

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

Charakterisierung der Regulation und Funktion von PPAR β

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt



von

Tanja Fauti
aus Bad Dürkheim

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Phillips-Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Rolf Müller

Korreferent: Prof. Dr.

für Christoph

*A truth can become widely accepted only, if someone is willing to believe it,
before it is widely accepted.*

Drew McDermott

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	TUMORIGENESE	2
2.2	SIGNALTRANSDUKTION	2
2.2.1	Zellzyklus	3
2.2.2	Apoptose	4
2.2.3	Angiogenese	4
2.3	KERNREZEPTOREN	6
2.3.1	Aufbau	6
2.3.2	Bindung an die DNA: „hormone response elements“	6
2.3.3	Regulation der Transkription	7
2.3.4	Liganden	8
2.3.5	Kofaktoren	9
2.4	„ORPHAN“-REZEPTOREN	10
2.5	„PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS“	10
2.5.1	Regulation der Transkription	12
2.5.1.1	DNA-Bindung	12
2.5.1.2	Liganden und Kofaktoren	13
2.5.1.3	Post-translationale Modifizierung	14
2.5.2	Expression und biologische Funktion	15
2.6	PPAR β	17
2.6.1	Biologische Rolle	17
2.6.1.1	Wundheilung	17
2.6.1.2	Reverser Cholesterol-Transport	18
2.6.1.3	Lipidmetabolismus und Insulinresistenz	19
2.6.1.4	Implantierung des Embryos in die Plazenta	19
2.6.1.5	Zellproliferation von Prä-Adipozyten	19
2.6.1.6	Reifung von Oligodendrozyten	20
2.6.1.7	Tumorentwicklung	20
2.7	CYCLOOXYGENASEN	21
2.8	LIPOXYGENASEN	22
2.9	RAS-RAF-ERK-KASKADE	23
2.10	ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	GERÄTE	25
3.2	CHEMIKALIEN UND ALLGEMEINE LÖSUNGEN	28
3.2.1	Allgemeines	29

3.2.2	Bakterienkultur	29
3.3	KITS.....	29
3.4	ANTIKÖRPER	30
3.5	SIRNA	30
3.6	COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN	30
3.7	ZELLKULTURMEDIEN UND -LÖSUNGEN	31
3.8	METHODEN	31
3.8.1	Molekularbiologische und biochemische Methoden	31
3.8.1.1	Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Bakterienstämme.....	31
3.8.1.2	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	31
3.8.1.3	Transformation von <i>E. coli</i>	32
3.8.1.4	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	32
3.8.1.5	Plasmidisolierung (Mini-Präparation)	32
3.8.1.6	Quantitative Plasmidisolierung.....	33
3.8.1.7	Quantifizierung von Plasmid-DNA.....	33
3.8.1.8	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	34
3.8.1.9	Analyse von DNA durch Agarosegelelektrophorese.....	34
3.8.1.10	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	35
3.8.1.11	Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.8.1.12	TOPO-TA-Klonierung.....	35
3.8.1.13	Klonierungsstrategien	36
3.8.1.14	DNA-Sequenzierung.....	37
3.8.1.15	Proteinextraktion aus dem Zytoplasma	37
3.8.1.16	Proteinextraktion aus dem Zellkern	38
3.8.1.17	Quantifizierung von Proteinen.....	39
3.8.1.18	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.8.1.19	Western-Transfer (Kyhse-Andersen, 1984).....	41
3.8.1.20	Immunoblot	41
3.8.1.21	RNA-Isolierung.....	42
3.8.1.22	Quantifizierung von RNA	42
3.8.1.23	Northern Blot (modifiziert nach Lei <i>et al.</i> , 2001)	42
3.8.1.23.1	RNA-Transfer.....	44
3.8.1.23.2	Sondenmarkierung	44
3.8.1.23.3	Hybridisierung und Analyse.....	45
3.8.1.24	Microarray	45
3.8.1.24.1	Vorbereitung der „slides“	46
3.8.1.24.2	Probenvorbereitung und Markierung.....	46
3.8.1.25	PCR.....	47
3.8.1.25.1	Oligonukleotide.....	48

3.8.1.25.2	RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)	55
3.8.1.25.3	Q-PCR ("Real-time PCR")	56
3.8.2	Zellbiologische Methoden.....	58
3.8.2.1	Verwendete Zellen und Kulturbedingungen	58
3.8.2.2	Präparation primärer humaner Nabelendothelzellen	60
3.8.2.3	Passagieren, Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	61
3.8.2.4	Transfektion.....	61
3.8.2.4.1	Verwendete Plasmide.....	62
3.8.2.4.2	Transiente Transfektionen.....	62
3.8.2.4.2.1	<i>Kultivierung der Zellen</i>	62
3.8.2.4.2.2	<i>Superfect</i>	63
3.8.2.4.2.3	<i>PEI (Polyethylenimin)</i>	63
3.8.2.4.2.4	<i>DEAE-DEXTRAN</i>	64
3.8.2.4.2.5	<i>RNAiFECT (Transfektion von siRNA)</i>	65
3.8.2.4.3	Stabile Transfektion	66
3.8.2.4.3.1	<i>Kultivierung der Zellen</i>	66
3.8.2.4.3.2	<i>Die Kalziumchlorid-Methode</i>	66
3.8.2.5	Reportergen-Assay	67
3.8.2.5.1	tkPPRE-System.....	68
3.8.2.5.2	Gal4-System	69
3.8.2.5.3	LexA-System	69
3.8.2.6	Prostaglandinkonzentration in Zellüberständen.....	69
3.8.2.7	Tet-OFF System	70
3.9	TIEREXPERIMENTE.....	71
4	ERGEBNISSE	72
4.1	ANALYSE DER EXPRESSION UND REGULATION VON PPAR β	72
4.1.1	Einfluss von Raf	72
4.1.1.1	Induktion der Prostaglandinsynthese	73
4.1.1.2	Induktion von Enzymen des Prostaglandinsynthese-Wegs	76
4.1.1.3	Induktion von PPAR β	78
4.1.2	Einfluss von PGI $_2$ auf PPAR β	81
4.1.2.1	Agonistischer Effekt von AA	81
4.1.2.2	Überexpression von Cox-2 und PGIS	85
4.1.3	Der LOX-Signalweg.....	87
4.1.4	Einfluss von PGE $_2$ auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β	89
4.1.5	Einfluss von PPAR γ auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β	90
4.2	IDENTIFIZIERUNG VON ZIELGENEN FÜR PPAR β	93
4.2.1	Genexpressionsanalyse mittels siRNA-Technologie und Microarray	93
4.2.2	Validierung der Microarray-Daten	95

4.2.2.1	siRNA-Technologie	95
4.2.2.2	Vergleich von Wildtyp- und PPAR β ^{-/-} -Zelllinien	97
4.2.2.3	Aktivierung von PPAR β durch GW501516 in HUVEC	100
4.2.2.4	Tetrazyklin-induzierbares PPAR β	101
4.2.2.5	In vivo Studien	104
4.2.3	Literatur-basierte Analyse	105
5	DISKUSSION.....	106
5.1.1	Raf-regulierte Enzyme der Prostaglandinsynthese.....	106
5.1.2	Prostazyklin übt keinen signifikanten Einfluss bezüglich der Regulation	107
5.1.3	Arachidonsäure besitzt einen agonistischen Effekt auf PPAR β	109
5.1.4	Die Suchen nach dem wahren Liganden von PPAR β	111
5.1.5	Biologische Relevanz	112
5.1.5.1	Prostazyklin	112
5.1.5.2	PPAR β und die Implantierung des Embryos in die Plazenta	112
5.1.5.3	PPAR β und der Lipidstoffwechsel.....	113
5.1.5.3.1	PDK4	114
5.1.5.4	PPAR β und Onkogenese	115
5.1.5.5	PPAR β und Angiogenese.....	117
5.1.5.5.1	PPAR β und PGE ₂	117
5.1.5.5.2	Angiogene Zielgene von PPAR β	118
5.1.5.5.2.1	CXCR-4 („chemokine C-X-C motif receptor 4“).....	119
5.1.5.5.2.2	EGR-1.....	122
5.1.5.5.2.3	Angiopoietin-1 (Ang-1)	123
5.1.5.6	Antagonismus von PPAR β und PPAR γ	123
5.1.5.6.1	PPAR β und Artherosklerose.....	124
5.1.6	Ausblick	125
6	LITERATURVERZEICHNIS	127
7	ANHANG	147
7.1	ABKÜRZUNGEN.....	147
7.2	LEBENS LAUF	149
7.3	AKADEMISCHE LEHRER.....	151
7.4	DANKSAGUNGEN	152
7.5	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	154

1 Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen kristallisierte sich in den letzten Jahren eine Gruppe von Kernrezeptoren heraus, die zunehmend mit Prozessen, wie dem Zellzyklus, der Apoptose oder der Angiogenese in Verbindung gebracht wurde (Cutler *et al.*, 2003; Di-Poi *et al.*, 2002; Elstner *et al.*, 2002; Desvergne und Wahli, 1999) – die Familie der PPARs („peroxisome proliferator-activated receptors“). Zusammengesetzt ist sie aus den drei Liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktoren PPAR α , PPAR β und PPAR γ . Ihre transkriptionelle Aktivität wird durch Fettsäuren und ihre Derivate, sowie verschiedene onkogene Signalwege, wie die Ras-Raf-ERK-Kaskade, reguliert (Müller, 2004).

Der Arachidonsäure-Metabolit Prostazyklin (PGI₂) wurde in der Literatur häufig als Agonist von PPAR β beschrieben (Lim *et al.*, 1999 und 2002; Gupta *et al.*, 1997; Hatae *et al.*, 2001). Im ersten Teil der Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Prostazyklin zumindest in den verschiedenen, eingesetzten Testsystemen keine signifikante Bedeutung bei der Regulation von PPAR β besitzt. So führte die Aktivierung eines c-Raf-Östrogen-Rezeptorfusionsproteins durch 4-OH-Tamoxifen zwar zu einer Induktion von Cox-2 und PPAR β , sowie zu einem deutlichen Anstieg der Prostazyklinsynthese, die erwartete Zunahme der transkriptionellen Aktivität von PPAR β blieb hingegen aus. Auch die Hemmung von PGIS und damit der Prostazyklinsynthese durch den spezifischen Inhibitor U51605 führte zu keiner Veränderung der durch Arachidonsäure vermittelten Aktivierung von PPAR β . In einem weiteren Versuch wurden sowohl Cox-2, als auch PGIS überexprimiert. Doch auch hier konnte kein Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β beobachtet werden. Die Frage nach dem spezifischen, hoch-affinen Liganden für PPAR β bleibt damit ungeklärt. Denkbar wäre durchaus auch, dass PPAR β durch verschiedene Faktoren, wie diverse Fettsäuren und Lipide, reguliert wird.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war neben den funktionellen Studien die Identifizierung neuer Zielgene, um die positive Wirkung von PPAR β im Kontext der Tumorigenese näher zu charakterisieren. Dafür wurde PPAR β durch den Einsatz spezifischer siRNA ausgeschaltet und der Effekt auf RNA-Ebene mittels eines Microarrays analysiert. Für die Validierung der Microarray-Daten wurden verschiedene Zellsysteme (Tet-induzierbare PPAR β -Zellen, Wildtyp- und Knock-out-Zellen) mittels Real-Time-PCR analysiert. Dabei haben sich mit CXCR-4 und Angiopoietin-1 interessante, potentielle Zielgene heraus kristallisiert, die durch Beeinflussung der Angiogenese eine wichtige Funktion von PPAR β bei der Tumorigenese vermitteln könnten.

2 EINLEITUNG

In den letzten Jahren lieferten diverse Studien zunehmend Hinweise, dass die so genannten PPARs („peroxisome-proliferator-activated receptors“, siehe Kapitel 1.3 und folgende) durch ihre Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, aber auch der Angiogenese eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielen könnten. Bevor die über geordnete Familie der Kernrezeptoren, sowie die PPARs detaillierter besprochen werden, sollen die folgenden Kapitel zunächst einen kurzen Einblick in die Prozesse geben, die bei der Tumorigenese von essenzieller Bedeutung sind.

2.1 Tumorigenese

Ein Tumor entsteht immer dann, wenn Zellen eines vielzelligen Organismus ihr normales Entwicklungsprogramm ändern und sich unkontrolliert vermehren (Seyffert *et al.*, 1998). Dabei erwerben die Tumorzellen die Fähigkeit, umliegendes mesenchymales Gewebe zu infiltrieren und zu zerstören. Um die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen für den wachsenden Tumor zu gewährleisten, benötigt dieser eine eigene Gefäßversorgung. Daher produzieren Tumorzellen spezifische Faktoren, die ruhende Endothelzellen aktivieren und eine Neovaskularisierung des wachsenden Tumors induzieren (Tumorangiogenese). Diese neuen Blutgefäße sind jedoch nicht voll ausgereift, so dass Tumorzellen diese, sowie das lymphatische System, leicht penetrieren und sich auf diese Weise im ganzen Organismus ausbreiten können (Metastasierung; maligne Tumore).

Die Entwicklung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess, der sich in der Regel über einen Zeitraum von Jahrzehnten erstreckt. Der initiierende Schritt liegt häufig in der Mutation eines Tumorsuppressorgens oder (Proto-)Onkogens. Durch die Ansammlung weiterer genetischer und epigenetischer Veränderungen kann sich schließlich ein maligner Tumor entwickeln (Vogelstein *et al.*, 1988; Knowles and Selby, 2005).

2.2 Signaltransduktion

Keine Zelle lebt in Isolation. Die Kommunikation mit der Umgebung, um beispielsweise Differenzierungsprozesse, das Überleben oder den Zelltod, sowie den Metabolismus und die Genexpression zu koordinieren, ist für sie von essentieller Bedeutung (Lodish *et al.*, 1999). Signalwege basieren auf einem gemeinsamen Konzept: Extrazelluläre Liganden binden als Informationsüberträger an Rezeptoren und setzen damit eine in-

trazelluläre Kaskade in Gang, in deren Verlauf das empfangene Signal durch Modifizierung von Proteinen weiter geleitet und letztlich die Aktivität eines Effektorproteins reguliert wird (Hindley und Kloch, 2002).

Eine bedeutende Eigenschaft von Tumorzellen liegt darin, dass die zelluläre Signaltransduktion gestört ist und es in Folge dessen zum unkontrollierten Wachstum der Zelle kommt. Dies geschieht durch Mutation von Genen, die wichtige Prozesse wie Apoptose, Proliferation oder Zellzyklus regulieren.

2.2.1 Zellzyklus

Als Zellzyklus bezeichnet man den Phasenablauf einer teilungsaktiven Zelle von einer Teilung bis zur nächsten. In Eukaryonten dauert ein solcher Zyklus etwa 10 bis 24 Stunden. Unterteilt wird er generell in die M-Phase (Mitose) und die Interphase, die wiederum aus der G₁-, der S- und der G₂-Phase besteht (näheres siehe Alberts *et al.*, 1995, und andere). Dauer und Abfolge der Phasen werden von Steuerungsmechanismen, so genannten Kontrollpunkten überwacht, die dafür sorgen, dass erst dann der nächste Schritt des Zellzyklus erfolgt, wenn die exogenen, sowie endogenen Faktoren dies ermöglichen. Reguliert wird der Zellzyklus durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), die in den verschiedenen Phasen über ihren Phosphorylierungsgrad bzw. durch Bindung der unterschiedlich exprimierten Cycline periodisch an- und abgeschaltet werden.

In vielen Tumorzellen sind Regulatoren des Zellzyklus mutiert. Dies kann sowohl die Cycline bzw. die CDKs und ihre Inhibitoren, als auch Tumorsuppressorgene wie *p53* oder das Retinoblastomgen (*Rb*) betreffen, die mit dem Zellzyklus verbunden sind. So resultiert beispielsweise die Mutation und Inaktivierung des Tumorsuppressors pRB in der Freisetzung von E2F. Als Folge davon wird die Expression von E2F-regulierten Genen induziert, die u.a. bei der Nukleotid- und DNA-Synthese, bzw. beim Übergang von der G₁- in die S-Phase eine Rolle spielen (Nevins, 1992).

p53 ist in etwa der Hälfte aller menschlicher Tumore durch (Punkt-)Mutation in seiner Funktion verändert. In etwa 85 % der Fälle betreffen die Mutationen die DNA-bindenden Bereiche des Transkriptionsfaktors. Damit wird die Expression des CDK-Inhibitors p21 durch p53 ausgeschaltet und die Induktion des G₁-Blocks in der Zelle verhindert (Holstein *et al.*, 1994; Levine, 1997). Als Folge erhält die Zelle nicht mehr genügend Zeit, um DNA-Schäden zu reparieren (Lane *et al.*, 1994).

2.2.2 Apoptose

Unter Apoptose (gr. Apoptos: das Herabfallen) versteht man einen kontrollierten, energieabhängigen Zelltod, der für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Homöostase eines vielzelligen Organismus von lebenswichtiger Bedeutung ist.

Morphologisch ist die Apoptose durch eine Kondensation des Chromatins und einer blasigen Veränderung und Schrumpfung von Kern und Zelle gekennzeichnet. Sie endet mit der Auflösung der Zelle in viele Zellkörperchen („apoptotic bodies“). Auf molekularer Ebene ist Apoptose durch die Verlagerung des Phosphatidylserins auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran, der Degradierung der DNA im Nukleus, sowie der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien gekennzeichnet. Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Caspase-Kaskaden.

Die Stimuli, die zum Ablauf des programmierten Zelltods führen, können sowohl externer, als auch interner Natur sein. Zu den extrinsischen Signalen gehören neben dem Entzug von Wachstums- bzw. Überlebensfaktoren, auch die Aktivierung von so genannten „death receptors“ durch Liganden der TNF-(„tumor necrosis factor“)- bzw. Fas-Familie. Oxidativer Stress, chemotherapeutische Agenzien, sowie DNA-Schäden durch UV- oder Röntgenstrahlung, zählen zu den intrinsischen Signalen. Sowohl die Rezeptor-vermittelte Apoptose, als auch der intrinsische Signalweg münden in die Aktivierung der (Pro-)Caspase 3. Auch p53 kann auf verschiedenen Wegen Apoptose auslösen: Über die Expression von „BH3-only“-Proteinen, wie PUMA und NOXA, wird beispielsweise die Apoptosom-abhängige Apoptose initiiert. Außerdem existieren neben p53 mehrere homologe Proteine in der Zelle, die ebenfalls Apoptose induzieren können, wie p51 oder p73 (Osada *et al.*, 1998).

2.2.3 Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Bildung neuer Blutgefäße, überwiegend aus bereits bestehender Vaskulatur (Folkman, 2003). Sie spielt nicht nur unter physiologischen Bedingungen, wie beim Wachstum und der Differenzierung von Organen und Geweben und der Wundheilung eine Rolle, sondern auch unter pathologischen Bedingungen, wie bei dem Wachstum und der Metastasierung solider Tumore (Folkman, 1995). Ohne die Neubildung und das Wachstum von Kapillaren können Tumore infolge der mangelnden Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nur eine Größe von etwa 10^6 Zellen erreichen (Lodish *et al.*, 1999).

Die Angiogenese ist ein stark regulierter, komplexer Vorgang, der Migration, Proliferation und erneute Differenzierung vaskulärer Endothelzellen erfordert. In Gang gesetzt wird dieser Prozess in aller Regel durch die kontrollierte Freisetzung von so genannten

pro-angiogenen Faktoren, wie FGF („fibroblast growth factor“), PDGF („platelet-derived growth factor“) oder VEGF („vascular endothelial growth factor“).

VEGF wurde 1989 als Schlüsselmolekül der Angiogenese entdeckt, das sowohl das Wachstum von Blutgefäßen, als auch deren Permeabilität reguliert (Leung *et al.*, 1989). Darüber hinaus wird das Überleben neu wachsender, noch nicht ausgereifter Blutgefäße durch VEGF gesteuert. Die Produktion des Wachstumsfaktors durch Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen (Josko *et al.*, 2000) wird durch verschiedene Zytokine und andere Wachstumsfaktoren, aber auch durch Hypoglykämie und Hypoxie stimuliert (Brogi *et al.*, 1996). Mit dem Angiopoietin/Tie-2 System wurde 1997 schließlich ein weiterer zentraler Regulator der Gefäßausreifung identifiziert. Die Bindung von Angiopoietin-1 (Ang-1) an seinen Rezeptor Tie-2 auf der Oberfläche von Endothelzellen führt über die Aktivierung einer Signalkaskade zur Ausschüttung von Botenstoffen, die Perizyten und glatte Muskelzellen anlocken. Diese führen zur Ausreifung und Stabilisierung der Gefäße. Angiopoietin-2 fungiert dabei als Gegenspieler von Ang-1, indem es an Tie-2 bindet und die Signalweiterleitung damit blockiert (Maisonpierre *et al.*, 1997). Um die Familie der vaskulären Wachstumsfaktoren zu komplettieren, seien an dieser Stelle außerdem die Ephrine und ihre Rezeptoren genannt. Dieses ursprünglich auf Nervenzellen entdeckte System ist in entscheidendem Maße dafür verantwortlich, dass aus sprossenden Blutkapillaren ein funktionsfähiges Netzwerk blutdurchströmter Arterien, Kapillaren und Venen werden kann (Kullander und Klein, 2002). Vor allem das Expressionsmuster des Liganden Ephrin B2 und des Rezeptors Eph B4 scheint in Mäusen die Differenzierung des Endothels zu arteriellen oder venösen Gefäßen zu beeinflussen (Adams *et al.*, 2001; Gale *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1998).

2.3 Kernrezeptoren

Kernrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die durch Bindung eines in der Regel kleinen und lipophilen Liganden aktiviert werden (Wahli, 2002; Michalik, 2004). Man unterscheidet vor allem zwei Klassen: Die erste umfasst Rezeptoren, die in Form von Monomeren an die DNA binden (wie zum Beispiel „estrogen receptor“ ER, progesterone receptor“ PR, „androgene receptor“ AR), während sich Rezeptoren der zweiten Klasse entweder als Homo- oder als Heterodimer an die DNA anlagern (wie zum Beispiel „thyroid receptor“ TR, „retinoic acid receptor“ RAR, „vitamin D receptor“ VDR).

2.3.1 Aufbau

Charakteristisch sind Kernrezeptoren aus einer variablen NH₂-terminalen Region (A/B), einer DNA-Bindungsdomäne (DBD bzw. Region C), einer „Linker“-Region D und einer Region E, die die Ligandenbindungsdomäne (LBD) enthält, aufgebaut (Vgl. Abb.1). Einige der Rezeptoren besitzen zudem eine COOH-terminale Region F, für die bisher keine Funktion bekannt ist.

Die hoch konservierte DBD beinhaltet zwei Cystein-reiche Zinkfinger-Motive, die für die spezifische DNA-Erkennung und –Bindung verantwortlich sind (Aranda und Pascual, 2001). Die „Linker“-Region D zwischen der DBD und der LBD ist hingegen sehr variabel und ermöglicht die Rotation der DBD. In vielen Fällen enthält sie NLS („nuclear localization signals“) oder Aminosäurereste, die für die Interaktion mit Korepressoren von Bedeutung sind. Die LBD besitzt mehrere Funktionen: Zum einen vermittelt sie durch zwei konservierte Regionen (das „signature motif“ und der C-terminale AF-2 Bereich) die Bindung der Liganden und die dadurch regulierte transkriptionelle Aktivität. Zum anderen ist sie für die Dimerisierung und die Interaktion mit Hitzeschock-Proteinen zuständig. In einigen Fällen übt sie zudem die Hormon-regulierte, reversible, basale Repression der Expression bestimmter Gene aus (Komar, 2005).

Neben der genannten Transaktivierungsdomäne besitzen Kernrezeptoren eine weitere, die in der hypervariablen A/F-Region (AF-1) lokalisiert ist. Diese ermöglicht eine Liganden-unabhängige, konstitutive Aktivierung des Rezeptors.

2.3.2 Bindung an die DNA: „hormone response elements“

Kernrezeptoren regulieren die Transkription von Zielgenen, indem sie an spezifische DNA-Sequenzen im 5'-Bereich, meist nahe der transkriptionellen Initiationsstelle, binden: die „hormone response elements“ (HREs; Aranda und Pascual, 2001). Bei Rezeptoren, die als Monomer an die DNA binden, besteht die Konsensussequenz aus einer

AGG/TTCA-Sequenz und einer AT-reichen, 5' davon liegenden Sequenz. Kernrezeptoren, die als Homo- oder Heterodimere an DNA binden, erkennen hingegen Nukleotidfolgen, die aus zwei Wiederholungen der Konsensussequenz AGG/TTCA bzw. AGAA-CA (Beato *et al.*, 1995) bestehen. Angeordnet sind die 6-Nukleotid langen Sequenzen entweder als Palindrome (Pal), umgekehrte Palindrome (IPs) oder direkte Wiederholungen („directs repeats“, DR). Die Bindung der Kernrezeptoren an die HREs kann sowohl eine Aktivierung, als auch eine Repression der Expression bestimmter Gene zur Folge haben. So genannte ‚negative HREs‘ sind beispielsweise im Gen für das TRH („thyrotropin-releasing hormone“) enthalten. Bei einem an negative HREs gebundenen Kernrezeptor wird die Transkription durch Bindung eines Liganden reprimiert (Aranda und Pascual, 2001). HREs findet man üblicherweise in der Nähe von Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die mit den Kernrezeptoren interagieren können (Aranda und Pascual, 2001).

Kernrezeptoren können jedoch auch die Expression von Genen regulieren, die keine HREs, sondern AP-1-Bindestellen besitzen. Dabei fungieren Kernrezeptoren als Liganden-abhängige Transrepressoren des AP1-Komplexes, der sich aus Dimeren der Jun-Proteinfamilie, wie Jun, Fos, u.a., zusammensetzt („transcriptional cross-talk“). So kann die Expression von Genen reguliert werden, die AP-1, NF- κ B oder CREB-Bindungsstellen beinhalten, ohne dass die Kernrezeptoren selbst an diese DNA-Elemente binden (Beato *et al.*, 1995; Aranda und Pascual, 2001).

2.3.3 Regulation der Transkription

Die transkriptionelle Aktivität von Kernrezeptoren wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst: In erster Linie gehört dazu die Bindung von Liganden und die Rekrutierung von Kofaktoren (siehe auch Abb. 2). Aber auch die Konzentration bestimmter Kernrezeptoren kann die Expression von Genen beeinflussen. So kompetieren beispielsweise die verschiedenen Bindungspartner von RXR („retinoid X receptor“) um dessen Bindung, wodurch die Expression bestimmter Gene reprimiert wird (Shi *et al.*, 2002).

Neben den Liganden-abhängigen Kernrezeptoren gibt es auch nukleäre Rezeptoren, die entweder konstitutiv aktiv sind oder deren Aktivität durch Phosphorylierungsreaktionen im Lauf einer Signaltransduktionskette reguliert wird (Shao und Lazar, 1999). Am besten charakterisiert ist in diesem Zusammenhang der Östrogen-Rezeptor, der durch Wachstumsfaktoren, die Proteinkinase A, MAPKs („mitogen-activated protein kinases“) oder die Serin/Threoninkinase AKT phosphoryliert werden kann (Knowles und Selby, 2005). Dies kann sowohl den Effekt des an den Rezeptor gebundenen Hormons verstärken, als auch völlig Liganden-unabhängig ablaufen. Stimuliert werden können

Kernrezeptoren zudem über die Bindung von Cyclinen. Beispielsweise interagiert Cyclin D1 nach Bindung an den Östrogenrezeptor mit Koaktivatoren der p160-Familie und reguliert auf diese Weise die transkriptionelle Aktivität des Kernrezeptors (Aranda und Pascual, 2001).

2.3.4 Liganden

Die Liganden von Kernrezeptoren (siehe Tab.1) können auf drei Arten generiert werden: Entweder werden sie in klassischen, endokrinen Organen synthetisiert und dann in die Zelle transportiert oder sie werden innerhalb der Zelle aus einer Vorstufe oder einem Protohormon generiert (Aranda und Pascual, 2001). Die dritte Möglichkeit ist, dass die Liganden direkt als Metaboliten in der Zielzelle produziert werden.

Tab. 1: Subfamilien der Kernrezeptoren in Säugetieren. Aufgeführt ist eine Auswahl von klassischen und (ursprünglich) „Orphan“-Kernrezeptoren und deren Liganden. Die rechte Spalte gibt an, in welcher Form die Bindung an die DNA erfolgt. M: Monomer, D: Homodimer, H: Heterodimer, DR: „direct repeat“, Pal: Palindrom, IP: „inverted palindrome“. Quelle: modifiziert nach Aranda und Pascual, 2001.

Rezeptor	Subtyp	Name	Ligand	„response element“	Struktur
RAR	α, β, γ	Retinsäure-Rezeptor	Retinsäure	DR-2, DR-5, Pal, IP	H
VDR		Vitamin D-Rezeptor	1-25(OH) ₂ Vitamin D ₃	DR-3, IP-9	H
PPAR	$\alpha, \beta/\delta, \gamma$	„Peroxisom proliferator-activated receptor“	Benzotrien B4; WY 14.643; Eicosanoide; Thiazolidindione (TZDs); 15-deoxy-12,41-Prostaglandin J2; mehrfach ungesättigte Fettsäuren	DR-1	H
RXR	α, β, γ	„retinoid X receptor“	9- <i>cis</i> -Retinsäure (9- <i>cis</i> -RA)	Pal, DR-1	D
ER	α, β	Estrogen receptor	Östradiole	Pal	D

In Abwesenheit eines Liganden sind viele Kernrezeptoren im Nukleus lokalisiert („thyroid receptor“ TR, „retinoic acid receptor“ RAR, „vitamin D receptor“ VDR). Doch es gibt auch Vertreter, wie zum Beispiel den ER („estrogen receptor“), die im Zytoplasma der Zelle zu finden sind und dort in einen Multiproteinkomplex mit verschiedenen Chaperonen eingebunden sind (Knoblauch und Garabedian, 1999). Durch Bindung eines Liganden dissoziiert dieser Komplex in seine Bestandteile und der Kernrezeptor kann in den Nukleus eindringen (Aranda und Pascual, 2001).

2.3.5 Kofaktoren

Kofaktoren können in Koaktivatoren und Korepressoren gegliedert werden. Zur ersten Gruppe gehört die p160 Familie (SRC-1, GRIP1/TIF2/SRC-2 und pCIB/AIB1/SRC-3; McKenna *et al.*, 1999), sowie PGC-1 („PPAR γ -interacting protein 1“) und CBP/p300. Als Beispiele für Korepressoren sind N-CoR und SMRT zu nennen (Chen *et al.*, 1997; Onate *et al.*, 1995; Chen und Evans, 1995; Hörlein *et al.*, 1995; Zamir *et al.*, 1997). Alleine oder im komplexen Verbund mit anderen Faktoren (CBP/p300, ...) beeinflussen sie die transkriptionelle Aktivität von assoziierten Rezeptoren auf verschiedenen Ebenen: Zum einen regulieren sie die Aktivität der Kernrezeptoren durch direkte Bindung – im Fall der p160-Familie über ihre LXXLL-Motive¹. Zum anderen besitzen viele Koaktivatoren selbst eine HAT-(„histone acetyl-transferase“-)Funktion, mit der sie Histone an ihren aminoterminalen Lysinresten azetylieren (Yang *et al.*, 1996; Spencer *et al.*, 1997). Die Folge davon ist die Auflockerung der nukleosomalen Struktur und die erhöhte Expression entsprechender Gene. Umgekehrt rekrutieren Korepressoren häufig Faktoren, die eine Histon-Deazetylase-Aktivität besitzen und somit zur Repression der Genexpression führen.

Die Rekrutierung von Kofaktoren hängt von der Konformation der Kernrezeptoren ab. So zeigt beispielsweise der Thyroidhormon-Rezeptor bei Anlagerung des Liganden eine Konformationsänderung, die zur Dissoziation des Korepressorkomplexes führt und die Anlagerung von Koaktivatoren ermöglicht (Mangelsdorf und Evans, 1995).

Neben den erwähnten Kofaktoren gibt es auch solche, die als Bindeglied zwischen Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie fungieren, indem sie den Prä-Initiationskomplex stabilisieren und die RNA Polymerase II rekrutieren (TRAP, „thyroid receptor associated proteins“; Knowles und Selby, 2005).

¹ L steht für Leucin, X für eine beliebige Aminosäure.

2.4 „Orphan“-Rezeptoren

Der Begriff der „Orphan“- (Waisen-)Rezeptoren wurde in den späten 80er Jahren für Rezeptoren gewählt, die eine hohe Homologie zur Superfamilie der Kernrezeptoren aufwiesen, für die jedoch kein natürlicher Ligand bekannt war (Giguère, 1999; Enmark und Gustafsson, 1996).

Man kann die Gruppe der „Orphan“-Rezeptoren in vier Kategorien einteilen (Mangelsdorf *et al.*, 1995): Die erste beinhaltet Rezeptoren, die mit RXR heterodimerisieren. Zu ihnen gehören beispielsweise die PPARs, aber auch LXR („liver X receptor“), NGFI-B („NGF-induced clone B“) und FXR („farnesoid X receptor“). Die zweite Kategorie bindet als Homodimer sowohl an palindrome Sequenzen, als auch an DRs. Viele von ihnen fungieren als starke, konstitutiv aktive Transaktivatoren, wie zum Beispiel HNF-4 („hepatocyte nuclear factor-4“, Jiang *et al.*, 1995) oder als Transrepressoren, wie die Gruppe der COUPs² („chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor“, Conneely und O'Malley, 1994). In der dritten Kategorie findet man Rezeptoren, wie die RORs („retinoid-related orphan receptor“) und SF-1 („steroidogenic factor“), die als Monomere an die DNA binden und die Transkription positiv regulieren. Häufig zeichnen sie sich durch eine konstitutive Aktivität aus. Die vierte Kategorie beinhaltet schließlich Rezeptoren, die entweder eine DBD oder eine LBD besitzen (Zanaria *et al.*, 1994).

2.5 „Peroxisome proliferator-activated receptors“

PPARs („peroxisome proliferator-activated receptors“) spielen unter anderem bei der Entstehung diverser Erkrankungen wie Diabetes, Adipositas, Artherosklerose und Krebs eine entscheidende Rolle. In ihrer Struktur und Funktionsweise entsprechen sie den anderen Kernrezeptoren (siehe Kapitel 1.3, sowie Abb. 1A). Alternativ werden sie auch als NR1C bezeichnet, da sie zur Gruppe C der Subfamilien der Kernrezeptoren gehören (Vanden Heuvel, http://jackvh.cas.psu.edu/reach_print.htm).

Ihren Namen bekamen sie Anfang der 90er Jahre, als sie zum ersten Mal in Nagetieren als Faktoren identifiziert wurden, die im Rahmen der Proliferation von Peroxisomen aktiviert wurden (Issemann und Green, 1990). Homologe Gene wurden weiterhin im Menschen, in Hühnern und in *Xenopus* nachgewiesen (Desvergne und Wahli, 1999).

Die Familie der PPARs besteht aus drei Mitgliedern, die sich in ihrer lokalen Expression, Ligandenbindung und biologischen Funktion unterscheiden (Komar, 2005): PPAR α (NR1C1)³, PPAR β/δ (NUC1, FAAR, NR1C2) und PPAR γ (NR1C3). Jede dieser

² Die COUPs können auch Heterodimere mit RXR bilden und dadurch deren Aktivität hemmen.

³ Innerhalb der PPARs wurde PPAR α als erstes identifiziert (Issemann und Green, 1990).

Unterformen wird von einem eigenen Gen kodiert. Durch alternatives Spleißen, sowie verschiedene Promotoren werden mehrere Spleißvarianten gebildet (siehe Abbildung 1B).

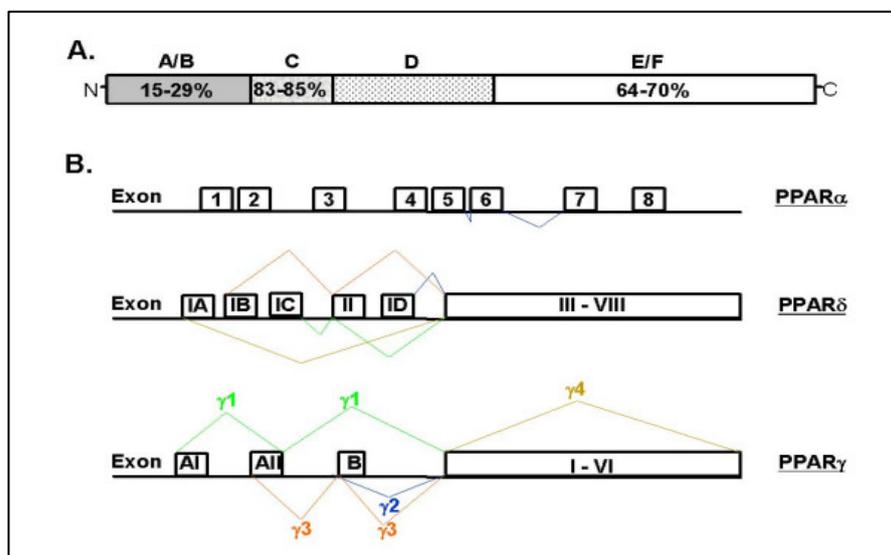


Abb. 1: Struktur und Spleißvarianten der PPARs. A) Schematische Struktur von nukleären Hormonrezeptoren bzw. PPARs. A/B: Aktivierungsdomäne AF1 (Liganden-unabhängig), C: DNA-Bindungsdomäne (2 Zinkfinger-Motive), D: Linkerdomäne/Dimerisierung, E/F: Dimerisierung/Ligandenbindungsdomäne (Aktivierungsdomäne AF2). Angegeben ist zudem die relative Übereinstimmung der Domänen der verschiedenen PPAR-Typen. B) Schematische Übersicht der Spleißvarianten der PPARs. Die Exons IA, IB, IC, ID, and Exon 2 sind nicht-kodierend. Betrachtet man exemplarisch die PPAR γ -Subtypen, kann man sehen, dass die Exons 1 bis 6 übereinstimmen. PPAR γ_1 beinhaltet weiterhin die nicht-translatierten Exons AI und AII, PPAR γ_2 das translatierte Exon B. PPAR γ_3 hingegen das nicht-translatierte Exon AII und das Exon B, während PPAR γ_4 nur die Exons I bis VI enthält (Quelle: Komar, 2005).

Für PPAR α gibt es beispielsweise neben dem „full-length“ Produkt noch eine Form, der ein Teil der variablen „Linker“-Region, sowie die gesamte LBD fehlt (Gervois *et al.*, 1999). Für PPAR β und PPAR γ wurden bisher vier Spleißvarianten charakterisiert. Bei PPAR β resultieren diese Formen in einem primären Translationsprodukt (Larsen *et al.*, 2002). Bei PPAR γ laufen die Spleißvarianten 1, 3 und 4 auf das gleiche Proteinprodukt hinaus, während das Protein, das von PPAR γ_2 kodiert wird, an seinem N-Terminus um 30 (Maus) bzw. 28 (Mensch) Aminosäuren verlängert ist (Zhu *et al.*, 1995; Fajas *et al.*, 1997).

2.5.1 Regulation der Transkription

2.5.1.1 DNA-Bindung

PPARs bilden mit den so genannten RXR („retinoid X receptor“) Heterodimere und binden, analog zu den anderen Kernrezeptoren, an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion bestimmter Gene. Diese PPREs („PPAR response elements“) bestehen aus zwei Wiederholungen der Hexanukleotid-Sequenz AGGTCA, die durch ein einzelnes Nukleotid (DR-1, „direct repeat“) voneinander getrennt sind (Mangelsdorf und Evans, 1995). Die Konsensussequenz ist bei allen drei PPARs identisch. Die Affinität der Bindung des RXR-PPAR-Heterodimers an die DNA hängt dabei vom Nukleotid ab, das sich zwischen den beiden Hexanukleotid-Sequenzen befindet. Weiterhin spielt vor allem bei PPAR α auch der 5' vom PPRE-liegende Bereich eine Rolle bei der DNA-Bindung (Komar 2005).

Die RXR sind eine Familie von Kernrezeptoren mit drei Mitgliedern: RXR α , RXR β und RXR γ , die jeweils verschiedene Spleißvarianten besitzen. Reguliert werden sie durch den Vitamin A-Metaboliten 9-cis-RA („9-cis-retinoic acid“), sowie durch verschiedene nicht-zyklische Terpenoide (Harmon *et al.*, 1995). RXR können sowohl Tetramere, als auch Homo- bzw. Heterodimere bilden. Zu den Dimerisierungspartnern gehören neben den PPARs auch der Thyroidrezeptor, der Vitamin D-Rezeptor, der Retinsäure-Rezeptor RAR und NGFI-B. Interessanter Weise bildet RXR in Abwesenheit seines Liganden Homotetramere, die keine transkriptionelle Aktivität besitzen und somit als inaktiver Speicher dienen. Sobald der Ligand 9-cis-RA zur Verfügung steht, werden die Homotetramere aufgelöst und stehen für die Regulation der Genexpression als Homo- oder Heterodimere zur Verfügung (Yasmin *et al.*, 2005). Dabei bilden RXR und PPARs so genannte ‚permissive‘ Heterodimere, in denen beide Rezeptoren durch die Bindung ihres jeweiligen Liganden aktiviert werden können (Mangelsdorf *et al.*, 1995; siehe Abb. 2)⁴.

⁴ Wenn RXR jedoch als Heterodimer mit TR, VDR und RAR vorliegt, kann RXR seinen Liganden nicht mehr binden. Man spricht hier von ‚stillen‘ bzw. ‚nicht-permissiven‘ Dimeren.

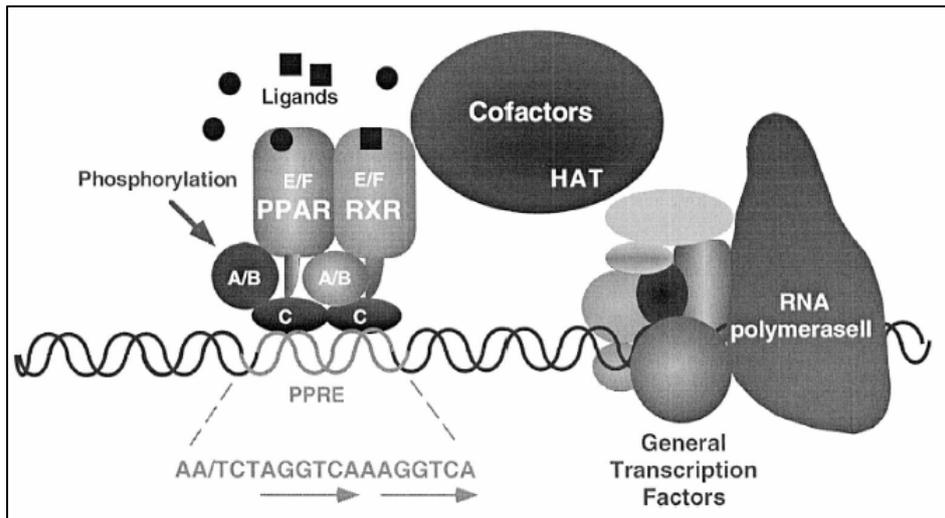


Abb 2: Mechanismus der Transaktivierung. Das RXR-PPRE-Heterodimer bindet über die jeweilige C-terminale Domäne an PPPE („PPAR-response element“), das in der Promotorregion spezifischer Zielgene liegt. Die Aktivität des Rezeptors wird sowohl durch Phosphorylierung in der A/B-Domäne, als auch durch die Bindung von Liganden in der E/F-Domäne reguliert. Die aktivierten Heterodimere assoziieren mit verschiedenen Kofaktoren, die (zumindest teils) eine Azetyltransferase-Funktion (HAT) besitzen. Damit wird die nukleosomale Struktur aufgelockert und die Expression der Gene induziert. Quelle: Escher und Wahli, 2000.

