AR-Zielgenen könnte als Nachweis für eine funktionelle Interaktion dieser Proteine dienen.

Diese und weitere Experimente könnten dazu beitragen, die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur funktionellen Kooperation der Koaktivatoren in der AR-abhängigen Transkription zu erweitern.

## 6 Zusammenfassung

In unserer Arbeitsgruppe wurden mit der murinen ZIPK, dem Transkriptionsfaktor AATF und dem Ubiquitin-Bindeprotein TSG101 neue Koaktivatoren der AR-abhängigen Transkription identifiziert, deren funktionelle Kooperation in dieser Arbeit untersucht wurde. Dabei lag der Fokus auf der zeitlichen Abfolge und der gegenseitigen Abhängigkeit der Assemblierung des AR und der Koaktivatoren im Transkriptionsinitiationskomplex, sowie dem Mechanismus über den die ZIPK koaktivierend wirkt.

Transiente Reporterstudien bestätigten zunächst die humanen Orthologen als Koaktivatoren des AR. Die von der Kinaseaktivität abhängende koaktivierende Wirkung der ZIPK wurde für Enhancer- und Promotorbereiche von Zielgenen des AR und unter den Steroidhormonrezeptoren für die GR-, aber nicht die ER- und PR-vermittelte Transkription nachgewiesen. Auch die p53-abhängige Reporterexpression wurde durch die ZIPK koaktiviert. Die Herunterregulation von ZIPK, AATF und TSG101 resultierte in verminderten mRNA-Leveln der endogenen AR-Zielgene PSA, KLK2 und TMPRSS2, was die endogenen Proteine als echte AR-Koaktivatoren klassifizierte. Die ZIPK zeigte dabei eine gewisse Zielgenspezifität, da das TMPRSS2-Gen von Überexpression und Reduktion der ZIPK unbeeinflusst blieb.

Sequentielle Chromatin-Immunpräzipitations- (ChIP)-Analysen bestätigten, dass ZIPK, AATF und TSG101 in einem gemeinsamen Komplex mit dem AR an Enhancer- und Promotorbereichen von AR-Zielgenen gebunden vorliegen. ChIP-Analysen nach siRNA-vermitteltem Knockdown von AATF zeigten, dass die Rekrutierung von TSG101 von AATF abhängt. Die Rekrutierung der ZIPK erfolgt dagegen direkt über den AR, wobei AATF stabilisierend wirkt.

Die Assemblierung des AR und der Koaktivatoren an regulatorische Bereiche des PSA-, KLK2- und TMPRSS2-Gens erfolgte dynamisch in einer zyklischen Abfolge. Die Zykluslänge des AR betrug ca. 90 min, mit einem verkürzten ersten Zyklus von 30 min am PSA-Promotor. Die Koaktivatoren zeigten dabei ein deutlich dynamischeres Anlagerungs- und Dissoziationsverhalten. Innerhalb des AR-Zyklus fand eine mehrfache Assoziation und Dissoziation mit einem individuellen Rekrutierungsverhalten statt.

Die *in vitro* von der ZIPK durchgeführte Phosphorylierung von Histon H3 an T11, welche ursprünglich als Mitose- und Centromerspezifisch beschrieben wurde (Preuss *et al.*, 2003), konnte an den regulatorischen Regionen des PSA-, KLK2- und TMPRSS2-Gens als neue Histonmodifikation identifiziert, allerdings nicht der ZIPK zugeordnet werden. Die H3T11-Phosphorylierung erfolgte im Zuge der Genaktivierung noch vor der H3S10-Phosphorylierung und korrelierte mit der Demethylierung von H3K9.

Um die Ursache für die zyklische Assoziation/Dissoziation des AR und der Koaktivatoren zu ermitteln wurden Proteasomen- oder Transkriptioninhibitoren eingesetzt. Die Inhibition des Proteasoms bewirkte einerseits ein Ausbleiben der zyklischen Assoziation/Dissoziation und

damit eine deutliche Akkumulation des AR an Response-Elementen, andererseits führte sie zur vollständigen Repression der AR-abhängigen Transkription von Reportergenen. Das zyklische Verhalten des AR kann somit auf den Abbau des AR zurückgeführt werden und ist für eine effiziente Transkription unerlässlich. Andererseits bewirkte die Inhibition der Transkription ebenso eine Akkumulation des AR. Daraus lässt sich schließen, dass die Initiation der Transkription eine Voraussetzung für den Abbau darstellt und der Abbau wiederum die Voraussetzung für eine erneute Transkriptionsinitiation.

