

**Institut für Experimentelle Genetik  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,  
Neuherberg**



**Funktionelle Analyse der humanen und murinen  
17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7**

Thomas Ohnesorg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Jerzy Adamski  
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 31.03.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.06.2005 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1. <i>Regulationsmechanismen der Genexpression</i> .....	10
1.1.1. Die transkriptionelle Regulation.....	11
1.2. <i>Die Herstellung einer Knock-out-Maus</i> .....	13
1.2.1. Knock-out durch homologe Rekombination.....	14
1.2.2. Von mutierten embryonalen Stammzellen zur Knock-out-Maus.....	14
1.3. <i>Cholesterin</i> .....	15
1.3.1. Cholesterin im adulten Organismus.....	15
1.3.2. Cholesterin in der Embryonalentwicklung.....	17
1.3.3. Störungen der embryonalen Cholesterinbiosynthese.....	17
1.3.3.1. CHILD-Syndrom.....	18
1.3.3.2. CDPX2.....	18
1.3.3.3. SLOS.....	19
1.4. <i>Steroidhormone</i> .....	20
1.5. <i>17<math>\beta</math>-Hydroxysteroiddehydrogenasen</i> .....	21
1.5.1. 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 (HSD17B7).....	23
1.6. <i>Zielsetzung der Arbeit und Erwartungen</i> .....	25
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
2.1. <i>Versuche zur Generierung einer 17<math>\beta</math>-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7-Knock-out Maus</i> .....	26
2.1.1. Bestimmung der genomischen Organisation und Sequenzierung der mhsd17b7.....	27
2.1.2. Restriktionsanalyse.....	28
2.1.3. Allgemeine Strategie zur Konstruktion der KO-Vektoren.....	28
2.1.4. Konstruktion der KO-Vektoren.....	29
2.1.5. Genotypisierungsstrategie.....	30
2.1.6. Transfektion embryonaler Stammzellen.....	32
2.1.7. Blastozysteninjektion und Embryonentransfer.....	33
2.1.8. Mauszucht.....	33
2.2. <i>Identifizierung potentieller Proteininteraktoren mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems (Y2H)</i> .....	34
2.2.1. Klonierung der Köderkonstrukte.....	34
2.2.2. Transformation der Köderkonstrukte in <i>S. cerevisiae</i> AH109.....	34
2.2.3. Test auf Selbstaktivierung des Köderkonstrukts.....	35
2.2.4. Qualitative Überprüfung der in Y187 vortransformierten Maus-d11-cDNA-Bank.....	35
2.2.5. Mating.....	36
2.2.6. Überprüfung der $\alpha$ -Galaktosidaseaktivität.....	36
2.2.7. Isolierung der cDNA tragenden Plasmide.....	37
2.2.8. Sequenzierung der Beuteplasmide.....	37
2.2.9. Retransformation in AH109 zur Verifizierung positiver Interaktoren.....	39
2.3. <i>Promotoranalyse in Maus und Mensch</i> .....	40
2.3.1. Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts.....	40
2.3.1.1. Primer-Extension-Analyse.....	41
2.3.1.2. 5' RACE.....	42
2.3.2. Dual Luciferase Assays (DLAs).....	43
2.3.2.1. Optimierung der Transfektion.....	44

2.3.2.2.	Minimalpromotor Feinkartierung .....	45
2.3.3.	Bioinformatische Analyse der potentiellen Promotorregionen: Genomatixsoftware .....	52
2.3.3.1.	PromotorInspector.....	53
2.3.3.2.	MatInspector.....	53
2.3.3.3.	Vergleich mit anderen Genen: Frameworker .....	55
2.3.4.	Experimentelle Bestätigung der bioinformatischen Ergebnisse .....	56
2.3.4.1.	DNaseI-Footprinting .....	56
2.3.4.2.	Auswirkungen verschiedener spezifischer Mutationen auf die Luciferaseaktivität ..	58
2.3.4.3.	Einfluß verschiedener Medienzusammensetzungen und Zusatzstoffe auf die transkriptionelle Aktivität der HSD17B7-Promotoren .....	64
2.3.4.4.	Einfluss von Activator Protein 2 (AP2) auf die transkriptionelle Aktivität .....	70
2.3.4.5.	Die Suche nach dem Auslöser der Induktion und den verantwortliche Transkriptionsfaktoren.....	71
2.3.4.6.	Nachweis der Bindung von Transkriptionsfaktoren an entsprechende Bindungsstellen: Gelshifts und Supershifts.....	75
<b>3.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
3.1.	<i>Promotoranalyse</i> .....	83
3.1.1.	Die genomische Organisation der mhsd17b7 und Vergleich der beiden humanen Kopien .....	83
3.1.2.	Die Aufklärung der transkriptionellen Regulation der humanen und murinen 17 $\beta$ -Hydroxsteroiddehydrogenase Typ 7.....	85
3.1.2.1.	Vergleich der Promotoren von Mensch und Maus.....	89
3.1.2.2.	Die identifizierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen und ihre bekannten Funktionen.....	94
3.1.2.3.	Die Funktionen der identifizierten TFs bei der Regulation der HSD17B7 .....	98
3.1.3.	Vergleich mit anderen Genen.....	107
3.1.3.1.	Vergleich mit Genen der Steroidhormonsynthese .....	107
3.1.3.2.	Vergleich mit Genen der Cholesterinbiosynthese.....	110
3.2.	<i>Ergebnisse des Yeast-Two-Hybrid Screens (Y2H)</i> .....	116
3.3.	<i>Knock-out Maus</i> .....	122
<b>4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>125</b>
4.1.	<i>Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Bakterien</i> .....	125
4.1.1.	Nährmedien .....	125
4.1.2.	Hemmstoffe und Medienzusätze .....	125
4.1.3.	Zellanzucht .....	126
4.1.4.	Stammhaltung und Lagerung .....	126
4.1.5.	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation von Plasmid-DNA .....	126
4.2.	<i>Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Hefen</i> .....	128
4.2.1.	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	128
4.2.2.	Stammhaltung und Lagerung .....	129
4.2.3.	Arbeitstechniken mit Hefe-Plasmiden.....	130
4.2.4.	Das Hefe Gal4 Two-Hybrid-System .....	132
4.3.	<i>Arbeiten mit Säugetierzellkulturen</i> .....	136
4.3.1.	Kultivierung von HeLa-, HEK 293- und HepG2-Zellen .....	136
4.3.2.	Kultivierung von HEPA1-6-Zellen .....	136
4.3.3.	Auftauen der Zellen .....	136
4.3.4.	Splitten konfluenter Zellen .....	136
4.3.5.	Einfrieren der Zellen .....	137
4.3.6.	Dual Luciferase Assay (DLA) .....	137
4.4.	<i>Spezielle Methoden zur Kultivierung von embryonalen Stamm-zellen (ES-Zellen) und Generierung der mhsd17b7-Knock-out-Maus</i> .....	139
4.4.1.	Allgemeines zu ES-Zellen.....	139
4.4.2.	Kultivierung und Splitten der ES-Zellen.....	139
4.4.3.	Elektroporation von ES-Zellen.....	140

4.4.4.	Picken der ES-Zellkolonien .....	140
4.4.5.	Einfrieren der ES-Zellen .....	140
4.4.6.	Lyse von ES-Zellen für Genotypisierung .....	141
4.4.7.	Kultivierung der Stammzellen für Blastozysteninjektion .....	142
4.4.8.	Blastozysteninjektion und Transfer in pseudoschwangere CD1-Weibchen .....	142
4.4.9.	Mauszucht .....	142
<b>4.5.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden mit DNA</b> .....	<b>143</b>
4.5.1.	Präparation von Plasmid-DNA .....	143
4.5.2.	Reinigung von DNA-Fragmenten .....	143
4.5.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA in wässrigen Lösungen .....	144
4.5.4.	Fällen von DNA .....	144
4.5.5.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen .....	144
4.5.6.	Ligation .....	145
4.5.7.	DNA-Sequenzierung .....	145
4.5.8.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	145
4.5.9.	PCR-basierte Mutagenese: QuikChange .....	145
4.5.10.	Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung .....	145
4.5.11.	Southern Blots .....	147
<b>4.6.</b>	<b>Methoden mit RNA</b> .....	<b>151</b>
4.6.1.	Gewinnung von RNA aus Zelllinien .....	151
4.6.2.	Primer Extension .....	151
4.6.3.	5'-RACE: Rapid Amplification of 5' cDNA Ends .....	152
<b>4.7.</b>	<b>Methoden zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren (TF) an ihre Bindungsstellen</b> .....	<b>152</b>
4.7.1.	Herstellung von Nuklearextrakten .....	152
4.7.2.	DNaseI-Footprinting .....	152
4.7.3.	Gel- und Supershifts .....	152
<b>4.8.</b>	<b>Bioinformatische Methoden</b> .....	<b>155</b>
4.8.1.	MatInspector .....	155
4.8.2.	PromotorInspector .....	155
4.8.3.	EIDorado .....	155
4.8.4.	FrameWorker .....	156
<b>5.</b>	<b>Material und Organismen</b> .....	<b>157</b>
5.1.	Bakterien- und Hefestämme .....	157
5.2.	Zelllinien .....	157
5.3.	Vektoren .....	157
5.4.	Enzyme .....	158
5.5.	Antikörper .....	158
5.6.	Proteine .....	158
5.7.	Radionuklide .....	158
5.8.	Chemikalien, Zusatzstoffe, Seren und Medien .....	159
5.9.	Laborgeräte .....	160
5.10.	Verwendete Kits .....	161
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>162</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>171</b>
	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>176</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>177</b>

# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Analyse der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 (HSD17B7). Sowohl dem humanen wie auch dem murinen Enzym wurde bislang eine duale Funktionalität im Cholesterin- und Steroidhormonstoffwechsel zugeschrieben, und zwar die Katalyse der Reaktionen von Zymosteron zu Zymosterol und von Estron zu Estradiol. Zudem war eine für Cholesterinbiosynthese-Gene typische Expression des Enzyms in neuronalem Gewebe während der Embryonalentwicklung der Maus bekannt.

Als potentielle Interaktionspartner der murinen Hsd17b7 auf Proteinebene während der Embryonalentwicklung wurden in dieser Arbeit mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid*-Experiments u. a. mehrere Proteine identifiziert, die für Aufbau und Funktion von neuronalem Gewebe unerlässlich sind. Dies korreliert mit dem bekannten Expressionsmuster in der Embryogenese.

Für die Analyse der Genfunktionen *in vivo* sollte eine *hsd17b7-Knock-out*-Maus generiert werden. Trotz der Herstellung einer phänotypisch viel versprechenden chimären Maus ist es im Rahmen der Arbeit nicht gelungen, eine entsprechende Mauslinie zu erhalten. Mit großer Wahrscheinlichkeit führt die Mutation des *hsd17b7*-Gens bereits heterozygot zu einem letalen Phänotyp. Dies steht nur zum Teil in Einklang mit bereits beschriebenen Mutanten der postsqualenen Cholesterinbiosynthese. In Hinblick auf die duale Funktion des Enzyms erscheint allerdings ein bereits im heterozygoten Zustand letaler Phänotyp wahrscheinlich.

Mit Hilfe eingehender Promotorstudien konnten in dieser Arbeit entscheidende Einblicke in die transkriptionelle Regulation des humanen und murinen *HSD17B7*-Gens gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität beider Gene unmittelbar vom Cholesterin-, nicht jedoch vom Estradiolspiegel abhängt. Die Cholesterinantwort wird durch einen in der vorliegenden Arbeit identifizierten *Enhancer*, dessen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen funktionell bestätigt wurden, vermittelt. Außerdem weist der *Enhancer* deutliche Übereinstimmungen zu bereits beschriebenen *Enhancern* mehrerer anderer Gene der Cholesterinbiosynthese auf, deren Expression ebenfalls vom Cholesterinspiegel abhängt. Im Vergleich mit untersuchten Genen des Steroidhormon-Metabolismus konnten beim humanen *HSD17B7*-Promotor weder in experimenteller noch in bioinformatischer Hinsicht Gemeinsamkeiten nachgewiesen werden. Beim Promotor des murinen Homologs konnten bioinformatisch zwar entsprechende Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen gefunden, experimentell jedoch nicht bestätigt werden. Daher wird hier postuliert, dass das humane Gen *in vivo* nur an der Cholesterinbiosynthese beteiligt ist. Für das murine Gen der Hsd17b7 ist die beschriebene duale Funktion durchaus denkbar.

Die vorliegende Arbeit ermöglicht zum ersten Mal Einblicke in die tatsächliche *in vivo* Funktionalität der humanen und murinen HSD17B7. Die Entdeckung mehrerer neuronaler Proteine als Interaktoren der murinen Hsd17b7 ist ein erster wichtiger Schritt zur Erlangung neuer Erkenntnisse über die Rolle von Cholesterin bzw. der Regulation seiner Biosynthese während der Entstehung und bei der Funktion von neuronalem Gewebe. Die erzielten Ergebnisse der Promotorstudien und der Versuche zur Herstellung einer *hsd17b7-Knock-out*-Maus unterstreichen die zentrale metabolische Bedeutung der HSD17B7 im Menschen und in der Maus.

## ABSTRACT

The aim of this study was the functional analysis of 17 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 7 (HSD17B7). Up to now, functional duality in cholesterol (conversion from zymosterone to zymosterol) and in steroid hormone metabolism (conversion from estrone to estradiol) was assigned to both murine and human HSD17B7. Prior to this work, also the distinct pattern of HSD17B7 expression, typical for genes of cholesterol biosynthesis, had been shown.

For the first time, this study could identify potential interaction partners of murine *Hsd17b7* during embryogenesis on protein level in a Yeast-Two-Hybrid screen. Several of the identified proteins are essential for assembly and function of neuronal tissue correlating with the aforementioned expression pattern.

For analysis of gene function *in vivo*, a *Hsd17b7-Knock-out*-mouse should be generated. Despite yielding a promising chimera, an accordant mutant mouse line could not be bred in the line of this work. Most likely, the null-mutation in the *Hsd17b7*-gene is lethal already in heterozygous mice. This is only partly consistent with priorly described mutants of postsqualene cholesterol biosynthesis. Taking into account the dual functionality of the enzyme and its task to convert estrone to estradiol, lethality in heterozygous mice is likely.

By means of in depth promoter studies, this work could lead to decisive comprehension of transcriptional regulation in both murine and human HSD17B7 gene. I could show that the promoter activity of both homologues is directly contingent on cholesterol but not estradiol concentration. The answer to low cholesterol concentration is mediated through an newly identified enhancer whose transcription factor binding sites have been functionally approved. The enhancer comprises significant similarities with priorly described enhancers of other cholesterol biosynthesis genes whose expression depends upon cholesterol concentration as well. Experimentally and bioinformatically, no similarities of the human HSD17B7 promoter could be shown in terms of comparison with scrutinized genes of steroid hormone metabolism. For the murine promoter, respective transcription factor binding sites could be identified bioinformatically but not be experimentally approved. This leads to the postulation that *in vivo*, the human *HSD17B7* enzyme is involved only in cholesterol biosynthesis but corroborates the hypothesis of dual functionality for the murine enzyme.

For the first time, this study leads to insights on *in vivo* functionality of human and murine HSD17B7 enzyme. The identification of several neuronal proteins as interactors makes an important move towards involvement of cholesterol and regulation of its biosynthesis during neurogenesis. The results of the studies on the promoter and *Knock-out* of this enzyme emphasize the crucial metabolic role of *HSD17B7* in both human and mouse.

# Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREBP	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
FBS	Fötales Rinderserum
FCS	Fötales Kälberserum
gfp	<i>Green fluorescent protein</i>
HNF4	<i>Hepatic nuclear factor 4</i>
Hsd	Hydroxysteroiddehydrogenase
kb	Kilobasenpaare
KO	<i>Knock-out</i>
LB	Luria Bertani
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NF-Y	<i>Nuclear Factor Y</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDR	<i>Short-chain dehydrogenase reductase</i>
SF1	<i>Steroidogenic Factor 1</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit)
UTR	Untranslatierte Region
üN	über Nacht
V	Volt
VDR	Vitamin D-Rezeptor
w/v	Weight/volume (Gewicht/Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Regulationsmechanismen der Genexpression

Das Genom einer Zelle enthält eine Vielzahl verschiedener Gene (z. B. *E.coli* ca. 1.000, Säugetiere ca. 30.000). Durch die komplexere Struktur der Gene (kodierende Exons und nichtkodierende Introns) können bei Eukaryonten durch alternatives Splicing aus manchen Genen viele unterschiedliche Produkte entstehen (bei Säugern wird die Zahl der Proteine auf 100.000 geschätzt). Für die korrekte Funktion einer Zelle, pro- oder eukaryotisch, ist es von entscheidender Bedeutung, dass aus der im Genom „gespeicherten“ Information für die Herstellung vieler verschiedener Genprodukte nur die benötigten in der jeweils erforderlichen Menge vorhanden sind. Die Vielzahl der möglichen Produkte verdeutlicht alleine schon die Komplexität der nötigen Vorgänge. Hinzu kommt, dass in mehrzelligen Organismen, durch das Auftreten spezialisierter Zellen, nicht jede Zelle des Organismus dieselben Genprodukte in gleicher Menge benötigt. Andererseits muss es einer Zelle, bzw. bei Eukaryonten auch einem Organ oder dem ganzen Organismus, möglich sein auf Veränderungen, sei es durch Reize von außen, Stoffwechselbedingungen oder Änderungen innerhalb des Organismus (z. B. Schwangerschaft), in angemessener Weise und Geschwindigkeit zu reagieren. Des Weiteren bestehen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien eines Organismus (embryonal, juvenil, adult) erhebliche Unterschiede bezüglich der benötigten Genprodukte. Störungen der korrekten Genexpression können zu schweren Krankheiten oder gar zum Tod des Organismus führen.

Für eine stringente Kontrolle der Genexpression stehen den Zellen verschiedene Ebenen der Regulation zur Verfügung (Abbildung 1). Neben der in dieser Arbeit untersuchten transkriptionellen Regulation zählen hierzu die posttranskriptionelle (manchmal auch als co-transkriptionell bezeichnete) Kontrolle durch alternatives Splicing und mRNA-Abbauraten, posttranslationelle Modifikationen und epigenomische Effekte, um nur die wichtigsten zu nennen. Besonders entscheidend ist hierbei die Regulation der Transkription, die dafür sorgt, dass nur die Information der jeweils benötigten Gene abgelesen wird und die Produktion nicht notwendiger Genprodukte zum jeweiligen Zeitpunkt oder auch am jeweiligen Ort unterdrückt wird. Den Zellen ermöglicht dies u.a. Energie und Platz zu sparen. Nachteile der transkriptionellen Regulation sind jedoch der Zeitbedarf vom Ablesen eines Gens bis zum funktionellen Genprodukt; zudem handelt es sich dabei um eine eher grobe Regulation. Für eine schnellere und feinere Regulierung dient der Zelle vor allem die posttranslationelle Ebene. Bereits gebildete Genprodukte können durch Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung, Bindung eines Liganden oder Spaltung in ihre aktive oder inaktive Form überführt werden. Von ganz entscheidender Bedeutung für das Wohl einer Zelle ist das korrekte

Zusammenspiel der verschiedenen Ebenen, da Störungen einer Ebene nur bedingt durch die übrigen kompensiert werden können.

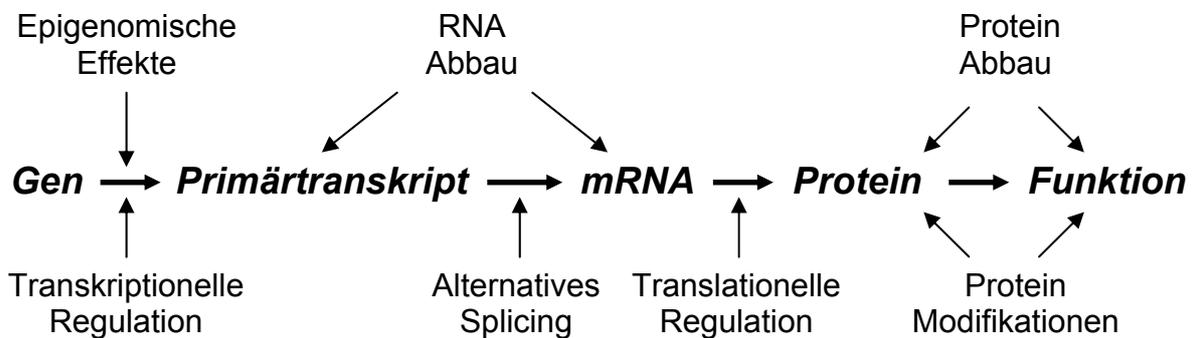


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Regulationsebenen der Genexpression. Durch epigenomische Mechanismen können Gene komplett „abgeschaltet“ werden. Proteinmodifikationen steuern im Allgemeinen nicht die Menge, sondern die Aktivität der Proteine.

### 1.1.1. Die transkriptionelle Regulation

Jede RNA im Organismus wird von einer DNA-spezifischen RNA-Polymerase gebildet. In Eukaryonten sind davon drei Typen beschrieben. Typ I ist für die Produktion von ribosomaler RNA (rRNA) zuständig, die als Bestandteil der Ribosomen und damit der Proteinherstellung in jeder Zelle gebildet wird. Typ III wird für die Herstellung von z. B. tRNAs benötigt. Nahezu alle proteinkodierenden Gene werden von der RNA-Polymerase II in RNA abgeschrieben.

Damit eine DNA-Sequenz von einer RNA-Polymerase transkribiert werden kann, ist das Vorhandensein eines Promotors nötig. Ein Promotor enthält regulatorische Sequenzen, an die Transkriptionsfaktoren (TFs), und damit auch die RNA-Polymerase, binden können. In den meisten Fällen besteht ein eukaryotischer Promotor aus verschiedenen Bestandteilen. Als Basiselement dient der sogenannte Core(Kern)-Promotor, der üblicherweise für ein basales, meist jedoch geringes Expressionsniveau eines Gens zuständig ist. Ohne ihn ist eine Transkription nicht möglich. Dieser Bereich befindet sich typischerweise in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunkts und umfasst kaum mehr als 100bp. Bei vielen, aber nicht allen Genen, befindet sich hier u.a. eine TATA-Box, eine Initiatorsequenz sowie ein „downstream promotor element“ (DPE).

Sogenannte „noncore promotor elements“ befinden sich bei manchen Genen innerhalb dieses Bereichs, überwiegend jedoch etwas strangaufwärts davon (im Bereich -50 bis -200). Dazu gehören beispielsweise Bindungsstellen der ubiquitären Transkriptionsfaktoren SP1 (GC-Boxen) und NF-Y (CCAAT-Boxen). Sowohl SP1 als auch NF-Y sind neben ihrer Funktion bei der basalen Transkription oftmals auch für regulatorische Effekte (mit)verantwortlich.

Die bisher beschriebenen Bestandteile werden oft als proximaler Promotor bzw. proximale Promotorregion oder basaler Promotor bezeichnet. Die Analyse dieses Bereichs ermöglicht meist keine eindeutige Aussage über die transkriptionelle Regulation bzw. die möglichen Funktionen der Genprodukte. Lediglich Hinweise auf das basale Expressionsniveau und die Einordnung als „*Housekeeping Gen*“ sind damit zu erhalten. Im Zusammenhang mit der Regulation sind die so genannten „*Enhancer*“ und „*Silencer*“ die wesentlich wichtigeren Bestandteile von Promotoren.

*Enhancer* haben positiv regulatorische Funktion und erhöhen das Transkriptionsniveau teilweise erheblich. Sie bestehen mindestens aus einer, oft jedoch aus mehreren regulatorischen Sequenzelementen, sowohl für ubiquitäre, als auch für gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren (TFs) und können sich in unmittelbarer Nähe des proximalen Promotors, aber auch sehr weit entfernt (mehrere Kilobasen) davon befinden. *Enhancer* sind für die Induktion der Transkription über das basale Level hinaus verantwortlich, z. B. bei unterschiedlichen Bedingungen oder in spezifischen Geweben. Die Identifizierung bereits bekannter *Enhancer*-Strukturen kann wertvolle Hinweise auf generelle und gewebsspezifische Funktion(en) des untersuchten Gens ergeben.

*Silencer* befinden sich oft in unmittelbarer Nähe des Kern-Promotors. Die Bindung des entsprechenden negativ regulierenden TFs an den *Silencer* verhindert oder erschwert die Bindung bzw. das Ablesen durch die RNA-Polymerase oder anderer wichtiger TFs. Ebenso ist es möglich, dass TFs mit positiv und negativ regulierenden Funktionen direkt um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren.

*Silencer* können aber auch außerhalb des Kern-Promotors liegen, z. B. innerhalb von Introns. Das Zusammenspiel von *Silencern* und *Enhancern*, sowie die Interaktionen mit den Kern-Promotorelementen, sind für die gebildete Menge der entsprechenden mRNA verantwortlich. Problematisch bei der Identifizierung von *Enhancern* und *Silencern* kann die große Varianz ihrer möglichen Lokalisation sein. Es ist daher nicht erstaunlich, dass diese des Öfteren eher zufällig entdeckt werden.

In Prokaryonten werden verschiedene Gene eines Stoffwechselweges oft direkt hintereinander im Genom kodiert und können auf einer einzigen mRNA abgebildet werden (polycistronische mRNA). Das bedeutet, dass für die Transkription dieser Gene nur ein Promotor benötigt wird (ein gut charakterisiertes Beispiel ist das *lac*-Operon). Meist wird für die Transkription eines prokaryotischen Gens nur ein einziger TF (Sigma-Faktor) rekrutiert.

Bedeutend komplexer ist die transkriptionelle Regulation bei Eukaryonten. Polycistronische mRNAs sind hier nur selten vorhanden, auch sind Gene eines Stoffwechselweges oftmals nicht in unmittelbarer Nähe, sondern sogar auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Deswegen benötigt jedes Gen einen eigenen Promotor. Aufgrund verschiedener Funktionen ein und desselben Genprodukts und möglicher Gewebsspezifitäten können Gene auch unter

der Kontrolle mehrerer verschiedener Promotoren stehen. Bisher ist dies bei 28% der untersuchten Säuger-Gene der Fall (laut Genomatix Software AG). Die Zusammensetzung bzw. der Abstand der einzelnen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen unterscheidet sich von Gen zu Gen und ist meist abhängig von der Funktion des Genprodukts. Verschiedene Gene, deren Produkte Bestandteile z. B. eines bestimmten Stoffwechselweges sind, zeichnen sich in ihren Promotorregionen oftmals durch gemeinsame regulatorische Sequenzen und eine ähnliche Organisation aus. Dadurch kann eine Zelle auf einen Reiz hin durch einen einzigen Mechanismus ganze Kaskaden von Genen anschalten. Besonders gut ist dieser Mechanismus u. a. in Bezug auf Gene des Cholesterinbiosyntheseweges untersucht (Brown and Goldstein, 1997; Horton *et al.*, 2002). Eine umfassende Analyse aller Facetten der transkriptionellen Regulation, in allen Geweben, während unterschiedlicher Entwicklungsstadien und Bedingungen, ist extrem aufwendig. In den allermeisten Fällen wird deswegen nur ein Ausschnitt untersucht, in bestimmten Zelllinien oder unter definierten Bedingungen. Daher ist ein gewisses Maß an bereits vorhandenem Wissen über das betreffende Genprodukt notwendig. Ansonsten wären entsprechende Experimente mit der vielbeschworenen Suche nach der „Stecknadel im Heuhaufen“ zu vergleichen. Andererseits kann die Entdeckung bereits beschriebener und spezifischer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in einem Promotor erste Hinweise auf die Funktion des betreffenden Gens liefern.

## 1.2. Die Herstellung einer *Knock-out*-Maus

Zur Untersuchung der Funktionen eines Gens bei der Maus bietet sich die Herstellung einer *Knock-out*-Maus an. Mit ihrer Hilfe ist die Analyse nicht redundanter Funktionen des zu untersuchenden Gens möglich.

Nach aktuellem Stand der Forschung gibt es mehrere Möglichkeiten zur Generierung von *Knock-out*-Mäusen. Man kann dabei zwischen ungerichteten (zufälligen) und gezielten Methoden unterscheiden. Zu den ungerichteten gehören z. B. Mutagenesen durch radioaktive Strahlung oder verschiedene chemische Substanzen und der Einsatz von Transposons. Der Vorteil dieser Methoden ist der geringere Zeitaufwand bei der Durchführung. Der größte Nachteil ist allerdings das aufwendige Lokalisieren der Mutationen. Diese Methoden eignen sich vor allem für Hochdurchsatz-Analysen.

Eine weitere Möglichkeit zur gezielten Analyse von Genfunktionen ist das immer mehr in Mode kommende sogenannte *gene silencing* durch den Einsatz von interferierender RNA. Dabei werden meist kurze spezifische RNA-Stücke in Zellen eingebracht, wodurch es zum Abbau der komplementären mRNA kommt. Dieses Verfahren führt zu einer Reduktion der Genexpression von bis zu max. 90%. Daher spricht man nicht von einem *Knock-out* im klassischen Sinne, sondern von einem *Knock-down*. Des Weiteren gestaltet sich der Einsatz

dieser Methode in ganzen Organismen bis heute recht schwierig. Daher wird sie überwiegend in Zellkulturexperimenten eingesetzt.

Die Methode der Wahl für einen gezielten *Knock-out* ist die der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen und wird trotz ihrer Schwierigkeiten und des großen Zeitaufwands noch immer als Standardmethode zur Aufklärung von Genfunktionen eingesetzt.

### **1.2.1. Knock-out durch homologe Rekombination**

Die Methode der homologen Rekombination nutzt einen natürlichen Vorgang, der z. B. während der Meiose vorkommt. In konservierten Bereichen der Chromosomen der Eltern kommt es dadurch zum Austausch genetischen Materials. Homologe Rekombination findet jedoch auch bei Prokaryonten statt und ist ein äußerst wichtiger Mechanismus der Evolution. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass es sich dabei nicht um eine zufällige, sondern eine gerichtete Mutagenese handelt. Der größte Nachteil ist der hohe Zeitaufwand. Für diesen Ansatz benötigt man einen sogenannten *Knock-out*-Vektor. Dieser enthält klassischerweise zwei Abschnitte der Sequenz des entsprechenden Gens (im Folgenden Arme genannt), die zur homologen Rekombination mit der nativen Gensequenz benötigt werden. Zwischen den beiden Armen befindet sich ein Antibiotika-Resistenzgen. Dies führt zur Unterbrechung der nativen Gensequenz und damit zu dem gewünschten *Knock-out*. Des Weiteren ermöglicht es die Positivselektion in embryonalen Stammzellen. Zur Negativselektion, und damit zum Nachweis der korrekten homologen Rekombination, wird normalerweise das Thymidinkinase-Gen (*tk*) verwendet. Dies befindet sich im Vektor außerhalb der Arme. Im Falle der korrekten Insertion des Vektors in das Genom der Maus wird dieses nicht mitintegriert und folglich in den Stammzellen abgebaut. Gibt man dem Wachstumsmedium ein Substrat der Thymidinkinase zu, führt dies nur dann zum Tod der Zellen, wenn das funktionelle *tk* vorhanden ist. Abhängig von der Konstruktion des *Knock-out*-Vektors kann eine Zerstörung des Gens, ein *Frameshift* oder ein „Ausschneiden“ bestimmter Teile (Exons und Introns) des Gens erreicht werden. Außerdem besteht bei dieser Methode die Möglichkeit durch eine *inframe*-Fusion Reportergene (z. B. *gfp* oder *lacZ*) unter der Kontrolle des endogenen Promotors einzufügen, um das Expressionsmuster des ausgeschalteten Gens in der *Knock-out*-Maus zu untersuchen.

### **1.2.2. Von mutierten embryonalen Stammzellen zur Knock-out-Maus**

Nach Überprüfung der erfolgten homologen Rekombination werden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) entweder mit Morulae aggregiert oder in Blastozysten injiziert. Anschließend erfolgt der Transfer der modifizierten Morulae oder Blastozysten in

pseudoschwangere Ammenmäuse (Embryonentransfer). Pseudoschwangere Weibchen erhält man durch die Verpaarung mit vasktomierten Männchen. Da die embryonalen Stammzellen üblicherweise aus *Agouti*-Mausstämmen gewonnen werden (*Agouti* steht für eine dominant braune Fellfarbe), die Morulae bzw. Blastozysten jedoch aus *non-Agouti*-Mausstämmen, kann bei den aus den Embryonentransfers entstandenen Nachkommen auf einfache Weise anhand der Fellfärbung auf das Vorhandensein der Mutation geschlossen werden. Nachkommen mit *Agouti*-Anteil im Fell werden als Chimäre bezeichnet. Da jedoch in den Chimären nicht alle Zellen den gewünschten *Gen-Knock-out* im Genom enthalten, werden chimäre Männchen (die verwendeten ES-Zellen haben männlichen Genotyp) mit Wildtyp-Weibchen verpaart. Daraus entstehende Nachkommen mit brauner Fellfarbe (*Agouti*) sind heterozygot für den *Knock-out*. Sofern lebensfähig und fertil werden die heterozygoten Mäuse miteinander verpaart um schließlich homozygote *Knock-out*-Mäuse zu erhalten und untersuchen zu können.

## **1.3. Cholesterin**

### ***1.3.1. Cholesterin im adulten Organismus***

Cholesterin nimmt in der Physiologie eine besondere Stellung ein. Aufgrund der zentralen Rolle im Stoffwechsel ist es lebensnotwendig; Störungen des Cholesterinhaushalts werden mit vielen verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. Nebenbei bemerkt ist Cholesterin das am höchsten ausgezeichnete Molekül, es wurden bereits 13 Nobelpreise in seinem Zusammenhang vergeben.

Cholesterin ist nicht nur als Vorstufe der Steroidhormone und Gallensäuren für Vertebraten von entscheidender Bedeutung, sondern auch in seiner Funktion als Regulator der Membranfluidität und Bestandteil der Plasmalipoproteine. Abhängig vom Zelltyp befinden sich bis zu 90% des zellulären Cholesterins in den Membranen (Woollett, 2001). Viele Vorgänge innerhalb von Zellen finden in oder an Membranen statt. Durch Veränderungen des Cholesteringehalts der Membranen können daher verschiedenste Prozesse empfindlich gestört bzw. verhindert werden, z. B. die Exo- und Endozytose (Yeagle, 1989). Je nach Ausmaß der Beeinträchtigung kann dies sogar zum Tod der Zelle führen. Medizinisch ist Cholesterin nicht nur im Zusammenhang mit Membranfunktionen von großer Bedeutung: ist im Blut Cholesterin in zu großer Menge vorhanden, bilden sich Ablagerungen, sog. Plaques. In den Arterien führt dies zu Arteriosklerose. Vieles deutet darauf hin, dass der Cholesteringehalt im Gehirn und im Plasma für die Ausprägung der Alzheimerschen Krankheit mit

entscheidend ist Die z. Z. meist diskutierten und mit am häufigsten eingesetzten Arzneimittel bei dieser Krankheit sind Cholesterin- oder Lipidsenker (Statine).

Cholesterin kann in großen Mengen mit der Nahrung aufgenommen werden, allerdings sind Vertebraten in der Lage Cholesterin auch in ausreichendem Umfang ausgehend von Acetyl-CoA *de novo* zu synthetisieren. Dazu ist eine Vielzahl an Enzymen notwendig. In Abb. 2 ist ein Ausschnitt der Syntheseschritte und der benötigten Enzyme dargestellt. Cholesterin wird in nahezu allen Zellen produziert, den größten Anteil liefert allerdings die Leber (Baynes und Dominiczak, 1999). Von dort wird es über die Blutbahn in Form von Lipoproteinen im Körper verteilt. Im gesunden Körper wird bei ausreichender Cholesterinzufuhr durch die Nahrung die endogene Synthese herabgesetzt. Störungen in diesem Mechanismus werden für überhöhte Cholesterinwerte verantwortlich gemacht. Eine gewisse Sonderstellung hat das Gehirn, obwohl es nur etwa 2% des Körpergewichts beim Menschen ausmacht, beinhaltet es etwa 23% des gesamten Cholesterins (Dietschy and Turley, 2001). Da jedoch Lipoproteine die Blut-Hirn-Schranke kaum überwinden können (Danik *et al.*, 1999; Simons *et al.*, 2001), muss das meiste Cholesterin vom Gehirn selbst gebildet werden.

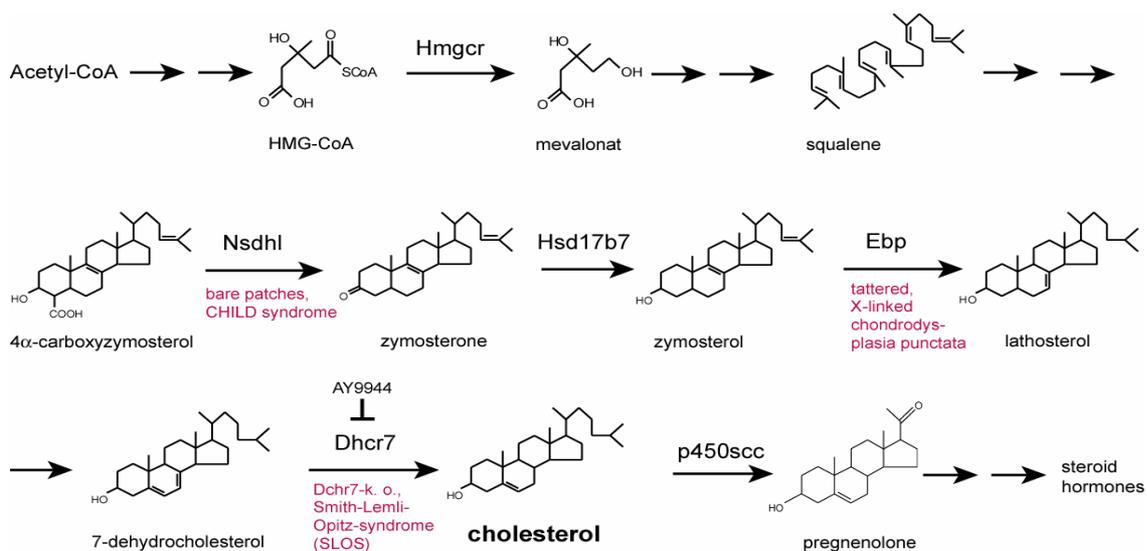


Abb. 2: Schematische Darstellung ausgewählter Schritte der Cholesterinbiosynthese nach Laubner, 2001. Bekannte Krankheiten und Mausmodelle sind unter den Enzymnamen aufgeführt. Die Substanz AY9944 ist ein spezifischer Inhibitor der Dhcr7. Die Gabe dieser Substanz erzeugt einen SLOS-Phänotyp in Ratten (Kolf-Claw *et al.*, 1996).

Im Organismus wird die *de novo* Synthese durch die Transkriptionsfaktoren *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) reguliert. Bislang sind drei Formen der SREBPs bekannt, SREBP1a und 1c, zwei Transkriptvarianten desselben Gens, und SREBP2. SREBPs werden als membranständige Vorläufer gebildet. Bei sinkendem Cholesterinspiegel in der Zelle werden die Vorläufer durch *SREBP cleavage activating proteins* (SCAP) gebunden, wodurch die anschließende Spaltung durch zwei Proteasen ermöglicht wird

(Brown and Goldstein, 1997). Durch die Spaltung entstehen aktivierte Transkriptionsfaktoren, die die Expression verschiedener Gene der Cholesterinbiosynthese steigern, z. B. *HMGCR*, *EBP* und *DHCR7* (s. Abb.2). Daneben kommt es aber auch zur vermehrten Bildung des LDL-Rezeptors (Sanchez *et al.*, 1995). SREPBs fördern also nicht nur die endogene Synthese, sondern auch die Aufnahme von exogenem Cholesterin.

### **1.3.2. Cholesterin in der Embryonalentwicklung**

Cholesterin spielt nicht nur im adulten Organismus eine wichtige Rolle, sondern auch während der Embryonalentwicklung. Durch die enorme Wachstumsrate während der Embryonalentwicklung wird vom sich entwickelnden Fötus eine große Menge an Cholesterin für den Aufbau der Membranen und als Vorläufer der Steroidhormone und Gallensäuren benötigt. Eine weitere wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung stellt die Aktivierung des Morphogens *Sonic Hedgehog* dar. Cholesterin bindet an den C-Terminus von *Sonic Hedgehog* (Porter *et al.*, 1996) und ermöglicht so die Verankerung in Membranen (Gallet *et al.*, 2003) und damit die biologische Funktionalität des Morphogens. *Sonic Hedgehog* ist beispielsweise für die korrekte Rechts-Links-Asymmetrie und die neuronale Entwicklung von entscheidender Bedeutung (Chiang *et al.*, 1996; Ericson *et al.*, 1995; Ho and Scott, 2002; Hynes *et al.*, 1995).

Cholesterin wird zum Teil von der Mutter bereitgestellt (exogene Quelle), jedoch auch vom Fötus selbst *de novo* synthetisiert (endogene Quelle). Allerdings sind beide Quellen für die Entwicklung essentiell. Versiegt eine Quelle, kann sie von der anderen nicht vollständig ersetzt werden. Dies konnte anhand verschiedener Mausmodelle und untersuchter menschlicher Krankheitssyndrome gezeigt werden (Hanaka *et al.*, 2000; Herz and Farese, 1999; Willnow *et al.*, 1996).

Lange Zeit wurde angenommen, dass das meiste Cholesterin im Embryo ebenfalls in der Leber gebildet wird. Durch die untersuchten Phänotypen von Mäusen mit Defekten in der Cholesterinbiosynthese, sowie entsprechender Krankheitsbilder beim Menschen, bestand daran jedoch Zweifel. Mittlerweile konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass die überwiegende embryonale Cholesterinproduktion in neuronalem Gewebe sowie in apoptotischen Bereichen, wie z. B. den interdigitalen Regionen, stattfindet (Laubner *et al.*, 2003).

### **1.3.3. Störungen der embryonalen Cholesterinbiosynthese**

Störungen der embryonalen Cholesterinbiosynthese führen gemäß der zentralen metabolischen Bedeutung zu schweren Missbildungen des Fötus. Bisher sind zwei prä-squalene (*mevalonic aciduria* und Ausfall der Squalensynthase) und fünf postsqualene

Defekte (SLOS, Desmosterolose, Lathosterolose, CDPX2 und CHILD) bekannt. Im Folgenden sind die häufigsten näher beschrieben.

#### 1.3.3.1. CHILD-Syndrom

Beim Menschen wurde dieses Fehlbildungssyndrom 1980 erstmals unter dem Namen „congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects“ (CHILD-Syndrom) beschrieben (Happle *et al.*, 1980). Die Ursache dieser Erkrankung sind Mutationen im *NAD(P)H-steroid dehydrogenase like*-Gen (*NSDHL*), das für eine 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, die an der Demethylierung von 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol beteiligt ist, kodiert (Konig *et al.*, 2000). Dieses Gen ist sowohl beim Menschen als auch bei der Maus auf dem X-Chromosom lokalisiert. Für männliche Träger der Mutation ist CHILD letal, bei heterozygoten Patientinnen zeigen sich schwere Fehlbildungen, wie z. B. ein unilateraler entzündlicher Nävus, der scharf entlang der Körperachse abgegrenzt ist, verkürzte oder fehlende Gliedmaßen, Gehirndefekte, Dysplasie aller skelettalen Strukturen, sowie Defekte der Nieren, der Lunge und des Herzens (Herman, 2000; Kelley, 2000).

Für CHILD sind zwei Mausmodelle beschrieben, *bare patches* und *striated*. Wie beim Menschen sind auch bei der Maus von diesen Mutationen betroffenen Männchen nicht lebensfähig. Je nach genetischem Hintergrund des Mausstamms sterben hemizygoten Männchen und homozygote Weibchen zwischen Tag 9,5 und 16,5 der Embryonalentwicklung. Der Phänotyp der *bare patches* Mäuse ist dem des menschlichen Syndroms sehr ähnlich. Es treten Kleinwüchsigkeit, Katarakte, Gaumenspalte, Hautveränderungen, Chondrodysplasia punctata und Camptodaktylie auf. In seltenen Fällen sind weiße Flecken im Fell erkennbar (Liu *et al.*, 1999). Bei den *striated* Mäusen treten ähnliche Symptome wie bei *bare patches* auf, allerdings in milderer Form. Der Grund dafür ist, dass die Mutation zu einem Protein mit größerer enzymatischer Restaktivität führt.

#### 1.3.3.2. CDPX2

CDPX2, auch Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom genannt, wird durch Mutationen im Gen für das Emopamil-bindende-Protein (EBP) verursacht (Derry *et al.*, 1999). Dieses Gen ist ebenfalls auf dem X-Chromosom lokalisiert. Das Produkt dieses Gens ist eine Sterol- $\Delta 7,8$ -isomerase, die Zymosterol in Cholesta-7,24-dienol umwandelt. Die Phänotypen für CDPX2 und CHILD sind einander sehr ähnlich. Jedoch, während bei CHILD die Symptome unilateral auftreten, sind bei CDPX2 mitunter beide Körperhälften betroffen, das Fehlen kompletter Gliedmaßen tritt hier nicht auf (Konig *et al.*, 2000).

Das entsprechende Mausmodell wird als *tattered* bezeichnet und entspricht weitgehend dem *bare patches* Phänotyp. Die hemizygoten Männchen sterben zwischen Tag 12,5 und 18,5 der Schwangerschaft (Derry *et al.*, 1999), also etwas später als bei *bare patches*. Allgemein sind die Auswirkungen der Mutation etwas geringer. Dies wird vermutlich dadurch bedingt, dass trotz Akkumulierung von Zwischenprodukten der Plasmacholesterinspiegel erstaunlicherweise kaum verändert ist (Derry *et al.*, ebd.).

### 1.3.3.3. SLOS

SLOS, die Abkürzung für das „Smith-Lemli-Opitz-Syndrom“, wurde bereits 1964 beschrieben (Smith *et al.*, 1964). Allerdings konnte erst 1993 nachgewiesen werden, dass es sich dabei um einen metabolischen Defekt in der Cholesterinbiosynthese handelt (Irons *et al.*, 1993). 1998 konnte schließlich gezeigt werden, dass bei SLOS-Patienten Mutationen im 7-Dehydrocholesterinreduktase-Gen (DHCR7) vorliegen (Fitzky *et al.*, 1998; Wassif *et al.*, 1998). DHCR7 wandelt 7-Dehydrocholesterin in Cholesterin um und ist somit für den letzten Schritt der Cholesterinbiosynthese verantwortlich. SLOS wird biochemisch durch einen niedrigen Cholesterinspiegel mit gleichzeitig stark erhöhten 7-Dehydrocholesterin-Werten definiert (Tint *et al.*, 1995). Das Syndrom tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:20000 bei Neugeborenen auf (Honda *et al.*, 1998).

Von diesem Defekt betroffene Patienten leiden an einer Vielzahl verschiedener körperlicher Beeinträchtigungen, die jedoch bezüglich ihrer Schwere stark variieren. Zu den am häufigsten beobachteten Symptomen zählen: geistige Retardierung, Mikrognathia, milde Formen von Holoprosenzephalie, Polydaktylie an den Händen, Gaumenspalte, cranofaciale Fehlbildungen, Myelinisierungsstörungen, Syndaktylie des 2. und 3. Zehs, Katarakte, sowie Herz-, Lungen- und Nierendefekte. Während die bisher beschriebenen Mausmutanten ähnlich der humanen Krankheitssyndrome waren, zeigen sich bei *dhcr7-Knock-out*-Mäusen deutliche Unterschiede zu SLOS-Patienten. Zwar sind auch bei den Mäusen Gaumenspalten, geringere Körpergrößen und Gesichtsmisbildungen zu erkennen, es treten jedoch keine offensichtlichen Defekte in Gehirn, Herz, Niere, Ganglien, Gliedmaßen oder Lunge auf. Allerdings sterben betroffene Mäuse kurz nach der Geburt, wahrscheinlich an der Unfähigkeit, Nahrung aufzunehmen (Wassif *et al.*, 2001). Obwohl keine morphologischen Auffälligkeiten zu beobachten waren, deuten verschiedene Symptome auf neurologische Defekte hin (unkoordiniertes Saugen und Schlucken, eingeschränkte Beweglichkeit). Die biochemischen Parameter entsprachen denen des humanen Syndroms.

## 1.4. Steroidhormone

Hormone sind chemische Signalstoffe, die zur Kommunikation zwischen den physiologischen Einheiten und zur Steuerung der komplexen Vorgänge in multizellulären Organismen benötigt werden. Die Hormone werden je nach Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt. Eine dieser Gruppen bilden die in Vertebraten unabhömmlichen Steroidhormone, die sich vom Cholesterin ableiten und mehrere Klassen bilden: neben den Geschlechtshormonen (Estrogene mit 18 Kohlenstoffatomen (C), Androgene mit 19 C, Gestagene mit 21 C) sind dies die Mineral- und Glucocorticoide (beide 21 C) und die Hormone der Vitamin D-Gruppe mit 26 C (Abb.3).

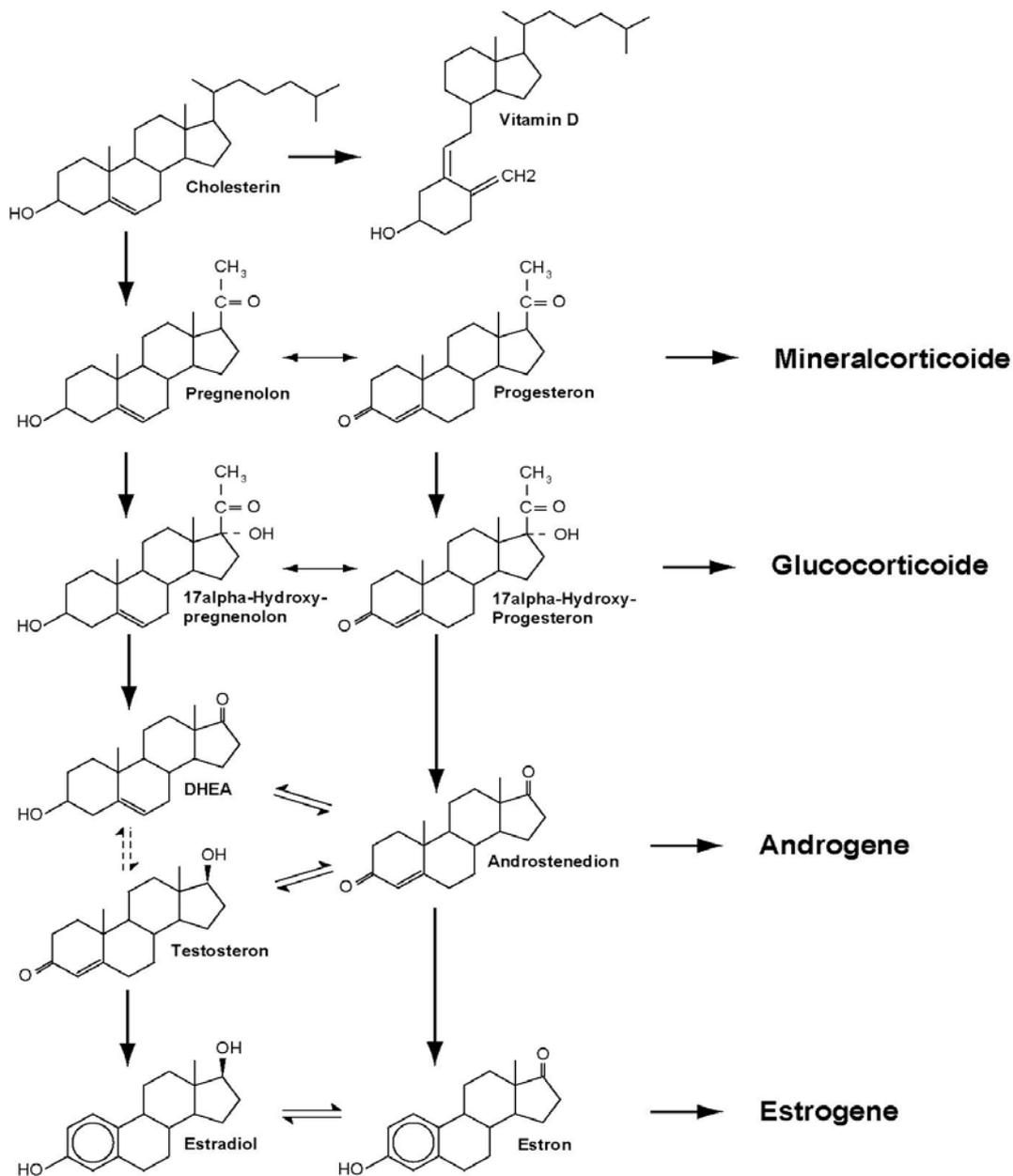


Abb. 3: Synthesewege der Steroidhormone ausgehend von Cholesterin.

Steroidhormone können ihre Wirkung auf endokrinem, parakrinem und intrakrinem Weg vermitteln. Beim endokrinen Wirkmechanismus werden die Hormone über den Blutkreislauf zu den Zielorganen transportiert. Beim intrakrinem (Labrie, 1991) bzw. parakrinem Weg haben sie ihre Wirkung direkt in der produzierenden Zelle bzw. in der nahen Umgebung. Dies geschieht ohne Beteiligung des Blutkreislaufs. Nach dem Eintritt in die Zielzelle vermitteln Steroidhormone ihre Wirkung durch die Bindung an spezifische intrazelluläre Rezeptoren. Nach der Bindung des Hormons dissoziiert das Begleitprotein vom Rezeptor ab, der Hormon-Rezeptor-Komplex dimerisiert und wird in den Zellkern transloziert, wo er als Transkriptionsfaktor wirkt und die Genexpression verändert. Neben diesem genomischen Wirkmechanismus ist auch eine nicht-genomische Wirkung bekannt, die innerhalb weniger Sekunden nach der Hormongabe auftritt. Dabei wurde beschrieben, dass Hormone nach der Bindung an ihren Rezeptor bestimmte Kinasen aktivieren können. Allerdings sind bezüglich des Mechanismus der nicht-genomischen Wirkung von Steroidhormonen noch viele Fragen offen (Losel *et al.*, 2003).

Die Aufgaben der Steroidhormone liegen in der Geschlechtsdetermination, aber auch in der Erhaltung der Schwangerschaft, der Regulation des Blutdrucks und der Hämatopoese, der Knochenentwicklung und dessen Umbau, der Differenzierung der Hautzellen und der Aufrechterhaltung des Elektrolytgleichgewichts. Störungen des Steroidhormonhaushaltes können zu schwerwiegenden Krankheiten wie beispielsweise Prostata- und Brustkrebs, Arteriosklerose, Fettsucht oder Pseudohermaphroditismus führen. Außerdem wird die Entwicklung von Nebennierenhyperplasie, Diabetes und Osteoporose entscheidend beeinflusst. Für Stressreaktionen im positiven und negativen Sinne sind mit den Corticoiden ebenfalls Steroidhormone entscheidend.

Die Expression vieler Gene im Steroidmetabolismus wird durch den Transkriptionsfaktor SF1 (Steroidogenic Factor 1) reguliert. Dieser sorgt, ähnlich wie SREBP bei der Cholesterinbiosynthese, für ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau. Die Bedeutung von SF1 wird dadurch erkennbar, dass bei SF1-*Knock-out* Mäusen ein komplettes Fehlen der Gonaden und der Nebenniere zu beobachten ist (Parker, 1998).

## 1.5. 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen

17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen (17 $\beta$ -HSDs) katalysieren Oxidations- und Reduktionsreaktionen im Stoffwechsel verschiedener Steroidhormone wie den Androgenen und Estrogenen. Dabei greifen sie am C17 des Steroidgerüsts an und überführen dort Ketogruppen in Hydroxygruppen und umgekehrt. Dadurch regulieren sie das biologische Potential dieser Verbindungen (Abbildung 4). Um Substrat oder Produkt einer 17 $\beta$ -HSD zu sein, muss die C17-Hydroxy-Gruppe in  $\beta$ -Konformation vorliegen. Bislang wurde davon

ausgegangen, dass die 17 $\beta$ -HSDs unter physiologischen Bedingungen immer nur eine der beiden theoretisch möglichen Reaktionen katalysieren, entweder Oxidation oder Reduktion (Andersson and Moghrabi, 1997). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass manche Enzyme auch beide Reaktionen ermöglichen (Khan *et al.*, 2004).

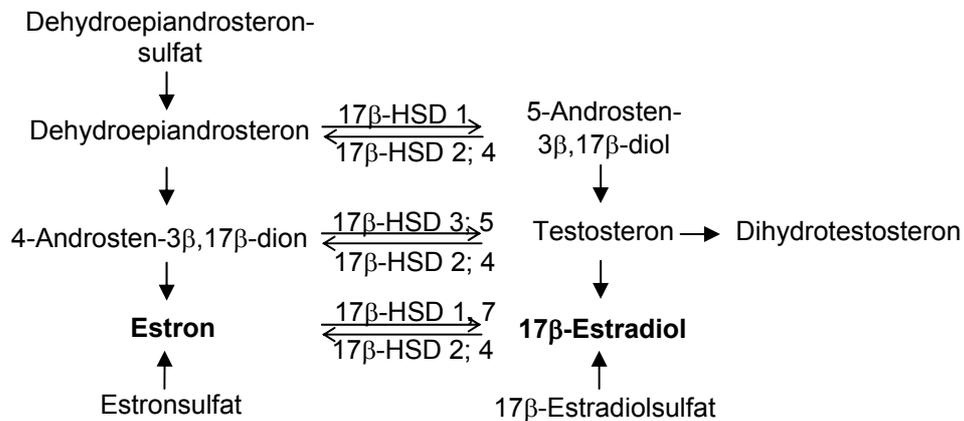


Abb. 4: Schematische Darstellung der von ausgewählten 17 $\beta$ -HSDs katalysierten Reaktionen im Steroidmetabolismus.

Beim Menschen sind bis zum heutigen Zeitpunkt zehn 17 $\beta$ -HSDs charakterisiert, bei der Maus sogar zwölf. Die verschiedenen 17 $\beta$ -HSDs unterscheiden sich voneinander in Gewebe- und Substratspezifität, Enzymkinetik und Richtung der katalysierten Reaktion.

17 $\beta$ -HSD6 und 17 $\beta$ -HSD9 sind bei der Maus, nicht aber beim Menschen bekannt. Beim Menschen existieren hierzu homologe Proteine, die jedoch Reaktionen im Retinoid-Stoffwechsel katalysieren.

Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen lassen sich zwei Proteinfamilien, den Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) (Jornvall *et al.*, 1995) und den Aldo-Keto-Reduktasen (AKR), zuordnen. Außer der als AKR identifizierten 17 $\beta$ -HSD5 gehören alle bekannten 17 $\beta$ -HSDs zur SDR-Familie (Mindnich *et al.*, 2004; Peltoketo *et al.*, 1999; Penning, 1999).

Die klassischen SDRs bestehen aus etwa 250 Aminosäuren, die Gruppe der verlängerten (extended) aus bis zu 400 Aminosäuren (Kallberg *et al.*, 2002). Über die gesamte Länge findet sich innerhalb der Familie kaum Sequenzidentität (lediglich 20-30%). SDRs sind als Dimere oder Tetramere aktiv. Die monomeren Untereinheiten sind aus siebenfachen, parallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, die auf beiden Seiten von je drei  $\alpha$ -Helices flankiert sind. Die Cofaktor-bindende Rossmann-Falte (Rossmann *et al.*, 1974) ist ein strukturelles Merkmal für Enzyme, deren Cofaktor NAD<sup>+</sup> oder NADPH/H<sup>+</sup>; dies ist auch bei SDRs der Fall.

Gemeinsam sind den SDRs weiterhin vier stark konservierte Strukturmerkmale (Oppermann *et al.*, 2001):

- Die Nukleotidbindungsstelle im N-terminalen Bereich mit einem konservierten glycinreichen Motiv (**GXXXGXG**)
- Das NAG-Motiv (**DXXXNAG**) mit bislang ungeklärter Bedeutung, vermutet wird eine strukturstabilisierende Funktion
- Das aktive katalytische Zentrum (**YXASK**). Tyrosin, Asparagin, Serin und Lysin stellen die katalytische Tetrade dar
- Ein strukturstabilisierendes Motiv nahe dem C-Terminus (**PG**)

### 1.5.1. 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 (HSD17B7)

Die HSD17B7 wurde 1996 zuerst in der Ratte entdeckt und als Prolaktinrezeptor-assoziiertes Protein (PRAP) beschrieben (Duan *et al.*, 1996). Das Protein bindet an die kurze Form des Prolaktinrezeptors. Die Funktion blieb jedoch unklar. 1997 erfolgte die erste Beschreibung des homologen Proteins (89% Identität auf Proteinebene, ebenfalls 334 Aminosäuren) in der Maus als 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 (mHsd17b7). Zunächst wurde die Expression überwiegend in den Ovarien während der Trächtigkeit nachgewiesen, in geringerem Umfang jedoch auch in Leber, Plazenta, Brustdrüsen, Nieren und Hoden, sowie in Ovarien nicht-trächtiger Mäuse. Unterstützt durch den experimentellen Nachweis, dass das Enzym *in vitro* Estron in die biologisch aktivere Form 17 $\beta$ -Estradiol überführt (Abb. 4) und der gewebespezifischen Expression wurde für die mHsd17b7 eine wichtige Funktion bei der Erhaltung der Trächtigkeit postuliert. Ferner wurde vermutet, dass die mHsd17b7 die mHsd17b1 bei der Deckung des zusätzlichen Estradiolbedarfs während der Schwangerschaft unterstützt (Nokelainen *et al.*, 1998).

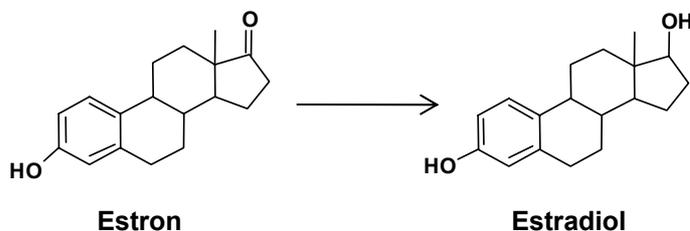


Abb. 5: Schematische Darstellung der Umwandlung von Estron zu Estradiol durch HSD17B7. Als Co-Faktor dient NADPH/H<sup>+</sup>.

Allerdings wurden beim Menschen zusätzlich zum oben beschriebenen Expressionsmuster große Mengen an hHSD17B7-ESTs (*Expressed sequence Tag*) sowohl in der Leber als auch in neuronalem Gewebe gefunden. Phylogenetische Analysen ergaben eine große Ähnlichkeit zwischen HSD17B7 und ERG27, einer 3-Ketosterolreduktase aus der Hefe (Breitling *et al.*, 2001). ERG27 katalysiert innerhalb des postsqualenen Ergosterolbiosynthesewegs die Synthese von Zymosterol aus Zymosteron (Gachotte *et al.*, 1999).

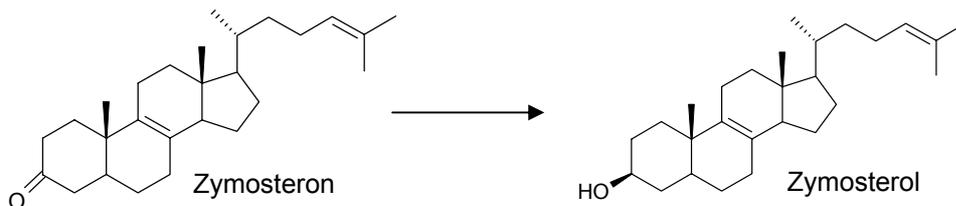


Abb. 6: Schematische Darstellung der Umwandlung von Zymosteron zu Zymosterol durch HSD17B7. Als Co-Faktor dient auch hier NADPH/H<sup>+</sup>.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die murine wie auch die humane 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 in der Lage sind, ERG27 in defizienten Hefestämmen zu ersetzen. Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 um das letzte bisher unbekannte Enzym der humanen postsqualenen Cholesterinbiosynthese handelt (Breitling *et al.*, 2001; Marijanovic *et al.*, 2003) (s. Abb. 2 und 6).

In einer später erschienenen Veröffentlichung wurde das Substratspektrum der humanen und murinen HSD17B7 erweitert. Neben der bereits bekannten Umwandlung von Estron zu Estradiol wurde auch die Umwandlung von Dihydrotestosteron zu 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol gezeigt. Zusätzlich wurden für das humane Enzym die Umwandlung von Progesteron zu 4-Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on, sowie von 20 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu 4-Pregnen-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol beschrieben (Torn *et al.*, 2003). Die Umsatzraten sind allerdings deutlich geringer als bei Estron zu Estradiol. Somit scheint das Enzym neben der ursprünglich entdeckten 17 $\beta$ -auch 3-Reduktase Funktionalität zu besitzen. Diese Aktivität wird auch für die Umwandlung von Zymosteron zu Zymosterol benötigt.