2.5.1.2 Liganden und Kofaktoren

PPARs werden in erster Linie durch natürlichen Liganden, wie Fettsäuren (Arachidonsäure, Palmitinsäure, u. v. m.) und deren Derivate beeinflusst (Xu *et al.*, 1999). Da diese an vielfältigen Prozessen beteiligt sind und innerhalb der Zellen durch Cyclooxygenasen bzw. Lipoxygenasen weiter umgewandelt werden, ist zum Teil unklar, ob die Liganden direkt oder erst nach weiterer Metabolisierung die PPARs aktivieren.

Neben den endogenen Liganden für PPARs sind inzwischen auch eine ganze Reihe synthetischer Formen bekannt, zu denen die PPs („peroxisome proliferators“) bzw. Fibrate, Fettsäuren-Analoga, NSAIDs („non-steroidal anti-inflammatory drugs“) und TZDs („thiazolidinediones“) gehören (Escher und Wahli, 1999; Komar, 2005). Einige dieser Liganden sind spezifisch für PPAR α , PPAR β oder PPAR γ : So wurden die Arachidonsäure-Derivate 8(S)-HETE („hydroxyicosatetraenoic acid“) und LTB₄ (Leukotrin B₄) als spezifische Liganden für PPAR α identifiziert (Kliewer *et al.*, 1997). Hochaffine synthetische PPAR α -Liganden stellen weiterhin die lipidsenkenden Fibrate (Fenofibrat, Clofibrat, WY-14,643 und andere) dar, die in der Klinik zur Therapie von Hyperlipoproteinämien eingesetzt werden. Allerdings führen diese in sehr hohen Konzentrationen ebenfalls zu einer Aktivierung von PPAR γ (Escher und Wahli, 2000).

Prostaglandine aktivieren alle Mitglieder der PPAR-Familie. Jedoch stellte sich das Prostaglandinderivat 15-deoxy- $\Delta^{2,14}$ -Prostaglandin J_2 (PG J_2) als spezifischer Ligand für PPAR γ heraus (Desvergne und Wahli, 1999), der neben den oxidierten Fettsäuren 9(S)-HODE und 13(S)-HODE („hydroxyoctadecadienoic acid“) die Aktivität von PPAR γ reguliert (Kliwer *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 1995). Als potente synthetische PPAR γ -Liganden agieren die Insulin-„Sensitizer“ vom Typ der Thiazolidindione (z. B. Troglitazone, Rosiglitazone, u.a.), die für die Behandlung des Typ 2 Diabetes eingesetzt werden, sowie der Antagonist GW9662.

Auch für PPAR β sind inzwischen einige synthetische Agonisten, wie GW501516, L165041, cPGI („Carbaprostazyklin“) und GW2433 (Hihi *et al.*, 2002) identifiziert. Klinische Relevanz besitzt vor allem GW501516, das bereits in einer klinischen Studie (Phase II) bei der Behandlung von Dyslipidämie eingesetzt wird (GlaxoSmithKline, Studiennummer: NCT00158899). cPGI („Carbaprostazyklin“) ist das stabile Analogon des endogenen PGI $_2$ (Prostazyklin), welches in der Literatur häufig als Ligand für PPAR β gehandelt wird (Lim *et al.*, 1999 und 2002; Gupta *et al.*, 1997; Hatae *et al.*, 2001). Synthetisiert wird PGI $_2$ durch Umwandlung des Prostaglandins H_2 durch die Prostazyklinsynthase (PGIS). Für die pro-onkogene Funktion von Prostazyklin gibt es mittlerweile verschiedene Hinweise. So unterstützt PGI $_2$, das von Stromazellen humaner Kolonkarzinome frei gesetzt wurde, das Überleben der Krebszellen (Cutler *et al.*, 2003). Weiterhin inhibieren Prostazyklin bzw. PPAR β die Apoptose in RMCs („renal medullary interstitial cells“; Hao *et al.*, 2002).

In Abwesenheit des Liganden liegen PPARs im Komplex mit Korepressoren wie SMRT, SHARP („SMRT/HDAC I-associated repressor protein“), NCoR und HDACs der Klasse I vor (Krogsgam *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass PPAR β , analog zu anderen Kernrezeptoren wie TR, RAR und anderen, als intrinsischer Repressor fungiert und die Expression von Zielgenen von PPAR γ (Shi *et al.*, 2001) und PPAR α reprimiert, indem er an deren PPREs bindet. Nach Ligandenbindung dissoziieren die Korepressoren vom PPAR-RXR-Heterodimer und Koaktivatoren können rekrutiert werden.

2.5.1.3 Post-translationale Modifizierung

PPARs können auf verschiedene Weise post-translational modifiziert werden. Neben der Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren (Lazennec *et al.*, 2000; Gelman *et al.*, 2005), sei an dieser Stelle auf die Möglichkeit der Ubiquitinierung, sowie der Nitrierung von Tyrosinresten hingewiesen (Shibuya *et al.*, 2002).

Die Aktivierung durch Phosphorylierung wurde als erstes für PPAR α gezeigt (Shalev *et al.*, 1996). Genau wie bei PPAR γ wird die PPAR α -abhängige Expression von Zielgenen durch Insulin um etwa das Zweifache gesteigert. Postuliert wurde, dass dieser Effekt auf der Phosphorylierung der Kernrezeptoren durch die MAP-Kinase beruht, da die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ durch Verwendung eines MAP-Kinase Inhibitors zumindest teilweise revidiert werden konnte (Juge-Aubry *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996). Das gegenteilige Ergebnis wurde jedoch für PPAR γ nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren gezeigt: EGF und PDGF führten zwar zur Phosphorylierung des Kernrezeptors durch die MAP-Kinase, die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ wurde jedoch gehemmt. Diese Beobachtung wurde von der Tatsache gestützt, dass Prostaglandin F 2α zur Aktivierung des MAPK-Signalweges und damit zur Inhibition der transkriptionellen Aktivität von PPAR γ nach Phosphorylierung durch die MAPK führte (Reginato, *et al.*, 1998; Hihi *et al.*, 2002). So scheint die positive Regulation von PPAR γ durch Insulin eher durch die Aktivierung anderer Signalwege vermittelt zu werden und die Phosphorylierung von PPAR γ generell zur Inhibition seiner transkriptionellen Aktivität zu führen. Wie bei Hausser *et al.* (2000) gezeigt, induziert die Bindung des Liganden die Ubiquitinierung von PPAR γ . Bei PPAR α führt die Ligandenbindung hingegen zur Reduktion der Ubiquitinierung (Hirovani *et al.*, 2001; Blanquart *et al.*, 2002).

2.5.2 Expression und biologische Funktion

Das gewebsspezifische Expressionsmuster der drei PPAR-Typen unterscheidet sich teils stark und weist auf ihre verschiedenen biologischen Funktionen hin.

PPAR β ist ubiquitär exprimiert; auf seine biologischen Funktionen wird im Kapitel 1.6 ausführlich eingegangen.

PPAR α und PPAR γ besitzen konträre Funktionen bei der Regulation des Lipidmetabolismus: Während PPAR α für die Oxidation der Fettsäuren in der Leber zuständig ist, bewirken Gene, die von PPAR γ reguliert werden, die Anreicherung von Fettsäuren im Fettgewebe und lösen damit die Differenzierung der Fettzellen aus. Verbunden ist die von PPAR γ induzierte Adipogenese nicht nur mit der Expression von Adipozyten-spezifischen Genen und der intrazellulären Akkumulation von Lipiden, sondern auch mit einem Zellzyklusstopp (Desvergne und Wahli, 1999).

PPAR γ findet man primär im braunen und weißen Fettgewebe. Aber auch in Makrophagen, in den Epithelzellen des Darms, der Retina und der Skelettmuskulatur ist PPAR γ nachzuweisen (Michalik *et al.*, 2004). Neben der Regulation der Adipogenese, leistet PPAR γ auch im Zusammenhang mit Artherosklerose einen wichtigen Bei-

trag. Ein entscheidender Schritt bei Artherosklerose-Erkrankungen ist die Bildung und Akkumulation von so genannten Schaumzellen (Makrophagen, die mit Cholesterol beladen sind) in der Gefäßwand. PPAR γ wirkt dem entgegen, indem es über die Transporter LXR bzw. ABCA1 (Abkürzung, siehe Kapitel 2.4) den Ausstrom von Cholesterol aus Makrophagen und Endothelzellen bewirkt. Dieses Ergebnis wird durch Studien untermauert, bei denen Diabetes (Typ2)-Patienten durch die Behandlung mit PPAR γ -Agonisten nicht nur eine erhöhte Insulin-Resistenz erlangten, sondern auch vor Artherosklerose geschützt wurden (Shearer und Hoekstra, 2002; Berger und Moller, 2002). Allerdings findet man in der Literatur auch einige proatherogene Effekte von PPAR γ beschrieben (Chen *et al.*, 1999; Chinetti *et al.*, 1998), so dass sich hier keine endgültigen Aussagen treffen lassen. Auch bei der Steroidogenese in den Ovarien spielt PPAR γ eine wichtige Rolle. So fungiert der Kernrezeptor hier durch die Bindung an EREs ("estrogen response elements") als kompetitiver Inhibitor für Östradiol (Cui *et al.*, 2002; Komar, 2005).

Die Rolle von PPAR γ bezüglich der Tumorentstehung ist widersprüchlich. Einerseits fungiert PPAR γ als Tumorpromotor, wenn bereits erste Schritte im mehrstufigen Prozess der Karzinogenese erfolgt sind. So wird in Mäusen, die eine genetische Prädisposition zur Entwicklung von Darmtumoren besitzen, das Wachstum von Darmpolypen verstärkt (Nahlé, 2004; siehe auch Studien mit APC^{min/+}-Mäusen, Saez *et al.*, 1998; Lefebvre, 1998). Andererseits gibt es auch viele interessante *in vitro*, aber auch *in vivo* Studien, die den antiproliferativen Effekt von PPAR γ bei Brust-, Darm- und Prostata-tumoren, sowie bei Liposarkomen zeigen. Bei der Behandlung von humanen Brust-Adenokarzinomen mit PPAR γ -Agonisten wird beispielsweise die Expression des Tumorsuppressors BRCA1 induziert und somit das Wachstum der Tumorzellen gehemmt (Elstner *et al.*, 1998, Pignatelli *et al.*, 2003). Generell äußert sich die antiproliferative Wirkung von PPAR γ in Form von Zellzyklus-Arrest, Differenzierung und Auslösung des programmierten Zelltodes (Elstner *et al.*, 2002; Tontonoz *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1998; Sarraf *et al.*, 1998; Desvergne und Wahli, 1999).

PPAR α wird in relativ hoher Konzentration in der Leber, der Niere, dem Herz und dem braunen Fettgewebe exprimiert (Escher und Wahli, 2000). Außerdem findet man den Kernrezeptor in der Skelettmuskulatur, in der Nebenniere, im Pankreas und im Darm. Neben seiner Rolle im Fettstoffwechsel bzw. bei der Behandlung von Artherosklerose (Senkung des Cholesterols) ist PPAR α auch an der Kontrolle der inflammatorischen Antwort beteiligt (Blanquart *et al.*, 2003; Desvergne und Wahli, 1999; Gelman *et al.*, 1999; Hihi *et al.*, 2002). Zudem kann PPAR α über p53 in die Regulation des Zellzyklus eingreifen (Khan und Vanden Heuvel, 2003; Sumanasekera *et al.*, 2003) und über-

nimmt bei der Regulation des Aminosäure- und des Kohlenhydrat-Metabolismus, sowie der Harnstoffsynthese und der Gluconeogenese diverse Funktionen (Wahli, 2002).

2.6 PPAR β

2.6.1 Biologische Rolle

Wie bereits im Kapitel 1.5.5 erwähnt, wird PPAR β ubiquitär und meist in höheren Konzentrationen als die anderen beiden PPAR-Typen exprimiert (Desvergne und Wahli, 1999). Ein relativ hohes Expressionsniveau des Rezeptors findet man im Gehirn, in der Haut und im Magen-Darm-Trakt (Tan *et al.*, 2004). Seine biologischen Funktionen sind vielfältig und reichen von der Differenzierung der Keratinozyten bei der Wundheilung, über die Entwicklung der Plazenta bzw. Implantierung des Embryos in die Plazenta (Lim *et al.*, 1999), bis hin zur Myelinisierung von Nervenzellen (Shearer und Hoekstra, 2002; Peters *et al.*, 2000).

2.6.1.1 Wundheilung

Während bei der normalen fötalen Entwicklung der Epidermis keines der drei Mitglieder der PPAR-Familie eine Rolle spielt, beeinflussen PPAR α und vor allem PPAR β die epidermale Regeneration im Rahmen der Wundheilung: Eine Verletzung der Haut veranlasst Immunzellen zur Produktion von Zytokinen, wie INF γ bzw. TNF α . Diese aktivieren bestimmte Streß-Signalwege, die schließlich zur AP1-vermittelten Induktion der Expression von PPAR β führen (Wahli, 2002).

Parallel dazu wird nach Tan *et al.* (2001) auch die Produktion von Liganden stimuliert, die den Kernrezeptor aktivieren. Somit kommt es einerseits zur Differenzierung von Keratinozyten, andererseits erhöht PPAR β die Resistenz dieser Zellen gegenüber TNF α -induzierter Apoptose (Michalik *et al.*, 2001). Damit wird sichergestellt, dass genügend Keratinozyten für die Rekonstruktion der verletzten Epithelschicht vorhanden sind. Durch Zellkulturstudien wurden die Effekte von PPAR β im Rahmen der Wundheilung näher beleuchtet: Neben Defekten in der Adhäsion hatten PPAR $\beta^{-/-}$ -Zellen auch Probleme bei der Migration, was sich u.a. durch gestörte Zell-Zell-Kontakte zeigte (Tan *et al.*, 2004). Letzteres ist durch die Aktivierung der NF- κ B Aktivität durch PPAR β zu erklären. Diese führt zur vermehrten Produktion der Matrix-Metalloproteinase-9, die die Migration von Keratinozyten reguliert. Der Grund für die anti-apoptotischen Effekte von PPAR β liegt in der Vernetzung mit dem Akt-Signalweg über PDK1 (siehe Abb. 3). Die anti-apoptotischen Effekte von Akt1 werden dabei über die Phosphorylierung mehrere Substrate, wie Bad und die Familie der „forkhead transcription factors“, vermittelt. An-

zumerken ist hierbei, dass die Rolle von ILK bzgl. der Phosphorylierung von Akt1 sehr widersprüchlich diskutiert wird. Nach Sarbassov *et al.* (2005) ist nicht ILK, sondern der Rictor-mTOR-Komplex für die Phosphorylierung von Akt1 am Serin473 verantwortlich.

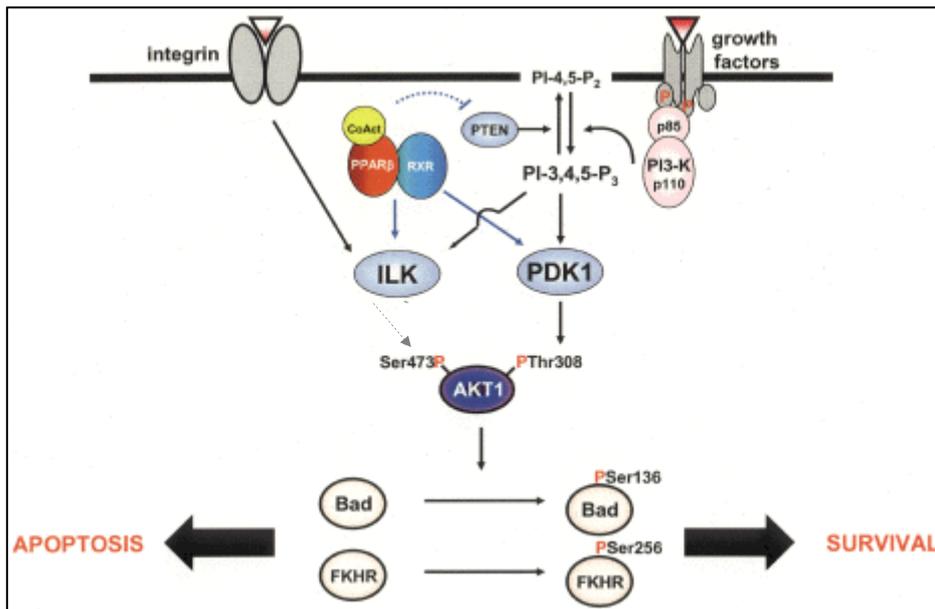


Abb. 3: Verbindung von PPAR β und Akt. In Keratinozyten sind ILK und PDK1 direkte Zielgene von PPAR β (Di Poi, 2002). PTEN wird durch PPAR β auf indirekte Weise negativ reguliert (gestrichelte Linie). Gemeinsam mit der erhöhten Expression von (ILK und) PDK-1 führt die gehemmte Expression von PTEN zu einem Anstieg der Aktivität von Akt1. CoAct: Koaktivator, PI: Phosphatidylinositol, PI3-K: Phosphoinositol-3-Kinase. Quelle: Tan *et al.*, 2004.

2.6.1.2 Reverser Cholesterol-Transport

Studien von Oliver *et al.* (2001) zeigen, dass die Expression von ABCA1 ("reverse cholesterol transporter ATP-binding cassette A1") in Makrophagen, Fibroblasten oder Darmzellen durch die Behandlung mit dem PPAR β -Agonisten GW501516 induziert wird. Die Folge davon ist ein Apolipoprotein A1-spezifischer Ausstrom von Cholesterol aus den genannten Zellen (Oliver *et al.*, 2001; Leibowitz *et al.*, 2000).

Vergleicht man diese Erkenntnisse mit den Daten über PPAR α , aber auch PPAR γ im Rahmen von Artherosklerose-Erkrankungen, so deutet sich an, dass auch PPAR β für die Regulation der Bildung von Schaumzellen von Bedeutung sein kann (siehe Kapitel 2.5.2).

2.6.1.3 Lipidmetabolismus und Insulinresistenz

Die spezifische Aktivierung von PPAR β in Fettzellen induziert die Expression von Genen, die für die Oxidation und den Verbrauch von Triglyzeriden zuständig sind. Studien mit PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen zeigen analog, dass diese nach Fütterung von fettreicher Nahrung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich mehr an Gewicht zunehmen (Peters *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). Welche metabolischen Signalwege hier *in vivo* eine Rolle spielen und in wie weit die Funktionen von PPAR β mit denen von PPAR γ oder PPAR α überlappen, muss jedoch noch geklärt werden. In Insulin-resistenten Rhesusaffen bzw. Mäusen wurde durch PPAR β eine Zunahme der HDL, sowie eine Abnahme der Triglyzeride im Zellplasma ausgelöst. Zudem konnten erhöhte Insulinwerte im Plasma (eine Folge von Insulinresistenzen) durch die Aktivierung von PPAR β supprimiert werden (Wang *et al.*, 2003; Barak *et al.*, 2002).

2.6.1.4 Implantierung des Embryos in die Plazenta

COX-2 $^{-/-}$ -Mäuse zeichnen sich durch eine verminderte Fruchtbarkeit aus, die zumindest zum Teil auf Problemen bei der Anheftung und der Nidation der Blastozyste beruhen (Lim *et al.*, 1999; Barak *et al.*, 2002). Die Erklärung dafür liegt in der ausbleibenden Aktivierung von PPAR β an den Implantationsstellen. In Wildtyp-Mäusen wird die Expression von PPAR β normalerweise analog zu der von COX-2 während der Nidation induziert. Da COX-2 der limitierende Faktor bei der Umwandlung von Fettsäuren zu Prostaglandinen ist, die als postulierte Liganden für PPARs fungieren, wird PPAR β in COX-2 $^{-/-}$ -Mäusen nicht mehr aktiviert und das Nidationsverhalten der Blastozyste dadurch gestört.

2.6.1.5 Zellproliferation von Prä-Adipozyten

Während PPAR γ der Regulator der finalen Differenzierung der Adipozyten ist, findet man PPAR β vor allem in nicht differenzierten Vorläuferzellen (Hansen *et al.*, 2001; Hellemans *et al.*, 2003). Hier induziert die ektopische Expression von PPAR β die Liganden-abhängige Transkription von Adipozyten-spezifischen Genen, wie PPAR γ_2 und unterstützt als Folge davon die Differenzierung der Adipozyten. Abhängig ist dieser Prozess von der gleichzeitigen Erhöhung des cAMP-Spiegels, z.B. durch Methylisobutylxanthin. Eine Aktivierung von endogenem PPAR β in 3T3-L1-Präadipozyten hat jedoch kaum einen Einfluss auf die terminale Differenzierung von Adipozyten (Hansen *et al.*, 2000).

2.6.1.6 Reifung von Oligodendrozyten

Oligodendrozyten stellen die größte Gruppe von Lipid-produzierenden Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar (Saluja *et al.*, 2001). Es wurden bereits einige Transkriptionsfaktoren identifiziert, die präferenziell in myelinisierten Gliazellen und deren Vorläuferzellen exprimiert werden. Doch wie sie transkriptionell reguliert werden, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Studien von Saluja *et al.* (2001) zeigen, dass die Aktivierung von PPAR β durch entsprechende (synthetische) Liganden die Reifung und Differenzierung von primären und angereicherten Oligodendrozyten-Kulturen stimuliert. Diese These wird durch den Nachweis untermauert, dass auch die Expression der Myelin-Gene MBP („myelin basic protein“) und PLP („proteolipid protein“) durch die Aktivierung von PPAR β induziert wird. Peters *et al.* (2000) konnten die transkriptionelle Regulation der Myelin-Gene in ihren Studien mit PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen zwar nicht zeigen, aber auch hier konnte eine Veränderung des Myelinisierungsgrades des Corpus callosum (Verbindung der beiden Großhirnhemisphären) beobachtet werden.

2.6.1.7 Tumorentwicklung

Die Rolle von PPAR β bei der Proliferation von Tumoren ist vielfältig und teils recht widersprüchlich. Studien von He *et al.* (1999) identifizierten PPAR β als Zielgen des Tumorsuppressors APC („adenomatous polyposis coli protein“) in Kolonkarzinomzellen mit inaktivem APC. Die Induktion der Expression von PPAR β wird hier durch Bindung von β -Catenin/Tcf-4 an den Promotor des Kernrezeptors vermittelt und das Tumorstadium wird stimuliert (Park *et al.*, 2001). Nach Behandlung mit dem PPAR β -Agonisten GW501516 zeigen die APC^{min}-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich erhöhtes Tumorstadium (Gupta *et al.*, 2004). Analog bilden Mäuse mit einer homozygoten Deletion von PPAR β deutlich kleinere Kolonkarzinome als Wildtyp-Mäuse aus (Barak *et al.*, 2002). Auch bei HCT116-Zellen führt die genetische Inaktivierung von PPAR β zur Hemmung der Proliferation von Tumorzellen (Park *et al.*, 2001).

Im Gegensatz dazu weisen neuere Studien mit anderen PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen auf ein erhöhtes Tumorstadium hin (Harman *et al.*, 2004).

Die Expression von PPAR β in epithelialen Hautzellen wird durch den Tumorstadium TPA („12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate“) signifikant erhöht (Peters *et al.*, 2000) und es gibt zunehmend Hinweise auf seine proliferative Funktion bei der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen (Jaeckel *et al.*, 2001; Nijsten *et al.*, 2005).

2.7 Cyclooxygenasen

Die Entwicklung von Tumoren geht häufig mit einer Überexpression der Cyclooxygenase Cox-2 einher (Sakamoto *et al.*, 2004). Hemmt man diese beispielsweise durch den Einsatz von so genannten NSAIDs („non-steroidal anti-inflammatory drugs“) wird einerseits die Aktivität von CDKs und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie gehemmt. Andererseits wird die Synthese des VEGF inhibiert (Müller, 2004 und hier angegebene Referenzen). Cox-2 wird im Gegensatz zur konstitutiv aktiven Cyclooxygenase Cox-1 durch verschiedene transkriptionelle und post-translationale Mechanismen reguliert (Müller, 2004).

Nach Freisetzung der Arachidonsäure durch die „cytosolic“ Phospholipase A₂ (cPLA₂) aus der Zellmembran, wird sie durch die beiden Cyclooxygenasen in PGH₂ umgewandelt. Cox-2 stellt dabei den limitierenden Faktor dar (Smith *et al.*, 2000).

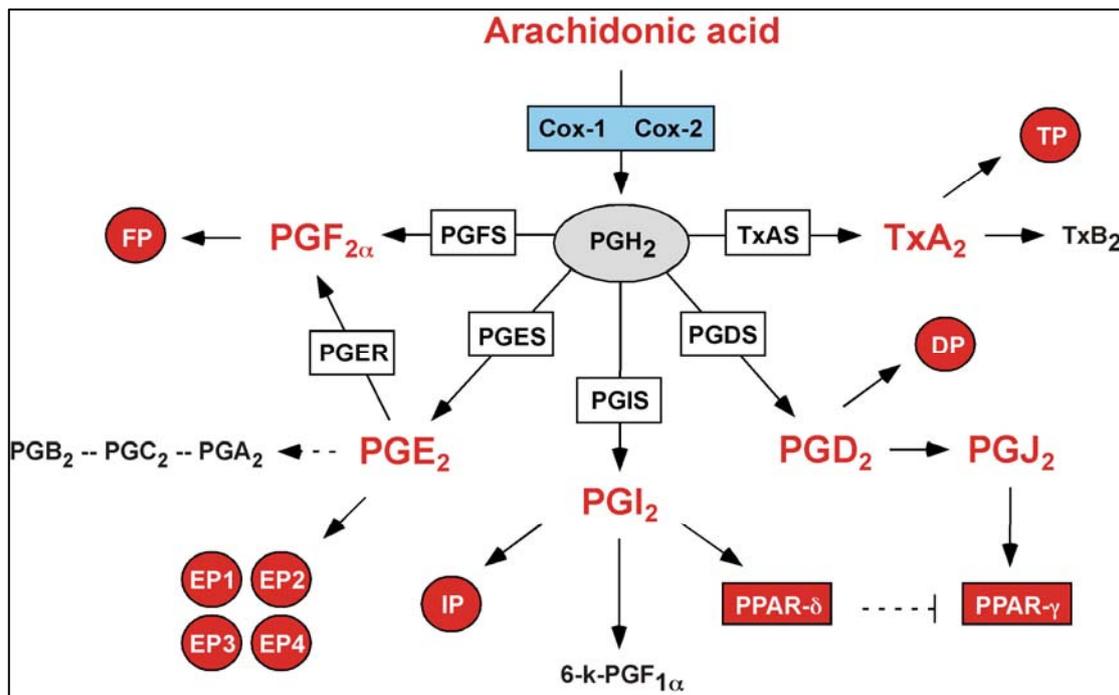


Abb. 4: Prostanoid-Synthese und Membranrezeptoren. PG: Prostaglandin, Tx: Thromboxan; PGJ₂: 15.deoxy-Δ^{12,14}-Prostaglandin J₂, PGDS/PGES/PGFS/PGIS: Prostaglandin D₂/E₂/F₂/I₂-Synthase, (PGIS: Prostacyclin-Synthase), TxAS: Thromboxan-Synthase, PGER: Prostaglandin E₂-Reduktase. Die rot unterlegten, runden Kästen stellen die Membranrezeptoren, die eckigen, rot unterlegten Rechtecke hingegen die Kernrezeptoren dar. In Abwesenheit des Liganden kann PPARβ als intrinsischer Repressor fungieren und bindet an die PPRES von PPARγ-Zielgenen. Quelle: Müller, 2004.

Im Anschluss wird PGH_2 durch weitere Reduktasen und Isomerasen zu verschiedenen Prostaglandinen umgewandelt, die eine regulatorische Funktion auf die Familie der PPARs ausüben (siehe Abb. 4). Prostaglandine sind lokal wirksame Hormone, die die Aktivität der Zellen, in denen sie gebildet werden, aber auch die der Nachbarzellen beeinflussen können. Sie vermitteln ihre Information über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren (Müller, 2004). Die Bindung von Prostazyklin an seinen Membranrezeptor IP führt beispielsweise zur Aktivierung verschiedenster Signalwege, die nicht nur im Rahmen der Vasodilatation, sondern auch bei der terminalen Differenzierung der Adipozyten (Aubert *et al.*, 2000) und beim Thromboseschutz eine wichtige Rolle spielen (Smyth und FitzGerald, 2002; Wise 2003).

Die Regulation der Expression von Cox-2 geschieht in erster Linie durch den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg und die Ras-Rac-MEKK1-JNKK-JNK-Kaskaden (Müller, 2004, sowie die hier erwähnten Referenzen). Weiterhin weist COX-2 in seiner Promotorregion ein PPRE auf und wirft damit die Frage auf, ob PPARs einen direkten Einfluss auf die Transkriptionsrate von COX-2 besitzen. Während es für PPAR_γ diesbezüglich sehr widersprüchliche Aussagen gibt (Meade *et al.*, 1999; Subbaramaiah *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2000), zeigen Studien von Glinghammar *et al.* (2003), einen direkten Einfluss von PPAR_β auf die Expression von COX-2.

2.8 Lipoxygenasen

Arachidonsäure kann nicht nur zu Prostaglandinen und Thromboxanen umgewandelt, sondern auch für die Synthese von Leukotrienen durch diverse Lipoxygenasen verwendet werden (siehe Abb. 5). Dieser Schritt läuft über die Bildung von azyklischen, instabilen und mehrfach ungesättigten Hydroperoxysäuren (HPETE, Hydroperoxyeicosatetraensäuren) ab, die dann weiter zu Leukotrienen, Hepoxilinen, Trioxilinen und Lipoxinen metabolisiert werden. Einige dieser Produkte wurden bereits als spezifische Liganden von PPAR_α (LTB_4) bzw. PPAR_γ (15-HETE) identifiziert. Ob jedoch auch PPAR_β durch Leukotriene oder andere Metaboliten der Lipoxygenasen reguliert wird, ist bisher ungeklärt.

Synthetisiert werden Leukotriene, die als Mediatoren bei allergischen und entzündlichen Erkrankungen eine große Rolle spielen, in den Leukozyten. Gemeinsam mit den Thromboxanen und Prostaglandinen werden Leukotriene in die Gruppe der Eicosanoide eingeteilt.

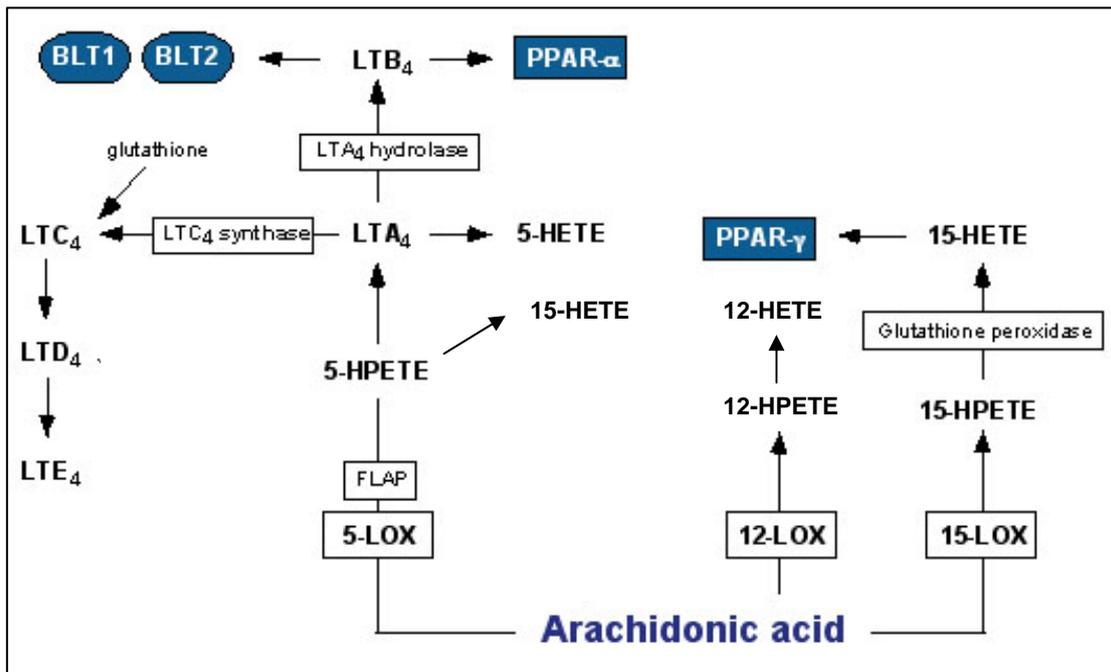


Abb. 5: Umwandlung von Arachidonsäure durch Lipoxygenasen. LOX: Lipoxygenase, HETE: „hydroxy-eicosatetraenoic acid“, FLAP: „5-LOX activating protein“ (dient als Adapterprotein zwischen der Arachidonsäure und der 5-LOX), LTA: Leukotrien. Die blau unterlegten, runden Kästen (BLT1/2) sind G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren, die eckigen, blau unterlegten Rechtecke hingegen Kernrezeptoren. Quelle: modifiziert nach Müller, R., IMT.

2.9 RAS-RAF-ERK-Kaskade

Die Ras-Raf-ERK-Kaskade besitzt mehrere Möglichkeiten, die transkriptionelle Aktivität der PPARs zu beeinflussen: Zum einen wird über Cox-2 und andere Schlüsselgene des Prostaglandinsyntheseweges die Liganden-abhängige Aktivierung der PPARs reguliert (Müller, 2004). Zum anderen werden die Kernrezeptoren durch Phosphorylierung bestimmter Serin- bzw. Threonin-Aminosäuren durch die MAPK („mitogen-activated protein kinase“) reguliert (Aranda und Pascual, 2001). Diese ist ein Mitglied des Ras-Raf-ERK-Signalweges, der in vielen Tumorzellen gestört und damit permanent aktiv ist. Ras-Onkogene entstehen vor allem durch Punktmutationen nach dem Kontakt mit Tabakrauch (Meuwissen *et al.*, 2005). Sie kodieren für GTPasen, die eine große Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose spielen (Chang *et al.*, 2003). So führt Ras nach Aktivierung beispielsweise zur Induktion des Cyclin D1 (Kerkhoff und Rapp, 1998), vermittelt die Bildung der Cyclin D-CDK4/6-Komplexe (Cheng *et al.*, 1998) und beeinflusst pRb bzw. E2F (Kerkhoff und Rapp, 1998).

2.10 Ziele der vorliegenden Arbeit

Prostazyklin (PGI₂) wird in der Literatur häufig als Agonist von PPAR β beschrieben (Lim *et al.*, 1999 und 2002; Gupta *et al.*, 1997; Hatae *et al.*, 2001). Synthetisiert wird es durch den Raf-induzierten Metabolismus von Arachidonsäure, der wiederum durch die Cyclooxygenase Cox-2 und PGIS („prostaglandin I₂ synthase“) vermittelt wird. Um zu überprüfen, ob Prostazyklin tatsächlich der natürliche Ligand von PPAR β ist, sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Expression und Aktivierung von PPAR β mittels induzierbarer Zellsysteme (3T3Raf-ER Zellen) und Reportergenkonstrukte analysiert werden.

Der Einfluss von PPAR β im Rahmen der Tumorigenese erstreckt sich nach bisherigen Erkenntnissen vor allem auf seine anti-apoptotische Wirkung (Di-Poi *et al.*, 2002). Neben PDK-1 (“3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1“) stellt auch Ubiquitin C als Zielgen von PPAR β eine interessante Möglichkeit des Kernrezeptors dar, Proteine des Zellzyklus durch Beeinflussung ihres Ubiquitinierungsgrades zu regulieren (Kim *et al.*, 2004) und damit in die Proliferation einzugreifen. Generell geben die bisherigen Studien jedoch kaum Aufschluss darüber, durch welche Zielgene PPAR β seine proliferative Wirkung ausübt. Im zweiten Teil der Arbeit sollten daher Zielgene für PPAR β identifiziert werden, die für diese Fragestellung relevant sind. Dies sollte durch Einsatz von siRNA-Technologie und anschließendem Microarray durchgeführt werden. Die Validierung der gewonnenen Daten sollte mit Hilfe verschiedener Zellsysteme und Real-Time-PCR erfolgen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Zentrifugen:	Tischzentrifuge Typ Biofuge Pico für 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße (Fa. Heraeus, Hanau)	
	Kühlzentrifuge 5402 für 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg)	
	Kühlzentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JS-13.1 oder Rotor JA-20 (Fa. Beckmann, München)	
	Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R für PP-Röhrchen (Heraeus, Hanau)	
	Vakuumpumpe Typ RZ8 (Vacuubrand, Wertheim)	
Inkubatoren:	Vakuumpumpe Typ RZ8 (Vacuubrand, Wertheim)	
<ul style="list-style-type: none"> • Bakterien: • Zelllinien: 	<p>Schüttelinkubator AJ112 (Infors, Bottmingen/Schweiz)</p> <p>Brutschrank, nicht begasbar, 37 °C, Modell BBD6120 (Fa. Heraeus, Hanau)</p> <p>CO₂-begasbarer Brutschrank, 37 °C, Modell BBD6220 (Fa. Heraeus, Hanau)</p>	
Heizblock:	<p>Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>Dri-Block DB-3 (Fa. Techne, Dextford-Cambridge/ England)</p>	
Elektrophorese:	<ul style="list-style-type: none"> • Agarosegele: • SDS-PAGE: 	<p>Wide Mini Sub Cell für Agarosegele (Fa. Biorad, München)</p> <p>Biorad Proteon II, 8.6 cm X 7.7 cm (Fa. Biorad, München)</p> <p>SDS-PAGE Mini-Protean[®] II (Fa. BioRad, München)</p>
Netzgeräte:	<p>Model 200/2.0 (Fa. Biorad, München)</p> <p>Model ST504 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)</p> <p>Model LKB-ECPS 3000/150 (Fa. Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England)</p>	
Mikroskope:	<p>Leitz Fluovert (Fa. Leitz, Wetzlar)</p> <p>Axiovert 40 CFC mit den Filtern Ph1-0.4, Ph2-0.4 (Fa. Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood/USA)</p> <p>Leica DMR mit Digitalkamera Spot (INTAS)</p>	

Gefäße:	<p>Einfrierröhrchen, 1 ml (Fa. Nunc, Wiesbaden)</p> <p>Eppendorf-Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>6-Well-Platten und Zellkulturschalen (Fa. Nunc, Wiesbaden)</p> <p>PP-Röhrchen, 15 ml und 50 ml (Fa. Greiner, Nürtlingen)</p>
Waagen:	<p>Universalwaage Sartorius Laboratory (Fa. Sartorius, Göttingen)</p> <p>Feinwaage Sartorius Research R200D (Fa. Sartorius, Göttingen)</p>
Sonstiges:	<p>Autoklav Bioclav (Fa. Schütt, Olching) und Autoklav Fedegari (Fa. Schütt, Olching)</p> <p>AutoLumat LB 953 Luminometer (Fa. Berthold, Düsseldorf)</p> <p>Beheizbarer Magnetrührer MR 3001 (Fa. Heidolph, Kelheim)</p> <p>ELISA Reader SPECTRA MAX340 (Fa. MWG Biotech, Ebersberg)</p> <p>Mikrowelle Privileg 7533P (Fa. Quelle, Forth)</p> <p>Milli-Q Water System (Fa. Millipore, Eschborn)</p> <p>PCR-Gerät Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Fa. Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)</p> <p>Minihybridisationsofen (Fa. Bachofer, Reutlingen)</p> <p>Filmkassette Biomax Cassette (Fa. Eastman Kodak Co., Rochester/USA) und BAS cassette 2040 (Fa. Fujifilm, Midwest/USA)</p> <p>Phospho-Imager: Fuji-Raytest-Scanner + Eraser für Imaging Plates (Fa. Raytest, Staubenhardt)</p> <p>Photometer Spectro-Max 340 (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg) mit Computerprogramm Softmax Pro Version 1.2.0 (Fa. Molecular Devices, Ismaning-München) und Ultrospec 3000 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire/England)</p> <p>pH-Meter Model PHM 83 Autocal (Fa. Radiometer, Copenhagen/Dänemark) und pH-Meter 764 Multi-Calimatic (Fa. Knick, Egelsbach)</p> <p>Pipetten Research der Firma Eppendorf (Hamburg)</p> <p>PosiBlot® 30-30 Pressure Blotter und Pressure Control Station, 230V (Fa. Stragene, Amsterdam/Niederlande)</p>

Real-Time PCR System Mx3000P™ (Stratagene, Amsterdam/Niederlande)

Robocycler 96 (Fa. Stratagene, Amsterdam/Niederlande)

Röntgenfilm Entwicklermaschine X-Omat 2000 Processor
(Fa. Kodak, Rochester/USA)

Scanner FLA 3000 (Fa. Fujifilm, Midwest/USA)

Sicherheitswerkbank Typ HA 2448 (Fa. Heraeus, Hanau)

Stickstofftank Chronos Biosafe (Fa. Messer-Griesheim, Düsseldorf)

Szintillationszähler LS 1701 (Fa. Beckman, München)

Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Fa. BioRad, München)

UV Stratalinker 2400 (Fa. Stratagene, Amsterdam/Niederlande)

UV-Transilluminator (Fa. IVP, San Gabriel/USA) mit Videokamera, Monitor und Videoprinter Modell P68E (Fa. Mitsubishi, Japan)

Vortex REAX2000 (Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG Schwabach) und **Vortex VF2**, sowie **Ika-Vibrax-VXR** (Fa. IKA-Labortechnik, Staufen)

Wasserbad (Fa. GFL, Burgwedel)

3.2 Chemikalien und allgemeine Lösungen

Substanz	Bezugsquelle
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Fa. Amersham Biosciences (Amersham Buchler), Braunschweig
Actinomycin D	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aspirin	Fa. Cayman chemical company (IBL, Hamburg)
BenchMark Prestained Protein Ladder	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Carbaprostazyklin	Fa. Cayman chemical company (IBL, Hamburg)
GW501516	Fa. Calbiochem (Merck Biosciences GmbH, Bad Soden)
Doxyzyklin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
4-Hydroxy-Tamoxifen	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
1 kb DNA Leiter	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Protease Inhibitor Cocktail (#P8340)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protran Nitrocellulose Transfer Membrane	Fa. Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel
ROTIPHORESE Gel 30 (37,5:1)	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
sc-58125	Fa. Calbiochem (Merck Biosciences GmbH, Bad Soden)
U51605	Fa. Cayman chemical company (IBL, Hamburg)
U0126	Fa. Promega GmbH, Mannheim

Alle verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.A. und wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Bad Soden), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München).