Interessanterweise führte die Herunterregulation der ZIPK ebenfalls zur Akkumulation des AR und von TSG101. Dieses Ergebnis wies auf eine Beteiligung der ZIPK an der Regulation des proteasomalen Abbaus des AR hin. Reporterstudien zeigten einen funktionellen Zusammenhang zwischen der E3-Ligase Mdm2 und der ZIPK. *In-vivo*-Ubiquitinierungsanalysen nach Expression kinaseinaktiver ZIPK, sowie nach Herunterregulation endogener ZIPK führten zu einer verminderten Polyubiquitinierung des AR. Demgegenüber konnte nach ektopischer Expression der ZIPK eine Zunahme an polyubiquitiniertem AR detektiert werden. Der Nachweis einer schwachen Phosphorylierung von Mdm2 durch die ZIPK deutet eine Funktion der ZIPK in der Regulation der Mdm2-vermittelten Ubiquitinierung und damit dem Abbau des AR an, der vermutlich die Ursache des zyklischen Verhaltens des AR ist.

Es lässt sich somit postulieren, dass das Zusammenspiel von AATF, TSG101 und ZIPK die Aktivität und den Abbau des AR reguliert. Nach Rekrutierung von ZIPK und AATF durch an den Enhancer/Promotor-gebundenen AR, rekrutiert AATF wiederum TSG101. Dieses wirkt koaktivierend, indem es die monoubiquitinierte, vermutlich aktive Form des AR stabilisiert. Nach erfolgter Transkriptionsinitiation ist die ZIPK an der Regulation des Ubiquitinierungszustandes des AR beteiligt, möglicherweise durch Aufhebung der Schutzwirkung von TSG101 und Aktivierung von Mdm2 durch Phosphorylierung, welches daraufhin die Polyubiquitinierung und damit den Abbau des AR einleitet. Dies bewirkt ein „Promotor-clearing“, welches dann die Bildung eines neuen Transkriptionsinitiationskomplexes ermöglicht.

## 7 Literaturverzeichnis

- Amazit L, Pasini L, Szafran AT, Berno V, Wu RC, Mielke M, Jones ED, Mancini MG, Hinojos CA, O'Malley BW, Mancini MA (2007) Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 27:6913-6932.
- Archer TK, Fryer CJ, Lee HL, Zaniewski E, Liang T, Mymryk JS (1995) Steroid hormone receptor status defines the MMTV promoter chromatin structure in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:421-429.
- Arimura A, vn Peer M, Schroder AJ, Rothman PB (2004) The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. *J Biol Chem* 279:31105-31112.
- Bertrand S, Brunet FG, Escriva H, Parmentier G, Laudet V, Robinson-Rechavi M (2004) Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. *Mol Biol Evol* 21:1923-1937.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bishop N, Horman A, Woodman P (2002) Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* 157:91-101.
- Black BE, Vitto MJ, Gioeli D, Spencer A, Afshar N, Conaway MR, Weber MJ, Paschal BM (2004) Transient, ligand-dependent arrest of the androgen receptor in subnuclear foci alters phosphorylation and coactivator interactions. *Mol Endocrinol* 18:834-850.
- Blackwood EM, Kadonaga JT (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281:60-63.
- Bonifacino JS, Weissman AM (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:19-57.
- Boosen M (2007) Molekulargenetische und Zellbiologische Untersuchungen zur Par-4-induzierten Apoptose. Dissertation, Universität Bonn.
- Boosen M, Vetterkind S, Kubicek J, Scheidtmann KH, Illenberger S, Preuss U (2009) Par-4 is an essential downstream target of DAP-like kinase (Dlk) in Dlk/Par-4-mediated apoptosis. *Mol Biol Cell* 20:4010-4020.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391:597-601.
- Brinckmann D (2007) Subzelluläre Lokalisation und Interaktion der ZIP-Kinase und der Myosin-Phosphatase-Untereinheit MYPT1. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Bruno T, De Angelis R, De Nicola F, Barbato C, Di Padova M, Corbi N, Libri V, Benassi B, Mattei E, Chersi A, Soddu S, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M (2002) Che-1 affects cell growth by interfering with the recruitment of HDAC1 by Rb. *Cancer Cell* 2:387-399.
- Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, Lecis D, D'Angelo C, Di Padova M, Corbi N, Dimiziani L, Zannini L, Jekimovs C, Scarsella M, Porrello A, Chersi A, Crescenzi M, Leonetti C, Khanna KK, Soddu S, Floridi A, Passananti C, Delia D, Fanciulli M (2006) Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. *Cancer Cell* 10:473-486.
- Bruno T, Iezzi S, De Nicola F, Di Padova M, Desantis A, Scarsella M, Di Certo MG, Leonetti C, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M (2008) Che-1 activates XIAP expression in response to DNA damage. *Cell Death Differ* 15:515-520.
- Burch LR, Scott M, Pohler E, Meek D, Hupp T (2004) Phage-peptide display identifies the interferon-responsive, death-activated protein kinase family as a novel modifier of MDM2 and p21WAF1. *J Mol Biol* 337:115-128.