Das Gen für die 17- $\beta$  Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 liegt sowohl im humanen wie im murinen Genom auf Chromosom 1. Das menschliche Gen besteht aus 9 Exons und 8 Introns und umfasst insgesamt 21,8 kb. Die Co-Faktor-Bindungsstelle ist auf Exon 1 und 2 kodiert, das charakteristische NAG-Motiv auf Exon 3, Exon 5 enthält das aktive Zentrum und auf Exon 6 und 7 ist der für die Membranassoziiierung notwendige hydrophobe Bereich enthalten (Breitling *et al.*, 2001; Krazeisen *et al.*, 1999). Über die genomische Organisation des murinen Gens war zu Beginn der Arbeit noch nichts bekannt.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die umfassende funktionelle Analyse der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7, vor allem in Hinsicht auf die duale Funktionalität des Enzyms. Die beschriebene Beteiligung am Cholesterin- und Steroidstoffwechsel sollte durch verschiedene Methoden bestätigt oder widerlegt werden.

Zu diesem Zweck sollte mit Hilfe der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen eine *hsd17b7-Knock-out*-Maus generiert und charakterisiert werden. Aufgrund der beschriebenen Beteiligung der Hsd17b7 an der postsqualenen Cholesterinbiosynthese wurde ein vergleichbarer Phänotyp wie bei *bare patches*, *striated* oder *tattered* Mäusen erwartet. Mit Hilfe dieser *Knock-out*-Maus sollte der letzte noch fehlende Beweis für eine Beteiligung des Enzyms an der Cholesterinbiosynthese erbracht werden.

Desweiteren sollten mittels eines *Yeast-Two-Hybrid*-Experiments Proteininteraktoren der Hsd17b7 während der Embryonalentwicklung der Maus identifiziert werden. Aufgrund des beschriebenen Expressionsmusters vor allem in neuronalem Gewebe und bestimmten apoptotischen Regionen wurden dabei spezifisch neuronale oder an apoptotischen Vorgängen beteiligte Interaktoren erwartet.

Schließlich sollten durch eine umfassende Analyse der 5'-flankierenden Regionen (Promotorbereiche) der Gene bei Mensch und Maus mit bioinformatischen und experimentellen Ansätzen Einblicke in die transkriptionelle Regulation der Expression der Gene gewonnen werden. Durch den Vergleich mit Promotoren verschiedener Gene des Steroidstoffwechsels und der Cholesterinbiosynthese sollte eine Einordnung der HSD17B7 in einen oder beide Stoffwechselwege ermöglicht werden.

## 2. ERGEBNISSE

### 2.1. Versuche zur Generierung einer 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7-Knock-out-Maus

Zur Untersuchung der verschiedenen Funktionen der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7, vor allem im Hinblick auf die duale Funktion des Enzyms im Cholesterin- und Steroidhormonstoffwechsels, bot sich die Herstellung einer *Knock-out*-Maus an. Durch das spezifische „Ausschalten“ eines Gens können, im Gegensatz zu Untersuchungen an Zelllinien, die physiologischen Auswirkungen des Fehlens des entsprechenden Genprodukts auf den gesamten Organismus analysiert werden. Dementsprechend sollte mittels des *Knock-outs* die Analyse nicht redundanter Funktionen des Enzyms erfolgen.

Der *Knock-out* des 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7-Gens (*hsd17b7*) sollte mit Hilfe homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen erfolgen. Die Entwicklung der generellen Strategie sowie die Durchführung erfolgte im Wesentlichen nach Joyner (1993). Der für diesen Ansatz benötigte *Knock-out*-Vektor (KO-Vektor) enthält zwei Abschnitte der Sequenz des auszuschaltenden Gens zur homologen Rekombination mit der nativen Gensequenz benötigt. Aus Gründen der später notwendigen Genotypisierung sollten diese Abschnitte (Arme) unterschiedlich lang sein. Generell gilt: je länger die Arme, desto höher die Wahrscheinlichkeit des Rekombinationsereignisses. Allerdings gestaltet sich die Genotypisierung mittels PCR bei sehr langen Armen entsprechend schwierig. Daher wird üblicherweise ein kurzer Arm mit etwa 1-2kb und ein langer Arm mit etwa 5kb Länge verwendet. Zwischen den beiden Armen befindet sich ein Antibiotika-Resistenzgen. Dieses führt nach erfolgter homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen zur Unterbrechung der nativen Gensequenz und verhindert damit die Bildung eines funktionellen Genprodukts. Des Weiteren ermöglicht das Resistenzgen die Positivselektion der embryonalen Stammzellen. Um phänotypische Auswirkungen des Resistenzgens zu vermeiden, kann dieses von *loxP-Sites* flankiert werden. Dies ermöglicht später die Entfernung des Gens durch die *Cre*-Rekombinase. Zum Nachweis der erfolgten homologen Rekombination kann das Thymidinkinase-Gen (*tk*) verwendet werden. Dies befindet sich im Vektor außerhalb der Region der Arme. Gibt man dem Zellkulturmedium ein Substrat der Thymidinkinase zu (z. B. Ganciclovir), führt dies nur dann zum Tod der ES-Zellen, wenn das funktionelle *tk* vorhanden ist. Dies ist z. B. bei zufälliger Integration des KO-Vektors ins Genom, d. h. ohne korrekte homologe Rekombination, der Fall. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist ein Antibiotika-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien.

### 2.1.1. Bestimmung der genomischen Organisation und Sequenzierung der *mhsd17b7*

Für einen gezielten *Knock-out* ist es nötig, die genomische Struktur des Gens genau zu kennen. Da zu Beginn dieser Arbeit das Genom der Maus noch nicht vollständig sequenziert und vom *hsd17b7*-Gen nur die codierende Sequenz und ein kurzes Stück des 5' untranslatierten Bereichs (5'-UTR) bekannt war, wurde zunächst die genomische Struktur des Gens bestimmt. Als Grundlage wurde dabei die Struktur des menschlichen Gens verwendet (Krazeisen *et al.*, 1999). Das menschliche Gen besteht aus 9 Exons und 8 Introns. Ausgehend von der Annahme, dass die Genorganisation in der Maus ähnlich ist, wurden an den wahrscheinlichen murinen Exongrenzen Primer gelegt, um mit Hilfe der PCR die ungefähren Introngrößen zu bestimmen. Als Template diente der PAC-Klon U75992 (RZPD). Tabelle 1 zeigt das Ergebnis. Auch das *hsd17b7* Gen der Maus besteht aus mindestens 8 Exons und 8 Introns. Die ungefähren Introngrößen und der Vergleich mit dem menschlichen Gen sind in Tabelle 1 und Abbildung 7 dargestellt. Das murine Intron 8 konnte aus dem zur Verfügung stehenden Material nicht amplifiziert werden.

	Humane 17 $\beta$ -HSD7	Murine 17 $\beta$ -HSD7
Intron 1	2 kb	1,7 kb
Intron 2	3 kb	1,5 kb
Intron 3	1 kb	1,3 kb
Intron 4	1,6 kb	3,3 kb
Intron 5	3 kb	1,2 kb
Intron 6	0,8 kb	0,2 kb
Intron 7	1 kb	3,5 kb
Intron 8	8 kb	n. a.

Tabelle 1: Ungefähre Introngrößen der humanen und murinen *Hsd17b7* im Vergleich (n. a. nicht amplifizierbar).

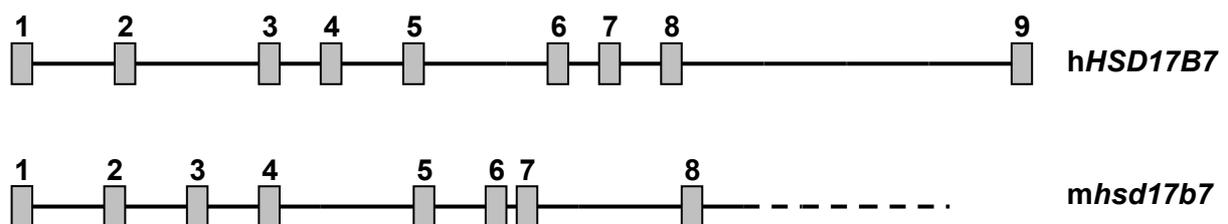


Abb. 7: Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *HSD17B7*-Gene in Mensch und Maus. Darstellung der Exons ist nicht maßstabsgetreu.

Im nächsten Schritt wurde die Sequenzierung der Introns mit den PCR-Primern begonnen und durch sogenanntes *Primer Walking* Schritt für Schritt fortgesetzt. Zur Vermeidung möglicher Sequenzierfehler wurde die Sequenzierung bei auftretenden Unsicherheiten sowohl in 5'- als auch 3'-Richtung durchgeführt und bei zweifelhaften Ergebnissen nochmals wiederholt. Die Sequenzen sämtlicher verwendeter Primer sind im Anhang aufgeführt. Insgesamt wurden ca. 14 kb des Gens sequenziert, beginnend bei etwa 2kb strangaufwärts des Startcodons bis hin zu Intron 8. Dabei stellte sich heraus, dass nicht die vollständige Gensequenz auf dem verwendeten PAC-Klon vorhanden ist und deswegen die Amplifikation des Introns 8 nicht möglich war. Für die weiteren Experimente stellte dies jedoch kein Hindernis dar. Die erhaltene Sequenz wurde vor der Veröffentlichung des Genoms der Maus unter der Zugangsnummer gi:20385195 in der NCBI Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) hinterlegt.

### **2.1.2. Restriktionsanalyse**

Zur Planung der Konstruktion der *Knock-out*-Vektoren, zur Auswahl eines verwendbaren Vektorgrundgerüsts und der Genotypisierungsstrategie war es unabdingbar, die natürlich vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme zu identifizieren. Dies geschah anhand der gewonnenen Sequenzdaten mit Hilfe der Software Analyze.PPC (Soft Gene GmbH, Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Kompatibilität der in der Gensequenz und dem Vektor vorhandenen Schnittstellen wurde in der vorliegenden Arbeit der Vektor pKO Scrambler NTKV1901 (Stratagene) als Grundgerüst verwendet.

### **2.1.3. Allgemeine Strategie zur Konstruktion der KO-Vektoren**

Das Ziel dieses Experiments war die vollständige Eliminierung der Funktionalität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 der Maus. Zu diesem Zweck musste ein geeigneter Bereich für die Insertion des KO-Vektors im Genom identifiziert werden. Die Analyse des Proteins zeigte, dass im Bereich von Exon 1 und 2 die Co-Faktor-Bindungsstelle, in Exon 5 das katalytische Zentrum und in Exon 6-8 der hydrophobe Bereich zur Assoziierung des Proteins mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums codiert wird (Breitling *et al.*, 2001). Es wurden zwei Vektoren konstruiert, einer davon mit den beiden Reportergenen *gfp* und *lacZ*, der andere ohne diese Gene. Der Grund für die Verwendung des Vektors ohne Reportergene war einerseits die Möglichkeit, dass das Vorhandensein der Reportergene einen Phänotyp erzeugt, der nicht auf den *Knock-out* des *hsd17b7*-Gens zurückzuführen ist, andererseits sollten technischer Schwierigkeiten vermieden werden, die durch die Größe des reportergentragenden Vektors bedingt sind. Aufgrund der Eigenschaften des Proteins und der verwendbaren Restriktionsschnittstellen in der genomischen Gensequenz wurden die

KO-Vektoren so konstruiert, dass es durch die homologe Rekombination zu einem Austausch der nahezu vollständigen Sequenz zwischen Exon 2 bis 3 durch das Neomycin-Resistenzgen kommt. Bei einem Überlesen der veränderten genomischen Region, d.h. bei alternativem Splicing und einer Verknüpfung der Sequenz von Exon 1 mit Exon 4, kann aus der so entstandenen *hsd17b7*-mRNA kein funktionelles Protein gebildet werden, da einerseits ein veränderter Leserahmen und andererseits keine funktionelle Co-Faktorbindungsstelle entsteht. Der KO-Vektor mit den beiden Reportergenen wurde derart zusammengefügt, dass es zusätzlich zu einer *inframe*-Fusion der promotorlosen Reportergene mit der verbliebenen codierenden Sequenz des *hsd17b7*-Gens kommt (Abb. 8). Dadurch stehen die Reportergene unter Kontrolle des nativen *hsd17b7*-Promotors. Dies ermöglicht die gezielte Analyse des Genexpressionsmusters in der *Knock-out*-Maus. Um Auswirkungen des *Neomycin*-Resistenzgens auf den Phänotyp der generierten Mäuse zu verhindern, wurde das *neo<sup>R</sup>*-Gen in beiden Vektoren von *loxP*-sites flankiert. Dies ermöglicht später die Entfernung des Resistenz-Gens durch die *Cre*-Rekombinase.

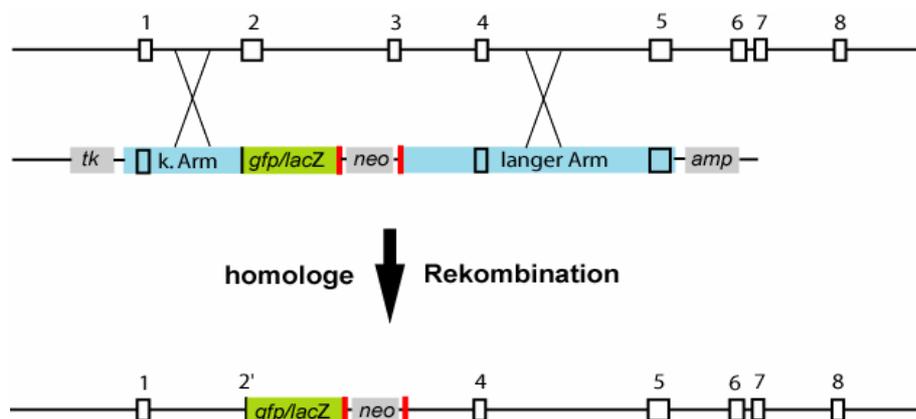


Abbildung 8: Nicht maßstabsgetreue schematische Darstellung der Auswirkungen der homologen Rekombination mit dem Reportergen-tragenden *Knock-out*-Vektor. Die Zahlen geben die entsprechenden Exons der *hsd17b7* an. Nach dem Rekombinationsereignis sind nur noch wenige Basen des Exons 2 enthalten (2'); Intron 2 und Exon 3 wurden durch die Reportergene *gfp/lacZ* und das von *loxP* sites flankierte *neo<sup>R</sup>* Gen ersetzt.

#### 2.1.4. Konstruktion der KO-Vektoren

Zur Erzeugung einer *hsd17b7*-*Knock-out* Maus wurden, wie oben bereits erwähnt, zwei Vektoren konstruiert. Der erste enthält die oben (siehe 2.1.) beschriebenen Bestandteile, der zweite enthält zusätzlich eine *inframe*-Fusion von *gfp* und *lacZ*, die unter der Kontrolle des nativen *hsd17b7*-Promotors steht.

Aufgrund der zusätzlichen Restriktionsschnittstellen innerhalb der *gfp* und *lacZ* Sequenzen konnten die Reportergene nicht direkt in den KO-Vektor eingebaut werden. Daher wurde die

*inframe*-Fusion der Gene mit der vorhandenen kodierenden Sequenz im kurzen Arm im Vektor pGem Zf3(+) durchgeführt. Die so erhaltene Sequenz wurde aus diesem Vektor ausgeschnitten und anschließend in den vorbereiteten KO-Vektor ligiert.

Der lange Arm der genomischen Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert und über in den Primern enthaltene Schnittstellen in den zuvor vorbereiteten Vektor ligiert. Die *loxP*-sites waren jeweils in den verwendeten PCR-Primern enthalten oder wurden nachträglich durch QuikChange-Mutagenese eingefügt. Die Klonierungsstrategie ist am Beispiel des Vektors mit den Reporter genen in Abb. 9 dargestellt.

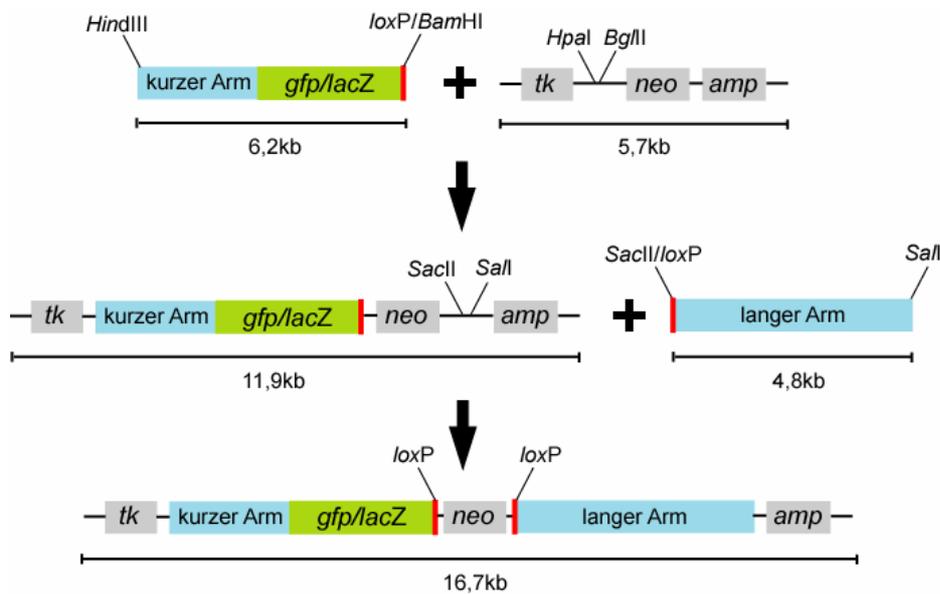


Abbildung 9: Klonierungsstrategie für den Reporter gen-tragenden *Knock-out*-Vektor

Die fertigen Vektoren wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf Fehlerfreiheit überprüft.

### 2.1.5. Genotypisierungsstrategie

Mit Hilfe der erstellten Restriktionskarte war es möglich, eine spezifische Genotypisierungsstrategie zu entwickeln. Dazu wurden zwei klassische Methoden eingesetzt, PCR und *Southern Blots*. Die folgenden Abbildungen (10-12) zeigen die Strategie, Abbildungen 13 und 14 ausgewählte Resultate.

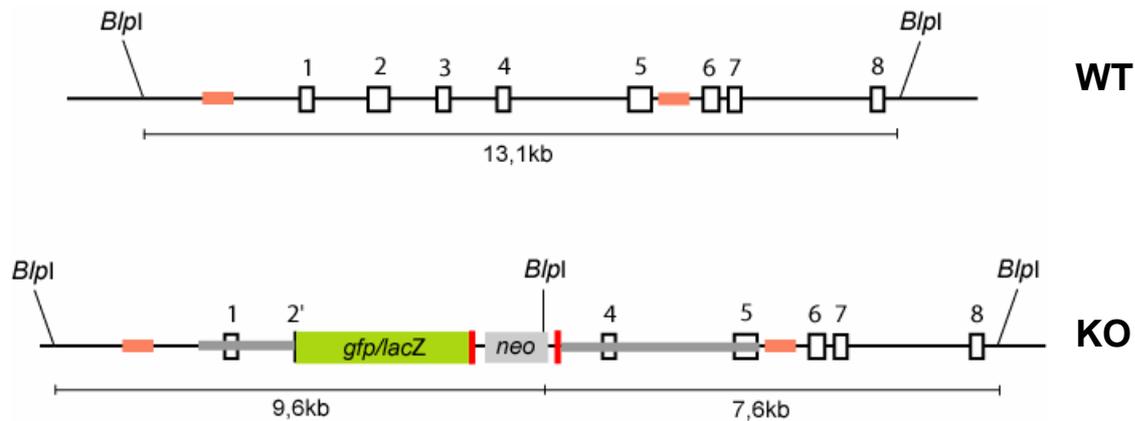


Abb. 10: Darstellung der Genotypisierung mit Hilfe von *Southern Blots*. Durch die Insertion des *neo<sup>R</sup>* Gens wird eine zusätzliche *BspI* Schnittstelle eingefügt. ■ Bindungsstelle der *Southern Blot* Sonden. Auf dem Vektor enthaltene Sequenzabschnitte sind grau dargestellt.

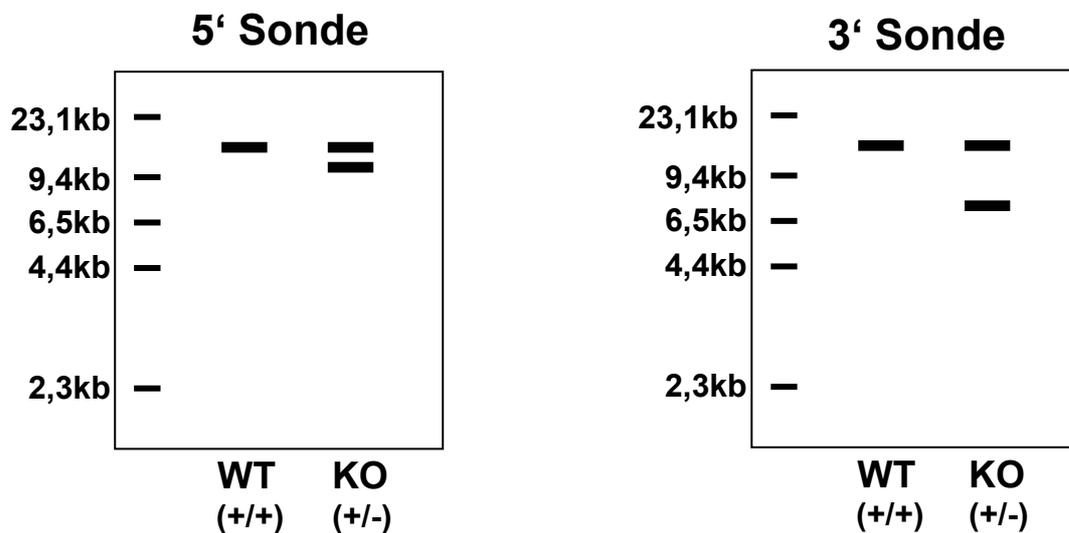


Abb. 11: Schematische Darstellung der erwarteten spezifischen Banden des *Southern Blots* mit den beiden verwendeten Sonden (in Abb. 10 gezeigt).

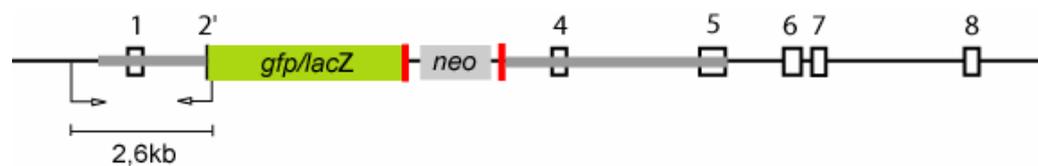


Abb. 12: Darstellung der Genotypisierung mit Hilfe der PCR. Da der *Reverse-Primer* innerhalb von *gfp* bindet, kann nur in Zellen mit erfolgreicher homologer Rekombination ein PCR-Produkt nachgewiesen werden.

### 2.1.6. Transfektion embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) des Typs TBV2 wurden mit 20 µg des jeweiligen linearisierten Vektors durch Elektroporation transfiziert. Anschließend wurden die Elektroporationsansätze 10 min auf Eis inkubiert und auf drei 10 cm Petrischalen mit Feederzellen aufgeteilt. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> wurde dem Wachstumsmedium G418 zur Positiv- und Gancyclovir zur Negativselektion zugegeben. Nach weiteren etwa 48 h begannen die ersten, mittlerweile zu Kolonien angewachsenen, ES-Zellen zu sterben bzw. sich abzulösen. Die Zellen wurden für insgesamt sechs Tage in Selektionsmedium belassen. Am 6. Tag der Selektion wurden die übriggebliebenen anhaftenden und morphologisch unauffälligen Kolonien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und auf 96-well-Platten mit Feederzellen überführt. Im ersten Versuch wurden jeweils 4 96-well-Platten von den beiden Ansätzen (Vektor mit bzw. ohne Reportergene) beimpft. Leider stellte sich bei der anschließenden Genotypisierung durch PCRs und *Southern Blots* heraus, dass kein einziger Klon den *Knock-out*-Vektor an der gewünschten Stelle im Genom trug. Daher wurde die Elektroporation der ES-Zellen mit dem Reportergen-tragenden KO-Vektor wiederholt. Diesmal wurden sechs 96-well-Platten beimpft und 7 Tage im Selektionsmedium inkubiert. Von den 576 gepickten ES-Zell-Klonen konnte bei einem mittels PCR und *Southern Blot* eine korrekte homologe Rekombination nachgewiesen werden (Abb. 13 und 14). Dieser Klon wurde für die Blastozysteninjektion kultiviert.

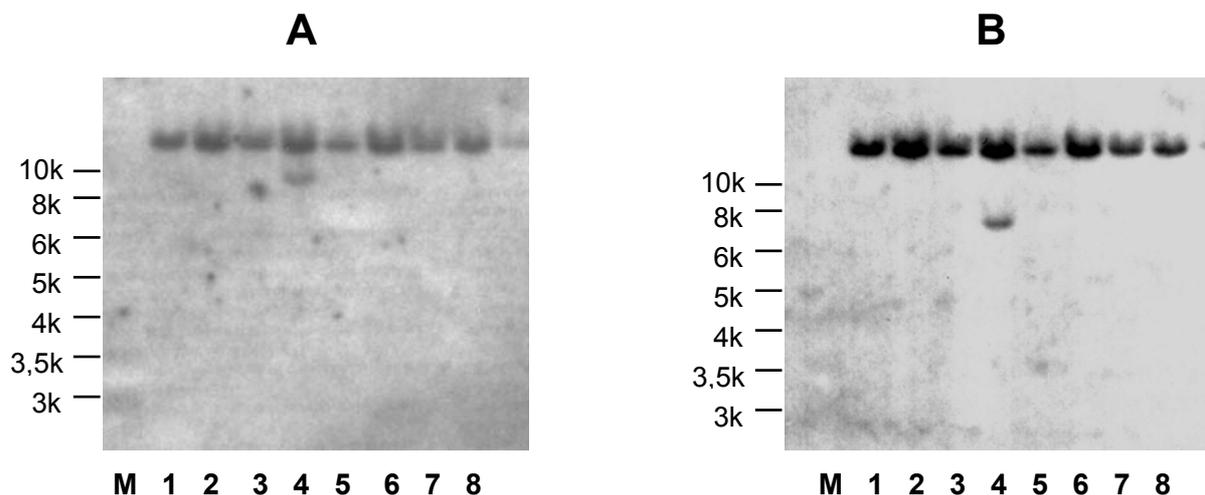


Abb. 13: Ergebnisse des *Southern Blots* mit 5'Sonde (A) und 3'Sonde (B) mit ausgewählten transfizierten Stammzellklonen. Bei allen Klonen ist die Wildtypbande gut zu erkennen (bei etwa 13kb). Einer der Klone (4) zeigt bei beiden Blots eine zusätzliche Bande.

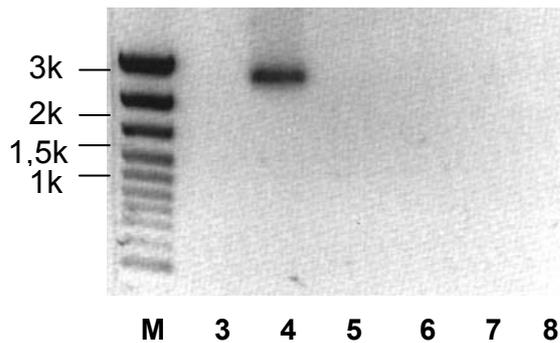


Abb. 14: Ergebnis der Genotypisierung mittels PCR. Nur einer der getesteten Klone (4) zeigt ein positives Ergebnis. Dieser entspricht dem in den Southern Blot identifizierten Klon.

### **2.1.7. Blastozysteninjektion und Embryonentransfer**

Die Blastozysteninjektion und der Embryonentransfer wurden im Institut für Entwicklungs-genetik an der GSF in Neuherberg durchgeführt. Dabei wurde der Klon mit der verifizierten Insertion auf gelatinisierten Kulturschalen kultiviert und nach Trypsinierung und Vereinzelung der Zellen in Blastozysten von Mausstämmen CD1, C57BL/6 und F1 injiziert. Anschließend wurden die behandelten Blastozysten in pseudoschwangere CD1-Weibchen transferiert.

### **2.1.8. Mauszucht**

Die aus der Blastozysteninjektion und dem anschließenden Transfer hervorgegangen chimären Männchen wurden ab dem Alter von etwa 7 Wochen mit Wildtyp C57BL/6 Weibchen verpaart. Die daraus entstandenen Nachkommen mit brauner (*Agouti*) Fellfarbe wurden mittels PCR und Southern Blots auf Tragen des *Knock-out*-Allels getestet. Dabei fiel auf, dass nur Chimären mit CD1-Hintergrund (ebenfalls *Agouti*) braune Nachkommen hatten. Von über 300 Nachkommen konnte bisher jedoch kein einziger Träger des *Knock-out* Allels identifiziert werden. Aufgrund dessen wurde zusätzlich eine Transfektion mit Stammzellen des Typs F1 durchgeführt. Wiederum wurde der KO-Vektor mit den Reportergenen verwendet. Diesmal konnten zwei positive Stammzellklone aus den 576 gepickten identifiziert werden, wobei der eine allerdings durch ungewöhnliches Aussehen und Wachstumsverhalten der Kolonien auffiel (es bildeten sich sehr schnell dunkle Kolonien mit ausgefränkter Morphologie, d. h. dass die Zellen wahrscheinlich ausdifferenziert waren). Daher wurde nur der andere Klon in Blastozysten injiziert. Die aus dem folgenden Transfer entstandenen chimären Männchen wurden wie oben beschrieben mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Alle bisher getesteten Nachkommen tragen allerdings ebenfalls kein *Knock-out* Allel. Die Zucht wird bis zum Tod bzw. dem Verlust der Fertilität der chimären Männchen fortgeführt.

## **2.2. Identifizierung potentieller Proteininteraktoren mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid-Systems* (Y2H)**

Zur Identifizierung potentieller Proteininteraktoren der Hsd17b7 wurde ein *Yeast-Two-Hybrid* (Y2H) Experiment durchgeführt. Das *Two-Hybrid*-System ist ein eleganter molekular-genetischer Ansatz, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zu untersuchen. Ein Weg zur Identifizierung potentieller Proteininteraktoren ist das Mating. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionskonstrukt aus der DNA-Bindedomäne des Hefe Transkriptionsfaktors Gal4 und dem bekannten Protein, für das Wechselwirkungs-Partner gesucht werden, hergestellt (Köder) und in einen haploiden MAT a Hefestamm transformiert. Ein zweiter Vektor enthält die Gal4 Transaktivierungsdomäne und Sequenzen aus einer cDNA-Bibliothek (Beute). Er wurde in den haploiden MAT  $\alpha$  Hefestamm transformiert. Durch Co-Kultivierung beider Stämme bildeten sich diploide Hefeklone, die sowohl den Köder- als auch den Beutevektor enthalten. Protein-Protein-Interaktionen konnten dann durch eine Aktivierung von Gal4-responsiven Reportergenen nachgewiesen werden.

### **2.2.1. Klonierung der Köderkonstrukte**

Ein Teil der Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Suche nach potentiellen Interaktoren der murinen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 während der Embryonalentwicklung. Zu diesem Zweck wurden zwei Köderkonstrukte hergestellt. Eines mit der vollständigen kodierenden *hsd17b7*-Sequenz (pGBKT7-*mhsd7*-lang) und eine C-terminal verkürzte Version (pGBKT7-*mhsd7*-kurz). Die verkürzte Version (entspricht der in Marijanovic *et al.*, 2003 verwendeten Version) enthält die Co-Faktor Bindungsstelle und das aktive Zentrum, jedoch nicht den stark hydrophoben Teil, der für die Membranverankerung verantwortlich ist. Grund für die Verwendung des verkürzten Konstrukts war, mögliche, durch die Hydrophobizität bedingte, Probleme zu vermeiden. Als Beute wurde eine cDNA-Bibliothek von Mausembryonen am Tag 11 der Entwicklung (d11) verwendet.

### **2.2.2. Transformation der Köderkonstrukte in *S. cerevisiae* AH109**

Die Voraussetzung für ein erfolgreiches Mating mit dem MAT  $\alpha$  Hefestamm Y187 ist die Transformation des Köderkonstrukts in den MAT a Hefestamm AH109. Die Transformation der Köderkonstrukte pGBKT7*mhsd7*-lang und pGBKT7*mhsd7*-kurz in den Hefestamm AH109 erfolgte wie unter 4.2.3. beschrieben. Die Kalkulation der Transformationseffizienz ergab einen Wert von 13750 cfu/ $\mu$ g DNA. Da das Köderplasmid pGBKT7 das Tryptophan-Gen trägt, können die mit dem Köderkonstrukt transformierten Hefen auf SD-Medium ohne

Tryptophan wachsen. Zum weiteren Nachweis transformierter Hefeklone wurden mittels PCR die Inserts (*mhsd7*-lang und *mhsd7*-kurz) direkt aus dem Hefezellysat amplifiziert und auf einem 1% Agarosegel überprüft (nicht gezeigt).

### 2.2.3. Test auf Selbstaktivierung des Köderkonstrukts

Köderkonstrukte können im *Two-Hybrid*-System nur dann eingesetzt werden, wenn sie nicht selbst eines oder mehrere der Reportergene aktivieren. Die Folge wäre sonst das Auftreten falsch-positiver Interaktoren. Um dies auszuschließen, wurden die mit pGBKT7-*mhsd7*-lang und pGBKT7-*mhsd7*-kurz transformierten AH109-Hefeklone auf Agarplatten mit den unterschiedlichen Selektionsmarkern ausgestrichen. Die Ergebnisse des Tests fasst Tabelle 2 zusammen.

	SD-Trp	SD-Trp/- His	SD-Trp/- Ade	YPDA	$\alpha$ -Gal- Assay
<b>Vektor in AH109</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Ergebnis</b>
pGBKT7- <i>mhsd7</i> -lang	+	-	-	+	-
pGBKT7- <i>mhsd7</i> -kurz	+	(+)	-	+	-

Tabelle 2: Wachstumsversuche mit den beiden Konstrukten in *S. cerevisiae* AH109. (+): sehr schwaches Wachstum nach 10 Tagen feststellbar.

Wie in Tabelle 2 aufgeführt ist, zeigten die mit den Köderkonstrukten pGBKT7-*mhsd7*-lang und pGBKT7-*mhsd7*-kurz transformierten Hefen nur Wachstum auf YPDA-Vollmedium und SD-Medium ohne Tryptophan. Das Wachstum auf tryptophanfreiem Medium wird durch das entsprechende Gen auf dem Ködervektor ermöglicht. Die Köderkonstrukte pGBKT7-*mhsd7*-lang und pGBKT7-*mhsd7*-kurz konnten demnach die Reportergene nicht selbständig aktivieren und waren somit im *Yeast-Two-Hybrid*-Experiment einsetzbar.

### 2.2.4. Qualitative Überprüfung der in Y187 vortransformierten Maus-d11-cDNA-Bank

Die Verwendung von kommerziell erhältlichen vortransformierten cDNA-Banken erfordert einen besonders sorgsamem Umgang. Sie werden bei -80°C aufbewahrt. Da jedes Auftauen und wieder Einfrieren die Lebensfähigkeit der vortransformierten Hefezellen um ca. 10% vermindert, sollte dieser Vorgang möglichst vermieden und vor jedem Mating der Titer bestimmt werden. Dazu wurde ein Aliquot der in Y187 vortransformierte Maus-d11-cDNA-

Bank in unterschiedlichen Verdünnungen auf Agarplatten ohne Leucin ausgestrichen. Nach viertägiger Inkubation wurden die Platten ausgezählt. Der Titer sollte mindestens  $5 \times 10^7$  cfu/ml betragen. Der Titer der in Y187 vortransformierten d11-cDNA-Bank lag bei  $2,5 \times 10^8$  cfu/ml. Die cDNA-Bank war somit im Mating einsetzbar.

### **2.2.5. Mating**

Mit dem Ziel, Proteininteraktoren der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 während der Embryonalentwicklung zu finden, erfolgte ein Mating zwischen den in den MAT a Hefestamm AH109 transformierten Köderkonstrukten pGBKT7*mhsd7*-lang und pGBKT7*mhsd7*-kurz und der in den MAT  $\alpha$  Hefestamm Y187 vortransformierten Maus-d11-cDNA-Bank. Als Beutevektor diente hierbei der Vektor pACT2. Beide Hefestämme wurden miteinander co-kultiviert und für 24 h in YPDA-Vollmedium inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Bildung diploider Zellen, die das *Adenin*-, *Histidin*- und *Mel1*-Reporter gen enthielten, und die Expression der Plasmid-kodierten Köder- und Beute-Proteine. Anschließend wurde die Hefezellsuspension auf insgesamt je 40 QDO-Platten ausplattiert. Ein Aliquot des Kulturansatzes wurde zur Bestimmung der Mating-Effizienz auf Agarplatten ohne Leucin, ohne Tryptophan und ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen. Die Kalkulation der Matingeffizienz ergab einen Wert von 3,9%. Nach 3 Tagen wurden die ersten Hefekolonien auf den QDO-Platten sichtbar. Am 14. Tag waren bereits 97 Klone vorhanden, und die Kultivierung wurde beendet. Die Klone wurden nach ihrem Erscheinungsdatum geordnet auf QDO-Sammelplatten überimpft. Die Bezeichnung der Hefeklone erfolgte nach ihrem Erscheinungszeitpunkt. 5 der 97 überimpften Klone wuchsen nicht an.

### **2.2.6. Überprüfung der $\alpha$ -Galaktosidaseaktivität**

Der  $\alpha$ -Galaktosidasetest wurde zum Nachweis der Expression des *Mel1*-Reporter gens verwendet. Um die QDO-positiven Klone auf ihre  $\alpha$ -Galaktosidaseaktivität zu testen, wurden von den QDO-Sammelplatten Kopien auf QDO-Platten mit X- $\alpha$ -Gal erstellt. Es wurden nur Klone als *Mel1* positiv gewertet, die innerhalb von 8 h Blaufärbung zeigten. Spätere Färbungen gelten als unspezifisch (Mitteilung von Dr. Otterbach, Clontech). Insgesamt konnten 11 der angewachsenen 92 Klone als  $\alpha$ -Galaktosidase negativ identifiziert werden. Das entspricht einem Prozentsatz von 12%. Da sie keine echten Interaktoren der mHsd17b7 darstellen können, wurden sie von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die  $\alpha$ -Galaktosidase-positiven Klone wurden zunächst in SD/-Trp, -Leu Flüssigmedium überimpft. Später wurden Glycerinkulturen von ihnen angelegt.

### 2.2.7. Isolierung der cDNA tragenden Plasmide

Um die mutmaßlich positiven Klone analysieren und verifizieren zu können, war es notwendig, zunächst die cDNA-tragenden Beuteplasmide aus den QDO und  $\alpha$ -Galaktosidase positiven Hefezellen zu isolieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst von allen 81 QDO- und  $\alpha$ -Galaktosidase positiven Klonen eine Plasmidisolierung durchgeführt und die so erhaltene DNA mittels Elektroporation in *E. coli* XL-1 blue Zellen transformiert. Da die aus den Hefen isolierte DNA ein Gemisch aus Köder- und Beuteplasmiden darstellte, enthielten die Transformanten entweder das Beute- oder das Köderkonstrukt. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Bakterienzelle bei Transformation zwei oder mehr Plasmide aufnimmt, ist äußerst gering. Die transformierten Bakterienzellen wurden auf LB-Medium mit Ampicillin ausgestrichen. Da das Köderplasmid Kanamycinresistenz, die Beuteplasmide jedoch Ampicillin-resistenz vermitteln, kann so eine Selektion auf Zellen erfolgen, die ein Beuteplasmid aufgenommen haben. Die Transformation in *E. coli* XL-1 blue und Isolierung von DNA konnte so bei 72 der 81 Plasmide erfolgreich durchgeführt werden.

### 2.2.8. Sequenzierung der Beuteplasmide

Um das Leseraster und die Identität der gefundenen mHsd17b7 Interaktoren festzustellen, wurden insgesamt 72 Beuteplasmide am 5'-Ende mit einem pACT2 spezifischen Primer ansequenziert. Insgesamt konnten im Rahmen der Arbeit die Sequenzen von 38 verschiedenen cDNAs ermittelt werden. Die Ergebnisse der Datenbankrecherche fasst Tabelle 3 zusammen. Die einzelnen Klone sind nach ihrem Erscheinungsdatum sortiert. Bei mehrfachem Auftreten ist jeweils nur der Erste aufgeführt. Die Tabelle enthält nur bekannte bzw. beschriebene Proteine. Die Interaktoren, die nur bei der verkürzten Version des Proteins auftraten, sind am Ende der Tabelle aufgeführt und mit k-x bezeichnet.

cDNA	Protein	Ergebnisse der Datenbankrecherche
1	Synaptotagmin I	Präsynaptisch, Exozytose
2	Filamin alpha	Zytoskelett
3	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	Transkriptionelle Regulation
4	meningioma expressed antigen 5	Protein mit Hyaluronidaseaktivität
5	Sporulation-induced transcript 4-associated protein, SAPLB homolog	Keine Information verfügbar
6	similar to inner nuclear membran protein MAN1	Keine Information verfügbar
7	Syntaxin 3A	Präsynaptisch, Exozytose
8 (3)	PTD008	integrales Membranprotein
9 (4)	TMP21-I (P23)	Transmembranes Protein, Proteintransport

10	Reticulon 3	Neuroendokrin-spezifisches Protein im ER
11	amyloid beta (A4) precursor protein	Vorläufer von A $\beta$ , Alzheimer
12	replication factor C (activator 1)	DNA-Replikation, ATPase
13 (2)	heat shock protein 105 (Hsp105)	Chaperon
14	Nucleolar RNA-associated protein	Spliceosom
15	Endoglycan	Leukozyten-Adhäsion
16	RNA binding motif protein (Rbm8)	Spliceosom
17 (2)	solute carrier family 30	Zink-Transporter in Vesikeln
18	paired related homeobox 1	Transkriptionsfaktor, vor allem während der Entwicklung aktiv
19	Reticulon 4	Neuroendokrin-spezifisches Protein im ER
20	cAMP responsive element binding protein	Transkriptionsfaktor
21	myeloid cell leukemia sequence 1	anti-apoptotisch
22	O-Linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (OGT)	Posttranslationale Modifikation von Proteinen
23	timeless homolog	Transkriptionsfaktor
24	delta-like 1 homolog (dlk)	Transkriptionsfaktor
25	Eph receptor A7	Zellmigration und Axonausbildung
26	Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein A1	Spliceosom
27	Tag4	Zellmigration
28	Bri3-binding protein	Keine Information verfügbar
29	ARP-1	Transkriptionsfaktor
30	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	Sphingolipidsynthese
31	1-acylglycerolphosphate acyltransferase-epsilon	Posttranslationale Modifikation von Proteinen
32	thyroid hormone receptor associated protein 5	Transkriptionelle Regulation
K-1	cofilin 1, non-muscle	Zytoskelett
K-2	microtubule-associated protein 1B	Zytoskelett, Axonentwicklung
K-3	cytochrome b-245, alpha polypeptide	Atmungskette
K-4	tesk1	Proteinkinase, inaktiviert Cofilin
K-5	gap junction membrane channel protein alpha	Zell-Zell-Kontakt
K-6	HS1 binding protein	Substrat von Tyrosinkinasen der Src-Familie

Tabelle 3: Ergebnis der Auswertung der Sequenzierungen der identifizierten mHsd17b7-Proteininteraktoren. Die Zahlen in Klammern geben an, wie oft diese Proteine als Interaktoren auftraten. K-x: nur beim Ansatz mit dem verkürzten mHsd17b7-Konstrukt aufgetretene Interaktoren.

### **2.2.9. Retransformation in AH109 zur Verifizierung positiver Interaktoren**

Um die spezifische Interaktion der Interaktorenproteine aus dem Ansatz mit pGBKT7*mhsd7*-kurz auch mit pGBKT7*mhsd7*-lang zu bestätigen, wurden die 6 Klone (K-1 – K-6) durch Co-Transformation zusammen mit pGBKT7*mhsd7*-lang in AH109 getestet. Einerseits wurde das Beuteplasmid zusammen mit dem Ködervektor pGBKT7 ohne Köderinsert, andererseits zusammen mit pGBKT7*mhsd7*-lang in AH109 transformiert. Die Transformation mit dem leeren Ködervektor wurde durchgeführt, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Die Transformationsansätze wurden zunächst auf Agarplatten ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert um auf Hefeklone zu selektionieren, die die jeweiligen Plasmide aufgenommen haben. Jeweils 5 Klone wurden nach ihrem Erscheinen auf QDO-Platten mit X- $\alpha$ -Gal überimpft. Nur wenn es sich um positive *Two-Hybrid*-Interaktoren handelt, können die Hefezellen wachsen und zeigen im  $\alpha$ -Galaktosidase Test eine blaue Färbung.

Wie erwartet zeigten alle Beuteplasmide zusammen mit den leeren Ködervektoren keine Aktivierung der Reportergene. Nach Co-Transfektion mit pGBKT7*mhsd7*-lang wuchs K-5 nicht an, K-3 zeigte keine Blaufärbung. Die entsprechenden Proteine sind also keine Interaktoren der vollständigen mHsd17b7.

## 2.3. Promotoranalyse in Maus und Mensch

Das Genom einer eukaryotischen Zelle enthält in seiner DNA-Sequenz die Information zur Herstellung tausender verschiedener Proteinmoleküle. Die Expression eines jeden Gens wird von einem Promotor reguliert, der sich 5' vom Translationsstart befindet. Jeder Promotor enthält regulatorische Sequenzen, an die Transkriptionsfaktoren binden können. Mit Hilfe der transkriptionellen Maschinerie und deren Bestandteile ist es einer Zelle, einem Organ oder einem ganzen Organismus möglich, eine stringente Kontrolle der Expression seiner einzelnen Gene aufrecht zu erhalten und auf verschiedene Bedürfnisse oder Reize von außen zu reagieren. Mit Hilfe der identifizierten TFs können oftmals Rückschlüsse auf die Funktion des Genprodukts gezogen werden.

Zur Untersuchung der Regulation der Expression der *HSD17B7*-Gene wurden die 5'-flankierenden Regionen (Promotorregionen) der Gene bei Mensch und Maus mit bioinformatischen und experimentellen Methoden untersucht. Mit Hilfe bioinformatischer Methoden konnten zwar mögliche TF-Bindungsstellen, Promotormodule und sogar regulatorische Netzwerke identifiziert werden, allerdings war ein Beweis für die Funktionalität damit alleine nicht möglich. Aus diesem Grund mussten die Ergebnisse mit verschiedenen experimentellen Ansätzen verifiziert werden. Dazu gehörten DNaseI *Footprints*, Gel- und *Supershifts* sowie die Analyse verschiedener Deletionsmutanten.

Ein weiterer wichtiger Punkt war der Vergleich mit Promotorregionen anderer 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen, sowie verschiedener an der Cholesterinbiosynthese oder am Steroidmetabolismus beteiligter Gene. Durch auffällige Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede sollte nicht nur die Regulation der Transkription der murinen und humanen *HSD17B7* aufgeklärt, sondern auch Hinweise auf die Funktion der Enzyme und eventuelle Unterschiede zwischen Mensch und Maus gefunden werden.

### 2.3.1. Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts

Da der Startpunkt der Transkription und der Translation eines Gens mitunter weit entfernt voneinander liegen können und aufgrund der Möglichkeit der Existenz zweier oder mehrerer Promotoren für dasselbe Gen, ist die Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts zur Lokalisation eines Promotors unumgänglich. In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck zwei verschiedene Methoden angewendet, *Primer Extension* und 5' RACE.

### 2.3.1.1. *Primer-Extension-Analyse*

Die *Primer-Extension-Analyse* kann sowohl zur Lokalisation des 5'-Endes einer mRNA, und damit des Transkriptionsstartpunkts, als auch zur Quantifizierung der mRNA verwendet werden. Ein radioaktiv markiertes, und für die zu analysierende mRNA spezifisches, Oligonukleotid wird dabei von einer Reversen Transkriptase als Primer verwendet. Dadurch wird die RNA in DNA umgeschrieben und anschließend auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Die Länge der entstandenen DNA gibt die Anzahl der Basen zwischen der markierten Base des Primers bis zum 5'-Ende der RNA und somit den Transkriptionsstartpunkt an. Die Intensität der Banden erlaubt Rückschlüsse auf die vorhandene mRNA-Menge.

Für die menschliche mRNA wurde ein zum Bereich -18/+4, für die murine zum Bereich -28/-8 (jeweils relativ zum Translationsstartpunkt) komplementärer Primer verwendet. Als Template diente mit dem Rneasy Midi Kit (Qiagen) isolierte Gesamt-RNA aus HepG2 bzw. HEPA1-6 Zellen. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich weder bei Maus noch bei Mensch eine eindeutige, sondern ein Bereich mit mehreren Banden (bei Maus mit Länge 40-45bp, bei Mensch 40-46bp, vgl. Abb. 15). Außerdem fiel auf, dass die humane *HSD17B7* in HepG2- stärker als das murine Homolog in HEPA1-6-Zellen exprimiert wird.

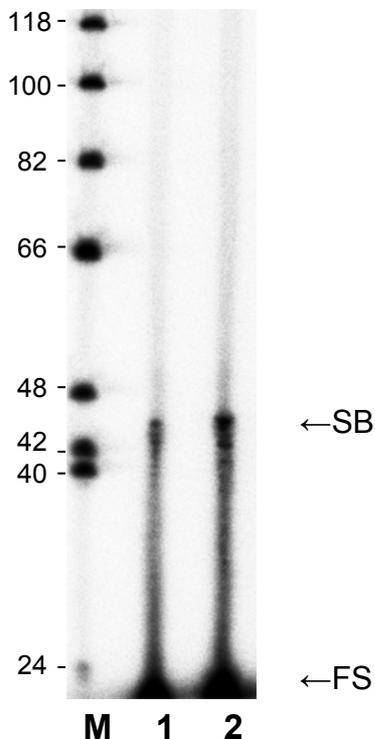


Abb. 15: Ergebnis der *Primer-Extension-Analyse* zur Bestimmung des 5'-Endes (Transkriptionsstartpunkt) der *HSD7B7* in Mensch und Maus. M: Längenstandard; 1: Gesamt-RNA aus HEPA1-6-Zellen als Template; 2: Gesamt-RNA aus HepG2-Zellen als Template. SB: Spezifische Banden; FS: freie (ungebundene) Sonde.

Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, wobei das Ergebnis stets ähnlich bis identisch war. Somit lag der Verdacht nahe, dass es keinen eindeutig definierten, sondern mehrere nahe beieinander liegende Transkriptionsstartpunkte gibt. Bei Berücksichtigung der verwendeten Primer ergeben sich Startbereiche von -41/-37 beim Menschen und von -52/-48 bei der Maus. Die daraus resultierenden 5'-untranslatierten Regionen erschienen im Vergleich zu anderen Genen als relativ kurz. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde auf eine weitere Standardmethode zurückgegriffen, die Rapid Amplification of 5' cDNA Ends (5' RACE).

#### 2.3.1.2. 5' RACE

Eine weitere Methode zur Lokalisation des Transkriptionsstartpunkts ist das etwas aufwendigere 5'-RACE Experiment. Auch hierbei wird Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Wie bei Primer Extensions wird auch hier ein für die zu analysierende mRNA spezifischer Primer (Sp1) verwendet. Mit Hilfe dieses Oligonukleotids und einer reversen Transkriptase wird die mRNA in DNA umgeschrieben. Anders als beim Primer-Extension-System wird die entstandene DNA nicht sofort analysiert. Zunächst wird an das 5'-Ende der DNA mit einer terminalen Transferase ein sogenannter Anchor Primer angehängt. Anschließend wird eine PCR mit einem zu dem Anchor komplementären Primer und einem weiteren für die zu analysierende, in DNA umgeschriebene, mRNA (Sp2) durchgeführt. Die Verwendung dieses zweiten genspezifischen Primers (Sp2) erhöht die Spezifität.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Instabilität von RNA-Molekülen zu reduzieren, wurden die Ansätze jeweils zweimal durchgeführt (mit RNA-Templates aus verschiedenen Präparationen). Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Die entstandenen PCR Produkte wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert. Sowohl bei Mensch als auch bei Maus wurden von jedem Ansatz 20, also jeweils 40 pro Spezies, insert-tragende Vektoren sequenziert. Wie aufgrund der Ergebnisse der *Primer-Extension-Analyse* zu erwarten war, enthielten die Vektoren Fragmente mit unterschiedlicher Länge. Die entsprechenden 5' Enden liegen relativ nahe beieinander, weswegen von der Existenz eines einzigen Promotors ausgegangen werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefasst.



man neben dem Reporterkonstrukt einen zweiten Vektor in die zu untersuchenden Zellen transfiziert. Dieser zweite Vektor trägt das Renilla-Luciferasegen, das unter der Kontrolle des SV40-Promotors steht (Vektor pRL-SV40). Dieser Promotor sorgt für eine hohe konstitutive Expression der Renilla-Luciferase, erlaubt damit auf einfache Weise Rückschlüsse auf die oft stark schwankende Transfektionseffizienz und reduziert durch eine Berechnung der Verhältnisse die Verfälschung der Ergebnisse.

Aufgrund des bekannten Expressionsmusters der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 in Mensch und Maus wurden zur Analyse der Promotoraktivität die Zelllinien HepG2 (humane Leberzellen) und HEPA1-6 (murine Leberzellen) verwendet. Die Expression des Gens wurde in beiden Zelllinien bereits nachgewiesen (Schertel, 2002). Als Kontrolle wurden zusätzlich HeLa- und HEK293-Zellen verwendet, da in diesen Zellen die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 in geringerem Umfang exprimiert wird.

#### 2.3.2.1. Optimierung der Transfektion

Zu Beginn mussten zunächst die optimalen Bedingungen für die Transfektion der verschiedenen Zelllinien bestimmt werden. In früheren Zellkulturversuchen hatte sich bereits das FuGene6-Transfektionsreagenz (Roche) für diese Zellen bewährt (Schertel, 2002).

Da sich jedoch jede Zelllinie bezüglich der optimalen Bedingungen für die Transfektion unterscheidet, mussten Versuchsreihen durchgeführt werden. Für diese Vorversuche wurde jeweils das Kontrollplasmid pRL-SV40 verwendet.

Es wurden verschiedene Verhältnisse von Transfektionsreagenz (in  $\mu$ l) zu DNA-Menge (in  $\mu$ g) getestet (3:2; 3:1; 4:1; 6:1). Die Zellen wurden in 12-well Zellkulturplatten kultiviert und bei etwa 50% Konfluenz mit den angegebenen FuGene/DNA Mischungen transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert, und die Luciferaseaktivität wurde im Luminometer gemessen. Dabei stellten sich, wie zu erwarten war, gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien heraus. Abb. 17 fasst die Ergebnisse zusammen.

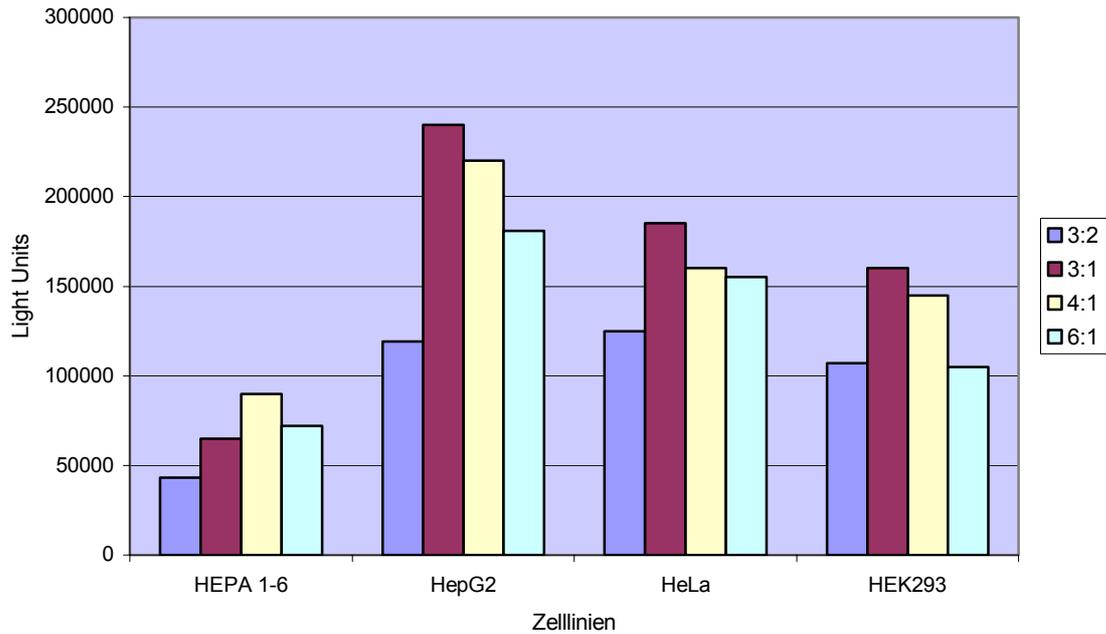


Abb.17: Überprüfung der Transfektionseffizienz in den verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen Transfektionsreagenz ( $\mu$ l) und DNA-Menge ( $\mu$ g). Weitere Erklärungen im Text.

Auffällig war, dass die Renilla-Luciferaseexpression in allen verwendeten menschlichen Zelllinien deutlich höher als die in der murinen war. Desweiteren zeigte sich, dass das optimale Verhältnis FuGene6 zu DNA bei den menschlichen Zellen 3:1, bei HEPA1-6-Zellen 4:1 beträgt.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der generellen Empfehlungen in den Anweisungen des Herstellers der Luciferase Assays (Promega) wurde daher für die weiteren Versuche für HepG2, HEK2993 und HeLa-Zellen eine Mischung von 1,5  $\mu$ l FuGene6, 0,5  $\mu$ g Testvektor-DNA (Verhältnis 3:1) und 0,025  $\mu$ g Kontrollvektor-DNA, für HEPA1-6 Zellen von 4  $\mu$ l FuGene6, 1  $\mu$ g Testvektor-DNA und 0,05  $\mu$ g Kontrollvektor-DNA verwendet.

### 2.3.2.2. Minimalpromotor Feinkartierung

Minimalpromotoren befinden sich in den meisten Fällen in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt der entsprechenden mRNA und enthalten viele bzw. alle zur Expression des Gens nötigen regulatorischen Sequenzen. *Enhancer* und *Silencer* können sich jedoch auch weit davon entfernt befinden (bis zu mehreren Kilobasen). Mit Hilfe von 5'-UTR Fragmenten verschiedener Länge (Abb. 18 und 19) sollte der Minimalpromotor beim murinen und humanen Gen eingegrenzt bzw. identifiziert werden. Aufgrund der Existenz mehrerer Transkriptionsstartpunkte sowohl beim menschlichen, wie auch beim murinen Gen, bezieht sich die Nummerierung der Basen auf den Translationsstartpunkt.

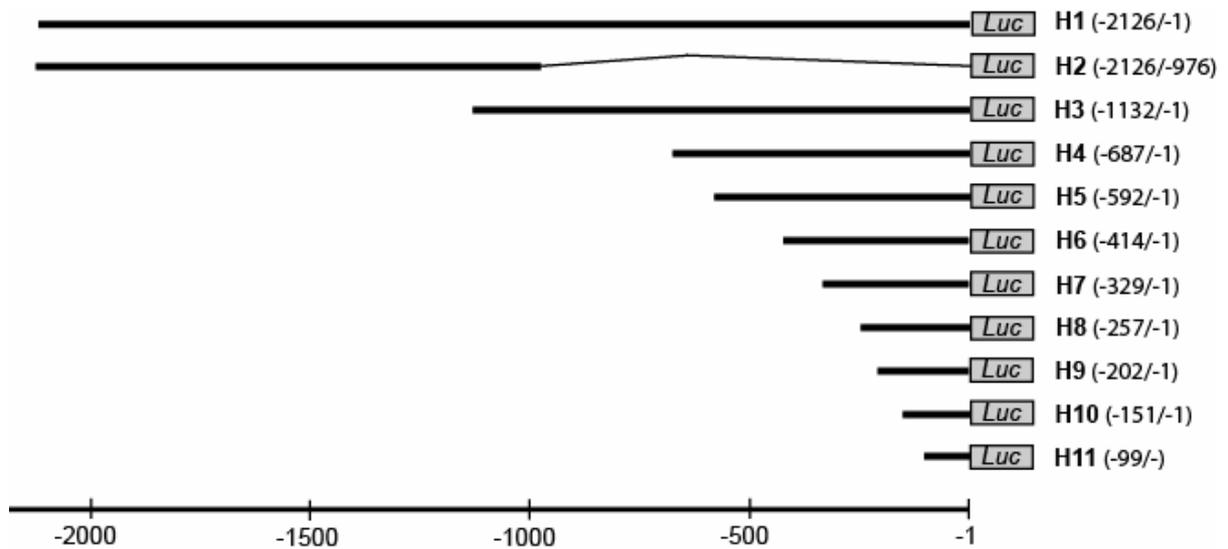


Abb.18: Schematische Darstellung der verwendeten 5'-Fragmente des humanen *HSD17B7*-Gens. Die Nummerierung der Basen bezieht sich auf den Translationsstartpunkt.

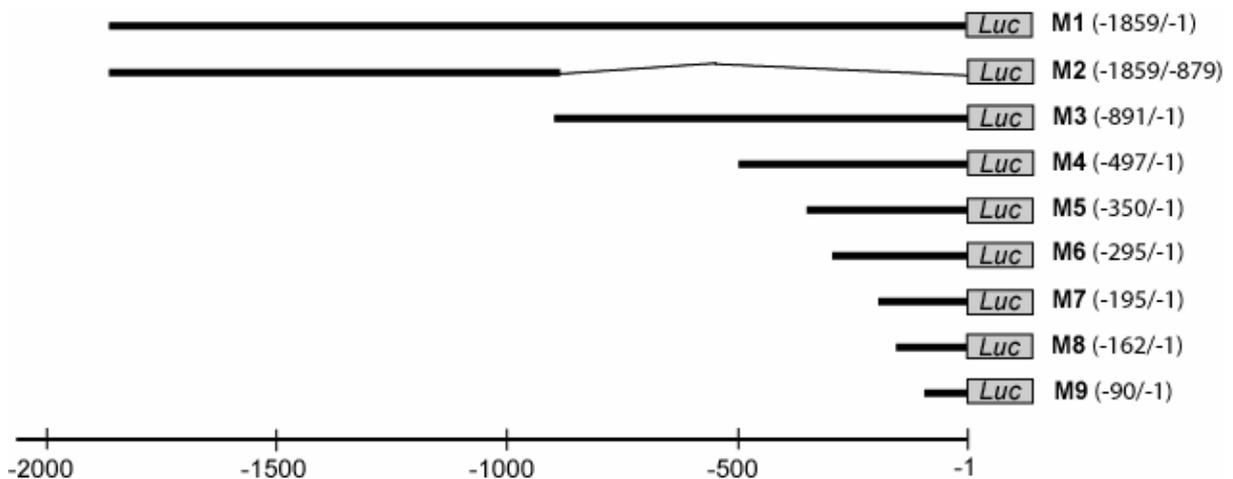


Abb.19: Schematische Darstellung der verwendeten 5'-Fragmente des murinen *hsd17b7*-Gens. Die Nummerierung der Basen bezieht sich auf den Translationsstartpunkt.

Um möglichst verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden zunächst jedoch die Auswirkungen von Inkubationszeiten (Zeit nach der Transfektion) und Passagenzahl der einzelnen Zelllinien auf die Luciferaseaktivität getestet. Für diese Versuche wurden jeweils die Testvektoren mit den längsten 5'-Fragmenten (M1 in HEPA1-6; H1 in HepG2, HeLa und HEK293) unter den o.g. Bedingungen (s. 2.3.2.1.) in die Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität wurde analysiert.