3.2.1 Allgemeines

A.a.i.:	aqua ad injectabilia Braun, aliquotiert und autoklaviert	
H ₂ O:	Milli-Q, gereinigt und autoklaviert	
PBS:	„Phosphate buffered saline“	6.5 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 2.5 mM KCl 140 mM NaCl pH 7.25; autoklaviert

3.2.2 Bakterienkultur

LB-Medium	1 % (w/v) Pepton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7.5 (mit 1 N NaOH eingestellt)
LB-Agar	LB-Medium mit 1 % (w/v) Bacto-Agar pH 7.5 (mit 1 N NaOH eingestellt)

Spezielle Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

3.3 Kits

Name	Bezugsquelle
„Biorad DC Protein Assay“	Fa. Biorad Laboratories, München
“DNeasy Tissue Kit”	Fa. Qiagen, Hilden
“ECL Plus Western Blotting detection reagents”	Fa. Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England
“Nucleobond AX 100”	Fa. Macherey-Nagel, Düren
“NucleoSpin Extract II (gel extraction kit)”	Fa. Macherey-Nagel, Düren
„QIAquick Nucleotide Removal Kit“	Fa. Qiagen, Hilden
„RNeasy Mini Kit“	Fa. Qiagen, Hilden
“TOPO TA cloning kit dual promoter”	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
“1st strand cDNA synthesis kit” (#1483188)	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim

Soweit nicht anders an entsprechender Stelle vermerkt, wurden alle Reaktions- und Nachweissysteme nach den Angaben des jeweiligen Herstellers angewendet.

3.4 Antikörper

Name	Bezugsquelle
PPAR β	Santa Cruz (sc-1987)
ERK1	Santa Cruz (sc-94)
pERK1/2	Santa Cruz (sc-7383)
Aktin	Chemicon (MAB1501)
Anti-Ziege-HRP	Santa Cruz (sc-2768)
Anti-Maus IgG2 α -HRP	Santa Cruz (sc-2061)
Anti-Maus IgM-HRP	Santa Cruz (sc-2064)
Anti-Maus IgG-HRP	Chemicon (AP124P)

3.5 siRNA

Name	Bezugsquelle	Zielsequenz
Negative control siRNA Alexa Fluor 488	Fa. Qiagen, Hilden	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT
mPPAR β 1-1	Fa. Qiagen, Hilden	CCG CAT GAA GCT CGA GTA TGA
mPPAR β 1-2	Fa. Qiagen, Hilden	CAA GTT CGA GTT TGC TGT CAA

3.6 Computerprogramme und Datenbanken

DNA-Sequenzen wurden den Internet-Datenbanken „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sowie Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) entnommen und als Grundlage für das Design von Oligonukleotiden mit Hilfe des Programms PrimerSelect (Fa. DNA STAR, Madison/USA) herangezogen. Die Quantifizierung von Röntgenfilm-Schwärzungen geschah mit Hilfe des Programms „Image Gauge 3.01“ (Fa. Fujifilm, Tokyo/Japan). Die Auswertung der Real-Time PCRs geschah mittels der im Lieferpaket der Fa. Stratagene (La Jolla/ USA) enthaltenen Software Mx3000P.

3.7 Zellkulturmedien und -lösungen

DMEM	„Dulbeccos modified eagle medium – high glucose“, Fa. PAA, Cölbe
RPMI 1640	„Roswell Park Memorial Institute 1640“, Fa. PAA, Cölbe
EGM-2	Fa. Cambrex Bio Science, Verviers (Belgien)
FCS	„Fetal calf serum“, Fa. Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Fa. Cambrex Bio Science, Verviers/Belgien
Penicillin/Streptomycin	Fa. Cambrex Bio Science, Verviers (Belgien)

Die Zellkulturmedien wurden, falls nicht besonders erwähnt, mit 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin (5000 units/ml) / Streptomycin (5000 mg/ml) versetzt.

3.8 Methoden

3.8.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.8.1.1 Verwendete *Escherichia coli*-Bakterienstämme

E. coli Stamm DH5 α

Genotyp: supE44 lacU169 (80lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA69 thi-1 relA149

E. coli Stamm XL1Blue

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac f'Z Δ M15 Tn10(ter^r)]

Nähere Erläuterungen hierzu siehe Sambrook *et al.* (1989) und Brown (1991).

3.8.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Durch die Behandlung mit eiskalter Kalziumchloridlösung wurden Bakterien zur spontanen Aufnahme von Fremd-DNA (Transformation) befähigt. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie DH5 α - bzw. XL1Blue inokuliert und üN bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Kultur wurde in 500 ml LB-Medium in einen 2 l Er-

lenmeyerkolben überführt und wiederum bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD600 (optische Dichte bei 600 nm) von maximal 0,4 kultiviert.

Damit wurde garantiert, dass sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und in sauberen Zentrifugenbechern für 15 min bei 3000 UpM und 4 °C pelletiert. Die Überstände wurden verworfen, die Bakterienzellen in 200 ml eiskalter 0,1 M Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert.

Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 20 ml eiskalter 0,1 M Kalziumchlorid-Lösung aufgenommen und nach Zugabe von 5 ml Glycerin (Endkonzentration von 20 %) in 500 µl Aliquots bei – 80 °C gelagert.

3.8.1.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Fremd-DNA in *E. coli* Bakterien wurde die oben beschriebenen Aliquote transformationskompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut.

Je 150 µl wurden mit 0,5 – 1 µg Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Hitzeschock-Behandlung für 90 sek bei 42 °C. Nach einer Abkühlungsphase von 3 min auf Eis wurden die transformierten Bakterien mit je 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium vermischt und in PP-Röhrchen für 45 min bei 37 °C geschüttelt.

Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden diese Kultur entweder in einen 100 ml Ansatz mit LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt oder es wurden 100 µl davon auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert.

3.8.1.4 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte, sofern nicht anders angegeben, stets in sterilen Glas- oder Plastikgefäßen bei 37 °C. Als Kulturmedium wurde Luria-Bertani Medium (LB) verwendet.

Nähere Erläuterungen hierzu finden sich ebenfalls bei Sambrook *et al.* (1989) und Brown (1991), sowie im Kapitel 3.2 bzw. 3.2.2 (allgemeine Lösungen).

3.8.1.5 Plasmidisolierung (Mini-Präparation)

Für die Isolierung kleinerer Mengen an Plasmid-DNA, um Subkolonien nach einer Transformation auf Integration der Fremd-DNA zu überprüfen, wurden 5 ml LB-Medium mit je einem Klon einer antibiotikumhaltigen Agarplatte (siehe Kapitel 3.8.1.3) inokuliert

und üN bei 37 °C unter stetem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 4 ml der Bakterienkultur für 3 min bei 13 000 UpM sedimentiert und der Überstand verworfen.

Die Aufreinigung geschah unter Verwendung der Puffer S1, S2 und S3 aus dem Nucleobond AX Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren): Das Pellet wurde in 200 µl kaltem Puffer S1 resuspendiert und durch Zugabe von 400 µl Puffer S2 lysiert. Dem gründlichen Mischen durch mehrmaliges Invertieren der Reaktionsgefäße schloss sich eine 5-minütige Inkubation des Gemisches bei RT an. Im nächsten Schritt wurde das Lysat mit 300 µl kaltem Puffer S3 neutralisiert, denaturiert und auf eine hohe Salzkonzentration gebracht. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 3 min bei 13 000 UpM zentrifugiert und die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA, sowie Zelltrümmer vom plasmidhaltigen Überstand getrennt, der in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 900 µl Isopropanol versetzt wurde. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte für 5 min bei 13 000 UpM. Die DNA wurde im Anschluss mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation für 5 min bei 13 000 UpM pelletiert.

Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in 30 µl sterilem A.a.i.-Wasser gelöst und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert. Pro Restriktionsverdau (siehe Kapitel 3.8.1.8) wurden 10 µl – 15 µl der DNA-Präparation eingesetzt.

3.8.1.6 *Quantitative Plasmidisolierung*

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad für Transfektionen, Klonierungen oder Sequenzierungen wurde das auf Säulenchromatographie basierende Reaktionssystem „Nucleobond AX100“, sowie die entsprechenden Lösungen der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Hierzu wurden die 100 ml des oben genannten üN-Ansatzes (siehe Kapitel 3.8.1.3) am nächsten Morgen für 15 min bei 4 °C und 3000 UpM pelletiert und gemäß den Herstellerangaben aufgearbeitet. Hierbei wurden pro 100 ml LB-Ansatz zwei Säulen verwendet. Die Elution der DNA erfolgte pro Säule in 100 µl sterilem A.a.i.-Wasser.

3.8.1.7 *Quantifizierung von Plasmid-DNA*

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektralphotometrisch gegen A.a.i. als Referenz ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml an doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

3.8.1.8 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die gezielte Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen innerhalb spezifischer DNA-Sequenzen wurde mit Enzymen der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bzw. der Firma NewEnglandBiolabs (Schwalbach) für 2 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur durchgeführt. Die benötigte Enzymmenge (U) pro μg Plasmid wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Größe } \lambda \text{ DNA (37kb)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen des entsprechenden Enzyms im Plasmid}}{\text{Größe des Plasmids (kb)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen des Enzyms im } \lambda \text{ - Genom}}$$

Die Angaben über die Anzahl der entsprechenden Schnittstellen im λ -Genom wurden dem Katalog von Invitrogen (Karlsruhe) entnommen.

Für optimale Bedingungen wurden die mitgelieferten Puffer eingesetzt. Die Reaktionsvolumina betragen jeweils 50 μl , wobei für analytische Maßstäbe bis zu 0,5 μg , für präparative bis zu 10 μg Plasmid-DNA eingesetzt wurde.

3.8.1.9 Analyse von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung restriktionsverdauter Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.8.1.8), zur Analyse von PCR-Reaktionen (siehe Kapitel 3.8.1.25), sowie zur präparativen Isolierung definierter DNA-Moleküle wurden horizontale TAE-Agarosegele mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid verwendet. Da die Laufgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten im Gel umgekehrt proportional zu ihrer Größe ist, wurden Agarosegellkonzentrationen zwischen 0,8 % (w/v) und 2,0 % (w/v) verwendet. Als Laufpuffer diente 1 x TAE. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und bei 10 V pro cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker (1 kb-DNA-Leiter, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) mit auf das Gel aufgetragen. Nach in der Regel 30 min Elektrophorese wurde die DNA über das interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht, und das Ergebnis mittels einer Videodokumentationsanlage festgehalten.

TAE-Puffer (Tris-Azetat-EDTA)	40 mM 1mM	Tris-Azetat, pH 8.0 EDTA
Probenpuffer	50 mM 50 % (v/v) 0,15 % (w/v)	EDTA Glyzerin Bromphenolblau

3.8.1.10 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA-Molekülen definierter Größe aus einem Agarosegel erfolgte säulenchromatographisch unter Verwendung des „NucleoSpin Extract II“-Reaktionssystems (Fa. Macherey-Nagel, Düren) und gemäß der Angaben des Herstellers.

3.8.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Phosphodiester-Bindungen können von Enzymen entweder zwischen kompatiblen kohäsiven oder zwischen glatten Enden gebildet werden.

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurden DNA-Fragmente durch das Enzym T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) mit adäquat restringierter Vektor-DNA kovalent verbunden.

Dabei ist zu beachten, dass durch ein Enzym linearisierte Vektor-DNA vor dem Einsatz in die Ligationsreaktion am 5'-Ende dephosphoryliert wurde, um Religationen zu verhindern. Hierfür wurde der Restriktionsansatz nach Beendigung der Restriktion mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP, Fa. Life Technologies, Karlsruhe) versetzt und nach Angaben des Enzym-Herstellers inkubiert.

3.8.1.12 TOPO-TA-Klonierung

Zur Ligation von PCR-Fragmenten in den pCRII-TOPO Vektor (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) wurde die TA-Überhang-Methode verwendet. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die *Taq*-DNA-Polymerase während der Elongation an die 3'-Termini der PCR-Produkte zusätzliche Adenosine anhängt. Dieser Umstand ermöglicht es, das PCR-Produkt mit Hilfe der kovalent an das Plasmid gebundenen Topoisomerase I direkt in den linearisierten pCRII-TOPO Vektor mit einzelner T-Überhang am 3'-Ende zu klonieren.

Wurde für die PCR eine DNA-Polymerase mit „proof-reading“ Funktion eingesetzt, so wurde im Anschluss der DNA-Amplifikation eine 10-minütige Inkubation des PCR-Ansatzes bei 72 °C mit nachträglich zugegebener *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt, bevor das PCR-Fragment in die Ligationsreaktion eingesetzt wurde.

Für Ligationen von PCR-Fragmenten in den pCRII-TOPO Vektor wurden 4 µl des PCR-Ansatzes (siehe Kapitel 3.8.1.25) mit 1 µl des Vektors pCRII-TOPO, sowie 1 µl der im Kit enthaltenen Salzlösung versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde dann komplett in *E. coli* Bakterien transformiert (siehe Kapitel 3.8.1.3).

Auf diese Art wurde beispielsweise die PGES-Sonde für den Northern Blot mit den folgenden Primern generiert:

hPGES_up	5'-CACGCTGCTGGTCATCAAGA-3'
hPGES_down	5'-TAGGTCACGGAGCGGATGG-3'

3.8.1.13 Klonierungsstrategien

pTRE2hyg-hPPAR β

Die Klonierung des Tetracyclin-induzierbaren, humanen PPAR β geschah durch Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments mittels PCR; als „Template“ diente DNA von HeL299-Zellen. Die richtige Orientierung wurde mit einem Restriktionsverdau mit *EcoRV* (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) überprüft (453 bp Fragment) und mit *Bam*HI, sowie *Not*I in den entsprechend geschnittenen Vektor pTRE2hyg (Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg) kloniert. Der Kontrollverdau mit *EcoRV* lieferte ein Fragment der Größe 495 bp.

pcDNA3.1-hPPAR β

Das humane „full-length“ PPAR β aus dem beschriebenen pTRE2hyg-hPPAR β -Vektor wurde mit *Bam*HI (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und *Not*I (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) herausgeschnitten und in den entsprechend behandelten Expressionsvektor pcDNA3.1 ligiert. Der Kontrollverdau mit *Bgl*II lieferte ein 2,29 kb großes Fragment, der Restriktionsverdau mit *EcoRV* ein Fragment von 453 bp.

pcDNA3.1-hPGES

Für die Klonierung des humanen „full-length“ PGES in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) wurde der DNA-Abschnitt zunächst mittels einer RT-PCR aus DNA (siehe oben) amplifiziert und mittels TOPO-TA-Klonierung (siehe oben) in den pCRII-TOPO-Vektor inseriert. Die gewünschte 5'-3'-Orientierung des Fragmentes wurde im Anschluss mittels eines Restriktionsverdaus (siehe Kapitel 2.8.1.8) mit *Hind*III (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und *Cl*I (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) überprüft (564 bp Fragment). Durch den Einsatz von *Bam*HI und *Not*I wurde das humane PGES nun aus dem pCRIITOPO-Vektor herausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Nach dem positiven Kontrollverdau des Klons 9 mit *Hind*III und *Cl*I (522 bp Fragment) wurde die vollständige Sequenz des positiven Klons durch Sequenzierung (siehe Kapitel 3.8.1.14) überprüft.

3.8.1.14 DNA-Sequenzierung

Nach der Klonierung und dem positiven Restriktionsverdau wurden sämtliche PCR-Produkte sequenziert, um unerwünschte Mutationen auszuschließen (Fa. Seqlab, Göttingen). Als Startermoleküle dienten entsprechend synthetisierte Oligonukleotide.

Plasmid	Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Länge (nt)
pTRE2hyg	pTRE2hyg_up(400)	GTT TTG ACC TCC ATA GAA GAC ACC	24
	pTRE2hyg_dn(593)	TAG CGA AAA AGA AAG AAC AAT CAA	24
pQE31	pQE31_rev	GGT CAT TAC TGG AGT CTT G	19
	pQE31_fw	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG	20
pBI-5	pBI5_sense	GTT TAC CAC TCC CTA TCA	18
	pBI5_antisense	TAA ACA ACA CCC TGA AAA	18
pGL3	RVprimer3	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	20
	pGL3_e	CCG GGC CTT TCT TTA TG	17
	pGL3_s	AGC AAA ATA GGC TGT CCC	18
Plasmide mit T7 Promotoren	T7	AAT ACG ACT CAC TAT AGG G	19
pcDNA3.1	BGHreverse	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	18
pCMX	Seq_pCMX_rev	TTA AAG GCA TTC CAC CAC TGC TCC	24
pUTrt 62.1	pUTrt_up	ACA GGC ATC ATA CCC ACT T	19
	pUTrt_down	CTT GAT GCT CCT GTT CCT C	19
pCRII-TOPO	M13(-20)fw	CTG GCC GTC GTT TTA C	16
	M13rev(-29)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	18

3.8.1.15 Proteinextraktion aus dem Zytoplasma

Für die Extraktion von Proteinen aus dem Zytoplasma diverser Zelllinien wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der 10 cm Kulturschale abgelöst und in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 UpM und 4 °C wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und je nach Pelletgröße in 80 bis 180 µl Lysispuffer resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubation auf Eis. Durch eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 13 000 UpM und 4 °C wurde der proteinhaltige Über-

stand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei – 20 °C bis – 80 °C gelagert.

1 %-iger Triton-X-100 Lysispuffer	50 mM Hepes-NaOH, pH 7,5
	150 mM NaCl
	10 % Glycerol
	1 % Triton-X-100

Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4 °C. Zum Schutz vor Proteinabbau wurde dem Lysispuffer kurz vor Gebrauch ein Proteinase-Inhibitor-Cocktail der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) im Verhältnis 1:100 zugegeben.

3.8.1.16 Proteinextraktion aus dem Zellkern

Für die Extraktion von Proteinen, die bevorzugt im Zellkern vorkommen, wurde das Protokoll des CelLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) mit den hier angegebenen Puffern nach Angaben des Herstellers verwendet.

10 x Lysispuffer, hypotonisch	100 mM Hepes, pH 7,9 15 mM MgCl ₂ 100 mM KCl
Extraktionspuffer	20 mM Hepes, pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 0,42 M NaCl 0,2 mM EDTA 25 % (v/v) Glycerol
DTT	0,1 M
Igepal CA-630	10 %ig in sterilem A.a.i.-Wasser

Sowohl dem Lysispuffer, als auch dem Extraktionspuffer wurden, den Angaben des Herstellers folgend, kurz vor Gebrauch DTT mit einer finalen Konzentration von 1 mM, sowie der Protease-Inhibitor-Cocktail der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) im Volumenverhältnis 1:100 zugegeben.

In der Regel wurde eine 100 % konfluente 10 cm Kulturschale für die Extraktion der Kernproteine verwendet.

3.8.1.17 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten oder in Luziferase-Proben erfolgte - modifiziert nach Lowry (Lowry, 1951) - basierend auf der Reduktion von Folin-Reagenz durch Kupfer-behandelte Proteine. Für die Blaufärbung des Reagenzes sind in erster Linie die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, sowie zu einem geringeren Anteil Cystein und Histidin verantwortlich.

Die Proteinbestimmung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mittels des Bio-Rad-DC-Protein Assays (Fa. Biorad, München). Hierzu wurden je 3 µl des Zelllysates mit 25 µl der Lösung A' versetzt, die zuvor durch Mischen von 20 µl Lösung S mit 1 ml Lösung A frisch hergestellt wurde. Nach Zugabe von 200 µl Lösung B und einer anschließenden 15-minütigen Inkubation bei RT, konnte die Absorption in Mikrotiterplatten bei 650 nm mit Hilfe eines ELISA Readers SPECTRA MAX340 (Fa. MWG Biotech, Ebersberg) gemessen werden. Anhand einer BSA-Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten bestimmt.

3.8.1.18 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten nach ihrem Molekulargewicht wurden die Proben mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit β-Mercaptoethanol reduziert. Mittels der Bindung von SDS an hydrophobe Regionen eines Proteins werden negative Ladungen eingeführt, welche die Eigenladung des Proteins derart überdecken, dass die Mobilität des Proteins im Acrylamidgel nicht mehr von seinem isoelektrischen Punkt, sondern nur noch von seiner Größe abhängt.

Die Elektrophorese wurde mit vertikalen Gelapparaturen bei einer konstanten Spannung von 90 bis 140 V pro Gel durchgeführt, wobei der Elektrophoresepuffer sowohl als Anoden-, als auch als Kathodenpuffer Verwendung fand.

Die zur Auftrennung der Proteine verwendeten Gele bestanden aus Sammel- und Trenngel. Dabei hatten die verwendeten Sammelgele eine Acrylamidkonzentration von 3 %, die Trenngele von 12 % und beide eine Endkonzentration von 1 % SDS. Nach Gießen des Trenngels wurde dieses vorsichtig mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erzielen. Nach Abschluss der Polymerisierung, erkennbar an einer deutlichen Trennlinie zwischen dem Alkohol und dem Trenngel, wurde der Isopropanol abgekippt und das Sammelgel gegossen.

Die zu untersuchenden Proben (in der Regel zwischen 10 und 100 µg Gesamtprotein) wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden wurde zudem „BenchMark Prestained Protein Ladder“ (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) auf das Gel

aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte dann zunächst bei 90 V im Sammelgel und anschließend bei bis zu 140 V im Trenngel.

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das Sammelgel entfernt und die aufgetrennten Proteine im Trenngel mittels Western-Transfer auf eine Membran übertragen.

Sammelgel (3 %-ig)	500 µl 30 % AA ROTIPHORESE Gel-30 (Roth GmbH & Co, Karlsruhe) 380 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 30 µl 10 % SDS 2,1 ml H ₂ O 10 µl TEMED 20 µl 10 % APS
Trenngel (12 %-ig)	4 ml 30 % AA ROTIPHORESE Gel-30 (Roth, Karlsruhe) 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 100 µl 10 % SDS 3,3 ml H ₂ O 25 µl TEMED 50 µl 10 % APS
SDS-Probenpuffer	3 ml Glyzerol 3 ml 10 % SDS 1 ml 0,625 M Tris-HCl, pH 6,8 0,5 ml β-Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer (1l)	3 g Tris 14,4 g Glycin 10 ml 10 % SDS

- AA (Acrylamid-Stammlösung): 39,5 % Acrylamid/1 % Bisacrylamid-Fertigmix (Fa. Roth, Karlsruhe)
- APS (Ammoniumpersulfat): 10 % in H₂O
- TEMED [N, N, N', N' – Tetramethylendämin] (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

3.8.1.19 Western-Transfer (Kyhse-Andersen, 1984)

Zum immunologischen Nachweis eines bestimmten Proteins nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die Proteine zunächst auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und anschließend immunologisch detektiert (2.8.1.20). Für den Transfer wurde eine „semi-dry“-Blotapparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell der Fa. BioRad, München) verwendet.

Der Aufbau des Blots erfolgte luftblasenfrei auf der Anodenplatte nach folgendem Schema: zwei Whatman Filterpapiere, Nitrozellulose-Membran, Gel, 2 Whatman Filterpapiere. Dabei wurden die Filterpapiere, sowie die Nitrozellulose-Membran vorher mit Western-Blot-Transferpuffer befeuchtet.

Die Übertragung der Proteine auf die Membran fand bei 10 V für 30 bis 40 min statt.

Western-Blot-Transferpuffer	25 mM Tris
	285 mM Glycin
	20 % (v/v) Methanol

3.8.1.20 Immunoblot

Die spezifische Detektion elektrophoretisch aufgetrennter und immobilisierter Proteine (siehe Kapitel 3.8.1.18 und 3.8.1.19) erfolgte in einem indirekten Enzym-Immunoverfahren. Die Membran wurde zunächst für mindestens 1 h bei RT mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS/0,01 % Tween-20 geblockt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu unterdrücken. Anschließend wurde sie für 3 h bei RT oder besser ü.N bei 4 °C mit der Erstantikörperverdünnung auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit PBS/0,01 % Tween-20 für je 5 bis 10 min gewaschen und mit der Zweitantikörperlösung für eine weitere Stunde bei RT schüttelnd inkubiert. Der Nachweis des gebundenen Zweitantikörpers erfolgte nach erneutem gründlichen Waschen (siehe oben) unter Verwendung eines ‚hauseigenen‘ Chemilumineszenzsystems, das im Wesentlichen dem „ECL“-System (Fa. Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England) entspricht: Dazu werden 5 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 mit 10 µl H₂O₂ versetzt und mit weiteren 5 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 vermischt, zu dem zuvor 22,2 µl Cumarinsäure, sowie 50 µl Luminol zugegeben wurden. Nach einer 1- bis 5-minütigen Inkubation der Nitrozellulose-Membran in dieser Lösung wurde die Membran vorsichtig abgetropft und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale geschah mittels 1- bis 30-minütiger Exposition eines Röntgenfilms („Hyperfilm ECL“, Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England).

3.8.1.21 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurde das „RNeasy Mini Kit“ der Fa. Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet: Laut Aussage von Qiagen ermöglicht dieses System durch den Einsatz eines Hochsalzpuffer-Systems die Bindung von bis zu 100 µg RNA an die Silicagel-Membran.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der entsprechenden Kulturschale (in der Regel 6 bis 10 cm Schalen) abgelöst und abzentrifugiert.

Im Anschluss daran wurde das Pellet im stark denaturierenden, Guanidinothiocyanat enthaltenden Puffer RLT lysiert und mit Hilfe der „QIAshredder“-Säulen homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol wurde das Lysat nun auf die „RNeasy“ Säulen aufgetragen. Die an die Säulen gebundene Gesamt-RNA (RNA-Moleküle mit einer Länge von über 200 Nukleotiden) konnte somit durch verschiedene Waschgänge von allen anderen Substanzen gereinigt und schließlich sauber mit sterilem, RNasen-freiem A.a.i.-Wasser von der Säule eluiert werden.

Für die Isolierung von RNA aus tierischen Gewebeproben, wie z.B. der Lunge, wurden maximal 30 mg Gewebe mit einem sterilen Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und dann im Puffer RLT mit Hilfe eines elektrischen Rotor-Stator-Homogenisators (Typ T8, Fa. IKA Labortechnik, Stauffen) gleichzeitig aufgeschlossen und homogenisiert. Die folgenden Schritte wurden nach den Anleitungen des Herstellers ausgeführt.

3.8.1.22 Quantifizierung von RNA

Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch gegen A.a.i. als Referenz ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml doppelsträngiger RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

3.8.1.23 Northern Blot (modifiziert nach Lei *et al.*, 2001)

Zum Nachweis spezifischer RNA aus einem heterogenen RNA-Gemisch aus Zellen wurden Northern Blots durchgeführt. Dazu wurden zwischen 5 µg (z.B. für den Nachweis von Aktin) und 20 µg RNA mittels eines denaturierenden Agarosegels elektrophoretisch getrennt.

Dafür wurden zuvor sämtliche Bestandteile der Gelapparatur für 30 min in 3 %-igem H₂O₂ inkubiert, um etwaige RNasen zu eliminieren und anschließend gründlich mit Wasser gespült. 1 Volumen RNA wurde üblicherweise mit 2 Volumen RNA-

Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 68 °C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und mit 2 µl RNA-Gelpuffer versetzt. Die RNA wurde dann auf ein 1 %-iges Agarosegel (mit 2,2 M Formaldehyd) aufgetragen und bei 80 V (5 bis 10 V je cm Elektrodenabstand) für etwa 2 h getrennt.

RNA-Probenpuffer (- 20 °C, vor Licht geschützt)	0,5 ml 10 x MOPS Puffer 1,75 ml 37 % Formaldehyd 5 ml Formamid
RNA-Gelpuffer (4 °C)	50 % (v/v) Glycerol 1 mM EDTA, pH 8,0 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
RNA-Elektrophoresepuffer (1 x MOPS-Puffer, autoklaviert, Lagerung bei 4 °C)	20 mM MOPS, pH 7,0 (Fa. Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München) 5 mM Natriumazetat 0,5 mM EDTA, pH 8,0
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumzitat pH mit 1 M HCl auf 7,0 einstellen
(Prä-)Hybridisierungslösung	5 x SSC 5 x Denhardt Lösung 50 % (v/v) Formamid 1 % SDS Kurz vor Gebrauch frisch zugegeben: 100 µg/ml denaturierte Heringssperma- DNA
100 x Denhardt Lösung	0,05% Polyvinylpyrolidon 0,05 % Ficoll 0,05% bovines Serumalbumin
Formamid-Deionisierung	5 g „mixed bed ion exchange resin“ (Fa. BioRad, München) in 100 ml Formamid geben

	1 h bei RT rühren lassen durch Whatman Papier Nr. 1 filtern
Waschlösung I	2 x SSC/0,1 % SDS
Waschlösung II	0,1 x SSC/0,1 % SDS

3.8.1.23.1 RNA-Transfer

Vor dem Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA wurde das Agarosegel durch zweimaliges Eintauchen in 10 x SSC äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte luftblasenfrei in einem „PosiBlot® 30-30 Pressure Blotter“ (Fa. Stragene, Amsterdam/Niederlande) in folgender Reihenfolge: zwei in 10 x SSC angefeuchtete Whatman Filterpapiere, eine Nylonmembran Hybond-N (Fa. Pharmacia, Freiburg), die zunächst in Wasser, dann ebenfalls in 10 x SSC äquilibriert wurde, das Gel und zum Abschluss zwei weitere in 10 x SSC angefeuchtete Whatman Papiere. Darüber wird ein in 10 x SSC getauchter Schwamm gelegt und die Kammer sorgfältig verschlossen. Das Blot wurde für 1,5 h bei 80 mm Hg durchgeführt, die Membran im Anschluss an der Luft getrocknet und die RNA mit der Membran bei 1200J/m^2 für 45 s durch UV-Strahlung quervernetzt.

3.8.1.23.2 Sondenmarkierung

Die Sonden wurden durch TOPO-TA Klonierung (REFERENZ) der geeigneten PCR-Fragmente in den pCRII-TOPO Vektor der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) generiert: Durch Transformation des Vektors in DH5 α -Zellen wurde das Plasmid vervielfältigt und nach entsprechender Aufarbeitung (siehe Kapitel 3.8.1.6) durch den Verdau mit *EcoRI* (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) isoliert.

Die radioaktive Markierung der Sonden wurde unter Verwendung des „DECAprime II kit“ (Fa. Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire/England) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden zunächst 100 ng DNA in 11,5 μl Wasser mit 2,5 μl der „decamer“ Lösung vermischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert, um dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren zu werden. Der Ansatz wurde leicht angetaut und mit 5 μl $\alpha\text{P}^{32}\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) pro 100 ng DNA, 5 μl 5 x Reaktionspuffer und 1 μl Exonuklease-freiem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I versetzt (alles im genannten Kit enthalten). Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37 °C inku-

biert und die Markierungsreaktion schließlich durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Nun wurde die radioaktiv markierte Sonde unter Verwendung von „Nick Columns“ (Fa. Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England) dem Protokoll des Herstellers folgend aufgereinigt und letztlich in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA) eluiert. Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde durch Messung von 1 µl Eluat in einem Szintillationszähler LS 1701 (Fa. Beckman, München) überprüft.

3.8.1.23.3 Hybridisierung und Analyse

Die Membran wurde vorsichtig mit der RNA-Seite nach innen in eine Hybridisierungsröhre gelegt und mit 6 x SSC angefeuchtet, bevor sie rotierend im Minihybridisationsofen (Fa. Bachofer, Reutlingen) bei 55 °C in 5 bis 10 ml Prähybridisierungslösung inkubiert wurde.

Die wie oben beschrieben hergestellte radioaktiv markierte Sonde wurde für 10 min bei 98 °C denaturiert und auf Eis kurz abgekühlt. Dann wurde sie mit Hybridisierungslösung auf 10^6 cpm pro ml Hybridisierungslösung verdünnt zu der Membran in die Hybridisierungsröhre gegeben, die zuvor für 1 h mit frischer Hybridisierungslösung bei 55 °C im Rotationsofen äquilibriert wurde.

Am nächsten Tag wurde die Membran einmal mit kalter, zweimal mit warmer Waschlösung I für je 15 min bei 55 °C, sowie einmal mit warmer Waschlösung II im Rotationsofen gewaschen und dann etwa 15 min an der Luft getrocknet. Die spezifischen Signale konnten schließlich nach Autoradiographie im Phospho-Imager (Fa. Raytest, Staubhardt) detektiert und analysiert werden.

3.8.1.24 Microarray

Für die Identifizierung möglicher Zielgene von PPAR β wurde der Mikroarray eingesetzt. Bei dieser Methode werden inzwischen bis zu mehr als 10 000 Sonden in Form von definierten cDNAs verwendet, die auf einem festen Trägermaterial wie aminiertem Polypropylen sitzen und als Bindestellen für die Ziel-DNA dienen.

3.8.1.24.1 Vorbereitung der „slides“

Verwendet wurden 11,5 k große Chips der Serie F (Dr. Krause, IMT). Diese wurden basierend auf den Datenbanken „NIA 15 k und 74 k Mouse“ (National Institute on Aging, USA), sowie „cDNA Clone Set – human sequence-verified cDNA UniGene set“ (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) generiert: Nach der PCR-Amplifikation der cDNA wurde sie aufgereinigt (NucleoFast, Fa. Macherey-Nagel, Düren) und die 11,5 k Chips mit Hilfe des Microarray Druckers „Gene Machine Microarray Printer OmniGrid 100“ hergestellt. Die Microarray-Slides wurden für die Hybridisierung folgendermaßen vorbereitet: Zunächst wurden die cDNAs auf dem Microarray durch 2-minütige Inkubation bei 95 °C denaturiert, kurz in – 20 °C kalten Ethanol getaucht und für 3 min bei 1500 UpM durch Zentrifugation getrocknet.

Im Anschluss wurden die Slides für 20 bis 30 min bei 55 °C in einer Lösung mit 1 % (w/v) BSA, 4,5 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS geblockt und für 3 min in 200 ml 0,1 x SSC/0,1 % SDS-Lösung, sowie für weitere 3 min in 200 ml Wasser gewaschen und für 3 min bei 1500 UpM getrocknet.

3.8.1.24.2 Probenvorbereitung und Markierung

Zunächst wurden NIH3T3-Zellen mit entsprechender PPAR β -siRNA bzw. Fluoreszenzmarkierter Kontroll-siRNA (Fa. Qiagen, Hilden) transfiziert (siehe Kapitel 3.8.2.4.2.5). Nach entsprechender Inkubationszeit wurde aus diesen Zellen RNA isoliert, die unter Verwendung des „MessageAmpTM II aRNA“ Kits (Fa. Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire/England) gemäß den Herstellerangaben amplifiziert wurde.

Die daraus resultierende, gereinigte aRNA wurde dann mit Hilfe des „CyScribe Post-Labeling Kit“ in cDNA umgeschrieben und einer Amino-Allyl-Markierung unterzogen. Im zweiten Schritt wurde diese cDNA mit den reaktiven Cy3- bzw. Cy5-NHS-Estern markiert, die an inkorporiertes Amino-Allyl-dUTP binden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem „GFX Purification Kit“ (beide Kits von der Fa. Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England).

Die beiden korrespondierenden Proben (siehe unten) wurden vereinigt und mit *Cot*-DNA (Fa. Invitrogen, Karlsruhe), sowie Poly A versetzt, um unspezifische Bindungen bei der Hybridisierung zu verhindern. Das Probenvolumen wurde dann in einer Speed-Vac auf 26 μ l eingedampft und mit 10 μ l 20 x SSC, sowie 4 μ l 2 % SDS gemischt.

Nach einer 2-minütigen Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben direkt auf die Slides pipettiert, die (wie oben beschrieben) vorbereitet wurden und je zwei Slides um 180 ° gegeneinander verdreht blasenfrei aufeinander gelegt.

Die Sandwich-Hybridisierung der nach dem „Color-Flip“-Design mit Cy3 und Cy5 markierten Proben erfolgte üN bei 55 °C in einem 50 ml PP-Röhrchen, das mit einem in 1 ml 3 x SSC und 0,1 % SDS-getränktem KimwipesLite-Tuch ausgelegt war:

„Sandwich“	Probe	Slide-Nummer
1	PPAR β -siRNA-Cy3 + control-siRNA-Cy5	45E010903 & 46E010903
2	PPAR β -siRNA-Cy5 + control-siRNA-Cy3	47E010903 & 48E010903

Am nächsten Morgen wurden die Slides dreimal für 5 min in 200 ml Waschlösung I (0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS), dann zweimal für 5 min in 200 ml Waschlösung II (0,1 x SSC) und schließlich kurz in 200 ml Wasser gewaschen und für 3 min bei 1500 UpM getrocknet. Die Slides wurden eingescannt und von Mitarbeitern des IMTs ausgewertet.

3.8.1.25 PCR

Die PCR ist eine enzymatische Kettenreaktion zur selektiven und spezifischen *in-vitro* Vermehrung von Nukleinsäurebereichen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Sie wurde 1985 von Ehrlich, Saiki und Mullis für die *in-vitro* Amplifikation des humanen β -Globin-Gens etabliert.

Das Prinzip der PCR beruht auf der exponentiellen Vermehrung eines Nukleinsäurebereiches mittels thermostabiler DNA-Polymerasen, die bei Vorhandensein von zwei kurzen, doppelsträngigen Oligonukleotidprimern, entsprechendem Puffer und Desoxynukleosidtriphosphaten aus einem DNA-Einzelstrang einen DNA-Doppelstrang synthetisieren können. Dabei wird in der ersten Reaktion (Denaturierung) die DNA durch Hitze in Einzelstränge zerlegt. Nach der Abkühlung können sich im nächsten Schritt die beiden Primer daran anlagern. Als Primer dienen synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg). Diese binden an die komplementäre Basensequenz im jeweiligen DNA-Einzelstrang und legen damit den Anfang (5'-Ende) des neu zu synthetisierenden DNA-Stranges und nach Ablauf der nacheinander geschalteten DNA-Replikationsschritte auch die (3'-)Enden des finalen neuen DNA-Doppelstranges fest. Um ein Renaturieren der beiden Elternstränge zu verhindern, werden die Primer dabei immer im Überschuss eingesetzt. Die DNA-Polymerase synthetisiert nun die erste Generation von Tochtersträngen, deren 5'-Enden von dem jeweiligen Primer gebildet werden (Elongation). Die 3'-Enden sind noch nicht begrenzt und werden solange verlängert, bis die Reaktionsbedingungen (Inkubationstemperatur und Substratmenge) für die Arbeit der DNA-Polymerase nicht mehr geeignet sind. Im nächsten Amplifikati-

onszyklus lagern sich die Primer nach der Denaturierung und Abkühlung, wie oben beschrieben, wieder an die einzelsträngigen Elternstränge, aber auch die jeweils anderen Primer an die einzelsträngigen Tochterstränge an, so dass die DNA-Polymerase alle 4 DNA-Einzelstränge als „Template“ benutzen und in 5'-3'-Richtung vier neue DNA-Stränge synthetisieren kann. Das heißt, dass sich theoretisch die Gesamtzahl der DNA-Stränge in jedem PCR-Zyklus verdoppelt. Allerdings entstehen in den ersten beiden Zyklen der PCR noch DNA-Fragmente, die nicht die gewünschte Länge haben. Erst ab dem dritten Zyklus entstehen PCR-Produkte von definierter Länge, die durch die Auswahl der Bindestellen für die beiden Primer vorgegeben ist. Damit nimmt die Anzahl der DNA-Fragmente mit nicht definierter Länge bei jedem PCR-Zyklus linear um zwei Fragmente zu, während die Anzahl der PCR-Produkte definierter Länge exponentiell ansteigt.

Durchgeführt wird die PCR in programmierbaren Thermocyclern (Peltier Thermal Cycler PTC-200, Fa. Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf).

3.8.1.25.1 Oligonukleotide

Als Startermoleküle für die Polymerasekettenreaktion und für Sequenzierungen wurden die in den Tabellen 2 bis 5, sowie dem Kapitel 3.8.1.25.1 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Diese wurden HPLC-gereinigt von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

Das Design der Primer erfolgte unter Zuhilfenahme der Software PrimerSelect (Fa. DNA STAR, Madison/USA). Bei den Primern für die Q-PCR wurde dabei v.a. darauf geachtet, dass die Primer Exon-Exon-Grenzen überlappen. War dies nicht möglich, so wurden die Primer so gewählt, dass der „Sense“ und der „Antisense“-Primer in verschiedenen Exons lagen.

Tab. 2: Murine Primer (RT-PCR). Aufgeführt sind die Sequenz, sowie die Länge der murinen Primer, die für die RT-PCRs eingesetzt wurden. Weiterhin wird auf die Länge des PCR-Produktes und die „Annealing-Temperatur“ für die PCR hingewiesen. Bp: Basenpaare.

Gen	Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'-3'	Länge (nt)	Produktlänge (bp) „Annealing“- Temperatur (° C)
β-Aktin	Aktin_up	GATGATGA- TATCGCCGCGCTCGTCGT C	24	800 53 -62
	Aktin_dn	GTGCCTCAGGGCAGCG- GACCGCTCA	25	
COX-1	COX1_up	CTGGTGGAC- TATGGGGTTGA	20	492 58
	COX1_dn	ATAGGGG- CAGGTCTTGGTGT	20	
COX-2	COX2_up	CCTTCTCCAACCTCTCC- TAC	20	748 58
	COX2_dn	AGGGGGTGCCAGTGATA- GAG	20	
cPLA2	cPLA2_up	TGTGAGAATTTCTG- CAACTGGGACC	25	1554 58
	cPLA2_dn	GTCTCTCAGGGGAGA- CAGTGGATATGA	27	
PGIS	PGIS_up	CCACACTCCCACAGAAGA	18	378 53
	PGIS_dn	TTGTTTGATGCTGTT- GATGG	20	
PPARβ	PPARβ_up	AAGAGGAGAAAG AG- GAAGTGG	21	788 55
	PPARβ_dn	ATTGAGGAAGAG GCTGCTGA	20	
PPARγ	PPARγ_up	TTACCACAGTT- GATTTCTCC	20	1006 52
	PPARγ_dn	ACAGCAAACCTCAAAC- TAGG	20	
Prosta- glandin E Synthase	mPGES_up	TGTACGCGGTGGCTGT- CATC	20	300 59
	mPGES_dn	GCCAGAACA- TAGGCCCCGG	19	

PTGER1/ PKN	L100	TAGGATCCT- TAGCTTCTGGGCACATT- CAG	29	360 (EP1) 780 (PKN) 55
	L104	CGCACACGATGTGGA- AATGG	20	
PTGER2	mEP2 up	CCTCCTTGCTCTTCTGTT	20	575
	mEP2 dn	CTGTTTACTGGCACTG- GACT	20	58
PTGER3	mEP3 up (new)	TCTGGTGGTGACCTTTGC	19	250
	mEP3 dn (new)	CTCCTTCTCCTTTCCCATC T	20	58
PTGER4	mEP4 up	TCTGGTGGTGCTCATCTG CT	20	537 58
	mEP4 dn	CTCCCACTAACCTCATC- CAC	20	
Thrombo- xan Synthase	mTXS up	CCAGCAAGCAGCAGAA- GAGA	20	466 58
	mTXS dn	TCCCAGCACCTCA- CAGTCC	19	

Tab. 3: Murine Primer („Real-Time“-PCR). Aufgeführt sind die Sequenz, sowie die Länge der murinen Primer, die für die Q-PCRs eingesetzt wurden. Weiterhin wird auf die Länge des PCR-Produktes und die „Annealing-Temperatur“ für die PCR hingewiesen. Bp: Basenpaare.