- Burgdorf S (2003) Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors AATF. Dissertation, Universität Bonn.
- Burgdorf S, Leister P, Scheidtmann KH (2004) TSG101 interacts with apoptosis-antagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination. *J Biol Chem* 279:17524-17534.
- Burns CG, Ohi R, Mehta S, O'Toole ET, Winey M, Clark TA, Sugnet CW, Ares M, Jr., Gould KL (2002) Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22:801-815.
- Carmell MA, Hannon GJ (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11:214-218.
- Chen D, Riedl T, Washbrook E, Pace PE, Coombes RC, Egly JM, Ali S (2000) Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell* 6:127-137.
- Chen J, Sowers MR, Moran FM, McConnell DS, Gee NA, Greendale GA, Whitehead C, Kasim-Karakas SE, Lasley BL (2006a) Circulating bioactive androgens in midlife women. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4387-4394.
- Chen S, Wang J, Yu G, Liu W, Pearce D (1997) Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J Biol Chem* 272:14087-14092.
- Chen S, Xu Y, Yuan X, Bublej GJ, Balk SP (2006b) Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15969-15974.
- Chesire DR, Isaacs WB (2002) Ligand-dependent inhibition of beta-catenin/TCF signaling by androgen receptor. *Oncogene* 21:8453-8469.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* 5:905-915.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22:442-451.
- Clayton AL, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (2000) Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J* 19:3714-3726.
- Clements JA, Willemsen NM, Myers SA, Dong Y (2004) The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41:265-312.
- Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW, Trapman J (1997) An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol* 11:148-161.
- Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J (1996) Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271:6379-6388.
- Cohen O, Feinstein E, Kimchi A (1997) DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 16:998-1008.
- Conradi A (2008) Untersuchungen zur Rolle der ZIPK und der Bedeutung der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose. Dissertation, Universität Bonn.
- Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE (2008) Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci* 121:957-968.

- Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11:1025-1033.
- De Nicola F, Bruno T, Iezzi S, Di Padova M, Floridi A, Passananti C, Del Sal G, Fanciulli M (2007) The prolyl isomerase Pin1 affects Che-1 stability in response to apoptotic DNA damage. *J Biol Chem* 282:19685-19691.
- Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A (1995) Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 9:15-30.
- Denayer S, Helsen C, Thorrez L, Haelens A, Claessens F (2010) The rules of DNA recognition by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 24:898-913.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.
- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ (1992) Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol* 88:15-22.
- Di Certo MG, Corbi N, Bruno T, Iezzi S, De Nicola F, Desantis A, Ciotti MT, Mattei E, Floridi A, Fanciulli M, Passananti C (2007) NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death. *J Cell Sci* 120:1852-1858.
- Di Padova M, Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, D'Angelo C, Gallo R, Nicosia D, Corbi N, Biroccio A, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M (2003) Che-1 arrests human colon carcinoma cell proliferation by displacing HDAC1 from the p21WAF1/CIP1 promoter. *J Biol Chem* 278:36496-36504.
- Dias SS, Hogan C, Ochocka AM, Meek DW (2009) Polo-like kinase-1 phosphorylates MDM2 at Ser260 and stimulates MDM2-mediated p53 turnover. *FEBS Lett* 583:3543-3548.
- Endo A, Surks HK, Mochizuki S, Mochizuki N, Mendelsohn ME (2004) Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *J Biol Chem* 279:42055-42061.
- Engemann H, Heinzl V, Page G, Preuss U, Scheidtmann KH (2002) DAP-like kinase interacts with the rat homolog of *Schizosaccharomyces pombe* CDC5 protein, a factor involved in pre-mRNA splicing and required for G2/M phase transition. *Nucleic Acids Res* 30:1408-1417.
- Engemann HG (2006) Charakterisierung der DIK/CDC5 Interaktion und der Genstruktur des DIK Gens. Dissertation, Universität Bonn.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, De Angelis R, Iezzi S, Iacobini C, Floridi A, Passananti C (2000) Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *FASEB J* 14:904-912.
- Faus H, Haendler B (2006) Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60:520-528.
- Felten A (2006) Charakterisierung eines neuen Interaktionspartners des Transkriptionsfaktors AATF: - SHIA -. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Felten A, Leister P, Burgdorf S, Uhlmann L, Scheidtmann KH (2007) Characterization of rat BLOS2/Ceap, a putative yeast She3 homolog, as interaction partner of apoptosis antagonizing transcription factor/Che-1. *Biol Chem* 388:569-582.
- Feng Q, Yi P, Wong J, O'Malley BW (2006) Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol* 26:7846-7857.
- Fu M, Rao M, Wang C, Sakamaki T, Wang J, Di Vizio D, Zhang X, Albanese C, Balk S, Chang C, Fan S, Rosen E, Palvimo JJ, Janne OA, Muratoglu S, Avantaggiati ML, Pestell RG (2003) Acetylation of androgen

- receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol* 23:8563-8575.
- Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Ogryzko V, Avantaggiati ML, Pestell RG (2000) p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 275:20853-20860.
- Gao S, Wang H, Lee P, Melamed J, Li CX, Zhang F, Wu H, Zhou L, Wang Z (2006) Androgen receptor and prostate apoptosis response factor-4 target the c-FLIP gene to determine survival and apoptosis in the prostate gland. *J Mol Endocrinol* 36:463-483.
- Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN (2002) Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* 277:25904-25913.
- Gaughan L, Logan IR, Neal DE, Robson CN (2005) Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation. *Nucleic Acids Res* 33:13-26.
- Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM, Christian RE, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ (2002) Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 277:29304-29314.
- Goel A, Janknecht R (2004) Concerted activation of ETS protein ER81 by p160 coactivators, the acetyltransferase p300 and the receptor tyrosine kinase HER2/Neu. *J Biol Chem* 279:14909-14916.
- Graves PR, Winkfield KM, Haystead TA (2005) Regulation of zipper-interacting protein kinase activity in vitro and in vivo by multisite phosphorylation. *J Biol Chem* 280:9363-9374.
- Gronemeyer H, Moras D (1995) Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature* 375:190-191.
- Guo Q, Xie J (2004) AATF inhibits aberrant production of amyloid beta peptide 1-42 by interacting directly with Par-4. *J Biol Chem* 279:4596-4603.
- Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F (2007) The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res* 67:4514-4523.
- Hagerty L, Weitzel DH, Chambers J, Fortner CN, Brush MH, Loiselle D, Hosoya H, Haystead TA (2007) ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. *J Biol Chem* 282:4884-4893.
- Hahn S (1998) The role of TAFs in RNA polymerase II transcription. *Cell* 95:579-582.
- Hanahn D (1983) Studies on transformation of Escherichia Coli with plasmids *J Mol Biol* 166:557-580.
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418:244-251.
- Hawthorne VS, Huang WC, Neal CL, Tseng LM, Hung MC, Yu D (2009) ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7:592-600.
- Haystead TA (2005) ZIP kinase, a key regulator of myosin protein phosphatase 1. *Cell Signal* 17:1313-1322.
- He B, Kempainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM (1999) Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *J Biol Chem* 274:37219-37225.
- Heemers HV, Tindall DJ (2007) Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 28:778-808.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733-736.
- Heinlein CA, Chang C (2002) Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23:175-200.

- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39:311-318.
- Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H (2002) Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30:1757-1766.
- Honda R, Korner R, Nigg EA (2003) Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 14:3325-3341.
- Hu YF, Hao ZL, Li R (1999) Chromatin remodeling and activation of chromosomal DNA replication by an acidic transcriptional activation domain from BRCA1. *Genes Dev* 13:637-642.
- Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 390:180-184.
- Inbal B, Shani G, Cohen O, Kissil JL, Kimchi A (2000) Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 20:1044-1054.
- Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO (1995) Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 270:7341-7346.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangnekar VM, Shi Y (1996) A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol* 16:6945-6956.
- Kaarbo M, Klock TI, Saatcioglu F (2007) Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *Bioessays* 29:1227-1238.
- Kaikkonen S, Jaaskelainen T, Karvonen U, Rytinki MM, Makkonen H, Gioeli D, Paschal BM, Palvimo JJ (2009) SUMO-specific protease 1 (SENP1) reverses the hormone-augmented SUMOylation of androgen receptor and modulates gene responses in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 23:292-307.
- Kaku N, Matsuda K, Tsujimura A, Kawata M (2008) Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with the importin alpha/beta and Ran-guanosine 5'-triphosphate systems. *Endocrinology* 149:3960-3969.
- Kang Z, Janne OA, Palvimo JJ (2004) Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18:2633-2648.
- Kang Z, Pirskanen A, Janne OA, Palvimo JJ (2002) Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem* 277:48366-48371.
- Kawai T, Akira S, Reed JC (2003) ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains. *Mol Cell Biol* 23:6174-6186.
- Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H, Akira S (1998) ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol* 18:1642-1651.
- Kawai T, Nomura F, Hoshino K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Akira S (1999) Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene* 18:3471-3480.
- Khan OY, Fu G, Ismail A, Srinivasan S, Cao X, Tu Y, Lu S, Nawaz Z (2006) Multifunction steroid receptor coactivator, E6-associated protein, is involved in development of the prostate gland. *Mol Endocrinol* 20:544-559.
- Kogel D, Bierbaum H, Preuss U, Scheidtmann KH (1999) C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity. *Oncogene* 18:7212-7218.
- Kogel D, Plottner O, Landsberg G, Christian S, Scheidtmann KH (1998) Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* 17:2645-2654.

- Kogel D, Prehn JH, Scheidtmann KH (2001) The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *Bioessays* 23:352-358.
- Komatsu S, Ikebe M (2004) ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol* 165:243-254.
- Koonin EV, Abagyan RA (1997) TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators. *Nat Genet* 16:330-331.
- Kornberg RD (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30:235-239.
- Kouzarides T (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12:198-209.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- Lambert JR, Nordeen SK (1998) Steroid-selective initiation of chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter is controlled by the site of promoter integration. *J Biol Chem* 273:32708-32714.
- Lavery DN, McEwan IJ (2006) The human androgen receptor AF1 transactivation domain: interactions with transcription factor IIF and molten-globule-like structural characteristics. *Biochem Soc Trans* 34:1054-1057.
- Leister P (2007) Die Funktion der Dlk/ZIP-Kinase in der androgenabhängigen Transkription. Dissertation, Universität Bonn.
- Leister P, Burgdorf S, Scheidtmann KH (2003) Apoptosis Antagonizing Transcription Factor AATF is a novel co-activator of nuclear hormone receptors. *Signal Transduction* 3:17-25.
- Leister P, Felten A, Chasan AI, Scheidtmann KH (2008) ZIP kinase plays a crucial role in androgen receptor-mediated transcription. *Oncogene* 27:3292-3300.
- Li L, Cohen SN (1996) Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell* 85:319-329.
- Li L, Liao J, Ruland J, Mak TW, Cohen SN (2001) A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1619-1624.
- Lin DY, Fang HI, Ma AH, Huang YS, Pu YS, Jenster G, Kung HJ, Shih HM (2004) Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx. *Mol Cell Biol* 24:10529-10541.
- Lin HK, Altuwajiri S, Lin WJ, Kan PY, Collins LL, Chang C (2002a) Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277:36570-36576.
- Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwajiri S, Chang C (2002b) Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J* 21:4037-4048.
- Lin HK, Yeh S, Kang HY, Chang C (2001) Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7200-7205.
- Lindfors K, Halttunen T, Huotari P, Nupponen N, Vihinen M, Visakorpi T, Maki M, Kainulainen H (2000) Identification of novel transcription factor-like gene from human intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 276:660-666.
- Louie MC, Zou JX, Rabinovich A, Chen HW (2004) ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* 24:5157-5171.
- MacDonald JA, Borman MA, Muranyi A, Somlyo AV, Hartshorne DJ, Haystead TA (2001a) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2419-2424.
- MacDonald JA, Eto M, Borman MA, Brautigam DL, Haystead TA (2001b) Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett* 493:91-94.

- Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9:935-944.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
- Marshall NF, Peng J, Xie Z, Price DH (1996) Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* 271:27176-27183.
- Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Scholz P, Wegg A, Basler S, Schafer M, Egner U, Carrondo MA (2000) Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem* 275:26164-26171.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344.
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-763.
- Metzger E, Imhof A, Patel D, Kahl P, Hoffmeyer K, Friedrichs N, Muller JM, Greschik H, Kirfel J, Ji S, Kunowska N, Beisenherz-Huss C, Gunther T, Buettner R, Schule R (2010) Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta(I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature* 464:792-796.
- Metzger E, Muller JM, Ferrari S, Buettner R, Schule R (2003) A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *EMBO J* 22:270-280.
- Metzger E, Yin N, Wissmann M, Kunowska N, Fischer K, Friedrichs N, Patnaik D, Higgins JM, Potier N, Scheidtmann KH, Buettner R, Schule R (2008) Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat Cell Biol* 10:53-60.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 140:627-636.
- Mukhopadhyay R, Ray PS, Arif A, Brady AK, Kinter M, Fox PL (2008) DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression. *Mol Cell* 32:371-382.
- Murata-Hori M, Fukuta Y, Ueda K, Iwasaki T, Hosoya H (2001) HeLa ZIP kinase induces diphosphorylation of myosin II regulatory light chain and reorganization of actin filaments in nonmuscle cells. *Oncogene* 20:8175-8183.
- Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1999) The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19:1182-1189.
- Nishida T, Yasuda H (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 277:41311-41317.
- Nowak SJ, Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20:214-220.
- Nuclear RNC (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97:161-163.
- Ohbayashi N, Okada K, Kawakami S, Togi S, Sato N, Ikeda O, Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y, Kawai T, Akira S, Matsuda T (2008) Physical and functional interactions between ZIP kinase and UbcH5. *Biochem Biophys Res Commun* 372:708-712.
- Oikawa T, Yamada T (2003) Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303:11-34.
- Osley MA (2006) Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5:179-189.
- Page G, Kogel D, Rangnekar V, Scheidtmann KH (1999a) Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene* 18:7265-7273.

- Page G, Lodige I, Kogel D, Scheidtmann KH (1999b) AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett* 462:187-191.
- Peterson CL, Workman JL (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* 10:187-192.
- Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ (2000) Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14145-14150.
- Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40:41-58.
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
- Prescott J, Coetzee GA (2006) Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett* 231:12-19.
- Preuss U, Bierbaum H, Buchenau P, Scheidtmann KH (2003a) DAP-like kinase, a member of the death-associated protein kinase family, associates with centrosomes, centromeres, and the contractile ring during mitosis. *Eur J Cell Biol* 82:447-459.
- Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH (2003b) Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* 31:878-885.
- Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11:695-707.
- Roeder RG (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21:327-335.
- Ruland J, Sirard C, Elia A, MacPherson D, Wakeham A, Li L, de la Pompa JL, Cohen SN, Mak TW (2001) p53 accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking *tsg101*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1859-1864.
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25:15-30.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14:20-28.
- Rzymiski T, Milani M, Singleton DC, Harris AL (2009) Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle* 8:3838-3847.
- Saji S, Okumura N, Eguchi H, Nakashima S, Suzuki A, Toi M, Nozawa Y, Hayashi S (2001) MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281:259-265.
- Salomoni P, Pandolfi PP (2002) p53 De-ubiquitination: at the edge between life and death. *Nat Cell Biol* 4:E152-153.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York.
- Sanjo H, Kawai T, Akira S (1998) DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem* 273:29066-29071.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419:407-411.
- Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285:886-891.