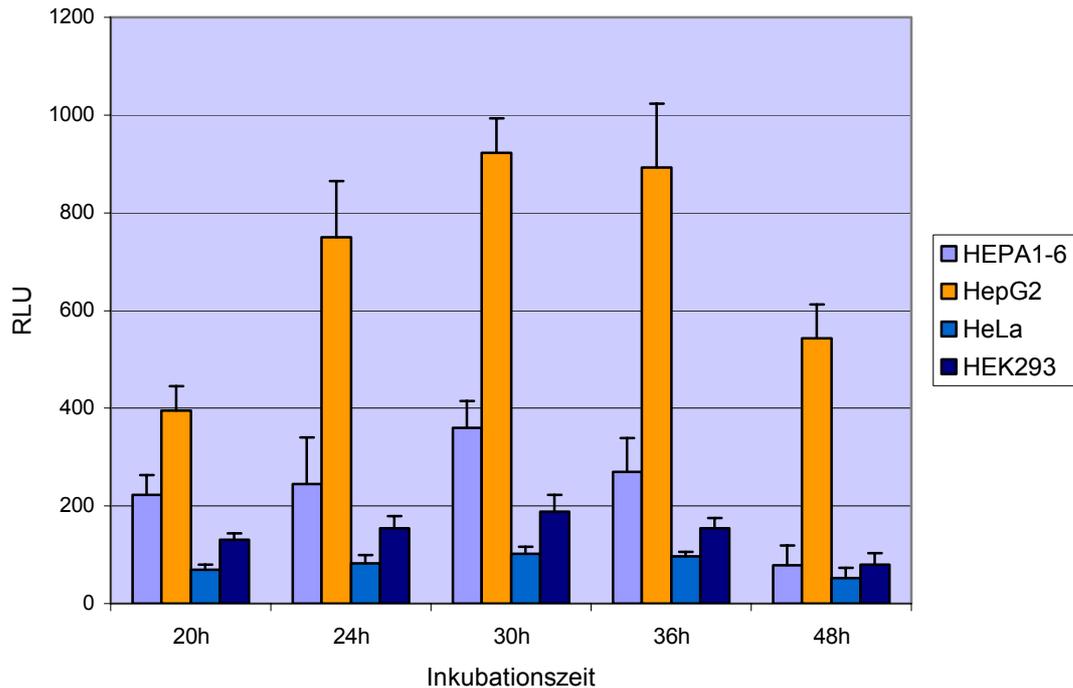


Abb. 20: Abhängigkeit der Inkubationszeit (Zeit zwischen Transfektion und Lyse der Zellen) auf die Luciferaseaktivität. RLU: Relativ Light Units.

Es zeigte sich, dass die Luciferaseaktivität der getesteten Konstrukte sowohl in den humanen als auch in der murinen Zelllinie nach einer 30-stündigen Inkubation am stärksten war. Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Versuche mit dieser Zeitspanne durchgeführt. Außerdem fiel auf, dass die Aktivität in HEPA1-6-Zellen deutlich geringer als in HepG2-Zellen war. Nicht nur die Transfektionseffizienz, auch die Promotoraktivität ist in den murinen Zellen geringer. Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass die Expressionsrate der Firefly-Luciferase in den beiden anderen menschlichen Zelllinien (HEK293 und HeLa) deutlich niedriger ist.

Als letzter Vortest wurden die Auswirkungen der Anzahl der Passagen der Zelllinien auf die Expression der Luciferase überprüft. Zu diesem Zweck wurden alle oben genannten Zelllinien nach unterschiedlicher Anzahl von Passagierungen mit den entsprechenden Vektoren (H1 bzw. M1) transfiziert. Dabei zeigte sich, dass die Passagenzahl bei HEPA1-6-, HEK293- und HeLa-Zellen kaum Auswirkungen hat, bei HepG2-Zellen jedoch ab der 15. Passage die Luciferaseaktivität nachließ (Abb.21). Daher wurden diese Zellen nur bis zur 12. Passage für die Luciferase Assays eingesetzt.

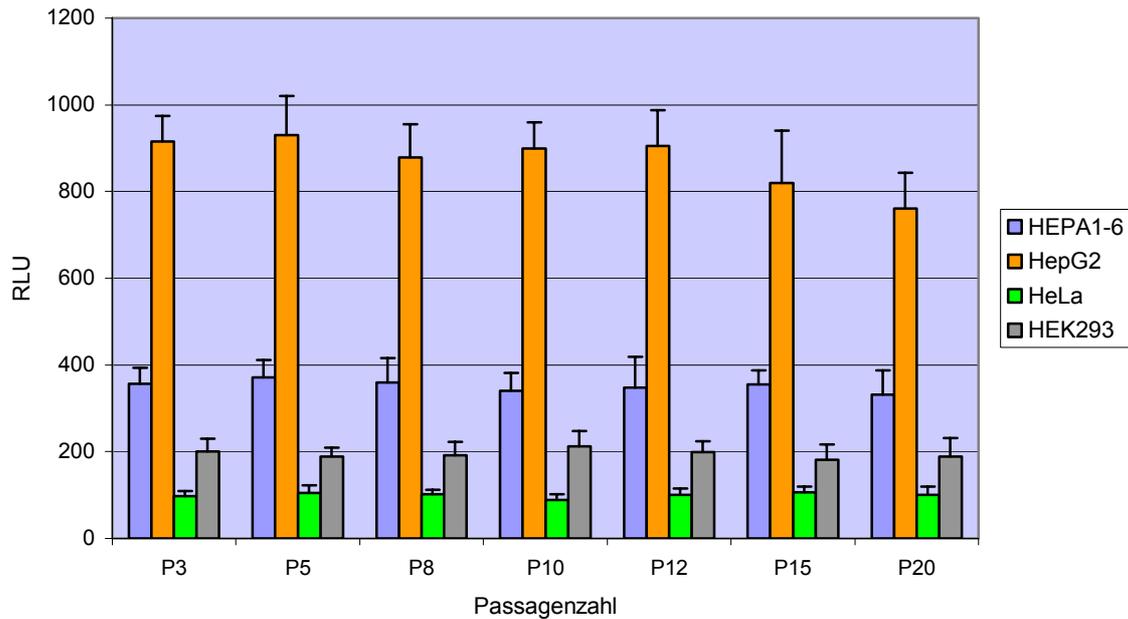


Abb. 21: Abhängigkeit der Passagenzahl auf die Luciferaseaktivität.

Nachdem nun die optimalen Bedingungen für den Dual Luciferase Assay bestimmt waren, konnte mit der Analyse der Promoterregionen begonnen werden. Dazu wurden zunächst alle oben beschriebenen Konstrukte zur Lokalisation der Promotoren eingesetzt. Um jedoch auch erste Hinweise auf die Induzierbarkeit der Luciferaseaktivität durch die einzelnen Promotorfragmente zu erhalten und damit mögliche *Enhancer*- oder *Silencer*-Elemente zu finden, wurden die Testvektoren sowohl in Zellen, die in Vollmedium (10% FBS), als auch in Zellen, die unter Serumangel (0,1% FBS) angezogen wurden, transfiziert. Mit diesem Versuchsansatz sollten Fragmente, die regulatorische Transkriptionsfaktorbindungsstellen enthalten, identifiziert werden. Eine Aussage über den Auslöser der gesteigerten Promotoraktivität war damit allerdings nicht möglich.

Zur besseren Übersicht werden die folgenden Abbildungen nicht in absoluten RLU-Werten dargestellt, sondern in ein bestimmtes, bei der jeweiligen Abbildung beschriebenes, Verhältnis zueinander gesetzt.

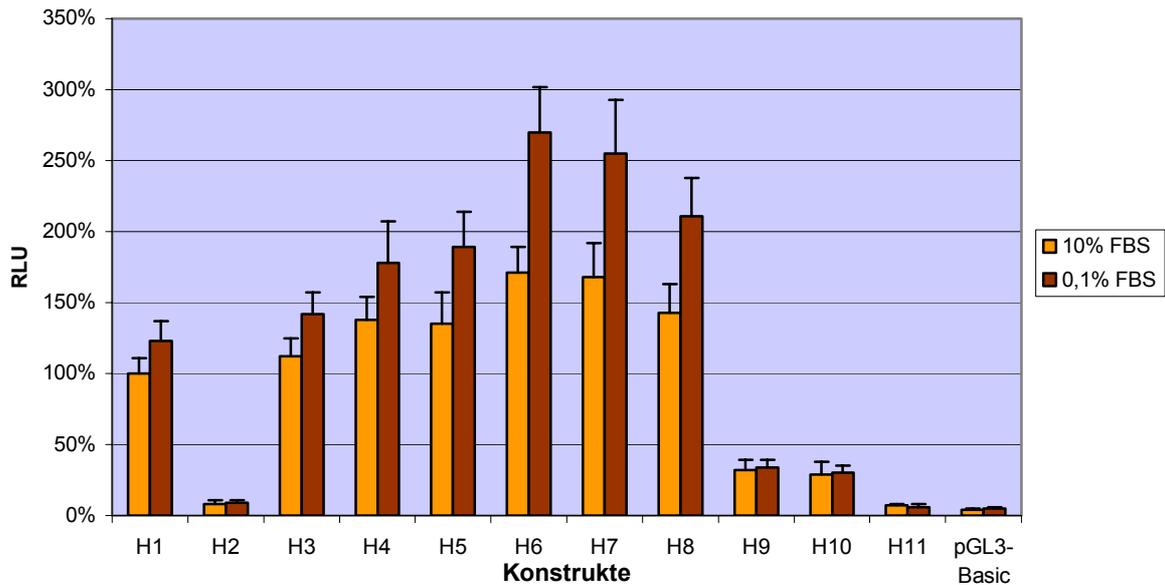


Abb. 22: Luciferaseaktivität der 5'-Deletionsmutanten des humanen Promotors in HepG2 Zellen. Die Aktivität des längsten Fragments (H1) in Vollmedium wurde auf 100% gesetzt. Zusätzlich wurde der Testvektor (pGL3) ohne Insert auf Aktivität überprüft.

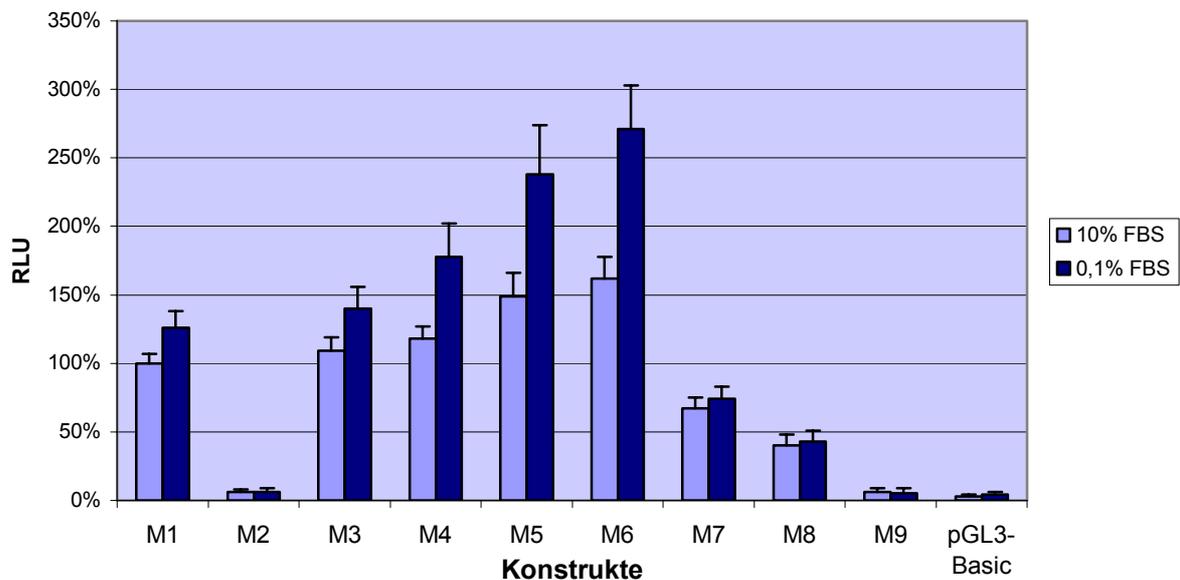


Abb. 23: Luciferaseaktivität der 5'-Deletionsmutanten des murinen Promotors in HEPA1-6 Zellen. Die Aktivität des längsten Fragments (M1) in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt. Zusätzlich wurde der Testvektor (pGL3) ohne Insert auf Aktivität überprüft.

Wie die Ergebnisse der Luciferase Assays zeigen, nimmt die Aktivität der Fragmente mit Abnahme der Länge zunächst zu, um ab einem bestimmten Wert stark abzufallen. Mit diesem Verlust geht auch die Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch Serummangel verloren. Die Promotorbereiche mit maximaler Aktivität und Induzierbarkeit durch

Serummangel befinden sich innerhalb weniger hundert Basen strangaufwärts vom Startpunkt der Translation bzw. der Transkription. Bei der menschlichen *HSD17B7* im Bereich von -414 bis -1, bei der murinen *Hsd17b7* im Bereich von -295 bis -1 relativ zum Startcodon.

Zur Kontrolle wurden ausgewählte humane Konstrukte auch in HeLa- und HEK293-Zellen transfiziert. Abb. 24 und 25 zeigen die Ergebnisse.

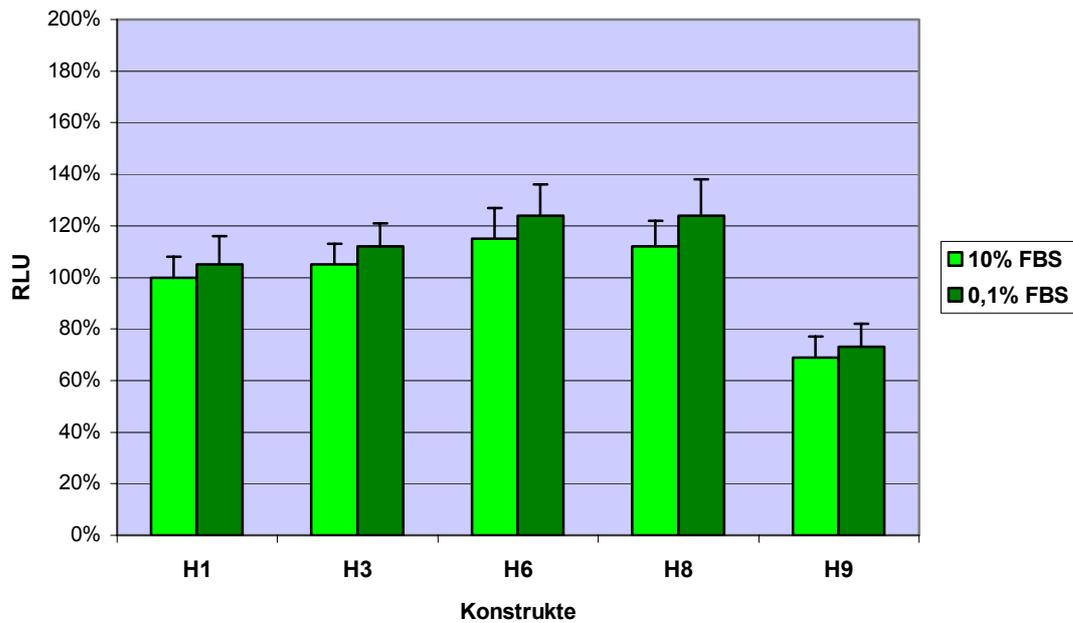


Abb. 24: Aktivität ausgewählter Fragmente in HeLa-Zellen. Die Aktivität des längsten Fragments (H1) in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

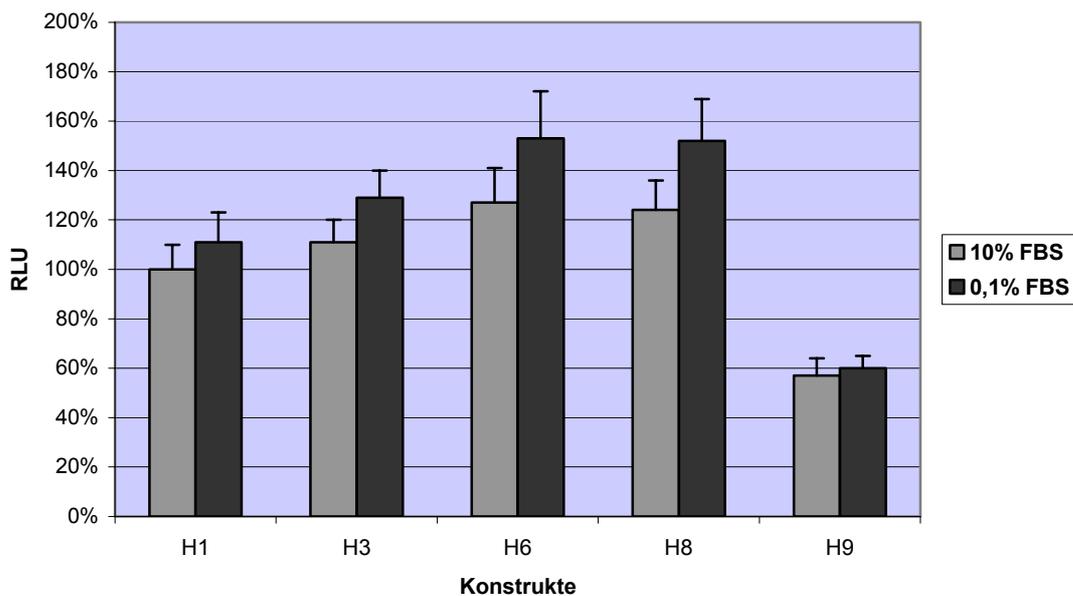


Abb. 25: Aktivität ausgewählter Fragmente in HEK293-Zellen. Die Aktivität des längsten Fragments (H1) in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die durch Serumangel bedingte Zunahme der Luciferaseaktivität in HeLa- und HEK293- deutlich schwächer als in HepG2-Zellen ist. Dies war allerdings aufgrund des Expressionsmusters und der in der Literatur bisher beschriebenen Funktionen der HSD17B7 auch erwartet worden. Jedoch ist sowohl die basale, als auch die durch Serumangel induzierte Expression in HEK293-Zellen etwas stärker als in HeLa-Zellen. Der Unterschied zwischen den Fragmenten H8 und H9 ist bei beiden Zelllinien geringer als in HepG2-Zellen.

Zur weiteren Eingrenzung der Promotorbereiche wurden im Folgenden verschiedene 3'-verkürzte Deletionsmutanten der Promotoren untersucht.

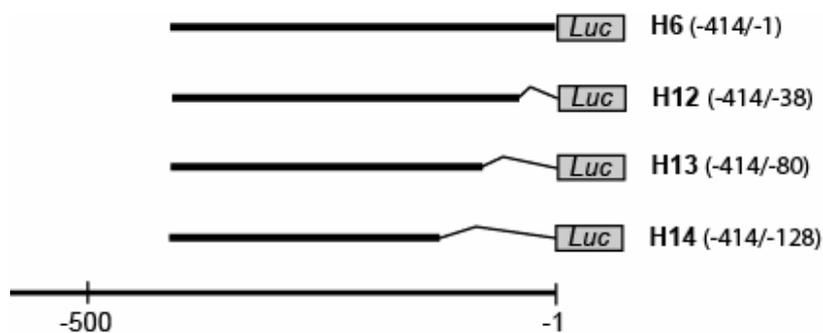


Abb. 26: Übersicht der hergestellten 3'-Deletionsmutanten des humanen Promotors ausgehend von Fragment H6.

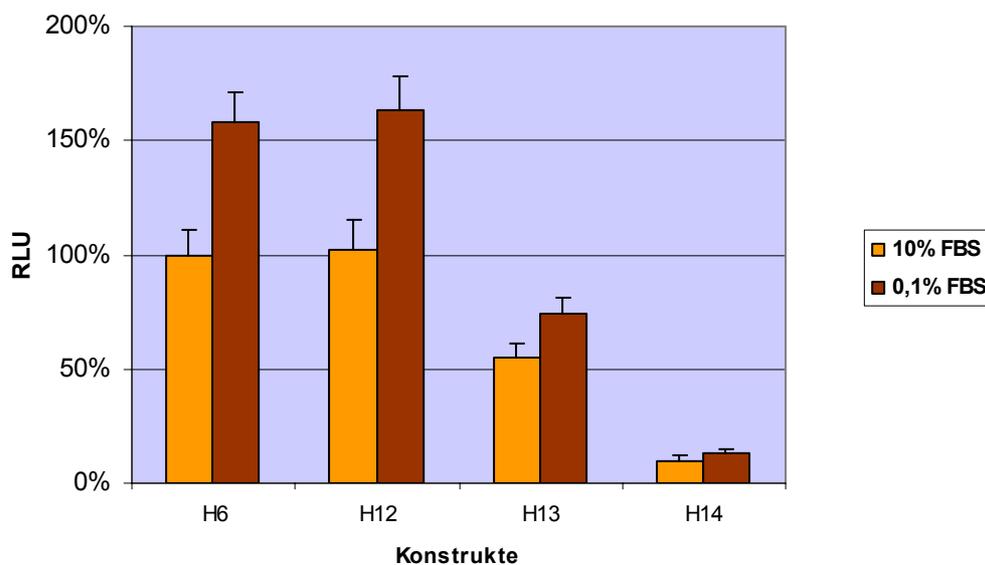


Abb. 27: Aktivität der 3'-Deletionsfragmente des humanen Promotors in HepG2-Zellen. Die Aktivität des Fragments H6 in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

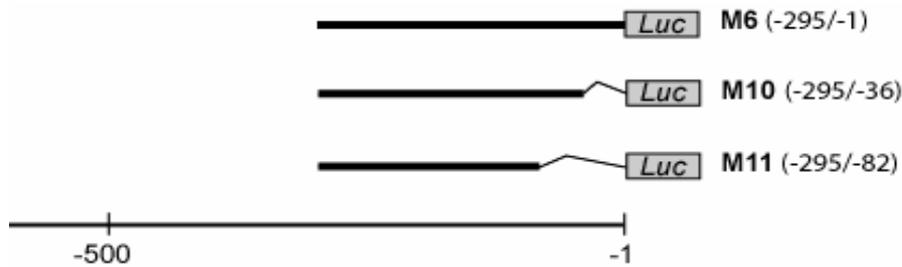


Abb. 28: Übersicht der hergestellten 3'-Deletionsmutanten des murinen Promotors ausgehend vom Fragment M6.

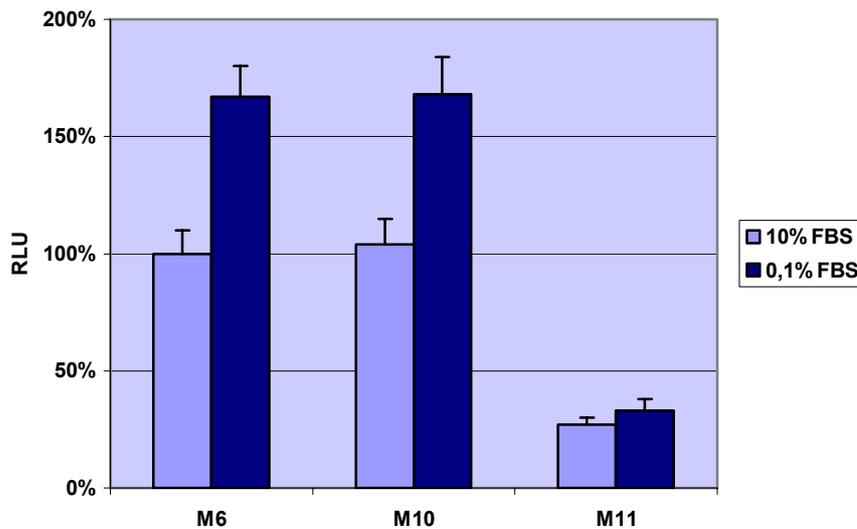


Abb. 29: Aktivität der 3'-Deletionsfragmente des murinen Promotors in HEPA1-6-Zellen. Die Aktivität des Fragments M6 in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

Die 3'-Deletionsmutanten zeigen, dass der Bereich der 5'-untranslatierten Regionen, d.h. der Bereich zwischen Transkriptions- und Translationsstart ohne nennenswerte Funktion ist. Werden die Bereiche jedoch weiter verkürzt, kommt es zu einer deutlich reduzierten Luciferaseaktivität. Ein gewisses Maß an Induzierbarkeit bleibt bei den humanen Promotorfragmenten zunächst jedoch erhalten (H13 in Abb. 27).

### **2.3.3. Bioinformatische Analyse der potentiellen Promotorregionen: Genomatixsoftware**

Nach der Lokalisation der Promotoren bzw. der Transkriptionsstartpunkte mit Hilfe der 5'RACE und der Primer Extensions, sowie der Feinkartierung durch die Luciferaseassays wurde die bioinformatische Analyse der Promotorregionen mit Hilfe des GenomatixSuite Software Pakets (Genomatix Software GmbH, [www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) durchgeführt. Dieses besteht aus mehreren Komponenten, folgende wurden in dieser Arbeit verwendet:

**PromoterInspector** zur Identifizierung von potentiellen Promotoren, **MatInspector** zur Identifizierung einzelner potentieller Transkriptionsfaktor (TF)-Bindungsstellen, **FrameWorker** zum Vergleich von Promotorbereichen verschiedener Gene in einer Spezies oder homologer Gene in unterschiedlichen Spezies.

#### 2.3.3.1. PromotorInspector

Um Hinweise auf die Lokalisation der Promotoren der murinen und humanen Hsd17b7 zu finden und damit die Ergebnisse der experimentellen Feinkartierungsversuche bioinformatisch zu bestätigen, sowie mögliche weitere vorhandene Promotoren zu identifizieren, wurden die Bereiche von -1 bis etwa -5000 mit dem Programm PromoterInspector analysiert. Mit dieser Software können allerdings nicht alle Promotoren identifiziert werden. Nach Angaben der Genomatix Software GmbH gelingt dies nur bei knapp 50% der Fälle, ein negatives Ergebnis bedeutet also nicht, dass in dem untersuchten Bereich kein Promotor vorhanden ist. Allerdings kann bei einem positiven Suchergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Existenz eines Promotors ausgegangen werden.

Die Analyse der humanen Sequenz gab keine Hinweise auf das Vorhandensein eines Promotors. Anders bei der Maus, hier wurde die Existenz eines Promotors im Bereich von -43 bis -247 relativ zum Startcodon vorhergesagt. Dies entspricht den Ergebnissen der Feinkartierungsversuche.

#### 2.3.3.2. MatInspector

Für die eingehende Analyse der durch die Luciferaseassays identifizierten Promotorregionen wurde das Programm MatInspector verwendet. Mit dieser Software können anhand von Sequenzähnlichkeiten potentielle TF-Bindungsstellen identifiziert werden. Die bioinformatische Analyse wurde mit den Bereichen durchgeführt, die die stärksten Luciferaseaktivitäten zeigten (H6 bzw. M6, Abb.30 und 31). Die Suche war erst jetzt sinnvoll, da eine Analyse mit den etwa 2kb großen 5'-UTR Fragmenten jeweils mehr als 300 potentielle TF-Bindungsstellen ergab, die natürlich nicht alle funktionell sein können. Zunächst wurde eine generelle Suche nach allen in der Datenbank vorhandenen regulatorischen Sequenzen durchgeführt. Aufgrund des bekannten Expressionsmusters und der Verwendung von Leberzelllinien wurde schließlich besonders auf Bindungsstellen für leberspezifische und ubiquitäre Transkriptionsfaktoren geachtet. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Bindungsstellen nach den entsprechenden Transkriptionsfaktoren benannt.

```

-414                               FXRE
    GCAAAGAAGTGCCAATCTCAGGGCGCCAGGGCACAGACCCAGTGCGTGTTCACAG
-361                               HNF4
    ATCCTGTCCTGAGTGCTAGGCCGGGTGACGCCCCACCAAGGATTAAAGATCAG
-308
    GCGCCCGCTGAGCCCTAGGAAGCAGTGACAGACACCTGCGCCTAGGCGGAGCG
-255                               CREBP           SP1           VDR/
    AGAAGAGCCTGGAATGGCTCCGGGCTTTGCGTCAAGCAGCTCCGCCCCICGGC
-202 RXR           SREBP
    CTATCTCACCCGACGCCGTCTCCGAGGGCAGGGAAACGGTTGGCGGACTGAGAT
-149 NF-Y                               CREBP           SP1
    TGGAGGGATCAGCTCAGACTCGATGACGCAACGGGAAGCGGGGCGTGGCCGTA
-96           NF-Y
    CTCTGATTGGTGACGGGTGAGGCGGCCCGAAATCGTAGGACTTCCGAAAGCAG
-43                               +10
    CGGTGGCGTTTGCTTCACTGCTTGAAGTGTGAGTGCGCGAAGATCGGAAAGG

```

Abb. 30: Ergebnisse der bioinformatischen Analyse (MatInspector) des aktivsten Fragments des putativen menschlichen *HSD17B7* Promotors (H6). Bei den Bindungsstellen ist jeweils der Kern-Bereich angegeben. Die Nummerierung der Nucleotide bezieht sich auf den Translationsstartpunkt (rot, kursiv). Der GC-Gehalt dieses Bereichs beträgt 63%.

```

-309                               HNF4
    CCAGCTCTGCCGCCCGCTTGCTTCACTCAGAACAAGCCCGCCGCGAGACTGG
-255                               SP1
    GGGCGGCGACTGCCTGGATTGGCTATAGGACCCTTGTGTCACGTGGCTCCGCCC
-201 VDR/RXR           SREBP
    CTCGGCCTATCTCACCTCACCCGGTCTGGGCGTGGAGAGAAGATGCCGAGTCGC
-147 NF-Y                               CREBP
    GATTGGCGGGCCTAACCGCGCGGACCGGATGACGCAGGAGAGGTGGAGCCGGGCC
-93           NF-Y
    GAGCCTTGATTGGTCGAGGTGCGCGTGGTCACGGATCAAGGTTGAGGCTAAGAG
-39                               +15
    AACCCCGGTGCAGTTCTACTTCGGTGCAGGGCGTGAAGATCGGGAAGGTGGTT

```

Abb. 31: Ergebnisse der bioinformatischen Analyse (MatInspector) des aktivsten Fragments des murinen *hsd17b7* Promotors (M6). Bei den Bindungsstellen ist jeweils der Kern-Bereich angegeben. Die Nummerierung der Nucleotide bezieht sich auf den Translationsstartpunkt (rot, kursiv). Der GC-Gehalt dieses Bereichs beträgt 61%.

Auffallend ist das Fehlen einer TATA-Box sowohl bei der humanen, als auch bei der murinen *HSD17B7*. Auch der GC-Gehalt ist mit jeweils über 60% relativ hoch. Des Weiteren sind trotz der vorhandenen Sequenzunterschiede zwischen Mensch und Maus einige gemeinsame potentielle TF-Bindungsstellen vorhanden. Dazu gehören jene für HNF4 (*Hepatic Nuclear Factor 4*), SREBP (*Sterol Responsive Element Binding Protein*), SP1, NF-Y (*Nuclear Factor Y*), VDR/RXR (*Vitamin D Receptor/Retinoic Acid Receptor Heterodimer*), CREBP (*cAMP*

*Responsive Element Binding Protein*). Während bei der Maus die Bindungsstellen, außer der für NF-Y, jeweils nur einmal entdeckt wurden, sind beim Menschen jeweils zwei potentielle Bindungsstellen für NF-Y, SP1 und CREBP vorhanden.

Der nur sehr geringe Aktivitätsunterschied zwischen den menschlichen Fragmenten H6 und H7 gibt erste Anzeichen darauf, dass die Bindungsstelle für FXRE, die nur beim Menschen vorhanden ist, nicht funktionell ist. Des Weiteren fällt beim Vergleich der Promotorbereiche auf, dass trotz nur geringer genereller Sequenzhomologie, die Bereiche -217/-193 des Menschen und -210/-186 der Maus 100% identisch sind, was die Wahrscheinlichkeit für die Funktionalität erhöht. Diese Bereiche enthalten potentielle Bindungsstellen für SP1, VDR/RXR und SREBP. Aufgrund der Luciferaseversuche scheint dieser Bereich von besonderer Bedeutung zu sein, da nur Fragmente, die diesen vollständig enthalten, auf Serummangel (0,1% FBS) mit erhöhter Luciferaseaktivität reagieren. Auch die basale Luciferaseexpression (10% FBS) ist ohne diese Bereiche bedeutend schwächer (vgl. Abb. 22 und 23).

#### 2.3.3.3. Vergleich mit anderen Genen: FrameWorker

Die FrameWorker Software dient dem Auffinden von Ähnlichkeiten bei der transkriptionellen Regulation, sowohl zwischen demselben Gen in verschiedenen Spezies, als auch verschiedener Gene in einem Organismus. Damit können Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Zusammensetzung der regulatorischen Sequenzen verschiedener Promotoren gefunden werden. Dies kann wertvolle Hinweise auf beteiligte Transkriptionsfaktoren geben, sowie die Einordnung der Funktion der Genprodukte ermöglichen.

Der Vergleich der humanen und murinen *HSD17B7* Promotoren mit denen verschiedener anderer Gene des Cholesterin- und Steroidstoffwechsels ergab leider keine eindeutigen Gemeinsamkeiten (bzw. mehr als zwei bei *HSD17B7* bestätigte Bindungsstellen) mit der *HSD17B7*, weder bei Mensch noch bei der Maus. Dasselbe gilt für den Vergleich mit anderen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen. Ein anderes Bild ergab sich beim interspezies-Vergleich zwischen der *HSD17B7* von Ratte, Maus und Mensch (Abbildung 32). Die gefundenen Ergebnisse sind ein deutliches Anzeichen für die Funktionalität der enthaltenen Bindungsstellen.

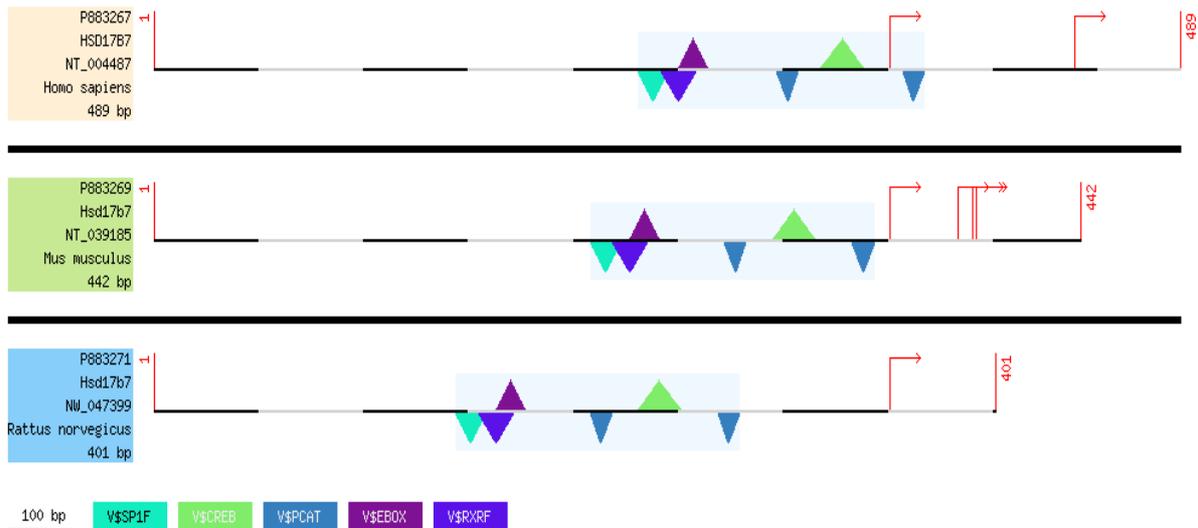


Abb. 32: Darstellung des Ergebnisses der FrameWorker-Analyse der *HSD17B7*-Promotoren von Mensch, Maus und Ratte. Die Bezeichnungen entsprechen folgenden Bindungsstellen: V\$SP1F = SP1; V\$CREB = CREBP; V\$PCAT=NF-Y; V\$EBOX = SREBP; V\$RXRF = VDR/RXR. Die Pfeile geben putative Transkriptionsstartpunkte an.

### 2.3.4. Experimentelle Bestätigung der bioinformatischen Ergebnisse

Bioinformatische Methoden eignen sich hervorragend, um potentielle (!) regulatorische Sequenzen und Regulationsschemen zu identifizieren. Allerdings ermöglichen diese Ergebnisse alleine keine Rückschlüsse auf die tatsächliche *in vivo* Situation. Für eine funktionelle Bestätigung kann auf verschiedene Methoden zurückgegriffen werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente dargestellt.

#### 2.3.4.1. DNaseI-Footprinting

Eine bewährte und oft verwendete Methode zur Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in einem Promotorbereich ist das DNaseI-Footprinting. Diese Methode nutzt die Tatsache aus, dass DNA, die durch Proteine gebunden ist, gegen den Verdau durch das Enzym DNaseI geschützt ist. Der Verdau von DNA mit dem Enzym DNaseI ergibt ein charakteristisches Bandenmuster in einem Polyacrylamidgel. Durch das Fehlen von Banden in Ansätzen mit Proteinen kann man Bereiche identifizieren (*Footprints*), an die diese zugegebenen Proteine gebunden haben. Als Proteinquelle kann hierbei Kernextrakt oder besser das gewünschte gereinigte Protein eingesetzt werden. Allerdings ist die Durchführung eines *Footprinting*-Experiments aufgrund der schwachen DNA-Affinität mancher Transkriptionsfaktoren (z. B. SREBP) technisch nicht trivial.

Als Test-DNA wurden PCR-Amplifikate entsprechend der Konstrukte H8 (257bp) und M6 (295bp) verwendet, die jedoch durch den vorhandenen „Primerüberhang“ (Schnittstelle + 4 zusätzliche Nucleotide) am 3' Ende um 8 Basen verlängert waren.

Trotz mehrfachen Wiederholungen waren die Ergebnisse der Ansätze mit den Kernextrakten nicht eindeutig auswertbar. Umso besser war das Ergebnis, als gereinigtes SP1 Protein eingesetzt wurde (Abb. 33).

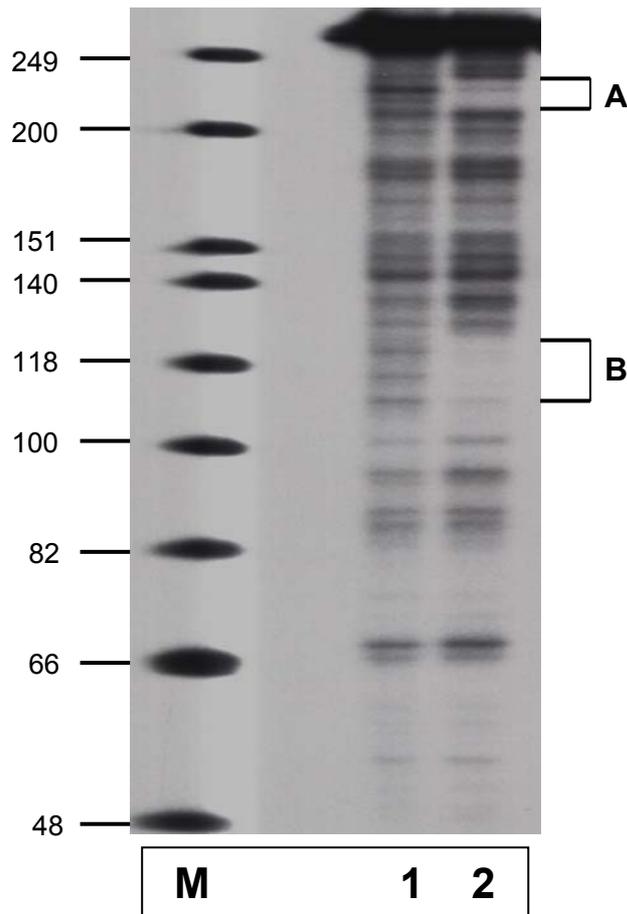


Abb. 33: Ergebnis des DnaseI-Footprints mit SP1 Protein und radioaktiv markiertem DNA Fragment entsprechend H8. M: Längenstandard, 1: DnaseI Verdau ohne Protein, 2: DnaseI Verdau mit Protein. Die Zugabe von SP1 in Spur 2 führt zu zwei Footprints (von 110-120 und 210-225).

Anhand des *Footprintings* konnte also gezeigt werden, dass im menschlichen Promotor, genauer gesagt im Bereich von -1 bis -257, zwei Bindungsstellen für SP1 vorhanden sind (von 110-120 und 210-225). Diese sind, nach Abzug der oben beschriebenen zusätzlichen Basen, entsprechend der bioinformatischen Vorhersage lokalisiert.

Für den murinen Promotor wurde dieses Experiment nicht durchgeführt, da nur menschliches SP1 zur Verfügung stand.

#### 2.3.4.2. Auswirkungen verschiedener spezifischer Mutationen auf die Luciferaseaktivität

Zur Verifizierung der Funktionalität verschiedener identifizierter regulatorischer Sequenzen bzw. TF-Bindungsstellen wurden diese mittels der QuikChange Mutagenese verändert. Dies geschah durch den gezielten Austausch von 2-4 Basen in der entsprechenden Bindungsstelle. Diese Anzahl war nötig, da (im Gegensatz zu beispielsweise Restriktionsendonucleasen) Transkriptionsfaktoren nicht nur an streng definierte Erkennungssequenzen binden, sondern auch gewisse Abweichungen tolerieren. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass möglichst konservierte Basen ausgetauscht und evtl. benachbarte bzw. überlappende andere Bindungsstellen nicht beeinflusst wurden. Die tatsächlichen Auswirkungen einiger Mutationen auf die Bindungsfähigkeit der entsprechenden Transkriptionsfaktoren wurden in *Gelshift*-Experimenten untersucht (s. 2.3.4.6.). Als Ausgangspunkt wurden die Testvektoren mit der stärksten Luciferaseaktivität (H6 bzw. M6) verwendet. Die für die Mutagenese verwendeten Primer mit den jeweiligen Mutationen sind im Anhang aufgeführt.

Mit Hilfe dieses Ansatzes sollte auch die Art der Funktion in der transkriptionellen Regulation, regulatorisch (induzierbar) oder basal, nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen sowohl in Vollmedium (10% FBS), als auch unter Serumangel (0,1% FBS) angezogen. Die verschiedenen Deletionsmutanten (s. Abb. 34, 36, 38 und 40) wurden in die entsprechenden Zellen transfiziert. Die Durchführung entsprach den oben beschriebenen Bedingungen. In HepG2- und HEPA1-6-Zellen wurden alle beschriebenen Konstrukte getestet. Aufgrund der geringen Auswirkungen der Serumangelbedingungen wurden diese Versuche nicht mit HEK293- und HeLa-Zellen durchgeführt.

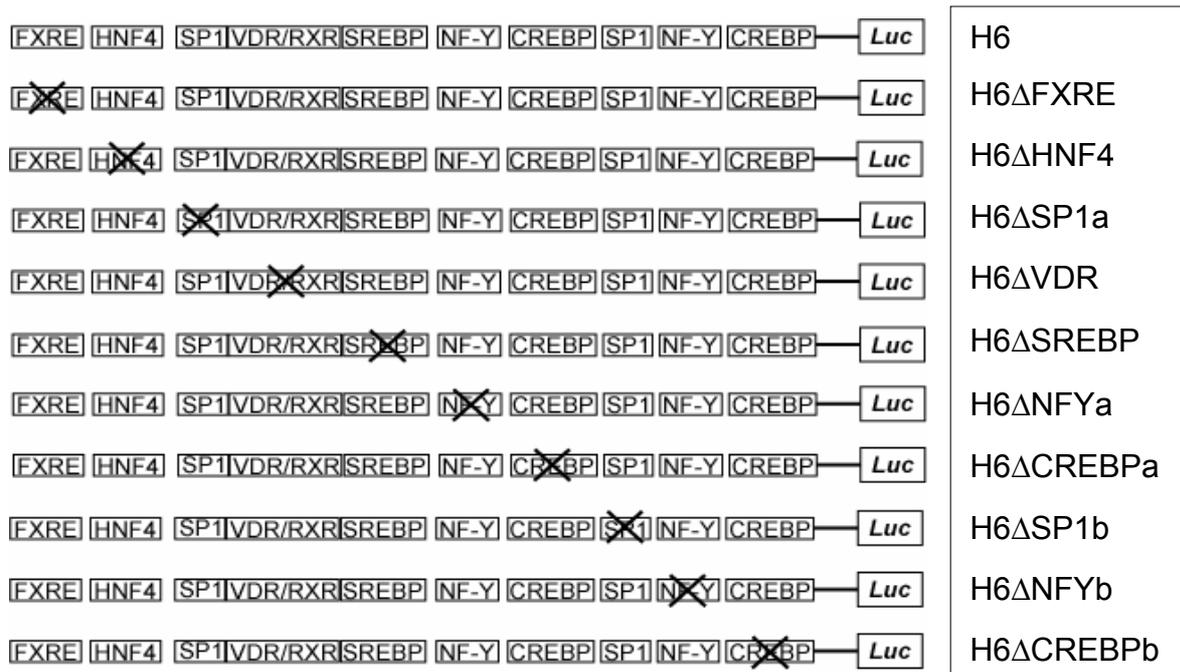


Abb. 34: Übersicht der hergestellten Einfach-Deletionsmutanten des humanen Promotors.

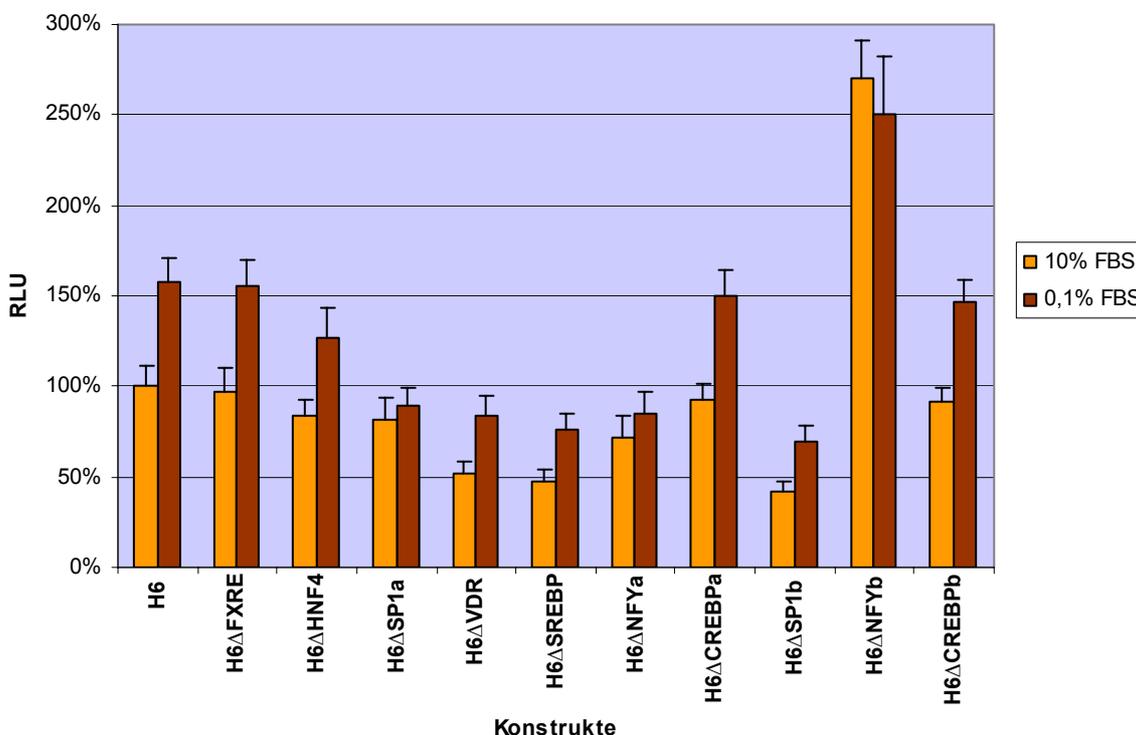


Abb. 35: Ergebnisse der Analyse der Einfach-Deletionsmutanten des humanen Promotors in HepG2-Zellen. Die Aktivität des Wildtyp-Fragments (H6) in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

Die Ergebnisse ließen zunächst folgende Schlüsse zu:

- 1: Die Bindungsstellen für FXRE, CREBP<sub>a</sub> und CREBP<sub>b</sub> sind ohne oder nur von geringer Bedeutung für die transkriptionelle Aktivität.
- 2: Die Bindungsstellen für HNF4, VDR/RXR, SREBP und SP1(b) sind eher für das basale Expressionsniveau verantwortlich (generelle Abnahme der Luciferaseaktivität, Verhältnis der Zunahme durch Serummangel vergleichbar mit dem Wildtyp-Fragment).
- 3: Die Bindungsstellen für SP1(a) und NF-Y(a) haben eine wichtige Funktion für die Induzierbarkeit des Expressionsniveaus (durch Serummangel bedingte Zunahme der Luciferaseaktivität deutlich geringer als beim Wildtyp-Fragment).
- 4: Aufgrund des starken Anstiegs der Aktivität durch die Mutation in der Bindungsstelle für NF-Y(b) liegt der Verdacht nahe, dass der entsprechende Transkriptionsfaktor negativ regulierend wirkt.

Im Folgenden wurden die Auswirkungen von Mehrfach-Mutationen überprüft. Zu diesem Zweck wurden die in Abb. 36 dargestellten Mutanten hergestellt.

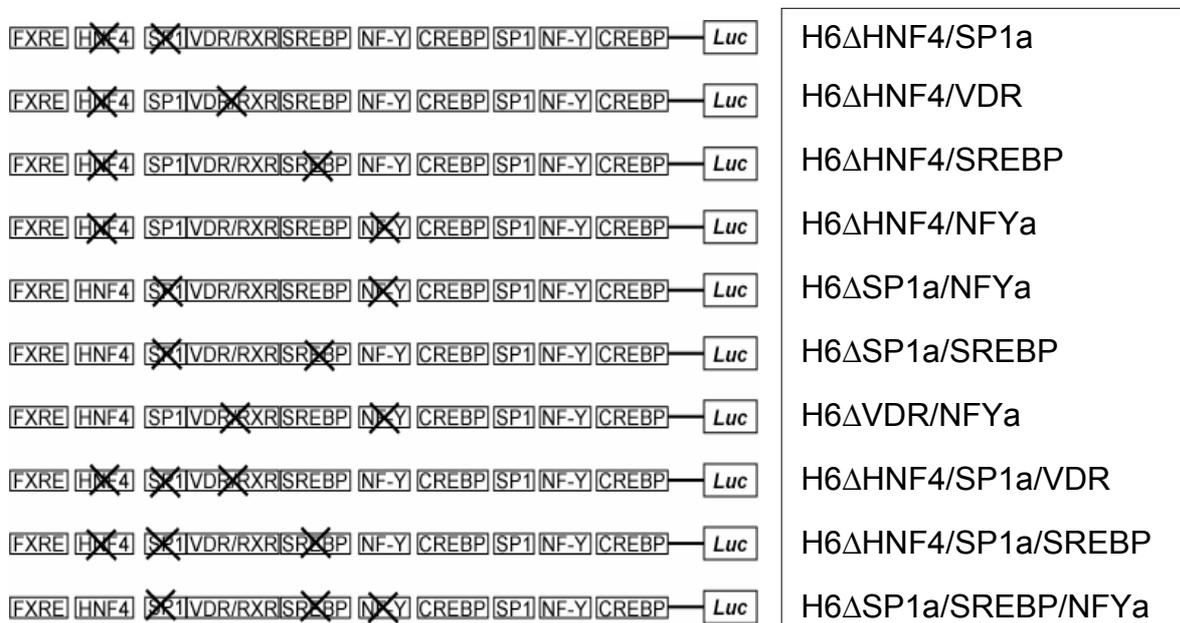


Abb. 36: Übersicht der hergestellten Zwei- und Dreifach-Deletionsmutanten des humanen Promotors.

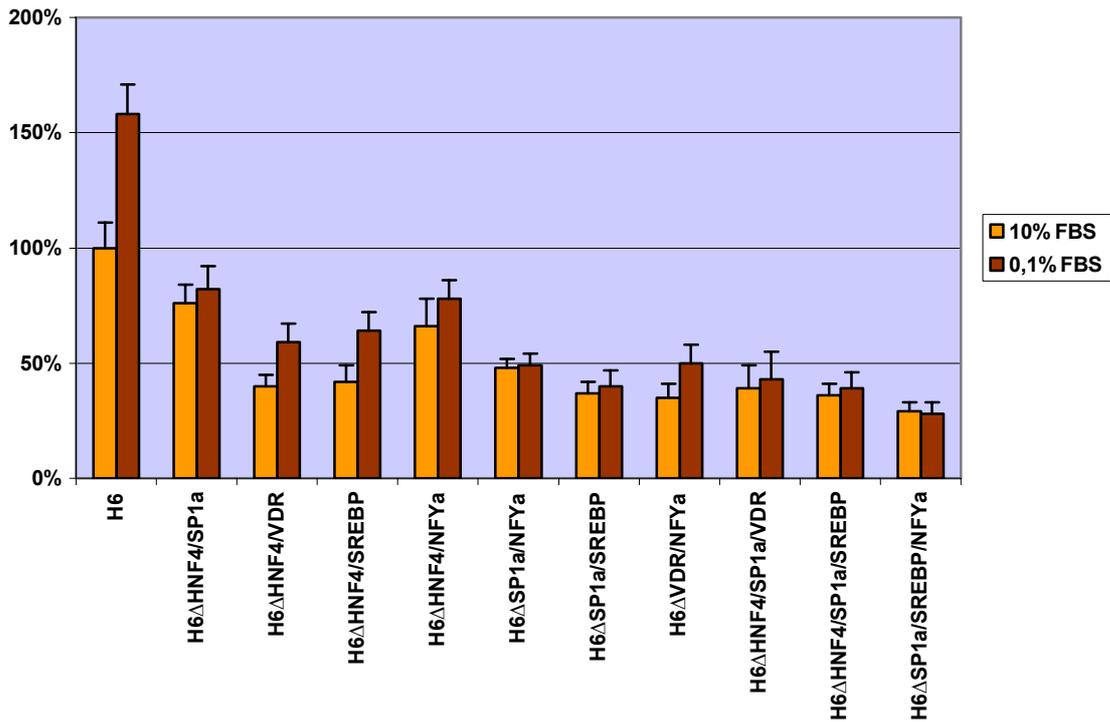


Abb. 37: Ergebnisse der Analyse der Zwei- und Dreifach-Deletionsmutanten des humanen Promotors in HepG2-Zellen. Die Aktivität des Wildtyp-Fragments (H6) in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

Folgende Erkenntnisse ergeben sich bei der Auswertung von Abb.37:

- 1: Da alle Konstrukte mit Mutationen in SP1(a) oder NF-Y(a) deutlich schwächere Reaktionen auf Serumangel zeigen (deutlich geringere Zunahme der Luciferaseaktivität), liegt die Vermutung nahe, dass die entsprechenden Transkriptionsfaktoren für die Induzierbarkeit verantwortlich sind, wobei die Mutation der SP1-Bindungsstelle etwas größere Auswirkungen zu haben scheint.
- 2: Die Kombination der Mutationen in SP1(a) und NF-Y(a) führt zu einem vollständigen Verlust der Induzierbarkeit (keine Zunahme der Luciferaseaktivität unter Serumangel-Bedingungen).
- 3: Die Auswirkung der Mutation in der HNF4-Bindungsstelle ist nicht ganz eindeutig. Einerseits führt sie in manchen Konstrukten zu geringerem basalen Expressionsniveau, andererseits in manchen zu geringerer Induzierbarkeit. In allen Fällen sind die Effekte zwar signifikant, jedoch nicht sehr stark.

Zum Vergleich des murinen mit dem humanen Promotor wurden, sofern vorhanden, die entsprechenden Bindungsstellen ebenfalls mutiert (Abb. 38).

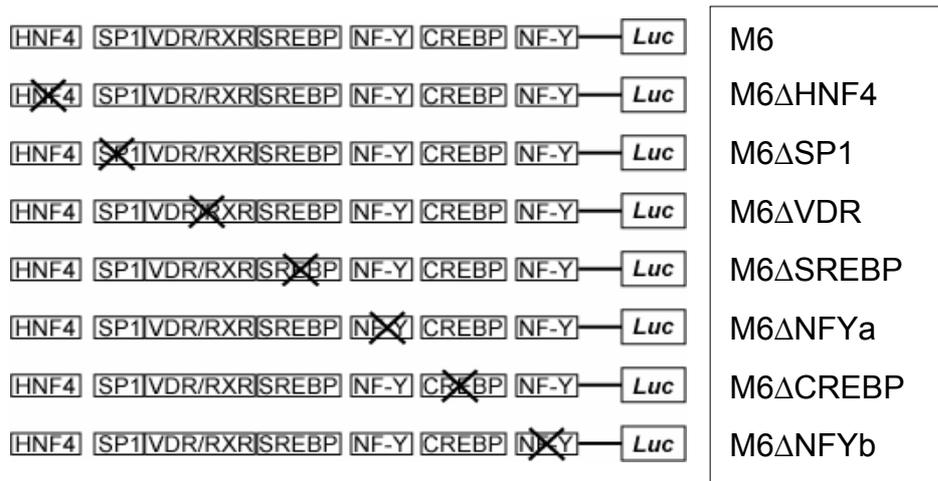


Abb. 38: Übersicht der hergestellten einfachen TF-Deletionsmutanten des murinen Promotors.

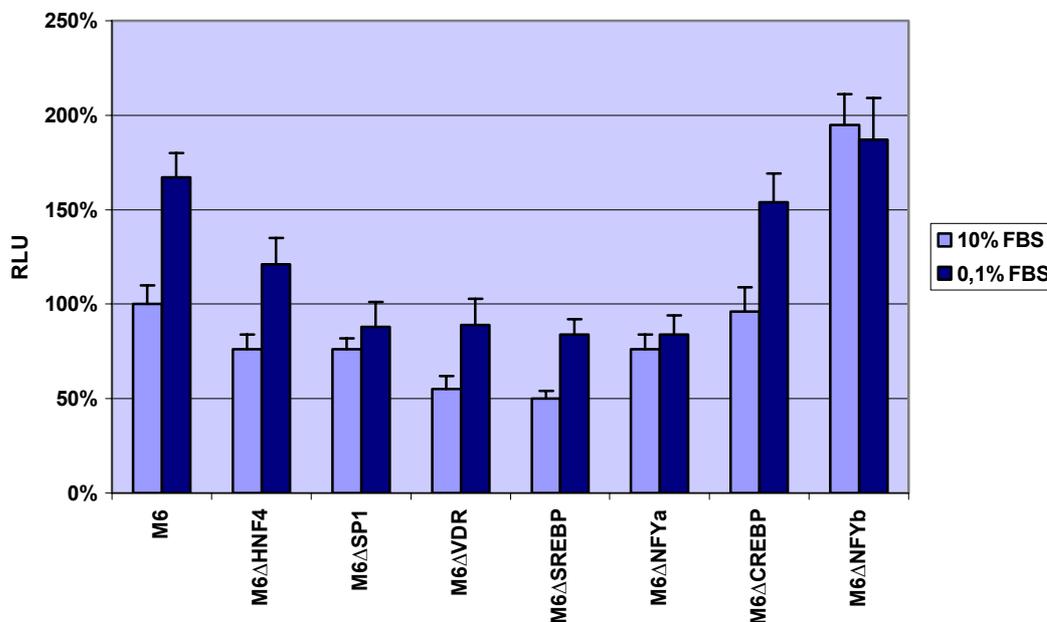


Abb. 39: Übersicht der getesteten Einfach-Deletionsmutanten des murinen Promotors in HEPA1-6-Zellen. Die Aktivität des Wildtyp-Fragments (M6) in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

Die Auswertung der Ergebnisse der murinen Promotormutanten ergab folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den humanen:

- 1: Die Bindungsstelle für CREBP scheint im murinen Promotor ebenso wenig wie im humanen von Bedeutung zu sein.
- 2: Die Auswirkung der Mutationen in den Bindungsstellen VDR/RXR und SREBP sind mit den humanen Ergebnissen vergleichbar und betreffen überwiegend die basale Expression.
- 3: Der Effekt der Mutation in NF-Y(b) ist ähnlich, aber eindeutig schwächer als im humanen Promotor.

4: SP1 (entspricht SP1(a) im humanen Promotor) und NF-Y(a) haben auch im murinen Promotor eine wichtige Funktion für die Induzierbarkeit.

5: HNF4 scheint beim murinen Promotor eine größere Rolle als im humanen zu spielen.

Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht der hergestellten Mehrfach-Mutanten des murinen Promotors.

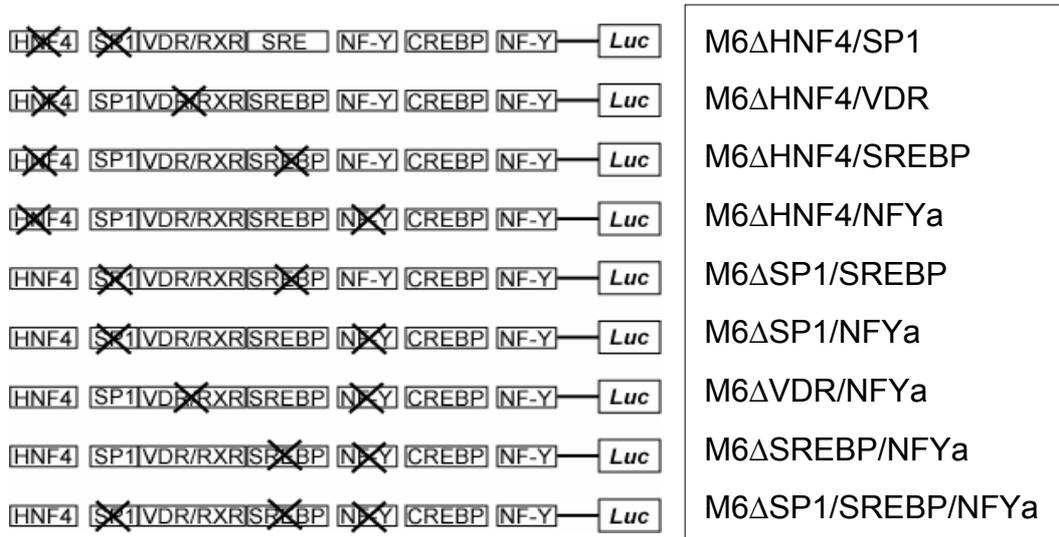


Abb. 40: Übersicht der getesteten zwei- und dreifachen Deletionsmutanten bei der Maus.

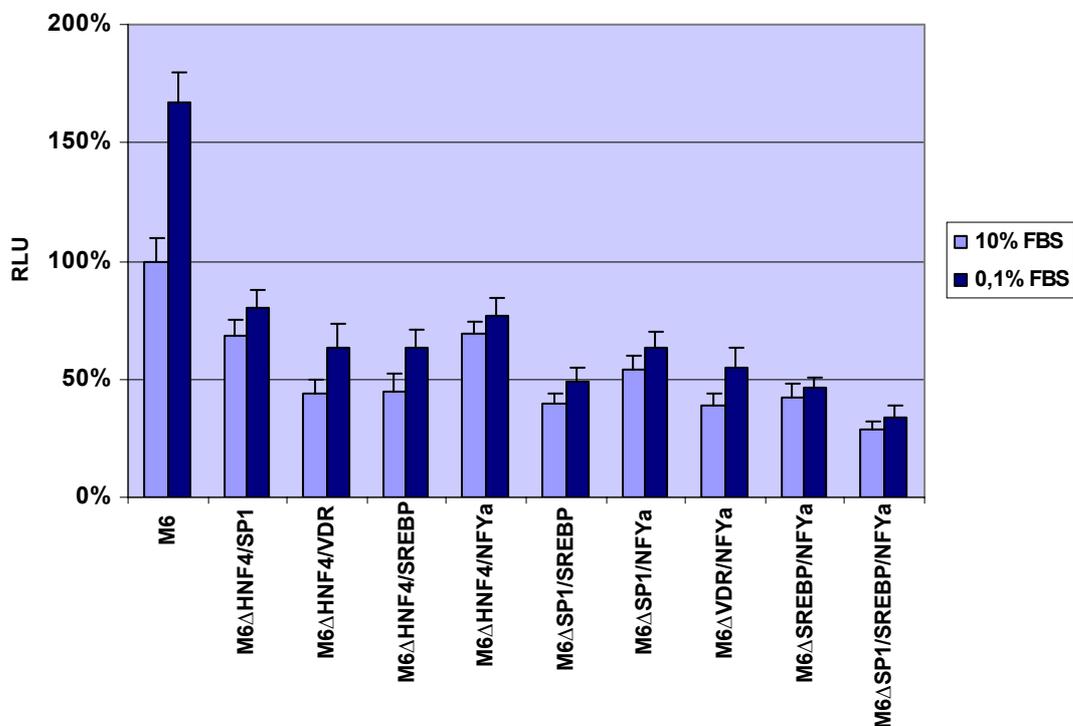


Abb. 41: Übersicht der getesteten zwei- und dreifachen Deletionsmutanten des murinen Promotors in HEPA1-6-Zellen. Die Aktivität des Wildtyp-Fragments (M6) in Vollmedium (10% FBS) wurde auf 100% gesetzt.

Die Auswertung der Versuche mit den Mehrfach-Mutanten ergab folgende Hinweise:

- 1: Auch beim murinen Promotor sind die Bindungsstellen für SP1 und NF-Y(a) für die Induzierbarkeit von entscheidender Bedeutung, allerdings führt die Doppelmutation nicht zum vollständigen Verlust derselben. Außerdem erscheint hier der Effekt von NF-Y(a) stärker als beim humanen Promotor zu sein.
- 2: Der stärkere Effekt der Mutation in HNF4 zeigt sich auch hier. Dieser scheint auf die basale Expression beschränkt zu sein.

#### 2.3.4.3. Einfluß verschiedener Medienzusammensetzungen und Zusatzstoffe auf die transkriptionelle Aktivität der HSD17B7-Promotoren

Um Hinweise auf die Funktion der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 zu finden, wurden verschiedene Promotorkonstrukte in Zellen, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert worden waren, getestet. Dazu wurden verschiedene Seren und Zusatzstoffe dem Nährmedium zugegeben. Neben dem bereits oben verwendeten FBS gehörten dazu delipidiertes FBS, delipidiertes humanes, sowie delipidiertes und steroidfreies (im Folgenden nur „steroidfrei“ genannt) humanes Serum.