Gen	Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'-3'	Länge (nt)	Produktlänge (bp) „Annealing“- Temperatur (° C)
β-Aktin	Aktin_up	GGGTGTGATGGTGG- GAATGG	20	405 53 - 62
	Aktin_dn	AGGATGGCGTGAGGGA- GAGC	20	
Ang-1	Ang1_m_L1307	TGTGCAAATGCGCTCT- CATGCT	22	188 60
	Ang1_m_R1494	AAAGTCCAAGGGCCG- GATCATCA	23	
Ang-2	Ang2_m_L741	CAAGAGCTCGGTTGC- TATCC	20	211 60

	Ang2_m_R951	CCTCTGGAAGTCCA- CACTGC	20	
Calnexin	Calnexin_up	AGGGGAGGTT- TATTTTGCTGAC	22	186 56
	Calnexin_dn	TGCTTGGCCCGAGACATC	18	
CXCR4	CXCR4_up	GACCGCCTTTACCCCGA- TAGC	21	140 56
	CXCR4_dn	TGGTGGCCCTTGGAGTGT GAC	21	
DDX6	DDX6_up	CAAACTTCGGATGT- GACCTC	21	190 58
	DDX6_dn	ACCGCTTTTGCCTGTTC- CATT	21	
EGR1	EGR1_up	TAATAGCAGCAGCAG- CACCAGCA	23	261 56
	EGR1_dn	CACAAAGTGTTC- CACTGTTGGGT	24	
HSP105	HSP105_up	GAAA- AATGGTGGCGTGGGAA- TAAA	24	160 58
	HSP105_dn	GAAGGATGGGACTGA- GATGACACA	24	
IER3	IER3_up	ACTCCGGCGGGGCTCTG GTC	20	178 59
	IER3_dn	CCTCTTGGCAATGTTGGG TTCCTC	24	
Ndap7	Ndap7_up	GGCCGCCACATTC- CAGTTC	19	168 58
	Ndap7_dn	CCCCAG- TATCGCGTCCTCCAAAAG	24	
PPAR β	PPAR β _up	GTCGCACAACGCTATCC	17	183 57
	PPAR β _dn	CTCCGGGCCTTCTTTTTG GTCA	22	
Prosta- glandin E Synthase	PGES_up	GGTGGCCCAGGAAGGA- GACAGC	22	131 57
	PGES_dn	TGGCCTTCATGGGTGGG- TAATA	22	
PSF	PSF_up	TGCCTCGACCGCCCTT- GACTACA	24	168 59

	PSF_dn	CATGGGGCCGCGGTTCT GGTTG	22	
TCP1	TCP1_up	CGGTCCGCTCCCA- GAATGTTATG	23	174 58
	TCP1_dn	CTTTGGCTGCGGGATGTT CTACCT	24	
Vinculin	Vinculin_up	CGCTGCTCGGATCT- TACTGA	20	199 56
	Vinculin_dn	ATTGGCCATGGCTACCT- TACACTT	24	

Tab. 4: Humane Primer (RT-PCR). Aufgeführt sind die Sequenz, sowie die Länge der humanen Primer, die für die RT-PCRs eingesetzt wurden. Weiterhin wird auf die Länge des PCR-Produktes und die „Annealing-Temperatur“ für die PCR hingewiesen. Bp: Basenpaare.

Gen	Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'-3'	Länge (nt)	Produktlänge (bp) „Annealing“- Temperatur (° C)
β-Aktin	Aktin_up	GATGATGA- TATCGCCGCGCTCGTCGT C	24	800 53 - 62
	Aktin_dn	GTGCCTCAGGGCAGCG- GACCGCTCA	25	
APC-1a	APC-1a_up	GAGACAGAATG- GAGGTGCTGC	21	177 58
	APC-1a_dn	GCCTCAGTTTC- CAGTTTTGTAAGA	24	
APC-1b	APC-1b_up	GCTTTGACAACTT- GACTTTTGGAG	25	258 58
	APC-1b_dn	CAATACGCTTTT- GAGGGTTGATTC	24	
COX-1	COX1_up	GGTGGGGTGTTCCTTCTTG	18	1125 58
	COX1_dn	TCCCTCAACCCTCATCTT	19	
COX-2	COX2_up	CCTTCTCCAACCTCTCC- TAC	20	748 58
	COX2_dn	AGGGGGTGCCAGTGATA- GAG	20	
cPLA2	cPLA2_up	GAGCTGATGTTTGCA- GATTGGGTTG	25	508 58

	cPLA2_dn	GCTCACTCAAAGGAGA- CAGTGGATAAGA	27	
PGIS	PGIS_up	AGGAGAAGCACGGTGA- CATC	20	386 58
	PGIS_dn	GCAGCGCCTCAATTCCG- TAA	20	
PTGER1	hEP1_up	CCTCGTCCGCTCGTCCA TC	20	317 63
	hEP1_dn	CGG GGG CAA GAG GCG AAG CA	20	
PTGER2	hEP2_up	GCT GCC GCT GCT GGA CTA TG	20	328 63
	hEP2_dn	CAA GGA GCA GAC GGC GAA GG	20	
PTGER 3	hEP3_up	CCC GCC TCA ACC ACT CCT AC	20	669 63
	hEP3_dn	CCA GGA AGG CAA AGG CAG AG	20	
PTGER 4	hEP4_up	CCTCCTGAGAAAGA- CAGTGCT	21	366 60
	hEP4_dn	AAGACACTCTCTGAGTCCT	19	
Thrombo- xan Synthase	HTXS_up	GGTGCCCTGATGTCTGCT TT	20	686 56
	HTXS_dn	TCTTGGCAGT- CAGGGTTGGT	20	
PPAR β – long transcript	PPAR β L/S	GCCTCCGCAAACCCTTCA	18	684 58
	PPAR β -L E10 rev	GGGAGGGCAAGGGA- GAAG	19	
PPAR β – short transcript	PPAR β L/S	GCCTCCGCAAACCCTTCA	21	182 57
	hPPAR β short(4 94)rev	GCCACCCCCCAGGACGAC	18	
PPAR γ	PPAR γ _up	ACAGGAAAGACAACAGA- CAA	20	762 53
	PPAR γ _dn	GGAAGAAGGGA- AATGTTGG	19	
Prosta- glandin E synthase	hPGES_up	CACGCTGCTGGTCAT- CAAGA	20	330 61
	hPGES_dn	TAGGTACGGAGCG- GATGG	19	

Tab. 5: Humane Primer („Real Time“-PCR). Aufgeführt sind die Sequenz, sowie die Länge der humanen Primer, die für die Q-PCRs eingesetzt wurden. Weiterhin wird auf die Länge des PCR-Produktes und die „Annealing-Temperatur“ für die PCR hingewiesen. Bp: Basenpaare.

Gen	Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'-3'	Länge (nt)	Produktlänge (bp) „Annealing“- Temperatur (° C)
Actin	Actin_up	TGGAGAAAATCTGGCAC- CACACC	23	251 53 - 62
	Actin_dn	GATGGGCA- CAGTGTGGGTGACCC	23	
APC (nicht me- thyliert)	APC_up	GTGTTTTATTGTG- GAGTGTGGGTT	24	108 60
	APC_dn	CCAATCAACAAACTCC- CAACAA	22	
APC (methy- liert)	APC _m _up	TATTGCGGAGTGCGGGTC	18	98 60
	APC _m _dn	TCGACGAACTCCCGAC- GAA	19	
Aquapo- rin1	hAqp1_up	GTCGCCACCGC- CATCCTCTCA	21	150 60
	hAqp1_dn	AGTAGCCAGCACGCA- TAGCACCAG	24	
COX-2	hCOX2_up	CCATGGGTGTGAAGGGA- AATAA	22	148 57
	hCOX2_dn	TTGAAAAACTGATGGGT- GAAG	21	
cPLA2	cPLA2_up	CATAAGTT- TACTGTTGTGGTTCTA	24	136 57
	cPLA2_dn	AGTGTCTCGTTCGCTTCC	18	
CXCR4	huCXCR4_up	CCTGCCCTCCTGCTGAC- TATTC	22	225 56
	huCXCR4_dn	GGCCTTGCGCTTCTGGTG	18	
EGR1	hEGR1_up	GCAGCAGCAGCAGCAG- CACCTTCA	24	119 58
	hEGR1_dn	CTCCACCAG- CACCTTCTCGTTGTT	24	

ILK	ILK_up	TAATGAACCGTGGGGAT- GA	19	89 57
	ILK_dn	TGCCTTGACTGCAA- TAGCTTC	22	
PDK4	hPDK4_up	GGATCGATTTTACAT- GAACCGTA	23	88 57
	hPDK4_dn	TGGGTTTCCTGTCTGTGA GTC	21	
PPAR β	hPPAR β _up	CGCAGCCTCCGCAAACC	17	120 57
	hPPAR β _dn	CAGAATGATGGCCG- CAATGAATAG	24	

3.8.1.25.2 RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)

Der Nachweis der Transkription eines bestimmten Gens in Geweben oder Zellen erfolgte meist mit der RT-PCR. Dabei wurde zunächst mit Hilfe des „1st strand cDNA synthesis kit“ der Firma Roche diagnostics (Mannheim) nach Angaben des Herstellers aus RNA cDNA synthetisiert und diese anschließend als „Template“ für die PCR eingesetzt. Der typische Reaktionsansatz (20 μ l Gesamtvolumen) für die cDNA-Synthese aus 1 μ g RNA sah dabei wie folgt aus:

Tab. 6: typischer Reaktionsansatz bei der Synthese von cDNA

Die Angaben beziehen sich auf ein Reaktionsgesamtvolumen von 20 μ l.

Reaktionskomponente	Volumina (μ l) pro Ansatz
0,8 μ g/ μ l Oligo(dT)Primer	2
dNTP-Mix (je 10 mM)	2
50 U/ μ l RNase-Inhibitor	1
10 x Puffer (100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3)	2
25 mM MgCl ₂	4
AMV Reverse Transkriptase	0,8

Die PCR wurde üblicherweise in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit den hier aufgeführten Reaktionskomponenten durchgeführt. Das typische PCR-Programm startete mit einer ersten Denaturierungsphase für 5 min bei 95 °C, an die sich je nach Expressionsniveau des untersuchten Gens 20 bis 40 Zyklen mit 1-minütiger Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 1 min Hybridisierung der Primer bei der in KAPITEL 2.8.1.25.1 angegebenen Temperatur, sowie einer 1-minütigen Elongationsphase anschlossen. Um die vollständige Amplifikation der DNA-Stücke vor allem bei langen Sequenzen zu ge-

währleisten, wurde die PCR mit einer 5- bis 10-minütigen Elongationsphase bei 72 °C abgeschlossen.

Tab. 7: Konzentration der Reaktionskomponenten bei Standard-PCR-Reaktionen.

Nicht absolute Angaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl.

Reaktionskomponente	Konzentration
Oligonukleotid 1	1 µM
Oligonukleotid 2	1 µM
Polymerase-Puffer	1 x <i>Taq</i> -Puffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
dNTP-Mix	200 µM pro dNTP (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
DNA-Polymerase	0,5 U Platinum- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Matrizen-DNA	0.1 µl cDNA bzw. 1 ng Plasmid-DNA

3.8.1.25.3 Q-PCR ("Real-time PCR")

Die Real Time PCR-Technologie erlaubt einerseits eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die kontinuierliche Messung von Laser-induzierten Fluoreszenzsignalen, die während der PCR proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes ansteigen und verringert andererseits die Kontaminationsgefahr, da das PCR-Amplifikat nicht mehr auf ein Agarosegel aufgetragen werden muss (Vermeidung von "carry-over"). Verwendet wurde hier der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (Fa. Stratagene, La Jolla/USA bzw. Fa. ABgene, Hamburg), der unspezifisch in Doppelstrang-DNA interkaliert.

Generell führt dies mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Bei der Verwendung von SYBR-Green fehlt allerdings die Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden „Templates“, da auch Primer-Dimere oder Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Dieser ist zunächst nicht von dem des spezifischen Produkts zu unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten kann erst nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Bei dieser werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Kleinere Fragmente wie z.B. Primer-Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die spezifischen PCR-Produkte.

Neben dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green wurde hier der Fluoreszenzfarbstoff ROX mit einer Endkonzentration von 20 nM eingesetzt. Da er keine Fähigkeit zur Interkalation in doppelsträngige DNA besitzt, konnte er zum Ausgleich etwaiger Ungenauigkeiten bei der Zugabe des cDNA-ROX-Mixes (siehe unten) eingesetzt werden.

Der typische PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl setzte sich aus dem SYBR-Green-Mix einerseits (19,5 µl) und der Mischung aus cDNA und ROX (5,5 µl) andererseits zusammen; sämtliche Reaktionskomponenten wurden von der Fa. ABgene (Hamburg) bezogen.

Tab. 8: Typischer Q-PCR-Reaktionsansatz.

Die Angaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl.

Reaktionskomponente	Volumina pro Ansatz (µl)
<i>absolute QPCR SYBR green mix</i> (<i>Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, Puffer, SYBR Green</i>)	12,5
Wasser	6,5
Primermix (je 10 µM 5'- bzw. 3'-Primer)	0,5

Dieser Mix wurde in die Vertiefungen einer 96-well-Platte pipettiert und dann mit der Mischung aus cDNA und ROX ergänzt. Dafür wurde der Farbstoff ROX zunächst 1:1000 in sterilem A.a.i.-Wasser verdünnt und dann mit der 1:50 in A.a.i.-Wasser verdünnten cDNA gründlich vermischt.

Als Kalibrator bei der komparativen Real-Time PCR wurde eine Mischung aus cDNAs von Zelllinien verwendet, deren Zelltyp mit dem der anderen Proben übereinstimmte, zum Beispiel Fibroblasten. Durch die im Lieferpaket der Fa. Stratagene (La Jolla/ USA) enthaltene Software Mx3000P wurden die einzelnen Messwerte im Anschluss an die Real-Time-PCR auf den Kalibrator, sowie das „house-keeping-gene“ Aktin normalisiert bzw. abgeglichen.

Üblicherweise wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Gestartet wurde mit einer 15-minütigen Aktivierung der *Hot-start*-DNA-Polymerase, um deren chemische Modifizierung aufzuheben, die diese ansonsten in ihrer enzymatischen Aktivität inhibiert. Anschließend wurden 45 Zyklen mit 15-sekündiger Denaturierung bei 95 °C, 30-sekündiger Hybridisierungsphase bei der im Kapitel 3.8.1.25.1 angegebenen Temperatur, sowie einer 30-sekündigen Elongationsphase bei 72 °C durchgeführt.

3.8.2 Zellbiologische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten bzw. sterilisierten Materialien. Um etwaige Kontaminationen mit Mykoplasmen zu detektieren, wurden regelmäßige Kontrollen mit Hilfe von PCRs durchgeführt und positiv getestete Zelllinien umgehend sachgemäß entsorgt.

3.8.2.1 Verwendete Zellen und Kulturbedingungen

Zelle	Herkunft	Zelltyp	Medium	P*
NHBE	Cambrex	Humane Lungenepithelzellen ("normal human bronchial tracheal epithelial cells")	BEGM	1:2
NCI-H125	ATCC	Humane LungenadenokarzinomZelllinie	RPMI, 10% FCS	1:10
NCI-H322*	ATCC	Humane LungenadenokarzinomZelllinie, nicht-kleinzellig	RPMI, 10% FCS	1:8
NCI-H522	ATCC CRL-5810	Humane LungenadenokarzinomZelllinie, nicht-kleinzellig	RPMI, 10% FCS	1:4
NCI-H596	ATCC HTB-178	Humane Lungenadenoakanthomlinie	RPMI, 10% FCS	1:3
NCI-H1651	ATCC CRL-5884	Humane Lungenadenokarzinom Zelllinie, nicht-kleinzellig	ACL-4	1:4
NCI-H2073	ATCC CRL-5918	Humane Lungenadenokarzinom Zelllinie, nicht-kleinzellig	ACL-4	1:4
NCI-H23	ATCC CRL-5800	Humane Lungenadenokarzinom Zelllinie, nicht-kleinzellig	RPMI, 10% FCS	1:8
NCI-H1373	ATCC CRL-5866	Humane Lungenadenokarzinom Zelllinie, nicht-kleinzellig	RPMI, 10% FCS	1:6
NCI-H2347	ATCC CRL-5942	Humane Lungenadenokarzinom Zelllinie, nicht-kleinzellig	RPMI, 10% FCS	1:6
A549	ATCC CCL-185	Humane Lungenadenokarzinom Zelllinie, nicht-kleinzellig	DMEM, 10% FCS	1:10
HCT-116	B. Vogelstein (J. Hopkins, Baltimore, USA)	Humane Kolonkarzinom Zelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5
HCT-116-PPAR β -/-		Humane Kolonkarzinom Zelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5

HtTA-hPPAR β	M. Alt (IMT)	Cervix-Karzinom Zelllinie (HeLa-Zellen mit Tetrazyklin-induzierbarem PPAR β)	DMEM, 10% FCS, 75 μ g/ml Hygromyzin	1:5
Hek293	ATCC CRL-1573	Humane embryonale Nierenepithelzelllinie (human embryonic kidney)	DMEM, 10% FCS	1:6
Hel299	ATCC CCL-137	Humane Lungenfibroblastenlinie	DMEM, 10% FCS	1:6
HUVEC	Präparation aus Nabelschnüren	Endothelzellen der Nabelschnurvene; primäre Zellen (Passage 3 bis 7)	EGM-2	1:5
WI-38	ATCC CCL-75	Humane Lungenfibroblastenlinie	DMEM, 10% FCS	1:3
Ao1/Ao2/Ao3-WT	Dr. Jürgen Adamkiewicz	Zelllinien, die aus der Aorta von C57bl6 Wildtyp-Mäusen generiert wurden (Peters J. M. <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10% FCS	1:4
Ao1/Ao2/Ao3-PPAR β ^{-/-}	Dr. Jürgen Adamkiewicz	Zelllinien, die aus der Aorta von C57bl6 PPAR β ^{-/-} -Mäusen generiert wurden (Peters J. M. <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10% FCS	1:4
B2-WT	Dr. Jürgen Adamkiewicz	Murine Fibroblastenlinie aus C57bl6 Mäusen (Peters J. M. <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10% FCS	1:4
A2/A3/A4/A5/A6-WT	Dr. Jürgen Adamkiewicz	Murine Fibroblastenlinie aus C57bl6 Mäusen (Peters J. M. <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10% FCS	1:4
C4-WT	Dr. Jürgen Adamkiewicz	Murine Fibroblastenlinie aus C57bl6 Mäusen (Peters J. M. <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10% FCS	1:4
A1-PPAR β ^{-/-}	Dr. Jürgen Adamkiewicz	Murine Fibroblastenlinie aus (PPAR β ^{-/-}) C57bl6 Mäusen (Peters J. M. <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10% FCS	1:4
A2-PPAR β ^{-/-}	Dr. Jürgen Adamkiewicz	Murine Fibroblastenlinie aus (PPAR β ^{-/-}) C57bl6 Mäusen (Peters J. M. <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10% FCS	1:4
LLC	ATCC CRL-1642	Murine Lungenkarzinom Zelllinie (Lewis Lung Carcinoma)	DMEM, 10% FCS	1:4
Linie1	Prof. R. Müller (IMT, Marburg)	Murine Lungenkarzinom Zelllinie	DMEM, 10% FCS	1:4
LT1	IMT, Marburg	Murine Lungenkarzinom Zelllinie	DMEM, 10% FCS	1:4

LT5	IMT, Marburg	Murine Lungenkarzinom Zelllinie	DMEM, 10% FCS	1:4
3T3Raf-ER (N-BxB-ER)	Prof. U. Rapp (Würz- burg)	Murine Fibroblastenlinie	DMEM, 10% FCS, 5 µg/ml Puromycin	1:6
NIH3T3	ATCC CRL-1658	Murine Fibroblastenlinie	DMEM, 10% FCS	1:6
U2OS	ATCC HTB-96	Humane Osteosarkom-Zelllinie	DMEM, 10% FCS	1:3

* Aufteilungsverhältnis beim Passagieren

Die Zellen wurden routinemäßig bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem CO₂-begasbarer Brutschrank (5 % CO₂) in 10 cm Kulturschalen kultiviert und je nach Wachstumseigenschaften alle 2 bis 4 Tage passagiert. Für die Kultivierung von HUVEC-Zellen wurde der Boden der Kulturschalen mit 1 %-iger Gelatine-Lösung vorbehandelt.

3.8.2.2 Präparation primärer humaner Nabelendothelzellen

Die Isolation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) aus Nabelschnüren erfolgte maximal 48 h nach der Geburt unter einer Sicherheitswerkbank von Mitarbeitern des IMT (Marburg). Dazu wurden die Nabelschnüre mit einer Länge von etwa 30 cm zunächst grob gereinigt und die beiden Enden sauber abgeschnitten. Eine 13er Knopfkanüle wurde an einem Nabelschnurende in die Nabelvene eingeführt. Dann wurde die Vene zunächst mit mindestens 40 ml PBS gespült, dann mit etwa 20 ml Kollagenase gespült und gefüllt. Beide Enden der Nabelvene wurden abgeklemmt und die so vorbereitete Nabelschnur für mindestens 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Klemmen wurden wieder entfernt, die Enden sauber abgeschnitten und die Endothelzellen mit FCS in ein 50 ml PP-Röhrchen gespült. Durch eine Zentrifugation bei 800 UpM wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 5 ml EGM-2 Medium aufgenommen, um sie auf einer gelatinisierten 6 cm Kulturschale auszusäen. Um die zunächst noch zahlreich vorhandenen Erythrozyten zu entfernen, wurden die adhärenen Endothelzellen am nächsten Tag ggf. mehrmals mit PBS gewaschen und in EGM-2-Medium bis zum Erreichen eines konfluenten Stadiums weiter kultiviert (nach Jaffee *et al.*, 1986, modifiziert nach Thornton *et al.*, 1983). Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen der Passage 2 in entsprechendem Kryomedium eingefroren (siehe Kapitel 3.8.2.3).

3.8.2.3 *Passagieren, Kryokonservierung und Auftauen von Zellen*

Um die adhärennten Zellen zu passagieren, wurden sie zunächst vorsichtig mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nachdem sich die Zellen abgerundet haben, wurden sie mit leichten seitlichen Schlägen gegen den Plattenboden gelöst und im angegebenen Kulturmedium aufgenommen, gründlich resuspendiert und abschließend im genannten Verhältnis neu ausplattiert.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vorsichtig vom Boden der Zellkulturschale gelöst, für 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert und der Überstand im Anschluss abgesaugt. Das Zellpellet wurde im Einfriermedium (übliches Zellkulturmedium mit 15 % FCS und 5 % DMSO) resuspendiert und in 1 ml-Einfrierröchen (Fa. Nunc, Wiesbaden) überführt.

Um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden, schloss sich der 24-stündigen Lagerung der Zellen bei – 20 °C zunächst eine weitere Lagerung der Zellen bei – 80 °C für zwei bis drei Tage an, bevor die Zellen in flüssigen Stickstoff umgelagert wurden.

Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Zellen nach schnellem Auftauen im 37 °C Wasserbad für etwa 10 Minuten in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und durch tropfenweise Zugabe von 5 ml Medium verdünnt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 UpM sedimentiert, in 10 ml Zellkulturmedium gründlich resuspendiert und auf eine der Zellzahl entsprechenden Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Morgen mit frischem Medium versorgt.

3.8.2.4 *Transfektion*

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellkulturzellen. Dabei unterscheidet man zwischen transienter Transfektion, bei der ein Plasmid zeitweilig in die Wirtszelle gebracht und damit die gezielte Expression eines Gens erreicht wird und stabiler Transfektion, bei der ein dauerhafter Einbau in das Wirtsgenom anvisiert wird.

3.8.2.4.1 Verwendete Plasmide

pGL3 control	Fa. Promega, Mannheim
pGL3 basic	Fa. Promega, Mannheim
pcDNA3.1(zeo)	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1(zeo)-COX2	dankend erhalten von Dr. Kömhoff
pcDNA3.1(zeo)-PGIS	dankend erhalten von M. Kreutzer
pCMX-empty	dankend erhalten von R.M. Evans
pcDNA3.1-LexA-PPAR β -LBD	dankend erhalten von M. Rieck
7L-TATAi	Nettelbeck <i>et al.</i> (<i>Gene Ther.</i> 6 , 1276-81)
10xGalSVGI3	dankend erhalten von V. Jerome (Vektor: pGL3 basic, Fa. Promega, Mannheim)
pCMX-Gal4-PPAR β -LBD	dankend erhalten von R.M. Evans
pCMX-mPPAR β	dankend erhalten von R.M. Evans
tkPPREpGL3	dankend erhalten von S. Müller-Brüsselbach (Vektor: pGL3 basic, Fa. Promega, Mannheim)
tkpGL3	dankend erhalten von V. Jerome (Vektor: pGL3 basic, Fa. Promega, Mannheim)
H2B-GFP	Dankend erhalten von Dr. T. Kanda, La Jolla/USA)
pBabe_puro-cRafBXB	dankend erhalten von E. Kerkhoff
pCRII-TOPOII	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
pSG5-hRXR α	dankend erhalten von A. Baniahmad (Vektor pSG5, Fa. Stratagene, Amsterdam/Niederlande)
pTRE2hyg	Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg

3.8.2.4.2 Transiente Transfektionen

Die Quantifizierung der Genexpression nach der Transfektion erfolgte nach wenigstens 24 h mit Hilfe eines Luziferase-Reporter-Gens (siehe Kapitel 3.8.2.5).

3.8.2.4.2.1 Kultivierung der Zellen

Für transiente Transfektionen wurden die Zellen am Vortag von 100 % konfluenten 10 cm Kulturschalen mit je 5 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Je nach Zelllinie wurden pro

„well“ einer 6-well-Platte 280 μ l – 350 μ l dieser Zellsuspension in je 2 ml frischem Zellkulturmedium plattiert, so dass die Zelldichte zu Beginn der Transfektion zwischen 40 % und 70 % betrug. Humane Endothelzellen wurden entsprechend in 6 cm Kulturschalen ausgesät.

3.8.2.4.2.2 Superfect

Für die Transfektion der humanen Endothelzellen (HUVEC) wurde zumeist Superfect (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Das Reagenz basiert auf aktivierten Dendrimer-Molekülen, d.h. stark verzweigten, sphärischen Makromolekülen. Die Komplexbildung erfolgt dabei durch Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle an die positiv geladenen Aminogruppen der Dendrimere. Die gebildeten kompakten Komplexe besitzen eine positive Nettoladung.

Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die Zellen einer etwa 70 % konfluenten 6 cm Zellkulturschalen folgendermaßen transfiziert:

5 μ g DNA ad 150 μ l Kulturmedium (serumfrei) 15 μ l Superfect (3 mg/ml)
--

Unter strikter Beibehaltung der obigen Reihenfolge wurde der Transfektionsansatz pipettiert, durch gründliches Auf- und Abpipettieren gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium in den 6 cm Schalen abgesaugt und der Transfektionskomplex, dem 1 ml frisches Kulturmedium beigegeben wurde, auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation für 3 h bei 37 °C erfolgte ein Mediumwechsel auf normales Kulturmedium und die Zellen wurden bis zur Analyse mittels des Reporter-Assays bei 37 °C unter den üblichen Bedingungen (siehe Kapitel 3.8.2.1) kultiviert.

3.8.2.4.2.3 PEI (Polyethylenimin)

Die meisten transienten Transfektionen wurden mit PEI (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) durchgeführt, bei der die Einschleussung der Fremd-DNA auf dem Prinzip der Transfektion mit kationischen Polymeren beruht. Das Makromolekül Polyethylenimin, das eine sehr hohe kationische Ladungsdichte besitzt, interagiert dabei mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrad der DNA, was die Kondensation der DNA zur Folge hat. Dieser kondensierte DNA-PEI-Komplex wird von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

Zu Beginn der Transfektion wurde zunächst ein Mediumwechsel auf je 2 ml Medium mit reduziertem Serumgehalt (2 % FCS) pro Vertiefung einer 6-well-Platte durchgeführt, sowie die Lösung 'B' aus 5 µl 10 %-iger PEI-Lösung, sowie 95 µl PBS angesetzt. Nun wurde die Lösung 'B' zu 5 µg Plasmid-DNA pipettiert, sofort gründlich für 5 s gemischt und die Mischung für 15 min bei RT inkubiert, damit sich der Transfektionskomplex bilden konnte. Dieser wurde schließlich tropfenweise in das Medium gegeben und die Zellen für 3 bis 4 h bei 37 °C inkubiert, bevor das Medium auf normales Kulturmedium gewechselt wurde.

3.8.2.4.2.4 DEAE-DEXTRAN

Neben der PEI-Transfektion war die Transfektion nach der DEAE-(Diethylaminoethyl)-Dextran-Methode die am häufigsten eingesetzte Methode für transiente Transfektionen. Auch hier beruht das Prinzip auf der Bildung von Komplexen aus DNA und DEAE-Dextran, die durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Durch einen DMSO-Schock wird die Zellpermeabilität und damit die Aufnahme der Plasmid-DNA erhöht. Chloroquine kann bei dieser Methode zum Schutz vor DNA-Degradierung eingesetzt werden.

Zu Beginn der Transfektion werden 40 µl 10 mg/ml DEAE-Dextran-Lösung mit Kulturmedium im Verhältnis 1:50 verdünnt. Der übliche Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 µg DNA
1 ml DEAE-Dextran-Verdünnung
1 ml Kulturmedium

Nach sorgfältigem Mischen der angegebenen Komponenten wurde dieser Mix auf die Zellen pipettiert, von denen zuvor das Medium abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Zellen für 2 bis 3 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die DEAE-Dextran-Mischung entfernt und die Zellen wurden für 2 min bei RT mit 1 ml 10 % DMSO pro Ansatz behandelt. Es folgte ein vorsichtiger Waschschrift mit PBS, bevor die Zellen für weitere 90 min mit Kulturmedium, das 0,1 mM Chloroquine und 2,5 % FCS enthielt, bei 37 °C inkubiert wurden. Der abschließende Schritt bestand aus dem Wechsel dieses Transfektionsmediums zu normalem Zellkulturmedium, in dem die Zellen bei 37 °C weiter kultiviert wurden.

3.8.2.4.2.5 RNAiFECT (Transfektion von siRNA)

Für die Analyse von Genfunktionen wurde das Prinzip der siRNA-Technologie eingesetzt, um gezielt Gene auszuschalten. Dabei wird die siRNA in die Zellen eingeschleust und bildet dort mit einem Proteinkomplex den so genannten „RNA-induced Silencing Complex“ (RISC). Dieser bindet an den „antisense“-Strang der genomischen mRNA und führt damit zur Degradation der mRNA.

Die Transfektion der NIH3T3-Zellen mit siRNA (PPAR β - bzw. Kontroll-siRNA, Fa. Qiagen, Hilden) wurde dem Protokoll des Herstellers folgend mit RNAiFect als Transfektionsreagenz durchgeführt.

Dabei wurden pro Ansatz (6-well-Platten) 200 μ mol siRNA mit normalem Medium auf 100 μ l aufgefüllt, mit 15 μ l RNAiFect sorgfältig vermischt und für 15 min bei RT inkubiert, damit sich der Transfektionskomplex bilden konnte. Währenddessen wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und durch 1,9 ml frisches Medium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix tropfenweise zugegeben und durch behutsames Schwenken der Kulturschale vermischt. Um die Effizienz der Transfektion zu erhöhen, wurde diese Transfektion am nächsten Tag wiederholt und die Zellen schließlich 48 h nach der zweiten Transfektion für die entsprechenden Fragestellungen aufgearbeitet.

Die Transfektionseffizienz ließ sich mikroskopisch anhand der transfizierten Kontroll-siRNA (Alexa Fluor488, Fa. Qiagen, Hilden) nach Anregung mit entsprechender Wellenlänge überprüfen.

3.8.2.4.3 Stabile Transfektion

3.8.2.4.3.1 Kultivierung der Zellen

Für stabile Transfektionen wurden die Zellen am Vortag so auf 6 cm Kulturschalen platziert, dass die Zelldichte zu Beginn der Transfektion zwischen 40 % und 70 % betrug.

3.8.2.4.3.2 Die Kalziumchlorid-Methode

Für die für die Generierung der stabilen Zelllinie H125Raf wurden H125-Zellen mit pBabe_puro-cRafBxB nach der Kalziumchloridmethode transfiziert.

Dazu wurde 2 h vor Transfektionsstart das Medium auf DMEM (Fa. PAA, Cölbe) gewechselt, um die Effizienz der Transfektion zu steigern, indem die Zellen vermehrt in die Mitosephase des Zellzyklus gelangen und so DNA in den Zellkern aufnehmen. Nun wird die Lösung A, wie im Folgenden beschrieben, angesetzt:

7,5 µg DNA
18 µl 2 M CaCl₂-Lösung
ad 150 µl H₂O

Mit einer Pasteurpipette werden Luftblasen in 150 µl 2 x HBS generiert und die Lösung A gleichzeitig dazu getropft. Im Anschluss wird der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert, damit sich der Transfektionskomplex bilden kann und dann zu den Zellen geben. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und das übliche RPMI1640 Medium (Fa. PAA, Cölbe) zugegeben.

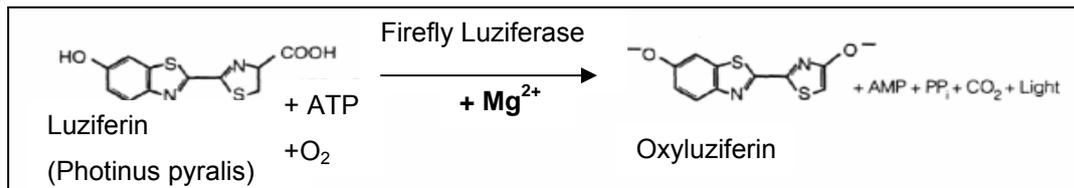
Das Selektionsmedium (in diesem Fall mit 1 µg/ml Puromyzin) wurde nach weiteren 24 h zugegeben, um die negativen Zellen, die nicht erfolgreich transfiziert wurden, zu eliminieren.

CaCl ₂ -Lösung (autoklaviert; Lagerung bei 4 °C)	60 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerol 10 mM PIPES, pH 7 (KOH)
2 x HBS	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,05

3.8.2.5 Reporter-Gen-Assay

Der Luziferase-Assay ist eine sensible, nicht radioaktive Nachweismethode für die Transfektion von Luziferase-Reporter-Gen-Konstrukten in Säugerzellen.

Hierbei wird eine Biolumineszenzreaktion durch das Enzym „Firefly“ Luziferase (aus *Photinus pyralis* isoliert) katalysiert, das hierfür D-Luziferin als Substrat, sowie ATP, Mg^{2+} und O_2 benötigt.



Durch Vermischen dieser Substanzen mit dem Zellysate, das Luziferase enthält, entsteht ein Lichtblitz, der im Luminometer (AutoLumat LB 953, Fa. Berthold, Düsseldorf) detektiert und über den angeschlossenen Drucker dokumentiert werden kann.

Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden die Zellen 24 h post-transfektion mit PBS gewaschen und mit je 250 μ l Lysispuffer pro "well" einer 6-well-Platte lysiert. Anschließend wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 13 000 UpM für 5 min bei RT zentrifugiert. 100 μ l dieses Zellüberstandes wurden zu je 360 μ l Assay-Puffer (LAB) in Polystyrolröhrchen (Fa. Greiner, Nürtlingen) pipettiert. Die Messung der RLUs ("relative light units") erfolgte nach automatischer Injektion von je 100 μ l Luziferinlösung pro Probenröhrchen. Gemessen wurde das Integral der Lumineszenz über ein Intervall von 10 ms.

Für die Analyse der Daten wurde der Leerwert (gemessen als Mittelwert aus drei Messungen von 100 μ l Lysis-Puffer in 360 μ l Assay-Puffer LAB) von den Messwerten abgezogen und der Mittelwert bzw. die Standardabweichung für die Triplikate kalkuliert.

Die Experimente wurden in der Regel drei Mal mit verschiedenen Plasmidpräparationen wiederholt. Im Ergebnisteil ist jeweils ein repräsentatives Experiment dargestellt.

Lysis-Puffer (TGG)	25 ml 0,1 M Glyzylglyzin Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), pH 7,8 (mit 4 M KOH eingestellt) 10 ml 10 % Triton-X-100 1,5 ml 1 M MgSO ₄ 1,6 ml 0,25 M EGTA, pH 8,0 61,9 ml H ₂ O
Assay-Puffer (LAB)	25 ml 0,1 M Glyzylglyzin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), pH 7,8 (mit 4 M KOH eingestellt) 15 ml 0,1 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,8 (mit 4 M KOH eingestellt) 1,5 ml 1 M MgSO ₄ 1,6 ml 0,25 M EGTA, pH 8,0 2 ml 0,1 M ATP 54,9 ml H ₂ O
Luziferin-Stammlösung (bei – 80 °C im Dunkeln gelagert)	1 mM D-Luziferin (kristallin, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) 25 mM Glyzylglyzin, pH 7,8 10 mM DTT
Luziferin-Meßlösung	1:5 mit 25 mM Glyzylglyzin, pH 7,8 verdünnte Luziferin-Stammlösung

Die fertig angesetzten Puffer (LAB, TGG) wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf RT erwärmt, sowie mit DTT versetzt (Endkonzentration 1 mM).

3.8.2.5.1 tkPPRE-System

Das tkPPRE-System besteht aus dem Expressionsplasmid pCMX-PPAR β , das für das „full-length“-PPAR β -Protein kodiert, sowie dem Reporterplasmid tkPPRE-pGI3 (siehe Kapitel 3.8.2.4.1). Letzteres zeichnet sich durch einen PPRE-abhängigen tk-Promotor aus, durch den, nach Bindung von PPAR α , PPAR β oder PPAR γ an die PPRE-Sequenz, die Expression des Reportergens Luziferase reguliert wird.

3.8.2.5.2 Gal4-System

Das GAL4-Protein ist eigentlich ein transkriptioneller Aktivator, der in Hefezellen für die Expression von Genen benötigt wird, die im Rahmen des Galaktose-Abbaus eine Rolle spielen. Es setzt sich aus einer N-terminalen Domäne zusammen, die an spezifische DNA-Sequenzen bindet, sowie einer C-terminalen Domäne, die für die Aktivierung der Transkription notwendig ist. Daher kann dieses System generell auch für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Expressionsplasmid (siehe Kapitel 3.8.2.4.1) eingesetzt, das für ein Fusionsprotein aus der PPAR β -LBD und der Gal4-DBD kodiert. Das Reporterplasmid beinhaltet hingegen die spezifische DNA-Sequenz, die für die Bindung des Gal4 benötigt wird. Durch Bindung des Fusionsproteins an die spezifische Gal4-Bindungsstelle im Reporterplasmid kann dann die Transkription des Reportergens (Luziferase) induziert werden.

3.8.2.5.3 LexA-System

Analog zum Gal4-System kodiert das Expressionsplasmid beim LexA-System für ein Fusionsprotein aus der DNA-Bindedomäne des bakteriellen LexA, das Reporterplasmid beinhaltet sieben LexA-Erkennungssequenzen, die dem „TATA-Initiator“-Element vorgeschaltet sind. Die Promotorregion besitzt selbst keine eigenen Aktivierungssequenzen mehr, so dass der Promotor nur auf die Bindung der aktivierenden PPAR β -LBD reagiert.

3.8.2.6 Prostaglandinkonzentration in Zellüberständen

Die Analyse der Prostaglandine (PGE₂, TxB₂, 6-k-PGF₁ α , ...) in Zellüberständen wurde mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) durch Horst Schweer und weitere Mitarbeiter des Eicosanoid-Labors der Kinderklinik Marburg durchgeführt (siehe auch Schweer, *et al.*, 1994). Die Konzentration von Prostazyklin wurde infolge seiner geringen Halbwertszeit in Form von 6-keto-PGF₁ α , dem stabileren Produkt von Prostazyklin bestimmt.

3.8.2.7 Tet-OFF System

Für die induzierbare Expression von humanem PPAR β wurde das Tet-OFF System verwendet. Dabei handelt es sich um ein binäres System, das aus dem stabil in HeLA-Zellen insertiertem Plasmid mit dem Tetrazyklin-regulierbaren Transkriptionsaktivator (TA) und dem Plasmid pTRE2hyg-hPPAR β besteht (siehe Abb. 6). Das Zielgen PPAR β steht unter der Kontrolle von tet-Operator-Sequenzen und wird immer exprimiert. Will man eine spezifische Induktion von PPAR β erzielen, muss man die Expression des Zielgens durch die Kultivierung der Zellen in Doxyzyklin-haltigem Medium verhindern. Der Wechsel auf Medium ohne Doxyzyklin führt dann zur spezifischen Induktion der Expression von PPAR β .

