

1 Einleitung

1.1 Identifizierung und Charakterisierung der *Hspa4l* cDNA

Das INSL3 Hormon gehört zur Familie der insulinähnlichen Hormone und wird ausschließlich in den Leydigzellen des Testis und in den Thekazellen des Ovars gebildet. Die „Deletion“ des *Ins13* Gens bei männlichen Mäusen führt zum Fehlen der scrotalen Strukturen und zur Lokalisation beider Testes im Abdomen. Die abdominale Lage der Testes in *Ins13* defizienten Mäusen ist auf die ausbleibende Entwicklung des Gubernakulums während der embryonalen Entwicklung zurückzuführen (Zimmermann *et al.*, 1999).

In unserer Gruppe wurde die Regulation des *Ins13* Gens untersucht. Durch Promotor-Analysen konnte die Promotorregion des murinen *Ins13* Gens auf ein 160 bp Fragment „upstream“ des Startcodons eingegrenzt werden. Dieses Fragment reicht für eine spezifische Expression in Leydigzellen aus (Thamm, 2002).

Durch den Vergleich der Sequenzen der *Ins13* Gene von Maus, Mensch und Schwein konnten innerhalb der 5'-untranslatierten Region zwei hoch konservierte Sequenzabschnitte (Box M1 und Box M2) identifiziert werden (Zimmermann *et al.*, 1997). Der Box M1-Sequenzbereich wurde als Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SF-1 („steroidogener Faktor 1“) identifiziert. Darüber hinaus konnten zwei weitere Bindungsstellen für den Faktor SF-1 im Promotorbereich lokalisiert werden (Abb. 1). Diese Sequenzelemente (SF-1/1, SF-1/2 und SF-1/3) wurden zusätzlich als *cis*-ständige Elemente nachgewiesen, an denen der Transkriptionsfaktor SF-1 bindet (Zimmermann *et al.*, 1998).

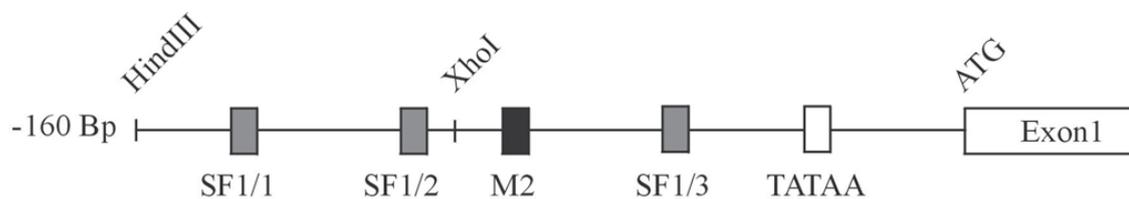


Abb. 1: Darstellung der *cis*-agierenden Elemente innerhalb der 160 Bp Promotorregion des murinen *Ins13* Gens.

An die grau unterlegten Sequenzen bindet der Transkriptionsfaktor SF-1. Schwarz unterlegt ist der Sequenzabschnitt M2 und weiß unterlegt ist die TATA-Box. Positionen der *cis*-ständigen Elemente: SF-1/1 (-145 bis -138), SF-1/2 (-115 bis -108), SF-1/3 (-65 bis -57) und M2 (-100 bis -87). Es sind ferner angegeben: TATA-Box (-36 bis -32), GC-Box (-53 bis -48) und der Transkriptionsstartpunkt ATG.

Im Rahmen seiner Doktorarbeit von 2002 suchte Thamm nach dem Transkriptionsfaktor, der an die Sequenz der Box M2 des *Ins13* Gens bindet. Unter Anwendung des „One-Hybrid-Systems“ konnte ein 972 bp großes cDNA-Fragment isoliert und charakterisiert werden, das für ein Protein kodiert, welches an die M2-Box bindet. Die Sequenz des isolierten cDNA-Fragments war 100 %-ig homolog zu der Nukleotidsequenz der murinen *Hspa4l* cDNA (Thamm, 2002). Außerdem konnte die Bindungsspezifität des murinen HSPA4L Fusionsproteins an die M2-Box durch ein „Gel-Retardation-Assay“ nachgewiesen werden. Dabei wurde an Kernproteinen verschiedener Zelllinien und somatischen Geweben gezeigt, dass die HSPA4L Fusionsproteine an die M2-Box binden und DNA/Protein-Komplexe bilden (Thamm, Diplomarbeit 1998).

Unter Verwendung einer *Hspa4l*-cDNA-Sonde konnte an RNA aus verschiedenen Organen adulter Mäuse ein 3,5 kb Transkript in Testis, Gehirn, Ovar und Niere nachgewiesen werden. Es wurde zudem ein testisspezifisches 3,0 kb Transkript detektiert (Held, 2003). Die erste veröffentlichte *Hspa4l* cDNA Sequenz entspricht der Länge des 3,0 kb Transkripts und enthält im 3'-untranslatierten Bereich das modifizierte Polyadenylierungssignal AATATA (Kaneko *et al.*, 1997b). Die *Hspa4l* cDNA-Sequenz konnte später vervollständigt werden (Held, 2003). Im Rahmen einer EST-Datenbankrecherche wurden zwei EST-Klone (Zugangsnummer BU662753 u. BU846521) identifiziert, die im 3'-Bereich mit der *Hspa4l* cDNA identisch sind und eine weiterführende Sequenz zeigen (Held, 2003). In der 3'-Region der identifizierten EST-Klone befindet sich ein weiteres Poly(A)-Signal (AATAAA), das vom ersten modifizierten Poly(A)-Signal 639 bp entfernt ist. Die Entfernung zwischen den beiden Poly(A)-Signalen in der vollständigen *Hspa4l* cDNA-Sequenz korreliert annähernd mit der Größendifferenz der beiden 3,5 kb und 3,0 kb großen Transkripte. Es wurde eine cDNA-Sonde generiert, die die Sequenz zwischen den beiden Poly(A)-Signalen beinhaltet und für eine Northern Blot-Analyse mit Testis-RNA eingesetzt wurde. Dabei wurde ausschließlich das größere 3,5 kb Transkript detektiert, was darauf schließen lässt, dass das kürzere Transkript durch alternatives „Splicing“ der 3'-UTR entsteht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden *Hspa4l* Transkripte durch die Benutzung verschiedener Poly(A)-Signale entstehen (Held, 2003).