Aufgrund der beschriebenen Beteiligung der Gene am Cholesterin- bzw. Steroidstoffwechsel, wurden Cholesterin (Chol, 10  $\mu$ g/ml) in Kombination mit 25-Dehydrocholesterin (25-Chol, 1,5  $\mu$ g/ml), 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D, 7-Chol, 2  $\mu$ g/ml) und Estradiol (E2, 10 nM) als Medienzusätze verwendet. Um weitere Hinweise auf mögliche Leber-spezifische Effekte zu erhalten, wurden diese Versuche ebenfalls mit HEK293-Zellen durchgeführt.

Die Funktion der HSD17B7 ist u. a. die Umwandlung von Estron zu Estradiol, einer Eigenschaft die auch der HSD17B1 zugeschrieben wird. In der Literatur ist beschrieben, dass die Expression der *HSD17B1* in erheblichem Ausmaß von den Transkriptionsfaktoren AP-2 und CREBP beeinflusst wird (Piao *et al.*, 1997). Zum Zwecke des Vergleichs der *HSD17B7*-Promotoren mit dem des *HSD17B1*-Gens wurden die Auswirkungen der beiden Transkriptionsfaktoren CREBP und AP-2 getestet. Daher wurde einerseits Forskolin eingesetzt, das die Effekte von CREBP durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verstärkt. Zum anderen erfolgte ein Co-Transfektionsexperiment mit einem AP-2-Expressionsplasmid (s. 2.3.4.4.).

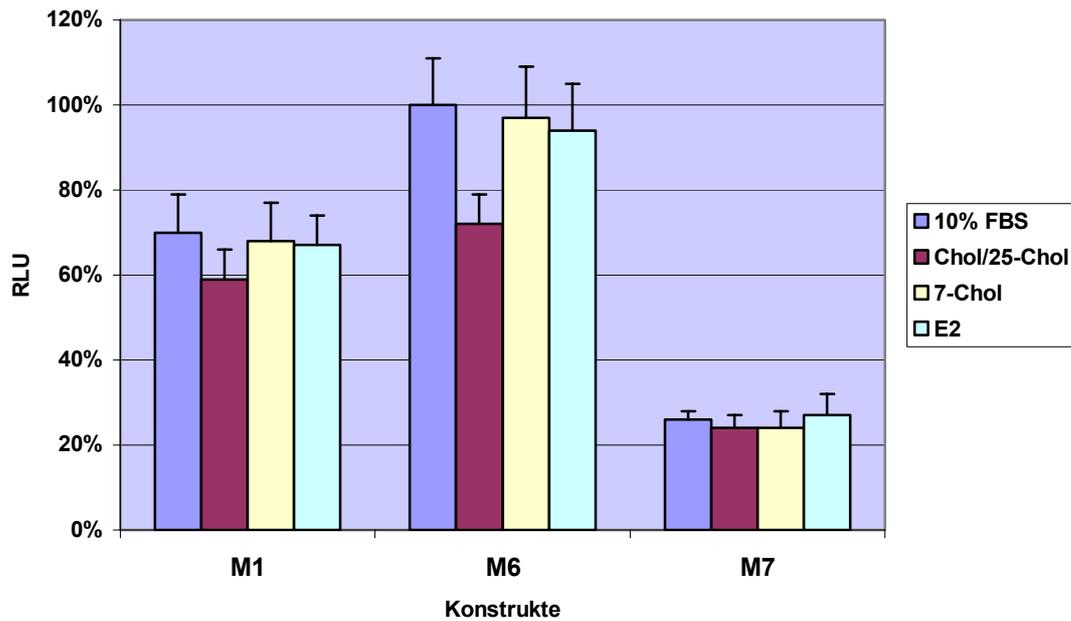


Abb. 42: Auswirkung verschiedener Medienzusätze auf die murine Promotoraktivität. Die Aktivität des Fragments M6 in 10% FBS ohne Zusätze wurde auf 100% gesetzt.

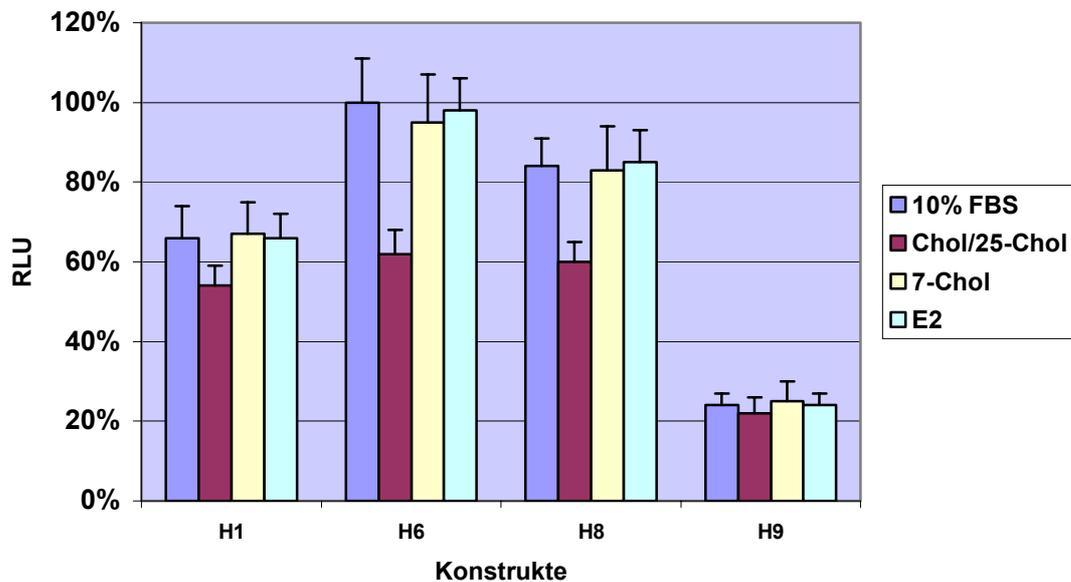


Abb. 43: Auswirkung verschiedener Medienzusätze auf die humane Promotoraktivität in HepG2-Zellen. Die Aktivität des Fragments H6 in 10% FBS ohne Zusätze wurde auf 100% gesetzt.

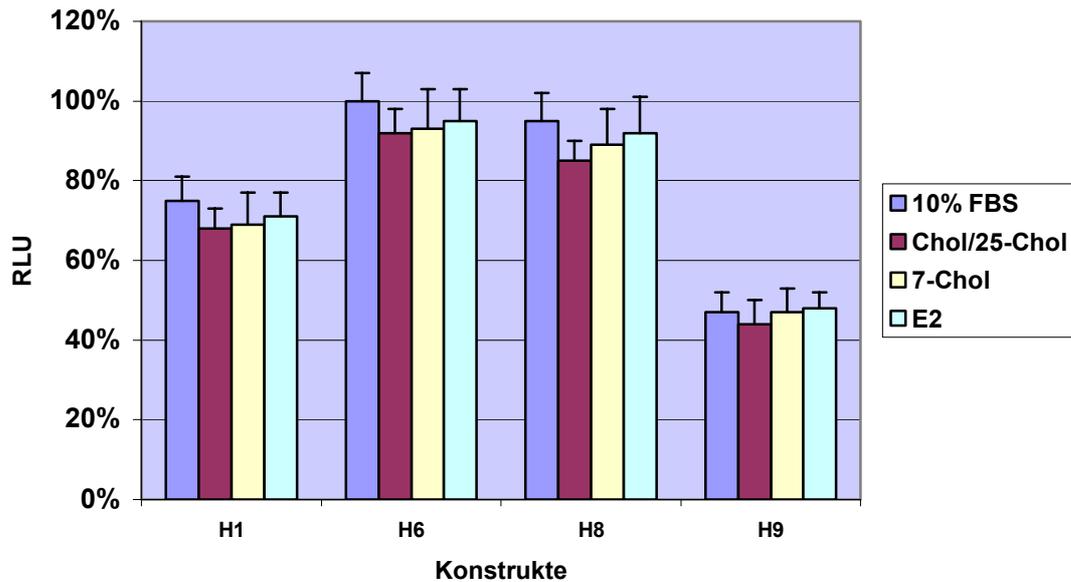


Abb. 44: Auswirkung verschiedener Medienzusätze auf die humane Promotoraktivität in HEK293-Zellen. Die Aktivität des Fragments H6 in 10% FBS ohne Zusätze wurde auf 100% gesetzt.

Die Auswertung der in den Abbildungen 42, 43 und 44 zusammengefassten Ergebnisse führte zu folgenden Schlüssen:

- 1: Die Zugabe von Cholesterin und 25-Dehydrocholesterin zum Wachstumsmedium führt zu einer deutlichen Abnahme der Promotoraktivität in den Leberzellen. Der Effekt ist beim humanen Promotor etwas stärker.
- 2: 7-Dehydrocholesterin und Estradiol haben unter den getesteten Bedingungen kaum Einfluss auf die Promotoraktivität.
- 3: In HEK293-Zellen ist ebenfalls eine Abnahme der Luciferaseaktivität durch Zugabe von Cholesterin messbar. Diese ist wesentlich geringer als in HepG2-Zellen. Die Abhängigkeit der Promotoraktivität vom Cholesteringehalt im Medium scheint also leberspezifisch zu sein.

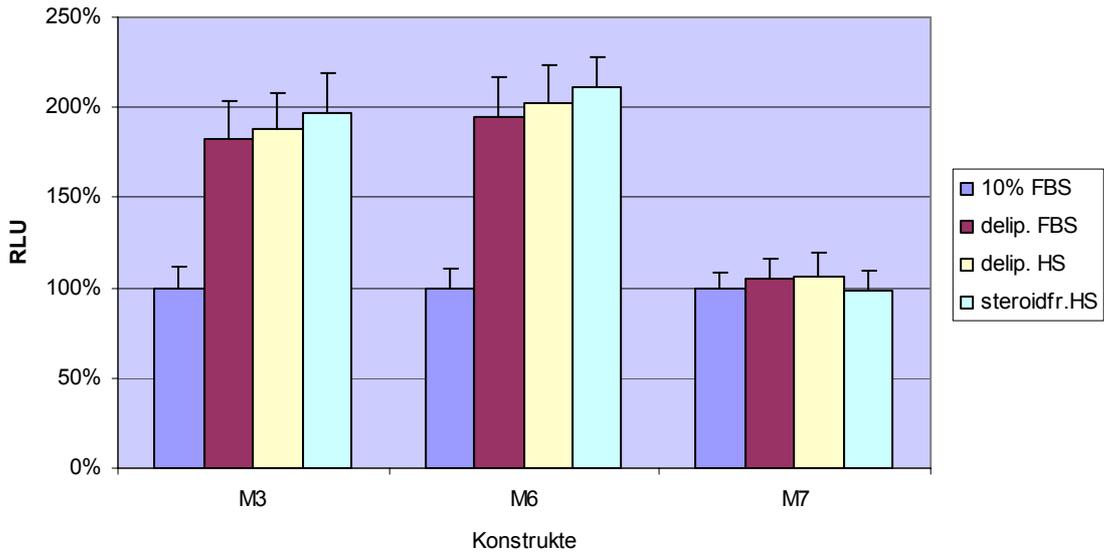


Abb. 45: Auswirkung verschiedener Seren auf die murine Promotoraktivität. Die Aktivität der Fragmente in 10% FBS wurde jeweils auf 100% gesetzt.

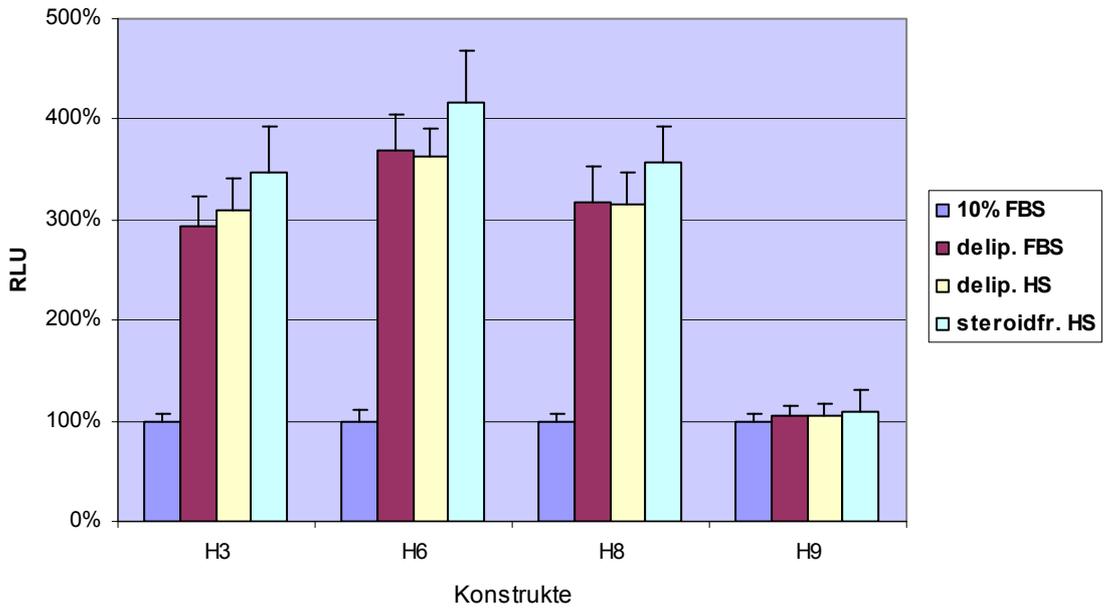


Abb. 46: Auswirkung verschiedener Seren auf die humane Promotoraktivität in HepG2-Zellen. Die Aktivität der Fragmente in 10% FBS wurde jeweils auf 100% gesetzt.

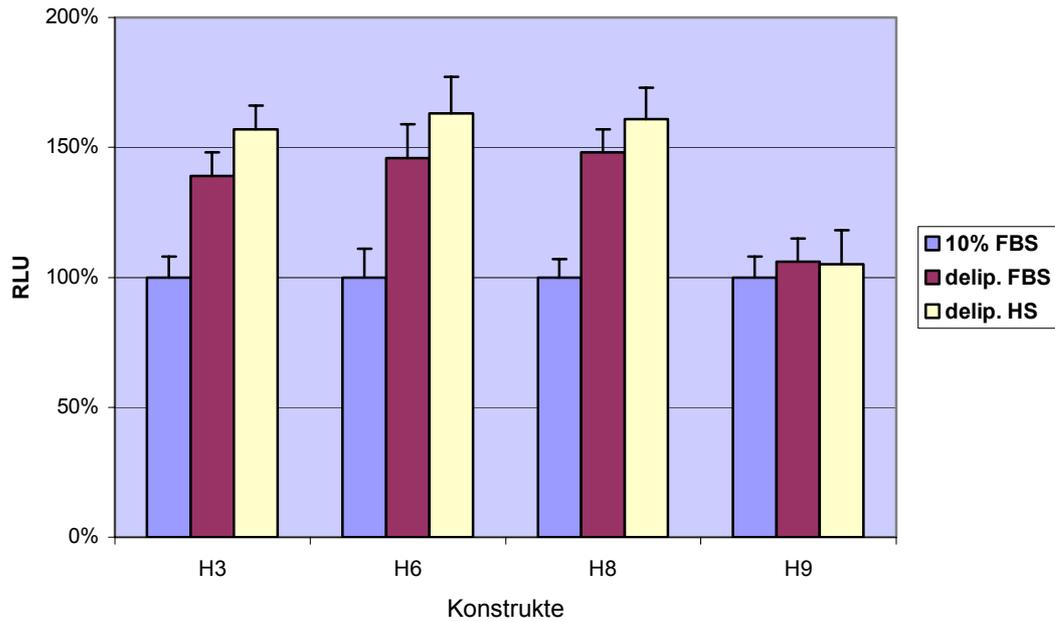


Abb. 47: Auswirkung verschiedener Seren auf die humane Promotoraktivität in HEK293-Zellen. Die Aktivität der Fragmente in 10% FBS wurde jeweils auf 100% gesetzt. Die Zellen wuchsen in steroidfreiem humanem Serum nicht an.

Die Auswirkungen der verschiedenen Seren auf die Promotoraktivität in den Leberzellen (vgl. Abbildung 45 und 46) erscheinen unerwartet hoch, sind sie doch um ein vielfaches höher als die durch Serummangel bedingten (Abb. 22 und 23). Dies liegt wahrscheinlich an den schwer zu vergleichenden Wachstumsbedingungen. Während die hier verwendeten Seren lediglich arm an den hydrophoben Bestandteilen (Lipide bzw. Cholesterin und Steroide) sind, sonst aber alle Bestandteile des unbehandelten Serums enthalten sollten, mangelt es den Zellen in 0,1% FBS an vielen unterschiedlichen Stoffen. Dies zeigte sich auch an der deutlich reduzierten Wachstumsrate der Zellen (nicht gezeigt). Dieser generelle Mangel führt vermutlich zu der im Vergleich niedrigeren Induktion der Promotoraktivität.

Auch bei diesem Versuchsansatz zeigen sich wiederum deutlich schwächere Auswirkungen auf die Promotoraktivität in HEK293- als in HepG2-Zellen.

Die Abbildungen 48 und 49 zeigen die Auswirkungen von Forskolin auf die Promotoraktivität. Die Zugabe von Forskolin führt zu einer deutlichen Steigerung der cAMP-Konzentration und damit zu erhöhten Transkriptionsraten bei entsprechend beeinflussten Genen.

Für diesen Versuch wurden die jeweiligen CREBP-Deletionsmutanten sowie die entsprechenden Wildtyp-Konstrukte verwendet. Aufgrund der oben beschriebenen Versuche mit diesen Deletionsmutanten wurden keine größeren Aktivitätsunterschiede erwartet.

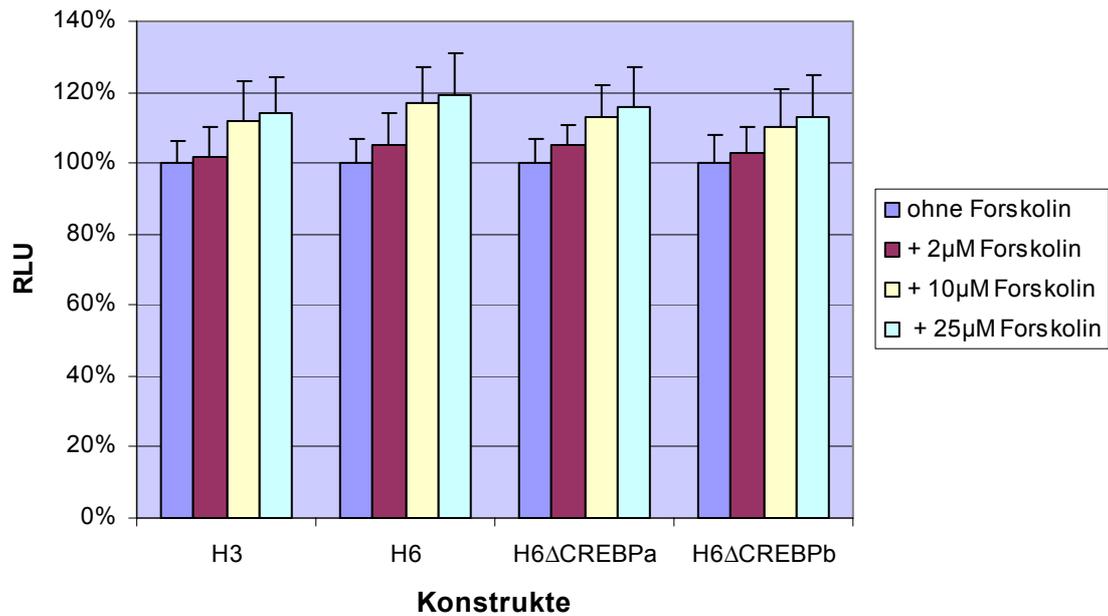


Abb. 48: Auswirkung verschiedener Forskolin Konzentrationen auf die human Promotoraktivität in HepG2-Zellen. Die Aktivität der Fragmente in 10% FBS ohne Forskolin wurde jeweils auf 100% gesetzt.

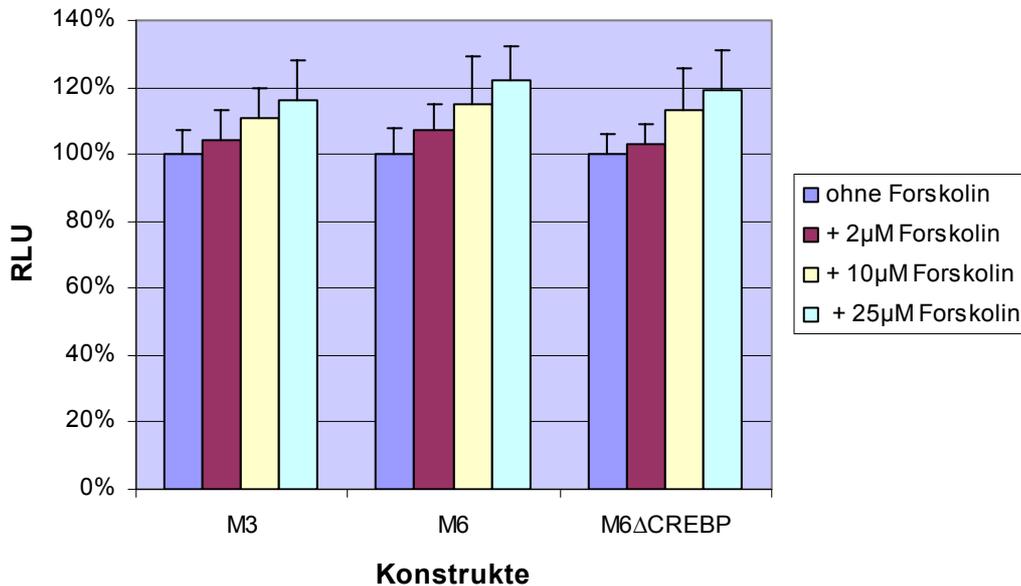


Abb. 49: Auswirkung verschiedener Forskolin Konzentrationen auf die murine Promotoraktivität in HEPA1-6-Zellen. Die Aktivität der Fragmente in 10% FBS ohne Forskolin wurde jeweils auf 100% gesetzt.

Die Auswertung der Versuche mit Forskolin ergab sowohl bei Mensch als auch bei Maus nur relativ geringe Auswirkungen dieser Substanz auf die Luciferaseexpression. Daher liegt der Verdacht nahe, dass der cAMP-Signaltransduktionsweg (bzw. CREBP) die transkriptionelle Regulation der humanen und murinen *HSD17B7* kaum beeinflusst. Auch die Auswirkungen der eingefügten Mutationen in die entsprechenden CREBP-Bindungsstellen sind als sehr

gering einzustufen. Allerdings können sie den, wenn auch geringen, Effekt der Zugabe von Forskolin nicht beseitigen. Dies führte zu der Annahme, dass die Unterschiede entweder auf indirekte Wirkungen oder auf eine weitere, nicht identifizierte, CREBP-Bindungsstelle zurückzuführen sind.

#### 2.3.4.4. Einfluss von *Activator Protein 2* (AP2) auf die transkriptionelle Aktivität

Der Einfluss von AP2 auf die transkriptionelle Aktivität der Promotoren sollte mit Hilfe eines Co-Transfektionsexperiments überprüft werden. Im Gegensatz zu den übrigen Luciferaseexperimenten wurde hierbei neben den beiden sonst eingesetzten Luciferaseplasmiden ein Expressionsplasmid für AP2 in die jeweiligen Zellen transfiziert. Anhand von Änderungen in der Luciferaseaktivität sollte so ein Nachweis über die Beteiligung von AP2 an der transkriptionellen Regulation der Gene überprüft werden.

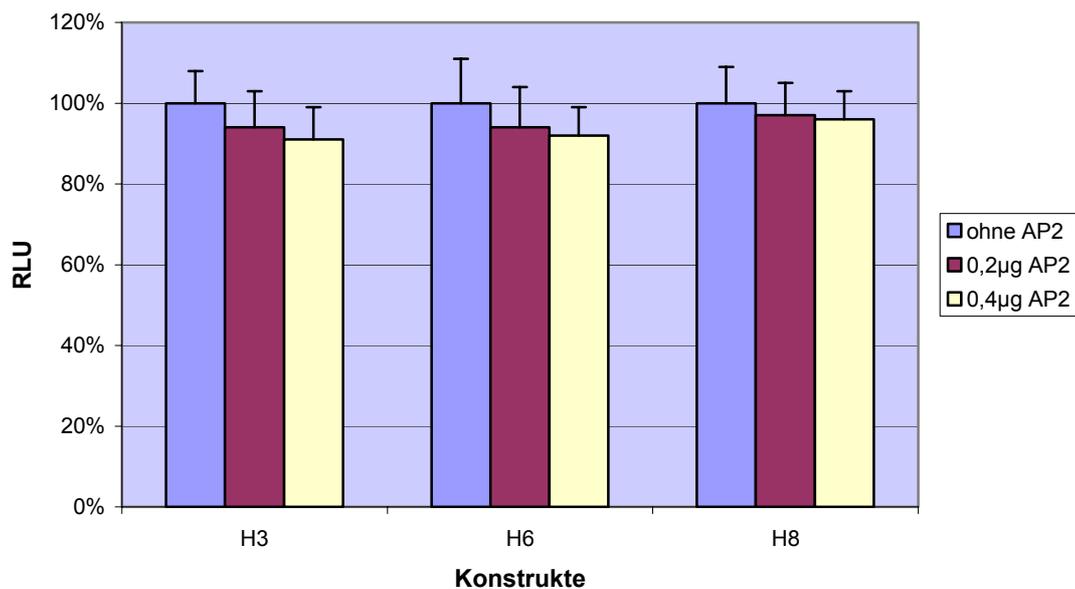


Abb. 50: Auswirkung durch AP2 auf den humanen Promotor. Unterschiedliche Mengen an AP2-Expressionsplasmid wurden zusammen mit den beiden Luciferaseplasmiden in HepG2-Zellen transfiziert. Die Aktivität der Fragmente ohne AP2 wurde auf 100% gesetzt.

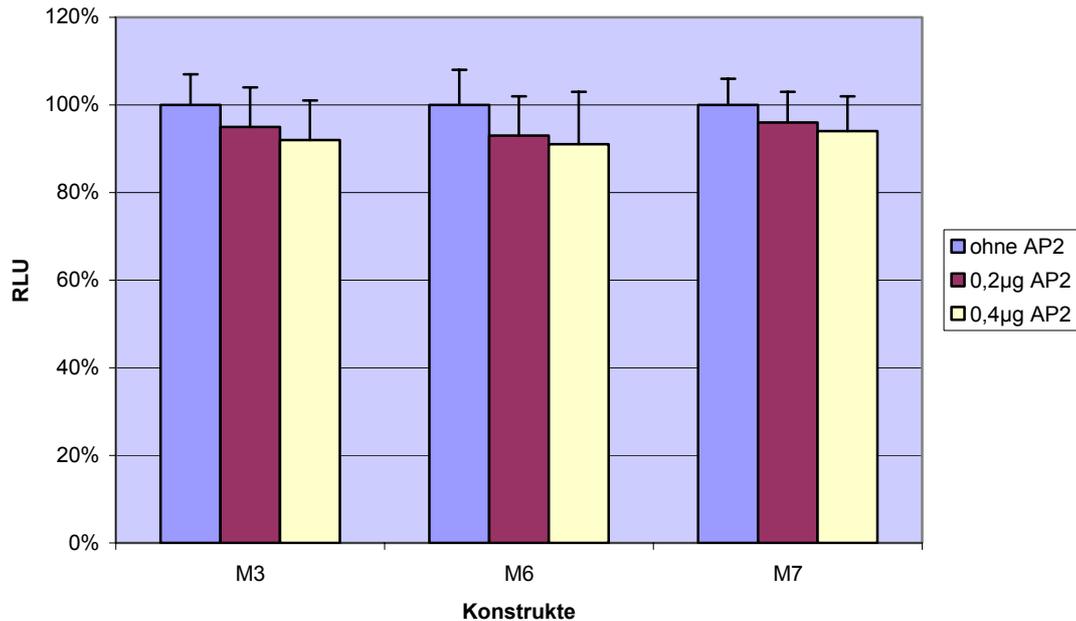


Abb. 51: Auswirkung durch AP2 auf den murinen Promotor. Unterschiedliche Mengen an AP2-Expressionsplasmid wurden zusammen mit den beiden Luciferaseplasmiden in HEPA1-6-Zellen transfiziert. Die Aktivität der Fragmente ohne AP2 wurde auf 100% gesetzt.

Anhand der Luciferaseassays konnte gezeigt werden, dass die Co-Transfektion von AP2 nur geringe Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität der Promotorfragmente hat. Sie führt zu einer geringfügigen Abnahme der Luciferaseexpression. Die Ergebnisse für den humanen Promotor sind allerdings mit Vorsicht zu genießen, da das Expressionsplasmid die murine Form von AP2 enthält, jedoch lassen die vergleichbaren Ergebnisse bei Mensch und Maus die gleichen Rückschlüsse zu. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass AP2 – wenn überhaupt – nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der *HSD17B7* spielt.

#### 2.3.4.5. Die Suche nach dem Auslöser der Induktion und den verantwortlichen Transkriptionsfaktoren

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Cholesterin und 25-Dehydrocholesterin zum Wachstumsmedium mit 10% FBS deutlichere Auswirkungen als Estradiol hat. Dies muss allerdings nicht bedeuten, dass Estradiol keinen Einfluss auf die Genexpression hat. Möglicherweise ist in Medium mit 10% FBS bereits ausreichend Estradiol vorhanden, so dass durch weitere Konzentrationserhöhungen keine Reaktion mehr erfolgt. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Luciferaseaktivität bei Wachstum der Zellen in Medium mit delipidisierendem und steroidfreiem Serum erheblich zunahm. Da die Expression vieler Gene durch die End-Produkt-Hemmung reguliert wird, lag es auf der Hand, Versuche mit diesem Serum und den beiden vermeintlichen Produkten der *HSD17B7* (Estradiol und

Cholesterin) durchzuführen. Für diese Versuche wurden die Konstrukte H6 und M6 verwendet. HepG2 und HEPA 1-6 Zellen wurden vor der Transfektion mit den entsprechenden Promotorkonstrukten in Medium mit 10% steroidfreiem Serum kultiviert. Je nach Ansatz wurde entweder eine Mischung aus Cholesterin und 25-Dehydrocholesterin, Estradiol oder keinem von beidem zugegeben.

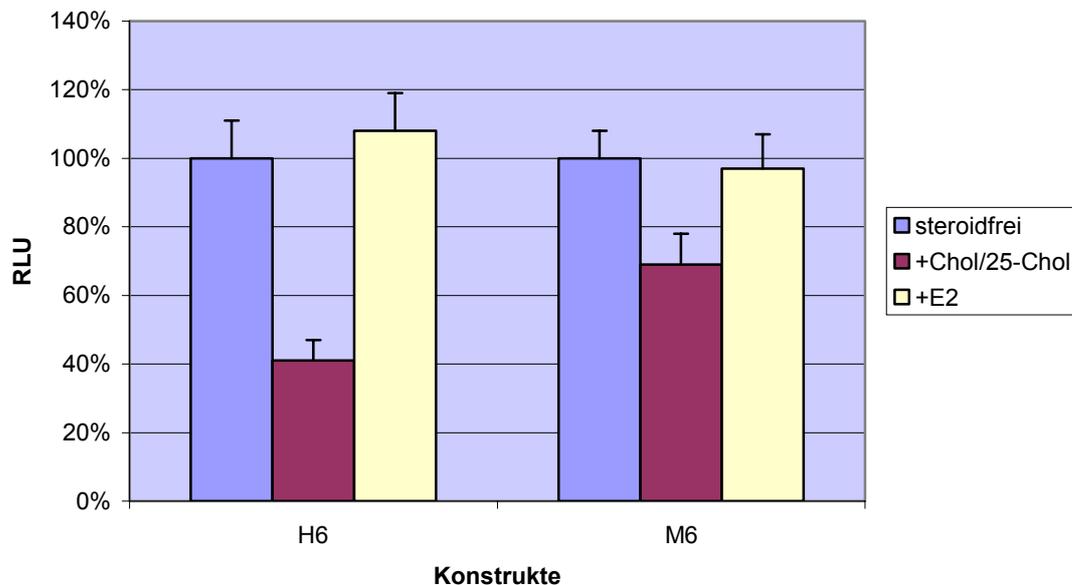


Abb. 52: Auswirkungen von Cholesterin/25-Dehydrocholesterin und Estradiol auf die Promotoraktivität in Leberzellen in delipidisiertem und steroidfreiem Serum. Die Aktivität der Konstrukte in Medium ohne Zusatzstoffe ist jeweils auf 100% gesetzt.

Durch die in Abb. 52 aufgeführten Ergebnisse zeigt sich, dass die Zugabe von Cholesterin/25-Dehydrocholesterin eine deutliche Abnahme der Promotoraktivität zur Folge hat. Wie bei den Versuchen zuvor (vgl. Abb. 42-45) ist, trotz der gleichen Tendenz, eine deutlich schwächere Reaktion des murinen Promotors zu beobachten. Erstaunlicherweise führt die Zugabe von Estradiol bei der HepG2-Zelllinie zu einer geringfügig höheren Luciferaseaktivität.

Im Folgenden wurde durch den Einsatz verschiedener Mutanten versucht, die Beteiligung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren an den beschriebenen Effekten nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Konstrukte denselben Bedingungen ausgesetzt. Abbildung 53 zeigt die Ergebnisse für murine, Abbildung 54 für humane Mutanten.

Zusätzlich wurde dieser Versuch auch mit delipidisiertem FBS durchgeführt (Abb. 55 und 56). Dies geschah, um die Ergebnisse besser mit den unspezifischen Versuchen mit 0,1% FBS (s. o.) vergleichen zu können bzw. Effekte durch den Einsatz von humanem Serum zu vermeiden.

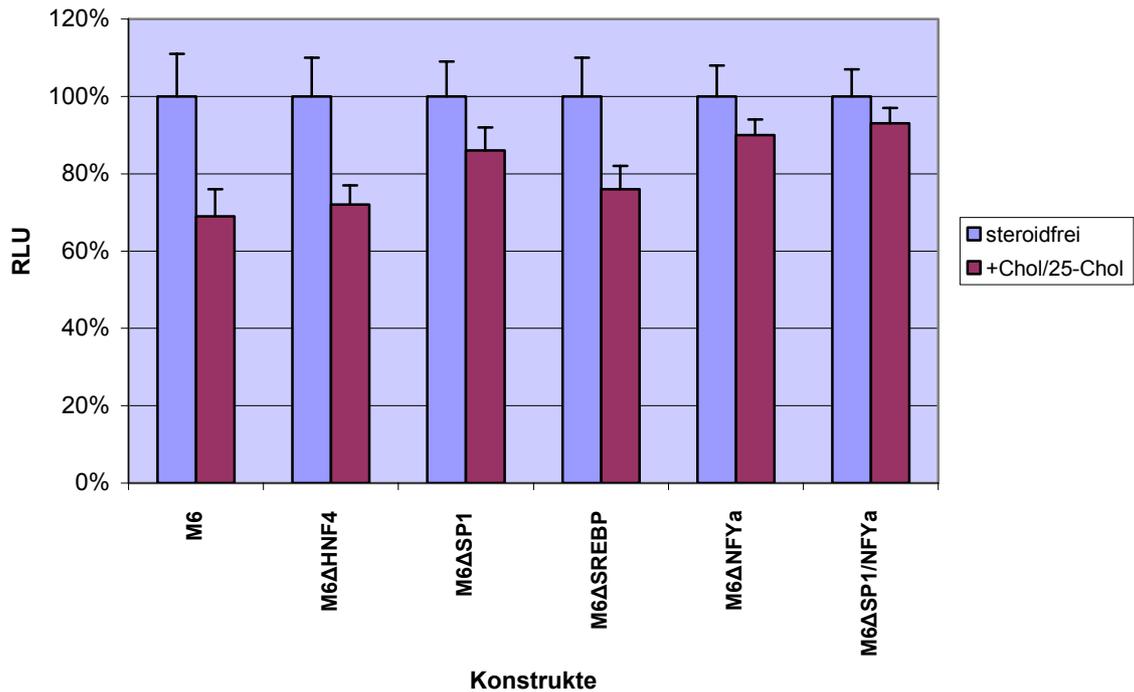


Abb. 53: Auswirkungen verschiedener Mutationen in der murinen Promotorsequenz auf die cholesterinbedingte Reaktion der Luciferaseaktivität in HEPA1-6-Zellen. Die Aktivität der Konstrukte in steroidfreiem Medium ohne Zusatz wurde jeweils auf 100% gesetzt.

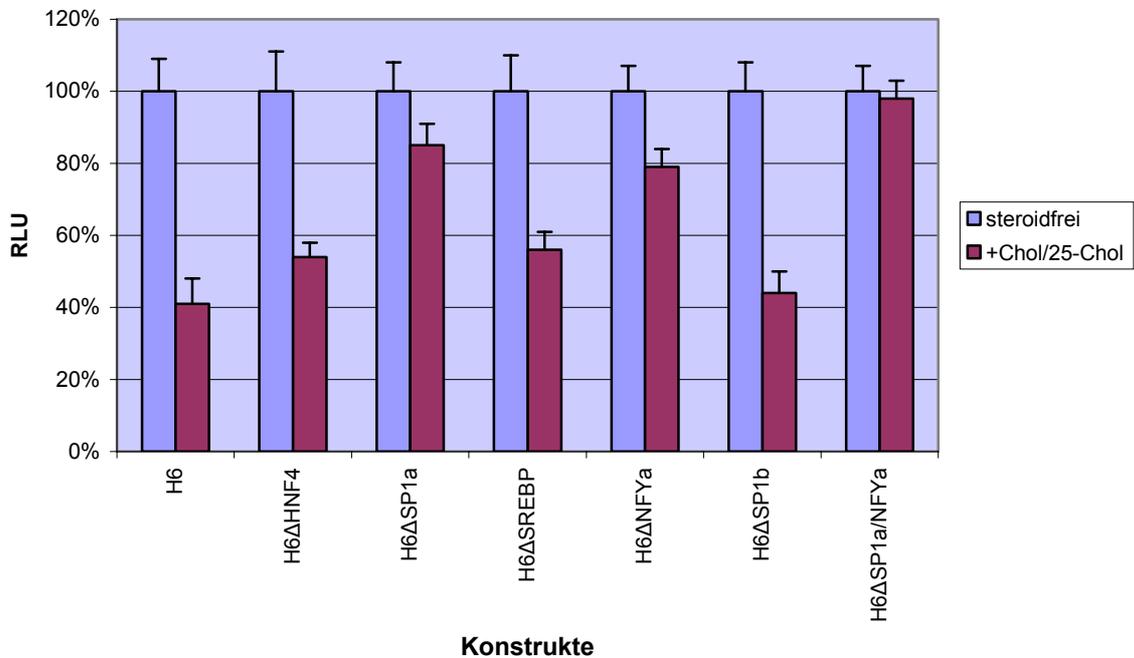


Abb. 54: Auswirkungen verschiedener Mutationen in der humanen Promotorsequenz auf die cholesterinbedingte Reaktion der Luciferaseaktivität in HepG2-Zellen. Die Aktivität der Konstrukte in steroidfreiem Medium ohne Zusatz wurde jeweils auf 100% gesetzt.

Die Ergebnisse der Analyse der Mutanten ergaben folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem humanen und murinen Promotor:

1. Wie bereits oben beobachtet, sind die beiden Bindungsstellen für NF-Y(a) und SP1 bzw. SP1(a) beim Menschen, von entscheidender Bedeutung für die Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch Cholesterinmangel. Während jedoch beim Menschen durch die Doppelmutation keine Reaktion mehr auf die Zugabe von Cholesterin zu erkennen ist, bleibt eine gewisse, wenn auch sehr geringe Induzierbarkeit bei der Maus erhalten. Dies könnte auf die Beteiligung eines zusätzlichen Signals oder eines weiteren Transkriptionsfaktors auf die Promotoraktivität hindeuten.
2. In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass funktionelle Bindungsstellen für SREBP und SP1(b) für die volle Aktivität der Promotoren nötig sind. Allerdings bestätigt sich auch die vorherige Beobachtung, dass sie keine (SP1(b)) oder nur geringe (SREBP) regulatorische Funktion besitzen.
3. Die Effekte der Mutation in der HNF4-Bindungsstelle sind messbar, aber nicht sehr groß. Sie führen zu einer leicht schwächeren Antwort auf die Zugabe von Cholesterin.

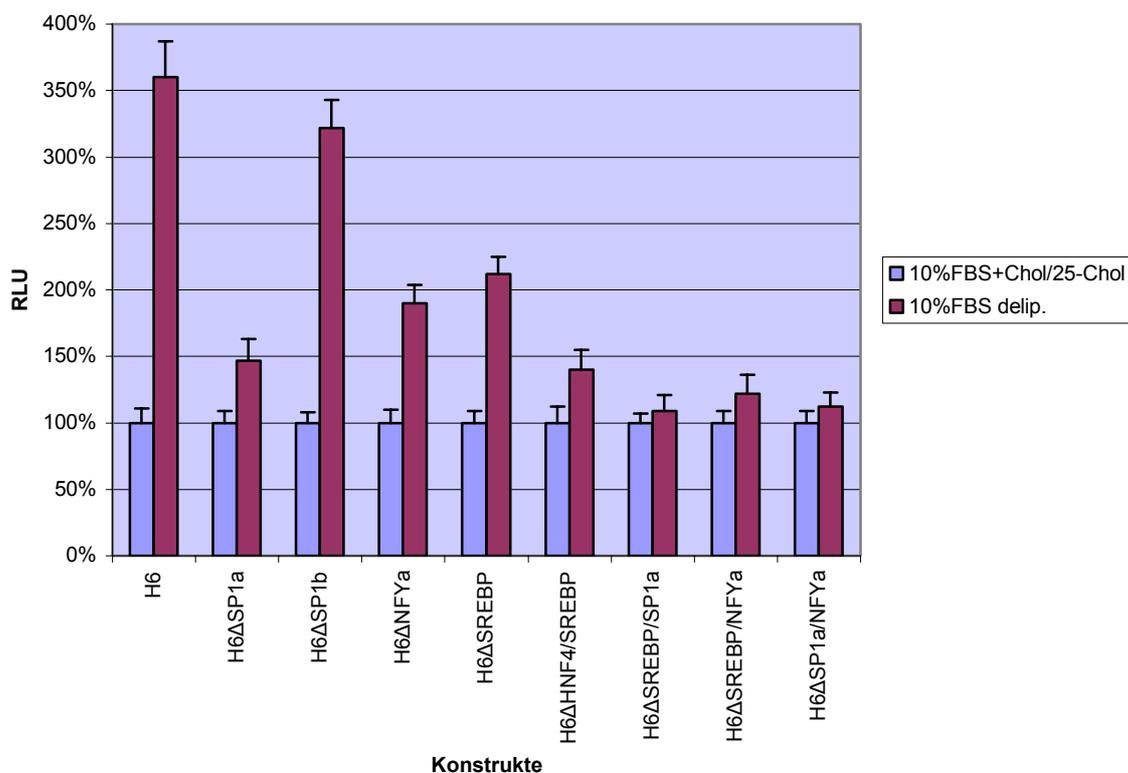


Abb. 55: Vergleich der Auswirkungen von verschiedenen TF-Bindungsstellenmutanten auf die Induktion der humanen Promotoraktivität in HepG2-Zellen durch Cholesterinmangel. Die Aktivität der Konstrukte in Medium mit Chol/25-Chol wurde auf 100% gesetzt.

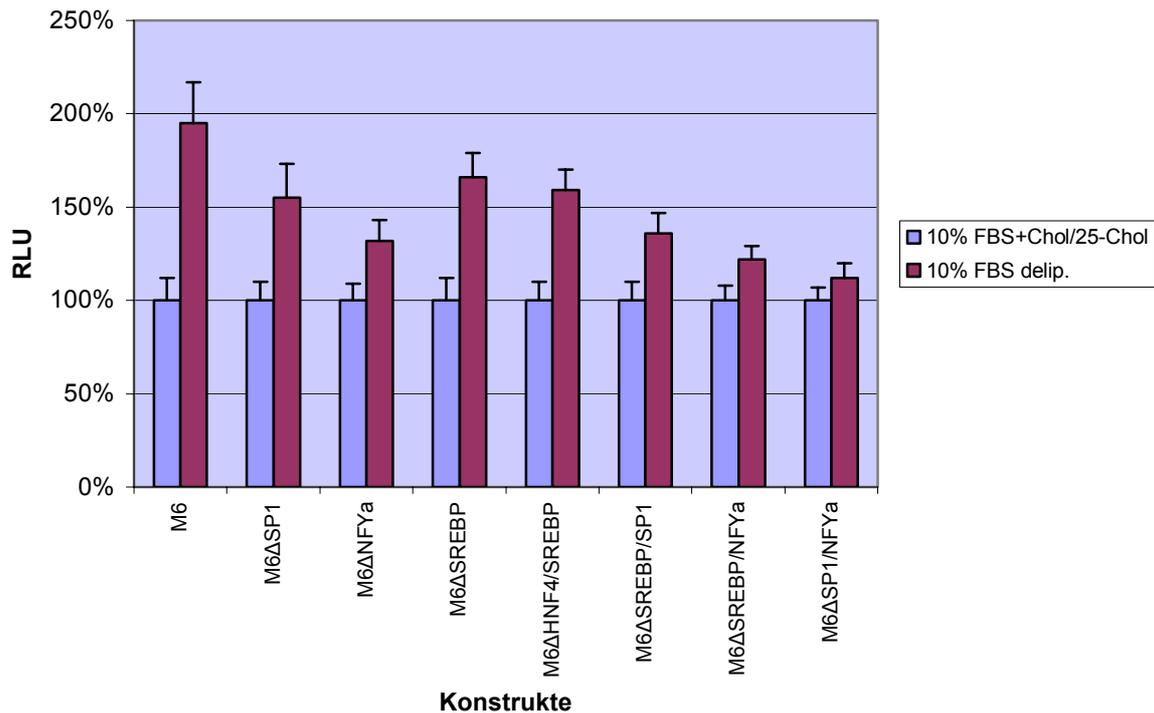


Abb. 56: Vergleich der Auswirkungen von verschiedenen TF-Bindungsstellenmutanten auf die Induktion der murinen Promotoraktivität in HEPA1-6-Zellen durch Cholesterinmangel. Die Aktivität der Konstrukte in Medium mit Chol/25-Chol wurde auf 100% gesetzt.

#### 2.3.4.6. Nachweis der Bindung von Transkriptionsfaktoren an entsprechende Bindungsstellen: *Gelshifts* und *Supershifts*

*Gelshifts*, auch *Electro-Mobility-Shift-Assays* (EMSA) oder *Gel Retardation Assays* genannt, sind eine bewährte Methode, um DNA-Proteinbindungen nachzuweisen. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass DNA, an die Protein gebunden ist, bei der Gelelektrophorese langsamer wandert als ungebundene DNA. Üblicherweise wird doppelsträngige DNA mit einer Größe von mindestens 20 bp verwendet, wobei längere Fragmente bessere Ergebnisse ermöglichen, allerdings auch mehr unspezifische Bindungen zur Folge haben können. Um die Bindung eines Transkriptionsfaktors an die entsprechende potentielle Bindungsstelle zu überprüfen, kann entweder das gereinigte Protein oder ein Nuklearextrakt verwendet werden. Im letzteren Fall muss das bindende Protein jedoch mit anderen Methoden identifiziert bzw. verifiziert werden. Dazu werden im Allgemeinen *Supershifts* verwendet. Dabei wird zusätzlich ein spezifischer Antikörper gegen den gewünschten Transkriptionsfaktor eingesetzt. Bindet dieser an den Protein-DNA-Komplex, führt dies zu einer weiteren Verlangsamung der Wanderung im Gel (*Supershift*) und damit zum Nachweis des jeweiligen Transkriptionsfaktors.

*Gelshifts* wurden in dieser Arbeit verwendet, um die zuvor durch Mutationsanalyse erzielten Ergebnisse zu bestätigen. Dies war nötig, da TF-Bindungsstellen teilweise überlappen und die nachgewiesenen Effekte damit nicht zwingend durch das Ausschalten der gewünschten Bindungsstelle verursacht wird, bzw. verschiedene Transkriptionsfaktoren an dieselbe binden können. Für die *Gelshifts* wurde überwiegend Nuklearextrakt verwendet, lediglich SP1 und VDR standen als gereinigte Proteine zur Verfügung. Um eine höhere Konzentration der Transkriptionsfaktoren zu erhalten, wurden die Nuklearextrakte aus Zellen, die in unter steroidfreien Bedingungen kultiviert wurden, präpariert. Bei Verwendung eines Nuklearextrakts kommt es allerdings zum Auftreten von unspezifischen Bindungen, die teilweise auch durch den Einsatz von unspezifischer Kompetitor-DNA nicht zu vermeiden sind. Ein weiteres Problem dabei ist, dass die optimalen Bindungsbedingungen für jeden Transkriptionsfaktor unterschiedlich sind und empirisch bestimmt werden müssen. Durch die unterschiedlichen Pufferkomponenten kommt es zum unterschiedlichen Aussehen der Shifts. Die jeweiligen Bindungsbedingungen sind ebenso wie die verwendeten DNA-Proben im Anhang aufgeführt. Jedes *Gelshift*-Experiment bestand aus mehreren Ansätzen, die bei der jeweiligen Abbildung angegeben sind; dazu gehören: 1. biotin-markierte doppelsträngige DNA-Sonde ohne Protein; 2. markierte DNA-Sonde mit Nuklearextrakt oder spezifischem Protein; 3. wie 2., zusätzlich mit einem 300-500molaren Überschuss an unmarkierter DNA-Sonde als Kompetitor zum Nachweis spezifischer Bindungen; 4. wie 2., zusätzlich mit einem 300-500molarem Überschuss an unmarkierter DNA-Sonde, die die selben Mutationen wie in Abschnitt 2.3.4.2. beschrieben trug; 5. wie 2., zusätzlich mit spezifischem Antikörper. Die Verwendung des mutierten Kompetitors erfolgte, um dadurch den Verlust der Fähigkeit der einzelnen Transkriptionsfaktoren, an die entsprechenden Bereiche zu binden nachzuweisen, und damit die zuvor beschriebenen Auswirkungen der Mutationen den entsprechenden Proteinen zuschreiben zu können. Banden, die trotz Zugabe des unmarkierten Kompetitors auftraten, sind als unspezifisch anzusehen.

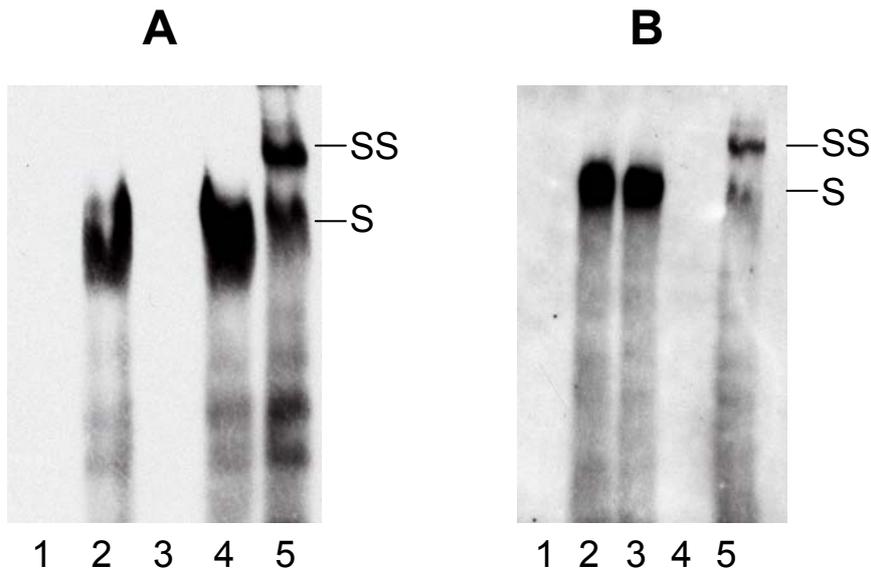


Abb. 57: *Gelshifts* mit SP1 Protein. **(A)** DNA-Sonde mit SP1-Bindungsstelle entsprechend Position -214/-208 (SP1a) im humanen Promotor; Spur 1: ohne Protein, 2: mit Protein, 3: mit unmarkiertem Kompetitor, 4: mit unmarkiertem mutiertem Kompetitor, 5: mit Protein und SP1-spezifischem Antikörper. **(B)** DNA-Sonde mit SP1-Bindungsstelle entsprechend Position -113/-107 (SP1b) im humanen Promotor; 1: ohne Protein, 2: mit Protein, 3: mit unmarkiertem mutiertem Kompetitor, 4: mit unmarkiertem Kompetitor, 5: mit 2  $\mu$ g SP1 Antikörper. S: Spezifische Bande; SS: *Supershift*.

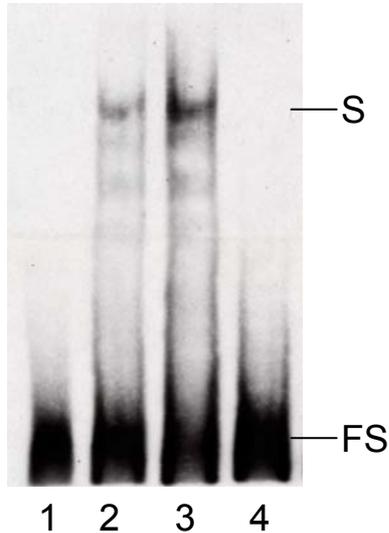


Abb. 58: *Gelshift* mit SP1 Protein. DNA-Sonde mit SP1-Bindungsstelle entsprechend Position -207/-201 im murinen Promotor; Spur 1: ohne Protein, 2: mit Protein, 3: mit unmarkiertem mutiertem Kompetitor, 4: mit unmarkiertem Kompetitor. S: Spezifische Bande; FS: Freie (ungebundene Sonde).

Die Gelshiftexperimente bestätigen das Ergebnis des DnaseI Footprints. Humanes SP1-Protein bindet an beide bioinformatisch vorhergesagten Bindungsstellen im menschlichen Promotor. Die in diesem Ansatz eigentlich nicht notwendigen Antikörper wurden eingesetzt, um deren Spezifität zu überprüfen.

In Abbildung 56 wird deutlich, dass das humane SP1-Protein auch an die vermutete Stelle im murinen Promotor bindet. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die eingefügten Mutationen in den Bindungsstellen zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit von SP1 führen.

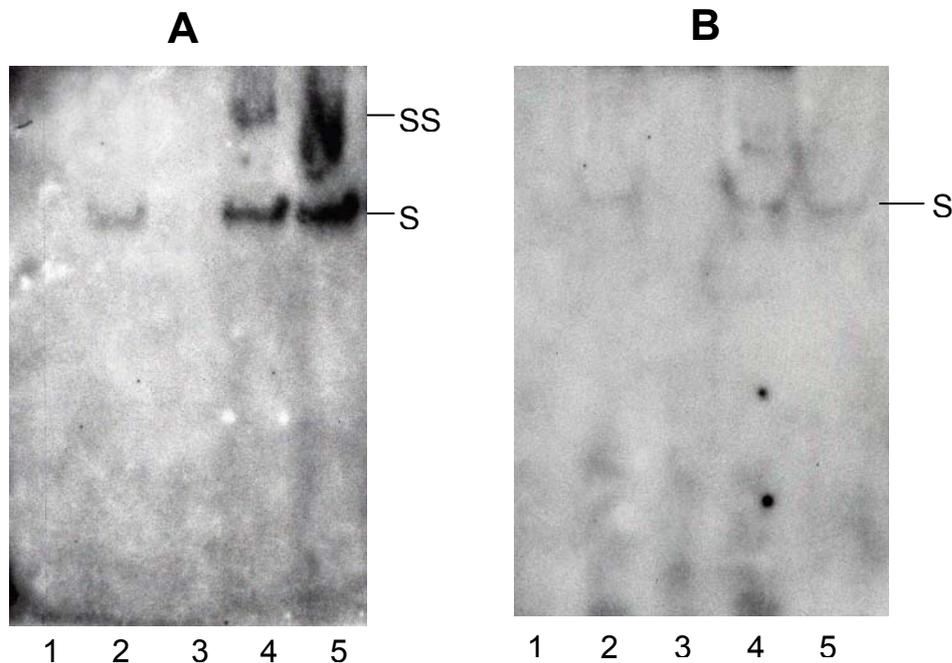


Abb. 59: *Gelshift* mit HepG2-Nuklearextrakt. Als DNA-Sonde wurden Fragmente verwendet, die die Bindungsstellen für NF-Y entsprechend den Bereichen -151/-147 (A) und -91/-87 (B) des humanen Promotors enthalten. S: Spezifische Bande; SS: *Supershift*.

- (A) 1: ohne Nuklearextrakt; 2: mit Nuklearextrakt; 3: mit unmarkiertem Kompetitor; 4: mit Nuklearextrakt und 2 µg NF-Y Antikörper; 5: mit 8 µg NF-Y Antikörper.
- (B) 1: ohne Nuklearextrakt; 2: mit Nuklearextrakt; 3: mit unmarkiertem Kompetitor; 4: mit unmarkiertem mutiertem Kompetitor; 5: mit 2 µg NF-Y Antikörper

Das Ergebnis des *Gelshifts* zeigt, dass NF-Y an den Bereich -151/-147 bindet. Die Zugabe des Antikörpers führt zu einem *Supershift* und damit zum Nachweis des entsprechenden Proteins. Im Gegensatz dazu, konnte zwar eine Bindung an den Bereich -91/-87 nachgewiesen werden, allerdings sind die geshifteten Banden deutlich schwächer. Des Weiteren führt die Zugabe von Antikörpern gegen NF-Y nicht zu einem *Supershift*. Da die Spezifität der Antikörper durch die Ergebnisse für NF-Y (a) bestätigt werden konnte, führte dies zu der Annahme, dass ein unbekanntes anderes im Nuklearextrakt vorhandenes Protein an diesen Bereich bindet.

Im Falle des murinen Promotors konnte eine Bindung von NF-Y an die CCAAT-Box im Bereich von -146 bis -142 gezeigt werden. Die Zugabe von NF-Y-spezifischem Antikörper führt zu einem *Supershift* (Abb. 60). Auch beim murinen Promotor konnte die Bindung an die zweite CCAAT-Box (im Bereich -85 bis -81) nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum

humanen Promotor konnten durch die Zugabe von Kernextrakt keine spezifischen Banden erhalten werden (nicht gezeigt).

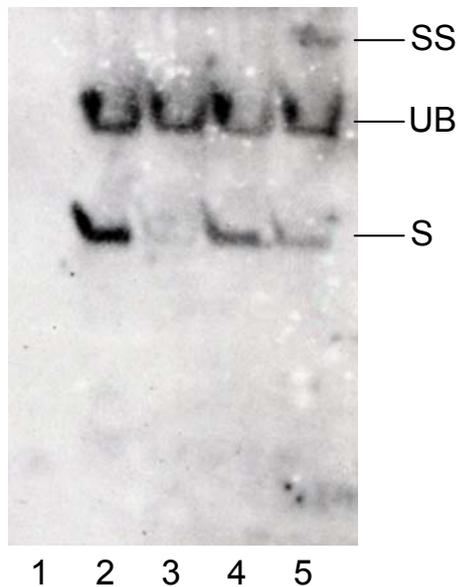


Abb. 60: *Gelshift* mit HEPA1-6-Nuklearextrakt. DNA-Fragment enthält NF-Y Bindungsstelle (entsprechend -146/-142) im murinen Promotor. 1: ohne Protein; 2: mit Nuklearextrakt; 3: mit unmarkiertem Kompetitor; 4: mit mutiertem unmarkiertem Kompetitor; 5: mit 2 µg NF-Y Antikörper. S: Spezifische Bande; UB: Unspezifische Bande; SS: *Supershift*.

Der Versuch, Proteinbindungen an den SREBP-enthaltenden Bereich in den Promotoren mit DNA-Sonden mit einer Länge von 26bp nachzuweisen schlug zunächst fehl. Es traten nur sehr schwache, kaum sichtbare Banden auf, die teilweise im „Hintergrundrauschen“ verschwanden (nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung dafür ist die, in der Literatur beschriebene, sehr schwache DNA-Bindung von SREBPs alleine (Shimano, 2001). Diese benötigen „Helferproteine“ wie z. B. SP1 oder NF-Y. Daher wurden diese *Gelshifts* mit einer längeren Sonde, die neben der Bindungsstelle für SREBPs auch jene für SP1(a) enthält, durchgeführt. Die verwendeten Sonden hatten eine Länge von insgesamt 44 Nucleotiden (human) bzw. 43 Nucleotiden (murin).

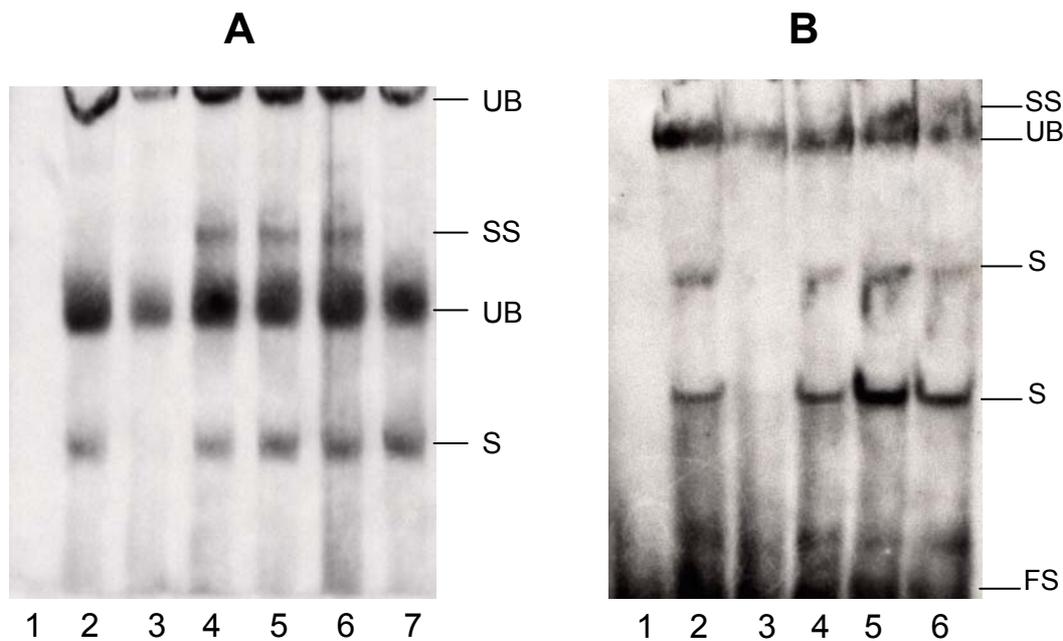


Abb. 61: (A) *Gelshift* mit HepG2-Nuklearextrakt. Als DNA-Sonde wurde ein Fragment verwendet, das die Bindungsstellen für SP1(a) und SREBP des humanen Promotors enthält. 1: ohne Nuklearextrakt, 2: mit Nuklearextrakt; 3: mit unmarkiertem Kompetitor, 4: mit Nuklearextrakt und SREBP1 Antikörper, 5: mit Nuklearextrakt und SREBP2 Antikörper, 6: mit Nuklearextrakt und SP1 Antikörper, 7: mit unmarkiertem Kompetitor der SP1-Bindungsstelle (entsprechend Abb. 57).

(B) *Gelshift* mit HEPA1-6-Nuklearextrakt. DNA-Sonde enthält SREBP- und SP1-Bindungsstelle des murinen Promotors. 1: Ohne Nuklearextrakt; 2: mit Nuklearextrakt; 3: mit unmarkiertem Kompetitor; 4: mit unmarkiertem Kompetitor mit Mutationen in SP1-Bindungsstelle (entsprechend Abb. 58); 5: mit Nuklearextrakt und SREBP1 Antikörper; 6: mit Nuklearextrakt und SREBP2 Antikörper.

UB: unspezifische Bande; S: spezifische Bande; SS: *Supershift*; FS: freie (ungebundene) Sonde.

Die Ergebnisse der *Gelshifts* zeigen, dass sowohl SREBP1 als auch SREBP2 an die entsprechenden Bereiche in den Promotoren binden können. Ferner scheint dabei die Hilfe von SP1 nötig zu sein, da der Nachweis erst mit den längeren Sonden möglich war. Bei der Maus führt die Zugabe des Nuklearextrakts zu zwei spezifischen Banden, beim Menschen nur zu einer.

Abbildung 62A zeigt die Bindung von HNF4 an den entsprechenden Bereich im humanen Promotor. Durch den Antikörper-bedingten *Supershift* konnte der Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Außerdem zeigt die Zugabe von mutierter Sonde in Spur 4 den Verlust der Bindungsfähigkeit an diesen Bereich.