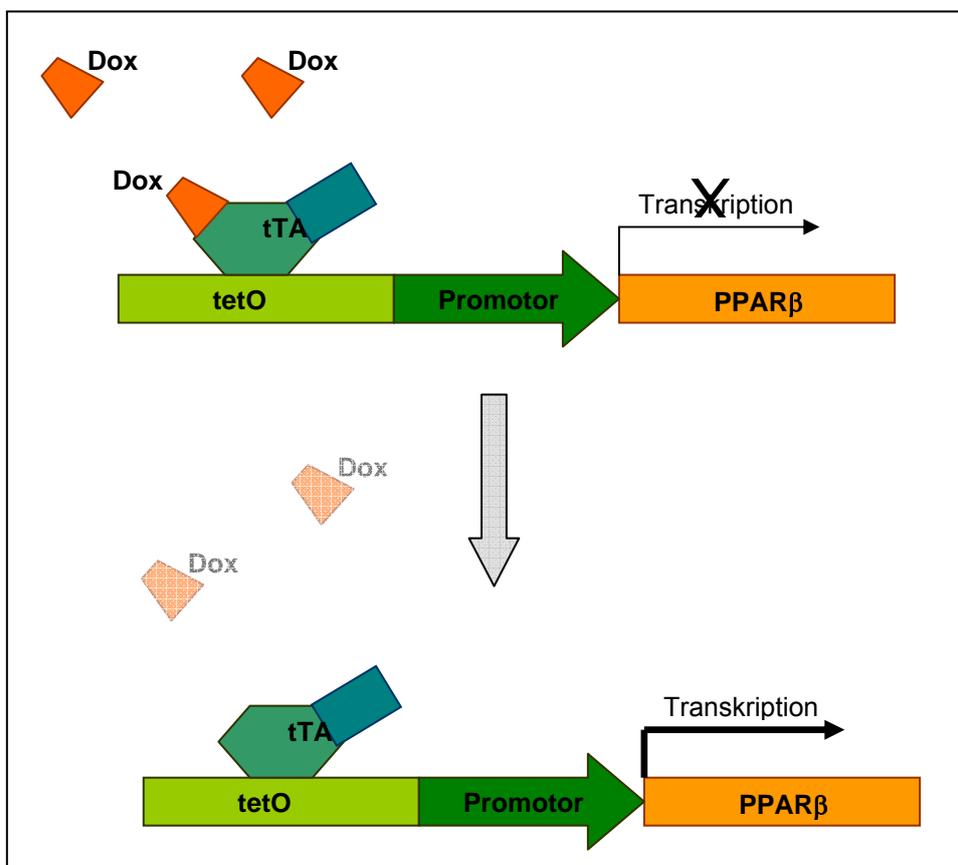


Abb. 6: graphische Darstellung des Tet-OFF-Systems. Die Transkription des Zielgens PPAR β wird in Abwesenheit von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin durch Bindung des Transaktivierungsproteins tTA an die spezifische Operator-Sequenz (tetO) des Promotors induziert. In Anwesenheit von Doxyzyklin bildet sich hingegen ein Komplex aus Doxyzyklin und dem Fusionsprotein tTA. Damit wird dessen Bindung an die tetO-Sequenz verhindert und die Expression des Zielgens inhibiert. Tet: Tetrazyklin; Dox: Doxyzyklin; tTA: Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor-DNA-Bindeprotein (TetR) aus *E. coli* und der Transaktivierungsdomäne VP16 des *Herpes simplex* Virus; TRE: „tetracycline-responsive promoter element“, setzt sich aus der Tet-Operator-Sequenz und dem (minimalen) Promotor zusammen.

3.9 TIEREXPERIMENTE

Als Versuchstiere diente ein syngenes Mausmodell (Wildtyp oder PPAR $\beta^{-/-}$) mit C57bl6 Mäusen (Peters J. M. *et al.*, 2000) mit einem Körpergewicht von 20 bis 30 g. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Die Versuchstiere erhielten Wasser und pelletiertes Futter Altromin 1324 (Fa. Altromin, Lage) *ad libidum*. Für die Induktion subkutaner Tumore wurden den Tieren 5×10^5 bis 3×10^6 Tumorzellen (LLC - „Lewis Lung Cancer“ Zellen) in 200 μ l Zellkulturmedium DMEM subkutan in die seitliche Rückenflanke injiziert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Analyse der Expression und Regulation von PPAR β

PPARs („peroxisome proliferator-activated receptors“) werden durch verschiedene Faktoren bezüglich ihrer Expression reguliert – eine Möglichkeit ist der Einfluss von Raf als Bestandteil der Ras-Raf-ERK-Kaskade (Müller, 2004).

4.1.1 Einfluss von Raf

Um den Effekt von Raf auf die Aktivierung von ERK zu untersuchen, wurden 3T3Raf-ER Zellen eingesetzt. Diese exprimieren ein Fusionsprotein aus dem N-terminal verkürzten Raf-Protein und dem Östrogen-Rezeptor.

Der N-Terminus des Raf-Onkogens fungiert normalerweise als Inhibitor der C-terminalen Domäne und reprimiert die Aktivität von Raf. Desweiteren interagiert er mit der aktivierten Form des Ras-Proteins, welches das Raf-Onkogen durch Phosphorylierung aktiviert (Chong und Guan, 2003). Diese Art der Induktion ist im vorliegenden System durch Deletion der N-terminalen Domäne ausgeschaltet. Stattdessen kann das beschriebene Fusionsprotein durch 4-OHT („4-hydroxy-tamoxifen“) spezifisch induziert werden und die Raf-MEK-ERK-Kaskade in Gang setzen. Als Folge wird ERK1/2 an spezifischen Tyrosinen bzw. Threoninen phosphoryliert und damit aktiviert.

Um den Einfluss von Raf auf ERK zu überprüfen, wurden 3T3Raf-ER Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 4-OHT inkubiert. Dann wurden die Proteine isoliert, indem die Zellen in einem Triton-X-100-haltigem Lysispuffer aufgeschlossen wurden (siehe Kapitel 3.8.1.15).

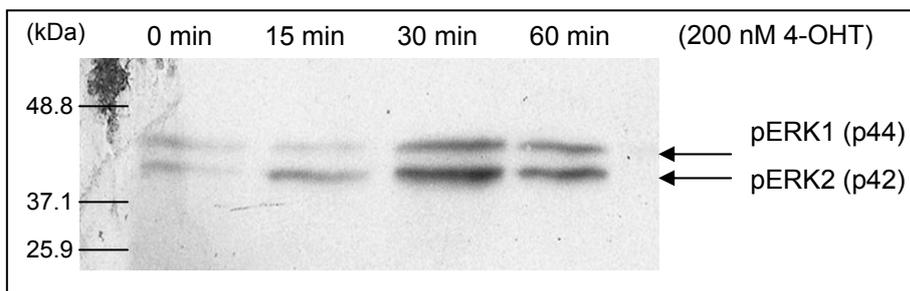


Abb. 7: Aktivierung von ERK durch Raf. Die Expression von Raf in 3T3Raf-ER Zellen wurde mit 200 nM 4-OHT für die angegebene Inkubationsdauer induziert. Die Analyse der Phosphorylierung von ERK durch die Raf-aktivierte MAPK-Kinase (MEK) wurde mittels eines Western Transfers nachgewiesen, der Proteinabgleich mit Hilfe eines Aktin-Western Blots überprüft. Als Proteinmarker wurde „BenchMark Prestained Protein Ladder“ der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Mittels einer SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.8.1.18), sowie einem Western Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (siehe Kapitel 3.8.1.19) wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 mit Hilfe eines spezifischen, HRP-gebundenen Antikörpers nachgewiesen (siehe Kapitel 3.8.1.20).

Der maximale Grad der Phosphorylierung wurde 30 min nach Zugabe von 4-OHT erzielt (Abb. 7). Außerdem konnte generell eine stärkere Phosphorylierung von ERK2 gegenüber ERK1 beobachtet werden.

Um die Raf-vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 bezüglich der involvierten Enzyme näher zu analysieren, wurden nun 3T3Raf-ER Zellen parallel mit 4-OHT und dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt. Nach Auftrennung der Proteine im Gel und Transfer auf die Nitrozellulose-Membran wurde die Phosphorylierung wiederum mittels des Antikörpers gegen pERK1/2 (Fa. Santa Cruz) nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der MEK-Inhibitor sowohl die basale Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 8, Spur 3), als auch die induzierte Phosphorylierung der Kinase (Abb. 8, Spur 4) reprimiert. Diese Daten zeigen, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Raf über die Aktivierung der MAPK-Kinase (MEK) vermittelt wird.

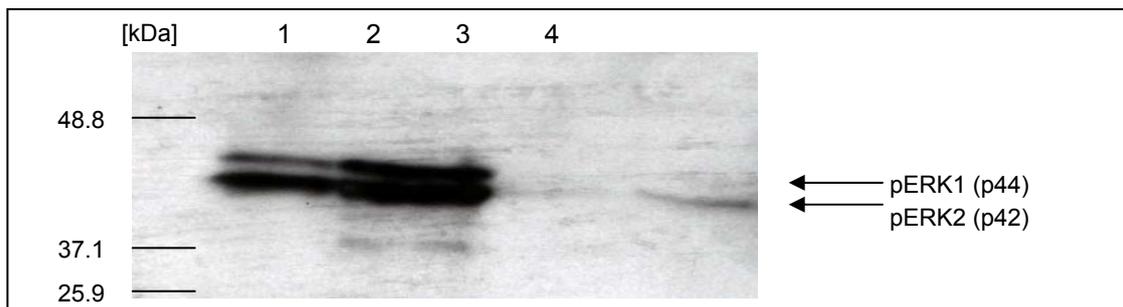


Abb. 8: Hemmung der Aktivierung von ERK durch U0126. Die Expression von Raf in 3T3Raf-ER Zellen wurde mit einer 1-stündigen Inkubation mit 200 nM 4-OHT induziert und die Phosphorylierung von ERK1/2 mittels eines Western Transfers überprüft. Die parallele Gabe von 10 μ M U0126 (MEK-Inhibitor) für 30 Minuten hemmt die Phosphorylierung von ERK1/2. 1: unbehandelte Zellen; 2: 1 h 4-OHT; 3: 30 min U0126; 4: 1 h 4-OHT und 30 min U0126. Als Proteinmarker wurde „BenchMark Prestained Protein Ladder“ der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

4.1.1.1 Induktion der Prostaglandinsynthese

Ziel der Raf-MEK-ERK-Kaskade ist unter anderem die Aktivierung der Cyclooxygenase- (Cox)-2, die gemeinsam mit Cox-1 die Synthese der Prostaglandine aus Arachidonsäure reguliert (Müller, 2004). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob es durch Aktivierung von Raf zu einem Anstieg der Konzentration bestimmter Prostaglandine kommt. Durchgeführt wurde die Analyse mit 3T3Raf-ER Zellen, die entweder in

An- oder Abwesenheit von Arachidonsäure mit 4-OHT behandelt wurden. Nach verschiedenen Zeiten (siehe Abb. 9) wurde mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) die Konzentration der Prostaglandine in den Zellüberständen ermittelt (siehe Kapitel 3.8.2.6).

Bereits 2 Stunden nach Induktion von Raf konnte man für Prostaglandin E₂ (PGE₂) und das stabile PGI₂-Produkt 6-k-PGF1 α einen deutlichen Anstieg beobachten (Abb. 9A). Alle anderen untersuchten Prostaglandine, wie PGD₂ oder PGF2 α , aber auch Thromboxan B₂, zeigten selbst 24 h nach Behandlung mit 4-OHT keine signifikant erhöhten Konzentrationen. Auch nach Zugabe von Arachidonsäure in das Medium der Zellen konnte diese Tendenz bestätigt werden (Abb. 9B).

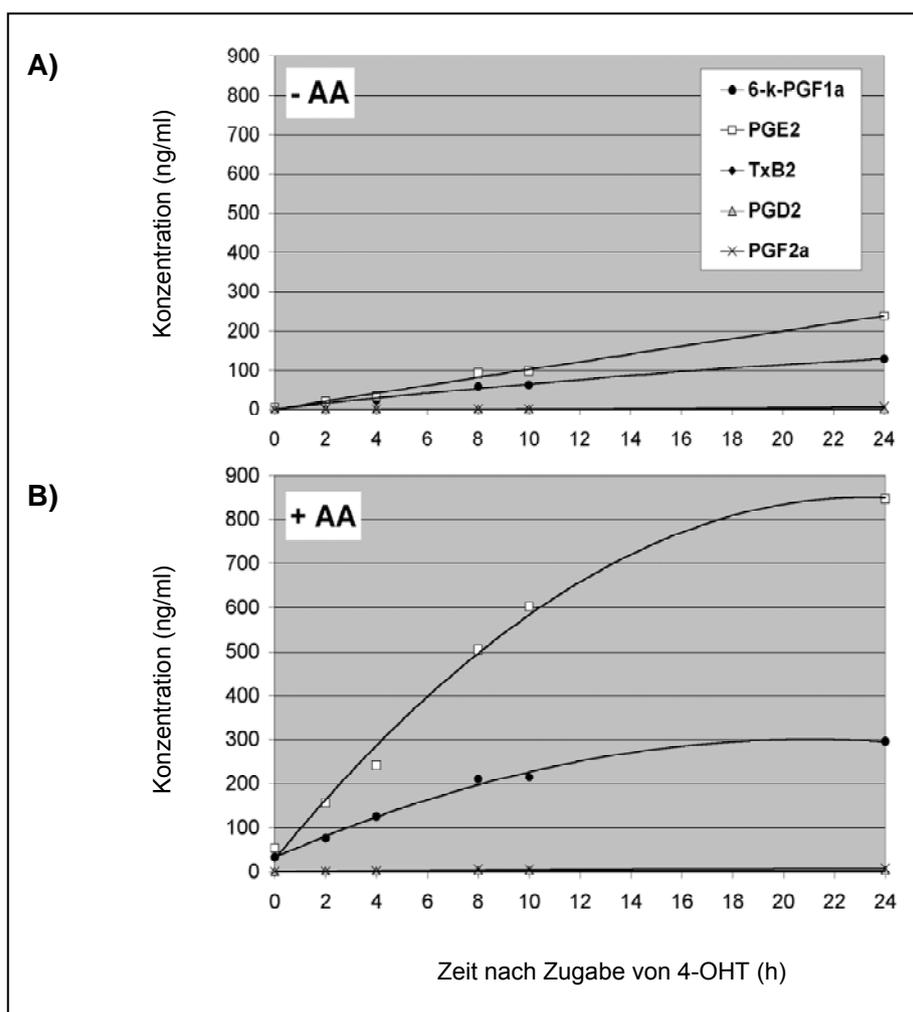


Abb. 9: Raf induziert die Synthese von PGE₂ und PGI₂. 3T3Raf-ER Zellen wurden entweder in Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von 20 μ M Arachidonsäure für 24 h mit 200 nM 4-OHT behandelt. Das instabile Prostaglandin (PGI₂) besitzt *in vivo* nur eine sehr geringe Halbwertszeit von wenigen Minuten. Für die Bestimmung der PGI₂-Synthese wurde daher sein stabiler Metabolit 6-k-PGF1 α herangezogen. Die Konzentration der Prostaglandine wurde mittels GC-MS (siehe Kapitel 3.9.1.3.3) durchgeführt.

Allerdings lag die Syntheserate von PGE₂ und PGI₂ in Anwesenheit von Arachidonsäure im Vergleich zu den Werten, die ohne Arachidonsäure ermittelt wurden, noch einmal deutlich höher. Das weist darauf hin, dass die Konzentration der endogenen Arachidonsäure bei der Synthese der Prostaglandine der limitierende Faktor ist.

Um zu klären, welche Rolle Cox-2 bei der Raf-induzierten Synthese von Prostazyklin bzw. PGE₂ spielt, wurden 3T3Raf-ER Zellen entweder für 4 oder 8 h mit 4-OHT behandelt und die Konzentration der beiden Prostaglandine im Überstand mittels GC-MS analysiert. Parallel dazu wurden die Zellen entweder mit dem generellen Cyclooxygenase-Inhibitor („acetylsalicylic acid“; ASS; Aspirin) bzw. mit dem Cox-2-spezifischen Inhibitor sc-58125 inkubiert. Auch hier führte die Aktivierung von Raf zu einem Anstieg der Synthese von PGE₂ und PGI₂. Dies konnte durch den Einsatz der Cox-Inhibitoren nahezu zu 100 Prozent gehemmt werden (Abb. 10). Diese Beobachtung zeigt, dass die Raf-induzierte Synthese der Prostaglandine PGI₂ und PGE₂ über die Cyclooxygenase-2 gesteuert wird.

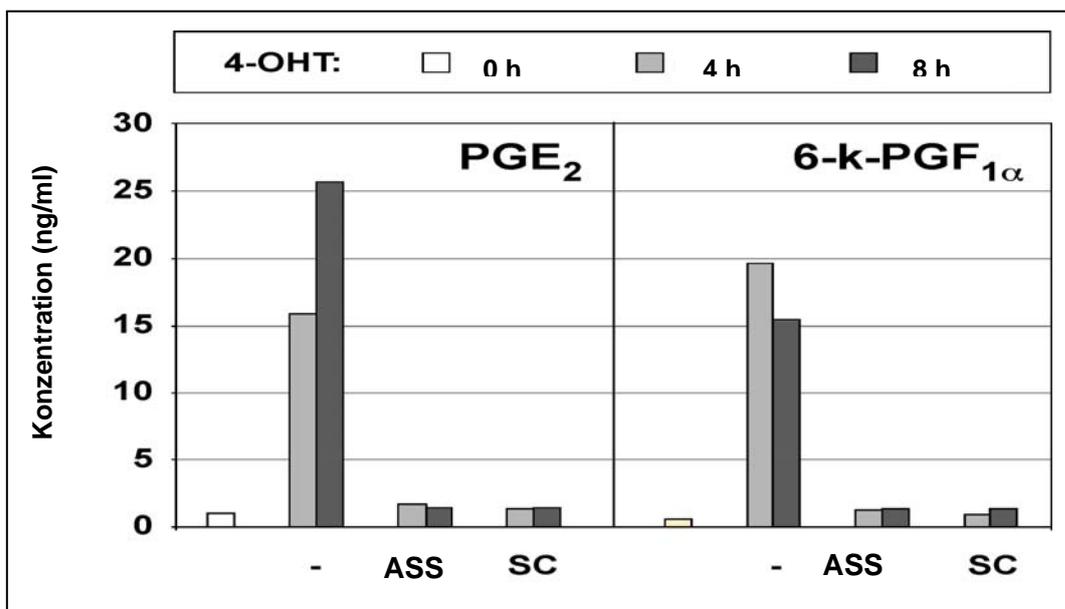


Abb. 10: Inhibition der Raf-induzierten Synthese von PGE₂ und PGI₂ durch Cox-Inhibitoren. Die Expression von Raf in 3T3Raf-ER Zellen wurde in Anwesenheit von 20 μM Arachidonsäure für 4 bzw. 8 h mit 200 nM 4-OHT induziert. Parallel wurden die Zellen entweder mit 100 μM ASS oder 0,1 μM sc-58125 behandelt. Die Analyse der Konzentration von PGE₂ bzw. des PGI₂-Metaboliten 6-k-PGF_{1α} im Zellüberstand wurde mittels GC-MS durchgeführt.

4.1.1.2 Induktion von Enzymen des Prostaglandinsynthese-Wegs

Neben Cox-2 gibt es noch einige andere Enzyme, die bei der Synthese der Prostaglandine eine wichtige Rolle spielen. Um den Einfluss von Raf auf die Transkription dieser Schlüsselfaktoren zu analysieren, wurden 3T3Raf-ER Zellen mit 4-OHT behandelt und das mRNA-Niveau von *cPLA₂*, *COX-2*, *mPGES-1* und *PGIS* mittels komparativer Real-Time PCR (siehe Kapitel 3.8.1.25.3) analysiert. Wie in der Abbildung 11 dargestellt, wurde die Expression von Cox-2 im Gegensatz zu der Expression der zytosolischen Phospholipase A₂ durch Raf deutlich induziert. Das Maximum wurde 240 min nach Zugabe von 4-OHT in das Zellkulturmedium erreicht. Unterstützt wurden diese Daten durch Northern Blots, die eine Zunahme der Cox-2 mRNA um etwa das Zehnfache zeigten (Abb. 11E). Die Expression von Cox-1 blieb hingegen unverändert. Neben Cox-2 wurde auch die Expression von PGIS, allerdings nur um das 1,3-fache, durch Raf induziert. Der Grund für die enorme Induktion der PGI₂-Synthese muss daher auf andere Weise vermittelt werden.

Eine relativ späte Induktion wurde für *mPGES-1* (Abb. 11C und Abb.12) gezeigt. Sie erreicht ihr Maximum nach 16 Stunden (4,7-fache Zunahme) und lässt daher eher auf einen indirekten oder über Zwischenstufen vermittelten Effekt von Raf schließen.

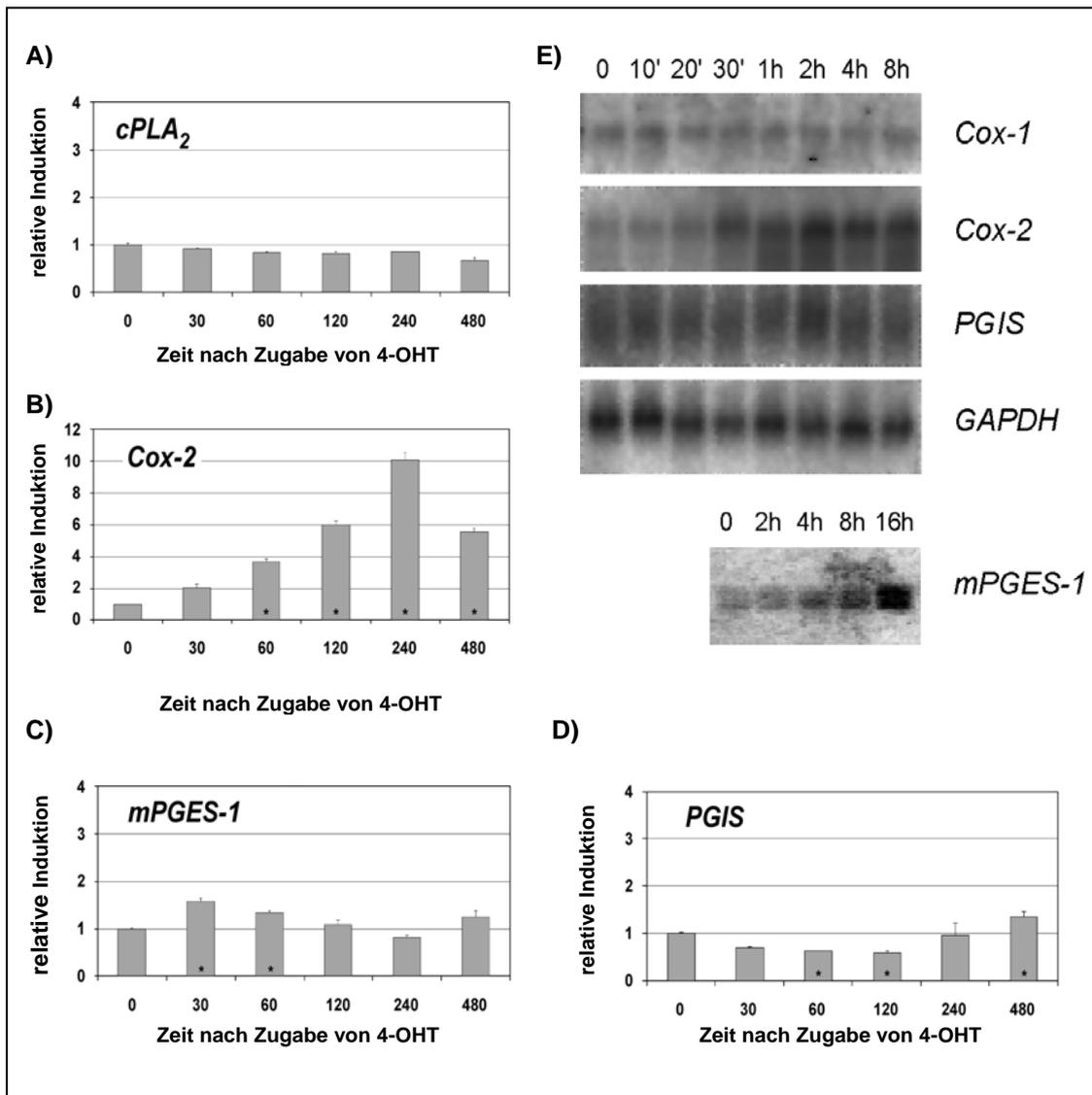


Abb. 11: Einfluss von Raf auf die Expression verschiedener Schlüsseltene des Prostaglandin-Synthesewegs. 3T3Raf-ER Zellen wurden für verschiedene Zeiträume (0 bis 480 min) mit 200 nM 4-OHT behandelt. Die Auswirkung der Aktivierung von Raf auf die Expression von *cPLA₂*, *COX-2*, *mPGES-1* und *PGIS* wurde dann über eine Real-Time-PCR durchgeführt (A – D). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,05$). Abbildung 11E zeigt die Northern Blot-Analyse eines in Zusammenarbeit mit Mihaela Kreutzer durchgeführten Versuchs mit 3T3Raf-ER-Zellen. Die quantitative Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms ‚Image Gauge 3.01‘ der Fa. Fujifilm, Tokyo/Japan.

4.1.1.3 Induktion von PPAR β

Abgesehen von dem Effekt auf die Expression verschiedener Enzyme, die während der Prostaglandinsynthese aktiv sind (Abb. 11), besitzt Raf auch einen transkriptionellen Einfluss auf PPAR β . Die stärkste Induktion wurde 480 min nach Zugabe von 4-OHT in das Medium von 3T3Raf-ER Zellen beobachtet (Abb. 12).

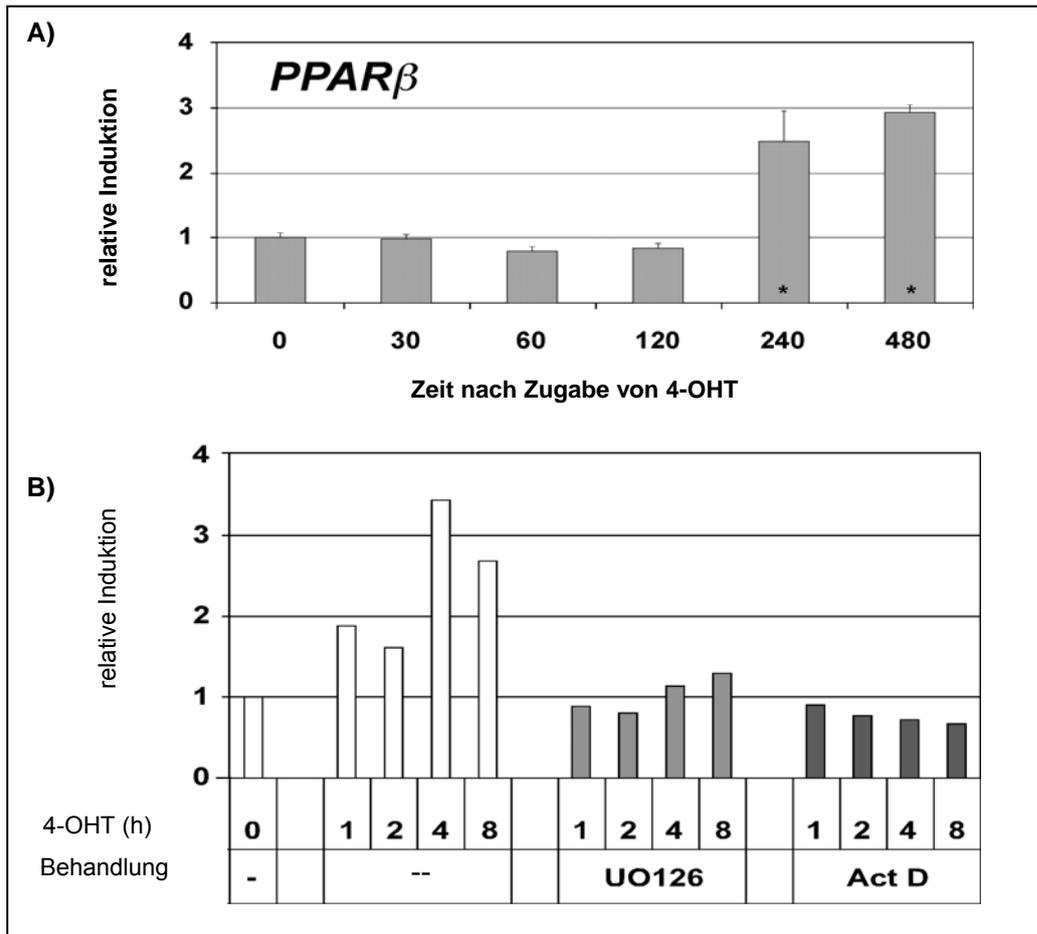


Abb. 12: Die Raf-abhängige Induktion der Expression von PPAR β wird durch die Raf-MEK-ERK1/2-Kaskade vermittelt. A) 3T3Raf-ER Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume (0 bis 480 min) mit 200 nM 4-OHT behandelt. Im Anschluss wurde die Expression von PPAR β mit Hilfe einer Real-Time-PCR analysiert. Die gezeigten Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,005$). B) Dargestellt ist der Einfluss des MEK-Inhibitors U0126 (100 μ M) bzw. des RNA Polymerase Inhibitors Actinomycin D auf die Raf-vermittelte Induktion der Expression von PPAR β (quantitative Analyse eines Northern Blots von Mihaela Kreutzer).

Dieser Effekt konnte durch den Einsatz des MEK-Inhibitors U0126 bzw. des Inhibitors der RNA Polymerase (Actinomycin D) vollständig blockiert werden, wie von Mihaela Kreutzer durchgeführte Northern Blots zeigten (Abb. 12B). Das weist darauf hin, dass

die transkriptionelle Regulation von PPAR β durch Raf über die Raf-MEK-ERK-Kaskade vermittelt wird.

PGI₂ wird in der Literatur mehrfach als natürlicher Agonist von PPAR β beschrieben (siehe Kapitel 2.5.1.2). Da Raf sowohl die Expression von PPAR β , als auch die Synthese von PGI₂ reguliert, sollte als nächstes der Frage nachgegangen werden, welchen Effekt Raf-induziertes PGI₂ auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β besitzt. Dafür wurden 3T3Raf-ER transient mit einem PPAR β -Expressionsplasmid transfiziert und der Raf-MEK-ERK-Signalweg durch Behandlung der Zellen mit 4-OHT induziert. Als Positivkontrolle für das verwendete System wurden die Zellen mit dem synthetischen, PPAR β -spezifischen Liganden GW501516 versetzt.

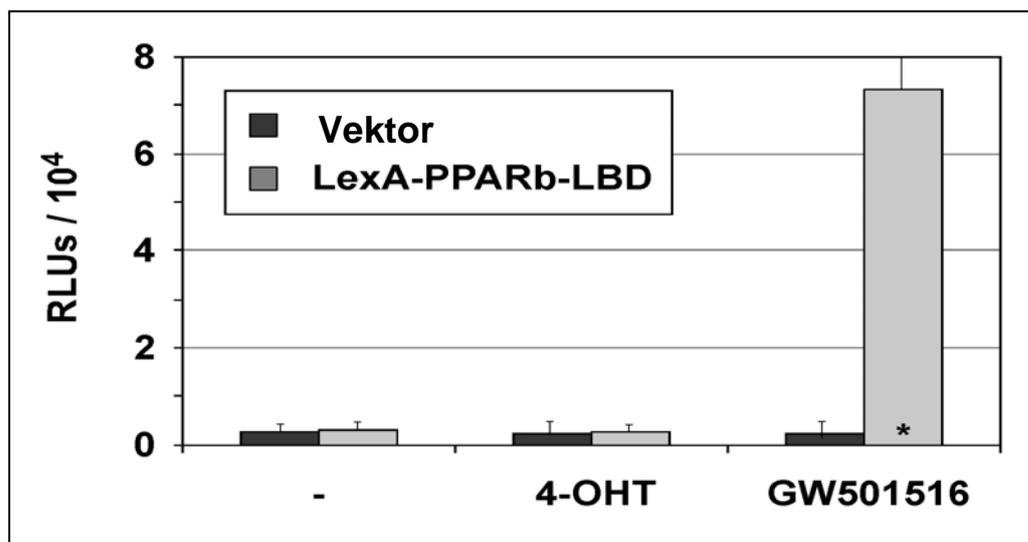


Abb. 13: Effekt von Raf auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β . 3T3Raf Zellen wurden mit einem Luziferase-Reporter-Gen-Plasmid (7L-TATAi) und einem Expressionsplasmid transient transfiziert, das für das Fusionsprotein LexA-PPAR β -LBD kodiert. Die Zellen wurden entweder mit 200 nM 4-OHT oder mit dem synthetischen PPAR β -Agonisten GW501516 (1 μ M) behandelt. Die Analyse der transkriptionellen Aktivität von PPAR β erfolgte 24 h nach der Transfektion mittels eines Reporter-Gen-Assays. RLUs: „relative light units“; Vektor: pcDNA3.1 (Leervektor). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,003$).

Charakteristisch für das Reporterplasmid ist, dass es keine signifikante basale Expression der Luziferase zeigt. Die Bindung des vom kotransfizierten Expressionsplasmid kodierten Fusionsproteins aus der PPAR β -LBD und der LexA-DNA-Bindungsdomäne erfolgt über die sieben LexA-Bindestellen des Expressionsplasmids, die 5' vor der „TATA-Initiator“-Domäne liegen (siehe Kapitel 3.8.2.5.3).

Wie die Abbildung 13 zeigt, führte der synthetische Agonist GW501516 zu einem etwa 30-fachen Anstieg der transkriptionellen Aktivität von PPAR β . Bei der Induktion von Raf durch 4-OHT blieb dieser Effekt hingegen völlig aus. Ähnliches wurde bei der Transfektion eines Luziferase-Reporterplasmids mit einem PPRE-tk-Promotor beobachtet (Abb. 14, Säulen 1 und 5).

Um auszuschließen, dass die ausbleibende Aktivierung von PPAR β an der limitierenden Konzentration des endogenen Heterodimerisierungspartners RXR bzw. dessen Liganden liegt, wurden 3T3Raf Zellen im gleichen Versuch zusätzlich mit einem RXR α -Ex-pressionsplasmid transfiziert.

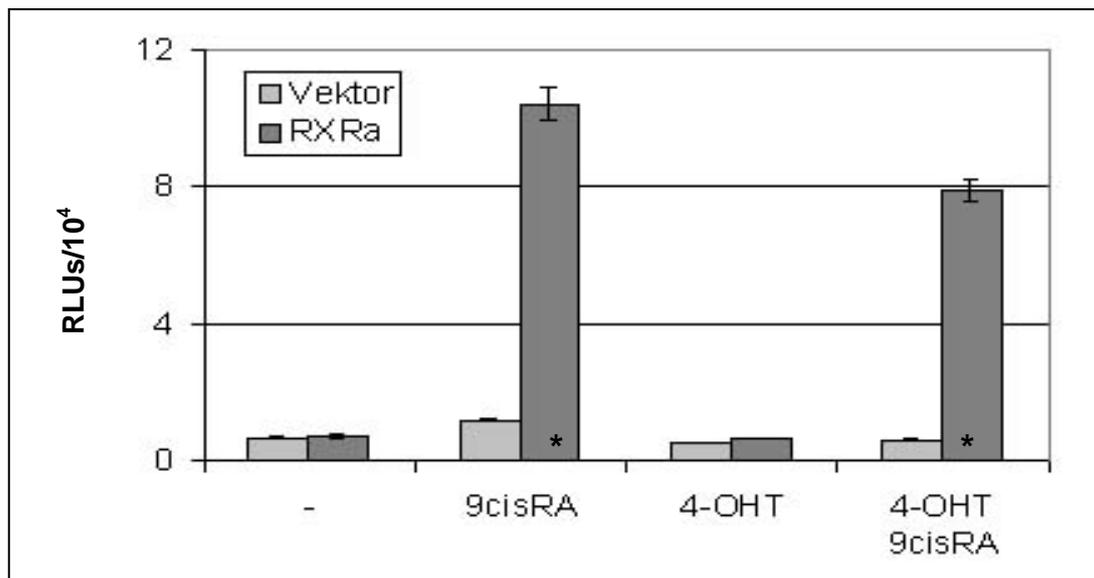


Abb. 14: Effekt von Raf auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β , wenn RXR α überexprimiert vorliegt. 3T3Raf Zellen wurden mit einem Reporterplasmid transfiziert, das einen PPRE-tk-Promotor besitzt. Expressionsplasmide für das humane RXR α (pSG5-hRXR α), sowie für das murine „full-length“ PPAR β -Protein wurden kotransfiziert (siehe Kapitel 2.9.1.3.2.3 und 2.9.1.4). Die Zellen wurden dann entweder mit 200 nM 4-OHT, mit 1 μ M 9-cis-RA oder mit einer Kombination aus beidem inkubiert. Die Analyse der transkriptionellen Aktivität von PPAR β erfolgte 24 h nach der Transfektion mittels eines Reporteragen-Assays. RLU: „relative light units“; Vektor: pCMX-empty (Leervektor). RXR: Zellen, die mit den Expressionsplasmiden für PPAR β und RXR α transfiziert wurden. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,001$).

Die transkriptionelle Aktivität von PPAR β wurde dann in Gegenwart bzw. Abwesenheit des RXR-spezifischen Liganden 9-cis-RA mittels eines Reporteragen-Assays (siehe Kapitel 3.8.2.5) analysiert.

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, führte die Induktion von Raf auch in Gegenwart von überexprimiertem RXR α nicht zum Anstieg der transkriptionellen Aktivität von PPAR β

(Säulen 2 und 6). Zellen, die in Anwesenheit des endogenen RXR mit 9-*cis*-Ra behandelt wurden, zeigten eine leicht erhöhte Induktion der Expression des Reportergens. Einen deutlichen Anstieg der Luziferase-Expression konnte man hingegen bei Zellen feststellen, die sowohl PPAR β , als auch RXR überexprimierten und mit 9-*cis*-RA bzw. der Kombination aus 9-*cis*-RA und 4-OHT behandelt wurden (Säulen 4 und 8 im Vergleich zur Säule 2).

Raf induzierte sowohl die Synthese von Prostazyklin, als auch die Expression von PPAR β . Da dies jedoch nicht zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität von PPAR β führte, sollte die Rolle von PGI₂ im Folgenden genauer betrachtet werden.

4.1.2 Einfluss von PGI₂ auf PPAR β

4.1.2.1 Agonistischer Effekt von AA

Verschiedene mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie die Arachidonsäure (AA) oder die Eicosapentaensäure (EPA), sollen eine agonistische Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β besitzen (McKenna, 2003; Berger und Moller, 2002; Komar, 2005). Um dies zu verifizieren, wurden NIH3T3 Zellen für 24 h mit Arachidonsäure, EPA oder einem der beiden synthethischen Agonisten für PPAR β (cPGI oder GW501516) inkubiert. Die Analyse wurde mittels des LexA-Reportersystems durchgeführt (siehe Kapitel 3.8.2.5.3).

Wie der Abbildung 15 zu entnehmen ist, führten die beiden synthethischen Agonisten GW501516 bzw. Carbaprostazyklin zu einer deutlichen Zunahme der Aktivität von PPAR β , während der agonistische Effekt der beiden ungesättigten Fettsäuren deutlich geringer war. Bei der Zugabe von EPA konnte erst bei einer relativ hohen Konzentration von 50 μ M ein leichter Anstieg der Expression der Luziferase beobachtet werden, während bereits 20 μ M Arachidonsäure eine reproduzierbare Steigerung der transkriptionellen Aktivität von PPAR β bedingten.

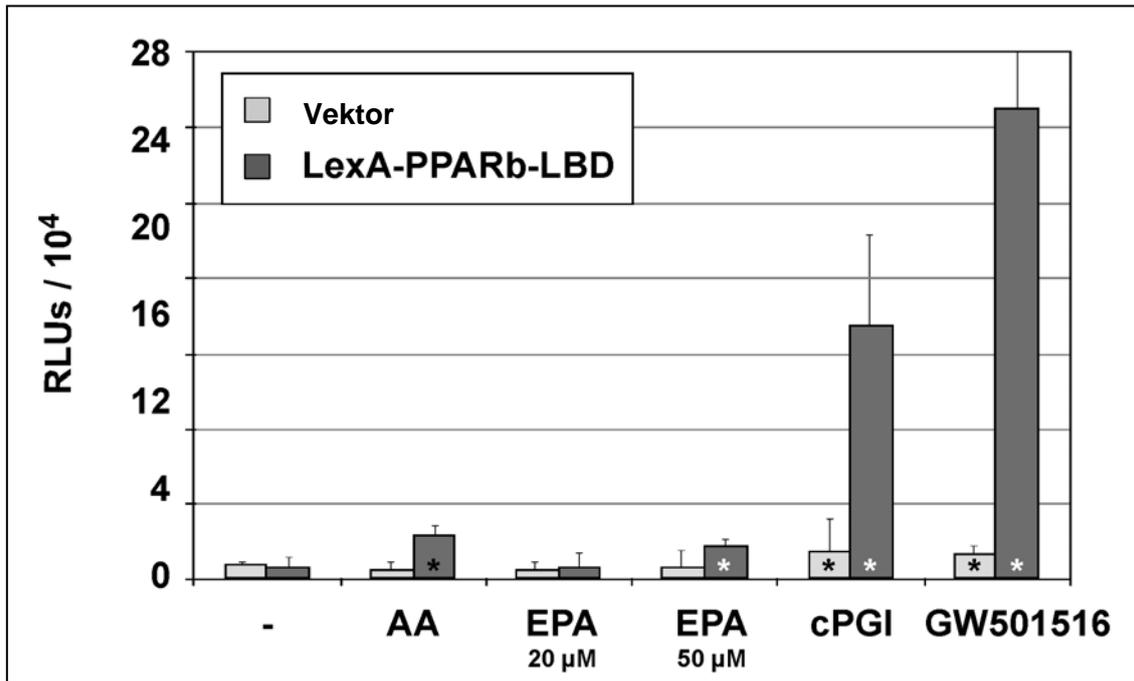


Abb. 15: Agonistischer Effekt von AA auf die transkriptionelle Aktivität von PPARβ. NIH3T3 Zellen wurden mit einem Luziferase-Reportergen-Plasmid (7L-TATAi) und einem Expressionsplasmid transient transfiziert, das für das Fusionsprotein LexA-PPARβ-LBD kodiert (2.9.1.3.2.3 und 2.9.1.4). Die Zellen wurden entweder mit 20 μM Arachidonsäure (AA), 20 bzw. 50 μM EPA oder mit den synthetischen PPARβ-Agonisten GW501516 (1 μM) bzw. cPGI (1 μM) behandelt. Die Analyse der transkriptionellen Aktivität von PPARβ erfolgte 24 h nach der Transfektion mittels eines Reportergen-Assays. RLU: „relative light units“; Vektor: pcDNA3.1 (Leervektor). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,05$).

Um zu überprüfen, ob der agonistische Effekt der Arachidonsäure über Prostazyklin vermittelt wird, wurden NIH3T3 Zellen in An- und Abwesenheit von Arachidonsäure mit einem PGIS-spezifischen Inhibitor (U51605) behandelt. Danach wurde die Konzentration von PGI₂ im Zellüberstand gemessen, um den Effekt der Arachidonsäure auf die Prostazyklinsynthese zu analysieren. Ferner wurde der Einfluss der Fettsäure auf die transkriptionelle Aktivität von PPARβ mittels eines parallel durchgeführten Reportergen-Assays überprüft.