- Sato N, Kawai T, Sugiyama K, Muromoto R, Imoto S, Sekine Y, Ishida M, Akira S, Matsuda T (2005) Physical and functional interactions between STAT3 and ZIP kinase. *Int Immunol* 17:1543-1552.
- Scheidtmann KH (2007) Dlk/ZIP kinase, a novel Ser/Thr-specific protein kinase with multiple functions. *Signal Transduction* 7:248-259.
- Schurter BT, Koh SS, Chen D, Bunick GJ, Harp JM, Hanson BL, Henschen-Edman A, Mackay DR, Stallcup MR, Aswad DW (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* 40:5747-5756.
- Sells SF, Wood DP, Jr., Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA, Humphreys S, Rangnekar VM (1994) Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ* 5:457-466.
- Shang F, Deng G, Liu Q, Guo W, Haas AL, Crosas B, Finley D, Taylor A (2005) Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation. *J Biol Chem* 280:20365-20374.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843-852.
- Shang Y, Myers M, Brown M (2002) Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* 9:601-610.
- Shani G, Marash L, Gozuacik D, Bialik S, Teitelbaum L, Shohat G, Kimchi A (2004) Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions. *Mol Cell Biol* 24:8611-8626.
- Sharma D, Fondell JD (2002) Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7934-7939.
- Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M (2008) Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* 132:221-232.
- Shoval Y, Pietrokovski S, Kimchi A (2007) ZIPK: a unique case of murine-specific divergence of a conserved vertebrate gene. *PLoS Genet* 3:1884-1893.
- Slagsvold T, Pattni K, Malerod L, Stenmark H (2006) Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol* 16:317-326.
- Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15:1265-1273.
- Spencer VA, Davie JR (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* 240:1-12.
- Starcevic M, Dell'Angelica EC (2004) Identification of snapin and three novel proteins (BLOS1, BLOS2, and BLOS3/reduced pigmentation) as subunits of biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1). *J Biol Chem* 279:28393-28401.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.
- Sutherland H, Bickmore WA (2009) Transcription factories: gene expression in unions? *Nat Rev Genet* 10:457-466.
- Tang F, Kokontis J, Lin Y, Liao S, Lin A, Xiang J (2009) Androgen via p21 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced JNK activation and apoptosis. *J Biol Chem* 284:32353-32358.
- Tang G (2005) siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 30:106-114.
- Thomas M, Dadgar N, Aphale A, Harrell JM, Kunkel R, Pratt WB, Lieberman AP (2004) Androgen receptor acetylation site mutations cause trafficking defects, misfolding, and aggregation similar to expanded glutamine tracts. *J Biol Chem* 279:8389-8395.
- Thomas T, Voss AK, Petrou P, Gruss P (2000) The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos. *Dev Biol* 227:324-342.

- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310:644-648.
- Tumbar T, Sudlow G, Belmont AS (1999) Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol* 145:1341-1354.
- Vaisanen S, Dunlop TW, Sinkkonen L, Frank C, Carlberg C (2005) Spatio-temporal activation of chromatin on the human CYP24 gene promoter in the presence of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Mol Biol* 350:65-77.
- van de Wijngaart DJ, van Royen ME, Hersmus R, Pike AC, Houtsmuller AB, Jenster G, Trapman J, Dubbink HJ (2006) Novel FXXFF and FXXMF motifs in androgen receptor cofactors mediate high affinity and specific interactions with the ligand-binding domain. *J Biol Chem* 281:19407-19416.
- van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ, Verschure PJ, Trapman J, Houtsmuller AB (2007) Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells. *J Cell Biol* 177:63-72.
- Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20:1899-1910.
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293:853-857.
- Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR (1999) Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 259:21-28.
- Wang Q, Carroll JS, Brown M (2005a) Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol Cell* 19:631-642.
- Wang Q, Li W, Liu XS, Carroll JS, Janne OA, Keeton EK, Chinnaiyan AM, Pienta KJ, Brown M (2007) A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell* 27:380-392.
- Wang X, Zhang Y, Kong L, Xie Z, Lin Z, Guo N, Strong JA, Meij JT, Zhao Z, Jing N, Yu L (2005b) RSEP1 is a novel gene with functional involvement in neuropathic pain behaviour. *Eur J Neurosci* 22:1090-1096.
- Wang Z, Wei H, Yu Y, Sun J, Yang Y, Xing G, Wu S, Zhou Y, Zhu Y, Zhang C, Zhou T, Zhao X, Sun Q, He F (2004) Characterization of Ceap-11 and Ceap-16, two novel splicing-variant-proteins, associated with centrosome, microtubule aggregation and cell proliferation. *J Mol Biol* 343:71-82.
- Weake VM, Workman JL (2008) Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29:653-663.
- Weinl V (2003) Untersuchungen zur Dlk-spezifischen Histon Phosphorylierung. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Welsbie DS, Xu J, Chen Y, Borsu L, Scher HI, Rosen N, Sawyers CL (2009) Histone deacetylases are required for androgen receptor function in hormone-sensitive and castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 69:958-966.
- Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA (2000) RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett* 485:195-199.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.
- Winter S, Simboeck E, Fischle W, Zupkovitz G, Dohnal I, Mechtler K, Ammerer G, Seiser C (2008) 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO J* 27:88-99.
- Wu RC, Feng Q, Lonard DM, O'Malley BW (2007) SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock. *Cell* 129:1125-1140.
- Xu K, Shimelis H, Linn DE, Jiang R, Yang X, Sun F, Guo Z, Chen H, Li W, Kong X, Melamed J, Fang S, Xiao Z, Veenstra TD, Qiu Y (2009) Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination. *Cancer Cell* 15:270-282.