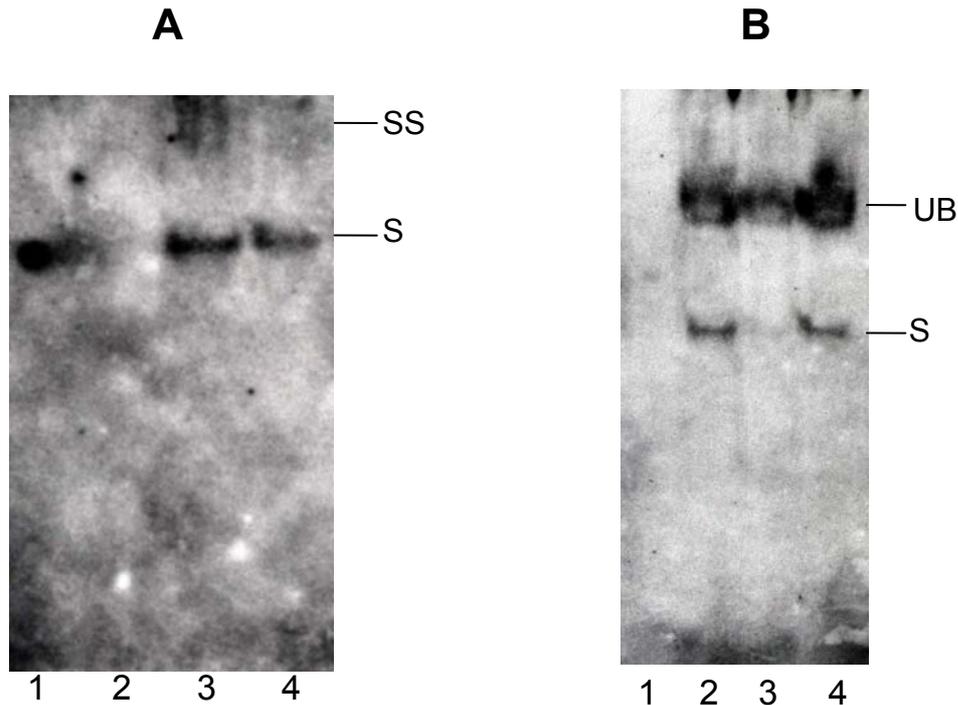


Abb. 62: (A) *Gelshift* mit HepG2-Nuklearextrakt. DNA-Sonde mit HNF4-Bindungsstelle entsprechend dem Bereich -322/-310 des humanen Promotors. 1: mit Nuklearextrakt; 2: mit unmarkiertem Kompetitor; 3: mit Nuklearextrakt und HNF4 Antikörper; 4: mit mutiertem unmarkiertem Kompetitor.

(B) *Gelshift* mit HEPA1-6-Nuklearextrakt. DNA-Sonde mit HNF4-Bindungsstelle im murinen Promotor.

1: ohne Extrakt; 2: mit Extrakt; 3: mit unmarkiertem Kompetitor; 4: mit unmarkiertem mutiertem Kompetitor.

S: Spezifische Bande; UB: Unspezifische Bande; SS: *Supershift*.

Bei der Maus konnte zwar die Bindung eines Proteins an den HNF4-entsprechenden Bereich nachgewiesen werden (Abb. 62B), allerdings gelang es trotz mehrfacher Versuche nicht, einen Antikörper-bedingten *Supershift* zu erhalten. Mögliche Erklärungen dafür sind, dass entweder die verwendeten Antikörper gegen humanes HNF4 die murine Variante nicht binden können, oder ein anderes, unbekanntes Protein an diesen Bereich bindet. Für die oben beschriebenen Effekte ist die Mutation der Bindungsstelle verantwortlich, da sie die Bindung nicht verhindern kann.

Zu guter Letzt wurde die Bindung von VDR/RXR an die entsprechende Stelle in den Promotoren überprüft. Das Problem dabei war, dass diese mit den Bindungsstellen für SREBP überlappen. Es gelang trotz mehrfacher Versuche nicht, die Bindung von VDR/RXR in Ansätzen mit Nuklearextrakt durch *Supershifts* nachzuweisen. Daher wurde auf rekombinantes gereinigtes VDR-Protein zurückgegriffen. VDR bindet normalerweise zusammen mit RXR an die entsprechenden Stellen der Promotoren. Eine zwar schwächere,

aber dennoch nachweisbare Affinität von VDR alleine an entsprechende DNA-Abschnitte konnte in früheren Experimenten bereits gezeigt werden (Erben *et al.*, 2002).

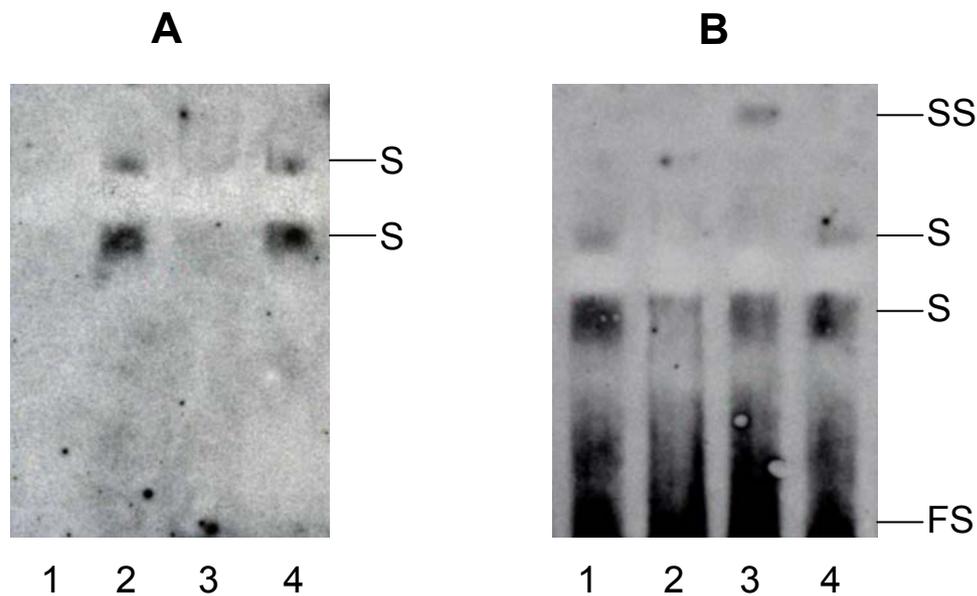


Abb. 63: *Gelshift* mit murinem VDR-Protein. (A) DNA-Sonde enthält VDR/RXR-Bindungsstelle im murinen Promotor. 1: ohne Protein; 2: mit Protein; 3: mit unmarkiertem Kompetitor; 4: mit unmarkiertem mutiertem Kompetitor. (B) DNA-Sonde enthält VDR/RXR-Bindungsstelle im humanen Promotor (entspricht der in Abb. 40 verwendeten). 1: mit Protein; 2: mit unmarkiertem Kompetitor; 3: mit 1 µg VDR-Antikörper; 4: mit unmarkiertem mutiertem Kompetitor. S: Spezifische Bande; FS: freie Sonde; SS: *Supershift*.

Die *Gelshift*-Experimente mit VDR-Protein zeigen eine Bindung des Proteins an die bioinformatisch vorhergesagten DNA-Abschnitte, in beiden Spezies treten zwei spezifische Banden auf. Allerdings ist die Bildung von DNA/Protein-Komplexen durch die Zugabe von unmarkiertem Kompetitor nicht vollständig zu verhindern. Aufgrund der aber nur sehr schwachen Signale ist dennoch von einer spezifischen Bindung auszugehen. Bei dem Ansatz mit menschlicher DNA ist deutlich ein *Supershift* zu erkennen (Spur 3). Eine Erklärung, warum dieser nicht mit Kernextrakt zu erreichen war, ist möglicherweise darin zu suchen, dass die Bindung des Antikörpers an VDR durch die Heterodimerisierung mit RXR verhindert wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass VDR im Kernextrakt in zu niedriger Konzentration vorhanden ist und daher mit der verwendeten Methode nicht nachweisbar war.

### 3. DISKUSSION

#### 3.1. Promotoranalyse

##### 3.1.1. Die genomische Organisation der *mhsd17b7* und Vergleich der beiden humanen Kopien

Während der Arbeit war bereits bekannt, dass das murine ebenso wie das humane *HSD17B7*-Gen auf Chromosom 1 (1q23) lokalisiert ist, obwohl in der Erstbeschreibung der humanen *HSD17B7* von Chromosom 10 (10q11) ausgegangen wurde (Krazeisen *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das murine Gen ebenfalls aus 9 Exons und 8 Introns besteht, auch die gesamte Größe von etwas über 20kb ist vergleichbar (Abb.64). Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der Genprodukte beträgt 74% (Krazeisen *et al.*, ebd). Während bei der Maus kein Pseudogen entdeckt werden konnte (kurze Stücke mit hoher Sequenzhomologie sind dennoch auf anderen Chromosomen vorhanden, nicht gezeigt), sind für die humane *HSD17B7* zwei beschrieben (in dieser Arbeit konnten auch im menschlichen Genom mehrere kurze Sequenzabschnitte mit hoher Sequenzhomologie auf verschiedenen Chromosomen in dieser Arbeit entdeckt werden, nicht gezeigt). Neben einem Pseudogen auf Chromosom 1 (1q44), dessen entsprechend codierende Sequenz viele Stopcodons enthält und somit nicht zu einem funktionellen Protein führen kann (Torn *et al.*, 2003), befindet sich ein weiteres auf Chromosom 10 (10q11). Dies entspricht der Lokalisation des ursprünglich von Krazeisen *et al.* (1999) beschriebenen Gens.

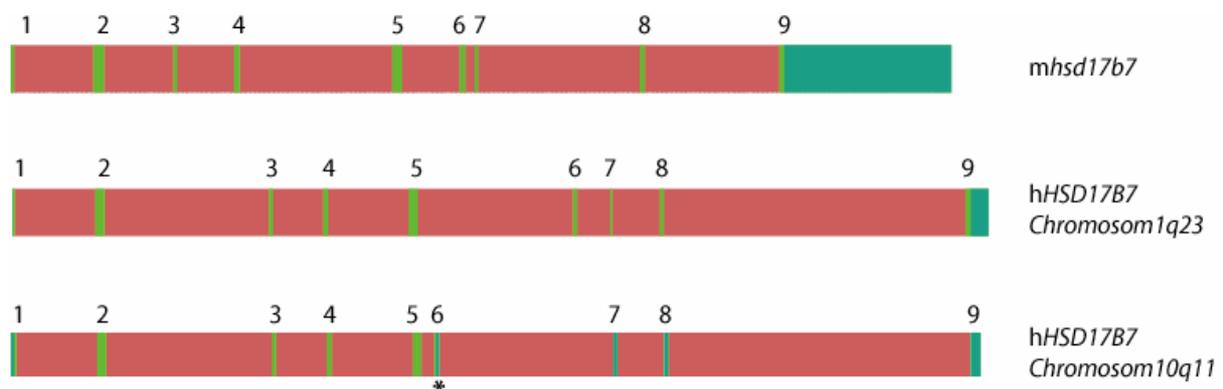


Abb. 64: Schematische Abbildung der genomischen Organisation der *HSD17B7* Gene in Mensch und Maus. Zusätzlich ist das vermeintliche Pseudogen auf Chromosom 10q11 des Menschen abgebildet. Dieses enthält ein Stopcodon in Exon 6(\*). Die Zahlen über den einzelnen Darstellungen geben die verschiedenen Exons an. Grün: translatierte Bereiche, Türkis: untranslatierte Bereiche. Die Organisation des weiteren Pseudogens auf Chromosom 1q44 wurde nicht bestimmt.



unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Aktivitätsuntersuchungen und subzelluläre Lokalisationsstudien mit einer um 127 Aminosäuren C-terminal verkürzten Version, die in etwa der auf Chromosom 10 enthaltenen Variante entspricht, zeigten, dass diese keine Aktivität bezüglich Estradiol- oder Cholesterinsynthese hat und nicht am ER, sondern im Zytoplasma lokalisiert ist (Marijanovic *et al.*, 2003). Dies ist jedoch kein definitiver Beweis für die fehlende Aktivität des theoretischen endogenen Genprodukts. Möglicherweise ist bei der von Marijanovic *et al.* (ebd.) getesteten Variante (durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz zur auf Chromosom 10 kodierten Variante) eine Faltung zu aktivem Protein nicht möglich.

Darüber hinaus wurde die Expression einer alternativ gespliceten Version der hHSD7B17 beschrieben. Diese unterscheidet sich durch das komplette Fehlen von Exon 6 und ein abweichendes Expressionsmuster (Luu-The, 2001). Für das daraus resultierende Protein gelten dieselben Mutmaßungen wie für die verkürzte Version. Da es aber hierbei nicht zu einem vorzeitigen Translations-Stop kommt und die Exons 7, 8 und 9 enthalten wären, ist ein funktionsfähiges Protein wahrscheinlicher. In bisherigen Experimenten in Bezug auf den Steroidmetabolismus konnte jedoch keine Aktivität dieser Version nachgewiesen werden (Torn *et al.*, 2003). Die entsprechend verkürzte mRNA konnte im Rahmen dieser Arbeit in Leber- und Nierenzellen nicht nachgewiesen werden.

Nachdem die Zahl der sequenzierten und veröffentlichten Genome stetig zunimmt, konnte die genomische Organisation des *HSD17B7*-Gens auch in anderen Spezies untersucht werden. Diese entspricht im Schimpansen weitgehend der humanen. Die komplette Genkopie ist ebenfalls auf Chromosom 1, das entsprechende „Pseudogen“ ebenfalls auf Chromosom 10 lokalisiert. Die entsprechenden Schemata wurden nicht in Abb. 64 aufgenommen, da sie identisch mit der humanen sind. Bei der Ratte konnte, wie bei der Maus, nur eine Kopie des Gens entdeckt werden, die Organisation entspricht dem murinen Gen. Das bedeutet also, dass diese möglicherweise funktionelle Genduplikation aus evolutionärer Sicht zwischen Nagetieren und Primaten entstanden sein muss. Studien mit weiteren Primatenspezies könnten in dieser Hinsicht Aufschluss geben. Dies wäre aber erst nach einer funktionellen Bestätigung des vermeintlichen Pseudogens (10q11) sinnvoll.

### **3.1.2. Die Aufklärung der transkriptionellen Regulation der humanen und murinen 17 $\beta$ -Hydroxsteroiddehydrogenase Typ 7**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, stehen einer Zelle verschiedene Kontrollmechanismen der Genexpression zur Verfügung. Während die meisten davon nicht unbedingt in direktem bzw. erkennbarem Zusammenhang mit der Funktion eines Genprodukts stehen, eignet sich die Analyse der transkriptionellen Regulation gut für die funktionelle

Analyse eines Genprodukts. In der Literatur beschriebene Promotorstudien zeigen, dass verschiedene Gene innerhalb eines Synthese- oder Stoffwechselweges häufig sehr ähnlich reguliert sind. Daher sollte durch die Identifizierung und funktionelle Bestätigung der beteiligten Transkriptionsfaktoren im Falle der 17 $\beta$ -Hydroxsteroiddehydrogenase Typ 7 zusätzlich zur Aufklärung des transkriptionellen Regulationsmechanismus auch eine funktionelle Einordnung des Enzyms in den Steroid- bzw. Cholesterinstoffwechsel erfolgen, da die 17 $\beta$ -Hydroxsteroiddehydrogenase Typ 7 in beide Stoffwechselwegen eingeordnet wurde. Kurz nach Entdeckung des homologen Rattenproteins (Duan *et al.*, 1996) wurde die murine 17 $\beta$ -Hydroxsteroiddehydrogenase Typ 7 (Hsd17b7) beschrieben (Nokelainen *et al.*, 1998). Als Funktion wurde *in vitro* die Umwandlung von Estron zum biologisch aktiveren Estradiol nachgewiesen, einer Aktivität, die auch der Hsd17b1 zugeschrieben wird. Somit lag der Verdacht nahe, dass Ähnlichkeiten der transkriptionellen Regulation bei beiden Genen auftreten sollten. Wie sich durch meine Arbeit zeigte, war dies nicht der Fall.

Zwei Jahre später konnte das homologe Gen des Menschen und dessen genomische Organisation beschrieben werden (Krazeisen *et al.*, 1999). Allerdings wurde als genomische Lokalisation Chromosom 10 angegeben. Später stellte sich heraus, dass sich an dieser Stelle ein vermeintliches Pseudogen befindet, das funktionelle Gen dagegen auf Chromosom 1. Dies ist insofern verwunderlich, da der für die damaligen Untersuchungen herangezogene und auch in der vorliegenden Arbeit verwendete PAC-Klon (LLNLP709105128Q2) die HSD17B7-Version von Chromosom 1 enthält. Einerseits ist dies zwar ein Zeichen für die große Ähnlichkeit der beiden Kopien, führte jedoch wahrscheinlich bei der Kartierung unter Verwendung eines *Radiation-Hybrid-Panels* aufgrund zu geringer Marker-Dichte zur falschen Annotation des humanen Gens auf Chromosom 10. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms war zu dieser Zeit noch nicht abgeschlossen, daher ist gut vorstellbar, dass die Marker-Dichte im entsprechenden Bereich auf Chromosom 10 höher war als auf Chromosom 1.

Das Expressionsmuster im Menschen wich von dem in der Maus ab. Das Enzym konnte auch im Gehirn und in der Leber gezeigt werden, also in Geweben die nicht mit der Steroidsynthese in Verbindung gebracht werden. Dies gab Anlass zu Zweifeln, dass das humane Protein ausschließlich an der Estradiolsynthese beteiligt ist. Etwa zwei Jahre später wurde anhand phylogenetischer Studien eine signifikante Ähnlichkeit mit dem ERG27-Protein der Hefe entdeckt (Breitling *et al.*, 2001). Dieses Protein besitzt die Funktion einer 3-Ketosteroidreduktase und ist ein wichtiger Bestandteil der postsqualenen Ergosterolbiosynthese (dem Äquivalent der Cholesterinbiosynthese in Vertebraten) in der Hefe (Gachotte *et al.*, 1999). Diese funktionelle Eigenschaft konnte wenig später auch für die humane und murine HSD17B7 gezeigt werden (Marijanovic *et al.*, 2003).

In Studien über die Rolle der murinen Hsd17b7 während der Embryonalentwicklung wurde mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen ein interessantes Expressionsmuster entdeckt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens in denselben Regionen wie die HMG-CoA-Reductase (*Hmgcr*) (und andere Gene der Cholesterinbiosynthese) erfolgte, dem limitierenden Enzym der Cholesterinbiosynthese und dem Hauptangriffspunkt von lipidsenkenden Medikamenten. Dies wurde als weitere Bestätigung für die Beteiligung der Hsd17b7 an der Cholesterinbiosynthese gewertet (Laubner *et al.*, 2003).

Auffällig war außerdem die starke Expression im sich entwickelnden Nervensystem, im Bereich der entstehenden Extremitäten, des Gesichts und in apoptotischen Regionen. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit den Phänotypen der bereits in der Einleitung beschriebenen *bare patches*, *striated* und *tattered* Mäuse. Die HSD17B7 wäre nicht das erste Enzym dieser Familie, das sowohl im Steroid-, als auch am Cholesterinhaushalt beteiligt ist. Auch im Falle der HSD17B4 konnte diese duale Funktionalität bereits gezeigt werden (Leenders *et al.*, 1996).

Generell sind *in vitro* Untersuchungen von Enzymen mit Vorsicht zu genießen, da die Ergebnisse nicht unbedingt auf die tatsächlichen biologischen Funktionen im Organismus übertragbar sind. Bei SDRs wurde schon mehrfach vermutet, dass, obwohl sie *in vitro* in der Lage sind ein breites Spektrum an Substraten umzusetzen, ihre tatsächliche Rolle *in vivo* jedoch meist hochspezifisch ist. Des Weiteren erfüllen homologe HSDs in Mensch und Maus nicht unbedingt dieselben Funktionen, wie die Beispiele der Hsd17b6 und Hsd17b9 zeigen. Teilweise kann man auch an den Bezeichnungen von Genen erkennen, dass sie zunächst einem anderen Bereich zugewiesen wurden. Beispiele dafür sind EBP, das zunächst als Emopamil-bindendes Protein beschrieben wurde, später aber Sterol-Isomerase Aktivität zeigte und die HSD17B10, die anfangs als ERAB (ER-assoziiertes Amyloid beta-bindendes Protein) bezeichnet wurde (Yan *et al.*, 1997), dann als 17 $\beta$ -HSD beschrieben wurde (He *et al.*, 1999). Es ist daher nur wahrscheinlich, dass in naher Zukunft die Funktionsspektren verschiedener SDRs noch erweitert werden.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer Ansatz zur Analyse der Funktion(en), und zwar die Aufklärung der transkriptionellen Regulation verwendet. Durch die Identifizierung bereits bekannter regulatorischer Sequenzen und damit der entsprechenden TFs konnten wertvolle Hinweise zur Funktion der humanen und murinen HSD17B7 gewonnen werden. Außerdem konnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Mensch und Maus aufgezeigt werden.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren bezüglich der Regulation der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 nur sehr wenige Daten verfügbar. Für das humane Gen wurde lediglich eine einfache bioinformatische Analyse durchgeführt (Krazeisen *et al.*, 1999), dabei konnte allerdings keiner der in dieser Arbeit nachgewiesenen TF-Bindungsstellen

identifiziert werden. Eine experimentelle Bestätigung der bioinformatischen Analyse fand nicht statt. Später wurde durch die Untersuchung von transgenen SREBP1a- und SREBP2-Mäusen für das murine Gen eine Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität von diesen beiden TFs beschrieben (Horton *et al.*, 2003).

Bei der ersten bioinformatischen Analyse *HSD17B7* fiel zunächst auf, dass die 5' flankierenden Regionen der Gene bei Mensch und Maus keine Initiatorsequenzen und TATA-Boxen enthalten, die Bereiche einen relativ hohen GC-Gehalt (über 60%) aufweisen und potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SP1 (GC-Box) und NF-Y (CCAAT-Boxen) enthalten (s. Abb. 30 und 31). Diese Eigenschaften sind typisch für so genannte „Housekeeping“-Gene (Azizkhan *et al.*, 1993; Nothias *et al.*, 1995), die sich durch nahezu ubiquitäre Expression auszeichnen. Und tatsächlich finden sich in den Datenbanken zahlreiche ESTs der *HSD17B7* aus den unterschiedlichsten Geweben (sowohl murin als auch human), jedoch mit überwiegender Expression in Plazenta, Ovarien, Gehirn und Leber. Bereits in diesem frühen Stadium der Untersuchung zeigten sich erste Hinweise auf die später erfolgte Einordnung der *HSD17B7*. Während die meisten Gene des Steroidstoffwechsels von Promotoren die TATA-Boxen enthalten und keine CCAAT-Box aufweisen reguliert werden, konnten bei den bisher analysierten Genen der postsqualenen Cholesterinbiosynthese (z. B. *SQLE*, Squalenepoxidase; *SI* bzw. *EBP*, Sterolisomerase; *DHCR7*, 7-Dehydrocholesterinreduktase) funktionelle CCAAT-Boxen, sowie das Fehlen von TATA-Boxen gezeigt werden.

#### *Chancen und Risiken der Bioinformatik:*

Die Bioinformatik und ihre bestehenden Möglichkeiten sind heutzutage bei der Analyse von Promotoren nicht mehr wegzudenken, allerdings sollte man bei ihrem Einsatz bzw. der Interpretation der Ergebnisse - trotz enormer Fortschritte in den letzten Jahren - noch immer Vorsicht walten lassen. Selbst mit den modernsten bioinformatischen Methoden können höchstens Hinweise auf die Regulation erhalten werden. Die Gründe dafür sind nicht bei den Softwareentwicklern, sondern vielmehr in der komplexen Biologie zu suchen.

Probleme entstehen z. B. durch die Tatsache, dass TFs an abweichende Bindungsstellen binden können. Für fast alle bekannten TFs sind zwar Konsensus-Sequenzen beschrieben, allerdings bestehen manche aus nur 3-4 konservierten Basen, bei anderen sind die tolerierten Abweichungen zum Teil erheblich. Dies bedeutet, dass eine durch MatInspector identifizierte Bindungsstelle nicht unbedingt auch von dem vermeintlichen TF erkannt bzw. gebunden wird. Andererseits sollten die Bedingungen für die Ähnlichkeit der Bindungsstellen nicht zu stringent gewählt werden, da sonst selbst funktionell bestätigte Bindungsstellen nicht erkannt werden. Die Auswahl der Stringenzbedingungen bei der MatInspector-Analyse ist

also nicht trivial und gleicht einer Gratwanderung. Dies zeigte sich auch bei dieser Arbeit beim Vergleich mit Promotoren anderer Gene (s.u.). Erschwerend kommt hinzu, dass manche Bindungsstellen von unterschiedlichen TFs akzeptiert werden und verschiedene TFs auch ohne ihre entsprechende Bindungsstelle direkt durch Protein-Protein-Bindung miteinander interagieren können. Ferner sind auch TFs mit sehr schwacher DNA-Bindungs-fähigkeit bekannt. Für die Funktionalität dieser TFs ist eine benachbarte Bindungsstelle für einen weiteren TF nötig, was es dementsprechend bei der Auswertung der Ergebnisse zu beachten gilt.

Bei der Identifizierung von ganzen regulatorischen Netzwerken (FrameWorker) entstehen Probleme z. B. dadurch, dass diese trotz unterschiedlicher Orientierungen und Abstände der einzelnen TF-Bindungsstellen in der Zelle funktionell sind, aber mit der entsprechenden Analysesoftware nicht oder nur teilweise erkannt werden können. Ein Beispiel unter vielen dafür sind die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse.

Durch die sehr vielfältigen Möglichkeiten des Aufbaus eukaryontischer Promotoren gestaltet sich die bioinformatische Vorhersage eines Promotors sehr schwierig. Mit der entsprechenden Software (PromotorInspector) können etwa die Hälfte der tatsächlichen Promotoren lokalisiert werden, aber nur entsprechend konservierte Vertreter werden von der Software erkannt. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass ein negatives Suchergebnis nicht heisst, dass in der untersuchten Sequenz kein Promotor vorhanden ist (ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt).

Trotz aller beschriebenen Nachteile ist eine Promotoranalyse ohne Bioinformatik kaum durchführbar. Man stelle sich nur vor, wie mühsam es wäre (und früher natürlich auch war) längere Sequenzabschnitte nach vielen unterschiedlichen und noch dazu variablen Motiven abzusuchen. Der Einsatz der Bioinformatik macht allerdings nur in Kombination mit experimenteller Bestätigung Sinn. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit neben der bioinformatischen Analyse verschiedene experimentelle Ansätze herangezogen. Dazu gehörten die experimentelle Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes, DNaseI-Footprints, Promotorfeinkartierung, Untersuchung verschiedener Deletionsmutanten und Wachstumsbedingungen mit *Dual Luciferase Assays*, sowie *Gel-* und *Supershifts*.

#### 3.1.2.1. Vergleich der Promotoren von Mensch und Maus

Zunächst wurden die 5'-flankierenden Regionen des humanen (auf Chromosom 1q23) und murinen Gens mit Hilfe der PromoterInspector-Software ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) auf mögliche Promotoren hin untersucht. Beim humanen Gen konnte innerhalb von 5kb strangaufwärts des Startcodons kein potentieller Promotorbereich identifiziert werden, auch nicht bei der Variante auf Chromosom 10. Im Gegensatz dazu wurde ein Bereich direkt strangaufwärts des Translationsstartpunkts bei der Maus als Promotorregion erkannt. Es konnten keine

Hinweise auf einen möglichen zweiten Promotorbereich innerhalb der untersuchten 5kb-Region erzielt werden. Aufgrund der vorhandenen alternativen Transkripte der menschlichen und murinen *HSD17B7*, durch unterschiedliche spezifische Banden auf Northern Blots entdeckt (Peltoketo *et al.*, 1999), wurde die Möglichkeit der Existenz zweier Promotoren in Betracht gezogen. Allerdings wurde schon von Peltoketo *et al.* (ebd.) vermutet, dass die verschiedenen mRNA-Längen auf unterschiedliche 3'-Enden zurückzuführen sind.

Die Analyse der Promotoraktivität bzw. der Luciferaseaktivität erfolgte überwiegend in etablierten Leberzelllinien, in denen die Expression der *HSD17B7* bereits nachgewiesen werden konnte (Schertel, 2002). Der Grund dafür war einerseits das bereits bekannte Expressionsmuster, andererseits die sehr wahrscheinliche Beteiligung der Genprodukte an der Cholesterinbiosynthese. Der mit Abstand größte Anteil der *de novo* Synthese des Cholesterins findet im adulten Organismus in der Leber statt. Daneben wurden für Promotorstudien im Falle des humanen Promotors auch HEK293 (Human Embryonic Kidney)- und HeLa-Zelllinien verwendet. Der Grund dafür war einerseits das geringere Expressionsniveau der *HSD17B7* in HeLa-Zellen (Steckelbroeck *et al.*, 2003), andererseits die Tatsache, dass die Niere weder zu den klassischen Steroid-, noch zu den Cholesterinsyntheseorganen gehört, die *HSD17B7* dennoch in diesem Organ in erheblichem Ausmaß nachgewiesen werden kann (Torn *et al.*, 2003). Durch diese Vergleiche sollten (und konnten) Hinweise auf die gewebsspezifische Funktion der identifizierten regulatorischen Bereiche gefunden werden.

#### *Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts (TSS):*

Bevor die *HSD17B7*-Promotorregionen genauer analysiert und miteinander und anderen Promotoren verglichen werden konnten, mussten sie natürlich erst identifiziert werden. Dabei konnte nicht vom Bereich unmittelbar vor dem Startcodon ausgegangen werden, da der 5'-untranslatierte Bereich (der Abschnitt zwischen Transkriptions- und Translationsstartpunkt) mitunter mehrere hundert Basen lang sein kann (teilweise sogar mehrere kb). Da sich Kernbereiche der Promotoren typischerweise in direkter Nähe zum Transkriptionsstartpunkt befinden, kann durch dessen Identifizierung der Promotorbereich lokalisiert werden. Erste Hinweise konnten durch den Vergleich der 5'-UTR-Endpunkten der in Datenbanken veröffentlichten ESTs erhalten werden. Allerdings ergab sich dabei ein für vermeintliche TSS relativ weiter Bereich von -9 bis -80 relativ zum Startcodon, sowohl für das humane wie das murine Gen.

Zur experimentellen Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten stehen mehrere Ansätze zur Verfügung. Der am schnellsten und einfachsten durchzuführende ist das *Primer Extension*-System. Dieses wurde zunächst auch eingesetzt. Aufgrund der Analyse der

verfügbaren EST-Daten wurden radioaktiv markierte Oligonucleotide verwendet, die zu einem Bereich nahe des Startcodons komplementär sind. Bei der Analyse der Ergebnisse stellte sich schnell heraus, dass es in beiden untersuchten Spezies offensichtlich keinen eindeutig definierten Startpunkt gibt (s. Abb. 15). Der Versuch wurde mehrmals mit unterschiedlichen RNA-Präparationen wiederholt. Dies geschah, um sicherzustellen, dass das Auftreten mehrerer Banden nicht an partiell degradierter mRNA lag. Die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze waren jedoch stets sehr ähnlich bis identisch. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Menge der gebildeten *HSD17B7*-mRNA durch verschiedene Wachstumsbedingungen der verwendeten Leberzellen reguliert wurde. Bei den ersten Versuchen mit RNA-Präparationen aus Zellen, die in Vollmedium gewachsen waren, zeigten sich nur sehr schwache Signale (nicht gezeigt), erst als die entsprechenden Zellen unter Serumangel kultiviert wurden, konnten eindeutige Banden detektiert werden.

Um aber auch methodisch bedingte Unsicherheiten auszuschließen, wurde eine alternative Methode (5'RACE) eingesetzt. Es sollte sichergestellt werden, dass es durch die hohe Homologie der potentiellen Promotorbereiche der humanen *HSD17B7*-Kopien auf Chromosom 1 und 10 nicht zu falschen Ergebnissen kam. Bei der 5'-RACE konnten die Primer in Bereiche mit spezifischer Sequenz gelegt werden, um zu verhindern, dass es zu möglichen Mischsequenzen kommt. Dies war aufgrund des engen und sehr ähnlichen Auswahlbereichs bei den *Primer Extension*-Analysen nicht möglich. Die Ergebnisse der *Primer Extension*-Versuchen konnten mit Hilfe der 5'-RACE-Methode weitgehend bestätigt werden. Die sequenzierten 5'-RACE Fragmente endeten überwiegend an den aufgrund der erzielten *Primer Extensions*-Ergebnisse erwarteten Stellen (s. Abb. 16). Der Grund für die erhaltenen geringfügigen Unterschiede liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Methoden. Ein Startpunkt, der nur sehr selten auftritt kann zwar durch Zufall bei der Sequenzierung der erhaltenen Fragmente auffallen (5'RACE), allerdings sind dann die Signale durch die Radioaktivität zu schwach und gehen im Hintergrund unter (*Primer Extensions*). Fasst man die Ergebnisse der beiden Experimente zusammen wird ersichtlich, dass es bei den beiden Genen keinen eindeutigen Transkriptionsstartpunkt, sondern einen Startbereich gibt. Dies ist bei Promotoren ohne TATA-Box nicht ungewöhnlich und zudem eine typische Eigenschaft von „*Housekeeping*“-Genen.

#### *Experimentelle Promotorfeinkartierung:*

Zur Eingrenzung der Promotorbereiche wurden anschließend die ersten *Dual Luciferase Assays* durchgeführt. Bei dieser Methode werden potentielle Promotorbereiche vor ein promotorloses Luciferasegen kloniert, in diesem Fall auf dem kommerziell erhältlichen pGL3-Vektor enthalten. Anhand der im Luminometer gemessenen Lichtstärke kann direkt die

Aktivität des potentiellen Promotors, auch bei unterschiedlichen Bedingungen, überprüft werden. Da die Transkriptionsstartbereiche relativ nahe am Startcodon liegen, wurden die Fragmente so konstruiert, dass sie im 3'-Bereich direkt vor dem Translationsstartpunkt endeten. Um möglichst auch *Enhancer* und *Silencer* zu identifizieren, wurden Fragmente mit bis zu 2kb Länge verwendet. Als Negativkontrolle wurden Fragmente mit inverser Orientierung verwendet. Diese zeigten in etwa dieselbe Luciferaseaktivität wie die promotorlosen Vektoren (nicht gezeigt), ein Beweis, dass die Orientierung des Promotors von entscheidender Bedeutung ist. Durch sukzessive Verkürzung der Fragmente konnten so die entsprechenden proximalen Promotorbereiche bestimmt werden (s. Abb. 22, 23, 27 und 29). Der Einsatz von Zellkulturmedium mit nur 0,1% Serum erfolgte, um Mangelbedingungen zu simulieren und damit gegebenenfalls die Promotoraktivität zu induzieren bzw. zu verstärken. Dieser Serumgehalt war gerade noch ausreichend um die Zellen am Leben zu erhalten. Im Vergleich mit den deutlich besseren Wachstumsbedingungen durch Einsatz von 10% Serum konnten auf diese Weise *Enhancer*-Bereiche identifiziert werden. Eine Aussage über die genauen Auslöser der Induktion war damit noch nicht direkt möglich. Um diese treffen zu können, erfolgte später auch der Einsatz von speziell behandelten Seren sowie bestimmter Zusatzstoffe. Dabei fiel auf, dass die Zugabe von zusätzlichem Cholesterin zum Wachstumsmedium mit 10% FBS einen deutlich abschwächenden Effekt auf die murine und humane Promotoraktivität hatte (s. Abb. 42 und 43). Dies war nicht unbedingt erwartet worden, da in Zellkulturmedium mit 10% FBS relativ optimale Wachstumsbedingungen für die verwendeten Zelllinien herrschen sollten. Die Zugabe der übrigen verwendeten Zusatzstoffe zeigte kaum Wirkung (s. u.). Beim murinen Gen zeigte der Bereich innerhalb von knapp 300 Basen (beinhaltet die komplette durch PromoterInspector vorhergesagte Promotorregion), beim Menschen knapp über 400 Basen strangaufwärts vom Startcodon die stärkste Luciferaseaktivität, sowohl in 10% als auch in 0,1% Serum (s. Abb. 22 und 23). Ein kleiner Teil der beobachteten Zunahme der relativen Aktivität bei Verkürzung der Fragmente ist damit zu begründen, dass, durch den Einsatz identischer DNA-Mengen, das Verhältnis des Luciferasegens zur DNA-Gesamtmenge bei kleineren Vektorgrößen geringfügig höher war. Dies erklärt allerdings nicht das komplette Ausmaß der Zunahme. Vielmehr ist davon auszugehen, dass mit Verkürzung der Promotorfragmente leicht negativ regulierende Sequenzen entfernt wurden. Die entsprechenden TFs ließen sich im Rahmen der Arbeit jedoch nicht identifizieren.

Ferner konnte gezeigt werden, dass der Kern-Promotor bei der *HSD17B7* und *hsd17b7* innerhalb von ca. 100bp strangaufwärts des Transkriptionsstartbereichs, und damit innerhalb von ca. 150bp vom Translationsstartpunkt, lokalisiert ist (s. Abb. 66). Die entsprechenden Fragmente zeigten eine deutlich stärkere Aktivität als die Negativkontrollen, waren durch Serumangel jedoch nicht mehr induzierbar. Eine Verlängerung der Fragmente um weitere

50 Basen (Mensch) bzw. 30 Basen (Maus) in 5'-Richtung hatte kaum Auswirkungen (s. Abb. 22 und 23). Somit beinhaltet der Bereich weiter strangaufwärts (bei Mensch etwa 150bp, bei Maus etwa 100bp umfassend) eine Region, die als *Enhancer* zu bezeichnen ist. Der Sequenzabschnitt zwischen Transkriptions- und Translationsstart hat in den untersuchten Zelllinien keinen Einfluss auf die Promotoraktivität (s. Abb. 27 und 29).

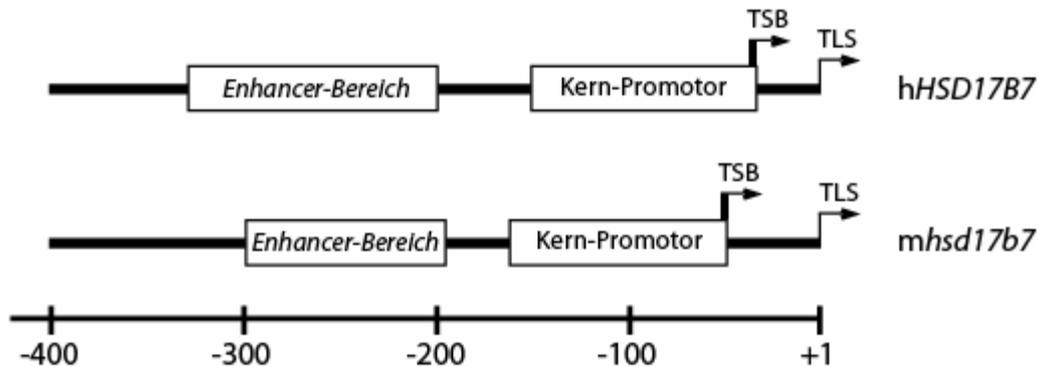


Abb. 66: Schematische Darstellung der Promotorregionen der humanen und murinen *HSD17B7* aufgrund der Feinkartierungsversuche. TSB: Transkriptionsstartbereich; TLS: Translationsstartpunkt.

#### *Der Auslöser der verstärkten Promotoraktivität:*

Hinweise auf verantwortliche Auslöser der Effekte auf die Promotoraktivität konnten durch den Einsatz bestimmter Seren und Zusatzstoffe gewonnen werden. Wie bereits erwähnt, führte der Zusatz von Cholesterin/25-Hydroxycholesterin selbst bei Medium mit 10% FBS zu einer merklichen Absenkung der Luciferaseaktivität. Der Einsatz dieser Kombination erfolgte, da bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte, dass Cholesterin alleine die Cholesterinbiosynthese nur geringfügig herabsetzt. Erst durch die Kombination mit 25-Hydroxycholesterin sind deutliche Effekte erkennbar (Brown and Goldstein, 1980; Kandutsch and Chen, 1978). Allerdings zeigten sowohl 7-Dehydrocholesterin (7-DHC), die letzte Vorstufe des Cholesterins, als auch Estradiol kaum Auswirkungen auf die Luciferaseaktivität der verwendeten Konstrukte (s. Abb. 42 und 43). Im Falle des 7-DHC könnte sich das dadurch erklären lassen, dass das Signal für die Änderung der Promotoraktivität der *HSD17B7* durch Cholesterin, nicht aber durch seine Vorläufer vermittelt wird. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass eine deutliche Reduzierung der Cholesterinbiosynthese in Hautfibroblasten durch die Zugabe von 7-DHC gezeigt werden konnte (Honda *et al.*, 1998). Möglicherweise war die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte 7-DHC-Konzentration nicht ausreichend. Diese konnte jedoch nicht weiter erhöht werden, da dies zum Absterben der Leberzellen führte. Ähnliche Effekte konnten bereits bei einer Leberzelllinie der Ratte beobachtet werden (Ohtani *et al.*, 1996). Im Falle von Estradiol war das Ergebnis in dieser

Hinsicht nicht erwartet worden. Die Expression vieler Gene wird durch Endprodukt-Hemmung reguliert. Bei der HSD17B7 wäre nach aktuellem Wissenstand Estradiol ein Endprodukt (Nokelainen *et al.*, 1998; Torn *et al.*, 2003). Die mangelnde Reaktion auf Estradiol verwundert ebenfalls durch die Tatsache, dass selbst bei relativ hohen Konzentrationen kein Effekt zu erkennen war. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in 10% FBS bereits ausreichend Estradiol vorhanden ist und somit keine Reaktion mehr erfolgte. Als die Beteiligung der HSD17B7 an der Cholesterinbiosynthese noch nicht beschrieben war, wurde die Expression des Gens in der Leber und anderen nicht steroidogenen Geweben mit einem dort bestehenden lokalen Bedarf an Estradiol erklärt, der möglicherweise nicht ausreichend durch in der Blutbahn enthaltenes Estradiol gedeckt werden kann (Peltoketo *et al.*, 1999). Dies erklärt allerdings nicht die mit steroidfreiem Serum erhaltenen Ergebnisse (s. Abb. 50). Dieses Serum ist laut Hersteller frei von jeglichen Steroidhormonen und seinen direkten Vorläufern. Cholesterin und Lipoproteine sind etwa um 95% reduziert. Dieses Serum eignete sich also ganz ausgezeichnet für die Analyse von Zusatzstoffen in dieser Arbeit. Die Zugabe von Estradiol zu diesem Serum zeigte dennoch keine Auswirkungen, ganz im Gegensatz zu Cholesterin. Man könnte zwar spekulieren, dass in steroidogener Hinsicht ebenfalls das Cholesterin der Auslöser für die veränderte Promotoraktivität bei der HSD17B7 ist, allerdings erscheint dies, zumindest in Leberzellen, mehr als unwahrscheinlich und konnte bisher auch bei keinem Gen der Steroidsynthese gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei dem homologen Gen der Ratte durch Zugabe von Estradiol eine deutlich schwächere Expression der rHsd17b7 im Ovar beobachtet werden (Duan *et al.*, 1997). Dieser Estradiol-Effekt könnte also auf steroidogene Gewebe beschränkt sein, das würde aber andererseits auch bedeuten, dass die Expression der HSD17B7 in der Leber nicht mit der Steroidsynthese in Verbindung steht. Die deutlichen Effekte durch Zugabe von Cholesterin/25-Hydroxycholesterin zum steroidfreiem Medium sind eindeutig im Bezug auf die Regulation in Abhängigkeit der Cholesterinkonzentration zu sehen – die Folgerung, dass die Enzyme an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind, lag somit schon vor der Identifizierung der beteiligten Transkriptionsfaktoren nahe.

### 3.1.2.2. Die identifizierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen und ihre bekannten Funktionen

Die identifizierten proximalen Promotorbereiche konnten nun einer eingehenden bioinformatischen Analyse unterzogen werden. Zu diesem Zweck wurde das Programm *MatInspector* ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) verwendet. Das Ergebnis der Analyse umfasste je nach Stringenzeinstellung eine unterschiedliche Anzahl verschiedener potentieller Bindungs-

stellen. Aufgrund der überwiegenden Verwendung von Leberzelllinien wurde besonders auf leberspezifische und ubiquitäre Transkriptionsfaktoren geachtet.

Dabei war auf den ersten Blick ersichtlich, dass die untersuchten Promotorbereiche der *HSD17B7* in beiden Spezies trotz ihrer geringen Sequenzhomologie einige gemeinsame Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aufweisen (s. Abb. 30 und 31). Dazu gehören SP1 (1x murin, 2x human), HNF4 (je 1x), NF-Y (je 2x), SREBP (je 1x), VDR/RXR (je 1x) und CREBP (1x murin, 2x human). Zusätzlich wurde in der humanen Sequenz ein potentielles FXR-Element entdeckt. FXR wird überwiegend in der Leber und im Gastrointestinaltrakt exprimiert (Forman *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 2002). Aufgrund seiner wichtigen Funktion bei der Regulation des Lipidhaushalts und als intrazellulärer Sensor für Gallensäuren (Sinal *et al.*, 2000) wurde FXR als aussichtsreicher Kandidat betrachtet. Allerdings war in den untersuchten Zelllinien kein erkennbarer Einfluss auf die Promotoraktivität zu erkennen (s. Abb. 22).

Im Folgenden werden die Eigenschaften der identifizierten Transkriptionsfaktoren und ihre Beteiligung an der transkriptionellen Regulation beschrieben:

#### *Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBPs):*

Bisher sind drei verschiedene Vertreter dieser Gruppe bekannt. SREBP1a und 1c, sowie SREBP2. Die ersten beiden werden von demselben Gen durch verschiedene Promotoren transkribiert und unterscheiden sich nur durch ihr erstes Exon (Yokoyama *et al.*, 1993). Der Letztere wird von einem anderen Gen kodiert (Hua *et al.*, 1993). Gemeinsam ist allen Dreien die Beteiligung an der Transkription von Genen, deren Produkte entweder direkt oder indirekt an der Biosynthese von Cholesterin oder Fettsäuren beteiligt sind (Brown and Goldstein, 1997). SREBP1a spielt eine wichtige Rolle bei beiden Prozessen, SREBP 1c ist überwiegend an der Fettsäuresynthese, SREBP2 an der Cholesterinbiosynthese beteiligt (Horton *et al.*, 2002). Bisher sind über 25 Gene der Cholesterinbiosynthese bekannt, mindestens 19 von ihnen werden durch SREBPs, vor allem durch SREBP2, reguliert (Horton *et al.*, 2003).

Eine weitere Gemeinsamkeit ist die nur sehr schwache Fähigkeit an DNA zu binden, SREBPs benötigen für die volle Induktion die Bindung von akzessorischen Transkriptionsfaktoren (TFs) wie z. B. SP1, NF-Y oder CREBP in unmittelbarer Nähe (Athaniar *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 1995). SREBPs sind nicht auf klassische Cholesterin- bzw. Fettsäure-produzierende Gewebe beschränkt, sondern zeichnen sich durch ein ubiquitäres Expressionsmuster aus. Eine Besonderheit von SREBPs ist der Weg ihrer Aktivierung. Sie werden als inaktive Vorläufermoleküle gebildet und zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert. Dort verbleiben sie so lange, bis die

Konzentration des Cholesterins in der Zelle ein bestimmtes Niveau unterschreitet. In diesem Fall ändert sich die Konformation von SCAP (*SREBP cleavage activating protein*), was zur Folge hat, dass sich ein SCAP/SREBP-Komplex bildet. Dieser wird in den Golgi-Apparat transportiert, wo es zur Spaltung und Freisetzung der SREBPs-DNA-Bindungsdomäne (und damit zur Aktivierung) durch zwei Proteasen kommt (Brown and Goldstein, 1997). Nach der Abspaltung gelangen die aktiven SREBP-Fragmente in den Zellkern und steigern dort die Expressionsrate ihrer Zielgene. Dies ist ein anschauliches Beispiel der in der Einleitung angesprochenen posttranslationalen Regulation. Im Falle der murinen *hsd17b7* konnte bereits eine Beteiligung von SREBP1a und 2 an der transkriptionellen Regulation nachgewiesen werden (Horton *et al.*, 2003).

#### *SP1:*

Zur SP1-Familie gehören mehrere Mitglieder (SP1-4, 6 und 7), wobei SP1 mit Abstand am bedeutendsten zu sein scheint (Cook *et al.*, 1999). SP1 bindet an GC-reiche Bereiche innerhalb von Promotoren, genauer gesagt an GC-Boxen (Konsensussequenz: GGGCGG). Auch SP1 zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster, seine Beteiligung an der Transkription ist bereits für viele verschiedene Gene beschrieben worden (Li *et al.*, 2004).

SP1 hat unterschiedliche Funktionen; neben der Beteiligung an der basalen Modulation der Expression durch einen Kern-Promotor, kann dieser TF auch regulatorische Funktionen als Bestandteil eines *Enhancers* haben (Cook *et al.*, 1999; Courey *et al.*, 1989). Ein Beispiel ist das Zusammenspiel von SP1 mit SREBPs, die ohne dessen Unterstützung in einigen untersuchten Promotoren kaum an DNA binden können (Sanchez *et al.*, 1995). Ferner konnte auch gezeigt werden, dass SP1 direkt und alleine für die Induktion der Steigerung der Genexpressionsrate zuständig sein kann (Li *et al.*, 2004).

#### *Nuclear Factor Y (NF-Y):*

NF-Y ist funktionell zu SP1 sehr ähnlich. Auch dieser TF wird ubiquitär exprimiert und ist bei vielen Genen ein wichtiger Bestandteil des Kern-Promotors, vor allem (aber nicht nur) bei solchen ohne TATA-Box. Dieser TF bindet an die CCAAT-Box (der Name entspricht der Konsensussequenz, (Bucher, 1990)). Wie auch SP1 kann NF-Y in unterschiedlicher Weise an der transkriptionellen Regulation beteiligt sein, neben der Beteiligung an der basalen Expressionsrate auch an der Induktion derselben (Maity and de Crombrughe, 1998; Mantovani, 1999).

#### *Vitamin D-Rezeptor (VDR):*

Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren. Diese große Gruppe von TFs benötigt zur Aktivierung spezifische Liganden, im Falle von VDR ist dies das 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (Lowe *et al.*, 1992).

Mitglieder dieser Familie binden DNA überwiegend als Heterodimere mit RXR, dessen wahrscheinlicher Ligand Retinolsäure ist, für einige Vertreter wurde eine DNA-Bindung als Monomer oder Homodimer beschrieben (Gronemeyer *et al.*, 2004; Laudet and Adelmant, 1995).

Von besonderer Bedeutung ist VDR während der Embryonalentwicklung und für den Kalziumhaushalt und die Knochenbildung in Erwachsenen (Yoshizawa *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen TFs wird VDR im adulten Organismus nicht ubiquitär exprimiert, sondern überwiegend in der Niere, im Dünndarm, in Knochen und im Herzen (Erben *et al.*, 2002).

#### *Hepatic Nuclear Factor 4 (HNF4):*

Ebenfalls zur Familie der nukleären Rezeptoren gehört HNF4. Dieser wurde ursprünglich als leberspezifisch beschrieben (Sladek *et al.*, 1990), später aber auch in anderen Organen wie z. B. Pankreas und Niere nachgewiesen (Duncan *et al.*, 1994). HNF4 wird auch als „*Orphan Nuclear Receptor*“ bezeichnet, da sein Ligand (noch) unbekannt ist.

HNF4 bindet DNA als Homodimer (Bogan *et al.*, 2000) und ist, wie u. a. durch Untersuchungen von HNF4-*Knock-out* Mäusen gezeigt werden konnte, für die Entwicklung und die korrekte Funktion von Leberzellen unverzichtbar (Darlington, 1999; Parviz *et al.*, 2003). Viele, wenn nicht die meisten, leberspezifischen Gene werden direkt oder indirekt durch HNF4 reguliert (Hayhurst *et al.*, 2001; Watt *et al.*, 2003).

#### *cAMP Responsive Element Binding Protein (CREBP):*

CREBP gehört zur „*Leucin Zipper Protein*“-Familie von TFs. Wie der Name schon sagt, vermittelt dieser TF die Wirkung von cAMP auf die Transkription der entsprechenden Zielgene (Karin, 1989; Montminy and Bilezikjian, 1987). Die Beteiligung von CREBP an der transkriptionellen Regulation konnte schon bei vielen unterschiedlichen Genen gezeigt werden, auch bei Genen des Cholesterin- und Steroidhormonmetabolismus (Dooley *et al.*, 1999; Hum and Miller, 1993). Für die Untersuchung der Auswirkungen von CREBP bietet sich der Einsatz von Forskolin an. Diese Substanz sorgt für eine deutliche Steigerung der cAMP-Konzentration (Seamon and Daly, 1981) und damit zu verstärkten Effekten von CREBP.

### 3.1.2.3. Die Funktionen der identifizierten TFs bei der Regulation der HSD17B7

Alle oben beschriebenen TFs wurden experimentell bezüglich ihrer Beteiligung an der transkriptionellen Regulation der *HSD17B7* überprüft. Für alle außer CREBP konnte eine Beteiligung gezeigt werden, sowohl beim Menschen, als auch in der Maus. Die Funktionen der einzelnen TFs waren allerdings unterschiedlicher Natur.

#### *SREBPs:*

Für SREBP1 und 2 konnte eine Bindung an beide Promotoren *in vitro* nachgewiesen werden. In *Gel-* und *Supershift*-Experimenten mit den entsprechenden Bindungsstellen konnte eine Bindung zweifelsfrei gezeigt werden (s. Abb. 59). Allerdings war eine Unterscheidung zwischen SREBP1a und 1c aufgrund der fehlenden Spezifität der verwendeten Antikörper nicht möglich – es steht aber eher die Bindung von SREBP1a als von 1c zu vermuten, da SREBP1c, im Gegensatz zu SREBP1a, überwiegend Fettsäuresynthese-beteiligte Gene reguliert (Horton *et al.*, 2002). Ein bekanntes Phänomen von SREBPs, die schwache Bindung an DNA, wurde ebenfalls deutlich. Erst als die eingesetzten DNA-Stücke ebenfalls die benachbarte SP1-Bindungsstelle (GC-Box) enthielten, waren durch Zugabe von Nuklearextrakt eindeutig geshiftete Banden zu erkennen. Ein *Supershift*-Experiment mit SP1-spezifischen Antikörpern ergab das gleiche Signal wie die *Supershifts* mit SREBP1- und SREBP2-Antikörpern (s. Abb. 61) – ein Anzeichen dafür, dass SREBPs und SP1 gemeinsam an den entsprechenden DNA-Abschnitt banden. Die Unterstützung von SREBPs durch SP1 ist nicht ungewöhnlich und konnte bereits bei der Analyse einiger anderer SREBP-regulierter Gene gezeigt werden (Athaniyar *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001; Zannis *et al.*, 2001).

Die Effekte der mutierten SREBP- und SP1-Bindungsstellen in den Luciferaseexperimenten waren auf den ersten Blick unerwartet. Die Mutation der SREBP-Bindungsstelle bewirkte eine im Vergleich zum Wildtyp-Promotor in beiden Spezies deutliche Absenkung der Luciferaseaktivität, allerdings veränderte sich die Induzierbarkeit durch Serummangel bzw. Cholesterinmangel (steroidfreies Serum) unerwartet wenig. Das Verhältnis der basalen (in 10% FBS bzw. mit Cholesterin) zur induzierten (in 0,1% FBS bzw. steroidfrei) Luciferaseexpression blieb gegenüber dem Wildtyp in etwa erhalten (s. Abb. 35, 39, 51 und 52). Lediglich bei den Versuchen mit delipidierten FBS waren deutlichere Auswirkungen der Mutation der SREBP-Bindungsstelle zu beobachten (Abb. 55 und 56).

### SP1:

Anders stellte sich die Situation bei Mutation der benachbarten SP1-Bindungsstelle (GC-Box) dar: das basale Expressionsniveau nahm nur wenig ab und die Induzierbarkeit durch Serummangel bzw. steroidfreies Serum ging weitgehend verloren (s. Abb. 35, 39, 53 und 54). Für die Induzierbarkeit der Promotoren unter den getesteten Bedingungen scheint SP1 also wesentlich wichtiger als SREBP 1 bzw. 2 zu sein. Dies erscheint in Anbetracht der beschriebenen Eigenschaft von SREBPs als Sensoren des Cholesterinspiegels unlogisch. Allerdings wurde bei der Analyse eines anderen Gens bereits die Vermutung geäußert, dass die Bindung von SREBPs die Wirkung von SP1 fördert und nicht umgekehrt (Yieh *et al.*, 1995). Weder bei Mensch noch bei Maus führte die Mutation der GC-Box zum vollständigen Verlust der Induzierbarkeit, auch eine SP1/SREBP-Doppelmutation hatte diesen Effekt nicht (s. Abb. 37 und 41). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass es noch einen weiteren beteiligten TF im *Enhancer*-Bereich gibt. In der Literatur ist mehrfach eine wichtige Wechselwirkung zwischen SREBPs und NF-Y beschrieben worden (Inoue *et al.*, 1998; Jump *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2000).

### NF-Y:

Eine CCAAT-Box, die charakteristische Bindungsstelle für NF-Y, konnte einige Basen strangabwärts der SREBP-Bindungsstelle identifiziert werden. Durch *Gel-* und *Supershifts* konnte die Bindung von NF-Y an diese CCAAT-Box im humanen und murinen *HSD17B7*-Promotor nachgewiesen werden (s. Abb. 59 und 60). Die Mutation der CCAAT-Box führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Mutation der GC-Box (bzw. SP1a im humanen Promotor). Die Luciferaseexpression in Vollmedium nahm nur geringfügig ab, das Ausmaß der Induktion durch Serummangel (bzw. steroidfreies Serum) war jedoch bedeutend geringer als beim Wildtyp. Beim humanen Promotor führte die SP1/NF-Y-Doppelmutation sogar zu einem vollständigen Verlust der Induzierbarkeit (s. Abb. 37). Beim murinen Promotor zeigte sich bei Doppelmutation zwar ein stärkerer Effekt als bei den beiden einfachen Mutationen, allerdings konnte weiterhin eine, wenn auch geringe, Steigerung der Expressionsrate durch Serummangel beobachtet werden (s. Abb. 41). Dies ist ein Anzeichen dafür, dass für die volle Promotoraktivität der Maus weitere regulatorische TFs von Nöten sind.

### SP1b:

Neben der direkt 5' der SREBP-Bindungsstelle befindlichen GC-Box konnte die Bindung von SP1 an eine zusätzliche Stelle im humanen Promotor, eine weitere GC-Box weiter

strangabwärts im Bereich des Kern-Promotors gezeigt werden (s. Abb. 57). Eine Mutation dieser GC-Box führte zu einer deutlichen Absenkung des Expressionsniveaus sowohl unter serumreichen (bzw. mit Cholesterin) als auch serumarmen Bedingungen (bzw. ohne Cholesterin) (s. Abb. 35). Das Ausmaß der Induktion war mit der des Wildtypfragments vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass SP1 hier die oben beschriebenen basalen Funktionen innerhalb des Kern-Promotors erfüllt.

#### *NF-Yb:*

Völlig anders und überraschend stellte sich die Situation für die CCAAT-Box im Kern-Promotorbereich dar, die Mutation dieses Bereichs führte zu einem sehr deutlichen Anstieg der basalen Luciferaseaktivität. Eigentlich wurden ähnliche Auswirkungen wie bei der zweiten GC-Box im humanen Promotor erwartet (generelle Abnahme der Luciferaseaktivität). Die Luciferaseaktivität stieg jedoch beim Menschen auf fast das dreifache, bei der Maus auf etwa das doppelte des Wildtypniveaus an. Die Effekte der Induktion durch Serumangel waren nur sehr gering (s. Abb. 35 und 39). Die deutliche Steigerung der basalen Expressionsrate ist in soweit verwunderlich, dass bisher in der Literatur kein einziger Hinweis auf eine negative Wirkung von NF-Y zu finden ist, obwohl seine Beteiligung an der Transkription von vielen verschiedenen Genen gut dokumentiert ist. Es ist also äußerst unwahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte durch die fehlende Bindung von NF-Y verursacht wurden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass ein anderer TF dafür verantwortlich ist, denn durch *Gelshift*-Experimente konnte gezeigt werden, dass ein im Nuklearextrakt enthaltenes Protein an die betreffende Stelle binden kann. Ferner wurde deutlich, dass diese Bindung durch die eingefügte Mutation verhindert werden konnte, der Effekt also durch die fehlende Bindung eines Proteins ausgelöst wurde (s. Abb. 58). Ob es sich dabei um NF-Y handelte ist fraglich, da NF-Y-spezifische Antikörper nicht zu einem *Supershift* führten. Aufgrund der sehr schwachen Banden schon im *Gelshift* kann jedoch die Bindung des Antikörpers an den Komplex und der damit verbundene *Supershift* unterhalb der Nachweisgrenze nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Allerdings deuten die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von NF-Y sowie die *Gelshift*-Experimente auf die Beteiligung eines anderen TFs hin. Ein weiterer CCAAT-Box-bindender TF ist der Nuclear Factor 1 (NF-1). Allerdings unterscheiden sich die CCAAT-Box flankierenden Basen von den für die NF-1 Bindungsstelle beschriebenen (Gronostajski *et al.*, 1984), was dazu führte, dass dieser Bereich bioinformatisch auch nicht als NF-1-bindend erkannt wurde. Bisher ist auch für diesen TF keine negativ regulierende Funktion bekannt. Das einzig bisher beschriebene negativ regulierende CCAAT-Box bindende Protein ist CDP (*CCAAT Displacement Protein*) (Skalnik *et al.*, 1991; Superti-Furga *et al.*, 1989). Allerdings unterscheiden sich die

flankierenden Basen ebenfalls von der für CDP beschriebenen Konsensussequenz. Auch dieser Faktor wurde bioinformatisch nicht als bindend in Betracht gezogen. Das verantwortliche Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Zu diesem Zweck wären weitere Experimente notwendig.

Bisher konnte also gezeigt werden, dass der zuvor beschriebene und für die Cholesterinantwort verantwortliche *Enhancer* im humanen und murinen *HSD17B7*-Promotor experimentell bestätigte Bindungsstellen für SP1, SREBP1 und 2, sowie NF-Y enthält, typische Bestandteile eines Promotors von Genen, die an der Cholesterin- oder Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Dies steht mit der beschriebenen Funktion der *HSD17B7* in der postsqualenen Cholesterinbiosynthese in Einklang (Marijanovic *et al.*, 2003).

#### VDR:

Eine weitere funktionell bestätigte Bindungsstelle ist ebenfalls in diesem *Enhancer*-Bereich enthalten: die für das VDR/RXR Heterodimer. Die Interpretation dieses Ergebnisses gestaltet sich ungleich schwieriger. Die Umgebung dieser Bindungsstelle (von CCAAT- und GC-Box flankiert) deutet auf die Beteiligung des Vitamin D-Rezeptors an der Promotorregulation hin. Ferner konnte mit rekombinantem VDR (im Gegensatz zu Versuchen mit Kernextrakten) *in vitro* eine Bindung an den entsprechenden Bereich (s. Abb. 63) nachgewiesen werden, sowie deutliche Auswirkungen durch die Mutation der Bindungsstelle auf die Luciferase-expression in den humanen und murinen Leberzellen gezeigt werden (s. Abb. 35 und 39). Das Erstaunliche dabei ist, dass VDR in der adulten Leber nach aktuellem Stand der Wissenschaft nicht exprimiert werden sollte.

Vitamin D<sub>3</sub> wird im Körper mit Hilfe von ultravioletter (UV) Strahlung und zweier Hydrolasen ausgehend von 7-Dehydrocholesterin gebildet (s. Abb. 67). 7-Dehydrocholesterin (auch Provitamin D<sub>3</sub> genannt) ist die letzte Vorstufe bei der *de novo* Synthese des Cholesterins im Körper. Damit daraus Vitamin D<sub>3</sub> gebildet werden kann, wird Provitamin D<sub>3</sub> von der Leber in die Haut transportiert, wo es durch UV-Strahlung in Prävitamin D<sub>3</sub> umgewandelt wird. In seiner biologisch aktivsten Form liegt es als 1-,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> vor. Die Umwandlung von Prävitamin D<sub>3</sub> in seine aktivste Form geschieht sukzessive durch zwei Enzyme, 1-Hydroxylase (in der Niere) und 25-Hydroxylase (in der Leber).