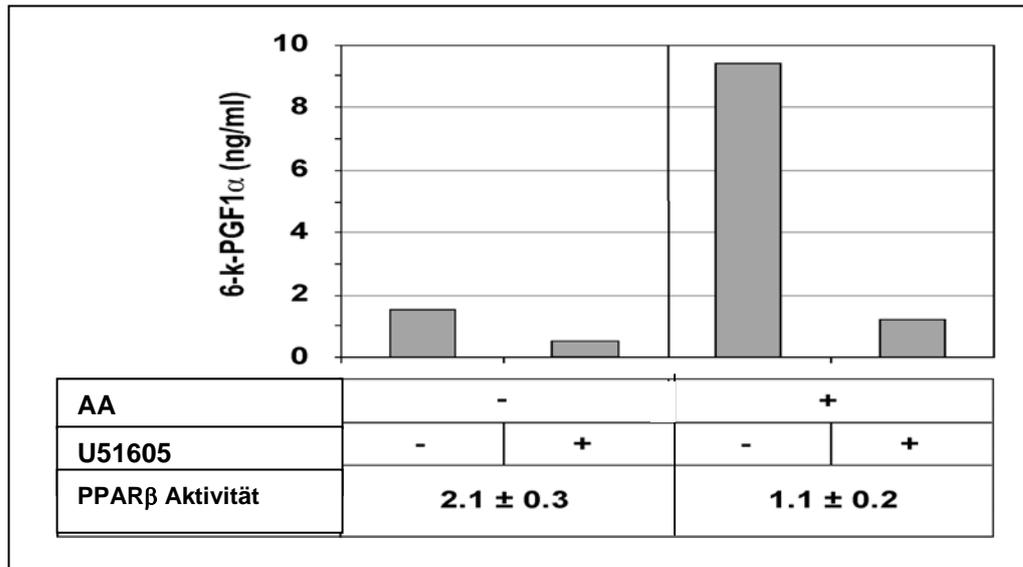


Abb. 16: Einfluss von Prostazyklin auf den agonistischen Effekt von AA (Inhibition der PGIS). NIH3T3 Zellen wurden mit einem Luziferase-Reportergen-Plasmid (7L-TATAi) und einem Expressionsplasmid transient transfiziert, das für das Fusionsprotein LexA-PPARβ-LBD kodiert (2.9.1.3.2.3 und 2.9.1.4). Die Zellen wurden 16 h mit dem PGIS-spezifischen Inhibitor präinkubiert. Die Bestimmung der Konzentration des PGI₂-Metaboliten 6-k-PGF1α erfolgte nach weiteren 8 h in Ab- bzw. Anwesenheit von 20 μM Arachidonsäure (AA) mittels GC-MS. Parallel wurde die transkriptionellen Aktivität von PPARβ mittels eines Reportergen-Assays ermittelt. Dargestellt ist hier das RLU-Verhältnis der Zellen, die mit 2,5 μM U51605 behandelt wurden, geteilt durch die Zellen, die nicht behandelt wurden. RLU: ‚relative light units‘.

Wie in der Graphik der Abbildung 16 dargestellt, bedingte die Arachidonsäure einen etwa 6-fachen Anstieg der Prostazyklin-Konzentration im Medium, der durch den Einsatz des PGIS-spezifischen Inhibitors vollständig verhindert wird. Die transkriptionelle Aktivität von PPARβ wird davon jedoch nicht beeinflusst, wie man der Tabelle (Abb. 16) entnehmen kann. In Abwesenheit von ektopischer Arachidonsäure ist weiterhin ein 2-facher Anstieg der Expression der Luziferase bei Zugabe des PGIS-Inhibitors zu beobachten. Gleichzeitig reduziert U51605 das Basalniveau von Prostazyklin noch mal um den Faktor 3.

Analog dazu wurde der Effekt des Cox-1/2-Inhibitors Aspirin (100 μM ASS) auf die Aktivität von PPARβ bzw. die Prostazyklinsynthese analysiert (Abb. 17). Durch die Inhibition von Cox-1/2 durch Aspirin wurde der Arachidonsäure-vermittelte Anstieg der Prostazyklin-Konzentration vollständig inhibiert. Trotzdem wurde keine Abnahme der transkriptionellen Aktivität von PPARβ verzeichnet. Diese Daten unterstützen also die

Beobachtung, das Prostazyklin keinen signifikanten Effekt auf die Regulation von PPAR β besitzt.

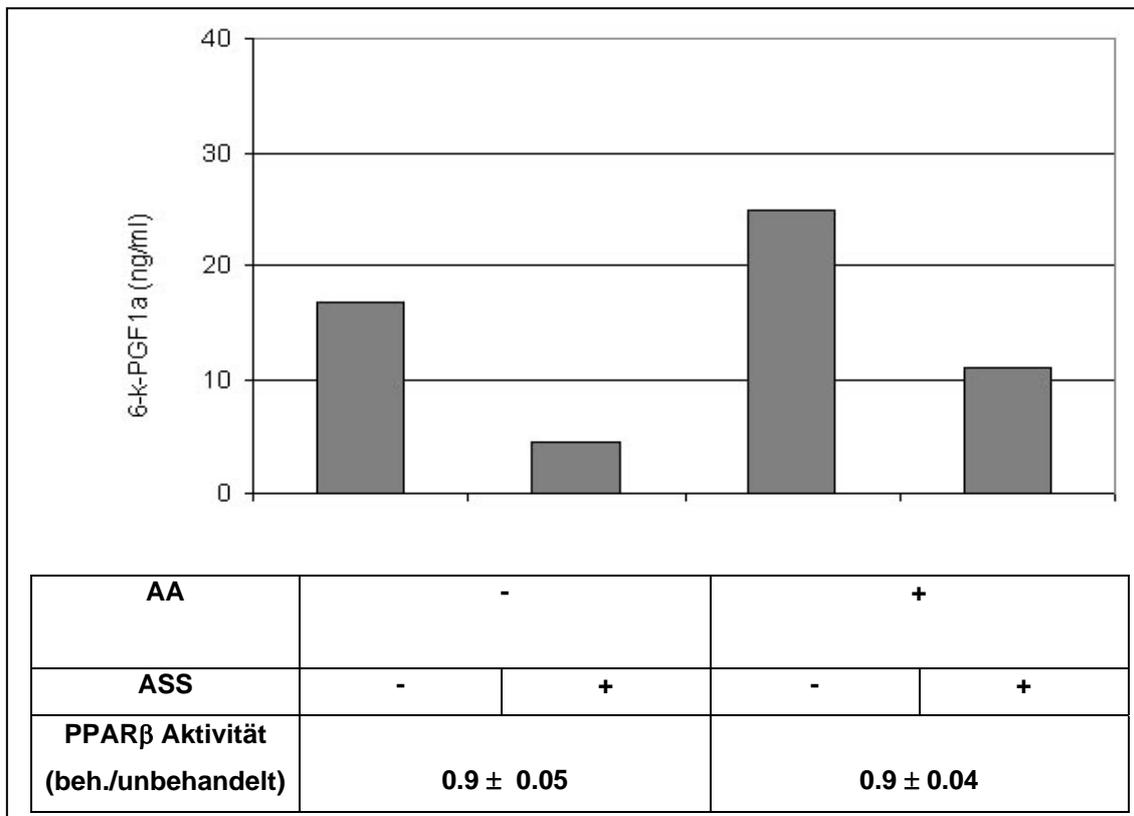


Abb. 17: Einfluss von Prostazyklin auf den agonistischen Effekt von AA (Inhibition von Cox-1/2). Für die Versuchsbeschreibung siehe auch Abb. 16. Die Zellen wurden für 16 h mit 100 μ M des generellen Cyclooxygenasen-Inhibitors ASS präinkubiert. Die Analyse erfolgte nach weiteren 8 h in Ab- bzw. Anwesenheit von 20 μ M Arachidonsäure (AA). Die Graphik zeigt die gemessene Konzentration des PGI $_2$ -Metaboliten 6-k-PGF1 α im Überstand. Parallel dazu wurde die transkriptionellen Aktivität von PPAR β mittels eines Reporteragen-Assays ermittelt (Auswertung, siehe Tabelle).

4.1.2.2 Überexpression von Cox-2 und PGIS

Um den direkten Effekt von Cox-2 bzw. PGIS auf die Synthese von Prostazyklin und die transkriptionelle Aktivität von PPAR β zu analysieren, wurden diese Enzyme in HEK293 Zellen überexprimiert. Wie in Abbildung 18 dargestellt, führte die Überexpression von Cox-2 bzw. PGIS alleine (in Anwesenheit von Arachidonsäure) nur zu einer sehr schwachen Zunahme der Prostazyklinsynthese. Die Kotransfektion von beiden Expressionsplasmiden (pcDNA3.1-Cox-2 und pcDNA3.1-PGIS) resultierte hingegen in einer fast 100-fachen Steigerung der Konzentration von 6-k-PGF1 α im Medium.

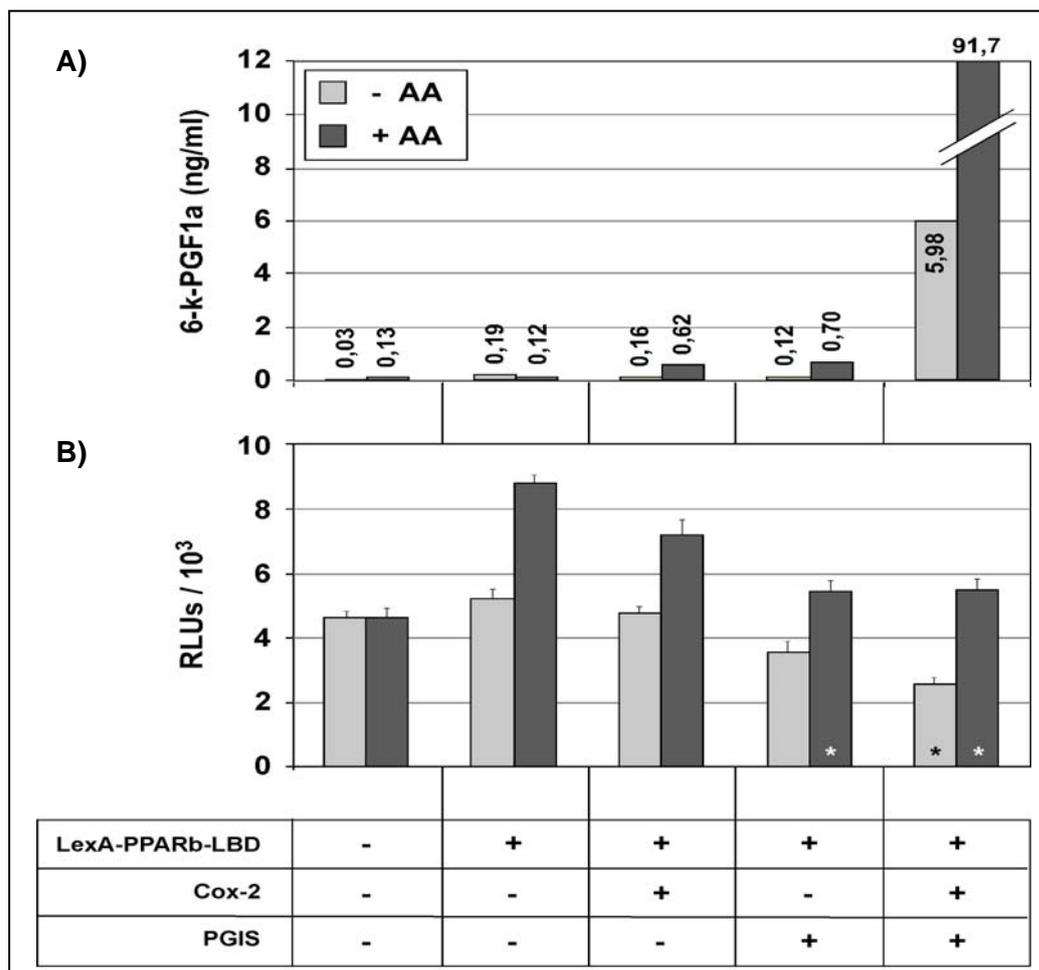


Abb. 18: Effekt von Cox-2 bzw. PGIS (LexA-System). Hek293 Zellen wurden mit einem Luziferase-Reportergen-Plasmid (7L-TATAi) und einem Expressionsplasmid transfiziert, das für das Fusionsprotein LexA-PPAR β -LBD kodiert (2.9.1.3.2.3 und 2.9.1.4). Kotransfiziert wurde weiterhin das Cox-2-Expressionsplasmid (pcDNA3.1-COX-2) und/oder das Expressionsplasmid für PGIS (pcDNA3.1-PGIS). Die Messung der Konzentration des Prostazyklin-Metaboliten 6-k-PGF1 α im Überstand wurde 24 h nach der Transfektion in An- bzw. Abwesenheit von 40 μ M Arachidonsäure durchgeführt (A). Parallel dazu wurde die transkriptionelle Aktivität von PPAR β mittels eines Reportergen-Assays ermittelt (B). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,01$). RLUs: „relative light units“.

Doch auch hier zeigte sich keine Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β . Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Expression des Luziferase-Reportergens durch die Kotransfektion des Cox-2- und des PGIS-Plasmids reduziert wurde.

Diese Beobachtungen stehen in deutlichem Kontrast zu den Ergebnissen von Gupta *et al.* (2000). Die Überexpression von COX-2 und PGIS in U2OS-Zellen führte hier sowohl zu einem Anstieg der Prostazyklinsynthese, als auch zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität von PPAR β . Die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses sollte daher im Folgenden analysiert werden. Dazu wurden U2OS-Zellen mit einem Gal4-Reportersystem (siehe Kapitel 3.8.2.5.2), sowie dem Cox-2- bzw. dem PGIS-Expressionsplasmid transfiziert (siehe Kapitel 3.8.2.4.1). Nach 24 Stunden wurde sowohl die Konzentration des Prostazyklins im Überstand, als auch die PPAR β -abhängige Expression der Luziferase analysiert.

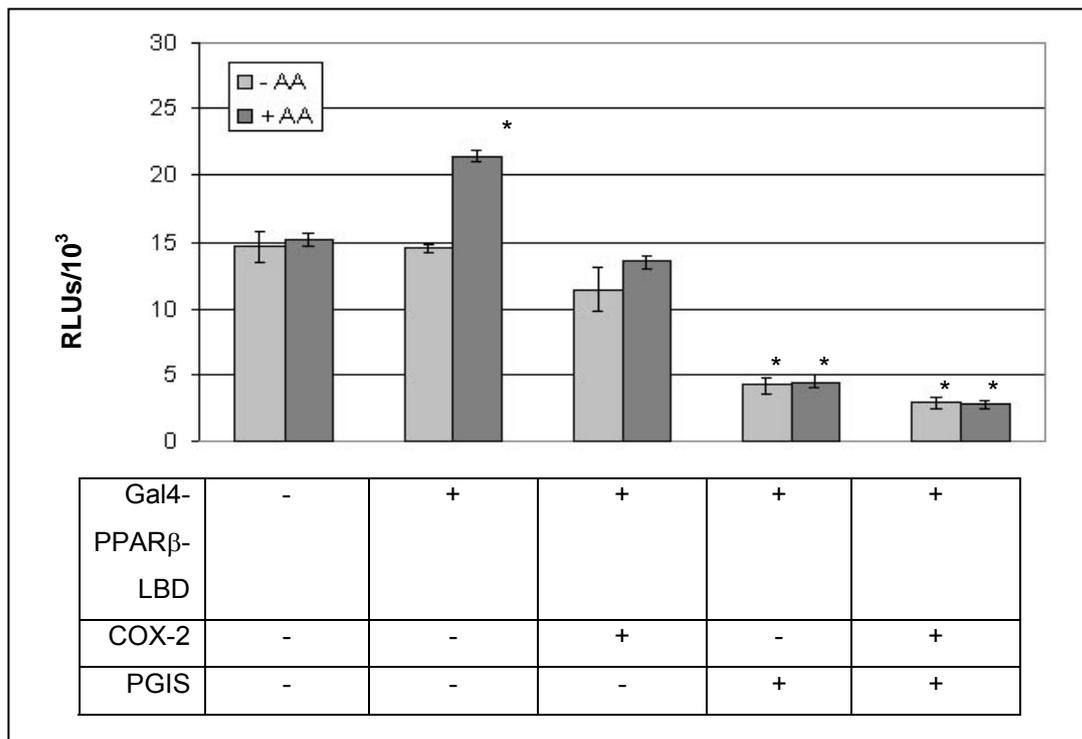


Abb. 19: Effekt von Cox-2 bzw. PGIS (Gal4-System). U2OS-Zellen wurden mit einem Luziferase-Reportergen-Plasmid (10xGalSVGI3) und einem Expressionsplasmid transfiziert, das für das Fusionsprotein Gal4-PPAR β -LBD kodiert (2.9.1.3.2.3 und 2.9.1.4). Kotransfiziert wurde weiterhin das Cox-2-Expressionsplasmid (pcDNA3.1-COX-2) und/oder das Expressionsplasmid für PGIS (pcDNA3.1-PGIS). 24 h nach der Transfektion wurde die transkriptionellen Aktivität von PPAR β in Ab- bzw. Anwesenheit von 40 μ M Arachidonsäure mittels eines Reportergen-Assays ermittelt. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,01$). RLU: „relative light units“.

Wie bereits in der Abbildung 18 und von Gupta *et al.* (2000) gezeigt, resultierte die gemeinsame Überexpression von Cox-2 und PGIS in einem deutlichen Anstieg der Prostazyklinsynthese. Ein Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β konnte jedoch auch in diesem Reporter-System nicht beobachtet werden (Abb. 19).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Prostazyklin keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation von PPAR β besitzt. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Arachidonsäure einen, wenn auch schwachen, agonistischen Effekt auf PPAR β ausübt, der jedoch nicht auf die Umwandlung durch die Cyclooxygenasen zurückzuführen ist.

4.1.3 Der LOX-Signalweg

Arachidonsäure kann nicht nur durch Cox-1/2, sondern auch durch verschiedene Lipoxygenasen metabolisiert werden (siehe Kapitel 2.8). Um die dokumentierte, transkriptionelle Aktivierung von PPAR β durch Arachidonsäure (siehe Abb. 15) zu erklären, wurde daher im Folgenden analysiert, ob die Umwandlung von Arachidonsäure durch Lipoxygenasen den natürlichen Liganden von PPAR β liefert. Dazu wurden NIH3T3 Zellen mit dem LexA-Reportersystem transfiziert und die Aktivität der Lipoxygenasen durch den Inhibitor NDGA („nordihydroguaiaretic acid“) gehemmt.

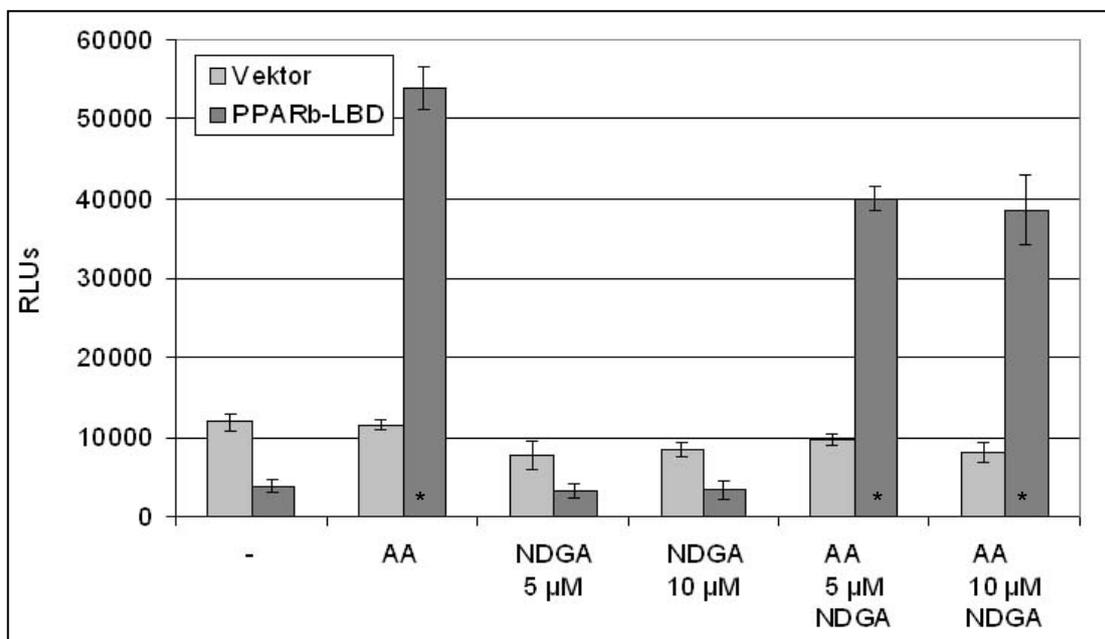


Abb. 20: Effekt von Cox-2 bzw. PGIS. NIH3T3 Zellen wurden mit dem LexA-Reportersystem transfiziert (siehe auch Erklärung zu Abb. 15). Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24 h mit 5 bzw. 10 μ M NDGA behandelt und die transkriptionelle Aktivität von PPAR β in Ab- bzw. Anwesenheit von Arachidonsäure mittels eines Reporterassays ermittelt. Vektor: pcDNA3.1 (Leervektor). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,05$). RLUs: „relative light units“.

Der Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β wurde sowohl in Ab-, als auch in Anwesenheit von Arachidonsäure gemessen.

Wie der Abbildung 20 zu entnehmen ist, führte die Arachidonsäure zu einer etwa 13-fachen Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von PPAR β . Diese Zunahme wurde durch den Einsatz des Lipoxygenase-Inhibitors NDGA um 19 % (5 μ M NDGA) bzw. 21 % (10 μ M NDGA) verringert. Doch auch bei den Zellen, die mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden, sank die Expression des Luziferase-Reportergens durch die Behandlung mit NDGA um einen vergleichbaren Prozentsatz. Ein weiteres Kontrollexperiment sollte daher verifizieren, dass der Metabolismus von Arachidonsäure durch die Lipoxygenasen keine Erklärung für den agonistischen Effekt der Arachidonsäure darstellt. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Produkte des Lipoxygenase-Signalweges auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β analysiert. Nach der Transfektion des LexA-Reportersystem wurden NIH3T3-Zellen für 24 h mit 2 μ M 5(S)HpETE, 12(S)HpETE bzw. 15(S)HpETE inkubiert. Wie die Abbildung 21 zeigt, besaß lediglich die Arachidonsäure einen signifikanten, agonistischen Effekt auf die Aktivität von PPAR β . Eine Aktivierung um den Faktor 1,3 wurde von 5(S)HpETE und 12(S)HpETE erreicht, jedoch ergab der durchgeführte, gepaarte T-Test einen p-Wert von fast 0,08 bzw. 0,06, so dass die Signifikanz dieser Ergebnisse nicht hinreichend dokumentiert werden konnte.

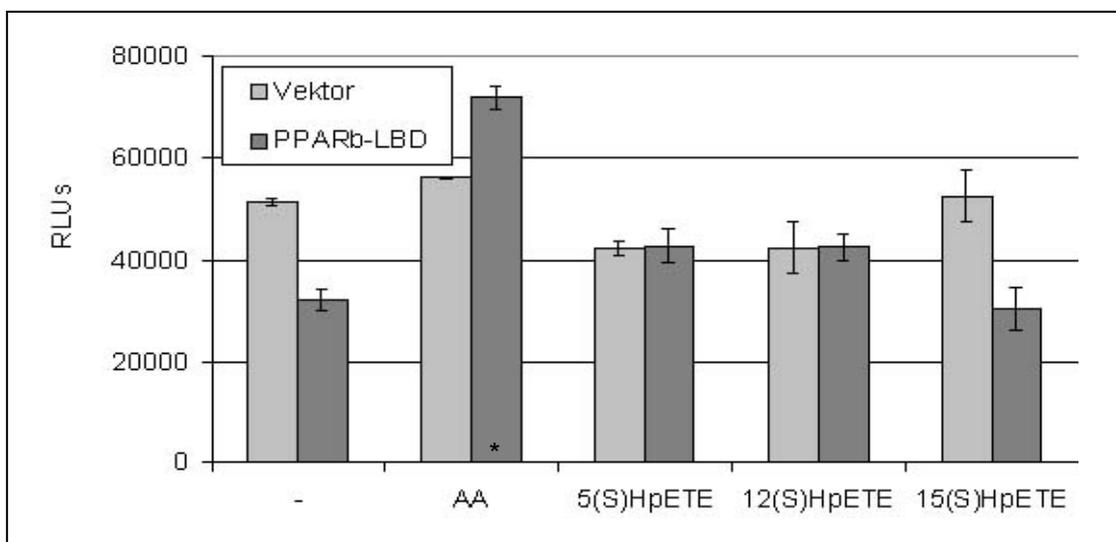


Abb. 21: Effekt verschiedener Arachidonsäure-Produkte auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β . 3T3 Zellen wurden mit dem LexA-Reportersystem transfiziert (siehe auch Erklärung zu Abb. 15). Direkt im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit 20 μ M Arachidonsäure (AA), 2 μ M 5(S)HpETE, 2 μ M 12(S)HpETE oder 2 μ M 15(S)HpETE behandelt. Vektor: pcDNA3.1 (Leervektor). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,003$). RLUs: „relative light units“.

4.1.4 Einfluss von PGE₂ auf die transkriptionelle Aktivität von PPARβ

Die Aktivierung von Raf induziert nicht nur die Arachidonsäure-abhängige Synthese von Prostazyklin, sondern auch von Prostaglandin E₂ (Abb. 9). Dieses wirkt wiederum positiv auf die Produktion von proangiogenen Faktoren und spielt daher eine wichtige Rolle im Rahmen der Tumorangio-genese (Amano *et al.*, 2003; Sonoshita *et al.*, 2001). Desweiteren wurde eine, allerdings relativ späte, Raf-abhängige Zunahme der Expression der Prostazyklin-Synthase (*mPGES-1*) beobachtet (Abb. 11C). Da bereits Studien von Wang *et al.* (2004) auf eine Verbindung von PGE₂ und PPARβ hinwiesen, sollte im Folgenden untersucht werden, welchen Effekt PGE₂ auf die transkriptionelle Aktivität von PPARβ besitzt. Da LLC Zellen („Lewis Lung Carcinoma“) relativ große Mengen PGE₂ synthetisieren (ca. 1,6 µg/ml und 24 h bzw. 10⁶ Zellen), wurden zunächst 3T3-Zellen mit dem LexA-Reportersystem transfiziert und für 24 Stunden mit 3 Tage altem Überstand von LLC Zellen inkubiert.

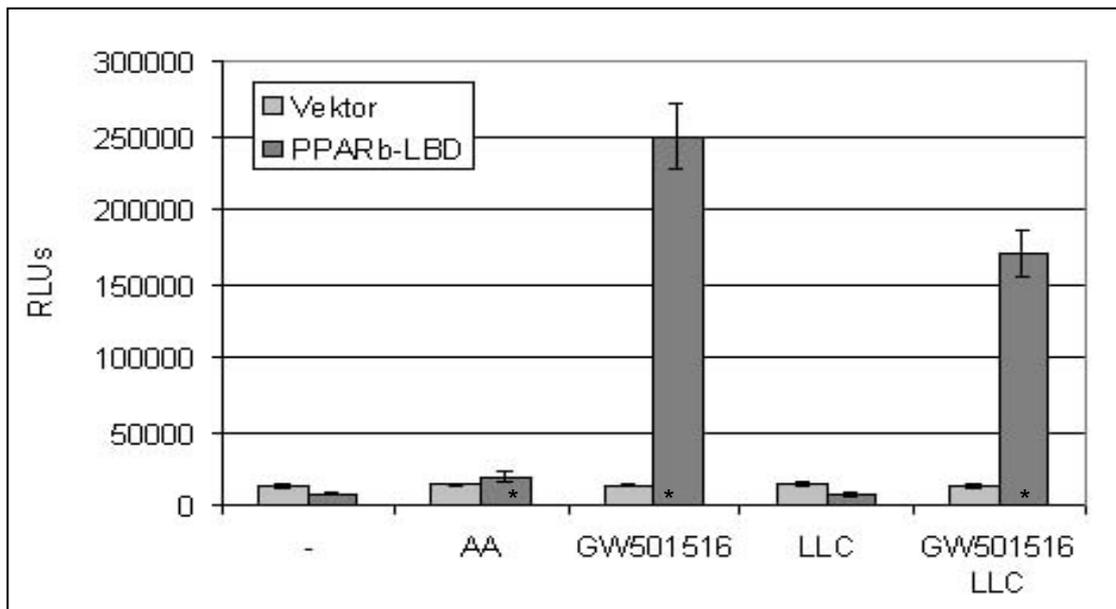


Abb. 22: Einfluss von PGE₂ auf die transkriptionelle Aktivität von PPARβ (LLC-Überstand). 3T3 Zellen wurden mit dem LexA-Reportersystem transfiziert (siehe auch Erklärung zu Abb. 15). Dann wurden die Zellen für 24 h mit 20 µM Arachidonsäure (AA), 1 µM GW501516 oder 2 ml 3 Tage altem Überstand von LLC Zellen inkubiert. Vektor: pcDNA3.1 (Leervektor). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,02$). RLUs: „relative light units“.

Wie in der Abbildung 22 gezeigt, induzierte der synthetische Agonist von PPARβ (GW501516) die transkriptionelle Aktivität des Kernrezeptors um den Faktor 31, Arachidonsäure erhöhte die Expression des Luziferase-Reportergens um das 2,4-fache.

Im Gegensatz dazu übte der PGE₂-haltige Überstand der LLC Zellen keinen Einfluss auf PPAR β aus. Vielmehr konnte bei der Kombination von GW501516 und dem Überstand der LLC Zellen ein Rückgang der transkriptionellen Aktivität von PPAR β im Vergleich zu den Zellen beobachtet werden, die nur mit GW501516 behandelt wurden.

Als weiterer Kontrollversuch wurden NIH3T3 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen PGE₂ behandelt und der Effekt auf PPAR β mittels eines LexA-Reportergen-Assays ermittelt. Wie sich herausstellte, hatte keine der hier eingesetzten PGE₂-Konzentrationen einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β (Abb. 23).

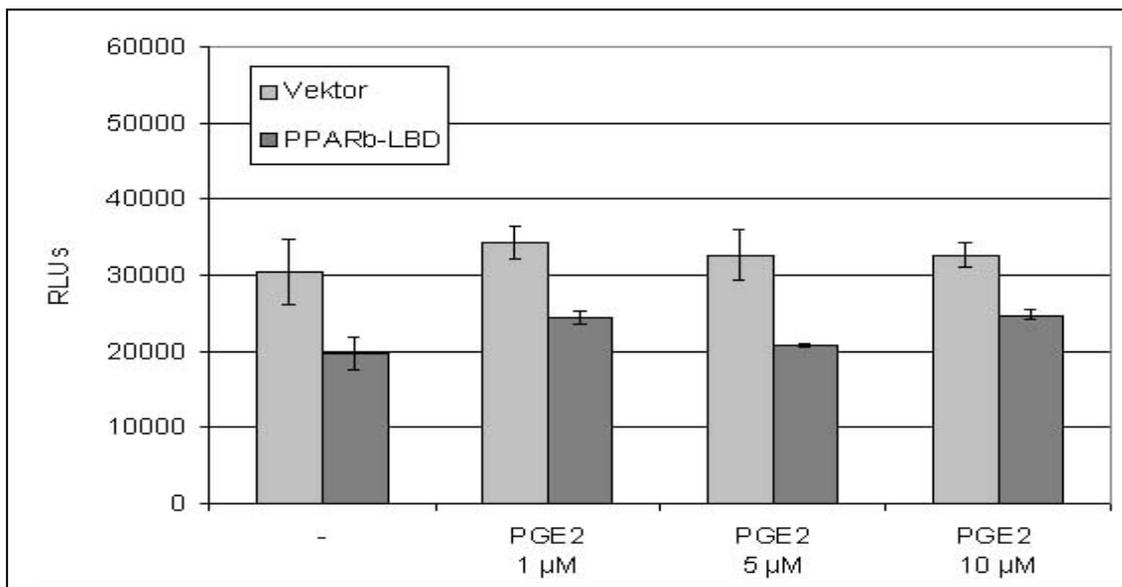


Abb. 23: Einfluss von PGE₂ auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β . 3T3 Zellen wurden mit dem LexA-Reportersystem transfiziert (siehe auch Erklärung zu Abb. 15). Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M PGE₂ inkubiert. Vektor: pcDNA3.1 (Leervektor). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. RLUs: „relative light units“.

4.1.5 Einfluss von PPAR γ auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β

Die Frage nach dem natürlichen Liganden konnte in den bisher beschriebenen Experimenten leider nicht geklärt werden. Umso interessanter ist daher die Analyse von anderen Faktoren, die womöglich eine wichtige Rolle bei der Regulation von PPAR β spielen könnten.

In diesem Zusammenhang zeigten Studien bezüglich des Expressionsniveaus von PPAR β und PPAR γ in verschiedenen NSCLC-Linien, dass Zelllinien mit ausgesprochen hohem PPAR β -Level PPAR γ meist nur in geringen Mengen exprimierten und umgekehrt (siehe Abb. 24).

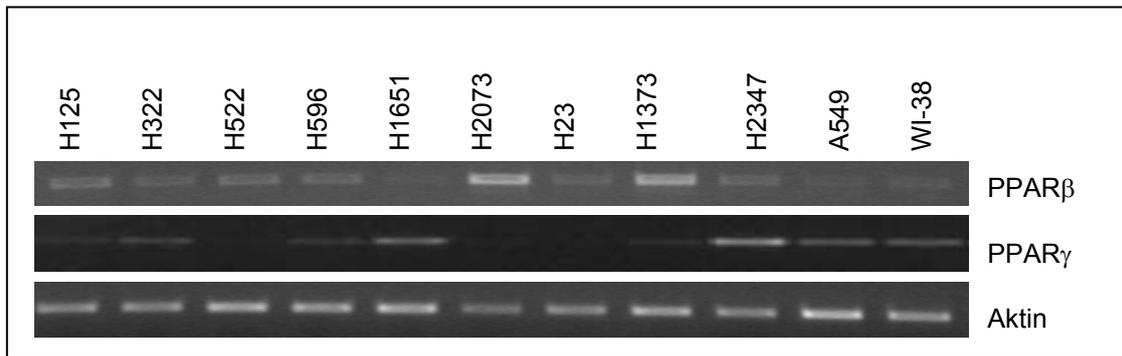


Abb. 24: Expressionsniveau von PPAR β bzw. PPAR γ in verschiedenen NSCLC. Gezeigt ist die RT-PCR-Analyse der Expression von PPAR β bzw. PPAR γ in den genannten humanen NSCLC-Linien. Zelllinien, wie H2073 und H1373, die ein relativ hohes Expressionsniveau von PPAR β besitzen, exprimieren kaum PPAR γ . Im Gegensatz dazu konnte PPAR β in Zellen mit stark exprimiertem PPAR γ (H1651, H2347 und A549) nur in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Nachstehend sollte nun untersucht werden, ob PPAR γ eine antagonistische Funktion auf die Transkription von PPAR β besitzt. Dazu wurden H125, H322, A549, H596, H1651 und H2347 Zellen für 24 h mit dem PPAR γ Agonisten Rosiglitazone bzw. dem PPAR γ Antagonisten GW9662 behandelt und der Effekt auf die Transkription von PPAR β mittels Real-Time-PCR analysiert. Ein genereller antagonistischer Effekt auf die Transkription von PPAR β konnte für PPAR γ aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 25). Einzig in H125 Zellen resultierten der PPAR γ -Agonist Rosiglitazone in einer Abnahme, sowie der PPAR γ -Antagonist GW9662 in einer Zunahme des RNA-Levels von PPAR β . Die Analyse der anderen Zelllinien ergab hingegen kein einheitliches Bild: Bei der Zelllinie H596 und in geringem Maß auch bei H1651 führte die Behandlung mit dem Antagonisten von PPAR γ zu einer erhöhten Transkription von PPAR β , doch der erwartete, gegensätzliche Einfluss des PPAR γ -Agonisten blieb aus. Andere Zelllinien, wie H322 und H2347 zeigten überhaupt keine PPAR γ -spezifische Regulation des PPAR β -RNA-Levels.

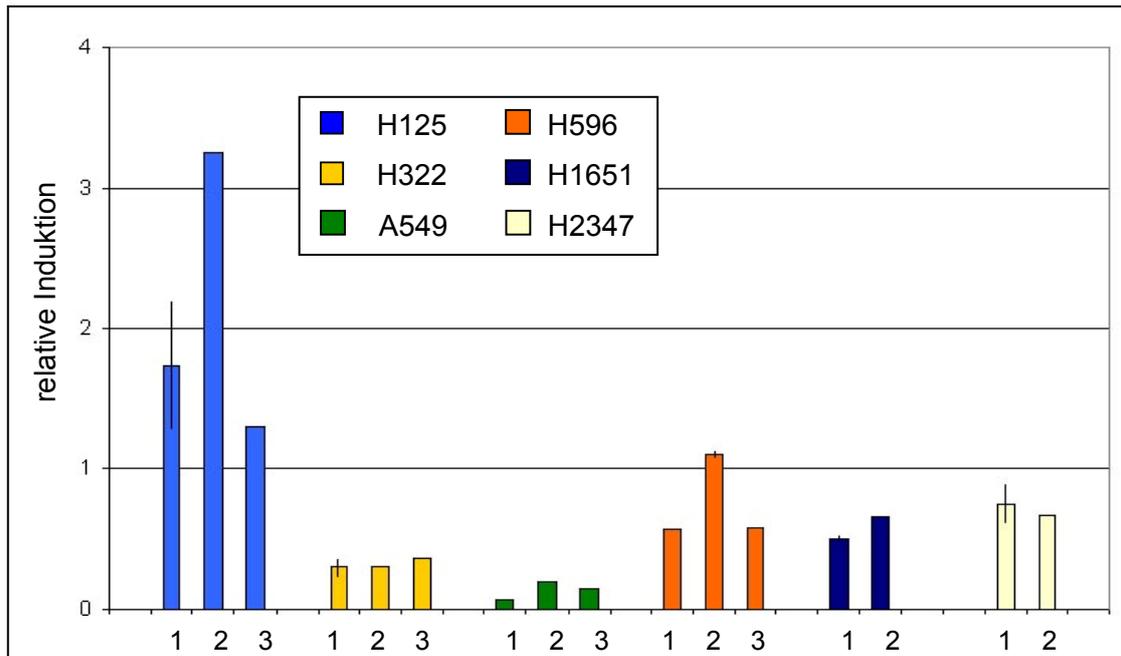


Abb. 25: PPAR γ übt keinen transkriptionellen Einfluss auf PPAR β aus. Gezeigt ist die Real-Time-PCR-Analyse der Expression von PPAR β in den NSCLC-Zelllinien H125, H322, A549, H596, H1651 und H2347 nach Abgleich auf Aktin. Die Zelllinien wurden für 24 h entweder mit 2 μ M des PPAR γ Antagonisten GW9662 (GW) oder mit 10 μ M des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazone (Rosi) behandelt. H1651 und H2347 wurden nur mit dem Antagonisten behandelt, da sie bereits große Mengen an PPAR γ exprimierten und ein zusätzlicher Effekt durch Behandlung der Zellen mit dem Agonisten daher nicht zu erwarten war. 1: unbehandelte Zellen; 2: Zellen + GW; 3: Zellen + Rosi.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass Prostazyklin in den untersuchten Testsystemen eindeutig keinen signifikanten Effekt auf die Regulation von PPAR β ausübt. Arachidonsäure, wie auch einige andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren, besitzen einen reproduzierbaren, agonistischen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β . Doch wie diese Wirkung vermittelt wird, konnte durch die vorliegenden Daten nicht restlos geklärt werden. Ausgeschlossen werden kann der Signalweg über COX-2 und PGIS, sowie der Metabolismus der Arachidonsäure durch verschiedene Lipoxygenasen.

Obwohl verschiedene NSCLC ein gegensätzliches Expressionsmuster für PPAR β und PPAR γ aufweisen, fungiert PPAR γ nicht als transkriptioneller Regulator von PPAR β .

4.2 Identifizierung von Zielgenen für PPAR β

4.2.1 Genexpressionsanalyse mittels siRNA-Technologie und Microarray

Verschiedene Studien zeigten, dass PPAR β an der Regulation der Zellproliferation, sowie der Apoptose beteiligt ist. Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie diese biologische Funktion von PPAR β vermittelt wird. Im Folgenden sollten daher Zielgene von PPAR β identifiziert werden, die diese Wirkung näher erklären. Dafür wurden NIH3T3 Zellen mit zwei verschiedenen PPAR β -siRNAs transfiziert (siehe Kapitel 3.8.2.4.2.5) und die Effizienz des „Knock-downs“ von PPAR β sowohl auf Protein-(A), als auch auf RNA-Ebene (B) überprüft (siehe Kapitel 3.8.1.20 und 3.8.1.25). Wie die Abbildung 26 darstellt, führte die Behandlung der NIH3T3-Zellen mit der spezifischen siRNA zur deutlichen Abnahme des RNA-Levels von PPAR β . Ein noch deutlicherer Effekt zeigte sich auf der Proteinebene: Je nach eingesetzter siRNA konnte die Konzentration des PPAR β -Proteins um bis zu 90 % gesenkt werden (Abb. 26 A).

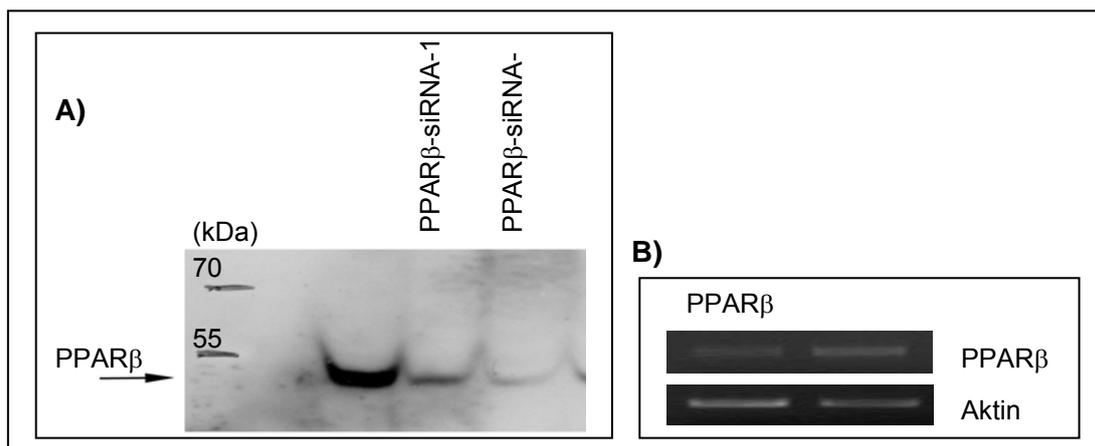


Abb. 26: „Knock-down“ von PPAR β durch spezifische siRNA. NIH3T3 Zellen wurden an Tag 1, sowie an Tag 2 mit je 200 pmol PPAR β -siRNA (Fa. Qiagen) transfiziert. Nach weiteren 48 h wurde die Effizienz des „Knock-down“ entweder über einen Western Transfer (A) oder eine RT-PCR (B) analysiert. Als Proteinmarker beim Western Transfer wurde „Prestained Protein Ladder“ der Fa. Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet (PPAR β : 49 kDa). A) Die Behandlung der NIH3T3 Zellen führte zu einem deutlich verringerten PPAR β -Proteinlevel um bis zu 90 %. B) Auch auf RNA-Ebene konnte eine deutliche Abnahme nach Einsatz der PPAR β -siRNA detektiert werden.