Zusätzliche Expressionsanalysen an Testis-RNA verschiedener Mausmutanten, bei denen die Spermatogenese in unterschiedlichen Stadien arretiert ist, ergaben, dass das größere 3,5 kb Transkript auch in den somatischen Zellen (Sertoli- u. Leydigzellen) nachweisbar ist (Held, 2003). Eine für das 3,5 kb Transkript verstärkte Expression in Testes von *Ins13* defizienten bzw. in kryptorchiden Testes deutete auf eine

temperatursensitive Regulation der *Ins13* Expression hin (Held, 2003). Aufgrund des abdominalen Kryptorchismus ist in diesen Mäusen die Umgebungstemperatur der Testes höher als im Skrotum. Außerdem korreliert die Abnahme der Expression des 3,5 kb Transkripts mit dem Temperaturfall während des *Descensus testis*. Weitere Expressionsanalysen an RNA verschiedener postnataler Testisstadien zeigten für das 3,0 kb Transkript eine ansteigende Expression, während das 3,5 kb Transkript ein reziprokes Expressionsmuster aufwies (Held, 2003). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression des 3,0 kb Transkripts in der Spermatogenese induziert wird, während die Expression des 3,5 kb Transkripts temperatursensitiv reguliert wird (Held, 2003). Diese Temperatursensitivität der *Hspa4l* Transkription wurde näheren Untersuchungen unterzogen, die ergaben, dass es zu einer Erhöhung der Expression des *Hspa4l* Transkripts bei einer Temperaturzunahme von 32 °C auf 39 °C sowohl in nicht testikulären NIH 3T3-Fibroblasten als auch in kultivierten Sertolizellen (TAMA26) kommt (Kaneko *et al.*, 1997c). Die Expressionsstärke wird durch Bindung des Transkriptionsfaktors Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) an das Hitzeschockelement (HSE) in der 5'-Region des *Hspa4l* Gens reguliert. Dabei nimmt die Bindeaktivität des HSF1 mit Erhöhung der Temperatur zu (Kaneko *et al.*, 1997c), wobei nicht nur Hitzeschock, sondern auch hyperosmotisches NaCl zu einer erhöhten Expression führt. Dies wurde durch Expressionsanalysen des *Hspa4l* in Testes, in Zellen der Nierenmarksammelkanälchen (mIMCD3) und in Nieren von Mäusen bei Wasserentzug nachgewiesen (Kojima *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1997c). Die Induktion der *Hspa4l* Genexpression stimmt mit der Beobachtung überein, dass die 5'-flankierende Region des *Hspa4l* funktionelle Tonizitäts- (TonE-) bzw. Hitzeschock-Elemente hat, die unabhängig auf die Hypertonie bzw. Hitzestress reagieren (Kojima *et al.*, 2004).

Das HSPA4L Protein gehört zur Familie der Hitzeschockproteine (HSP) HSP110. Die Funktion der HSPs ist vielfältig, vorwiegend sind sie aber an der Faltung von Proteinen beteiligt. In der Literatur gibt es bisher keine Untersuchungen, die zeigen, dass HSPs als Transkriptionsfaktoren wirken, indem sie an die DNA binden und die Genexpression regulieren.

Dennoch konnte Thamm (2002) die Bindungsspezifität des *Hspa4l* Fusionsproteins an das M2 Element vom *Ins13* Gen nachweisen. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass das HSPA4L Protein an der Regulation des *Ins13* Gens beteiligt ist. Während die *Ins13* Expression im Testis von drei Wochen alten Mäusen signifikant ansteigt, nimmt die Expression des 3,5 kb *Hspa4l* Transkripts ab. In diesem Zusammenhang kann HSPA4L als interagierender Faktor mit der M2 Box des *Ins13* Gens somit nur als Repressor wirken. In *Hspa4l* defizienten Mäusen kann folglich kein HSPA4L Protein an

die M2 Box in der Promotorregion des *Ins13* Gens binden. Die Repression des *Ins13* Gens würde entfallen, und es käme zu einer Expression von *Ins13*. Während der männliche Phänotyp möglicherweise keine Auffälligkeiten zeigt, dürfte der zu erwartende weibliche Phänotyp dem der weiblichen transgenen *Ins13* Mäuse entsprechen (Adham *et al.*, 2002). Die ektopische Expression des *Ins13* Gens in weiblichen transgenen Embryonen führt zur Entwicklung des Gubernaculums (Thamm, 2002). Phänotypische Analysen der transgenen Weibchen zeigten, dass die Ovarien cranial zur Harnblase lokalisiert sind und durch das „cranial suspensory ligament“ (CSL) und das Gubernaculum mit der Bauchdecke verbunden sind (Thamm, 2002). Der Descensus der Ovarien in die Inguinalregion wird in transgenen Weibchen durch den V-förmigen Uterus behindert.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit eine *Hspa4l* defiziente Maus generiert und die Funktion des *Hspa4l* Gens näher untersucht werden.