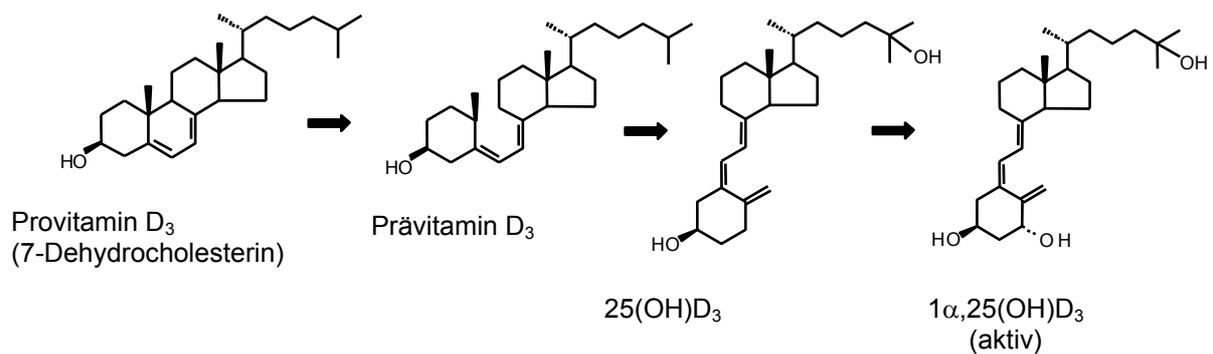


Abb. 67: Schematische Darstellung der Synthese des biologisch aktiven Vitamin D<sub>3</sub>. Die Umwandlung von ProvitaminD<sub>3</sub> zu PrävitaminD<sub>3</sub> geschieht durch UV-Strahlung in der Haut, die 25-Hydroxylierung wird in der Leber katalysiert. Der letzte Schritt der Aktivierung zum biologisch aktiven VitaminD<sub>3</sub> wird durch die 1-Hydroxylase in der Niere vermittelt.

Der Aufbau des *Enhancer*-Elements in den Promotoren der humanen und murinen *HSD17B7* könnte sich in dieser Hinsicht durchaus erklären lassen. Die teilweise überlappenden Bindungsstellen für VDR/RXR und SREBP sind von Bindungsstellen für typisch akzessorische TFs (SP1 und NF-Y) flankiert. Dies könnte bedeuten, dass zwei verschiedene Stimuli, Cholesterin- und Vitamin D-Mangel über den gleichen *Enhancer*-Bereich zu einer Steigerung der Expressionsrate der *HSD17B7*, deren Produkt im Cholesterinbiosyntheseweg beteiligt ist, führen.

Die experimentell erzielten Ergebnisse sind bezüglich der Regulation durch Cholesterin eindeutig und problemlos nachzuvollziehen, nicht jedoch im Zusammenhang mit Vitamin D<sub>3</sub>. Bei diesem Erklärungsansatz bestehen nämlich zwei gravierende Probleme: 1. VDR wird (im Gegensatz zu RXR) in der Leber nach bekanntem Wissensstand nicht exprimiert; 2. alle bisher beschriebenen biologischen Effekte von VDR/RXR werden erst nach Bindung der Liganden der beiden Partner ermöglicht. Dies ist im Falle des VDRs das erwähnte Vitamin D<sub>3</sub>. Warum sollte also durch Vorhandensein eines Stoffes (Vitamin D<sub>3</sub>) dessen eigene Synthese bzw. die seiner Vorstufen gefördert werden, noch dazu in einem Organ, in dem sein, für die biologische Funktion notwendiger, Rezeptor (VDR) nicht vorhanden ist? Ein möglicher Grund für die beobachteten Auswirkungen (s. Abb. 35, 37, 39 und 41) könnte sein, dass durch das Überlappen der SREBP- und VDR/RXR-Bindungsstellen, die Mutation der VDR/RXR-Bindungsstelle auch die benachbarte SREBP-Stelle beeinflusst und die Abnahme der Luciferaseaktivität dadurch ausgelöst wurden. Dies scheint durch die Auswahl der mutierten Basen, die die konservierten SREBP-Erkennungsstellen nicht betreffen, allerdings eher unwahrscheinlich. Nicht auszuschließen ist auch eine Wechselwirkung zwischen VDR und SREBPs, obwohl darüber bisher noch nichts bekannt ist.

Eine weitere Möglichkeit wäre in der Natur der verwendeten Zellen zu suchen. Da es sich bei HepG2 und HEPA1-6 um Tumorzelllinien handelt (und obwohl es nicht gelang VDR-mRNA in den Zelllinien nachzuweisen, nicht gezeigt), ist nicht auszuschließen, dass diese VDR

dennoch exprimieren. In diesem Falle bestünde aber immerhin noch das zweite beschriebene Problem. Die einzig logische Erklärung wäre in diesem Fall, dass VDR bzw. VDR/RXR auch ohne den Liganden, bzw. mit einem anderen, bisher unbekanntem, Liganden an DNA binden kann. Im Falle eines Vitamin D<sub>3</sub> Mangels könnte so die Expression von Vorläufern gesteigert werden. Die Bindung von VDR an DNA ohne seinen Liganden konnte bereits gezeigt werden (Erben *et al.*, 2002) Der Nachweis einer *in vivo* Funktionalität konnte jedoch bisher nicht erbracht werden.

Eine andere Möglichkeit wäre die Existenz einer, bisher nicht beschriebenen Wirkung von VDR als Homodimer. Die Funktionalität und die Bindung von Mitgliedern der Familie der nukleären Rezeptoren an DNA als Homodimer konnte bereits gezeigt werden (z. B. bei HNF4; Bogan *et al.*, 2000). Nicht auszuschließen ist also eine duale Funktionalität des VDR-Proteins. Während es einerseits durch Bindung seines Liganden (Vitamin D<sub>3</sub>) und RXR die Wirkungen von Vitamin D<sub>3</sub> als Heterodimer vermittelt, kommt es andererseits ohne den Liganden zur Homodimerisierung und zu verstärkter Transkription von Genen der Cholesterinbiosynthese (und damit von Vitamin D<sub>3</sub> Vorläufern). Unterstützung für diese Theorie könnte von der Beobachtung des Auftretens zweier spezifischer Banden bei den *Gelshift*-Experimenten kommen (s. Abb. 63).

Wie bereits erwähnt, können unterschiedliche TFs an gleiche oder ähnliche DNA-Sequenzen binden. Daher könnte es durchaus sein, dass die Effekte durch einen anderen TF ausgelöst werden. Aus bioinformatischer Sicht könnte *Activator Protein 2* (AP-2) in Frage kommen, da ein mit VDR/RXR überlappender Bereich gewisse, wenn auch geringe, Homologie zur AP-2 Konsensussequenz zeigt. Ein Co-Transfektionsexperiment mit AP-2 hatte allerdings nicht den entsprechenden Effekt. In den diesbezüglichen Versuchen zeigte AP-2 schwach negative Auswirkungen auf die Expression (s. Abb. 50 und 51).

Die identifizierte VDR/RXR-Bindungsstelle im *HSD17B7*-Promotor könnte jedoch in anderen Geweben von entscheidender Bedeutung sein. Das neben der Leber wichtigste Organ der endogenen Cholesterinbiosynthese im adulten Organismus ist der Darm. Auch hier wurde bereits ein deutliches Expressionsniveau der *HSD17B7* nachgewiesen, VDR ist ebenfalls vorhanden. Möglicherweise wird durch VDR im Darm die Funktion von SREBPs ersetzt bzw. unterstützt.

Eine abschließende, wissenschaftlich fundierte Bewertung dieser Zusammenhänge ist ohne weitere Daten nicht möglich. Allerdings sei noch darauf hingewiesen, dass auch die Promotoren anderer Gene der Cholesterinbiosynthese potentielle VDR/RXR-Bindungsstellen enthalten (laut eigenen MatInspector-Analysen, nicht gezeigt).

#### *HNF4:*

Alles in allem ist die Rolle von HNF4 bei der transkriptionellen Regulation der humanen HSD17B7 als eher gering einzustufen. Allerdings ist das Vorhandensein der Bindungsstelle für die volle Promotoraktivität nötig. Dies zeigte sich sowohl bei der Promotor-Feinkartierung (s. Abb.22, H7 zu H8), als auch bei der Analyse der Bindungsstellenmutationen (Abb. 35). Größere Auswirkungen zeigten sich nur bei Doppelmутanten, vor allem in Kombination mit SREBP. Diese Kombination scheint auch spezifisch für die Cholesterinantwort von Bedeutung zu sein. Bei den unspezifischen Induktionsversuchen mit 0,1% FBS waren die Auswirkungen deutlich geringer (Abb. 35 und 37), als bei den Versuchen mit delipidisiertem FBS bzw. der Zugabe von Cholesterin/25-Hydroxycholesterin (Abb. 55).

Ein Teil der in der Leber (bzw. in HepG2-Zellen) höheren *HSD17B7*-Expressionsrate als in HEK293- und HeLa-Zellen war wohl auch auf die Beteiligung von HNF4 zurückzuführen. Dieser TF wird überwiegend in der Leber exprimiert. Er wird zwar auch in der Niere gebildet, aber in deutlich niedrigerem Umfang (Watt *et al.*, 2003). Die Unterschiede zwischen HepG2- und HEK293-Zellen bezüglich der beobachteten Luciferaseaktivität sind sicherlich nicht allein auf HNF4 zurückzuführen. Dazu waren die Expressionsunterschiede durch die Mutation der HNF4-Bindungsstelle zu gering (s. Abb. 35 und 39). Es wäre zwar theoretisch denkbar, dass eine weitere, nicht identifizierte HNF4-Bindungsstelle in den Promotoren vorhanden ist. Dies erscheint aber aufgrund der erzielten Ergebnisse als eher unwahrscheinlich. Für die Unterschiede sind eher die übrigen identifizierten TFs verantwortlich. Allerdings könnte HNF4 für die stärkere Luciferaseaktivität der Promotoren in HEK293- gegenüber HeLa-Zellen sorgen, da HNF4 in HeLa-Zellen nicht exprimiert wird.

Bei der Maus hingegen konnte die Bindung von HNF4 an den Promotor nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dies ist in sofern verwunderlich, da die Position und die Homologie zur beschriebenen HNF4-Konsensus-Sequenz der potentiellen Bindungsstelle im murinen Promotor mit der im humanen vergleichbar ist. Dennoch führten die HNF4-Antikörper nicht zu einem *Supershift* (nicht gezeigt). Da diese Antikörper speziell für das menschliche Protein hergestellt wurden, wäre die fehlende Spezifität eine mögliche Erklärung. Laut Hersteller sollten sie jedoch, wenn auch schwächer, die murine Form ebenfalls erkennen.

Die Auswirkungen der Mutation der potentiellen HNF4-Bindungsstelle auf die murine Promotoraktivität waren bei den Versuchen mit 0,1% FBS mit denen auf die humane Aktivität vergleichbar (Abb. 39). Im Gegensatz dazu zeigten sich in Bezug auf die Cholesterinantwort deutliche Unterschiede. Hier waren keine Auswirkungen durch die Mutation der potentiellen HNF4-Bindungsstelle zu erkennen, weder bei den Versuchen mit steroidfreiem humanen Serum (Abb. 53), noch mit delipidisiertem FBS (Abb. 56).

Laut MatInspector befindet sich exakt an der vorhergesagten HNF4-Bindungsstelle, in umgekehrter Orientierung, eine Bindungsstelle für den Progesteron-Rezeptor (PR). Daher

könnte auch dieser TF an der Transkription des murinen Gens beteiligt sein (beim humanen Promotor wird keine potentielle Bindungsstelle für den PR angezeigt). Diese potentielle Bindungsstelle trat bei den zu Beginn der Arbeit durchgeführten MatInspector Analysen nicht auf, möglicherweise wurde die Konsensussequenz durch neuere Erkenntnisse verändert bzw. erweitert. Da weder das PR-Protein noch ein spezifischer Antikörper dagegen zur Verfügung stand, wurde dieser Zusammenhang nicht überprüft. Auch wenn ihm Rahmen der Arbeit der verantwortliche murine TF nicht identifiziert werden konnte, so zeigen die Ergebnisse deutlich, dass das entsprechende Protein zwar generell an der transkriptionellen Regulation der *hsd17b7*, jedoch nicht an der Cholesterinantwort beteiligt ist.

#### *CREBP:*

Unerwartet waren die Ergebnisse bezüglich der CREBP-Bindungsstellen. CREBP ist für durch cAMP vermittelte Effekte auf die Transkription verantwortlich und auch typisch für Gene, die in der Leber exprimiert werden. Die Beteiligung von CREBP an der Expressionsrate verschiedener an der Cholesterinbiosynthese und im Steroidstoffwechsel beteiligter Gene konnte auch schon bestätigt werden (s.u.). Die bioinformatisch hier in den *HSD17B7*-Promotoren identifizierten potentiellen Bindungsstellen sind der CREBP-Konsensussequenz sehr ähnlich (s. Abb. 30 und 31). Daher lag die Vermutung nahe, dass CREBP auch bei der transkriptionellen Regulation der *HSD17B7* eine wichtige Rolle spielt. Allerdings konnte dies durch CREBP-Promotormutanten nicht bestätigt werden (s. Abb. 35 und 39). Um dieses Ergebnis genauer zu verifizieren, wurden zusätzlich Luciferaseassays mit verschiedenen Forskolinkonzentrationen (Forskolin führt zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels) im Wachstumsmedium durchgeführt. Auch diese Versuche bestätigten nicht die ursprünglichen Vermutungen. Selbst längere Promotorfragmente zeigten diesbezüglich keine deutlichen Unterschiede. Die Luciferaseaktivität nahm jeweils nur geringfügig zu (s. Abb. 48 und 49). Dies lässt nur den Schluss zu, dass cAMP, wenn überhaupt, nur eine geringe Rolle für das Expressionsniveau der humanen und murinen *HSD17B7* spielt.

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Bild für die Regulation in Leberzellen:

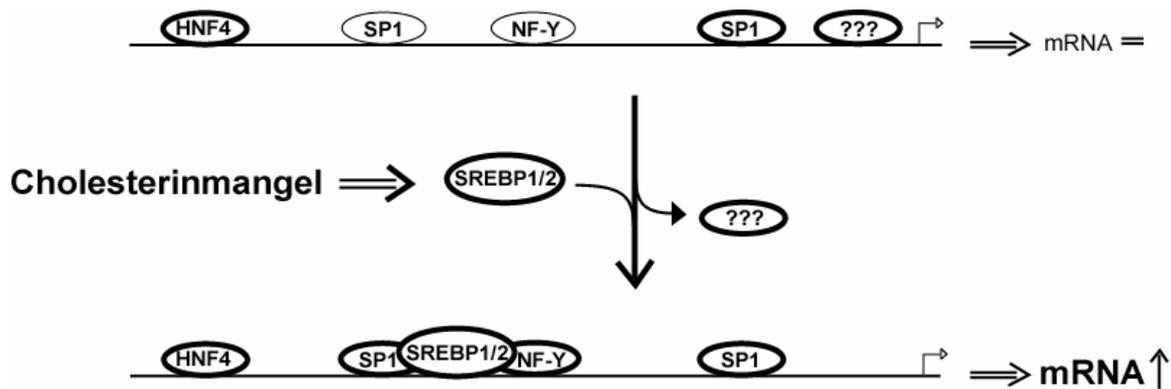


Abb. 68: Mögliches Modell der Regulation des humanen Promotors in HepG2-Zellen. Oben: beteiligte Faktoren bei der basalen Expression. Unten: Durch Cholesterinmangel kommt es zur Aktivierung von SREBPs. Die Bindung von SREBPs an den Promotor führt auch zu einer verstärkten Bindung von SP1 und/oder NF-Y (durch stärkere Linien angedeutet). Daneben kommt es zur Dissoziation eines unbekanntes Proteins (und evtl. eines weiteren TFs). Zusammen führen diese Effekte zu einer deutlich verstärkten Expression der *HSD17B7*. Möglicherweise kann VDR SREBP dabei ersetzen oder unterstützen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Interaktion von HNF4 und SREBP ebenfalls für die volle Promotoraktivität notwendig ist.

#### *HSD17B7*-Promotoraktivität in den anderen Zelllinien:

Generell war ein deutlich höheres Niveau der Luciferaseaktivität unter allen getesteten Bedingungen in Leberzellen als in HEK293- und HeLa-Zellen zu beobachten (s. Abb. 21, 22, 23, 24 und 25). Der beschriebene *Enhancer*, der in Abhängigkeit der Cholesterinkonzentration die Expression der *HSD17B7* reguliert, zeigte seine volle Wirkung nur in den Leberzellen. Die Bedeutung dieses *Enhancers* zeigte sich bereits bei den unspezifischen Induktionsversuchen in 10% FBS und unter Serummangelbedingungen. Die Unterschiede in der Luciferaseexpression zwischen Fragmenten mit und ohne *Enhancer* waren in den Leberzellen deutlich ausgeprägter als in den anderen getesteten Zelllinien (HEK293, HeLa) (s. Abb. 24 und 25). Auch die Reaktion auf Cholesterinmangel war deutlich stärker. Diese Ergebnisse sind durchaus im Einklang mit dem beschriebenen Expressionsmuster und der Beteiligung der *HSD17B7* an der Cholesterinbiosynthese. Cholesterin wird zwar in geringerem Ausmaß ubiquitär synthetisiert. Da aber die systemische Versorgung des adulten Organismus mit endogenem Cholesterin überwiegend von der Leber gewährleistet wird, ist hier eine größere Auswirkung von spezifischen regulierenden Signalen zu erwarten. Worauf dieser leberspezifische Effekt im Detail zurückzuführen ist, konnte bisher auch bei anderen Genen der Cholesterinbiosynthese nicht zweifelsfrei geklärt werden. Bis auf HNF4 und VDR werden alle identifizierten Transkriptionsfaktoren ubiquitär exprimiert. Beim murinen Promotor konnte die Bindung von HNF4 an die bioinformatisch identifizierte Bindungsstelle nicht eindeutig nachgewiesen werden. Wie bereits angedeutet (s. o.), könnten die Effekte

hier auch durch den Progesteron-Rezeptor ausgelöst werden. Allerdings waren die Effekte durch HNF4 alleine nicht ausreichend, als dass dieser die alleinige Verantwortung dafür tragen könnte. Dies zeigte sich sowohl bei den HNF4-Deletionsmutanten (s. Abb. 35 und 39), als auch bei den Versuchen zur Promotorfeinkartierung (s. Abb. 22 und 23). Im Falle von VDR war die Beteiligung an der transkriptionellen Regulation aufgrund der oben beschriebenen Problematik nicht eindeutig zu klären. Ein weiterer Grund könnte im Expressionsmuster von SP1 zu suchen sein. Dieser TF hatte wesentlich gravierendere Auswirkungen auf die *HSD17B7*-Promotoraktivität als HNF4, sowohl basal, als auch induzierend (s. Abb. 35 und 39). Ähnlich wie bei HNF4 konnte für SP1 ebenfalls ein höheres Expressionsniveau in der Leber als in der Niere gezeigt werden (bzw. in HepG2- gegenüber HEK293-Zellen, persönliche Mitteilung von Brigitte Keller). Über das SP1-Niveau in HeLa-Zellen war keine Information verfügbar. Nicht alle Gene der Cholesterinbiosynthese werden durch SP1 reguliert. Auffällig bei den SP1-unabhängigen Genen ist jedoch die transkriptionelle Beteiligung von CREBP. Die Expressionsniveaus der beiden TFs SREBP und NF-Y zeigen keine deutlichen Unterschiede in unterschiedlichen Geweben, somit ist ein direkter Leber-spezifischer Effekt der beiden auf die Expression nicht zu erwarten. Möglicherweise ist auch ein leberspezifischer Cofaktor dafür verantwortlich. Dies scheint jedoch in soweit unwahrscheinlich, da die transkriptionelle Regulation durch SREBPs gut untersucht ist. Über weitere Cofaktoren, abgesehen von den schon erwähnten TFs, ist nichts bekannt. Alles in allem dürfte das Zusammenspiel von SREBPs mit SP1 bzw. CREBP für das Expressionsniveau der Gene der Cholesterinbiosynthese in der Leber verantwortlich sein.

### **3.1.3. Vergleich mit anderen Genen**

Aufgrund der Tatsache, dass Gene, die an demselben Syntheseweg beteiligt sind, oft auch gemeinsamen Regulationsmechanismen unterworfen sind, wurde eine vergleichende Promotoranalyse der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7 mit mehreren Genen durchgeführt. Aufgrund der bisher *in vitro* nachgewiesenen Funktionen des Enzyms in der Estradiol- und Cholesterinbiosynthese, gehörten dazu Gene, die an diesen Synthesewegen beteiligt sind. Dies geschah einerseits durch bioinformatische Methoden, andererseits durch Vergleich mit bereits veröffentlichten experimentellen Daten.

#### **3.1.3.1. Vergleich mit Genen der Steroidhormonsynthese**

Stellvertretend für die Regulation des Steroidstoffwechsels wurden verfügbare Daten der Regulation von *STAR* (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*), *CYP11a* (*Cholesterol Side-*

*Chain Cleavage Enzyme*, P450scc), *CYP19* (Aromatase), *CYP17* (17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase), *HSD3B2* (3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2), sowie *HSD17B1* (17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1) herangezogen (Chau *et al.*, 1997; Hum and Miller, 1993; Jimenez *et al.*, 2003; Leers-Sucheta *et al.*, 1997; Piao *et al.*, 1997; Sewer and Waterman, 2001; Toda *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997). Die entsprechenden Genprodukte sind für die Estradiolsynthese ausgehend von Cholesterin notwendig. Da sowohl *HSD17B1* als auch *HSD17B7* (human und murin) für den letzten Schritt der Estradiolsynthese verantwortlich gemacht werden (Umwandlung von Estron zu Estradiol), wurden gewisse Gemeinsamkeiten bezüglich der transkriptionellen Regulation erwartet.

Für die Regulation der am Steroidstoffwechsel beteiligten Gene ist in vielen Fällen der TF *Steroidogenic Factor 1* (SF1) von entscheidender Bedeutung. Für die Transkription aller aufgeführten Gene, außer *HSD17B1*, konnte bereits eine aktivierende Funktion von SF1 nachgewiesen werden (Val *et al.*, 2003). Im Falle von *HSD17B1* ist die Beurteilung nicht ganz einfach. Für dieses Gen wurden zwei Transkriptvarianten beschrieben. Diese unterscheiden sich im Gegensatz zur *HSD17B7* im 5'-Bereich, werden also von unterschiedlichen Promotoren reguliert. Allerdings ist nicht bekannt, ob die längere *HSD17B1*-Version, deren mRNA nachweisbar ist, auch tatsächlich translatiert wird (Luu-The, 2001). Wahrscheinlich wurde deshalb bei der *HSD17B1* bisher nur der proximale Promotor untersucht (Piao *et al.*, 1997). Bei diesen Analysen wurde die Beteiligung von SF1 nicht überprüft und laut MatInspector befindet sich in diesem Bereich auch keine entsprechende Bindungsstelle. Im Gegensatz dazu kann mit MatInspector im distalen Promotor eine gut konservierte SF1-Bindungsstelle identifiziert werden. In ihrer unmittelbaren Nähe befinden sich weitere typische (potentielle) Bindungsstellen für Gene des Steroidstoffwechsels, zu denen der Progesteron- und der Glucocorticoidrezeptor gehören (nicht gezeigt). Die Funktionalität wurde bisher nicht überprüft, daher ist eine Interpretation rein spekulativ. Diese Funktionalität vorausgesetzt, besteht allerdings die Möglichkeit, dass die unterschiedlichen Promotoren gewebsspezifisch reguliert werden, bzw. dass der distale Promotor der eigentlich wichtigere für die Antwort auf ein Hormonsignal ist. Experimente in dieser Richtung würden sicher wertvolle Hinweise liefern können.

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden war weder in der humanen noch in der murinen Promotorregion der *HSD17B7* eine potentielle SF1-Bindungsstelle zu finden. Auch bis -2000bp in 5'-Richtung fanden sich keinerlei Hinweise darauf. Dies lässt den Schluss zu, dass die Expression von *HSD17B7* durch diesen TF nicht reguliert wird. Denkbar wäre eine indirekte Wirkung, die im Vergleich mit den bisher beschriebenen Funktionen von SF1 aber eher unwahrscheinlich erscheint.

Im murinen Kernpromotor der *hsd17b7* wurde von MatInspector eine potentielle Bindungsstelle für den TF *Liver Receptor Homologue 1* (LRH-1) identifiziert. Diese befindet

sich direkt im experimentell bestätigten Transkriptionsstartbereich. Da auf Anhiob keine Funktionalität zu erkennen war wurde sie nicht weiter untersucht und im Ergebnisteil nicht in die Übersicht aufgenommen. Aufgrund ihrer Position im Promotor wäre eine Funktion als *Silencer* denkbar. LRH-1 wird zusammen mit SF1 funktionell in eine TF-Familie zusammengefasst. In der Literatur wird mehrfach berichtet, dass LRH-1 in manchen, nicht SF1-exprimierenden Geweben die Funktion von SF1 übernehmen kann (Clyne *et al.*, 2002). Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass LRH-1 in steroidogenen Geweben exprimiert wird (Sirianni *et al.*, 2002). Bestätigt ist auch eine positiv regulierende Wirkung von LRH-1 auf Gene des Gallensäuremetabolismus (Lu *et al.*, 2000). Überschüssiges Cholesterin wird im Körper überwiegend zu Gallensäuren umgewandelt und so ausgeschieden. Daher wird LRH-1 eine wichtige Funktion in der Cholesterinhomöostase zugeschrieben (Fayard *et al.*, 2003). Es wäre durchaus denkbar, dass LRH-1 bei einem Cholesterinüberschuss einerseits die Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren fördert, andererseits die Expression von Cholesterinbiosynthesegenen vermindert, was bei der *hsd17b7* aufgrund der Position der Bindungsstelle im Promotor zu erklären wäre. Da eine regulatorische Funktion für LRH-1 bei den Kartierungsversuchen nicht festgestellt werden konnte, gestaltet sich eine mögliche Interpretation über die Funktionalität rein spekulativ.

Des Weiteren besteht in diesem Zusammenhang auch die Möglichkeit der Interpretation des Ergebnisses der proximalen CCAAT-Box. Da NF-Y oftmals als Cofaktor für andere TFs fungiert (Mantovani, 1999), wäre es im Bereich des Denkbaren, dass die stark positiv regulierenden Effekte der CCAAT-Box Mutation auf die Luciferaseaktivität mit der Bindung von LRH-1 in Zusammenhang stehen, und dass die beobachteten Auswirkungen ähnlich, wenn auch in entgegengesetzter Richtung und ungleich stärker, wie bei der NF-Y/SREBP Interaktion zu werten sind. Diese Spekulation bezieht sich allerdings nur auf den murinen Promotor, da im humanen keine LRH-1-Bindungsstelle zu finden ist.

Beim Vergleich mit den untersuchten Genen der Estradiolsynthese fällt zudem eine transkriptionelle Abhängigkeit dieser Gene von den TFs SP1, AP-2 und GATA auf. Die Beteiligung von SP1 an der Regulation der *HSD17B7* konnte eindeutig gezeigt werden. Allerdings ist dadurch alleine keine Gemeinsamkeit mit Genen der Steroidsynthese zu begründen, da SP1 bei sehr vielen und völlig unterschiedlichen Promotoren eine wichtige Rolle spielt. Im Bereich der proximalen Promotoren der *HSD17B7s* sind Bindungsstellen für GATA nicht vorhanden. Für AP-2 konnte eine transkriptionelle Beteiligung, zumindest in den verwendeten Zelllinien, experimentell ausgeschlossen werden.

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor bei Genen des Steroidstoffwechsels ist CREBP und konnte bereits bei vielen Promotoren funktionell bestätigt werden. Wie bereits erwähnt (s. o.), hatte CREBP jedoch kaum Auswirkungen auf die Regulation der *HSD17B7*-Promotoren in den untersuchten Zelllinien.

### Fazit:

Es konnten aus Sicht der transkriptionellen Regulation keinerlei Hinweise auf Gemeinsamkeiten der humanen *HSD17B7* mit anderen Genen des Steroidstoffwechsels entdeckt werden. In diesem Zusammenhang ist nochmals zu erwähnen, dass die Zugabe von Estradiol ins Medium keine Auswirkungen auf die Luciferaseaktivität zeigte. All das schließt eine Beteiligung des Enzyms an derartigen Prozessen jedoch nicht zwingend aus. Auch wenn weder aus experimenteller noch aus bioinformatischer Sicht entsprechende Gemeinsamkeiten auftraten, besteht die Möglichkeit eines 2. Promotors bzw. *Enhancers*, der für die entsprechende Regulation verantwortlich ist, jedoch bislang nicht detektiert werden konnte. Im Falle der murinen *hsd17b7* erfolgte zwar ebenfalls keine experimentelle Bestätigung für eine Regulation im Zusammenhang mit dem Steroidhormonhaushalt. Allerdings erschien kurz vor der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit eine Veröffentlichung über die Regulation der *P450scc* (Kim *et al.*, 2005). Darin ist die funktionelle Bestätigung eines LRH-1-enthaltenden *Enhancers* etwa 1500 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt beschrieben. Zusätzlich ist in diesem Promotor eine funktionelle LRH-1-Bindungsstelle bei -40 (relativ zum Transkriptionsstart) enthalten. Dies gab Anlass zu einer wiederholten bioinformatische Analyse der *mhsd17b7*. MatInspector sagte im entsprechenden Bereich (ca. -1500) der *mhsd17b7* ebenfalls eine Bindungsstelle für LRH-1 vorher, mit deutlich größerer Ähnlichkeit zur Konsensussequenz, als die bereits identifizierte im Transkriptionsstartbereich. Diese ist auf dem längsten der experimentell untersuchten Promotorfragmente auch vollständig enthalten. Zusätzlich finden sich in unmittelbarer Nähe potentielle Bindungsstellen für den Progesteron- sowie den Estrogenrezeptor, ähnlich der Umgebung im *P450scc*-Promotor. Dieser potentielle *Enhancer* würde in Hinblick auf die beschriebene Funktion der *hsd17b7* im Steroidstoffwechsel durchaus sinnvoll erscheinen. Zusammen mit der zusätzlich entdeckten Progesteron-Rezeptor-Bindungsstelle an der Position für HNF4, könnte man vermuten, dass, aus Sicht der transkriptionellen Regulation, das murine Enzym *in vivo* tatsächlich an beiden Synthesewegen beteiligt ist. Solange jedoch keine experimentelle Bestätigung der TF-Bindungsstellen erfolgt, bleibt dies reine Spekulation. In Luciferaseexperimenten mit Leberzellen konnten zumindest keine Auswirkungen durch diesen potentiellen *Enhancer* festgestellt werden. Da die Leber bekanntermaßen nicht zu den klassischen Geweben der Steroidhormonsynthese gezählt wird, wäre es sinnvoll, Experimente in dieser Hinsicht mit anderen Zelllinien durchzuführen.

### 3.1.3.2. Vergleich mit Genen der Cholesterinbiosynthese

Von zentraler Bedeutung für nahezu alle Gene der Cholesterinbiosynthese sind, wie bereits dargelegt, die Transkriptionsfaktoren der SREBP-Familie, insbesondere SREBP1a und 2.

Bisher sind mehr als 25 Gene bekannt, deren Produkte in diesem Stoffwechselweg beteiligt sind. Anhand einer Studie mit transgenen SREBP1a und 2-, sowie mit SCAP-*Knock-out* Mäusen konnte für 19 von ihnen eine positive Regulation durch SREBPs nachgewiesen werden (Horton *et al.*, 2003). Aber nicht nur Gene der Cholesterinbiosynthese sind betroffen, sondern auch solche die für die Cholesterinhomöostase mitverantwortlich sind, wie z. B. das für den LDL-Rezeptor (*LDLR*) (Sanchez *et al.*, 1995), für die Aufnahme von Cholesterin in Zellen aus der Blutbahn verantwortlich, und für die Cholesterylesterhydrolase (*CEH*), das für die Freisetzung von Cholesterin aus seiner Cholesterylester-Speicherform sorgt (Natarajan *et al.*, 1998). Auch die Expression von SREBPs selbst und von NAD(P)-reduzierenden Genen wird durch SREBPs verstärkt. NAD(P)H/H<sup>+</sup> ist ein wichtiger Cofaktor verschiedener cholesterinbildender Enzyme.

Auffallend bei Promotoren aller bisher untersuchten SREBP-regulierten Gene ist, dass SREBP-Bindungsstellen von GC- und/oder CCAAT-Boxen flankiert sind. Außerdem konnte in allen Fällen eine direkte Beteiligung von SP1 und/oder NF-Y an der durch Cholesterinmangel bedingten Induktion der transkriptionellen Aktivität beobachtet werden. Als Beispiele für die Beteiligung von SP1 seien die Gene für den LDL-Rezeptor, die Fettsäure-Synthase und die AcetylCoA-Carboxylase genannt. Hierbei wurde schon spekuliert, dass SREBP die Bindung von SP1 und damit den Anstieg der Expressionsrate erhöht und nicht umgekehrt (Yieh *et al.*, 1995). Beispiele für die unterstützende Wirkung von NF-Y auf SREBPs sind die Gene der HMGCoA-Synthase und -Reduktase (*HMGCS* bzw. *HMGCR*) (Abb. 69) und der Farnesyldiphosphat-Synthase. Die erste Beschreibung für die Beteiligung beider Cofaktoren an der transkriptionellen Regulation bei Genen der postsqualenen Cholesterinbiosynthese betraf die 7-Dehydrocholesterolreductase (*DHCR7*) (Kim *et al.*, 2001). Wenig später konnte der synergistische Effekt auch bei der Sterol- $\Delta$ 8-Isomerase (*S1*) gezeigt werden (Abb. 69) (Misawa *et al.*, 2003). Für noch nicht untersuchte Promotoren anderer Gene dieses Syntheseabschnitts wurde eine bioinformatische Analyse durchgeführt. MatInspector identifizierte für *SQLE* (Squalenepoxidase) die TFs SREBP, NF-Y, SP1 in 5'-3'-Anordnung innerhalb des Promotors. Nicht ganz so offensichtlich ist die Einordnung des *NSDHL*-Gens. Hier finden sich innerhalb des potentiellen Promotors lediglich zwei sehr schwach konservierte Bindungsstellen für SREBP. Diese sind auch nicht direkt von SP1 oder NF-Y flankiert. Dennoch wurde ein positiver Effekt von SREBPs auf die Expression von *NSDHL* bereits gezeigt (Horton *et al.*, 2003). Dieser wird möglicherweise von einem entfernteren *Enhancer* vermittelt, der bioinformatisch in dieser Arbeit nicht ermittelt werden konnte.

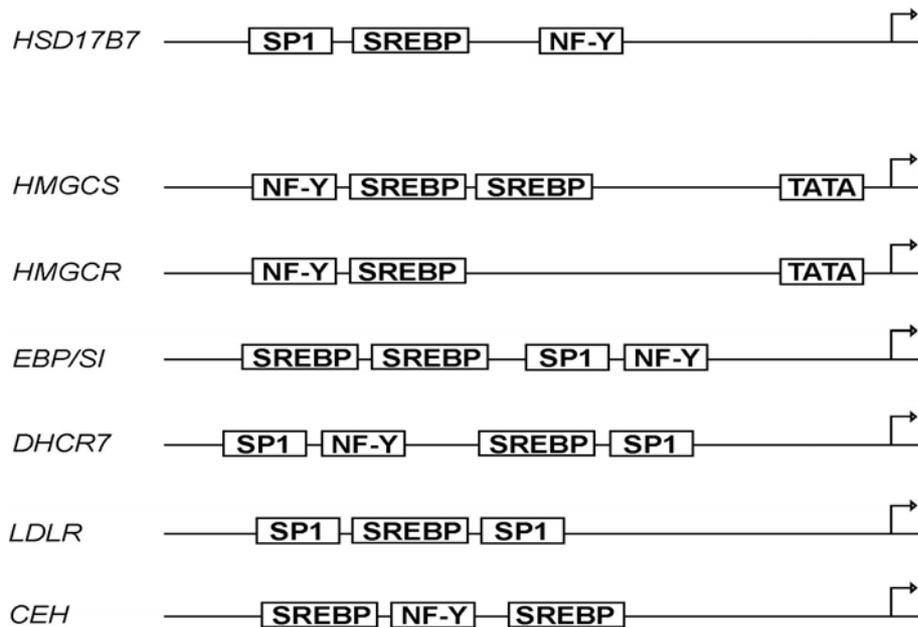


Abb. 69: Schematische Darstellung funktionell bestätigter Promotorbestandteile SREBP-regulierter Gene des Cholesterinhaushalts. Die Genprodukte von *LDLR* und *CEH* sind an der Aufnahme bzw. Freisetzung von Cholesterin beteiligt, die übrigen an der *de novo* Synthese.

Die kombinierte Wirkung von SP1 und NF-Y mit SREBPs konnte bisher nur bei einem Gen der präsqalenen Cholesterinbiosynthese gezeigt werden, der Squalensynthese (Guan *et al.*, 1998). Möglicherweise ergibt die experimentelle Charakterisierung der übrigen postsqualenen Gene einen gemeinsamen Regulationsmechanismus. Eine spezifische postsqualene Regulation wäre auch nicht überraschend, da die Zwischenprodukte vor Squalen auch für andere Synthesewege verwendet werden (Mevalonat dient beispielsweise als Vorstufe der Isoprenoide; Farnesyl-PP für Dolichol und Ubiquinon). Durch eine spezielle Regulation der postsqualenen Gene (und der Squalensynthese) könnten die entsprechenden Zellen ihren Stoffwechsel gezielt in Richtung Cholesterin steuern. Sollte sich diese Vermutung im Laufe der Zeit durch weitere Experimente bestätigen, könnte dies einen neuen Ansatz der Behandlung von erhöhten Cholesterinwerten darstellen. Bisher stellt die HMGCoA-Reductase den Hauptangriffspunkt für Cholesterin-senkende Medikation durch Statine dar. Ein Eingriff zu späterem Zeitpunkt in den Syntheseweg könnte allerdings durchaus Vorteile haben. Durch Eingrenzung der Zahl der beeinflussten Synthesewege wäre theoretisch von geringeren Nebenwirkungen auszugehen. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde eine Analyse der meisten bisher bekannten SREBP-abhängigen Gene der Cholesterinbiosynthese durchgeführt (Abb. 70). Dazu wurden in der Literatur verfügbare Daten herangezogen (Bishop *et al.*, 1998; Dooley *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 1998; Halder *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Misawa *et al.*, 2003; Ngo *et al.*, 2002; Tansey and Shechter, 2001). Bei bisher nicht untersuchten Genen wurde eine Analyse mit MatInspector durchgeführt.

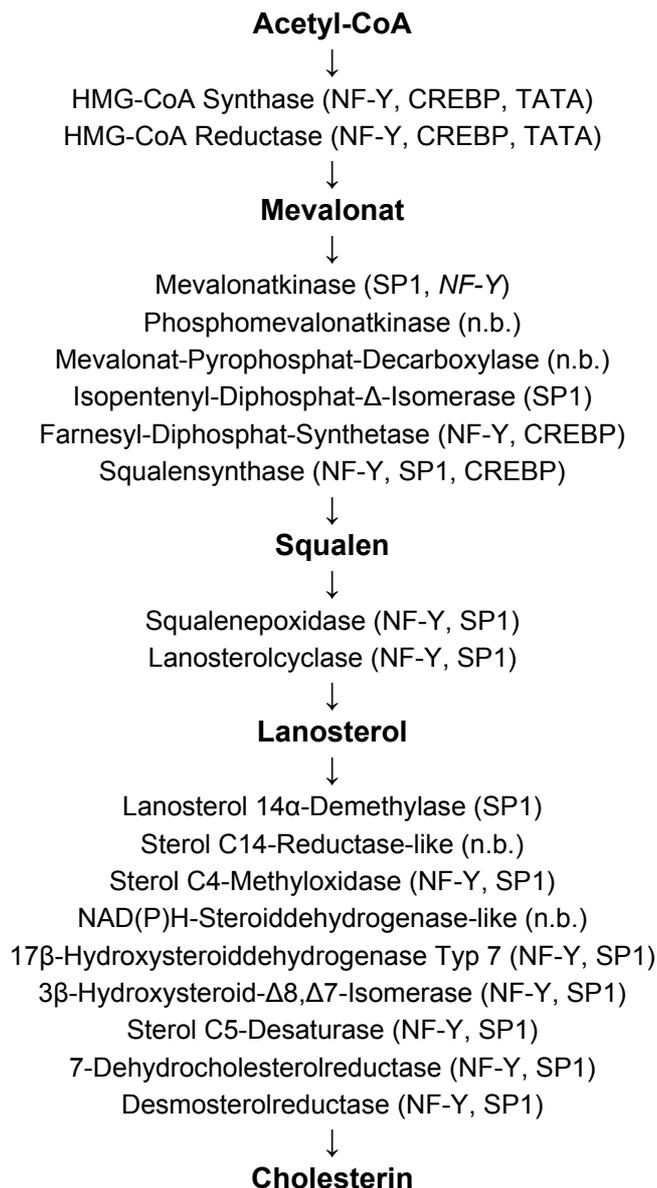


Abb. 70: Übersicht SREBP-abhängiger Gene der Cholesterinbiosynthese (nach Horton *et al.*, 2003) und der beteiligten transkriptionellen SREBP-Cofaktoren. N.b. Interpretation aufgrund fehlender Daten nicht zweifelsfrei möglich. TATA: Promotor enthält eine funktionell bestätigte TATA-Box. Der Mevalonatkinase-Promotor enthält eine CCAAT-Box (NF-Y), diese scheint jedoch nicht an der Sterolantwort beteiligt zu sein (Bishop *et al.*, 1998). Bei MatInspector-Analysen wurden nur GC- und CCAAT-Boxen innerhalb von 100 bp 5' oder 3' von SREBP-Bindungsstellen berücksichtigt.

Aus der Literatur sind neben SP1 und NF-Y noch weitere synergistische Proteine für die Wirkung von SREBPs bekannt. Dazu zählt neben HNF4 auch CREBP. Wie schon erwähnt, ist HNF4 vor allem an der Expression leberspezifischer Gene beteiligt. In soweit würde eine Beteiligung an der Regulation der Gene der Cholesterinbiosynthese nicht verwundern. Bisher wurde der direkte experimentelle Beweis nur beim *si*-Gen der Ratte erbracht (Misawa *et al.*, 2003). Die Autoren waren jedoch nicht in der Lage, eine HNF4-Bindungsstelle im *si*-Promotor zu identifizieren und gingen daher von einer direkten Protein-Protein-Interaktion

zwischen HNF4 und SREBP2 aus, die sie auch experimentell bestätigen konnten. Im Falle des *HSD17B7* Promotors konnte das Vorhandensein einer funktionellen HNF4-Bindungsstelle bestätigt werden. Allerdings waren die beobachteten Effekte weitaus geringer, als die von Misawa *et al.* beschriebenen. Dies könnte an den verschiedenen verwendeten Nachweismethoden liegen: in der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsstelle mutiert, die Autoren der Veröffentlichung setzten mangels einer identifizierten HNF4-Bindungsstelle ein Überexpressionsplasmid für HNF4 ein. Der Einsatz von solchen Plasmiden führt zu Proteinkonzentrationen weit oberhalb der natürlich vorkommenden. Daher sind die jeweils erzielten Ergebnisse bzw. das Ausmaß nicht einfach gleichzusetzen. Durch den Einsatz von MatInspector konnten mindestens zwei potentielle HNF4-Bindungsstellen im *Sl-Gen* Promotor entdeckt werden. Deren funktionelle Bestätigung war jedoch nicht Thema dieser Arbeit.

Anders ist der Vergleich bezüglich CREBP zu interpretieren. Während die positiv regulierende Funktion von CREBP auf die Expressionsrate sowohl der Squalensynthase, der Farnesyl-Diphosphat-Synthetase, der HMGCoA-Reductase, als auch der HMGCoA-Synthase gezeigt werden konnte (vier Vertreter der präqualenen Cholesterinsynthese) (Dooley *et al.*, 1999; Ngo *et al.*, 2002; Tansey und Shechter, 2001), war dies bisher bei keinem Gen der postsqualenen Cholesterinsynthese möglich. Die Promotoren der humanen und murinen *HSD17B7* enthalten zwar potentielle CREBP-Bindungsstellen, jedoch war die Wirkung von Forskolin auf das Luciferaseexpressionsniveau nur sehr gering. CREBP ist also, wenn überhaupt, nur von geringer Bedeutung für die transkriptionelle Regulation der *HSD17B7*. Die verfügbaren Daten sind noch nicht ausreichend, jedoch könnte dies ein weiterer Hinweis auf eine spezielle postsqualene Regulation sein, bzw. der Bedarf an anderen aus Mevalonat oder Squalen synthetisierten Produkten für den cAMP-Effekt verantwortlich sein. Nicht auszuschließen ist auch die Möglichkeit, dass cAMP in anderen Geweben als der Leber die Expression der *HSD17B7* steigert bzw. dass diese Signalregulation während der Embryonalentwicklung von Bedeutung ist.

#### *Weitere konservierte TF-Bindungsstellen ohne funktionelle Bestätigung:*

Sowohl beim humanen als auch beim murinen *HSD17B7*-Promotor ergab die MatInspector Analyse konservierte potentielle Bindungsstellen für NRSF (*Neuron-Restrictive Silencing Factor*) und COUP-TF (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor*) im Bereich der aktivsten Promotorfragmente. Beide TFs werden überwiegend während der Embryonalentwicklung exprimiert. *Knock-outs* beider Gene führen zu einem frühen Tod (vor Tag11; (Jones and Meech, 1999; Pereira *et al.*, 1995)). Durch die Wirkung von NRSF wird die Expression neuronal-spezifischer Gene während der Embryonalentwicklung in nicht-neuronalen Zellen unterdrückt oder verhindert (Jones and Meech, 1999). Dies bedeutet,

dass dieser TF für das charakteristische embryonale *hsd17b7*-Expressionsmuster (Laubner *et al.*, 2003) verantwortlich sein könnte. Weitere Unterstützung erhält diese Theorie durch eine intensive Genomanalyse bei Mensch und Maus in Bezug auf NRSF-regulierte Gene. Sowohl die menschliche, als auch die murine HSD17B7 werden bei dieser Untersuchung als NRSF-reguliert beschrieben (Bruce *et al.*, 2004). Interessanterweise findet sich in dieser Aufstellung für NRSF-regulierte Kandidatengene zwar ebenfalls die *HMGCR*, allerdings kein anderes Gen der postsqualenen Cholesterinbiosynthese. Diese bioinformatische Analyse stellt jedoch keinen endgültigen Beweis für oder gegen die transkriptionelle Abhängigkeit der Gene von NRSF dar.

COUP-TFs zeigen ein weit verbreitetes Expressionsmuster im Embryo. Ihnen wird eine wichtige Funktion bei unterschiedlichen Prozessen zugeschrieben, z. B. bei der Muskel-, Herz- und Magenentwicklung (Pereira *et al.*, 1995). Expressionsstudien in Mausembryos zeigten, dass die *coup-tfii*-Expression zwar in räumlicher Nähe zur *hsd17b7*-Expression geschieht, allerdings scharf voneinander abgegrenzt. So konnte die Expression von *coup-tfii* in den Somiten und in digitalen Regionen der entstehenden Gliedmaßen nachgewiesen werden, die der *hsd17b7* in den interdigitalen Bereichen und in *Dorsal Root* Ganglien. Die Expression der *hsd17b7b* könnte also durch COUP-TFII unterdrückt werden. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass COUP-TFs mit MyoD interagieren und dadurch die Differenzierung von Muskelzellen inhibieren (Muscat *et al.*, 1995). Im humanen *HSD17B7*-Promotor befindet sich eine gut konservierte MyoD-Bindungsstelle, wobei ein eventueller Zusammenhang zwischen der *HSD17B7*-Expression und der Muskelbildung unklar bleibt. Aufgrund der verwendeten, aus adulten Geweben stammenden Zelllinien konnte eine Beteiligung der beschriebenen TFs nicht nachgewiesen werden. Wegen der beobachteten Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung ist eine Beteiligung der TFs (COUP-TFs und NRSF) an der *HSD17B7*-Expression jedoch nicht unwahrscheinlich. Die Verwendung von HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) stellt hier ebenfalls keine Alternative dar, da die *HSD17B7* während der Embryonalentwicklung in der Niere nicht exprimiert wird (Laubner *et al.*, 2003). In dieser Hinsicht wäre die Durchführung entsprechender Experimente mit Zelllinien aus embryonalem Nervengewebe sinnvoll.

#### *Fazit:*

Die erzielten Ergebnisse lassen keinen Zweifel an der Regulation der humanen und murinen *HSD17B7* durch Cholesterin. Dies konnte auch durch die Zugabe von Cholesterin in die Wachstumsmedien der Zellen gezeigt werden. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse, die Experimente in der vorliegenden Arbeit und der Vergleich mit anderen Cholesterinbiosynthesegenen liefern eine eindeutige Bestätigung für die Beteiligung sowohl des humanen als auch des murinen Enzyms an der Cholesterinbiosynthese.

### 3.2. Ergebnisse des *Yeast-Two-Hybrid Screens* (Y2H)

Die stringente Bearbeitung des *Y2H-Screens* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Die funktionelle Verifizierung der Ergebnisse fand jedoch nicht statt. Zwar wurden Wechselwirkungskandidaten beim geringsten Zweifel aussortiert, dennoch ist es aus wissenschaftlicher Sicht eigentlich erforderlich, dass solche Ergebnisse durch weitere Methoden (*Mammalian-Two-Hybrid* (M2H), *GST-Pulldown-Assays*) verifiziert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht erfolgen. Dennoch lassen die Ergebnisse einige Schlüsse, Interpretationen und Spekulationen zu. Beispielsweise lassen sich einige der identifizierten Proteininteraktoren in funktionelle Gruppen zusammenfassen.

Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund des für die Wechselwirkungs-Analyse gewählten Organismus erhalten werden. Hefen sind zwar ebenfalls Eukaryonten, aber aus evolutionärer Sicht sehr weit von Säugetieren entfernt. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass einige das Testsystem betreffende Prozesse so unterschiedlich ablaufen, dass es dadurch zu (falsch-positiven) Ergebnissen, die bei einem M2H nicht aufgetreten wären, kommen kann. Große Vorteile hat der Y2H dadurch, dass er gut etabliert ist und im Verhältnis zum M2H einfacher und schneller durchzuführen ist. M2Hs werden daher auch meistens nur zur Verifizierung von Y2Hs eingesetzt. Viel schneller und einfacher wäre ein *Bacterial-Two-Hybrid*. Allerdings treten hier aufgrund der Verwendung von Prokaryonten weitaus mehr falsch-positive Ergebnisse auf. Dies liegt u.a. am Fehlen essentieller Proteine, wie z. B. der für die korrekte Faltung vieler Proteine notwendiger Chaperone. Aus den beschriebenen Gründen erfolgte die Suche nach potentiellen Proteininteraktoren der Hsd17b7 mit dem Y2H.

Mit dem hier diskutierten Y2H sollten Proteininteraktoren während der Embryonalentwicklung identifiziert werden. Aufgrund des beschriebenen Expressionsmusters und des bereits überprüften zeitlichen Auftretens der Hsd17b7 (Laubner *et al.*, 2003), wurde als „Beute“ eine Gesamt-cDNA-Bibliothek von murinen Tag11-Embryonen verwendet.

Als erstes verwundert das Fehlen des eigentlich erwarteten Prolaktinrezeptors in der Liste der identifizierten Interaktoren. Schließlich wurde die Hsd17b7 ursprünglich als Prolaktinrezeptor-assoziiertes Protein in der Ratte entdeckt. Dies dürfte jedoch an der verwendeten Methode liegen, da mit einem Y2H nicht nur falsch-positive, sondern auch falsch-negative Ergebnisse zu erwarten sind. Andererseits ist auch vorstellbar, dass, da diese Interaktion nur während der Trächtigkeit eine Rolle spielt, der Prolaktinrezeptor im Embryonalstadium nicht exprimiert wird und damit nicht in der cDNA-Bibliothek vorhanden ist.

Auf den ersten Blick unerwartet, aber umso spannender ist das Auftreten mehrerer direkt oder indirekt mit der Alzheimer'schen Krankheit in Verbindung gebrachter Proteine. Dazu zählen das Amyloid-beta-Vorläufer-Protein (APP), Cofilin, Syntaxin 3A, Synaptotagmin I,

Bri3-binding-Protein, Filamin A, Reticulon3 und 4, sowie das *Microtubule-associated Protein* 1B (MAP1B). Auch wenn bei den meisten, außer beim APP, die Art der Beteiligung am Krankheitsverlauf unklar ist, so steht zumindest zweifelsfrei fest, dass diese Proteine entweder für die Bildung oder die Funktion von Nervenzellen unerlässlich sind.

### *Cholesterin und Alzheimer?*

Zum besseren Verständnis möchte ich, soweit bekannt, auf die Pathogenese von Alzheimer eingehen. Die Problematik dabei ist die etwas unübersichtliche Situation. Aufgrund des enormen Interesses sind weltweit viele verschiedene Arbeitsgruppen an der Erforschung der Krankheit beteiligt. In PubMed erhält man mit dem Suchbegriff „Alzheimer“ Verweise auf aktuell 36.000 (!) Veröffentlichungen. Daher entstehen oftmals scheinbare und tatsächliche Widersprüche. Obwohl noch immer kontrovers diskutiert, findet die Theorie der Abhängigkeit des Verlaufs der Krankheit vom Cholesterinspiegel mehr und mehr Anhänger (bei PubMed findet man knapp 500 Veröffentlichungen bei Eingabe „Alzheimer Cholesterol“).

Alzheimer wird als progressive Demenz charakterisiert, sie tritt vor allem bei Menschen ab dem 65. Lebensjahr auf. Mit zunehmendem Alter steigt die Zahl der betroffenen Personen. Bei den über 90-jährigen liegt der Anteil bereits bei über 20% (Bachman *et al.*, 1992). Durch die stetig steigende Lebenserwartung wird auch die Zahl der Alzheimer Fälle in Zukunft immer mehr zunehmen; allein in Deutschland von zurzeit geschätzt 850000 auf über 2 Millionen im Jahr 2050 (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.). Obwohl auch genetische Prädisposition eine wichtige Rolle spielt, ist bei den meisten Fällen eine genetische Ursache bisher nicht bekannt. In allen Fällen ist dabei der Verlust von präsynaptischen Markern (bzw. ganzen Synapsen bis hin zu ganzen Nervenzellen), die Bildung von Plaques im Gehirn, sowie das Auftreten der charakteristischen „*neurofibrillary tangles*“ (NFT) in neuronalen Zellen zu beobachten. Die Plaques bestehen zum überwiegenden Anteil aus dem Amyloid-beta-Protein (A $\beta$ ). Dieses entsteht durch sequentielle Spaltung durch zwei Proteasen ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretase) aus dem transmembranen *Amyloid-beta-Precursor-Protein* (APP). Im Gegensatz dazu kommt es auch zu einer alternativen Prozessierung durch die  $\alpha$ -Secretase. APP, das zunächst durch die  $\alpha$ -Secretase gespalten wurde, kann von der  $\gamma$ -Secretase nicht mehr zum plaquebildenden A $\beta$  prozessiert werden (s. Abb. 71; Sinha and Lieberburg, 1999).

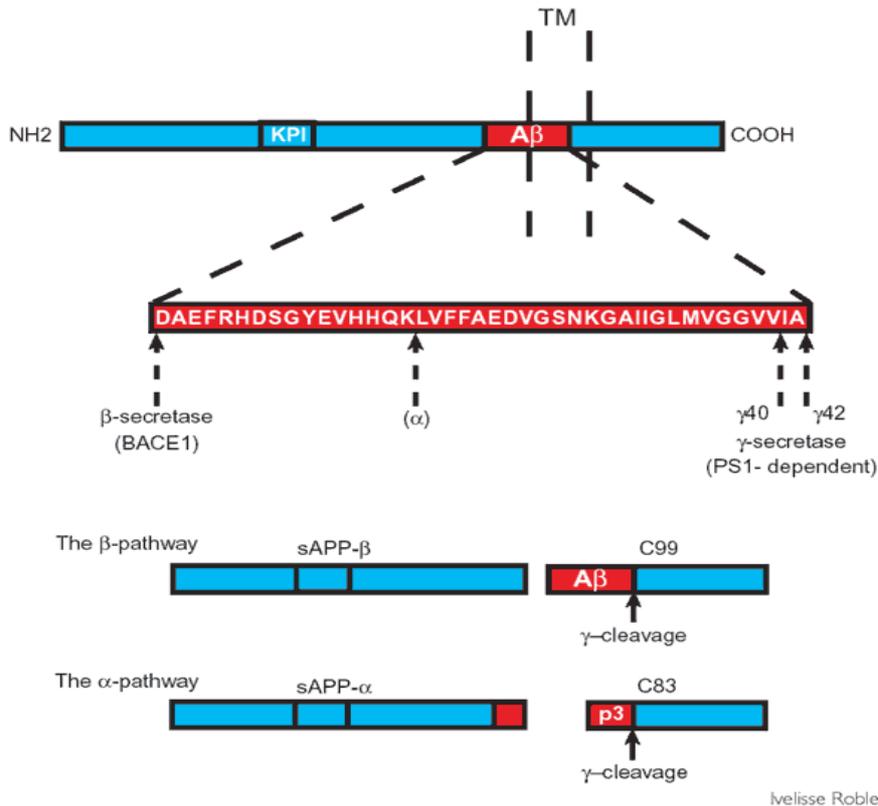


Abb.71: Schematische Darstellung der Prozessierung von APP (Puglielli *et al.*, 2003). Kommt es zunächst zu einer Spaltung durch die  $\alpha$ -Secretase, kann das plaquebildende A $\beta$  (rot dargestellt) nicht mehr gebildet werden. Reticulon3 führt zu einer Hemmung der  $\beta$ -Secretase Aktivität.

A $\beta$  wird normalerweise aus den Zellen bzw. dem Gewebe entfernt (Evin and Weidemann, 2002). Durch einen bisher ungeklärten Auslöser oder Mechanismus kommt es bei Alzheimer zu einer vermehrten Bildung bzw. zum gestörten Abbau von A $\beta$  und in der Folge zur Plaquebildung. NFTs und Plaques führen schließlich zum Verlust der neuronalen und synaptischen Funktion, bis hin zum Absterben der betroffenen Nervenzellen. Dadurch entsteht die für Alzheimer typische Demenz.

Die „normale“ Funktion des Amyloid-beta-Vorläufer-Proteins ist bisher ebenso wenig geklärt, wie die des A $\beta$ , jedoch mehren sich die Anzeichen, dass diese für die korrekte Funktion und den Aufbau der Synapsen unerlässlich ist (Koudinov and Berezov, 2004; Turner *et al.*, 2003), ferner wurde über eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Cholesterinhomöostase berichtet. Bisher ist für die Funktion des Bri3-binding-Proteins keine Information verfügbar. Bri3 dagegen wird mit der Entstehung von Alzheimer in Verbindung gebracht (Wickham *et al.*, 2005). Cofilin verkürzt Aktinfilamente durch Abspaltung von Aktin-Monomeren und ist somit ein Gegenspieler des Filamin A (Borm *et al.*, 2005), das für die Quervernetzung und Stabilisierung von Aktinfilamenten verantwortlich ist. Beide spielen eine wichtige Rolle beim Auf- und Umbau des Zytoskeletts und damit bei der Migration von Nervenzellen und der Axonausbildung, ebenso wie MAP1B, das ein wichtiger Strukturbestandteil von Mikrotubuli ist. Auch wenn der genaue Zusammenhang noch nicht geklärt ist, finden sich in den Plaques

von Alzheimer-Patienten große Mengen an Cofilin (Kondo *et al.*, 1996; Maciver and Harrington, 1995).

Syntaxine und Synaptotagmine sind wichtige präsynaptische Membranbestandteile (Bennett *et al.*, 1992; Brose *et al.*, 1992). Ohne ihre Unterstützung ist die Verschmelzung von Neurotransmitter-Vesikeln mit der präsynaptischen Membran, und damit die Reizweiterleitung, nicht möglich. Syntaxine sind für das Anhaften von Vesikeln an die präsynaptische Membran verantwortlich, Synaptotagmin unterstützt oder ermöglicht in Abhängigkeit vom intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel die Verschmelzung von Vesikel und Membran, und damit die Freisetzung des Transmitters in den synaptischen Spalt (Fernandez-Chacon *et al.*, 2001). Dieser Prozess ist bei Alzheimer stark beeinträchtigt. Um dies einigermaßen auszugleichen, wurden und werden Cholinesterase-Hemmer als akute Medikation bei Alzheimer eingesetzt, allerdings nur mit mäßigem Erfolg.

Reticulon 3 und 4 sind im ER lokalisiert, ihnen wird eine wichtige und bei Alzheimer gestörte Funktion bei der Regenerierung der Axone zugeschrieben (GrandPre *et al.*, 2000; Reilly, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der Reticulon-Familie, vor allem Reticulon 3, die Bildung von A $\beta$ , durch Hemmung der  $\beta$ -Secretase deutlich reduzieren können (He *et al.*, 2004). Je mehr Reticulon 3 in Nervenzellen vorhanden ist, desto weniger A $\beta$  entsteht (s. Abb. 71).

Der Zusammenhang zwischen der HSD17B7 und Alzheimer bleibt ungeklärt. Zwar könnte man durch die Funktionalität des Enzyms im Steroidstoffwechsel (Estradiol hat neuroprotektive Wirkung) und in der Cholesterinbiosynthese eine indirekte Beteiligung vermuten. Allerdings sind Bedeutung und Art der Interaktionen mit den identifizierten Proteinen unklar. Möglicherweise führt die Interaktion der Proteine zu einer Änderung der Aktivität der HSD17B7 oder des Interaktionspartners. Theoretisch vorstellbar wäre dies durch die beschriebene Beteiligung von A $\beta$  an der Cholesterinhomöostase (Gong *et al.*, 2002; Michikawa *et al.*, 2001). Anhand der vorhandenen Daten ist eine abschließende Beurteilung der Zusammenhänge nicht möglich, allerdings wären weiterführende Untersuchungen in Bezug auf die Beteiligung der HSD17B7 an der Alzheimer'schen Krankheit dringendst zu empfehlen.

Es traten jedoch auch andere, bisher noch nicht mit Alzheimer in Verbindung gebrachte, für Nervenzellen dennoch wichtige Proteine auf. Dazu gehört das *Heat Shock Protein 105* (HSP105). Es konnte gezeigt werden, dass HSP105 an Mikrotubuli bindet und Stress-induzierte Apoptose in neuronalen Zellen verhindert (Hatayama *et al.*, 1997; Hatayama *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2003). Hatayama *et al.* (1997) beschrieben eine wichtige Funktion des Proteins während der Embryonalentwicklung der Maus, vor allem in den interdigitalen Regionen. In einem Y2H-Experiment konnte eine Interaktion zwischen HSP105 und Cofilin gezeigt werden (Saito *et al.*, 2004). Ferner das *Meningioma Expressed Antigen 5* mit

Hyalurodinase-Aktivität (an der Meningeom-Entstehung beteiligt; Heckel *et al.*, 1998), das *Solute Carrier Family 30 Protein* (ZnT-1, schützt Neuronen vor toxischen Zink-Konzentrationen; Nitzan *et al.*, 2002) und der Eph Rezeptor A7 (wichtig für die Bildung bzw. Stabilisierung von Mikrotubuli und das „Targeting“ von Axonen, (Yue *et al.*, 2002)).

Eine weitere Gruppe identifizierter potentieller Hsd17b7-Interaktoren sind integrale Membranproteine, zu dieser zählt das am häufigsten als Interaktor aufgetretene TMP21(I)-p23, dieses transmembrane Protein ist am vesikulären Targeting und Proteintransport beteiligt, detailliertere Informationen sind leider nicht verfügbar (Horer *et al.*, 1999). Ebenfalls zu dieser Gruppe gehört PTD008, es wird als integrales Membranprotein beschrieben, über seine Funktion ist nichts bekannt.

Es konnte kein einziges Protein mit direkter Verbindung zu Estradiol bzw. zum Steroidstoffwechsel identifiziert werden, nur für den Cholesterin- bzw. Fettstoffwechsel wurden 2 Interaktoren entdeckt, ARP-1 und DLK. ARP-1 steht für „Apolipoproteinregulatorisches-Protein1“, ein Transkriptionsfaktor der COUP-Familie der nuklearen Rezeptoren. Dieser TF unterdrückt die Expression von ApolipoproteinA1, einem Hauptbestandteil des HDLs (Ladias and Karathanasis, 1991; Srivastava *et al.*, 2000). HDL wird auch als „gutes“ Lipoprotein bezeichnet, da es, im Gegensatz zu LDL, für die Senkung des Cholesterinspiegels im Körper sorgt (Franceschini *et al.*, 1991). Im Gehirn ist HDL jedoch als Haupttransportform des Cholesterins beschrieben, das hier auch die Funktion des LDLs (Cholesterinaufnahme in die Zellen) übernimmt. DLK ist die Abkürzung für Delta-Like 1-Homolog, nicht zu verwechseln mit DLL, dem Bestandteil des Delta-Notch-Signalweges. DLK wird auch als „*Preadipocyte Factor*“ (Pref-1) bezeichnet und verhindert die Bildung von Fettzellen, genauer gesagt die Umwandlung von Vorläuferzellen (Prädipozyten) zu Fettzellen (Smas and Sul, 1993).