Um Gene zu identifizieren, die durch PPAR β reguliert werden, wurde nun die beschriebene siRNA-Technologie für eine Microarray-Analyse (siehe Kapitel 3.8.1.24) verwendet, die auf einem murinen Chip mit 15 000 cDNA-Klonen basierte. Ausgewählt wurde die PPAR β -siRNA-2, da sie zu einer deutlich stärkeren Reduktion des Proteinlevels

von PPAR β führte, als die PPAR β -siRNA-1 (Abb. 26A). Die statistische Auswertung der Microarray-Daten resultierte in der Identifizierung verschiedener Gene, die durch den „knock-down“ von PPAR β reguliert wurden (Tab. 3).

Tab. 3: Identifizierung von Genen, die durch PPAR β reguliert werden. Gezeigt ist ein Auszug aus der statistischen Auswertung der Microarray-Daten, ergänzt durch die Informationen des „clone/gene ID converter“ (<http://idconverter.bioinfo.cnio.es/>). Erwähnt sind neben der Identifizierungsnummer des cDNA-Klons („clone ID“), der Name des Gens, sein Symbol und die bekannten Synonyme, sowie die wichtigsten Funktionen des jeweiligen Proteins. Die relative Änderung bezieht sich auf das veränderte Expressionsniveau des Gens durch den PPAR β -„knock-down“. Rot hinterlegte Zahlen bedeuten, dass dieses Gen durch PPAR β negativ reguliert wird, positiv beeinflusste Gene sind hier grün hinterlegt.

Clone ID	relative Änderung	UniGene Cluster	Name	Symbol	Synonym	Funktion
H3092E09	3,51	Mm.181959	„ <u>early growth response 1</u> “	EGR-1	Zfp-6; Zenk; NGF1-A; Krox-24; TIS8	DNA-Bindung; Transkriptionsfaktor; Differenzierung der Thymozyten; Bindung von Zinkionen
H3081D12	2,04	-	<u>Calnexin</u>	Cnx	IP90; p88; p90	integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Reticulums; Chaperon
H3049B07	1,93	Mm.270681	„ <u>Heat shock protein 105</u> “	Hsp105	HSP-E7; HSP110; HSP105 42 C-HSP	Bindung von ATP; Proteinfaltung (Chaperon)
H3057B07	1,93	Mm.25613	„ <u>Immediate early response 3</u> “	IER-3	IEX-1; gly96; cl-3; cAMP inducible gene 3; DIF2; PRG1	Schutz der Zellen vor Fas- oder TNF α -induzierter Apoptose
H3013C11	1,84	Mm.32019	„ <u>T-complex protein 1</u> “	Tcp1	Tric; c-cpn; Ccta; Tp63; Cct1	Bindung von ATP; Proteinfaltung
H3064F10	1,83	Mm.250265	„ <u>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</u> “	Arnt	Hif1b; ESTM42; Drnt; D3Erttd557e	DNA-Bindung; Transkriptionsfaktor
H3006D04	1,94	-	„chemokine (<u>C-X-C</u> motif) <u>receptor 4</u> “	CXCR-4	FB22; HM89; LAP3; LCR1; NPYR; WHIM; LESTR; NPY3R; NPYRL; HSY3RR; NPYY3R; D2S201E	unterstützt durch Interaktion mit dem CD4-Protein das Eindringen des HIVirus in die Zelle; Rolle bei der Metastasierung verschiedener Tumore

„Clone ID“: Name des jeweiligen cDNA-Klons auf dem Chip.

Bei der genaueren Betrachtung der hier aufgeführten putativen Zielgene fallen einige besonders auf, die bereits in der Vergangenheit mit überlebenswichtigen Prozessen, wie der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation in Verbindung gebracht wurden. So induziert beispielsweise der Transkriptionsfaktor EGR-1 die Expression vieler Wachstumsfaktoren, wie TGF β („tissue growth factor β “), b-FGF („basic fibroblast growth factor“) oder PDGF („platelet derived growth factor“) (Kim *et al.*, 1989; Biesiada *et al.*, 1996). Eine Verbindung zu den PPARs wurde bereits durch Studien von Wakino *et al.* (2001) hergestellt. Hier konnte nachgewiesen werden, dass PPAR γ die Expression von EGR-1 durch Interaktion mit einem „serum response element“ im EGR-1 Promotor hemmt. Ein anderer interessanter Kandidat ist das CXCR-4-Protein, das mehrfach mit der Metastasierung verschiedener Tumore in Verbindung gebracht wurde (Saur *et al.*, 2005).

4.2.2 Validierung der Microarray-Daten

Im Folgenden sollten die Ergebnisse des Microarrays über die Kombination von Real-Time PCR Analysen, siRNA-Technologie und verschiedenen Zellsystemen validiert werden.

Neben dem Vergleich der Expressionsniveaus der putativen Zielgene in Wildtyp- und PPAR $\beta^{-/-}$ -Zelllinien, wurde der Effekt des PPAR β -spezifischen Agonisten GW501516 auf die Expression dieser Gene untersucht.

4.2.2.1 siRNA-Technologie

Ausgehend von derselben RNA, die bereits für den Microarray verwendet wurde, sollte als erstes überprüft werden, ob sich die Ergebnisse des Microarrays in der Real-Time PCR reproduzieren lassen. Dazu wurde die RNA unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 3.8.1.25.2) und der Einfluss des PPAR β -„knock-downs“ auf die Expression der putativen Zielgene durch einen SYBR Green-Assay (siehe Kapitel 3.8.1.25.3) analysiert.

Bei der Auswertung der komparativen Real-Time PCR stellte sich heraus, dass die Microarray-Daten für EGR-1, IER-3 und CXCR-4 signifikant bestätigt werden konnten (Abb. 27): Die Expression von EGR-1 in Zellen, die mit spezifischer PPAR β -siRNA behandelt wurden, stieg um den Faktor 8,5, die Expression von IER-3 immerhin um das 1,9-fache.

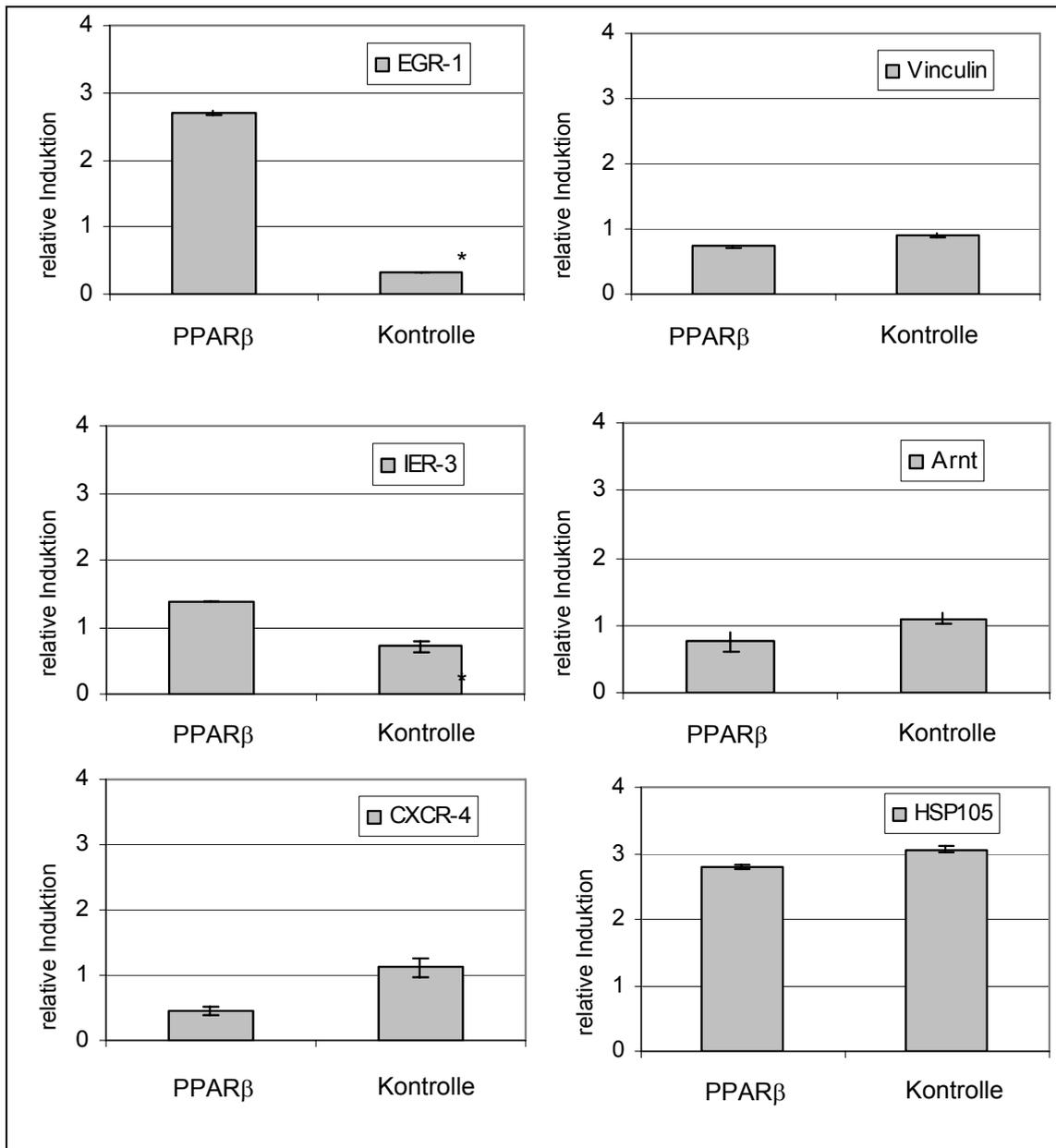


Abb. 27: Einfluss des PPARβ-„knock-downs“ auf die Expression putativer Zielgene. NIH3T3 Zellen wurden an Tag 1 und Tag 2 mit je 200 pmol siRNA transfiziert (siehe auch Versuchsbeschreibung von Abb. 27). Nach weiteren 48 h wurde die RNA isoliert und nach Umschreibung in cDNA in einer Real-Time PCR analysiert. Dargestellt ist die graphische Auswertung der komparativen Real-Time-PCR. Die relative Induktion bezieht sich auf die normalisierten Werte nach Abgleich auf Aktin. Der für die Normalisierung verwendete Kalibrator setzte sich aus der cDNA verschiedener muriner Fibroblasten zusammen und wurde in der Auswertung gleich 1 gesetzt (nicht dargestellt). PPARβ: Zellen, die mit spezifischer PPARβ-siRNA-2 (Fa. Qiagen) behandelt wurden. Kontrolle: Zellen, die mit der „non-silencing“ Kontroll-siRNA (Fa. Qiagen) transfiziert wurden. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test (p < 0,001).

Durch das Ausschalten von PPAR β kam es außerdem zu einer Abnahme der Expression von CXCR-4 um gut 52 %. Diese Daten untermauern daher die Annahme, dass PPAR β die Expression von EGR-1 und IER-3 reprimiert, während CXCR-4 ein positiv reguliertes Zielgen von PPAR β darstellt. Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Microarray konnte auch für die Gene HSP-105, Arnt, sowie Vinculin gezeigt werden, dass ihre Expression durch den „knock-down“ von PPAR β verringert wurde (Abb. 27). Allerdings konnte dies nicht signifikant belegt werden ($p > 0,05$, gepaarter T-Test) und so wurden diese Gene bei der weiteren Validierung der putativen Zielgenen von PPAR β nicht weiter charakterisiert.

4.2.2.2 Vergleich von Wildtyp- und PPAR $\beta^{-/-}$ -Zelllinien

Um die regulierende Funktion von PPAR β bezüglich EGR-1 und CXCR-4 weiter zu charakterisieren, sollten nun die Expressionsniveaus der putativen Zielgene in PPAR $\beta^{-/-}$ - bzw. Wildtyp-Zelllinien verglichen werden. Dazu wurden humane HCT-116 Zellen (Wildtyp und PPAR $\beta^{-/-}$, siehe Kapitel 3.8.2.1) mit 1 μ M des spezifischen PPAR β -Agonisten GW501516 behandelt. Für die Validierung dieses Zellsystems wurde zunächst die Expression von Genen untersucht, für die bereits ein Einfluss durch die PPARs belegt wurde. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass die Expression von PDK-4 („pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4“) durch PPAR α induziert (Muio *et al.*, 2002; Sugden und Holness, 2002) und durch PPAR γ reprimiert wurde (Way *et al.*, 2001). Nachstehend sollte nun geklärt werden, ob und welchen Einfluss PPAR β auf die Expression von PDK-4 besitzt.

Die Analyse mittels Real-Time-PCR zeigte, dass die Aktivierung von PPAR β in den HCT-116-Wildtypzellen zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg der Expression von PDK-4 um den Faktor 3,3 führte (Abb. 28). In den PPAR $\beta^{-/-}$ -Zellen blieb diese Zunahme hingegen aus, was darauf hinweist, dass PDK-4 spezifisch von PPAR β reguliert wird und sich dieses Zellsystem zur Validierung von PPAR β -regulierten Genen eignet.

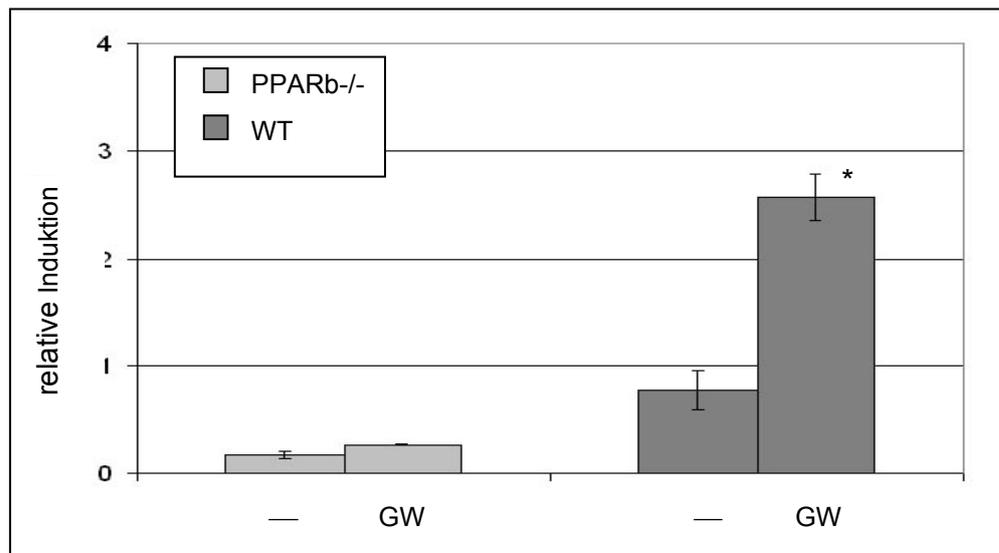


Abb. 28: Einfluss von PPAR β auf die Expression von PDK-4 in HCT-116 Zellen. HCT-116 Wildtyp- oder PPAR β ^{-/-} Zellen wurden für 24 h mit 1 μ M des synthetischen PPAR β -Agonisten GW501516 inkubiert. Dann wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels einer komparativen Real-Time PCR analysiert. Der für die Normalisierung verwendete Kalibrator setzte sich aus den verschiedenen cDNA-Präparation von HCT-116-Wildtyp bzw. -PPAR β ^{-/-} Zellen zusammen und wurde in der Auswertung gleich 1 gesetzt (nicht dargestellt). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,02$).

Nach Validierung des humanen Testsystems mit dem PPAR β -regulierten *PDK-4* wurde die Expression der putativen Zielgene *CXCR-4* bzw. *EGR-1* analysiert. Es zeigte sich, dass die GW501516-vermittelte Stimulation von PPAR β in HCT-116 Wildtypzellen zum signifikanten Anstieg des Expressionsniveaus von *CXCR-4* um den Faktor 1,3 führte (Abb. 29 A). In PPAR β ^{-/-}-Zellen übte der spezifische PPAR β -Agonist hingegen keinen Einfluss auf die Expression von *CXCR-4* aus. *CXCR-4* scheint daher spezifisch durch PPAR β reguliert zu werden. Trotzdem ist darauf hinzuweisen, dass die HCT-116-PPAR β ^{-/-}-Zellen generell mehr *CXCR-4* exprimierten als die Wildtypzellen.

Die negative Regulation der Expression von *EGR-1* durch PPAR β konnte in den HCT-116 Zellen hingegen nicht gezeigt werden, da es durch GW501516 nicht zu einer Abnahme des *EGR-1* RNA-Niveaus kam (Abb. 29 B). Allgemein unterschied sich das Expressionsniveau von *EGR-1* WT-A4 in den Wildtyp- bzw. PPAR β ^{-/-}-Zellen kaum voneinander.

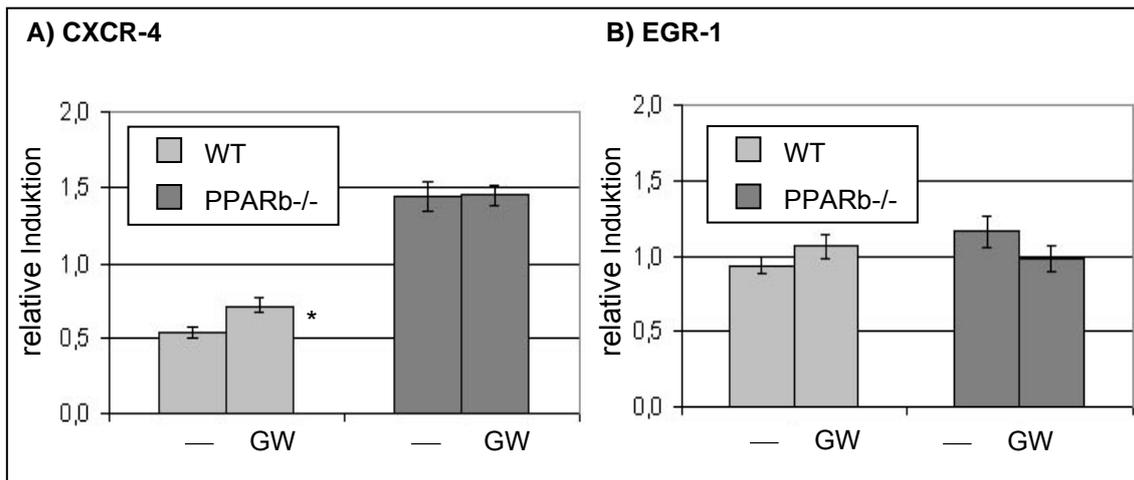


Abb. 29: Einfluss von PPAR β auf die Expression von CXCR-4 bzw. EGR-1 in HCT-116 Zellen. HCT-116 Wildtyp- oder PPAR β ^{-/-} Zellen wurden für 24 h mit 1 μ M des synthetischen PPAR β -Agonisten GW501516 inkubiert. Dann wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels einer komparativen Real-Time PCR analysiert. Dargestellt ist die graphische Auswertung der Expressionsniveaus von CXCR-4 bzw. EGR-1 in unbehandelten (-) oder mit GW501516-behandelten Zellen (GW). Die relative Induktion bezieht sich auf die normalisierten Werte nach Abgleich der gemessenen Fluoreszenzsignale auf Aktin. Der für die Normalisierung verwendete Kalibrator setzte sich aus den verschiedenen cDNA-Präparation von HCT-116-Wildtyp bzw. PPAR β ^{-/-} Zellen zusammen und wurde in der Auswertung gleich 1 gesetzt (nicht dargestellt). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,05$).

Analog dazu wurde die PPAR β -abhängige Expression von PDK-4, sowie von CXCR-4 und EGR-1 auch im murinen System in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 μ M GW501516 mittels Real-Time-PCR charakterisiert (nicht gezeigte Daten). Dazu wurden die murinen Fibroblastenzelllinien A4-wt und B2-wt bzw. A1-PPAR β ^{-/-} und A2 PPAR β ^{-/-} eingesetzt, die ursprünglich von Dr. Jürgen Adamkiewicz aus syngenen Mäusen isoliert wurden (siehe Kapitel 3.8.2.1 und 3.9). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von PDK-4 in den Wildtyp-Zelllinien durch Aktivierung von PPAR β induziert wurde. Die Behandlung der PPAR β ^{-/-}-Zelllinien führte hingegen nur zu einer schwachen und vor allem nicht signifikanten Erhöhung von PDK-4, so dass zusammenfassend von einer PPAR β -spezifischen Regulation von PDK-4 in diesem Zellsystem gesprochen werden kann. Allerdings kristallisierte sich bei der weiteren Charakterisierung dieser Zelllinien eine enorme Diversität bezüglich Expressionsniveau bzw. Induktionsverhalten innerhalb der Wildtyp-, aber auch der PPAR β ^{-/-}-Zelllinien heraus. Inwiefern diese Daten also eine aussagekräftige Analyse ermöglichen, muss noch genauer diskutiert werden.

4.2.2.3 Aktivierung von PPAR β durch GW501516 in HUVEC

Beim Vergleich von verschiedenen Wildtyp- und PPAR $\beta^{-/-}$ -Zelllinien in den voran gegangenen Experimenten wurde bereits auf das Problem der biologischen Varianz hingewiesen. Relativ eindeutige Aussagen konnten hingegen gemacht werden, wenn man sich auf den Effekt der Aktivierung von PPAR β auf die Expression der Zielgene beschränkte. Dies sollte in einem weiteren Zellsystem bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden HUVEC („human umbilical vein endothelial cells“) für verschiedene Zeiträume mit 1 μ M GW501516 inkubiert und die Transkription von CXCR-4 bzw. EGR-1 im Anschluss mittels Real-Time-PCR analysiert.

Die spezifische Aktivierung von PPAR β führte, wie in Abbildung 30 dargestellt ist, zur signifikanten Induktion der Expression von CXCR-4 nach 4 bzw. 8 h um den Faktor 1,3.

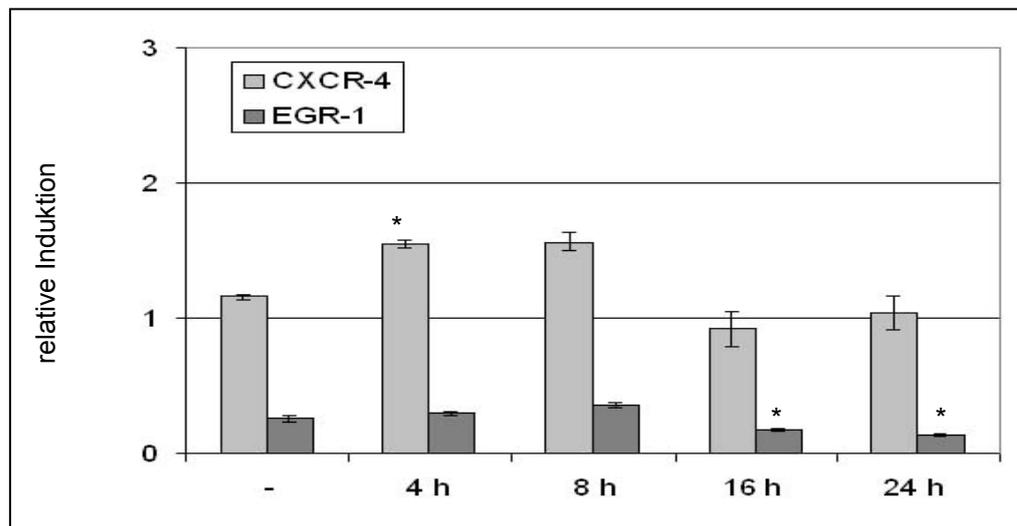


Abb. 30: Einfluss von PPAR β auf die Expression von CXCR-4 bzw. EGR-1 in Huvec. Nach der Inkubation von Huvec mit 1 μ M des synthetischen PPAR β -Agonisten GW501516 für die angegebenen Zeiträume (0 bis 24 Stunden) wurde RNA isoliert und der Einfluss auf die Transkription von CXCR-4 bzw. EGR-1 mittels komparativer Real-Time-PCR untersucht. (Für die weitere Erklärung, siehe auch Erläuterungen zur Abb. 29). Der für die Normalisierung verwendete Kalibrator setzte sich hier aus den verschiedenen cDNA-Präparationen von Huvec zusammen und wurde in der Auswertung gleich 1 gesetzt (nicht dargestellt). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test (bei CXCR-4: $p < 0,05$; bei EGR-1: $p < 0,03$).

Eine längere Inkubation mit dem spezifischen PPAR β -Agonisten verringerte die Expression des putativen Zielgens hingegen wieder. Der reprimierende Effekt von PPAR β auf die Transkription von EGR-1 konnte nach einer 16- bzw. 24-stündigen Behandlung der Zellen mit GW501516 signifikant nachgewiesen werden.

4.2.2.4 Tetrazyklin-induzierbares PPAR β

Eine weitere Möglichkeit, PPAR β -spezifische Effekte zu untersuchen, liegt in der kontrollierten Expression von PPAR β . Dafür wurden HeLa-Zellen verwendet, bei denen die Expression von PPAR β durch Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin reguliert werden konnte (Tet-OFF-Zellen, siehe auch Kapitel 3.8.2.7). Die stetige Expression des Zielgens PPAR β wurde durch Kultivierung der Zellen in Doxyzyklin-haltigem Medium (1 μ g/ml) verhindert. Der 24-stündige Entzug des Doxyzyklins führte dann zur spezifischen Induktion von PPAR β und konnte mittels eines Western Transfers überprüft werden (Abb. 31).

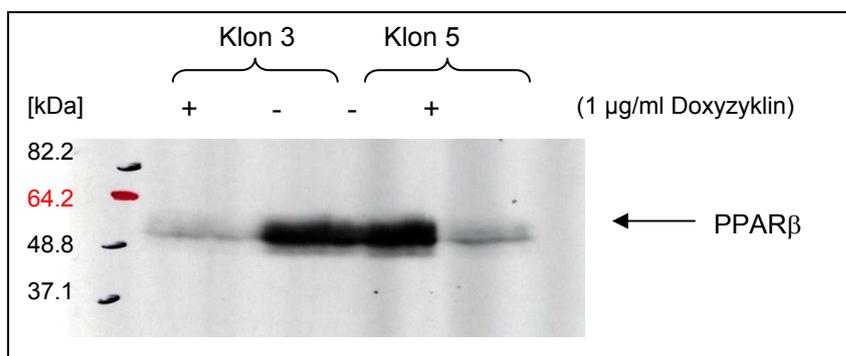


Abb. 31: Induktion von PPAR β durch Doxyzyklin-Entzug. Die Expression von PPAR β in HtTA-hPPAR β -Klonen wurde durch 24-stündigen Entzug des Doxyzyklins induziert. Im Anschluss wurde das Proteinniveau von PPAR β mittels eines Western Transfers (siehe Kapitel 3.8.1.19) überprüft. Als Proteinmarker wurde „BenchMark Prestained Protein Ladder“ der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Um das Tet-System zu validieren, wurde nun in einem weiteren Experiment analysiert, welchen Effekt die Induktion von PPAR β auf die Expression von PDK-4 besitzt. Zu diesem Zweck wurden HtTA-hPPAR β -Zellen in Ab- und Anwesenheit von GW501516 für 24 h in Doxyzyklin-freiem Medium kultiviert. Nach Isolierung und reverser Transkription der RNA (siehe Kapitel 3.8.1.25.2) wurde eine komparative Real-Time-PCR durchgeführt (siehe Kapitel 3.8.1.25.3).

In beiden untersuchten HtTA-hPPAR β -Zelllinien resultierte die Aktivierung von PPAR β durch GW501516 in einem deutlichen Anstieg der Expression von PDK-4 (Abb. 32). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Expression von PPAR β durch Entzug des Doxyzyklins angeschaltet wurde oder nicht. Auch in den Wildtypzellen führte die Behandlung der Zellen mit GW501516 zu erhöhten PDK-4-Leveln. Diese Ergebnisse deuten, dass der endogene PPAR β -Hintergrund bereits ausreicht, um die Expression von PDK-4 zu regulieren.

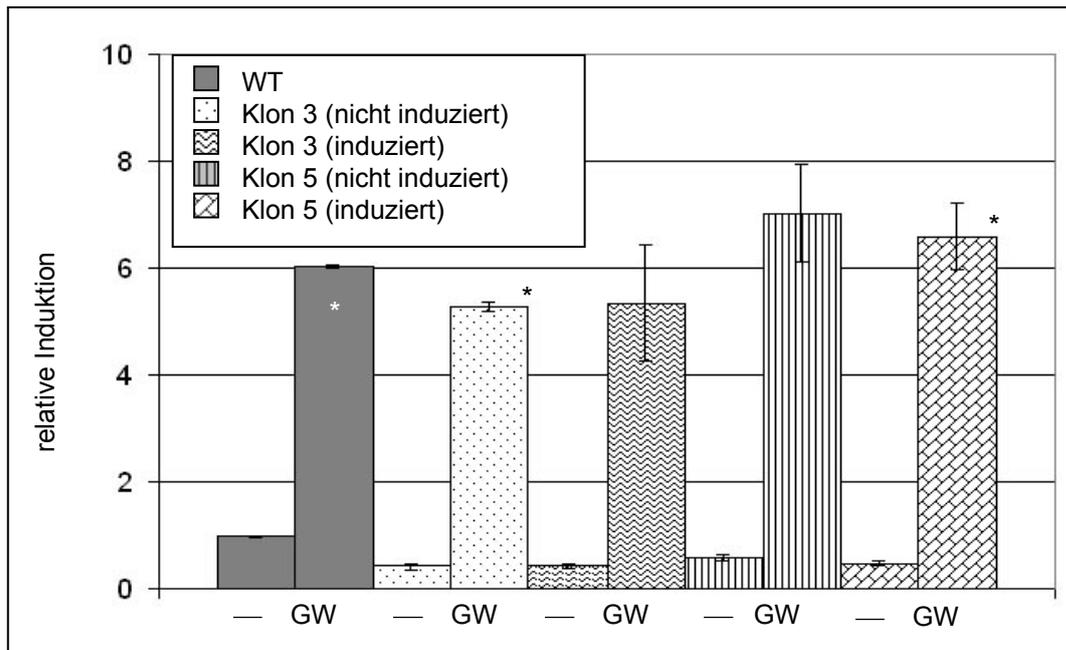


Abb. 32: Einfluss der Tetrazyklin-induzierten Expression von PPAR β auf PDK-4. HtTA-hPPAR β -(Klon 3 und Klon 5) bzw. HtTA-Wildtyp-Zellen wurden in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 μ M GW501516 für 24 h in Tetrazyklin-freiem Medium kultiviert, um die Expression von PPAR β zu induzieren (siehe Kapitel 3.8.2.7). Der Einfluss auf die Transkription von PDK-4 wurde dann mittels komparativer Real-Time-PCR untersucht. (Für die weitere Erklärung, siehe auch Erläuterungen zur Abb. 29). Der für die Normalisierung verwendete Kalibrator setzte sich hier aus verschiedenen cDNAs von nicht-induzierten HtTA-hPPAR β -Klonen zusammen und wurde in der Auswertung gleich 1 gesetzt (nicht dargestellt). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0.05$).

Basierend auf derselben RNA wurde zudem die Expression von CXCR-4 nach Induktion von PPAR β mittels Real-Time-PCR überprüft. Bereits für die HtTA-Wildtyp-Zellen, sowie den nicht-induzierten Klon 3 konnte durch Behandlung der Zellen mit dem spezifischen PPAR β -Agonisten ein signifikanter Anstieg bezüglich der Expression von CXCR-4 beobachtet werden (Abb. 33). Die Induktion der Expression von PPAR β durch Doxyzyklin-Entzug (Klon 3) führte jedoch nicht zu einer darüber hinaus gesteigerten Expression von CXCR-4 – weder in Ab-, noch in Anwesenheit von GW501516. Letzteres galt ebenfalls für den HtTA-hPPAR β Klon 5.

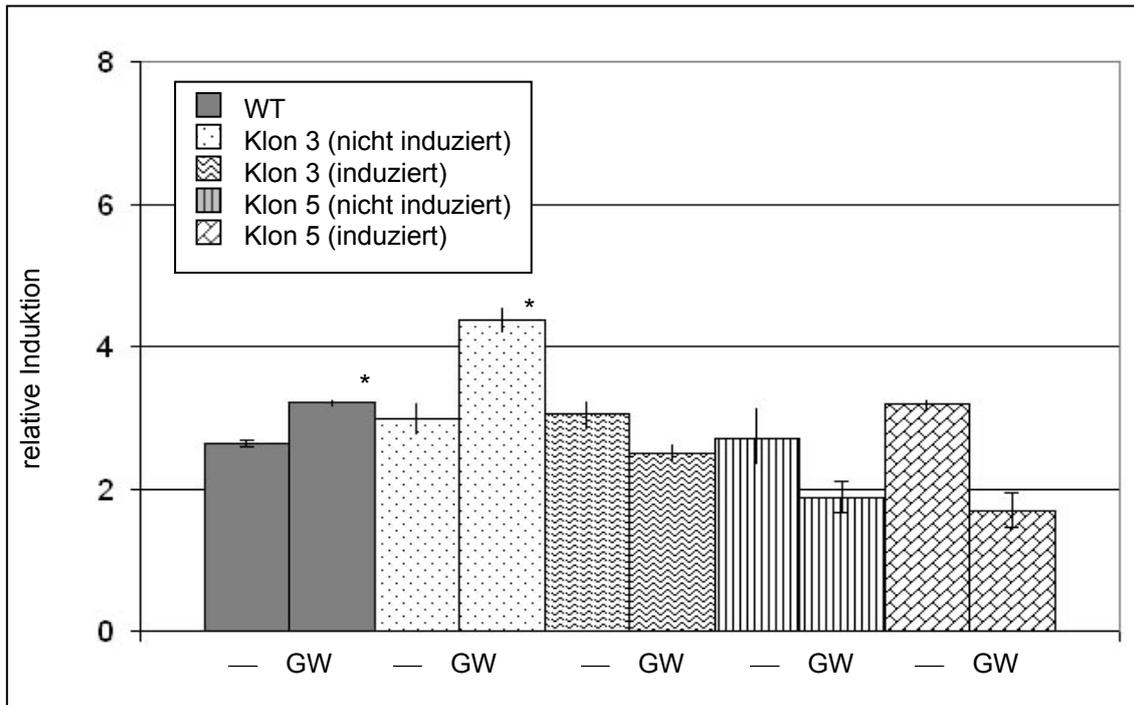


Abb. 33: Einfluss der Tetrazyklin-induzierten Expression von PPAR β auf CXCR-4. HtTA-hPPAR β -(Klon 3 und Klon 5) bzw. HtTa-Wildtyp-Zellen wurden in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 μ M GW501516 für 24 h in Tetrazyklin-freiem Medium kultiviert, um die Expression von PPAR β zu induzieren. Der Einfluss auf die Transkription von CXCR-4 wurde dann mittels komparativer Real-Time-PCR untersucht. (Für die weitere Erklärung, siehe auch Erläuterungen zur Abb. 29). Der für die Normalisierung verwendete Kalibrator setzte sich hier aus verschiedenen cDNAs von nicht-induzierten HtTA-hPPAR β -Klonen zusammen und wurde in der Auswertung gleich 1 gesetzt (nicht dargestellt). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) markiert und basieren auf einem gepaarten T-Test ($p < 0,05$).

Zusammen genommen bedeutet dies, dass die beobachtete Regulation der Expression von CXCR-4 beim Klon 3 dem endogenen PPAR β in den HtTA-Zellen zugeschrieben werden kann. Beim Klon 5 konnte keine PPAR β -abhängige Expression von CXCR-4 gezeigt werden.

4.2.2.5 *In vivo* Studien

Um zu überprüfen, ob die in Zellkultur-Experimenten gewonnenen Hinweise auf die Regulation von CXCR-4 durch PPAR β auch *in vivo* demonstriert werden können, wurde die Expression des putativen Zielgens in den Lungen eines syngenen Mausmodells mit C57bl6-Mäusen (Wildtyp- bzw. PPAR $\beta^{-/-}$) analysiert. Bisher unveröffentlichte Studien (Dr. Sabine Müller-Brüsselbach) zeigten in diesem Zusammenhang, dass die subkutane Injektion von LLC-Zellen in PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen binnen einer Woche zur Bildung von kleinsten, lokal begrenzten Tumoren führte (siehe Kapitel 3.9). Während sich diese in Wildtypmäusen stark vergrößerten, bildeten sie sich in den PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen innerhalb weniger Tage vollständig zurück. Die Ursache für diesen erstaunlichen Effekt lag in der Inhibition der Angiogenese, wie verschiedene histologische Untersuchungen ergaben (bisher unveröffentlichte Ergebnisse, Dr. Sabine Müller-Brüsselbach). Vor diesem Hintergrund sollte nun die Rolle von CXCR-4 charakterisiert werden.

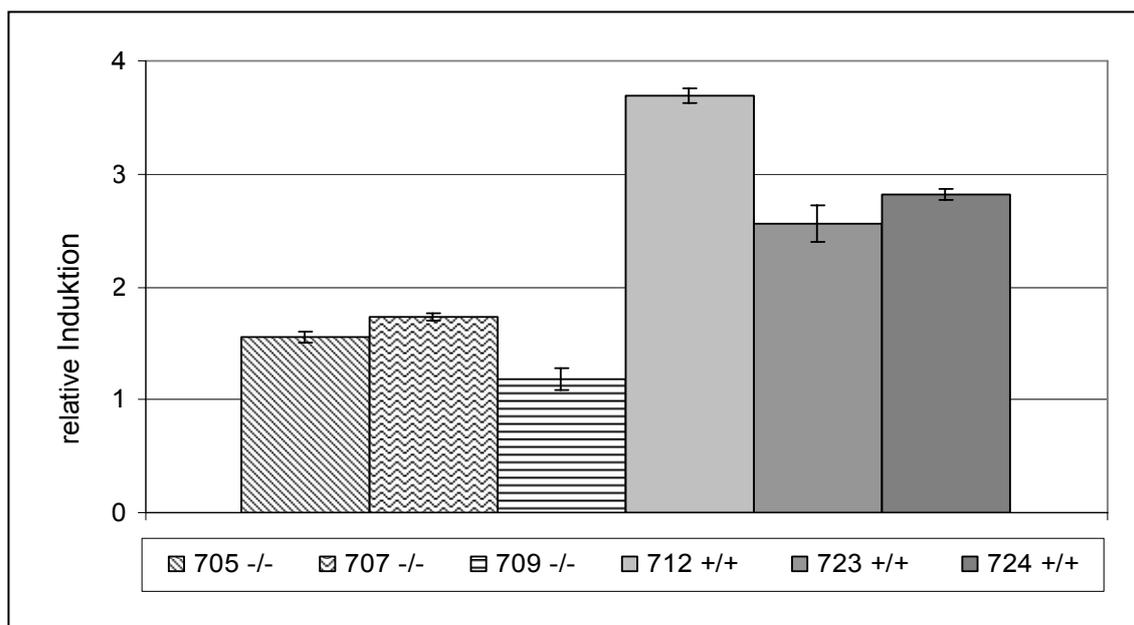


Abb. 34: PPAR β -spezifische Expression von CXCR-4 in murinen Lungen. Für die Analyse des Expressionsniveaus von CXCR-4 in murinen Lungen wurden diese aus Wildtyp- bzw. PPAR $\beta^{-/-}$ -C57bl6-Mäusen isoliert und nach cDNA-Synthese mittels komparativer Real-Time PCR analysiert. Verwendet wurden hierbei Mäuse, denen subkutan LLC-Tumorzellen injiziert wurden (Wildtypmäuse mit der Bezeichnung 712+/, 723+/, und 724+/, bzw. PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäuse mit der Bezeichnung 705-/, 707-/, und 709-). Der für die Normalisierung verwendete Kalibrator setzte sich aus einem Mix der verwendeten cDNAs zusammen und wurde in der Auswertung gleich 1 gesetzt (nicht dargestellt). Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikaten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

Die Expression von CXCR-4 in Wildtypmäusen mit subkutanen LLC-Tumoren war im Vergleich zur Expression in PPAR β ^{-/-}-Mäusen deutlich erhöht und unterstützt daher das, auf *in vitro* Daten gestützte, Modell der PPAR β -abhängigen Regulation von CXCR-4 (Abb. 34).

4.2.3 Literatur-basierte Analyse

Wie zahlreiche Publikationen belegen, spielt das Angiopoietin/Tie-2-System als zentraler Regulator der Gefäßausreifung eine bedeutende Rolle während der Angiogenese (siehe Kapitel 2.2.3). Um die Gründe für die ausgebliebene Neovaskularisierung im beschriebenen murinen Tumormodell zu identifizieren (siehe Kapitel 4.2.2.5), sollte daher weiterhin untersucht werden, ob Angiopoietin-1 von PPAR β reguliert wird.

Dazu wurden verschiedene murine Fibroblasten, die ursprünglich von Dr. Jürgen Adamkiewicz aus Wildtyp- oder PPAR β ^{-/-}-Mäusen isoliert wurden (siehe Kapitel 3.8.2.1 und Kapitel 3.9) mittels Real-Time-PCR analysiert. Nach Validierung des Zellsystems mittels des PPAR β -regulierten *PDK-4* wurde die Expression von Angiopoietin-1 (Ang-1) in unbehandelten bzw. in mit GW501516 behandelten Zellen überprüft (nicht gezeigte Daten). Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von Ang-1 PPAR β -spezifisch ausschließlich in den Wildtypzelllinien erfolgte. Damit unterstützen diese Daten die These, dass die verminderte Tumor-Angiogenese in den PPAR β ^{-/-}-Mäusen womöglich über die runter regulierte, da PPAR β -abhängige, Repression der Expression von Angiopoietin-1 vermittelt wurde. Allerdings muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass andere untersuchte Zellklone den hier beschriebenen PPAR β -spezifischen Effekt bezüglich Ang-1 nicht zeigten. Um die Frage zu klären, ob Ang-1 ein von PPAR β reguliertes Gen darstellt, bedarf es daher geeigneterer Testsysteme.

Zusammengefasst liefern die hier vorgestellten Ergebnisse erste Hinweise darauf, dass CXCR-4 ein durch PPAR β reguliertes Gen darstellt. Sowohl in den HCT-116-Zellen, als auch in den HUVEC konnte eine PPAR β -abhängige Expression von CXCR-4 gezeigt werden. Ein weiterer interessanter Kandidat ist Angiopoietin-1. Hier konnte der Vergleich muriner Wildtyp- und PPAR β ^{-/-}-Fibroblasten die Regulation von Ang-1 durch PPAR β deutlich belegen.

Generell ist darauf hinzuweisen, dass die Validierung putativer Zielgene von PPAR β Zellsysteme verlangt, bei denen das Problem der biologischen Varianz ausgeklammert werden kann. So zeigte sich, dass die Aktivierung von PPAR β durch GW501516 verlässlichere Daten lieferte, als der Vergleich von Wildtyp- und PPAR β ^{-/-}-Zelllinien.