- 
- Yankulov K, Yamashita K, Roy R, Egly JM, Bentley DL (1995) The transcriptional elongation inhibitor 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription factor IIH-associated protein kinase. *J Biol Chem* 270:23922-23925.
- Yeh S, Lin HK, Kang HY, Thin TH, Lin MF, Chang C (1999) From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5458-5463.
- Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, Gibbs RA, Weinstock G, Wheeler DA (2004) Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res* 14:580-590.
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3:973-982.
- Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM (1994) A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem* 269:13115-13123.
- Zilliagus J, Wright AP, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA (1995) Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol* 9:389-400.

---

## VERÖFFENTLICHUNGEN

---

**Felten, A.**<sup>1</sup>, Leister, P.<sup>1</sup>, Burgdorf, S., Uhlmann, L. and Scheidtmann KH. (2007): Characterization of rat BLOS2/Ceap, a putative yeast She3 homolog, as interaction partner of apoptosis antagonizing transcription factor/Che-1. *Biol. Chem.* 388: 569-82

Leister, P., **Felten, A.**, Chasan, Al. and Scheidtmann, KH. (2008): ZIP kinase plays a crucial role in androgen receptor-mediated transcription. *Oncogene* 27: 3292-300

**Felten, A.** and Scheidtmann, KH.: On the mechanism of ZIP kinase, AATF and TSG101 in androgen receptor-mediated transcription. (Manuskript in Vorbereitung)

<sup>1</sup>= Geteilte Erstautorenschaft

---

## POSTER UND FACHTAGUNGEN

---

**Felten A.**, Leister P. and Scheidtmann KH: Novel Coactivators of Androgen Receptor: AATF and ZIP-Kinase. 59. Mosbacher Kolloquium „Epigenetics“ der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM) 2008, Mosbach

**Felten A.** and Scheidtmann KH: Interplay of ZIP-Kinase, AATF and TSG101 in Androgen Receptor-mediated Transcription. 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) 2009, Konstanz

**Felten A.** and Scheidtmann KH: Interplay of ZIP-Kinase, AATF and TSG101 in Androgen Receptor-mediated Transcription. Trinationale Herbsttagung “Signal Transduction and Disease” der GBM 2009, Aachen

## **LEBENS LAUF**

## DANKSAGUNG

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ganz herzlich danken!

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Unterstützung, für die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen, sowie die konstruktive Kritik beim Erstellen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Walter Witke danke ich für seine Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen.

Prof. Dr. Norbert Koch und Prof. Dr. Martin Reuter danke ich für ihre Teilnahme an der Promotionskommission als fachnaher und fachangrenzender Gutachter.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Scheidtmann möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Laboratmosphäre bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an Gerd für seine Unterstützung bei allen Fragen und Problemen und für die Durchführung des einen oder anderen Kinaseassays. Anne danke ich für die vielen Anregungen, bereichernden Diskussionen und Korrekturlesen. Dominik, Peter, Achmet und Steve danke ich für die Bereicherung des Laboralltags.

Ein großer Dank geht auch an alle übrigen Institutsmitglieder insbesondere an Silke und Gertrud für die immerwährende Hilfsbereitschaft und für ihr stets offenes Ohr. Vielen Dank Miriam für Deine Freundschaft.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund Dominik, die mich während dieser Arbeit und dem gesamten Studium auf ihre Art unterstützt haben und immer für mich da waren.

## ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

---

Andrea Felten

Bonn, September 2010