Es bleibt allerdings fraglich, ob die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Hsd17b7 realistisch ist. Möglicherweise stellt dies einen bisher unbekanntem Signalweg dar. Solange die intrazelluläre Cholesterinsynthese ausreichend stattfindet, wird die Aufnahmerate von extrazellulärem Cholesterin durch die verminderte Bildung von HDL herabgesetzt.

Für die Interaktion mit den übrigen Proteinen ist eine schlüssige Interpretation mit dem vorhandenen Wissen nicht möglich. Zu diesen zählt *timeless*, das in *Drosophila* eine wichtige Rolle bei der tageszeitabhängigen Funktion von verschiedenen Proteinen und Mechanismen einnimmt. Dazu kommen zwei wichtige Proteine des Spliceosoms (*Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein A1* und *Nucleolar RNA-associated Protein*). In diesem Zusammenhang sei auch das polyA-bindende Protein erwähnt, das für die Initiation der Translation unverzichtbar ist, desweiteren der „Replikationsfaktor C2“, dem eine wichtige Funktion bei der DNA-Replikation zugeschrieben wird (Noskov *et al.*, 1994), Rbm8 (enthält ein RNA-bindendes Motif) sowie CREBP (der oben erwähnte Transkriptionsfaktor). Im Falle von

CREBP könnte das auch ein Hinweis auf eine cAMP-vermittelte posttranslationelle Regulation während der Embryonalentwicklung sein, da, wie oben beschrieben, in den (nicht-embryonalen) Zelllinien kaum Auswirkungen durch Forskolin zu beobachten waren.

Weitere Hinweise auf eine posttranslationelle Regulation der Hsd17b7 könnte auch die Interaktion mit der *O-Linked N-acetylglucosamine Transferase* (Ogt) geben, dieses Enzym glycosiliert Proteine und beeinflusst damit die biologische Aktivität.

#### *Fazit:*

Auch wenn die biologische Funktion der Interaktionen der identifizierten Proteine nicht geklärt werden konnte, so ist doch sehr auffällig, dass viele der Interaktoren für neuronales Gewebe unverzichtbar sind, dies gilt sowohl für die Struktur als auch die Funktion von Nervenzellen. Diese Beobachtung kann man durchaus mit den von Laubner *et al.* (2003) erzielten Ergebnissen der *in situ* Experimente in Verbindung bringen. Bei diesen Versuchen zeigte sich ein hohes Expressionsniveau im embryonalen neuronalen Gewebe. In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant, diesen Versuch auch mit einer cDNA-Bibliothek von adulten Mäusen oder Menschen durchzuführen. Vor allem im Bezug auf Alzheimer könnten sich dadurch neue und äußerst interessante Erkenntnisse ergeben. Sollte sich der Hinweis auf eine Interaktion bzw. Bindung zwischen APP und HSD17B7 bestätigen, so wäre die HSD17B7 neben der HSD17B10 der zweite Vertreter der Enzymgruppe der 17 $\beta$ -HSDs, der mit Alzheimer in Verbindung steht. Aber nicht nur 17 $\beta$ -HSDs, sondern auch Gene der Cholesterinbiosynthese werden mit der Krankheit bzw. ihrem Verlauf vermutet. Dazu gehört die bereits mehrfach angesprochene *HMGCR* und *DHCR24* (auch Seladin-1 genannt), das die Umwandlung von Desmosterin zu Cholesterin katalysiert (Greeve *et al.*, 2000; Iivonen *et al.*, 2002). Möglicherweise stellt die *HSD17B7* einen wichtigen Bestandteil der Pathogenese von Alzheimer dar.

### 3.3. Knock-out-Maus

Leider ist es im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht gelungen eine *hsd17b7-Knock-out* Maus herzustellen. Mit ihrer Hilfe wäre es sicherlich möglich gewesen einige der oben aufgestellten Theorien und Spekulationen zu bestätigen bzw. zu widerlegen. Auch wären viele neue Erkenntnisse möglich gewesen. Generell sind zwei Möglichkeiten für das Nichtgelingen dieses Projekts vorstellbar: technische oder biologische Gründe.

Zunächst zu den technischen Gründen, die zwar nicht ganz auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich sind: Da durch die Genotypisierung die korrekte Insertion des Vektors in das Genom der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) eindeutig gezeigt werden konnte, bleibt aus technischer Sicht nur noch die Möglichkeit einer nicht ausreichend sorgsamem Behandlung bzw. Bearbeitung der ES-Zellen. Das Problem dabei liegt in der Natur dieser Zellen. Damit aus ES-Zellen Keimbahnzellen entstehen können (und nur dann ist die Weitergabe der Mutation an die Nachkommen möglich), ist es von entscheidender Bedeutung, dass sie ihre Omnipotenz bis zur Blastozysteninjektion beibehalten. Um dies zu ermöglichen, werden ES-Zellen mit Feeder-Zellen kokultiviert und dem Wachstumsmedium wird LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*) zugegeben. Bei nicht ordnungsgemäßer Behandlung, z. B. wenn ES-Zellkolonien zu lange auf den jeweiligen Zellkulturgefäßen belassen werden oder der rechtzeitige Wachstumsmediumwechsel nicht stattfindet, beginnen sich die ES-Zellen zu verändern und damit ihre Omnipotenz zu verlieren. Allerdings geht dieser Differenzierungsprozess normalerweise mit einer merklich veränderten Morphologie der ES-Zellen bzw. Kolonien einher. Vor allen durchgeführten Blastozysteninjektionen wurden die Zellen bzw. Kolonien gründlich auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Auf die Injektion selbst und den anschließenden Embryonentransfer hatte ich keinen Einfluss, allerdings ist wegen der großen Erfahrung der durchführenden Personen hierbei nicht von Schwierigkeiten bzw. Ursachen für fehlende Keimbahntransmission auszugehen.

Nun zu den möglichen biologischen Gründen: Möglicherweise führt die hier erzeugte heterozygote *hsd17b7*-Mutation bereits in ES-Zellen zu solchen Veränderungen, dass sich die Zellen nicht mehr zu Keimbahnzellen entwickeln können. Die für die Blastozysteninjektion verwendeten Stammzellen waren jedoch morphologisch unauffällig. Ein weiterer Grund könnte die Lethalität der Mutation sein. Homozygote *ebp (tattered)*- und *nsdhl (bare patches)*-Mutanten sterben früh während der Embryonalentwicklung (vor Tag11). Da diese Gene X-chromosomal lokalisiert sind (*hsd17b7* ist autosomal lokalisiert), sind Männchen nicht lebensfähig. Heterozygote Weibchen sind aufgrund ihres Phänotyps mit bloßem Auge von Wildtypen zu unterscheiden. Die *tattered*- und *bare patches*-Weibchen sind dennoch lebensfähig (ihre Lebenserwartung unterscheidet sich kaum von Wildtypen) und fertil.

Eigentlich wurde für *hsd17b7*-Mäuse ein Phänotyp ganz ähnlich der *tattered*- bzw. *bare patches*-Mäuse erwartet. Insofern erscheint die Lethalitäts-Theorie auf den ersten Blick nicht unbedingt plausibel. Dennoch gibt es erklärbare Gründe für diese These. Zunächst wurden die *ebp*- und *nsdhl*-Mutanten auf andere Weise hergestellt. Das hat zur Folge, dass es durch Punktmutationen zwar zu veränderten Enzymen, nicht jedoch zu einem kompletten Fehlen der Proteine kommt. Daher besteht durchaus die Möglichkeit, dass die entstehenden Proteine eine gewisse Restaktivität besitzen. Gestützt wird dies durch den Vergleich der verschiedenen erzeugten und untersuchten Mutationen in diesen Genen. Mäuse mit den verschiedenen Mutationen zeigen unterschiedlich starke Auffälligkeiten in ihrem Phänotyp, bzw. sterben früher oder später während der Embryonalentwicklung. Durch die Konstruktionsart der *hsd17b7*-*Knock-out* Maus kommt es zu einer vollständigen Zerstörung einer Genkopie. Dies ist in heterozygoten *hsd17b7*-Mäusen möglicherweise durch die funktionelle Kopie nicht ausreichend zu kompensieren.

Unterstützung für diese Spekulation kommt durch die Beobachtung eines der in dieser Arbeit erzeugten chimären Männchen. Dieses zeigt bereits ein vielversprechendes Erscheinungsbild mit struppigem Fell, geringerer Körpergröße und deformierter Schnauze und ist somit phänotypisch mit *ebp*- und *nsdhl*-Mutanten vergleichbar (Abb. 72). Anhand der Felfärbung war zwar nur bedingt auf den tatsächlichen Chimärisierungsgrad zu schließen (geschätzt 50-60%). Allerdings fiel bei der Beobachtung aller erhaltenen Chimären diese mit dem höchsten Agouti-Anteil (bei den anderen geschätzt 5-20%) auf. Sollte der erkennbare Phänotyp tatsächlich nur auf die *hsd17b7*-Mutation zurückzuführen sein, d.h., sollten bereits chimäre *hsd17b7*-Mäuse in diesem Ausmaß betroffen sein, ist es nur wahrscheinlich, dass heterozygote Mäuse nicht lebensfähig sind. Weitere Unterstützung bietet die Tatsache, dass alle bisher geborenen Nachkommen dieser auf C57BL/6-Hintergrund basierenden chimären Maus eine schwarze Fellfarbe hatten, also keine Träger des *Knock-out* Allels waren. Die übrigen chimären Männchen waren morphologisch gegenüber ihren Wildtypen unauffällig.

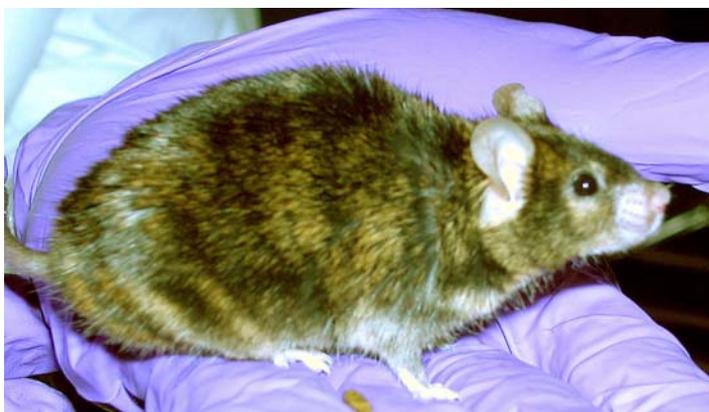


Abb. 72: Photo des im Text beschriebenen chimären Männchens. Gut zu erkennen sind die deformierte Schnauze und das struppige Fell.

Ein weiterer möglicher Grund für die Lethalität könnte in den unterschiedlichen Funktionen der mHsd17b7 zu suchen sein. Während bei *bare patches* und *tattered* jeweils „nur“ die Cholesterinbiosynthese betroffen ist, könnte die Beteiligung der mHsd17b7 am Cholesterin- und am Steroidstoffwechsel zu einer heterozygot lethalen Mutation führen. Andererseits ist es aufgrund des bekannten Expressionsmusters und der Erfahrung mit *bare patches* und *tattered* Mutationen denkbar (Liu *et al.*, 1999; Derry *et al.*, 1999), dass die Mutation nur während der frühen bis mittleren Embryonalentwicklung zum Tod der betroffenen Mäuse führt, nicht jedoch bei adulten bzw. spät in der Embryonalentwicklung befindlichen Tieren. Ein konditionaler, bzw. induzierbarer *Knock-out* könnte in dieser Hinsicht sehr aufschlussreich sein. Ferner könnten die z. Z. in unserer Arbeitsgruppe stattfindenden RNAi-Experimente wertvolle Hinweise in diese Richtung liefern.

Weitere Unterstützung für die Lethalitäts-Theorie bieten die Ergebnisse des Y2H. Sollte die Hsd17b7, neben den bereits beschriebenen Funktionen, tatsächlich auch direkt an der korrekten Bildung und Funktion von Nervenzellen beteiligt sein, wäre ein frühes Sterben der Embryonen ebenfalls nicht weiter verwunderlich. Aufgrund der bereits angesprochenen mangelnden Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Lipoproteine kann fehlendes embryonales Cholesterin auch nicht ausreichend durch maternales ersetzt werden. Aufgrund des von Marijanovic *et al.* (2003) beschriebenen embryonalen Expressionsmuster lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Das von der Mutter bereitgestellte Cholesterin kann die Blut-Hirn-Schranke kaum überwinden, daher muss es hier vom Embryo selbst hergestellt werden. Ist die embryonale Synthese gestört, kann sich das Gehirn nicht korrekt entwickeln, was bei schweren Störungen zum Tod führt. Andererseits versorgt das maternale Cholesterin den restlichen Embryo. Lediglich in bestimmten Bereichen mit erhöhtem Cholesterinbedarf wird zusätzlich vom Embryo Cholesterin gebildet. Fällt die maternale Versorgung aus, kann dies vom Embryo nicht ausreichend kompensiert werden.

Da viele Erkenntnisse über die Eigenschaften der Hsd17b7 erst nach Beginn der Doktorarbeit bekannt bzw. veröffentlicht wurden, konnten sie bei der Auswahl der Methode und der Strategie für den *Knock-out* noch nicht berücksichtigt werden. Aus heutiger Sicht wäre ein konditionaler *Knock-out* sicherlich der vielversprechendere Ansatz.

## 4. METHODEN

### 4.1. Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Bakterien

#### 4.1.1. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden 20min bei 121°C autoklaviert. Festmedien wurde vor dem Autoklavieren Agar mit einer Konzentration von 1,5% (w/v) zugesetzt. Temperaturempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugesetzt.

- LB-Medium (modifiziert nach Bertani, 1951)
  - Caseinhydrolysat 10 g
  - Hefeextrakt 5 g
  - NaCl 4 g
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1 l, pH 7,4
  
- SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)
  - Trypton 2 g
  - Hefeextrakt 0,5 g
  - MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,2 g
  - MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,25 g
  - Glukose 0,36 g
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 0,1 l

#### 4.1.2. Hemmstoffe und Medienzusätze

Die verwendeten Hemmstoffe und Medienzusätze wurden sterilfiltriert und nach Abkühlen der Medien auf ca. 45°C (Festmedien) oder vor Inokulation (Flüssigmedien) zugesetzt.

Medienzusätze	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration
Ampicillin	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 µg/ml
Kanamycin	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	30 µg/ml

### **4.1.3. Zellanzucht**

Das Überimpfen der verschiedenen *E. coli*-Stämme auf Festmedien und die Inokulation von Flüssigkulturen wurde mit einer ausgeglühten Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze, ausgehend von Einzelkolonien auf Agarplatte oder von Glycerinkulturen, durchgeführt. Flüssigkulturen mit größerem Volumen als 30 ml wurden aus üN (über Nacht) gewachsenen Vorkulturen (5 ml) in Verdünnung 1:100 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in Brutschränken bzw. Rundschüttlern bei mind. 200 rpm.

### **4.1.4. Stammhaltung und Lagerung**

Bakterienstämme können mehrere Monate bei 4°C auf Agarplatten gehalten werden. Dazu wurden Einzelkolonieausstriche einen Tag bei 37°C bebrütet, die Agarplatten anschließend mit Parafilm (American National Can, Chicago, USA) umwickelt und bei 4°C aufbewahrt. Ausgehend von Flüssigkulturen können Glycerinkulturen angelegt werden, die über mehrere Jahre bei -80°C stabil sind. Für deren Herstellung wurden Einzelkolonien in 5 ml selektivem Medium üN bei 37°C kultiviert. Diesen Kulturen wurden 500 µl entnommen und mit 500 µl 80%igem sterilem Glycerin in Nunc Cryo Tube™ Vials (Merck, Bruchsal) pipettiert, die Suspension durch Invertieren gemischt und bei -80°C gelagert.

### **4.1.5. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation von Plasmid-DNA**

#### *Herstellung elektrokompenter Bakterien*

5 ml Übernackkultur wurden zu 500 ml vorgewärmtem LB-Medium gegeben. Die Bakterienkultur ohne Antibiotika wurde bis zu einer optischen Dichte von 0.6-0.8 bei 600 nm inkubiert. Für die anschließende Aufarbeitung sollten alle verwendeten Geräte und Lösungen auf 4°C vorgekühlt sein. Die Bakteriensuspension wurde 15 min bei 4°C mit 4000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 Volumen eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen. Nach vorsichtigem Resuspendieren wurden die Zellen wieder abzentrifugiert. Weitere Waschschrirte mit 0,5 und 0,02 Vol mit 10%iger Glycerinlösung schlossen sich an. Das Bakterienpellet wurde in 1/500 Vol mit 20%igem Glycerin resuspendiert, in 50 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### *Transformation elektrokompetenter Bakterien (Elektroporation)*

Ein 50 µl Aliquot kommerziell erhältlicher oder selbst hergestellter elektrokompetenter Bakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1-5 ng Plasmid-DNA bzw. maximal 2 µl DNA aus einem Ligationsansatz vorsichtig gemischt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA-Zellsuspension in eine eiskalte sterile Elektroporationsküvette überführt und mit dem Gene Pulser der Firma BIORAD bei 200 Ohm, 2,5 kV und 25 mF gepulst. Nach sofortiger Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurden die Bakterien in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 45 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde ein 150 µl Aliquot des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion von Transformanden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### *Herstellung chemokompetenter Bakterien (RbCl-Methode) (The NEB Transcript, 1994)*

Benötigte Lösungen:

- TFB1:
  - 30mM KAc
  - 100mM RbCl
  - 10mM CaCl<sub>2</sub>
  - 50mM MnCl<sub>2</sub>
  - 15% Glyzerin
  - pH 5,8
  
- TFB2:
  - 10mM MOPS
  - 75mM CaCl<sub>2</sub>
  - 10mM RbCl
  - 15% Glyzerin
  - pH 6,5

2,5 ml Übernachtskultur wurden zu 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> ohne Antibiotikum gegeben und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet mit 100 ml kalter TFB1-Lösung resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und wieder abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml kalter TFB2-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### *Transformation hitz-kompetenter Bakterien (Hitzeschock-Verfahren)*

Kommerziell erhältliche oder selbst hergestellte hitzekompetente Bakterienzellen (50-100 µl Aliquots) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5-10 ng Plasmid-DNA oder 1-10 µl Ligationsansatz zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen je nach Stamm für 30-60 s in ein 42°C Wasserbad getaucht und danach sofort für 1 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 45 – 60 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde ein 150 µl Aliquot des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion von Transformanden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **4.2. Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Hefen**

### ***4.2.1. Kultivierung von *S. cerevisiae****

Hefen lassen sich wie Bakterien sowohl in flüssigem Medium als auch auf Agarplatten kultivieren. Die optimale Inkubationstemperatur liegt bei 30°C. Während der logarithmischen Wachstumsphase, bei Kultivierung im Vollmedium, teilen sich Hefezellen ca. alle 90 min. Über die Messung der Absorption bei 600 nm kann in Flüssigkultur die Zelldichte bestimmt werden.

#### *Nährmedien*

Alle Nährmedien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Festmedien wurde vor dem Autoklavieren Agar mit einer Konzentration von 2% (w/v) zugesetzt. Temperaturempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugesetzt.

- YPDA-Medium
  - Difco Pepton 20g
  - Hefeextrakt 10g
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 950ml
  - 40%ige Glukoselösung 50ml
  - 1%ige Adeninlösung 3ml

- SD-Medium (QDO-Medium)
  - DO Supplement (ohne Ade, His, Leu, Trp) 0,6g
  - Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 6,7g
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 950ml
  - 40%ige Glukoselösung 50ml
  
- ⇒ je nach Selektion zusätzlich:
  - 1%ige Histidinlösung 2ml
  - 1%ige Leucinlösung 6ml
  - 1%ige Tryptophanlösung 4ml
  - 1%ige Adeninlösung 2ml

### *Flüssigkultur*

Zur Vermehrung nicht transformierter Hefen wurde ein YPDA-Vollmedium verwendet. Durch diese optimalen Wachstumsbedingungen wurden hohe Zelldichten erreicht. Plasmid-transformierte Hefen wurden zur Selektion in Minimalmedium kultiviert. Hier wurde den Zellen Glukose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung gestellt, außerdem bestimmte Aminosäuren, Salze, Stickstoff, Phosphor und Spurenelemente. Minimalmedien eignen sich zur Selektion auf spezielle auxotrophe Eigenschaften der Hefezellen. Der hier verwendete Stamm AH109 ist defizient für die Synthese von Adenin, Tryptophan, Leucin und Histidin. Die Hefen können auf Minimalmedium nur dann wachsen, wenn diese Aminosäuren und dieses Nukleotid zugesetzt werden. Der hier eingesetzte Stamm Y187 ist in Minimalmedium nur dann lebensfähig, wenn die Aminosäuren Methionin, Tryptophan, Leucin, Histidin und das Nukleotid Adenin vorhanden sind.

### *Kultivierung auf festen Nährmedien*

Hefen aus Glyzerin- oder Flüssigkulturen, bzw. aus Transformations- und Mating-Ansätzen wurden mit einer sterilen Impföse auf Agarplatten ausgestrichen oder als Verdünnung ausplattiert. Die Platten wurden 2-4 Tage bei 30°C inkubiert.

### **4.2.2. Stammhaltung und Lagerung**

Stammhaltung und Lagerung erfolgte wie bei Bakterien (s. 3.1.4.).

### **4.2.3. Arbeitstechniken mit Hefe-Plasmiden**

#### *Herstellung kompetenter Hefen*

##### Stammlösungen:

10x TE (0,1M Tris, 10mM EDTA, pH 8)

10x LiAc (1M Lithiumacetat, pH 7,5)

##### Arbeitslösungen :

1x LiAc/1x TE

PEG/LiAc : 3g PEG (Polyethylenglycol)

+ 3,5 ml steriles Wasser; bei 60°C im Wasserbad lösen

+ 0,75 ml 10x TE

+ 0,75 ml 10x LiAc (Lithiumacetat)

ad 7,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

##### Durchführung :

Kompetente Hefezellen wurden jeweils frisch hergestellt. Zu diesem Zweck wurde 1 ml YPDA-Medium mit Hefekultur angeimpft und so lange gevortext, bis eine homogene Suspension entstand. Handelte es sich um schon vortransformierte Stämme wurde statt YPDA-Medium das entsprechende SD-Selektionsmedium verwendet. Im Anschluß daran wurde der 1 ml Ansatz in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml YPDA bzw. SD-Medium überführt und bei 30°C und 250 rpm für 16-18 h bis zum Erreichen der stationären Phase ( $OD_{600nm} > 1,5$ ) inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Morgen 30 ml abgenommen und in einen 2 l Erlenmeyerkolben mit 300 ml YPDA- bzw. SD-Medium überführt. Die  $OD_{600nm}$  der verdünnten Kultur sollte hierbei 0,2-0,3 betragen. Nach einer weiteren 3 stündigen Inkubation bei 30°C und 230 rpm, bis zur  $OD_{600nm}$  von 0,4-0,6, wurde die Kultur bei 1000 x g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Das Hefezellpellet wurde im Anschluß in 1,5 ml einer frisch hergestellten sterilen 1x TE/1x LiAc-Lösung resuspendiert.

#### *Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Hefen*

0,1 µg der zu transformierenden DNA und 0,1 mg der Heringssperm DNA (Clontech [10 µg/µl]) wurden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Zu jedem Transformations-

ansatz wurden 100 µl der kompetenten Hefezellen hinzugefügt. Die Ansätze wurden gemischt und anschließend 0,6 ml einer sterilen PEG/LiAc-Lösung zugegeben. Zur Herstellung einer homogenen Lösung wurden die Ansätze 10 Sekunden gevortext. Es schloss sich eine Inkubationsphase von 30 min bei 30°C und 200 rpm im Luftschüttler an. Nach Zugabe von 70 µl DMSO wurden die Lösungen durch vorsichtiges Schwenken miteinander vermischt. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Hefezellen mittels Hitzeschock wurden die Ansätze 15 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert und daraufhin für 2-5 min auf Eis gelagert. Durch fünfsekündige Zentrifugation bei 12000 x g bei RT erfolgte die Abtrennung der Zellen vom Überstand, bevor das Zellpellet in 0,5 ml sterilem TE-Puffer resuspendiert wurde. Jeweils 100 µl aus den Transformationsansätzen wurden auf SD-Agarplatten ausplattiert und diese bei 30°C für 2-4 Tage inkubiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 100 µl einer 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung auf geeignete Selektionsagarplatten ausplattiert und ebenso inkubiert. Die Transformationseffizienz wurde nach folgender Formel bestimmt:

Transformationseffizienz:

$$\frac{\text{cfu} \times \text{resuspendiertes Volumen } (\mu\text{l})}{\text{Plattiertes Volumen } (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Plasmidmenge } (\mu\text{g})} = \text{cfu}/\mu\text{g DNA}$$

*Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen*

Lösungen:

- S-Puffer:                    10mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2  
                                   50mM β-Mercaptoethanol  
                                   10mM EDTA, pH 8.0  
                                   + 50 µg/ml Zymolase  
                                   (vor Gebrauch zugeben)  
                                   → auf pH 7.5 einstellen
  
- Lysis-Puffer:                25mM Tris-HCl pH 7.5  
                                   25 mM EDTA pH 8.0  
                                   2,5 % SDS  
                                   → pH auf 7.5 einstellen
  
- 3M Kaliumacetat pH 5.5
  
- 70 % (v/v) Ethanol

### Durchführung:

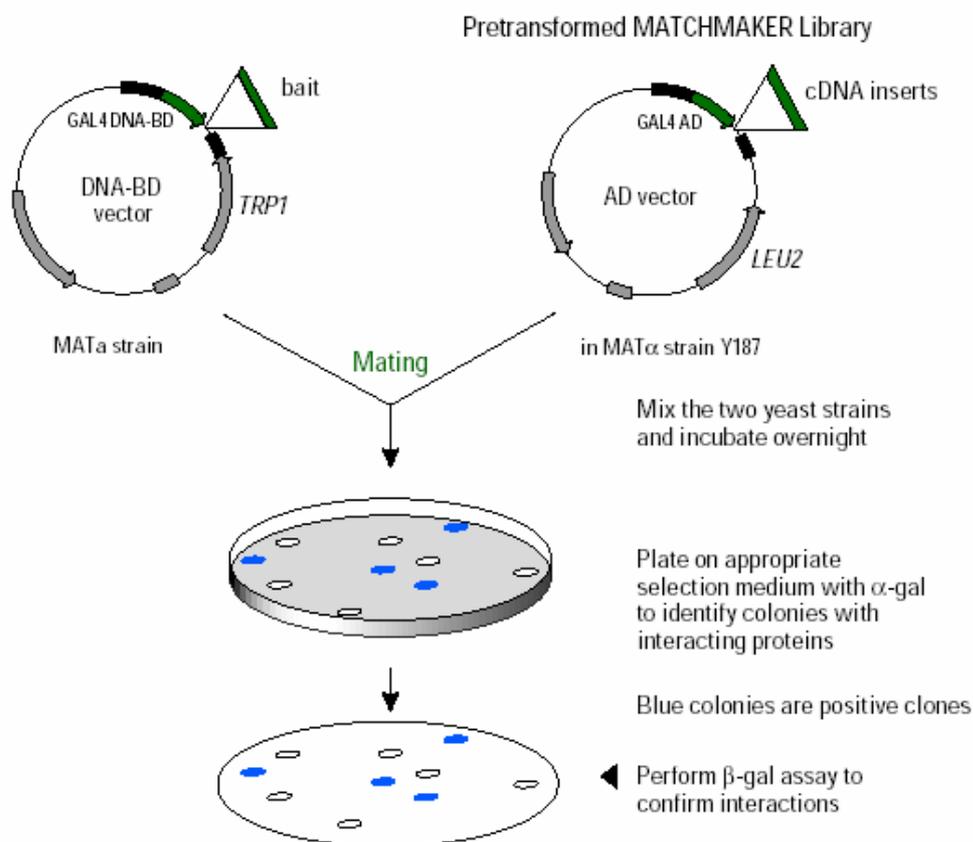
Der zu untersuchende Hefeklon wurde mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte gepickt und in 5 ml SD-Selektionsmedium überführt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 30°C und 230 rpm im Luftschüttler. Es wurde 1 ml für eine Glycerinkultur abgenommen. 1 ml wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 12000 x g bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl S-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer wurde gevortext und der Ansatz für 30 min in den auf 65°C temperierten Heizblock gestellt. Durch Zugabe von 166 µl 3 M Kaliumacetat pH 5.5 wurde die genomische Hefe-DNA gefällt und zusammen mit Proteinen und Zelltrümmern nach 10 min Inkubation auf Eis durch Zentrifugation bei 12000 x g bei 4°C von der übrigen Lösung abgetrennt. Der Überstand mit Plasmid-DNA wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 800 µl 100%igem Ethanol. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis belassen und dann 15 min bei 12000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert.

#### **4.2.4. Das Hefe Gal4 Two-Hybrid-System**

##### *Überblick*

Das Hefe Gal4 Two-Hybrid-System ermöglicht den Nachweis von Interaktionen zweier Proteine *in vivo*. Im *MATCHMAKER 3 Gal4 Two-Hybrid-System* von Clontech wird zunächst das zu testende Köder-Gen in den Ködervektor pGBKT7 mit dem Selektionsmarker Tryptophan einkloniert. Dieses Konstrukt erlaubt nach Transformation in den MAT a Hefestamm AH109 die Expression des Ködergens als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors Gal4. Die cDNA einer Bibliothek ist bereits in den pACT2-Beutevektor mit dem Leucin-Gen als Selektionsmarker einkloniert und in den MAT α Hefestamm Y187 vortransformiert. Beuteproteine werden als Fusionsprotein mit der transkriptionsaktivierenden Domäne von Gal4 exprimiert. Die transformierten Hefestämme AH109 und Y187 werden durch ein Mating zu diploiden Hefezellen verschmolzen. Bei einer positiven Interaktion des Köderproteins mit einem Protein der Bibliothek, kommen die DNA-bindende Domäne und die transkriptionsaktivierende Domäne von Gal4 in räumliche Nähe. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung von 3 Reportergenen. Dabei handelt es sich um die Gene *His3*, *Ade2* und *Mel1*. Die Expression von *His3* und *Ade1* verleiht den Hefezellen die Eigenschaft zur *de novo* Synthese von Histidin und Adenin, wodurch ihnen ein Wachstum auf histidin- und adeninfreiem Medium möglich wird. Die Transkription von *Mel1*

führt zur Bildung einer  $\alpha$ -Galaktosidase. Der Nachweis einer Proteininteraktion kann durch Selektion der Diploiden Hefeklone auf Medium ohne Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin erfolgen. Das Wachstum auf adenin- und histidinfreiem Medium wird dabei durch die Aktivierung der Reportergene (Interaktion von Beute und Köder) erreicht, während das Wachstum auf tryptophan- und leucinfreiem Medium durch die entsprechenden Gene auf dem Köder- und Beuteplasmid möglich ist. Die Aktivierung des  $\alpha$ -Galaktosidasegens wird durch einen  $\alpha$ -Galaktosidasetest geprüft (siehe Abb. 4). Um falsch positive Interaktoren auszuschließen, die entweder selbst oder über andere Transkriptionsfaktoren an eine strangaufwärts liegende Sequenz eines Reportergens binden, werden für jedes Reporterogen unterschiedliche UAS und TATA-Box-Sequenzen verwendet.



**Abb. 73: Prinzip der Selektion positiver Interaktoren mit dem Hefe Gal4 Zwei-Hybrid-System**

Übernommen von CLONTECHniques, Januar 2000

### *Mating*

Zur Herstellung einer konzentrierten Übernachtskultur des transformierten Köderstamms AH109 wurde eine 2-3 mm große, weniger als 2 Monate alte Kolonie in 50 ml SD/-Trp Medium resuspendiert und über Nacht bei 30°C aus 250-270 rpm für 16-24 h geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Lag der Wert über 0,8 wurde

die 50 ml Übernachtkultur bei 1000 x g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml des verbleibenden Überstands durch vortexen resuspendiert. In der Zwischenzeit wurde in einem Wasserbad mit RT ein 1 ml Aliquot der vortransformierten Y187 cDNA-Bibliothek aufgetaut und 10 µl für die Bestimmung des Titters entnommen. Die Suspensionen der Hefestämme MAT α Y187 und MAT a AH109 wurden in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 44 ml YPDA/Kanamycin (12 mg/l) kokultiviert (Gesamtvolumen 50 ml). Der Mating-Ansatz wurde bei 30°C und 30-50 rpm für 20-24 h zur Bildung von diploiden Hefezellen inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Mating-Ansatz in ein steriles 100 ml Zentrifugengefäß überführt und für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um möglichst wenig Diploide zu verlieren, wurde das 2 l Reaktionsgefäß 2 x mit 50 ml YPDA/Kanamycin ausgespült. Diese Suspension wurde zum Resuspendieren des Pellets verwendet. Anschließend wurden die Zellen noch einmal für 10 min bei 1000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml YPDA/Kanamycin resuspendiert. Die Mating-Mischung wurde wie folgt ausplattiert:

- 100 µl einer 1:10 000, 1:1000, 1:100, 1:10 Verdünnung auf SD/-Leu, SD/-Trp und SD/-Leu/-Trp-Platten (Ø10 cm) zur Bestimmung der Mating Effizienz  
→ Die Inkubation erfolgt für 4 d bei 30°C.
- Je 200 µl auf ca. 40 QDO-Platten mit X-α-Gal (Ø15cm)  
→ Die Inkubation erfolgt für 8-21 Tage bei 30°C. Die Anzahl von Kolonien sowie ihr Erscheinungsdatum sind während des gesamten Zeitraums zu protokollieren.

### *Ermittlung der Mating-Effizienz*

Zur Bestimmung der Mating-Effizienz wurden jeweils 100 µl einer 1:10000, 1:1000, 1:100, 1:10 Verdünnung des Mating-Ansatzes auf SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Leu/-Trp-Platten (Ø10cm) ausplattiert. Nach 4 Tagen wurden die Platten mit 30-300 Kolonien ausgezählt, um die Mating-Effizienz zu bestimmen.

Die Ermittlung der lebensfähigen Zellen (cfu/ml) erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{cfu} \times 1000 \text{ } \mu\text{l/ml}}{\text{plattiertes Volumen (}\mu\text{l)} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{lebensfähige cfu/ml}$$

Folgende Werte sind zu bestimmen:

- cfu/ml von SD/-Leu = Lebensfähigkeit des Y187 Matingpartners
- cfu/ml von SD/-Trp = Lebensfähigkeit des AH109 Matingpartners
- cfu/ml von SD/-Leu, -Trp = Lebensfähigkeit der Diploiden

### Die Kalkulation der Mating-Effizienz (%)

Der Stamm mit der geringsten Lebensfähigkeit (cfu/ml) ist der „limitierende“ Matingpartner. Nach Angaben der Firma Clontech ist dies der Stamm Y187, um sicher zu stellen, dass der größte Teil der Hefezellen mit cDNA-Inserts einen Matingpartner findet. Die Kalkulation erfolgt anhand folgender Formel:

$$\frac{\text{Lebensfähigkeit Diploide (cfu/ml)} \times 100}{\text{Lebensfähigkeit limitierender Partner (cfu/ml)}} = \% \text{ Diploide}$$

### *Bestimmung des Titers der cDNA Bibliothek*

Die Bestimmung des Titers der im Mating verwendeten cDNA Bibliothek dient der Qualitätskontrolle. Zu diesem Zweck wurde ein 10 µl Aliquot der vortransformierten Y187 cDNA Bibliothek 1:100 in 1 ml YPDA/Kanamycin (12 mg/l) verdünnt. Von dieser Verdünnungsstufe wurden erneut 10 µl entnommen und in 1 ml YPDA/Kanamycin resuspendiert (Verdünnungsfaktor 1:10000). 10 µl (+ 50 µl YPDA/Kanamycin) der 1:100 Verdünnungsstufe, sowie 50 µl bzw. 100 µl der 1:10000 Verdünnung wurden auf separate SD/-Leu Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 3-5 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Für die Ermittlung des Titers wurden die Kulturschalen mit 30-300 Kolonien herangezogen. Die Kalkulation erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Kolonien}}{\text{ausplattiertes Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{cfu/ml}$$

### *α-Galaktosidasetest*

Um die auf QDO-Medium selektionierten Hefeklone auf ihre α-Galaktosidaseaktivität zu testen, dient das Reagenz X-α-Gal. Zu diesem Zweck wird dem QDO-Agar 20 µg/ml X-α-Gal zugegeben. Da das Enzym α-Galaktosidase X-α-Gal in einen blauen Farbstoff umwandeln kann, ist die Expression des *Me1*-Gens durch die Blaufärbung der Hefeklone direkt nachweisbar. Um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Färbungen auszuschließen, wurde der Test nach 8 Stunden abgebrochen.

## **4.3. Arbeiten mit Säugetierzellkulturen**

### ***4.3.1. Kultivierung von HeLa-, HEK 293- und HepG2-Zellen***

Bei HeLa- und HepG2 handelt es sich um menschliche Krebszelllinien. HeLa-Zellen entstammen einem Cervixkarzinom, HepG2-Zellen einem Hepakarzinom. HEK293 sind humane embryonale Nierenzellen. Für ihre Kultivierung wurde eine Mischung aus 90 % RPMI 1640-Medium und 10 % fötalem Rinderserum (FBS) verwendet, zusätzlich wurde dem Medium L-Glutamin (Endkonzentration 2mM) zugegeben. Die Inkubation fand bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> statt.

### ***4.3.2. Kultivierung von HEPA1-6-Zellen***

Bei HEPA1-6 handelt es sich um eine murine Krebszelllinie. Diese Zellen stammen aus einem Hepakarzinom. Für ihre Kultivierung wurde eine Mischung aus 90% DMEM-Medium und 10% fötalem Rinderserum (FBS) verwendet, zusätzlich wurde dem Medium L-Glutamin (Endkonzentration 2mM) zugegeben. Die Inkubation fand ebenfalls bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> statt.

### ***4.3.3. Auftauen der Zellen***

Zum Auftauen einer neuen Charge von Säugetierzellen wurde das Kryogefäß aus flüssigem Stickstoff entnommen und in einem 37°C-Wasserbad schnell aufgetaut, dann in ein 15 ml Falconröhrchen mit 9 ml Zellkulturmedium überführt und für 3 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und in eine 25 ml Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium überführt. Diese Prozedur sollte möglichst zügig durchgeführt werden, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO für aufgetaute Zellen schädlich ist.

### ***4.3.4. Splitten konfluenter Zellen***

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen verdoppeln sich etwa alle 40-48 h und wachsen als Monolayer. Bei Erreichen der Konfluenz ist es notwendig, die Zellen auf eine oder mehrere Zellkulturflaschen zu überführen (splitten). Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (Zell-Monolayer gut bedeckt) versetzt. Nach etwa 3-5 min Inkubation im Brutschrank waren die Zellen abgelöst und können nach Resuspendieren in

Medium im Verhältnis 1:3 bis 1:6 auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden. Dieser Vorgang musste alle 2-4 Tage wiederholt werden.

#### **4.3.5. Einfrieren der Zellen**

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einer 25 ml-Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert und anschließend in 1ml Medium mit 10% DMSO zügig resuspendiert und in ein Cryoröhrchen (NUNC) überführt. Die Zellen sollten nicht schockgefroren werden, deshalb wurden die befüllten Röhrchen über Nacht in speziellen Gefrierboxen (NUNC) bei -80°C eingefroren (ca. 1°C Abkühlung pro Minute). Bis maximal 6 Monate können die Zellen bei -80°C gelagert werden. Für längere Zeiträume empfiehlt sich die Überführung in flüssigen Stickstoff.

#### **4.3.6. Dual Luciferase Assay (DLA)**

Der Dual Luciferase Assay wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl zur Feinkartierung der *HSD17B7*-Promotoren verwendet, um die transkriptionelle Aktivität von Promotorfragmenten unter verschiedenen Bedingungen zu testen, als auch die Auswirkungen von mutierten spezifischen TF-Bindungsstellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde das „*Dual Luciferase Reporter Assay System*“ der Firma Promega mit den enthaltenen Puffern verwendet. Bei diesen Versuchen wurden potentielle Promotorfragmente und verschiedene mutierte Varianten davon vor ein promotorloses Reporter gen (Firefly-Luciferase, auf dem Vektor pGL3 enthalten) inkloniert und in die oben genannten Zelllinien transformiert. Zur Bestimmung bzw. Normalisierung der mitunter stark schwankenden Transfektionseffizienz erfolgte die zusätzliche Transfektion eines zweiten Vektors (pRL-SV40). Dieser trägt das Gen der Renilla-Luciferase unter Kontrolle des konstitutiven SV40-Promotors. Ein angemessenes Mengenverhältnis der beiden Vektoren für die Transfektion muss empirisch bestimmt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Mischungen sind im Ergebnisteil angegeben. Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Versuche mindestens zweimal wiederholt.

#### Transfektion:

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Transfektion das Transfektionsreagenz FuGENE 6 von Roche verwendet. Dieses basiert auf Lipidkomponenten, welche das zu transfizierende

Plasmid einschließen und durch Verschmelzen mit der Zellmembran in die Wirtszelle einschleusen. Es bedient sich dabei der Methode der Lipofektion.

#### Vorbereitung der Zellen zur Transfektion:

Das folgende Protokoll basiert auf den Anweisungen des Herstellers.

Von einer 80-90% konfluenten Kultur von Säugetierzellen in 25ml-Kulturflaschen wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 1 ml Trypsin hinzugefügt. Die Zellen wurden ca. 5 min im Inkubationsschrank belassen bzw. bis sie sich von der Oberfläche abgelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium vereinzelt. Je 3 Tropfen der Zellsuspension wurden in ein Well einer 12 Well Zellkulturplatte getropft, mit 1 ml serumhaltigem Medium versetzt und so lange bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis die Kultur 30-40 % konfluent war. Bei Verwendung von speziellen Seren und Zusatzstoffen wurde das Standardmedium mindestens 6 Stunden vor der Transfektion ersetzt.

#### Durchführung der Transfektion:

Die Transfektionsansätze wurden in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Dabei war es wichtig, FuGENE 6 direkt ins serumfreie Zellkulturmedium zu geben, da es sonst an der Gefäßwand anhaftet. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA zugegeben. Es wurden jeweils Gesamtansätze von 50 µl verwendet. Da sich jede Zelllinie bezüglich der optimalen Transfektionsbedingungen unterscheidet, mussten diese empirisch bestimmt werden. Die verwendeten Mischungen sind jeweils im Ergebnisteil angegeben.

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und für 15 min bei RT belassen. Nach der Inkubation wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und die 12 Well Platte dabei vorsichtig geschwenkt. Bis zur Detektion der Luciferaseexpression (20-48 Stunden) wurden die Zellen im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

#### Detektion der Luciferaseaktivität:

Nach beendeter Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden anschließend in jedes Well 200 µl 1,25x PLB (5x PLB ist im Kit enthalten, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnen) pipettiert. Die 12 Well Platte wurde daraufhin 10 min bei RT geschüttelt. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen ließen sich die Zellen auf diese Weise nur schlecht lysieren. In diesem Falle wurden die Zellen für 10 min bei -80°C eingefroren und anschließend für 10 min bei RT unter schütteln aufgetaut. Nach erfolgter Lyse der Zellen wurden aus jedem Well 3x 20 µl in 3

Wells einer 96 Well Platte überführt. Die anschließende Messung der Luciferaseaktivität erfolgte im OrionII Luminometer (Berthold) mit den im Kit enthaltenen Lösungen.

#### Auswertung der Ergebnisse:

Das Ergebnis der Dual Luciferase Assays wird in „Relative Light Units“ (RLU) angegeben. Um diese zu erhalten, dividiert man die erhaltenen Werte der Firefly-Luciferaseaktivität durch die Werte der Renilla-Luciferaseaktivität. Zur Verringerung der Fehler wurden die Mittelwerte der dreifachen Messungen bestimmt.

## **4.4. Spezielle Methoden zur Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und Generierung der *mhsd17b7-Knock-out-Maus***

### ***4.4.1. Allgemeines zu ES-Zellen***

Im Umgang mit ES-Zellen ist besondere Vorsicht geboten. Damit diese Zellen zur Herstellung einer *Knock-out* Maus verwendet werden können (d.h. keimbahnfähig bleiben), ist eine Ausdifferenzierung der Zellen unbedingt zu vermeiden. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte nicht wie oben beschrieben in Zellkulturflaschen, sondern in speziell beschichteten 6 cm und 10 cm Petrischalen bzw. 96, 48, 24, 12 und 6 Well Platten (NUNC).

### ***4.4.2. Kultivierung und Splitten der ES-Zellen***

Als Kulturmedium wurde DMEM mit 15% FCS, 2mM L-Glutamin, 100µM β-Mercaptoethanol verwendet. Die Kultivierung der Kolonien-bildenden ES-Zellen erfolgte auf einem Feeder-Zellen-Monolayer (primäre embryonale Fibroblasten, freundlicherweise von Susanne Bourier zur Verfügung gestellt) in den entsprechenden Kulturgefäßen. Zusätzlich wurde dem Kulturmedium LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) (1000U/ml) zugegeben. Feeder-Zellen zusammen mit LIF erhalten den omnipotenten Zustand der ES-Zellen. Dennoch müssen ES-Zellen regelmäßig gesplittet werden (nach 1-3 Tagen). Das Splitten der Zellen entspricht dem oben aufgeführten Protokoll (s. 3.3.4.), allerdings wurden die Kolonien für 10min trypsinisiert. Omnipotente ES-Zellen sind gegenüber Trypsinverdau resistenter, Feeder-Zellen und teilweise differenzierte ES-Zellen sterben dabei ab.

#### **4.4.3. Elektroporation von ES-Zellen**

ES-Zellkolonien auf 10 cm Petrischalen wurden mit 3ml Trypsin-EDTA (0,05%) Lösung versetzt und 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Vereinzeln der Zellen erfolgte ein Waschschriff mit PBS und die Aufnahme des Pellets in 800 µl PBS. Das resuspendierte Pellet wurde mit der linearisierten *Knock-out*-Vektor-DNA vermischt und in einer Elektroporationsküvette für 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Elektroporation mit dem Gene Pulser der Firma BIORAD (0,24kV, 500µF) wurden die transformierten Zellen auf mehrere 10 cm Petrischalen mit Feeder-Zellen Monolayern verteilt. Die weitere Vorgehensweise ist im Ergebnissteil (s. 2.1.6.) angegeben.

#### **4.4.4. Picken der ES-Zellkolonien**

Nach dem Selektionszeitraum (8-9 Tage) wurde das Selektionsmedium abgesaugt und durch PBS ersetzt. Übrig gebliebene und morphologisch unauffällige (nicht ausdifferenzierte) Kolonien wurden unter einem Binokular mit gelben Pipettenspitzen abgelöst und in 96 Well V-Boden Platten (NUNC) überführt. Zur Vereinzeln wurden die Zellen wie oben trypsiniert und anschließend in 96 Well Platten mit Feeder-Zellen überführt. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen in einem angemessenen Verhältnis auf 2 frische 96 Well Platten mit Feederzellen gesplittet, um in den einzelnen Wells vergleichbare ES-Zelldichten zu erhalten. Nach weiteren etwa 48 Stunden wurden die Zellen von einer der beiden Platten auf wiederum 2 frische 96 Well Platten mit Feederzellen gesplittet. Diese beiden Platten wurden nach weiterer Inkubation eingefroren und bis zur weiteren Verwendung (z. B. Blastozysteninjektion) bei -80°C gelagert. Die andere bewachsene Platte wurde zum Zwecke der Genotypisierung auf gelatinisierte (100 µl einer wässrigen 0,1%igen Gelatine-Lösung pro Well geben, absaugen und trocknen lassen) 96-Well Platten ohne Feederzellen gesplittet. Um hohe Zelldichten zu erhalten, wurden diese Zellen für etwa 72-96 Stunden im Brutschrank inkubiert, anschließend lysiert und mittels Southern Blot (s. u.) und PCR genotypisiert.

#### **4.4.5. Einfrieren der ES-Zellen**

##### Einfriermedium:

pro 96-Well Platte (mischen und bis zur Verwendung auf Eis lagern):

- 3 ml Kulturmedium
- 5 ml FCS
- 2 ml DMSO

#### Durchführung:

- 30 µl Trypsin-EDTA pro Well zugeben
- 10 min bei 37°C inkubieren
- 70 µl Kulturmedium zugeben und Zellen suspendieren
- 100 µl Einfriermedium zugeben, mischen
- 96 Well Platte mit Parafilm umwickeln und sofort bei -80°C lagern

Die Zellen können bis zu 3 Monaten bei -80°C gelagert werden.

#### **4.4.6. Lyse von ES-Zellen für Genotypisierung**

##### Lyse-Puffer:

- 10mM Tris-HCl
- 10mM EDTA
- 10mM NaCl
- 0,5% N-Lauroyl-Sarcosin
- vor Gebrauch Proteinase K zugeben (Endkonzentration 1mg/ml)

##### Präzipitationslösung:

- 150 µl 5M NaCl, ad 10 ml mit 100% EtOH

##### Durchführung:

- mit Zellen dicht bewachsene gelatinisierte Platten 2x mit PBS waschen
- PBS komplett (!) absaugen
- 50 µl Lyse-Puffer pro Well
- über Nacht bei 50°C in feuchter Umgebung inkubieren (z. B. die Platten mit 2 nassen Papierhandtüchern in eine luftdichte Box legen)
- am nächsten Tag 100 µl Präzipitationslösung pro Well zugeben
- 30 min bei RT leicht schütteln
- 5 min bei 2500 x g zentrifugieren
- Überstand dekantieren
- 2x mit 70% EtOH waschen
- 20 min lufttrocknen lassen

Die so behandelte ES-Zell-DNA ist für die Genotypisierung direkt einsetzbar.

#### **4.4.7. Kultivierung der Stammzellen für Blastozysteninjektion**

Um die gewünschten ES-Zell-Klone (mit dem richtigen Genotyp) für die Blastozysteninjektion einsetzen zu können, d.h. eine ausreichende Menge an Stammzellen zu erhalten, wurden zunächst die bei -80°C in 96 Well Platten gelagerten Zellen im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Platten 3 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen, das Pellet in ES-Zellmedium resuspendiert und jeweils in ein Well einer 48 Well Platte mit Feederzellen überführt. Nach je etwa 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schrittweise auf 24, 12, 6 Well Platten und schließlich auf 6 cm Petrischalen (immer mit Feederzellen) kultiviert. Die Zellen wurden schließlich trypsiniert und in Aliquots im oben bereits beschriebenen Einfriermedium in Cryoröhrchen (NUNC) bei -80°C eingefroren.

48 Stunden vor der Injektion wurde ein Aliquot der ES-Zellen im Wasserbad aufgetaut und auf eine 6 cm Petrischale mit Feederzellen überführt. 24 Stunden vor Injektion wurden die Zellen trypsiniert und auf 2 gelatinisierte 6 cm Petrischalen (ohne Feederzellen) gesplittet. 30 min vor der Injektion wurden die Zellen trypsiniert und mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert und bis zur Injektion auf Eis gelagert.

#### **4.4.8. Blastozysteninjektion und Transfer in pseudoschwangere CD1-Weibchen**

Die Blastozysteninjektion und der anschließende Transfer in pseudoschwangere CD1-Weibchen wurden freundlicherweise von erfahrenen Spezialisten am Institut für Entwicklungsgenetik an der GSF in Neuherberg durchgeführt.

#### **4.4.9. Mauszucht**

Die Haltung der Mäuse erfolgte entsprechend der Kriterien der FELASA. Die Organisation und die Überprüfung des Hygienestatus wurde von der Abteilung für vergleichende Medizin (AVM) durchgeführt.

Die erhaltenen chimären Männchen wurden ab einem Alter von etwa 7 Wochen mit Wildtyp C57BL/6-Weibchen verpaart. Aus diesen Verpaarungen hervorgegangene Nachkommen mit brauner Fellfarbe wurden durch PCR und Southern Blot (s. 3.5.11.) genotypisiert.

## **4.5. Molekularbiologische Methoden mit DNA**

### **4.5.1. Präparation von Plasmid-DNA**

#### *Plasmidisolierung im kleinen Maßstab*

Die Präparation im kleinen Maßstab (sog. Mini-Präp) wurde mit dem NucleoSpin-System (Macherey-Nagel, Düren) mit den enthaltenen Lösungen gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das Protokoll sieht eine üN-Kultur in LB-Medium mit einem Volumen von 2 - 5 ml vor. Sofern nicht anders beschrieben wurden 5 ml verwendet.

#### *Plasmidisolierung im mittleren und größeren Maßstab*

Die Präparative Plasmidpräparation im mittleren und großen Maßstab (sog. Midi- bzw. Maxi-Präp) erfolgte mit dem Nucleobond® AX-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) gemäß den Angaben des Herstellers.

Für die Midi-Präp wurden üN-Kulturen mit einem Volumen von 25 - 30 ml verwendet, für Maxi-Präp K-Ituren von 250 - 500 ml Volumen.

### **4.5.2. Reinigung von DNA-Fragmenten**

#### *Reinigung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit*

Die Reinigung, Aufkonzentrierung und Umpufferung von DNA-haltigen Lösungen nach enzymatischer Modifikation sowie die Abtrennung amplifizierter PCR-Fragmente von den Agentien der PCR-Reaktion erfolgte durch Verwendung des QIAquickPCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden)– Die Methode nutzt die Fähigkeit langkettiger DNA–aus, an eine spezifisch dafür entwickelte, positiv geladene Säulenmatrix zu binden, während Oligos (Primer) und Nucleotide nicht anhaften. Die Elution von der Säule kann dann mit dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer oder auch mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> erfolgen. Alle benötigten Lösungen sowie das Arbeitsprotokoll sind in den Kits enthalten.

#### *Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Ebenso wie beim PCR-Purification-Kit wurde hier die Fähigkeit von DNA ausgenutzt, an spezielle Säulenmatrices zu binden. Auch in diesem Kit sind die benötigten Lösungen sowie das Arbeitsprotokoll enthalten.

#### **4.5.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA in wässrigen Lösungen**

Desoxyribonukleinsäure besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm. Die zu vermessende DNA wurde angemessen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm sowie für die Reinheitskontrolle auch bei 280 nm (Adsorptionsmaximum von Proteinen) gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  photometrisch bestimmt.

Die Berechnung der Konzentration erfolgt gemäß der Formel:

$(\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsstufe}) : 1000 = \text{Konzentration in mg/ml}$

Die Gesamtausbeute ergibt sich durch Multiplikation der Konzentration mit dem Volumen der Lösung. Für eine nicht verunreinigte Probe nimmt der Term  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  einen Wert nahe 2,0 an. Verunreinigungen der Lösung mit Proteinen erhöhen die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm.

Die Konzentrationsmessungen wurden mit dem Beckman DU<sup>®</sup> Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman, Unterschleißheim) durchgeführt.

#### **4.5.4. Fällern von DNA**

Stark verdünnte DNA-Lösungen, ebenso wie verunreinigte DNA-Lösungen, können zur Aufkonzentrierung bzw. Aufreinigung, gefällt werden. Hierzu wurde folgendes Protokoll verwendet:

Der DNA-Lösung wurde ein Zehntel Volumen 3M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina absoluten Ethanol zugegeben. Die Mischung wurde mind. 2 h bei  $-20^\circ\text{C}$  inkubiert und mind. 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $17.000 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min mit 70%igem Ethanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) gewaschen (Zentrifugation bei  $17.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$ ). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und in angemessenem Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen.

#### **4.5.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen**

1-10  $\mu\text{g}$  zu verdauender DNA wurden mit 5-20 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym und zugehörigem Reaktionspuffer (MBI Fermentas; NEB) versetzt und 2 – 16 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die verdaute DNA auf einem Agarosegel analysiert oder direkt mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind im Anhang aufgeführt.

#### **4.5.6. Ligation**

Für die Ligation von Vektor und Insert wurden die DNA-Fragmente im Verhältnis 1:4 gemischt und in 20 µl Gesamtvolumen mit 1x Ligasepuffer und T4-Ligase (NEB) entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 14°C inkubiert.

#### **4.5.7. DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA wurde entweder von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) oder von mir selbst mit dem CEQ2000 (Beckman) durchgeführt. Im zweiten Fall wurde die Sequenzierung exakt nach Anleitung des Herstellers mit dem zugehörigen Kit durchgeführt, mit dem Unterschied, dass lediglich jeweils die Hälfte der empfohlenen Mengen verwendet wurde. Das Verhältnis der einzelnen Komponenten wurde dadurch nicht verändert.

#### **4.5.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten erfolgte mittels PCR. Die PCR-Ansätze wurden im 20 bzw. 50 µl Format durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 200nM dNTP-Mix, 10-100ng DNA-Template, 0,5µM der beiden Primer und 1-2 Einheiten einer DNA-Polymerase in 1x PCR-Reaktionspuffer. Für Standard-PCRs wurde die hauseigene Taq-Polymerase verwendet, bei schwer amplifizierbaren Templates die Herculase (Stratagene), für möglichst fehlerfreie Amplifikationen die Pfu-Turbo-Polymerase (Stratagene).

#### **4.5.9. PCR-basierte Mutagenese: QuikChange**

Mutagenesen in Plasmiden wurden mit der QuikChange Methode (Stratagene) durchgeführt. Die dazu benötigten Bestandteile (Puffer und Enzyme) sind im Kit enthalten. Die Durchführung erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls, jeweils mit der empfohlenen Maximalmenge an Template-DNA. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

#### **4.5.10. Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung**

Southern Blots wurden zum Zwecke der Genotypisierung entweder mit genomischer ES-Zell-DNA oder mit aus Mäuseschwanzspitzen gewonnener genomischer DNA durchgeführt. ES-Zell-DNA wurde wie oben bereits (s. 3.4.6.) beschrieben gewonnen, DNA aus Mäuseschwänzen durch Phenol-Chloroform-Extraktion.

## Phenol-Chloroform Extraktion genomischer DNA:

### Material:

- 0,5 – 1 cm einer Schwanzspitze einer 3-6 Wochen alten Maus
- Tail-Puffer (50mM Tris-HCl pH8, 50mM EDTA, 100mM NaCl, 0,5% SDS, 20 mg/ml Proteinase K)
- Roti-Phenol/Chloroform (Roth)
- Chloroform/Isoamylalkohol 24:1
- Isopropanol
- 70% EtOH
- 0,5x TE-Puffer (5mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA; pH 7,5)

### Durchführung:

- Schwanzspitze mit 0,7ml Tail-Puffer in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß üN bei 55°C schüttelnd (1200 rpm) inkubieren
- 0,7ml Roti-Phenol/Chloroform zugeben und 1 h leicht schütteln
- 10 min bei 7000 x g und 4°C zentrifugieren
- Obere Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführen und wiederum 0,7ml Roti-Phenol/Chloroform zugeben und 30 min leicht schütteln
- 10 min bei 7000 x g und 4°C zentrifugieren
- Obere Phase in neues Eppendorfreaktionsgefäß überführen, 0,7ml Chloroform/Isoamylalkohol zugeben, 30 min schütteln und 10 min bei 7000 x g und 4°C zentrifugieren
- Obere Phase in neues Eppendorfreaktionsgefäß überführen, 0,5ml Isopropanol zugeben und leicht schütteln/schwenken bis DNA ausfällt
- 1 min bei 12000 x g zentrifugieren
- DNA-Pellets 2x mit 70% EtOH waschen
- Pellets 20-30 min trocknen lassen
- Pellets üN in 100 µl 0,5x TE lösen

#### **4.5.11. Southern Blots**

##### *Restriktionsverdau der genomischen DNA*

##### Restriktionsverdau-Mix: (pro Well 30 µl)

- 3 µl 10x Restriktionspuffer
- 0,2 µl 0,1M Spermidin
- 0,25 µl RNase (10 mg/ml)
- 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
- 25,35 µl H<sub>2</sub>O bidest

Bei der Genotypisierung von Mäusen wurde anstatt H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 25,35 µl DNA-Lösung aus der Präparation der Schwanzspitzen verwendet. Der Verdau fand in diesem Fall in Eppendorfreaktionsgefäßen statt. Die Inkubation erfolgte üN bei 37°C unter leichtem Schütteln, bei Verdau direkt in 96 Well-Platten in feuchter Umgebung.

##### *Agarose-Gelelektrophorese*

die Restriktionsansätze (30 µl) wurden mit 6 µl 6x Auftragspuffer (15% Ficoll, 0,25% Bromphenol-Blau, 0,25% Xylencyanol FF) versetzt und anschließend in die Taschen eines 0,8% Agarosegels (15x15cm) überführt. Die Dauer der Elektrophorese betrug bei 90V 4-5 Stunden bzw. bis die Bromphenol-Bande das Gelende erreicht hat.

##### *Blot nach Kapillar-Methode*

##### Lösungen:

- 0,2M HCl
- Denaturierungslösung: 0,5N NaOH, 1,5M NaCl
- Neutralisierungslösung: 0,2M Tris-HCl, 1,5M NaCl; pH 7
- 20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat; pH 7

##### Durchführung:

- Gel nach Beendigung der Elektrophorese in Plastikwanne überführen und mit Wasser spülen
- Ausreichend 0,2M HCl zugeben (bis Gel fast bedeckt ist) und 10 min leicht schütteln

- HCl durch Denaturierungslösung ersetzen und ca. 20min leicht schütteln (bis zum Farbumschlag der Bromphenolblau-Bande)
- Denaturierungslösung durch Neutralisationslösung ersetzen und ca. 20min leicht schütteln
- Gel kurz in 20x SSC schütteln

Das Gel ist somit für den Blot-Vorgang bereit.

### Blotaufbau:

#### Material und Puffer:

- 6x auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Blotpapier
- 1x Whatman-Blotpapier auf ca. 20x30cm zugeschnitten
- auf Gelgröße zugeschnittene Blotmembran (BiodyneB, PALL)
- Plastikwanne
- 2 Plastik- oder Glasplatten
- Küchenrolle
- Gewicht (Glasflasche, Katalog, ca. 700-800g)

#### Blotdurchführung:

- mind. 1l 20x SSC in die Plastikwanne geben (Kapillarstrom darf nicht unterbrochen werden!)
- Plastikplatte auf die Wanne legen
- 20x30cm Whatman-Blotpapier so auf der Platte platzieren, dass es auf beiden Seiten überhängt und Puffer aufsaugen kann
- 3x Whatman-Blotpapier mittig auf dem bereits getränkten Whatman-Blotpapier platzieren und befeuchten, unbedingt Luftblasenbildung vermeiden
- Gel mit der Oberseite nach unten auf den Blotpapierstapel legen (ohne Luftblasen!)
- Um Kapillarstrom außerhalb des Gels zu vermeiden, das Gel mit Parafilm umgeben
- Mit 20x SSC befeuchtete Blotmembran auf das Gel legen (ohne Luftblasen!)
- Die übrigen 3 Whatman-Blotpapiere auf die Membran legen (ohne Luftblasen!)
- Mehrere Lagen Küchenrollenlagen darüber platzieren (ca. 20cm Höhe)
- zweite Plastikplatte auf den Papierstapel legen und mit Gewicht beschweren
- nach 12-16 Stunden Blotmembran vorsichtig entfernen, kurz in 2x SSC schwenken, überschüssige Flüssigkeit entfernen und mit UV-Licht ( $\lambda=254\text{nm}$ ) Crosslinken

- direkt mit Hybridisierung beginnen oder die Membran zwischen leicht angefeuchteten Whatman-Papieren bei 4°C lagern (mehrere Monate möglich)

### *Sondenherstellung*

Alle verwendeten Sonden wurden ausgehend von PCR-Produkten (Primer sind im Anhang aufgeführt) mit dem Rm-T Random Priming Labelling Kit (Stratagene) hergestellt. Zur Markierung der Sonde wurde jeweils [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP verwendet. Durchführung der Markierung und anschließende Reinigung der Sonde erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### *Hybridisierung*

#### Prähybridisierungslösung:

- 50% Formamid
- 5x SSC
- 5x Denhardt's Mix
- 0,5% (w/v)SDS
- 50 µg/ml Heringssperm-DNA
- Jeweils 12ml Lösung pro Anwendung

#### Hybridisierungslösung:

- 50% Formamid
- 5,75x SSC
- 0,1 g/ml Dextransulfat
- 0,5% (w/v)SDS
- 50 µg/ml Heringssperm-DNA
- Jeweils 12 ml Lösung pro Anwendung

#### Waschpuffer:

- **1:** 2x SSC, 0,1% (w/v)SDS
- **2:** 1x SSC, 0,1% (w/v)SDS
- **3:** 0,2x SSC, 0,1% (w/v)SDS

### Durchführung:

- Membran und auf 42°C vorgewärmte Prähybridisierungslösung in Hybridisierungsröhre geben und mind. 1 Stunde bei 42°C rotieren lassen
- Radioaktiv-markierte Sonde in vorgewärmte Hybridisierungslösung pipettieren
- Prähybridisierungslösung durch Hybridisierungslösung inkl. Sonde ersetzen
- 16-20 Stunden bei 42°C rotierend inkubieren
- am nächsten Tag Hybridisierungslösung dekantieren
- Blot 30 min bei 60°C in Waschpuffer 1 im Hybridisierungsofen rotierend waschen
- Waschlösung 1 durch Waschlösung 2 ersetzen, 20 min bei 60°C inkubieren
- Blot aus Hybridisierungsröhre entnehmen und Strahlungswert (counts/sec) messen, bei unter 500 counts/sec Waschschrirte beenden, sonst Blot mit Waschlösung 3 waschen
- Blotmembran zwischen 2 Schichten Frischhaltefolie legen und in Belichtungskassette befestigen
- X-omat Film (Kodak) auflegen und Kassette bis zur Filmentwicklung bei -80°C lagern
- Je nach Strahlungsintensität des Blots den Film nach 2-5 Tagen entwickeln (alternativ 2 oder 3 Filme übereinander legen und nacheinander entwickeln)

### *Strippen der Membran zur Rehybridisierung*

Zur Rehybridisierung der Blotmembran mit weiteren Sonden muss die gebundene Sonde zunächst entfernt werden. Dazu eignen sich die 2 folgenden Methoden. Dabei besteht auch die Möglichkeit, beide hintereinander durchzuführen. Die Blotmembran konnte ohne große Qualitätsverluste bis zu 5x rehybridisiert werden.

### Hot-SDS-Methode:

- 0,1% (w/v) SDS zum Kochen bringen (ca. 100ml) und auf die Blotmembran geben
- abkühlen lassen (ca. 20 min)
- Striplösung abschütten und Membran kurz mit 2x SSC waschen

### Alkali-Methode:

- 0,2M NaOH auf 42°C erwärmen und auf die Blotmembran geben
- 10 min leicht schütteln
- Vorgang wiederholen

- 0,2M NaOH abkippen und Membran 10 min in Neutralisationslösung (s. 3.5.11.3.) leicht schütteln
- Membran kurz mit 2x SSC waschen

Bei beiden Methoden gilt: Erfolg des Strippens durch Bestimmung des Strahlungswerts (Sollwert < 30counts/sec) überprüfen!

## **4.6. Methoden mit RNA**

### ***4.6.1. Gewinnung von RNA aus Zelllinien***

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus HepG2- und HEPA1-6-Zellen wurde das RNeasy-Midi-Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend des Protokolls des Herstellers. Die Bestimmung der erhaltenen RNA-Konzentration erfolgte analog der Bestimmung der DNA-Konzentration (s. 3.5.3.). Die Berechnung der Konzentration erfolgt gemäß der Formel:  $(OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsstufe}) : 1000 = \text{Konzentration in mg/ml}$

### ***4.6.2. Primer Extension***

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts wurde das Primer Extension System (Promega) verwendet. Als Template diente Gesamt-RNA aus HepG2- und HEPA1-6-Zellen. Die zum Umschreiben der RNA in DNA verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers.

Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit DNA-Laufpuffer gemischt und auf ein 21x40x0,1cm denaturierendes Polyacrylamidgel (6% Acrylamid, 7M Harnstoff, 1x TBE) aufgetragen. Die Durchführung erfolgte in der „Sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell“ (BioRad) Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolbande das untere Ende des Gels erreicht hatte (ca. 90 min bei 1900V).

Nach dem Lauf wurde das Gel vorsichtig auf ein Whatman-Blotpapier überführt und in einer lichtdichten Expositionskassette befestigt. Die Expositionszeit der aufgelegten X-omat-Filme (Kodak) hing von der Strahlungsintensität des Gels ab und betrug 1-3 Tage.

#### **4.6.3. 5'-RACE: Rapid Amplification of 5' cDNA Ends**

Eine weitere Methode zur Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten ist die „5'RACE“. Als Template wurde, wie zuvor bei der Primer Extension Methode, Gesamt-RNA aus HepG2- und HEPA1-6-Zellen verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Roche). Die für diese Versuche verwendeten genspezifischen Primer sind im Anhang aufgeführt.

### **4.7. Methoden zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren (TF) an ihre Bindungsstellen**

#### **4.7.1. Herstellung von Nuklearextrakten**

Da für TF-Bindungsstudien in den überwiegenden Fällen die entsprechenden Proteine (TFs) nicht in Reinform vorlagen, wurden für die entsprechenden Experimente Nuklearextrakte verwendet. Zur Gewinnung dieser Extrakte wurde das „NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction“ Kit (PIERCE) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Um eine höhere Proteinkonzentration zu erreichen, erfolgte die Aufnahme der nuklearen Fraktion in 50% der empfohlenen Reagenzmenge. Laut Anleitung sind dadurch keine negativen Auswirkungen auf die Qualität des Extrakts zu befürchten.

#### **4.7.2. DNaseI-Footprinting**

DNaseI-Footprinting wurde durchgeführt, um die Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte Promotorbereiche (humaner Promotor: 257bp strangaufwärts des Startcodons) nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde das „Core Footprinting System“ (Promega) verwendet. Die Versuche wurden mit Nuklearextrakten und rekombinantem SP1-Protein durchgeführt (s. Ergebnisteil). Die Durchführung erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls. Gelelektrophorese, sowie Exposition und Entwicklung der Filme wurde wie bei der *Primer Extension*-Methode durchgeführt.

#### **4.7.3. Gel- und Supershifts**

Um die Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren an bioinformatisch vorhergesagte Stellen innerhalb von Promotorbereichen nachzuweisen, wurden Gel- und Supershifts verwendet.

Kurze Stücke doppelsträngiger DNA (23-57bp, im Anhang aufgeführt), die die jeweiligen vorhergesagten Bindungsstellen enthielten, wurden entweder mit rekombinantem gereinigtem Protein oder Nuklearextrakt inkubiert. Die Bindung eines Proteins an die entsprechende DNA führt zu einer Verlangsamung der Wanderung im Gel. Bei Verwendung von Nuklearextrakt wurde die Bindung von Transkriptionsfaktoren durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern nachgewiesen (*Supershift*). Für diese Versuche wurde auf das „LightShift Chemiluminescent EMSA Kit“ (PIERCE) zurückgegriffen. Die meisten der benötigten Lösungen sind in diesem Kit enthalten. Die zusätzlich verwendeten sind mit # markiert. Zum Nachweis der Banden müssen die DNA-Stücke endmarkiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu Biotin verwendet.

#### *Biotinylierung der DNA*

Aufgrund der besseren Ausbeute an biotinylierter DNA empfiehlt sich die Endmarkierung von einzelsträngigen Oligo-DNAs und das anschließende Annealing der komplementären markierten Oligos. Zur Markierung wurde das „Biotin 3' End DNA Labeling Kit“ (Pierce) verwendet. Die Markierung und anschließende Reinigung der Oligos erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Nach erfolgter Markierung wurden gleiche Mengen komplementärer Oligos in 1x PCR-Puffer auf 90°C erhitzt und anschließend bei ihrer Schmelztemperatur für 15 min inkubiert. Danach wurden die Ansätze langsam bis auf RT abgekühlt, um doppelsträngige Oligos zu erhalten.

#### *DNA-Protein-Bindungsreaktion*

Die generelle Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers in Gesamtansätzen von 20 µl. Die Inkubationszeiten der Reaktionen betragen jedoch jeweils 30 min. Jedes Experiment bestand aus mehreren Ansätzen. Dazu gehörten:

- DNA ohne Protein
- DNA mit Protein
- DNA mit Protein und 300molarem Überschuss unmarkierter Kompetitor-DNA (entsprechend der markierten DNA) zum Nachweis einer spezifischen Bindung
- DNA mit Protein und 300molarem Überschuss unmarkierter Kompetitor-DNA mit mutierten Bindungsstellen (entsprechend der bei DLAs verwendeten Mutationen; s. Ergebnisteil) zum Nachweis des mutationsbedingten Verlusts der Bindungsfähigkeit

- Zusätzlich bei Verwendung von Nuklearextrakt: DNA mit Protein und spezifischem Antikörper (2 µg) zum Nachweis des entsprechenden Transkriptionsfaktors; bei diesen Ansätzen erfolgte eine Präinkubation (15 min bei RT ohne DNA)

Da jeder Transkriptionsfaktor unterschiedliche Bedingungen für die Bindung an DNA bevorzugt, mussten diese jeweils empirisch bestimmt werden. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Inkubationsansätze aufgeführt:

	<b>HNF4</b>	<b>SREBPs</b>	<b>SP1</b>	<b>NF-Y</b>	<b>VDR</b>
Bindungspuffer	1,5x	1x	1x	1x	1x
Glycerin	5%	2,5%	7,5%	5%	2,5%
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
# Hepes-KOH pH7	12,5 mM	10 mM	-----	10 mM	10 mM
NP-40	0,05%	0,05%	-----	-----	0,05%
# BSA	2,5 µg	2,5 µg	2,5 µg	2,5 µg	2,5 µg
Poly (dl·dC)	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg

Anschließend wurden entweder 3 µl Kernextrakt (etwa 10 µg Gesamt-Protein) oder 250 ng des rekombinanten Proteins zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT wurden schließlich die biotinylierten doppelsträngigen Oligos zugegeben (1µl aus den Annealing-Ansätzen, Menge laut Anleitung des Herstellers).

Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurden die Ansätze mit 4 µl 6x Auftragspuffer versetzt, auf ein 5%-TBE-Criterion-Gel (BioRad) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V für etwa 1,5 Stunden (bzw. bis die Bromphenol-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hat) durchgeführt. Daraufhin wurde das Gel vorsichtig entnommen und die DNA mittels Elektrotransfer (Semidry Transblot; BioRad) auf eine Membran geblottet (25 V, 30 min). Nach Crosslinking durch UV-Licht ( $\lambda=254$  nm) erfolgte der Nachweis der Banden auf der Membran mit den im LightShift-Kit enthaltenen Puffern und Lösungen nach Anleitung des Herstellers. Anschließend wurden X-omat Filme (Kodak) aufgelegt und nach 1-3minütiger Exposition entwickelt.

## 4.8. Bioinformatische Methoden

Die unten aufgeführte Software ist unter [www.genomatix.de](http://www.genomatix.de) in begrenztem Ausmaß frei zugänglich. Die unbegrenzte Funktionalität ist kostenpflichtig (für Mitarbeiter der GSF bei Anmeldung kostenfrei).

### 4.8.1. *MatInspector*

MatInspector dient dem Auffinden von potentiellen TF-Bindungsstellen in einer beliebigen DNA-Sequenz. Bezüglich der Länge der zu untersuchenden DNA-Sequenz gibt es keine Einschränkungen, allerdings empfiehlt sich aus Gründen der [Übersichtlichkeit der Ergebnisse](#) die Verwendung von DNA-Sequenzen von nicht mehr als 1000 bp.

Die Software ermöglicht die Identifizierung potentieller Bindungsstellen anhand von Sequenzähnlichkeiten, dabei wird auf eine Bibliothek definierter Matrizen (Konsensus-Sequenzen die aus mehreren Bindungsstellen für den jeweiligen TF erstellt wurden) zurückgegriffen. Die Konsensussequenz wird als Matrix bezeichnet, die am stärksten konservierten Basen (Core) werden dabei gesondert bewertet, was zu einer besseren Spezifität führt (Quandt *et al.*, 1995). Auf Wunsch wird zu jedem TF die zugrunde liegende statistische Basis der Matrix angezeigt. Bei der Eingabemaske bestehen verschiedene Einstellmöglichkeiten. So kann die Stringenz der Sequenzähnlichkeiten (Matrix similarity) verändert werden oder es können nur für bestimmte Gewebe spezifische TFs ausgewählt werden.

### 4.8.2. *PromotorInspector*

Dieses Programm untersucht genomische DNA-Sequenzen spezifisch auf das Vorhandensein von Promotoren der RNA-Polymerase Typ II (Scherf *et al.*, 2000). Aufgrund der teils sehr unterschiedlichen Zusammensetzung eukaryotischer Promotoren kann mit diesem Programm nicht jeder Promotor identifiziert werden. Laut Angaben von Genomatix können etwa 50% aller Promotoren entdeckt werden.

### 4.8.3. *EIDorado*

Mit EIDorado können DNA-Sequenzen zu bereits veröffentlichten Genomen annotiert werden. Daneben kann die genaue Lokalisation von Genen innerhalb eines Genoms und ihre nähere Umgebung angezeigt werden. Des Weiteren sind verschiedene Zusatzinformationen enthalten, beispielsweise bereits identifizierte Promotoren, Promotormodule,

Exon-Intron Grenzen und Transkriptionsstartpunkte. Ferner besteht die Möglichkeit bestimmte Sequenzabschnitte herunterzuladen oder direkt mit anderen Genomatix-Programmen zu untersuchen (z. B. MatInspector). Die Funktion „Comparative Genomics“ ermöglicht den Vergleich eines beliebigen Gens in verschiedenen Spezies (sofern Information bereits vorhanden).

#### **4.8.4. *FrameWorker***

Diese Software erlaubt die Suche nach gemeinsamen konservierten TF-Bindungsstellen in einem Set von mehreren Promotoren. Sind in den untersuchten Sequenzen mehrere TF-Bindungsstellen in gleicher Orientierung (Plus- oder Minusstrang) und in ähnlichem Abstand zueinander vorhanden, errechnet das Programm daraus ein Modell. Je mehr TF-Bindungsstellen in einem solchen Modell enthalten sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die betreffenden Gene einem gleichen transkriptionellen Regulationsmechanismus unterworfen sind. Weiterhin besteht die Möglichkeit ganze Genome auf das Vorhandensein eines solchen entdeckten Modells zu untersuchen.

## 5. MATERIAL UND ORGANISMEN

### 5.1. Bakterien- und Hefestämme

<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA 1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac {F', proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15, Tn10(tet<sup>R</sup>)}</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5α	F-, Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, D( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR, recA1, endA1, hsdR17</i> (rk-,mk+), <i>phoA, supE44, λ-thi-1, gyrA96, relA1</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> Top 10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Δ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i> AH109	<b>MATa</b> , <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2 URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ MEL1</i>	Clontech
<i>S. cerevisiae</i> Y187	<b>MATα</b> , <i>ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met<sup>-</sup>, URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ MEL1</i>	Clontech

### 5.2. Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Bezeichnung
HepG2	DMSZ	ACC 180
HEK293	DMSZ	ACC 305
HeLa	DMSZ	ACC 57
HEPA1-6	DMSZ	ACC 175
TBV-2	IDG, GSF	
F1	IDG, GSF	

### 5.3. Vektoren

pGBKT7 DNA-BD	Clontech
pACT2 DNA-AD	Clontech
pGem3 Zf(+)	Promega

pKO Scrambler NTKV1901	Stratagene
pGL3-Basic	Promega
pRL-SV40	Promega
pCR2.1	Invitrogen
pCDNA3-AP2	Doris Münster, IDG, GSF

## 5.4. Enzyme

Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, NEB
Herculase, PfuTurbo	Stratagene
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, NEB

## 5.5. Antikörper

Name	Bestellnummer	Hersteller
SREBP-1 (H-160)	Sc-8984 X	Santa Cruz
SREBP-2 (N-19)	Sc-8151 X	Santa Cruz
SP1 (H-225)	Sc-14027 X	Santa Cruz
CBF-A (NF-Y) (C-20)	Sc-7711 X	Santa Cruz
HNF-4 $\alpha$ (H-171)	Sc-8987 X	Santa Cruz
VDR (H-81)	Sc-9164	Santa Cruz

## 5.6. Proteine

SP1 (human)	# E6391	Promega
VDR (murin)	---	Dr. Gabriele Möller

## 5.7. Radionuklide

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP	Amersham Pharmacia Biotech
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP	Amersham Pharmacia Biotech

## 5.8. Chemikalien, Zusatzstoffe, Seren und Medien

Agarose	Biozym
Ampicillin	Sigma
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Agar	Difco
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
BSA	NEB
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Biomol
Drop out Supplement	Clontech
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Biomol
Ethidiumbromid	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Glucose	Merck
YNB ohne Aminosäuren	Difco
Hefeextrakt	Difco
Hepes-KOH	Gibco
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	MBI Fermentas
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumacetat	Merck
Lithiumacetat	Sigma
Manganchlorid (Tetrahydrat)	Sigma
Magnesium-Hexahydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
NN'-Dimethylformamid	Merck
Trisbase	Merck
PEG 6000	Sigma
2-Propanol	Merck
Rubidiumchlorid	Sigma
X- $\alpha$ -Gal	Clontech
G418	Gibco

Ganciclovir	Gibco
Estradiol	Sigma
Cholesterin	Sigma
25-Hydroxycholesterin	Sigma
7-Dehydrocholesterin	Sigma
RPMI1640	Gibco
DMEM	Gibco
Steroidfreies humanes Serum	PAA
Delipidisiertes humanes Serum	PAA
FBS	Biochrom
Delipidisiertes FBS	PAN
FCS für embryonale Stammzellen	PAN
LIF	Gibco

## 5.9. Laborgeräte

PCR Maschinen	Stratagene Robocycler 96
Netzgerät	Biorad, Power PA300
Sequenziergerät	Beckman CEQ 2000
Wärmeschüttler	New Brunswick Scientific innova 4230
Geldokumentationsanlage	MWG-Biotech, TFX-20M
Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer comfort
Elektroporationsgerät	Biorad Gene Pulser II
Minishaker	IKA <sup>®</sup> MS <sub>2</sub> -Minishaker
Vortexer	Scientific Industries Vortex Genie
Feinwaage	Feinwaage Sartorius 1205 MD
pH-Meter	pH Meter 766 calimetric Knick
Mikropipetten	Gilson
Brutschränke	Haereus Instruments
Zentrifuge	Beckman Avanti J-20 Zentrifuge
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C
Kühlzentrifuge	Universal 32R Hettich Zentrifugen
Konzentrator	Eppendorf Concentrator 5301
Spektralphotometer	Beckman DU 530
Agarosegelelektrophorese-Apparatur	BIO-RAD Sub Cell GT
PAGE-Apparatur (Criterion-Gele)	BIO-RAD CRITERION Cell
PAGE-Apparatur (große Gele)	BIO-RAD Sequi-Gen GT Cell

Luminometer  
UV-Crosslinker

Berthold Orion2  
BioLink BLX 312

## 5.10. Verwendete Kits

Maxi-Plasmidisolierung	# 740573	MACHERY & NAGEL, Nucleobond PC 500 Kit
Midi-Plasmidisolierung	# 740574	MACHERY & NAGEL, Nucleobond PC 100 Kit
Mini-Plasmidisolierung	# 740588.50	MACHERY & NAGEL, NucleoSpin® Plasmid Kit
DNA Elution aus Agarose	# 28704	QIAGEN, QIAquick Gel Extraktions Kit
Sequenzierung	# 608120	BECKMAN, CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit
Topo TA Klonierung	# 45-0641	INVITROGEN, TA Cloning Kit
Reinigung von PCR-Produkten	# 28104	QIAGEN, QIAquick PCR Purification Kit
Hefe Gal4 Two-Hybrid-System	# 630303	Clontech, MATCHMAKER 3
RNA-Isolierung	# 75142	QIAGEN, RNeasy Midi Kit
Primer Extension	# E3030	Promega
Core Footprinting	# E3730	Promega
Dual Luciferase Reporter Assay System	# E1910	Promega
QuikChange	# 200519	Stratagene
5' RACE	# 03353621001	Roche
LightShift EMSA Kit	# 20148	PIERCE
Biotin 3' Labeling Kit	# 89818	PIERCE
NE-PER Nuclear Extraction Kit	# 78833	PIERCE

# LITERATURVERZEICHNIS

- Andersson, S and Moghrabi, N (1997). "Physiology and molecular genetics of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." *Steroids* 62(1): 143-7.
- Athanikar, JN, Sanchez, HB and Osborne, TF (1997). "Promoter selective transcriptional synergy mediated by sterol regulatory element binding protein and Sp1: a critical role for the Btd domain of Sp1." *Mol Cell Biol* 17(9): 5193-200.
- Azizkhan, JC, Jensen, DE, Pierce, AJ and Wade, M (1993). "Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3(4): 229-54.
- Bachman, DL, Wolf, PA, Linn, R, Knoefel, JE, Cobb, J, Belanger, A, D'Agostino, RB and White, LR (1992). "Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study." *Neurology* 42(1): 115-9.
- Bennett, MK, Calakos, N and Scheller, RH (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." *Science* 257(5067): 255-9.
- Bishop, RW, Chambliss, KL, Hoffmann, GF, Tanaka, RD and Gibson, KM (1998). "Characterization of the mevalonate kinase 5'-untranslated region provides evidence for coordinate regulation of cholesterol biosynthesis." *Biochem Biophys Res Commun* 242(3): 518-24.
- Bogan, AA, Dallas-Yang, Q, Ruse, MD, Jr., Maeda, Y, Jiang, G, Nepomuceno, L, Scanlan, TS, Cohen, FE and Sladek, FM (2000). "Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha." *J Mol Biol* 302(4): 831-51.
- Borm, B, Requardt, RP, Herzog, V and Kirfel, G (2005). "Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization." *Exp Cell Res* 302(1): 83-95.
- Breitling, R, Krazeisen, A, Moller, G and Adamski, J (2001). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7--an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis." *Mol Cell Endocrinol* 171(1-2): 199-204.
- Brose, N, Petrenko, AG, Sudhof, TC and Jahn, R (1992). "Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface." *Science* 256(5059): 1021-5.
- Brown, MS and Goldstein, JL (1980). "Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth." *J Lipid Res* 21(5): 505-17.
- Brown, MS and Goldstein, JL (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." *Cell* 89(3): 331-40.
- Bruce, AW, Donaldson, IJ, Wood, IC, Yerbury, SA, Sadowski, MI, Chapman, M, Gottgens, B and Buckley, NJ (2004). "Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10458-63.
- Bucher, P (1990). "Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences." *J Mol Biol* 212(4): 563-78.
- Chau, YM, Crawford, PA, Woodson, KG, Polish, JA, Olson, LM and Sadovsky, Y (1997). "Role of steroidogenic-factor 1 in basal and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated regulation of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the mouse." *Biol Reprod* 57(4): 765-71.
- Chiang, C, Litingtung, Y, Lee, E, Young, KE, Corden, JL, Westphal, H and Beachy, PA (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function." *Nature* 383(6599): 407-13.

- Clyne, CD, Speed, CJ, Zhou, J and Simpson, ER (2002). "Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes." *J Biol Chem* 277(23): 20591-7.
- Cook, T, Gebelein, B and Urrutia, R (1999). "Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors." *Ann N Y Acad Sci* 880: 94-102.
- Courey, AJ, Holtzman, DA, Jackson, SP and Tjian, R (1989). "Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1." *Cell* 59(5): 827-36.
- Danik, M, Champagne, D, Petit-Turcotte, C, Beffert, U and Poirier, J (1999). "Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease." *Crit Rev Neurobiol* 13(4): 357-407.
- Darlington, GJ (1999). "Molecular mechanisms of liver development and differentiation." *Curr Opin Cell Biol* 11(6): 678-82.
- Derry, JM, Gormally, E, Means, GD, Zhao, W, Meindl, A, Kelley, RI, Boyd, Y and Herman, GE (1999). "Mutations in a delta 8-delta 7 sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata. jderry@immunex.com." *Nat Genet* 22(3): 286-90.
- Dietschy, JM and Turley, SD (2001). "Cholesterol metabolism in the brain." *Curr Opin Lipidol* 12(2): 105-12.
- Dooley, KA, Bennett, MK and Osborne, TF (1999). "A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase promoter." *J Biol Chem* 274(9): 5285-91.
- Duan, WR, Linzer, DI and Gibori, G (1996). "Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor." *J Biol Chem* 271(26): 15602-7.
- Duan, WR, Parmer, TG, Albarracin, CT, Zhong, L and Gibori, G (1997). "PRAP, a prolactin receptor associated protein: its gene expression and regulation in the corpus luteum." *Endocrinology* 138(8): 3216-21.
- Duncan, SA, Manova, K, Chen, WS, Hoodless, P, Weinstein, DC, Bachvarova, RF and Darnell, JE, Jr. (1994). "Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16): 7598-602.
- Erben, RG, Soegiarto, DW, Weber, K, Zeitz, U, Lieberherr, M, Gniadecki, R, Moller, G, Adamski, J and Balling, R (2002). "Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D." *Mol Endocrinol* 16(7): 1524-37.
- Ericson, J, Muhr, J, Placzek, M, Lints, T, Jessell, TM and Edlund, T (1995). "Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube." *Cell* 81(5): 747-56.
- Evin, G and Weidemann, A (2002). "Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides." *Peptides* 23(7): 1285-97.
- Fayard, E, Schoonjans, K, Annicotte, JS and Auwerx, J (2003). "Liver receptor homolog 1 controls the expression of carboxyl ester lipase." *J Biol Chem* 278(37): 35725-31.
- Fernandez-Chacon, R, Konigstorfer, A, Gerber, SH, Garcia, J, Matos, MF, Stevens, CF, Brose, N, Rizo, J, Rosenmund, C and Sudhof, TC (2001). "Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability." *Nature* 410(6824): 41-9.
- Fitzky, BU, Witsch-Baumgartner, M, Erdel, M, Lee, JN, Paik, YK, Glossmann, H, Utermann, G and Moebius, FF (1998). "Mutations in the Delta7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8181-6.
- Franceschini, G, Maderna, P and Sirtori, CR (1991). "Reverse cholesterol transport: physiology and pharmacology." *Atherosclerosis* 88(2-3): 99-107.

- Gachotte, D, Sen, SE, Eckstein, J, Barbuch, R, Krieger, M, Ray, BD and Bard, M (1999). "Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12655-60.
- Gallet, A, Rodriguez, R, Ruel, L and Therond, PP (2003). "Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog." *Dev Cell* 4(2): 191-204.
- Gong, JS, Sawamura, N, Zou, K, Sakai, J, Yanagisawa, K and Michikawa, M (2002). "Amyloid beta-protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade." *J Neurosci Res* 70(3): 438-46.
- GrandPre, T, Nakamura, F, Vartanian, T and Strittmatter, SM (2000). "Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein." *Nature* 403(6768): 439-44.
- Greeve, I, Hermans-Borgmeyer, I, Brellinger, C, Kasper, D, Gomez-Isla, T, Behl, C, Levkau, B and Nitsch, RM (2000). "The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress." *J Neurosci* 20(19): 7345-52.
- Gronemeyer, H, Gustafsson, JA and Laudet, V (2004). "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily." *Nat Rev Drug Discov* 3(11): 950-64.
- Gronostajski, RM, Nagata, K and Hurwitz, J (1984). "Isolation of human DNA sequences that bind to nuclear factor I, a host protein involved in adenovirus DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(13): 4013-7.
- Guan, G, Dai, P and Shechter, I (1998). "Differential transcriptional regulation of the human squalene synthase gene by sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) 1a and 2 and involvement of 5' DNA sequence elements in the regulation." *J Biol Chem* 273(20): 12526-35.
- Halder, SK, Fink, M, Waterman, MR and Rozman, D (2002). "A cAMP-responsive element binding site is essential for sterol regulation of the human lanosterol 14alpha-demethylase gene (CYP51)." *Mol Endocrinol* 16(8): 1853-63.
- Hanaka, S, Abe, T, Itakura, H and Matsumoto, A (2000). "Gene expression related to cholesterol metabolism in mouse brain during development." *Brain Dev* 22(5): 321-6.
- Happle, R, Koch, H and Lenz, W (1980). "The CHILD syndrome. Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects." *Eur J Pediatr* 134(1): 27-33.
- Hatayama, T, Takigawa, T, Takeuchi, S and Shiota, K (1997). "Characteristic expression of high molecular mass heat shock protein HSP105 during mouse embryo development." *Cell Struct Funct* 22(5): 517-25.
- Hatayama, T, Yamagishi, N, Minobe, E and Sakai, K (2001). "Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 288(3): 528-34.
- Hayhurst, GP, Lee, YH, Lambert, G, Ward, JM and Gonzalez, FJ (2001). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis." *Mol Cell Biol* 21(4): 1393-403.
- He, W, Lu, Y, Qahwash, I, Hu, XY, Chang, A and Yan, R (2004). "Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation." *Nat Med* 10(9): 959-65.
- He, XY, Merz, G, Mehta, P, Schulz, H and Yang, SY (1999). "Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. Characterization of a novel 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *J Biol Chem* 274(21): 15014-9.
- Herman, GE (2000). "X-Linked dominant disorders of cholesterol biosynthesis in man and mouse." *Biochim Biophys Acta* 1529(1-3): 357-73.
- Herz, J and Farese, RV, Jr. (1999). "The LDL receptor gene family, apolipoprotein B and cholesterol in embryonic development." *J Nutr* 129(2S Suppl): 473S-475S.

- Ho, KS and Scott, MP (2002). "Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms." *Curr Opin Neurobiol* 12(1): 57-63.
- Honda, M, Tint, GS, Honda, A, Nguyen, LB, Chen, TS and Shefer, S (1998). "7-Dehydrocholesterol down-regulates cholesterol biosynthesis in cultured Smith-Lemli-Opitz syndrome skin fibroblasts." *J Lipid Res* 39(3): 647-57.
- Horer, J, Blum, R, Feick, P, Nastainczyk, W and Schulz, I (1999). "A comparative study of rat and human Tmp21 (p23) reveals the pseudogene-like features of human Tmp21-II." *DNA Seq* 10(2): 121-6.
- Horton, JD, Goldstein, JL and Brown, MS (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." *J Clin Invest* 109(9): 1125-31.
- Horton, JD, Shah, NA, Warrington, JA, Anderson, NN, Park, SW, Brown, MS and Goldstein, JL (2003). "Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12027-32.
- Hua, X, Yokoyama, C, Wu, J, Briggs, MR, Brown, MS, Goldstein, JL and Wang, X (1993). "SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11603-7.
- Hum, DW and Miller, WL (1993). "Transcriptional regulation of human genes for steroidogenic enzymes." *Clin Chem* 39(2): 333-40.
- Hynes, M, Porter, JA, Chiang, C, Chang, D, Tessier-Lavigne, M, Beachy, PA and Rosenthal, A (1995). "Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog." *Neuron* 15(1): 35-44.
- Iivonen, S, Hiltunen, M, Alafuzoff, I, Mannermaa, A, Kerokoski, P, Puolivali, J, Salminen, A, Helisalmi, S and Soininen, H (2002). "Seladin-1 transcription is linked to neuronal degeneration in Alzheimer's disease." *Neuroscience* 113(2): 301-10.
- Inoue, J, Sato, R and Maeda, M (1998). "Multiple DNA elements for sterol regulatory element-binding protein and NF-Y are responsible for sterol-regulated transcription of the genes for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and squalene synthase." *J Biochem (Tokyo)* 123(6): 1191-8.
- Irons, M, Elias, ER, Salen, G, Tint, GS and Batta, AK (1993). "Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome." *Lancet* 341(8857): 1414.
- Jackson, SM, Ericsson, J, Mantovani, R and Edwards, PA (1998). "Synergistic activation of transcription by nuclear factor Y and sterol regulatory element binding protein." *J Lipid Res* 39(4): 767-76.
- Jimenez, P, Saner, K, Mayhew, B and Rainey, WE (2003). "GATA-6 is expressed in the human adrenal and regulates transcription of genes required for adrenal androgen biosynthesis." *Endocrinology* 144(10): 4285-8.
- Jones, FS and Meech, R (1999). "Knockout of REST/NRSF shows that the protein is a potent repressor of neuronally expressed genes in non-neural tissues." *Bioessays* 21(5): 372-6.
- Jornvall, H, Persson, B, Krook, M, Atrian, S, Gonzalez-Duarte, R, Jeffery, J and Ghosh, D (1995). "Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)." *Biochemistry* 34(18): 6003-13.
- Joyner, AL (1993). "Gene Targeting: A Practical Approach." Oxford University Press.
- Jump, DB, Thelen, AP and Mater, MK (2001). "Functional interaction between sterol regulatory element-binding protein-1c, nuclear factor Y, and 3,5,3'-triiodothyronine nuclear receptors." *J Biol Chem* 276(37): 34419-27.
- Kallberg, Y, Oppermann, U, Jornvall, H and Persson, B (2002). "Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)." *Eur J Biochem* 269(18): 4409-17.

- Kandutsch, AA and Chen, HW (1978). "Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols." *Lipids* 13(10): 704-7.
- Karin, M (1989). "Complexities of gene regulation by cAMP." *Trends Genet* 5(3): 65-7.
- Kelley, RI (2000). "Inborn errors of cholesterol biosynthesis." *Adv Pediatr* 47: 1-53.
- Khan, N, Sharma, KK, Andersson, S and Auchus, RJ (2004). "Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases types 1, 2, and 3 catalyze bi-directional equilibrium reactions, rather than unidirectional metabolism, in HEK-293 cells." *Arch Biochem Biophys* 429(1): 50-9.
- Kim, JH, Lee, JN and Paik, YK (2001). "Cholesterol biosynthesis from lanosterol. A concerted role for Sp1 and NF-Y-binding sites for sterol-mediated regulation of rat 7-dehydrocholesterol reductase gene expression." *J Biol Chem* 276(21): 18153-60.
- Kim, JW, Havelock, JC, Carr, BR and Attia, GR (2005). "The orphan nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450 enzyme in human granulosa cells." *J Clin Endocrinol Metab* 90(3): 1678-85.
- Kondo, T, Shirasawa, T, Itoyama, Y and Mori, H (1996). "Embryonic genes expressed in Alzheimer's disease brains." *Neurosci Lett* 209(3): 157-60.
- Konig, A, Happle, R, Bornholdt, D, Engel, H and Grzeschik, KH (2000). "Mutations in the NSDHL gene, encoding a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHLD syndrome." *Am J Med Genet* 90(4): 339-46.
- Koudinov, AR and Berezov, TT (2004). "Alzheimer's amyloid-beta (A beta) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64(1): 71-9.
- Krazeisen, A, Breitling, R, Imai, K, Fritz, S, Moller, G and Adamski, J (1999). "Determination of cDNA, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7(1)." *FEBS Lett* 460(2): 373-9.
- Labrie, F (1991). "Intracrinology." *Mol Cell Endocrinol* 78(3): C113-8.
- Ladias, JA and Karathanasis, SK (1991). "Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily." *Science* 251(4993): 561-5.
- Laubner, D, Breitling, R and Adamski, J (2003). "Embryonic expression of cholesterologenic genes is restricted to distinct domains and colocalizes with apoptotic regions in mice." *Brain Res Mol Brain Res* 115(1): 87-92.
- Laudet, V and Adelmant, G (1995). "Nuclear receptors. Lonesome orphans." *Curr Biol* 5(2): 124-7.
- Leenders, F, Tesdorpf, JG, Markus, M, Engel, T, Seedorf, U and Adamski, J (1996). "Porcine 80-kDa protein reveals intrinsic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, fatty acyl-CoA-hydratase/dehydrogenase, and sterol transfer activities." *J Biol Chem* 271(10): 5438-42.
- Leers-Sucheta, S, Morohashi, K, Mason, JI and Melner, MH (1997). "Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester." *J Biol Chem* 272(12): 7960-7.
- Li, L, He, S, Sun, JM and Davie, JR (2004). "Gene regulation by Sp1 and Sp3." *Biochem Cell Biol* 82(4): 460-71.
- Liu, XY, Dangel, AW, Kelley, RI, Zhao, W, Denny, P, Botcherby, M, Cattanach, B, Peters, J, Hunsicker, PR, Mallon, AM, Strivens, MA, Bate, R, Miller, W, Rhodes, M, Brown, SD and Herman, GE (1999). "The gene mutated in bare patches and striated mice encodes a novel 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *Nat Genet* 22(2): 182-7.

- Losel, RM, Falkenstein, E, Feuring, M, Schultz, A, Tillmann, HC, Rossol-Haseroth, K and Wehling, M (2003). "Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers." *Physiol Rev* 83(3): 965-1016.
- Lowe, KE, Maiyar, AC and Norman, AW (1992). "Vitamin D-mediated gene expression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2(1): 65-109.
- Lu, TT, Makishima, M, Repa, JJ, Schoonjans, K, Kerr, TA, Auwerx, J and Mangelsdorf, DJ (2000). "Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors." *Mol Cell* 6(3): 507-15.
- Luu-The, V (2001). "Analysis and characteristics of multiple types of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase." *J Steroid Biochem Mol Biol* 76(1-5): 143-51.
- Maciver, SK and Harrington, CR (1995). "Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies." *Neuroreport* 6(15): 1985-8.
- Maity, SN and de Crombrughe, B (1998). "Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription." *Trends Biochem Sci* 23(5): 174-8.
- Mantovani, R (1999). "The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y." *Gene* 239(1): 15-27.
- Marijanovic, Z, Laubner, D, Moller, G, Gege, C, Husen, B, Adamski, J and Breitling, R (2003). "Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis." *Mol Endocrinol* 17(9): 1715-25.
- Michikawa, M, Gong, JS, Fan, QW, Sawamura, N and Yanagisawa, K (2001). "A novel action of alzheimer's amyloid beta-protein (A $\beta$ ): oligomeric A $\beta$  promotes lipid release." *J Neurosci* 21(18): 7226-35.
- Mindnich, R, Moller, G and Adamski, J (2004). "The role of 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases." *Mol Cell Endocrinol* 218(1-2): 7-20.
- Misawa, K, Horiba, T, Arimura, N, Hirano, Y, Inoue, J, Emoto, N, Shimano, H, Shimizu, M and Sato, R (2003). "Sterol regulatory element-binding protein-2 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 to enhance sterol isomerase gene expression in hepatocytes." *J Biol Chem* 278(38): 36176-82.
- Montminy, MR and Bilezikjian, LM (1987). "Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene." *Nature* 328(6126): 175-8.
- Muscat, GE, Rea, S and Downes, M (1995). "Identification of a regulatory function for an orphan receptor in muscle: COUP-TF II affects the expression of the myoD gene family during myogenesis." *Nucleic Acids Res* 23(8): 1311-8.
- Natarajan, R, Ghosh, S and Grogan, WM (1998). "Molecular cloning of the promoter for rat hepatic neutral cholesterol ester hydrolase: evidence for transcriptional regulation by sterols." *Biochem Biophys Res Commun* 243(2): 349-55.
- Ngo, TT, Bennett, MK, Bourgeois, AL, Toth, JI and Osborne, TF (2002). "A role for cyclic AMP response element-binding protein (CREB) but not the highly similar ATF-2 protein in sterol regulation of the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase." *J Biol Chem* 277(37): 33901-5.
- Nitzan, YB, Sekler, I, Hershfinkel, M, Moran, A and Silverman, WF (2002). "Postnatal regulation of ZnT-1 expression in the mouse brain." *Brain Res Dev Brain Res* 137(2): 149-57.
- Nokelainen, P, Peltoketo, H, Vihko, R and Vihko, P (1998). "Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat." *Mol Endocrinol* 12(7): 1048-59.
- Noskov, V, Maki, S, Kawasaki, Y, Leem, SH, Ono, B, Araki, H, Pavlov, Y and Sugino, A (1994). "The RFC2 gene encoding a subunit of replication factor C of *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* 22(9): 1527-35.

- Nothias, JY, Majumder, S, Kaneko, KJ and DePamphilis, ML (1995). "Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development." *J Biol Chem* 270(38): 22077-80.
- Ohtani, K, Miyabara, K, Okamoto, E, Kamei, M and Matsui-Yuasa, I (1996). "Cytotoxicity of 7-ketocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E." *Biosci Biotechnol Biochem* 60(12): 1989-93.
- Oppermann, UC, Filling, C and Jornvall, H (2001). "Forms and functions of human SDR enzymes." *Chem Biol Interact* 130-132(1-3): 699-705.
- Parker, KL (1998). "The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function." *Mol Cell Endocrinol* 140(1-2): 59-63.
- Parviz, F, Matullo, C, Garrison, WD, Savatski, L, Adamson, JW, Ning, G, Kaestner, KH, Rossi, JM, Zaret, KS and Duncan, SA (2003). "Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis." *Nat Genet* 34(3): 292-6.
- Peltoketo, H, Luu-The, V, Simard, J and Adamski, J (1999). "17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes." *J Mol Endocrinol* 23(1): 1-11.
- Peltoketo, H, Nokelainen, P, Piao, YS, Vihko, R and Vihko, P (1999). "Two 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7." *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6): 431-9.
- Penning, TM (1999). "Molecular determinants of steroid recognition and catalysis in aldo-keto reductases. Lessons from 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase." *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6): 211-25.
- Pereira, FA, Qiu, Y, Tsai, MJ and Tsai, SY (1995). "Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis." *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 503-8.
- Piao, YS, Peltoketo, H, Vihko, P and Vihko, R (1997). "The proximal promoter region of the gene encoding human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contains GATA, AP-2, and Sp1 response elements: analysis of promoter function in choriocarcinoma cells." *Endocrinology* 138(8): 3417-25.
- Porter, JA, Young, KE and Beachy, PA (1996). "Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development." *Science* 274(5285): 255-9.
- Puglielli, L, Tanzi, RE and Kovacs, DM (2003). "Alzheimer's disease: the cholesterol connection." *Nat Neurosci* 6(4): 345-51.
- Quandt, K, Frech, K, Karas, H, Wingender, E and Werner, T (1995). "MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data." *Nucleic Acids Res* 23(23): 4878-84.
- Reilly, CE (2000). "Nogo-A is the inhibitor of CNS axon regeneration." *J Neurol* 247(3): 239-40.
- Rossmann, MG, Moras, D and Olsen, KW (1974). "Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein." *Nature* 250(463): 194-9.
- Saito, Y, Doi, K, Yamagishi, N, Ishihara, K and Hatayama, T (2004). "Screening of Hsp105 $\alpha$ -binding proteins using yeast and bacterial two-hybrid systems." *Biochem Biophys Res Commun* 314(2): 396-402.
- Saito, Y, Yamagishi, N, Ishihara, K and Hatayama, T (2003). "Identification of  $\alpha$ -tubulin as an hsp105 $\alpha$ -binding protein by the yeast two-hybrid system." *Exp Cell Res* 286(2): 233-40.
- Sanchez, HB, Yieh, L and Osborne, TF (1995). "Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene." *J Biol Chem* 270(3): 1161-9.

- Scherf, M, Klingenhoff, A and Werner, T (2000). "Highly specific localization of promoter regions in large genomic sequences by PromoterInspector: a novel context analysis approach." *J Mol Biol* 297(3): 599-606.
- Schertel, C (2002). "Charakterisierung der Promotorbereiche der 17beta-HSD7 von Mensch und Maus." Diplomarbeit an der Technischen Universität München.
- Seamon, KB and Daly, JW (1981). "Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems." *J Cyclic Nucleotide Res* 7(4): 201-24.
- Sewer, MB and Waterman, MR (2001). "Insights into the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes and StAR." *Rev Endocr Metab Disord* 2(3): 269-74.
- Shimano, H (2001). "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes." *Prog Lipid Res* 40(6): 439-52.
- Simons, M, Keller, P, Dichgans, J and Schulz, JB (2001). "Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link?" *Neurology* 57(6): 1089-93.
- Sinha, S and Lieberburg, I (1999). "Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11049-53.
- Sirianni, R, Seely, JB, Attia, G, Stocco, DM, Carr, BR, Pezzi, V and Rainey, WE (2002). "Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes." *J Endocrinol* 174(3): R13-7.
- Skalnik, DG, Strauss, EC and Orkin, SH (1991). "CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter." *J Biol Chem* 266(25): 16736-44.
- Sladek, FM, Zhong, WM, Lai, E and Darnell, JE, Jr. (1990). "Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily." *Genes Dev* 4(12B): 2353-65.
- Smas, CM and Sul, HS (1993). "Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation." *Cell* 73(4): 725-34.
- Smith, DW, Lemli, L and Opitz, JM (1964). "A Newly Recognized Syndrome of Multiple Congenital Anomalies." *J Pediatr* 64: 210-7.
- Srivastava, RA, Srivastava, N and Aversa, M (2000). "Dietary cholic acid lowers plasma levels of mouse and human apolipoprotein A-I primarily via a transcriptional mechanism." *Eur J Biochem* 267(13): 4272-80.
- Steckelbroeck, S, Watzka, M, Reissinger, A, Wegener-Toper, P, Bidlingmaier, F, Bliesener, N, Hans, VH, Clusmann, H, Ludwig, M, Siekmann, L and Klingmüller, D (2003). "Characterisation of estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) activity in the human brain." *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(1): 79-92.
- Superti-Furga, G, Barberis, A, Schreiber, E and Busslinger, M (1989). "The protein CDP, but not CP1, footprints on the CCAAT region of the gamma-globin gene in unfractionated B-cell extracts." *Biochim Biophys Acta* 1007(2): 237-42.
- Tansey, TR and Shechter, I (2001). "Squalene synthase: structure and regulation." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65: 157-95.
- Tint, GS, Seller, M, Hughes-Benzie, R, Batta, AK, Shefer, S, Genest, D, Irons, M, Elias, E and Salen, G (1995). "Markedly increased tissue concentrations of 7-dehydrocholesterol combined with low levels of cholesterol are characteristic of the Smith-Lemli-Opitz syndrome." *J Lipid Res* 36(1): 89-95.
- Toda, K, Nomoto, S and Shizuta, Y (1996). "Identification and characterization of transcriptional regulatory elements of the human aromatase cytochrome P450 gene (CYP19)." *J Steroid Biochem Mol Biol* 56(1-6 Spec No): 151-9.

- Torn, S, Nokelainen, P, Kurkela, R, Pulkka, A, Menjivar, M, Ghosh, S, Coca-Prados, M, Peltoketo, H, Isomaa, V and Vihko, P (2003). "Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7." *Biochem Biophys Res Commun* 305(1): 37-45.
- Turner, PR, O'Connor, K, Tate, WP and Abraham, WC (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol* 70(1): 1-32.
- Val, P, Lefrancois-Martinez, AM, Veyssiere, G and Martinez, A (2003). "SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues." *Nucl Recept* 1(1): 8.
- Wassif, CA, Maslen, C, Kachilele-Linjewile, S, Lin, D, Linck, LM, Connor, WE, Steiner, RD and Porter, FD (1998). "Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome." *Am J Hum Genet* 63(1): 55-62.
- Wassif, CA, Zhu, P, Kratz, L, Krakowiak, PA, Battaile, KP, Weight, FF, Grinberg, A, Steiner, RD, Nwokoro, NA, Kelley, RI, Stewart, RR and Porter, FD (2001). "Biochemical, phenotypic and neurophysiological characterization of a genetic mouse model of RSH/Smith--Lemli--Opitz syndrome." *Hum Mol Genet* 10(6): 555-64.
- Watt, AJ, Garrison, WD and Duncan, SA (2003). "HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function." *Hepatology* 37(6): 1249-53.
- Wickham, L, Benjannet, S, Marcinkiewicz, E, Chretien, M and Seidah, NG (2005). "Beta-amyloid protein converting enzyme 1 and brain-specific type II membrane protein BRI3: binding partners processed by furin." *J Neurochem* 92(1): 93-102.
- Willnow, TE, Hilpert, J, Armstrong, SA, Rohlmann, A, Hammer, RE, Burns, DK and Herz, J (1996). "Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8460-4.
- Woollett, LA (2001). "The origins and roles of cholesterol and fatty acids in the fetus." *Curr Opin Lipidol* 12(3): 305-12.
- Xiong, S, Chirala, SS and Wakil, SJ (2000). "Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 3948-53.
- Yan, SD, Fu, J, Soto, C, Chen, X, Zhu, H, Al-Mohanna, F, Collison, K, Zhu, A, Stern, E, Saido, T, Tohyama, M, Ogawa, S, Roher, A and Stern, D (1997). "An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Nature* 389(6652): 689-95.
- Yeagle, PL (1989). "Lipid regulation of cell membrane structure and function." *Faseb J* 3(7): 1833-42.
- Yieh, L, Sanchez, HB and Osborne, TF (1995). "Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(13): 6102-6.
- Yokoyama, C, Wang, X, Briggs, MR, Admon, A, Wu, J, Hua, X, Goldstein, JL and Brown, MS (1993). "SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene." *Cell* 75(1): 187-97.
- Yoshizawa, T, Handa, Y, Uematsu, Y, Takeda, S, Sekine, K, Yoshihara, Y, Kawakami, T, Arioka, K, Sato, H, Uchiyama, Y, Masushige, S, Fukamizu, A, Matsumoto, T and Kato, S (1997). "Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning." *Nat Genet* 16(4): 391-6.
- Yue, Y, Chen, ZY, Gale, NW, Blair-Flynn, J, Hu, TJ, Yue, X, Cooper, M, Crockett, DP, Yancopoulos, GD, Tessarollo, L and Zhou, R (2002). "Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10777-82.
- Zannis, VI, Kan, HY, Kritis, A, Zanni, E and Kardassis, D (2001). "Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes." *Front Biosci* 6: D456-504.
- Zhou, D, Zhou, C and Chen, S (1997). "Gene regulation studies of aromatase expression in breast cancer and adipose stromal cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* 61(3-6): 273-80.

# ANHANG

## 1. Primer

### a. Primer für die Sequenzierung der *mhsd17b7*

Orientierung	Interne Nummer	Position	Sequenz (5' → 3')
for	38600	5'UTR	ACTACACTGCTCTACTCATGCCAAGCC
rev	34339	5'UTR	GAAAGCAACATCAGGAGTTTGCCTG
for	38597	5'UTR	CAGGCAAACCTCCTGATGTTGCTTTC
rev	38599	5'UTR	AACCCTGGAGTTCAGAAGTGGCAGC
for	33869	5'UTR	CTCTGGTTTCATTCCACATTCAGAGC
rev	32480	Exon 1	GTGATCAAACCACCTTCCGCATC
for	32481	Exon 1	CGGTGCAGTTCTACTTCGGTGCAG
rev	33620	Intron 1	CTGCCAGGCTGACCAGTCACTG
for	33711	Intron 1	AGCCTGGCAGTGATGCTGAACAG
for	34102	Intron 1	TGAATAGGCCGGTACCTGCTTGG
rev	33420	Intron 1	AATGACACAGTGAGTGAGTTTGGAGC
rev	32483	Exon 2	CCAAACACAGGTGGAGGTCATCG
for	32482	Exon 2	CAGCATCGTGCAGATGGATGTCAG
for	33618	Intron 2	CATAGTGATGACATTCGAGCCCTGAG
rev	32485	Exon 3	GAATTGTGGATTAGGCAGGATTCCAGC
for	32484	Exon 3	ATCCTGCCTAATCCACAATTCAACCTC
rev	32886	Intron 3	ATTCTAAGAGCATCAAACACATTAACAGACTG
rev	32496	Exon 4	GCAGTGACCGAGTCATTCTGGGTC
for	32486	Exon 4	GACCCAGAATGACTCGGTCACTGC
for	33870	Intron 4	GCATGGAGGAGGTAGATTGGCAGAC
for	34096	Intron 4	CTTAATTAGACCCCAATGAGGCCTAGG
for	34272	Intron 4	GGTTGCCATAGATGAACTTGGGTACC
for	34427	Intron 4	TCTACCCAGGGCTACAGTGTGAGGAG
rev	33422	Intron 4	GAAGGGGTACAGACATAACGGTTTCG
rev	34276	Intron 4	TAGAGCGCATCTAATTACCATCCTATGTC
rev	32488	Exon 5	CGAGAGGACGTCCAGATGAGCTG
for	32487	Exon 5	GCTCTTCCAAATATGCTACCGACCTC
for	33419	Intron 5	CATGTAICTCAGCCTTACACCTCCCAG
for	34277	Intron 5	GAGAGTCCAACTTGCCATTCCCTG
rev	32490	Exon 6	CACATTATGGGTAGGAGCAACGTCC
for	32489	Exon 6	CGTCGTGATGACCAATATGACGTATG
for	32491	Exon 7	GTAATGCGCTCACTGTGACACCGTAC

for	33416	Intron 7	AGAACCATTGCTCCGTGAACAAGC
rev	34271	Intron 7	TCTGACAAGGAAGCCTTCACATTCTG
rev	33871	Intron 7	TAACACTTGACTACCCGCCAGAGAGTC
for	34617	Intron 7	ATGTTTGGTGCAGAGCTGTGATGG
rev	33714	Intron 7	CTCTTAAACGGGGCTATGCATGG
rev	33614	Intron 8	CCTGCTCCACAGTAGACTTTGAGAGC
for	33615	Intron 8	GTCTACTGTGGAGCAGGCTGATTTACAG
rev	32494	Exon 8	CTTTTGGCCCGTGACGTAATTAGTC
for	32493	Exon 8	AAACCGGAGTCTCTTAATCCTCTGACC
for	34103	Intron 8	CCAGGCATCTTCTTTCTGCTAAGCC
for	34270	Intron 8	GAATCGCACAGAGGTGGGGTAGAG
for	33423	Intron 8	CATTTAATGTCTTCCCCACTGCAGC

b. Primer für Herstellung und Überprüfung der *Knock-out*-Vektoren sowie die Genotypisierung

Name	Interne Nummer	Sequenz (5' → 3')
5UTR-hind-for	35398	CCACATTCAAAGCTTGAAATTGCTAACTG
5UTR-hpa-for	35394	AAGAAGTTAACTTGGACTTGGGTTCTCTGC
Ex5-Sal-rev	35399	CTTCTGGTCGACATTCTGTTCAAAGCC
Ex3-lox-sac-for	37673	TGACCCGCGGATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGT TATGCGGCATCTTTTCAAGGTAATTTCC
Ex2-hind-rev	35395	CAAAGGGCAAGCTTAATGCCACTGG
Ex2-sal-rev	36071	CAGTCGACCGCAAAGGGCTAG
LoxP-KA-for	37675	CCTTCCAGTGGCATTAAAGATAACTTCGTATAGCATACATTA TACGAAGTTATCTTTCTAGGGTACCTCTAGC
LoxP-KA-rev	37676	GCTAGAGGTACCCTAGAAAGATAACTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTATCTTAATGCCACTGGAAGG
LacZ-loxP-Bam	38357	GCGTAGGATCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG TTATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGG
GFP-Nhe-for	37942	ATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTCTTC
TestKA-for	36535	GAGGGGAACAACCTGGATGTTGC
TestKA-rev	36536	TAGCCTGAACCTTGATCCGTGAC
TestLA-rev	36537	TGGTTCTCATCCTTCCCAATGC
TestLA-for	36538	TCCTTGCTACCATATCCCCTATGAG
TestTK-for	36539	CAGACCCATGGTTTTTGGATGG
TestNEO-rev	36540	CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC
TestNEO-for	36541	TCCTGACTAGGGGAGGAGTAGAAGG
TestAMP-rev	36542	TCCAGTTCGATGTAACCCACTCG

TestGFP-rev	37460	AGCACGTGTCTTGTAGTTGCCGTC
TestLACZ-for	37461	CCGATTTGGCTACATGACATCAACC
5'Sonde-rev	46465	GAATGCGTACTGTCATCTCCTTCAGACC
5'Sonde-for	46466	GCAGACTCCTGATGTTGCTTTCATGC
3'Sonde-for	46467	GCCACTGACTGTATCTACTCTTCTGTCTGC
3'Sonde-rev	46468	CCTTGCTGCTTAGTAGGACCATGTAAGTC

c. Primer für Y2H; Insertgrößenbestimmung und Sequenzierung

Name	Interne Nummer	Sequenz (5' → 3')
Y2H-fullfor	47871	CGTGAATTCATGCGGAAGGTGGTTTTGATCACC
Y2H-FULLrev	47872	AGAGGATCCTCAGCTCGGGTGATCCG
Y2H-kurzrev	47874	GCAAGGATCCATACGTCATATTGGTCATCACGACG

d. Primer für 5'RACE

Human SP1	CAAACACCTCCTGAAGTCCATCAGC
Human SP2	GAAACCTTTGCTTAAGTTCCTTGGAGG
Murin SP1	CGAGAGGACGTCCAGATGAGCTG
Murin SP2	CCAAACACAGGTGGAGGTCATCG

e. Primer für die Sequenzierung der Promotortestvektoren

pGL3-Basic for	GTGTGAATCGATAGTACTAACATACGCTCTCC
pGL3-Basic rev	CTTCATAGCCTTATGCAGTTGCTCTCC

f. Primer für die Herstellung der Promotorfragmente

Name und Orientierung	Fragmente	Sequenz (5' → 3')
H1 rev	H1,3-11	GATCAAGCTTCTTCCAAGCAGTGAAGCAAACGC
H1 for	H1,2	CAGTCTCGAGGTAACAAAGGAATGAAGCTGCG
H2 rev	H2	AGAGAAAGCTTCCAACCTTCTAAAGCTAAACCAGAAGG
H3 for	H3	GATCCTCGAGAATACAAGGGCAATCACCCAG
H4 for	H4	GATCCTCGAGAGCCCATCAAGAATTTTGCCTAGGC
H5 for	H5	GATCCTCGAGTAAGCTTCTTTAGAGGAGGAGGTCTGG

H6 for	H6,12,13,14	GATCCTCGAGCTTCTGCAAAGAAGTGCCAATCTC
H7 for	H7	CAGTCTCGAGCCCACCAGGATTAAGATCAGGC
H8 for	H8	CTAGCTCGAGCGAGAAGAGCCTGGAATGG
H9 for	H9	GATCCTCGAGCTATCTACCCGACGCCGTCTC
H10 for	H10	GATCCTCGAGATTGGAGGGATCAGCTCAGACTC
H11 for	H11	GATCCTCGAGGTACTCTGATTGGTGACGGGTGAGG
H12 rev	H12	GATCAAGCTTCCACCGCTGCTTTCGGAAGTCC
H13 rev	H13	GATCAAGCTTCCCGTCACCAATCAGAGTACGGC
H14 rev	H14	ATATAAGCTTGCTGATCCCTCCAATCTCAGTCC
M1 rev	M1,3-9	GATCAAGCTTGTTCTCTTAGCCTGAACCTTGATCCG
M1 for	M1,2	ATATTCTCGAGCTGCTCTACTCATGCCAAGGC
M2 rev	M2	GAGAAAGCTTGCTGTAATTACTAGGGATAGCCGTGATCC
M3 for	M3	ATGCCTCGAGGGATCACGGCTATCCTAGTAATTACAGC
M4 for	M4	GAATTCTCGAGGTTCTGCACCGAAGCCTCTCC
M5 for	M5	GATCCTCGAGAAGCTCATTACAGCGACCTGAGAGG
M6 for	M6,10,11	CTCTCTCGAGCGCTTGCTTCACTCAGAACAAGC
M7 for	M7	AACCCTCGAGCTATCTACCTCACCCGGTCTG
M8 for	M8	GATCCTCGAGAAGATGCCGAGTCGCGATTG
M9 for	M9	GAATCTCGAGCCTTGATTGGTCGAGGTGC
M10 rev	M10	GATCAAGCTTGGTTCTCTTAGCCTGAACCTTGATCC
M11 rev	M11	GATCAAGCTTCAATCAAGGCTCGGCCCGG

#### g. Primer für Bindungsstellenmutagenese

Die jeweils mutierten Basen sind fett und kursiv dargestellt. Die jeweiligen komplementären Oligos (3'-5'-Richtung) sind nicht aufgeführt (H: Human; M: Murin).

Bindungsstelle	Sequenz (5' → 3')
H FXRE	GCCAATCTCAGGCGCCAGAGATCAGACCCAGTGCGTGTC
H SREBP	CCTCGGCCTATCTC <b>GA</b> ACCAGGCCGTCTCCG
H SP1a	CGTCACGCAGCTCAG <b>G</b> ACCTCGGCCTATCTCAC
H SP1b	CGATGACGCAACGGGAT <b>TT</b> CGGGGCGTGGCCGTA <b>CT</b> C
H NF-Ya	GGTTGGCGGACTGAGAG <b>GG</b> AGAGGGATCAGCTCAGAC
H NF-Yb	GCCGTA <b>CT</b> CTGATT <b>ACT</b> GACGGGTGAGGCG
H HNF4	CCCCACCAGGATTA <b>ACTACA</b> AGGCGCCCGCTGAGC
H CREBP <sub>a</sub>	CCGGGCTTTGCGT <b>G</b> TCGCAGCTCCGCCC
H CREBP <sub>b</sub>	GGATCAGCTCAGACTCGAG <b>T</b> ACGCAACG GGAGGC
H VDR	CAGCTCCGCCCTC <b>AGT</b> GTATCTCACCCGACGCC
M SREBP	CCCCTCGGCCTATCT <b>TGCCTA</b> TCCCGGTCTGGG

M SP1	CTTGTGTCACGTGGCTC <b>AGG</b> ACCTCGGCCTATCTCAC
M NF-Ya	GATGCCGAGTCGCGA <b>GGAG</b> CGGGCCTAACGCG
M NF-Yb	GGCCGAGCCTTGA <b>ATGAT</b> CGAGGTGCGCG
M HNF4	GCTTGCTTCACTCAGAACA <b>CTCC</b> GCCGCCGAGACTGG
M CREBP	GCGCGGACCGG <b>ACC</b> ACGCAGGAGAGG
M VDR	GCCCTCGG <b>TG</b> TATCTCACATCACCCGGTCTGG

## 2. Oligos für Gelshifts

Aufgeführt sind die verwendeten Wildtyp-Fragmente. Die jeweiligen komplementären Oligos (3'-5'-Richtung) sind nicht aufgeführt (H: Human; M: Murin). Mutierte Fragmente entsprechen den Oligos der Bindungsstellenmutagenese.

Bindungsstelle	Sequenz (5' → 3')
H SREBP	GCCTATCTCACCCGACGCCGTC
H SP1a	CACGCAGCTCCGCCCTCGGCCTATC
H SP1b	GCAACGGGAGGCGGGGCGTGGCCGTA
H NF-Ya	TGGCGGACTGAGATTGGAGGGATCAG
H NF-Yb	CCGTACTCTGATTGGTGACGGG
H HNF4	ACCAGGATTAAGATCAGGCGC
H VDR	CCCTCGGCCTATCTCACCCGAC
H SREBP-SP1a	TCACGCAGCTCCGCCCTCGGCCTATCTCACCCGACGCCGCTCTC
M SREBP	CCTATCTCACCTCACCCGGTCT
M SP1	CACGTGGCTCCGCCCTCGGCCTATC
M NF-Ya	CGAGTCGCGATTGGCGGGCCTAACG
M NF-Yb	CCGAGCCTTGATTGGTCGAGGTG
M HNF4	CACTCAGAACAAGCCCCCGCCG
M VDR	CCCTCGGCCTATCTCACCTCA
M SREBP-SP1	TCACGTGGCTCCGCCCTCGGCCTATCTCACCTCACCCGGTCT

## PUBLIKATIONEN

Breitling, R, Gerber, JK, Graedler, F, Gloeckner, JC, Krazeisen, A, Laubner, D, Ohnesorg, T, Marijanovic, Z, Mindnich, R, Moeller, G, Perovic, D, Voelkl, A and Adamski J (2001). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenases – tackling them from all directions." Posterpräsentation, 11<sup>th</sup> International Congress on Genes, Gene Families and Isozymes, Stockholm, Sweden.

Ohnesorg, T and Adamski, J (2004). "Promotor analyses of human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7." Posterpräsentation, 16<sup>th</sup> International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, Seefeld, Austria.

Ohnesorg, T and Adamski, J (2005). „Promotor analyses of human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7.“ Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Im Druck.

# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken die direkt oder indirekt an dem Gelingen meiner Doktorarbeit beteiligt waren.

Ganz besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jurek Adamski, für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Seine positive Einstellung und Diskussionsbereitschaft ermöglichte es mir, meine Ideen zu verwirklichen und gaben mir großen wissenschaftlichen Freiraum.

Desweiteren möchte mich ich bei Dr. Gabriele Möller für ihre stete Unterstützung und das kritische Lesen meiner Doktorarbeit bedanken.

Großen Dank möchte ich der gesamten JAG aussprechen, für ein äußerst angenehmes Arbeitsklima und viele wertvolle Ratschläge. Besonders möchte ich hierbei Frau Gabriele Zieglmeier nennen, ohne deren stets freundliche und hilfsbereite Art vieles im Laboralltag viel trister wäre und Frau Dr. Rebekka Mindnich, der ich für viele hilfreiche (und manchmal auch hoffnungslose ☺) Diskussionen aller Art herzlich danke.

Frau Brigitte Keller möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft danken, vor allem während der ersten beiden Jahre meiner Arbeit am GAC und für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei Frau Susanne Bourier möchte ich mich für die Einführung in die Geheimnisse der Kultivierung embryonaler Stammzellen und die Bereitstellung der Feederzellen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön auch an die Mitarbeiter des IDGs für Blastozysten-Injektionen und Embryonen-Transfers und an die Tierpfleger, die meine Mäuse hervorragend versorgt haben.

Bei meinen Verwandten und Freunden, die in letzter Zeit leider viel zu kurz gekommen sind möchte ich mich ebenso bedanken wie bei Herzog Rudolf für seine richtige und weitsichtige Entscheidung vor langer Zeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, dafür dass sie immer an mich geglaubt haben und mich mit allen Kräften unterstützt haben.