5 DISKUSSION

Die Familie der PPARs („peroxisome proliferator-activated receptors“) gehört zu einer Gruppe von Kernrezeptoren, die in den letzten Jahren zunehmend mit schwer wiegenden Erkrankungen, wie Artherosklerose, Diabetes Typ II, Störungen des Lipidstoffwechsels, sowie verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht wurden (Chapman, 2003; Escher und Wahli, 2000; Komar, 2005; Saez *et al.*, 1998). Reguliert werden sie durch diverse Fettsäuren und ihre Derivate, wie zum Beispiel die Prostaglandine. Für PPAR β wurde in diesem Zusammenhang der Arachidonsäure-Metabolit Prostazyklin als natürlicher Ligand beschrieben (Lim *et al.*, 1999 und 2002; Gupta *et al.*, 1997; Hatae *et al.*, 2001). Doch diese Annahme basierte hauptsächlich auf der Tatsache, dass das synthetische Analogon zu Prostazyklin, das so genannte Carbaprostazyklin, eine nachgewiesene agonistische Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β besaß (Gupta *et al.*, 2000; Forman *et al.*, 1997; Kliewer *et al.*, 1997).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Prostazyklin tatsächlich der Ligand von PPAR β ist bzw. welche Signalwege bei der Regulation von PPAR β von Bedeutung sind. Neben der funktionellen Charakterisierung von PPAR β sollte weiterhin der Frage nachgegangen werden, über welche Zielgene PPAR β seine proliferative Wirkung bei der Tumorigenese vermittelt.

5.1.1 Raf-regulierte Enzyme der Prostaglandinsynthese

Die Ras-Raf-ERK-Kaskade kontrolliert nicht nur die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation des Zellzyklus, sowie der Apoptose von Bedeutung sind (Kerkhoff und Rapp, 1998; Chang *et al.*, 2003), sondern spielt auch eine bedeutende Rolle bei der Synthese der Prostaglandine (Müller, 2004).

Prostaglandine sind hormonähnliche Substanzen mit vielfältigen Funktionen und Wirkungen. Einerseits steigern sie die Empfindsamkeit der Schmerzrezeptoren und spielen eine Rolle bei der Kontraktion der glatten Muskulatur. Andererseits übernehmen die Prostaglandine auch eine wichtige Funktion bei der Blutgerinnung, der Entstehung von Fieber und bei Entzündungsprozessen (Lim *et al.*, 1999; Müller, 2004; Fauti *et al.*, 2006).

Synthetisiert werden sie durch Umwandlung der Arachidonsäure durch die beiden Cyklooxygenasen Cox-1 und Cox-2. Während Cox-1 konstitutiv exprimiert wird, stellt Cox-2 den limitierenden Faktor des Arachidonsäure-Metabolismus dar (siehe Kapitel 2.7 und 2.9). Reguliert wird Cox-2, analog zur zytosolischen Phospholipase A₂ und PPAR β , durch Raf (Müller, 2004 und hier angegebene Referenzen). Dies konnte in der

vorliegenden Arbeit anhand von N-BxB-ER Zellen (3T3Raf-ER Zellen; siehe Kapitel 3.8.2.1) belegt werden, in denen die spezifische Expression einer konstitutiv aktiven Form von C-Raf durch Behandlung mit 4-OH-Tamoxifen induziert wurde. Die Aktivierung von C-Raf führte einerseits zur ERK-abhängigen Induktion der Expression von Cox-2 (Abb. 7, 8 und 11) und PPAR β (Abb. 12), andererseits zur deutlich erhöhten Synthese von Prostazyklin und Prostaglandin E₂ (Abb. 9). Letzteres wurde vor allem durch die Induktion der Expression von Cox-2 vermittelt, die bereits in verschiedenen anderen Systemen als Ziel des Raf-Signalweges identifiziert wurde (Han *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2002). *PGIS* bzw. *mPGES-1* wurden durch Raf entweder nur marginal oder sehr spät und daher womöglich indirekt reguliert und spielen im Rahmen der Raf-vermittelten Synthese von Prostazyklin und PGE₂ daher, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle (Abb. 10 und 11). Interessanterweise wurde auch die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂), die in epithelialen Zellen der Lunge als Zielgen von Raf beschrieben wurde (Heasley, *et al.*, 1997; Blaine *et al.*, 2001), in der vorliegenden Arbeit nicht durch Raf reguliert. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Ras die Expression der cPLA₂ über andere Signalwege als die Raf-MEK-ERK-Kaskade beeinflusst (Fauti *et al.*, 2006). Dazu passt auch die Beobachtung, dass die Raf-vermittelte Synthese von Prostazyklin und PGE₂ durch Gabe von Arachidonsäure in das Zellkulturmedium der 3T3Raf-ER Zellen deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 9 B).

5.1.2 Prostazyklin übt keinen signifikanten Einfluss bezüglich der Regulation von PPAR β aus

Da Raf nicht nur die Synthese von Prostazyklin, sondern auch die Expression von PPAR β induzierte (siehe auch Shao *et al.*, 2002), lag die Frage nach einer auto- bzw. intrakrinen Regulationsschleife von PGI₂ und PPAR β nahe. Erstaunlicherweise konnte anhand von Reportergen-Assays mit einem PPRE-tk-, sowie einem PPAR β -spezifischen LexA-Konstrukt jedoch beobachtet werden, dass die enorme Zunahme der Prostazyklinsynthese nach Aktivierung von Raf keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β besaß (Abb. 9, 13 und 14). Nun könnte man anführen, dass dies in der limitierenden Konzentration des Heterodimerisierungspartners von PPAR β begründet liegt. Doch die parallele Überexpression von RXR α im entsprechenden Folgeexperiment zeigte deutlich, dass der ausbleibende Effekt von Prostazyklin auf die Aktivität von PPAR β nicht durch mangelndes RXR bedingt wurde (Abb. 14). Der beobachtete, leichte *9-cis*-RA-abhängige Anstieg der Luziferase-Expression in Zellen mit endogenem RXR-Leveln konnte nicht signifikant belegt werden. Daher liegt der

Schluss nahe, dass der RXR-spezifische Ligand in diesem Zellsystem ebenfalls keinen begrenzenden Faktor darstellt.

Generell führte die Zugabe von 9-*cis*-RA ins Zellkulturmedium zu einem deutlichen Anstieg der Expression des Reportergens. Dies wurde nicht nur durch die Bildung von RXR α -PPAR β -Heterodimeren, sondern auch von RXR-Homodimeren verursacht, die beide an das PPRE-Element binden können.

Damit wird bereits ein Nachteil des PPRE-gesteuerten Reportersystems deutlich: Durch die Bindung des Heterodimerisierungspartners RXR, aber auch des endogenen PPAR α oder PPAR γ kann die Expression des Luziferase-Gens beeinflusst und die Analyse des PPAR β -spezifischen Effekts erschwert werden. Zudem können die verschiedenen PPARs in diesem System durch Signalwege reguliert werden, die durch Interaktion von Prostazyklin mit dem Membranrezeptor IP angeschaltet werden (siehe Kapitel 2.7). Vor diesem Hintergrund erscheint die von Hatae *et al.* (2001) vermutete Prostazyklin-abhängige Regulation von PPAR β fraglich, zumal hier die entsprechenden Kontrollen fehlen, die einen PPAR β -unspezifischen Effekt ausschließen.

Infolge der diskutierten Nachteile des PPRE-regulierten Reportersystems wurde in der vorliegenden Arbeit daher in der Regel das artifizielle, aber PPAR β -spezifische LexA- oder Gal4-Reporterkonstrukt eingesetzt, um die Rolle von Prostazyklin weiter zu charakterisieren (siehe Kapitel 3.8.2.5.2 und 3.8.2.5.3). Im Zuge dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Hemmung der Prostazyklinsynthese durch PGIS- oder Cox-Inhibitoren keinen Effekt auf die Aktivität von PPAR β besaßen (Abb. 16 und 17). Weiterhin führte die simultane Überexpression von Cox-2 und PGIS in Hek-Zellen zwar zu einem enormen Anstieg der Prostazyklin-Synthese, doch die transkriptionelle Aktivität von PPAR β blieb davon unbeeinflusst (Abb. 18). Letzteres steht im völligen Kontrast zu Beobachtungen von Gupta *et al.* (2000), der in humanen Osteosarkoma-Zellen (U2OS) unter Verwendung eines Gal4-Reporterkonstruktes eine Prostazyklin-abhängige Regulation von PPAR β zeigen konnte. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Wiederholung dieses Experiments konnte den veröffentlichten Effekt jedoch nicht bestätigen (Abb. 19): Zwar resultierte die Überexpression von Cox-2 und PGIS in einer Zunahme der Synthese von PGI $_2$, doch ein agonistischer Effekt von Prostazyklin auf PPAR β konnte hier nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigte damit die bisherigen, eigenen Resultate. Die Gründe für die Diskrepanz der hier und bei Gupta *et al.* vorgestellten Ergebnisse konnte leider nicht erklärt werden.

Weitere Hinweise darauf, dass Prostazyklin keine essentielle Rolle bei der Regulation von PPAR β spielt, lieferten Studien mit diversen Zelllinien, deren Zellkulturmedium mit 10 μ M Prostazyklin versetzt wurde (Fauti *et al.*, 2006; Yuk *et al.*, 1995; Forman *et al.*,

1997). Die Analyse des Einflusses auf PPAR β mittels eines entsprechenden Reporter-konstruktes konnte auch hier nicht beobachtet werden. Natürlich ist bei dieser Ver-suchsstrategie zu beachten, dass Prostazyklin eine sehr geringe biologische Halb-wertszeit von etwa 3 Minuten besitzt (Dusting *et al.*, 1997). Daher ist unklar, ob die Zel-len für den Nachweis von Prostazyklin-abhängigen Effekten auf PPAR β ausreichend Prostazyklin aufnehmen konnten, bevor dieses in seinen stabilen Metaboliten 6-k-PGF 1α umgewandelt wurde.

Während die beschriebenen Experimente zweifelsfrei belegen, dass PPAR β nicht sig-nifikant durch Prostazyklin reguliert wird, konnte der agonistische Effekt des synthethi-schen Prostazyklin-Analogons (Carbaprostazyklin) in verschiedenen Studien belegt werden (Gupta *et al.*, 2000; Forman *et al.*, 1997; Kliwer *et al.*, 1997). Auch die Ergeb-nisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Beobachtung (Abb. 15).

Betrachtet man die biochemische Struktur von Prostazyklin und Carbaprostazyklin, so unterscheiden sie sich lediglich an einer Position (Abb. 37). Ob diese marginale Abwei-chung der Grund für die gravierenden Unterschiede bezüglich der Bindung von PPAR β ist, bleibt jedoch unklar. Alternativ könnte man vermuten, dass die geringe Halbwerts-zeit von PPAR β verhindert, dass genügend intakte Prostazyklin-Moleküle bis zur Transkriptionsmaschinerie in den Zellkern vordringen. Während die mangelnde Stabili-tät von Prostazyklin damit die Regulation der transkriptionellen Aktivität von PPAR β verhindert, mag sie für die Bindung an den Membranrezeptor IP eine eher untergeord-nete Rolle spielen (Fauti *et al.*, 2006). Somit könnte Prostazyklin seine regulatorische Funktion vor allem über die Aktivierung verschiedenster Signalwege nach Bindung an den IP-Rezeptor vermitteln.

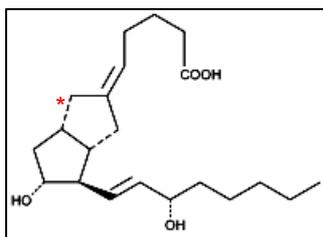


Abb 37: Strukturformel von Carbaprostazyklin. Der Unterschied zu Prostazyklin (PGI $_2$) liegt in einem Sauerstoffatom an der hier mit einem roten Stern markierten Position des cPGI $_2$.

5.1.3 Arachidonsäure besitzt einen agonistischen Effekt auf PPAR β

Wie bereits in diversen Studien beschrieben, konnte für bestimmte mehrfach ungesät-tigte Fettsäuren, wie die Arachidonsäure (AA) oder die Eicosapentaensäure (EPA), nicht jedoch für die LA („linoleic acid“, Linolsäure; eigene, nicht gezeigte Daten), eine agonistische Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β nachgewiesen wer-

den (Abb. 15, 21 und 22, sowie Forman *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2001). Während EPA in einer relativ hohen Konzentration von 50 μM eingesetzt werden musste und die Wirkung nicht Isoform-spezifisch war, konnte der spezifische, stimulatorische Effekt der Arachidonsäure auf PPAR β bereits nach Zugabe von 20 μM AA in das Zellkulturmedium erzielt werden (Abb. 15 und Forman *et al.*, 1995).

Vermittelt wurde dieser Effekt jedoch nicht über die Cox-2- bzw. PGIS-induzierte Synthese von Prostazyklin, wie der Einsatz von spezifischen Inhibitoren dieser Schlüsselenzyme des Prostaglandin-Synthesewegs zeigte (Abb. 16 und 17). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die experimentelle Handhabung des hier eingesetzten PGIS-, oder Cox-spezifischen Inhibitors besonderer Sorgfalt bedarf. So ist die Prä-Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor ein essentieller Schritt, um die größtmögliche Inhibition der Prostazyklinsynthese zu erreichen. Voran gegangene Experimente mit Zellen, die parallel für 24 h mit Arachidonsäure und U51605 oder den Cox-Inhibitoren inkubiert wurden, zeigten im Gegensatz zu den hier vorgestellten Versuchen lediglich eine 60 – 70-%ige Hemmung der Prostazyklinsynthese. Um eine verlässliche Analyse des Einflusses von Prostazyklin auf PPAR β zu ermöglichen, ist daher die genaue Abstimmung der Versuchsparameter unentbehrlich.

Ferner konnte beobachtet werden, dass die transkriptionellen Aktivität von PPAR β nach Transfektion von PGIS abnimmt (Abb.18). Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch Überexpression der PGIS eine Konkurrenzsituation um das Substrat Arachidonsäure entsteht, die die Produktion des wahren PPAR β -Liganden beeinträchtigt. Dieses Argument konnte jedoch entkräftet werden, da die Abnahme auch in Abwesenheit von transfiziertem PPAR β -LBD zu beobachten war (nicht gezeigte Daten).

Wie weitere Analysen ergaben, wird der PPAR β -spezifische Ligand auch nicht durch Metabolisierung der Arachidonsäure durch diverse Lipoxygenasen gebildet (Abb. 20 und 21). So übte weder die Inhibition der Lipoxygenasen durch NDGA („nordihydroguaiaretic acid“), noch die gezielte Applikation verschiedener Produkte des Lipoxygenase-Weges (5(S)HpETE, 12(S)HpETE bzw. 15(S)HpETE) einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β aus.

Arachidonsäure ist eine extrem oxidationsanfällige Substanz, die daher licht- und luftgeschützt bei -80 °C gelagert wird. Im Grunde wäre also denkbar, dass die agonistische Wirkung der Arachidonsäure auf der Wirkung eines Oxidationsproduktes beruht, das durch den Kontakt der Fettsäure mit Luft gebildet wurde. Um dies zu klären, wurde anhand eines LexA-Reportersystems (vergleiche Abb. 21) der Einfluss des Oxidationsproduktes 8-iso-PGF 2α untersucht. Doch auch dieses zeigte keine Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β (Daten nicht gezeigt). Ein Effekt durch unsach-

gemäße Lagerung der Arachidonsäure konnte daher weitgehend ausgeschlossen werden.

Wie der agonistische Einfluss der Arachidonsäure vermittelt wird, bleibt demzufolge offen. Eine Möglichkeit besteht in der direkten Interaktion der Fettsäure mit PPAR β . Ebenso ist denkbar, dass die Arachidonsäure durch Wege metabolisiert wird, die unabhängig von den Cyclooxygenasen, sowie den Lipoxygenasen, ablaufen. Auch die Existenz eines natürlichen Liganden, der nichts mit Arachidonsäure zu tun hat, ist generell möglich.

Um die Frage nach dem natürlichen Liganden von PPAR β abschließend zu klären, bedarf es daher weiter führender Studien. Ein in diesem Zusammenhang interessanter Aspekt soll im Folgenden kurz angerissen werden.

5.1.4 Die Suchen nach dem wahren Liganden von PPAR β

Tan *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Differenzierung von primären Keratinozyten erst durch die Kombination von überexprimiertem PPAR β und der Behandlung der Zellen mit dem synthetischen PPAR β -Liganden L165041 ausgelöst werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde anhand verschiedener Reporter-gen-Assays bewiesen, dass die Ausschüttung von Signalmolekülen, wie TNF α oder IFN γ im Rahmen von Entzündungsprozessen, sowohl zur Expression von PPAR β , als auch zur Produktion eines endogenen, nicht näher charakterisierten PPAR β -Liganden führten. Die biochemische Analyse des organischen Extrakts von Zytokin-aktivierten Keratinozyten könnte daher sehr interessante Hinweise auf die Identität des hier induzierten PPAR β -spezifischen Liganden geben. Besondere Aufmerksamkeit verdienen hier vor allem Lipide und ähnliche Substanzen. Inwiefern es sich um einen zelltyp-spezifischen oder generellen Liganden handelt, müsste selbstverständlich im Folgenden durch Verwendung verschiedenster Zellsysteme charakterisiert werden. Außerdem muss bei der experimentellen Planung bedacht werden, dass die PPARs nicht nur durch Bindung von Liganden, sondern auch durch cAMP und andere Signalwege reguliert werden können (Lazennec *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001).

Die Tatsache, dass bisher kein natürlicher Ligand für PPAR β gefunden wurde, könnte auch darauf hinweisen, dass PPAR β eine generelle Rolle bei der Regulation von zellulären Funktionen übernimmt, beispielsweise indem es die Konzentration von Fettsäuren überwacht und grundlegende zelluläre Mechanismen reguliert (Escher und Wahli, 2000).

5.1.5 Biologische Relevanz

5.1.5.1 Prostazyklin

Produziert wird Prostazyklin vor allem von Endothelzellen und von Fibroblasten des Tumorstromas - nicht jedoch von Tumorzellen selbst (Mihaela Kreutzer, nicht publizierte Ergebnisse).

Da die beiden Schlüsselenzyme der Synthese von PGI₂, Cox-2 und PGIS, sowohl an den Kernmembranen, als auch im Bereich der Membran des ER (Endoplasmatischen Retikulums) lokalisiert sind, wurde angenommen, das Prostazyklin nicht nur über den klassischen IP-vermittelten Signalweg agiert, sondern auch über Kernrezeptoren, genauer gesagt über PPAR β (Lim und Dey, 2002, sowie hier angegebene Referenzen). In Ergänzung zur PGI₂-abhängigen Vasodilatation und dem Thromboseschutz wurden seither diverse biologische Funktionen von PPAR β bzw. Prostazyklin beschrieben (Moncada, 1982; Murata *et al.*, 1997; siehe auch folgende Kapitel, sowie 1.6.1).

Da Prostazyklin jedoch nicht der natürliche Ligand von PPAR β ist, wie die vorliegende Arbeit zeigt, dienen die folgenden Kapitel einer erneuten, kritischen Auseinandersetzung mit ausgewählten, beschriebenen Wirkmechanismen von PPAR β .

5.1.5.2 PPAR β und die Implantierung des Embryos in die Plazenta

Von den verschiedenen Prostaglandinen ist Prostazyklin dasjenige, welches im Uterus von trächtigen Mäusen am höchsten konzentriert vorliegt (Reese *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 1999). Weiterhin konnten sowohl Cox-2, das für die Nidation der Blastozyste, sowie der Dezidualisation unabdingbar ist, als auch PGIS an den Implantationsstellen nachgewiesen werden (Lim *et al.*, 1997). Auf der Suche nach einem geeigneten Rezeptor für Prostazyklin an diesen Stellen, stießen Lim *et al.* (1999) schließlich auf PPAR β , der hier im Gegensatz zum Membranrezeptor des Prostazyklins stark exprimiert wurde. Da die beeinträchtigte Dezidualisation in Cox-2^{-/-}-Mäusen mit PPAR β -spezifischen Agonisten deutlich verbessert werden konnte, argumentierten Lim *et al.* (1999) für eine entscheidende, Prostazyklin-vermittelte Rolle von PPAR β bei der Implantierung des Embryos in den murinen Uterus.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, erscheint diese Hypothese strittig. Außer Frage steht sicherlich, dass PPAR β eine wichtige Funktion bei der Ausbildung bzw. adäquaten Vorbereitung der Plazenta für die Nidation spielt. So lag die Überlebensrate von Embryos in PPAR β ^{-/-}-Mäusen deutlich unter dem Durchschnitt von Wildtypmäusen (Barak *et al.*, 2001). Durch welchen Liganden oder Signalweg dieser PPAR β -spezifische Effekt jedoch vermittelt wird, ist bisher unklar.

Weiterer Aufklärung bedarf außerdem die Frage, ob Prostazyklin in diesem Zusammenhang überhaupt eine Rolle spielt. Die nahe liegende Vermutung, dass die Funktion von Prostazyklin über dessen Bindung an den IP-Rezeptor vermittelt wurde, konnte durch entsprechende Studien von Lim *et al.* (1999) entkräftet werden. So beeinflusste der Einsatz von Cicaprost, einem Agonisten des Membranrezeptors von Prostazyklin, der jedoch keine agonistische Wirkung auf PPAR β besitzt, die Implantierung des Embryos in keiner Weise.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass PPAR β eine entscheidende Funktion bei der Implantierung des Embryos in die Plazenta ausübt. Die Rolle von Prostazyklin in diesem Zusammenhang ist hingegen völlig unklar.

5.1.5.3 PPAR β und der Lipidstoffwechsel

Neben der hier im Folgenden näher diskutierten Rolle bei der Proliferation von Tumoren beeinflusst PPAR β zudem den Lipidstoffwechsel (siehe auch Kapitel 2.6.1.3). So zeigten Studien mit PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen, dass diese eher zur Gewichtszunahme neigten als Wildtyp-Mäuse (Peters *et al.*, 2000; ‚McDonald’s Diät‘, Wang *et al.*, 2003). Analog führte die zielgerichtete Aktivierung von PPAR β durch synthetische Agonisten im Fettgewebe zu einem deutlich dünneren Phänotyp im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Mäusen. Als Ursache dafür konnte sowohl ein Defekt bei der Differenzierung der Adipozyten, als auch die Aktivierung von Enzymen, die den Fettverbrauch erhöhten, in Frage kommen.

Wie bereits von Hansen *et al.* (2001) und Hellemans *et al.*, (2003) beschrieben, übt PPAR β jedoch nur in nicht-differenzierten Vorläuferzellen einen Einfluss aus. Hier induziert der Kernrezeptor die Expression von PPAR γ und anderen Adipozyten-spezifischen Genen. Bei der finalen Differenzierung der Adipozyten hingegen spielt PPAR β keine Rolle. Dies konnte von Wang *et al.* (2003) durch die Beobachtung unterstützt werden, dass nach Aktivierung von PPAR β keines der typischen Merkmale einer gestörten Differenzierung der Fettzellen (Fettleber, erhöhte Triglyzerid-Werte im Blut, Insulinresistenz) beobachtet werden konnte. Die Wirkung von PPAR β auf den Lipidmetabolismus beruht also auf der Regulation der Oxidation der Fettsäuren und dem gesteigerten Energieverbrauch. Dies wird vor allem durch die Induktion der Expression von Genen wie dem UCP-3 („uncoupling protein-3“) bzw. UCP-1, durch PPAR β erreicht. Durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, das heißt der Atmungskette und der ATP-Synthese im braunen Fettgewebe, läuft die Atmungskette trotz Überschuss von ATP weiter und es entsteht Wärme (Thermogenese). Ein bereits

beschriebener Regulator der Thermogenese ist der transkriptioneller Koaktivator PGC-1 α . In diesem Zug konnte Wang *et al.* (2003) eine starke Interaktion von PPAR β und PGC-1 α in Ko-Immunopräzipitationen zeigen. Außerdem führte PGC-1 α in transienten Transfektionen zu einer deutlichen Aktivierung von PPAR β . Daher argumentierte Wang *et al.* (2003), dass die bereits beschriebene Funktion von PGC-1 α bei der Thermogenese vor allem durch Interaktion mit PPAR β vermittelt wird.

Insgesamt übt PPAR β also einen ähnlichen Effekt wie PPAR α aus, was die Regulation des Lipidmetabolismus angeht. Viele Gene, die während der β -Oxidation exprimiert werden, werden sowohl von PPAR α , als auch von PPAR β reguliert („long chain acyl-CoA synthetase LCAS, „very long chain acyl-CoA synthetase“ VLCAS, acyl-CoA oxidase“ AOX, und andere; Reddy und Hashimoto, 2001; Berger und Moller, 2002; Wang *et al.*, 2003). Ferner ist für verschiedene Fettsäuren beschrieben, dass sie sowohl an PPAR α , als auch an PPAR β , jedoch kaum oder gar nicht an PPAR γ binden (Forman *et al.*, 1997).

Trotz dieser Gemeinsamkeiten werden PPAR α und PPAR β unterschiedlich exprimiert, was darauf schließen lässt, dass sich die beiden Kernrezeptoren auf eine gewebsspezifische Weise in ihrer Funktion ergänzen. Während PPAR α demnach vor allem für die β -Oxidation in der Leber zuständig ist, kommt PPAR β die generelle Aufrechterhaltung der Energiebalance zu, indem die Oxidation von lokal verfügbaren Fettsäuren reguliert wird. PPAR β wird dadurch sicherlich zu einem interessanten Angriffspunkt für die Behandlung von Adipositas. Natürlich müsste bei längerem Einsatz von PPAR β -spezifischen Agonisten der stimulatorischen Wirkung von PPAR β auf die Tumorpherproliferation durch entsprechende pharmakologische Regulatoren Sorge getragen werden.

5.1.5.3.1 PDK4

PDK-4 ist eine Kinase, deren Aufgabe in der Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Pyruvate-Dehydrogenase liegt. In der Skelettmuskulatur resultiert dies darin, dass Glukose nicht mehr oxidiert, sondern dem Laktat-Zyklus zugeführt wird.

Im Zug von Diabetes, aber auch von Diäten, werden vermehrt Fettsäuren frei gesetzt. Dies könnte zur Aktivierung von PPAR α und damit zu einem Anstieg der Expression von PDK-4 führen, das bereits mehrfach als Zielgen von PPAR α beschrieben wurde (Muio *et al.*, 2002; Ferré, 2004). PPAR α ^{-/-}-Mäusen zeichnen sich durch eine reduzierte β -Oxidation der Fettsäuren, sowie eine verminderte Expression von zumindest sieben mitochondrialen Enzymen aus, die am Fettsäure-Metabolismus beteiligt sind (Watanabe *et al.*, 2000). In der Skelettmuskulatur dieser Mäuse konnte man jedoch nur ei-

nen sehr schwachen Defekt der Fettsäure-Oxidation beobachten. Außerdem kam es zu einer völlig normalen Induktion der Expression von PDK-4, wenn die Mäuse für eine zeitlang gehungert wurden. Eine Erklärung für diesen Umstand fand man nach der Analyse der Expression von PPAR β . Dieser Kernrezeptor wird im Vergleich zu den anderen beiden Isotypen in der Skelettmuskulatur von Nagetieren am stärksten exprimiert (Ferré, 2004). Die Vermutung, dass die Fettsäure-Oxidation in der Skelettmuskulatur von PPAR $\alpha^{-/-}$ -Mäusen von PPAR β übernommen wird, lag auf der Hand. Zumal die Rolle von PPAR β im Lipidstoffwechsel bereits mehrfach beschrieben wurde (siehe Kapitel 2.6.1.3 und 5.1.5.3). Ferner wiesen die Daten der PPAR $\alpha^{-/-}$ -Mausstudien darauf hin, dass PDK-4 nicht nur durch PPAR α , sondern auch durch PPAR β reguliert werden konnte. Analog dazu wurde die Expression von PDK-4 durch den Gegenspieler von PPAR β - bzw. PPAR α im Lipidstoffwechsel, PPAR γ , negativ reguliert (Way *et al.*, 2001). Die hier beschriebenen Daten zeigen, dass PPAR β sowohl in etablierten, murinen Fibroblasten aus syngenen C57bl6 Mäusen (siehe Kapitel 3.8.2.1, 3.9 und 4.2.2.2), als auch in humanen HCT-116-Zellen die Expression von PDK-4 reguliert (Abb. 28). Auch im Tet-induzierbaren HeLa-System konnte PDK-4 auf eine PPAR β -spezifische Art reguliert werden und unterstützt damit die Annahme, dass PDK-4 ein PPAR β -reguliertes Gen darstellt (Abb. 30). Da die Computer-gestützte Analyse der Promotor-Sequenz des *PDK-4* jedoch kein PPPE-Element offenbarte, bedarf es weiter führender Experimente, um die Frage zu klären, in welchem Zusammenhang die Expression von PDK-4 und die Aktivität der PPARs stehen. Denkbar wäre beispielsweise eine Regulation über FoxO1, wie sie bereits von Furuyama *et al.* (2003) beschrieben wurde. Unterstützt wird dies durch (nicht gezeigte) eigene Daten mit dem vorgestellten HCT-116-Zellsystem. Hier führte die Aktivierung von PPAR β durch GW501516 lediglich in den Wildtypzellen, nicht jedoch in den PPAR $\beta^{-/-}$ -Zellen zu einem etwa 1,3-fachen Anstieg der Expression von FoxO1. Demnach könnte PDK-4 über die PPAR β -abhängige Expression von FoxO1 reguliert werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand jedoch in der Identifizierung direkter Zielgene von PPAR β , so dass die weitere Analyse der Regulationsmechanismen von PDK-4 durch die PPARs nicht durchgeführt wurde.

5.1.5.4 PPAR β und Onkogenese

Während die Deregulation oder Überexpression von Cox-2 in Tumor- bzw. Tumorstromazellen bereits durch vielfältige Studien belegt wurde, gestaltet sich die Rolle von PPAR β im Rahmen der Tumorigenese teils sehr widersprüchlich (Dannenbergh und

Subbaramaiah, 2003; Gupta und Dubois, 2001; Williams *et al.*, 1999; siehe auch Kapitel 2.6.1.7).

In Kolonkarzinomen, aber auch in Adenomakarzinomen des Endometriums, konnte gezeigt werden, dass nicht nur Cox-2, sondern auch der Kernrezeptor PPAR β überexprimiert wurden (He *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2000). Basierend auf den Ergebnissen von Gupta *et al.* (2000) stellten Lim und Dey (2002) die These auf, dass die proliferative Wirkung von PPAR β bezüglich Kolonkarzinomen durch Prostazyklin vermittelt wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass die Überexpression von Cox-2 und PGIS zwar zu einem enormen Anstieg der Synthese von Prostazyklin führte. Doch übte dies keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR β aus (Abb. 9). Die proliferative Wirkung von PPAR β , die zum Beispiel auch in HCT-116 Zellen demonstriert werden konnte, muss daher auf andere Weise vermittelt werden (Park *et al.*, 2001).

Auch das von Cutler *et al.* (2003) beschriebene Modell muss vor diesem Hintergrund neu bewertet werden. Nach seinen Beobachtungen unterstützte die Freisetzung von Prostazyklin durch die Fibroblasten des Tumorstromas das Wachstum der Kolonkarzinomzellen. Basierend auf dem bisher postulierten Zusammenhang von PPAR β und Prostazyklin, sowie dem beobachteten proliferativen Effekt von PPAR β in Kolonkarzinomen, lag der Schluss nahe, dass dies durch Bindung von PGI $_2$ an den Kernrezeptor PPAR β vermittelt wurde.

Wie die vorliegende Arbeit jedoch gezeigt hat, ist es für das Verständnis der Funktion von PPAR β notwendig, nach anderen Regulationsmechanismen zu schauen.

Die Tumorigenese ist immer ein mehrstufiger Prozess, der nach einem initialen Mutationsschritt viele weitere bedingt, bis sich ein maligner Tumor bildet. Kennzeichen dieses Prozesses ist häufig die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie dem APC. Beispielsweise führt die Methylierung des APC-Promotors in Kolonkarzinomen zur Transkription von TCF-4-regulierten Zielgenen, wie dem PPAR β (Willert und Nuse, 1998). Dabei konnten Studien von Barak *et al.* (2002) verdeutlichen, dass PPAR β nicht so sehr bei der Initiation, sondern vielmehr bei der Progression von Kolonkarzinomen von Bedeutung ist. So führte die homozygote Deletion von PPAR β in APC $^{-/-}$ -Mäusen zwar nicht zur Abnahme der durchschnittlichen Tumorzahl, aber zur Hemmung des Wachstums der Tumore über eine Größe von 2 mm Durchmesser. Weiterhin konnte die Zahl der Kolonkarzinome in APC $^{-/-}$ -Mäusen durch Behandlung mit dem PPAR β -spezifischen Agonisten GW501516 deutlich gesteigert werden (Gupta *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Inaktivierung von APC greift PPAR β also erst relativ spät in das Wachstum von Tumoren ein. Das geschieht zu einem Zeitpunkt, an dem sie vor allem auf ei-

ne funktionierende Angiogenese angewiesen sind, damit die ausreichende Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff garantiert werden kann. Daher liegt die Vermutung nahe, dass PPAR β seine positive Wirkung auf das Tumorstadium durch Förderung der Angiogenese ausübt (siehe auch Kapitel 5.1.5.6).

5.1.5.5 PPAR β und Angiogenese

5.1.5.5.1 PPAR β und PGE₂

Die fördernde Wirkung von PGE₂ im Rahmen der Tumorigenese wurde bereits in diversen Studien gezeigt und beruht vor allem auf der Regulation von pro-angiogenen Faktoren (Amano *et al.*, 2003; Sonoshita *et al.*, 2001). Ferner gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass zumindest drei der vier G-Protein gekoppelten Rezeptoren von PGE₂ (EP2, EP3 und EP4) eine elementare, jedoch teils Zelltyp-spezifische Rolle bei der Entstehung diverser Tumore spielten (Müller, 2004 und hier aufgeführten Referenzen). In APC ^{Δ 716}-Mäusen, die neben einem mutierten APC-Allel auch eine Mutation im *Smad4* besaßen, führte die genetische Inaktivierung des EP2-Rezeptors zur Senkung der Anzahl und Größe von intestinalen Polypen bzw. Adenomkarzinomen (Seno *et al.*, 2002). Dies beruhte auf einer verminderten Ausbildung von Blutgefäßen. Während die Deletion des Rezeptors EP3 vor diesem genetischen Hintergrund keine Bedeutung besaß, führte sie in syngenesischen Sarcoma-180 Modellen zu einer deutlich reduzierten Tumor-Angiogenese und Expression von VEGF (Amano *et al.*, 2003).

Neben den Effekten auf die Angiogenese weisen verschiedene Daten auch auf eine direkte Wirkung von PGE₂ auf die Tumorzellen hin. So resultierte die genetische Inaktivierung bzw. pharmakologische Inhibition von EP4 in einer Abnahme der Polypenanzahl um 44 % in dem von Mutoh *et al.* (2002) beschriebenen Mausmodell, ohne einen nachweisbaren Effekt auf die Angiogenese auszuüben. Auch Pai *et al.* (2002) konnten eine PGE₂-abhängige Abnahme der Proliferation von Kolon- bzw. Magentumorzellen beobachten. In diesem Fall wurde die Wirkung über die EGF-Rezeptor-vermittelte Aktivierung des ERK-Signalweges erzielt. Ferner konnten Wang *et al.* (2004) zeigen, dass PGE₂ seine stimulatorische Wirkung auf das Wachstum von kolorektalen Adenomen über die Aktivierung von PPAR β durch den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass PGE₂ zumindest zwei Möglichkeiten besitzt, das Tumorstadium zu regulieren: Einerseits durch Beeinflussung der Angiogenese, andererseits durch Aktivierung bestimmter Signalkaskaden, die einen proliferativen Effekt ausüben. Beispielsweise konnten Wang *et al.* (2004) zeigen, dass PGE₂ seine stimulatorische Wirkung auf das Wachstum von kolorektalen Adenomen über die Aktivie-

lung von PPAR β durch den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt. Auch Han *et al.* (2005) konnten zeigen, dass PPAR β über Aktivierung der PI₃-(Phosphatidyl-Inositol-3)-Kinase und gleichzeitiger Hemmung von PTEN (siehe Kapitel 2.6.1.1) die Expression des PGE₂-Rezeptors EP4 stimulierte. Dies resultierte in der Stimulation des Wachstums von humanen NSCLC durch PGE₂ und erklärt, warum die Überexpression von *mPGES-1* und die damit verbundene erhöhte PGE₂-Produktion für die Entwicklung von Lungentumoren alleine nicht ausreicht (Blaine *et al.*, 2005).

Die hier gezeigten Untersuchungen weisen nicht darauf hin, dass PPAR β durch PGE₂ aktiviert wird (Abb. 22 und 23). Weder der PGE₂-haltige Überstand der LLC-Zellen, noch die gezielte Applikation von PGE₂ führte im verwendeten LexA-Reportersystem in NIH3T3-Zellen zur transkriptionellen Aktivierung von PPAR β . Analysiert man das Expressionsniveau der vier EP-Rezeptoren von PGE₂ in den NIH3T3-Zellen, so findet man hier bevorzugt die Expression von EP4, nicht jedoch von EP2 oder EP3. Falls PPAR β seinen proliferativen Effekt bei der Tumorigenese über die Stimulation der Angiogenese durch PGE₂ vermittelt, könnte es sein, dass dies ein zelltyp-spezifischer Effekt ist, der von der Expression der PGE₂-Rezeptoren abhängt und daher im hier untersuchten Zellsystem nicht beobachtet werden konnte. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass NIH3T3-Zellen bereits soviel PGE₂ produzieren, dass die weitere Zugabe von PGE₂ keinen Effekt mehr ausüben kann.

5.1.5.5.2 Angiogene Zielgene von PPAR β

Um zu klären, in wie weit die proliferative Wirkung von PPAR β über einen stimulatorischen Effekt auf die Tumor-Angiogenese vermittelt wird, müssen zunächst einmal entsprechende Zielgene von PPAR β identifiziert werden. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit durch Kombination eines Microarrays mit dem spezifischen „knock-down“ von PPAR β durch siRNA erreicht werden. Weiterhin wurde mit Ang-1 ein typisches angiogenes Gen bezüglich seiner Regulation durch PPAR β analysiert.

In den letzten Jahren wurden bereits diverse Gene identifiziert, deren Promotoren die typische PPRE-, bzw. RXR-Konsensus-Sequenz beinhalten, so dass man von ihnen als den Zielgenen der PPARs spricht: ACBP („acycl CoA-binding protein“), BRCA1⁵ und ACO („acyl coenzyme A oxidase“) sind nur ein paar Beispiele (Pignatelli *et al.*, 2003). Durch Microarray-Studien wurden weitere Gene identifiziert, die von PPAR α reguliert

⁵ BRCA1 ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Expression v. a. in Fällen von Brust- oder Eierstockkrebs reprimiert ist.

werden und eine wichtige Rolle im Zellzyklus, der Differenzierung, sowie der Angiogenese spielen: Angptl4 (“angiopoietin-like protein 4”), MKP-1 (“MAPK-phosphatase-1”) und FoxC2 (“forkhead C2”) (Tien *et al.*, 2004; Tachibana *et al.*, 2005). Außerdem gelten viele Gene, die eine wichtige Funktion im Lipidstoffwechsel in der Leber ausüben, als Zielgene von PPAR α . Dazu gehören unter anderem die Acyl-CoA Synthetase, die Lipoprotein-Lipase, aber auch die Acyl-CoA Oxidase, die eine Schlüsselfunktion während der peroxisomalen β -Oxidation einnimmt.

Zielgene von PPAR β , die bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen, sind bisher wenige bekannt. Jedoch stellt Ubiquitin C als Zielgen von PPAR β (Kim *et al.*, 2004) eine interessante Möglichkeit für den Kernrezeptor dar, Proteine des Zellzyklus durch Ubiquitinierung indirekt zu regulieren. Weitere Zielgene von PPAR β sind z. B. die HMG-CoA Synthase (Basu-Modak *et al.*, 1999), sowie PDK-1 (“3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1”; Di-Poi, 2002). Diskutiert wird weiterhin Upc-3 (“uncoupling protein 3”) (Nagase *et al.*, 1999 und 2001; Wang *et al.*, 2003), das bei der mitochondrialen Regulation des Energiemetabolismus eine Rolle spielt. PPAR β -regulierte Gene, die explizit bei der Angiogenese von Bedeutung sind, wurden bisher jedoch nicht identifiziert.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden vor allem zwei Kandidaten untersucht, die einen PPAR β -spezifischen Effekt auf die Tumor-Angiogenese ausüben könnten: CXCR-4 und EGR-1.

5.1.5.5.2.1 CXCR-4 („chemokine C-X-C motif receptor 4“)

CXCR-4 (SDF-1 Rezeptor, Fusin, CD184 Antigen) gehört zu den Chemokin-Rezeptoren die sich in die Subfamilien mit den Motiven CXC, C, CX3C, sowie CC einteilen. Der G-Protein gekoppelte Transmembran-Rezeptor reguliert einerseits den Leukozytenfluss, andererseits ist er eine Schlüsselkomponente bei HIV-1 Infektionen (Sato *et al.*, 2005): Als Ko-Faktor ermöglicht er die Bindung und den Eintritt von HIV-1 (“human immunodeficiency virus type 1”) in T-Zellen, von denen er exprimiert wird. CXCR-4 stellt dabei ein interessantes therapeutisches Ziel dar, da die CXCR-4-abhängige HIV-1 Infektion (X4 Viren) durch extrazelluläres HIV-1 Tat-Protein gehemmt werden kann, welches den natürlichen CXCR-4 Liganden CXCL12 (SDF-1 α) verdrängt.

Neben der Funktion im Immunsystem wurde CXCR-4 zunehmend mit verschiedenen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (Balkwill, 2004, sowie hier angegebene Referenzen). Vor allem die gezielte Migration von Tumorzellen, die reduzierte Apoptoserate, sowie die Etablierung von Tumor-unterstützenden Cytokin-Chemokin-

Netzwerken konnte hier beobachtet werden. Ferner konnten Sato *et al.* (2005) zeigen, dass die Expression von CXCR-4 in verschiedenen Pankreas-Tumorzelllinien durch DNA-Methylierung inhibiert wurde und erbrachten damit den ersten Beweis der epigenetischen Regulation von CXCR-4 in humanen Tumoren. CXCL12, der Ligand von CXCR-4, wurde sowohl in Tumorzellen selbst, als auch in deren Stromazellen nachgewiesen. Interessanterweise konnte die stärkste Expression von CXCL12 jedoch in Organen detektiert werden, die bevorzugt von Metastasen (hier: von Mammakarzinomen) befallen werden (Muller *et al.*, 2001). Auch in anderen Tumorarten konnte der stimulatorische Effekt von CXCR-4/CXCL12 auf die Migration, Adhäsion, Invasion und Proliferation gezeigt werden (Scotton *et al.*, 2002; Kijima *et al.*, 2002; Koshiba *et al.*, 2000; Libura *et al.*, 2002; Cardones *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2003). Vermittelt wird dies unter anderem durch die Aktivierung von Signalkaskaden, wie dem Akt- oder dem ERK1/2-Signalweg (Barbero *et al.*, 2003). Außerdem wird CXCR-4 durch verschiedene Faktoren, zu denen das Tumorsuppressor-Protein Hippel-Lindau, aber auch VEGF, NF-KB, sowie Hypoxie gehören, reguliert (Staller *et al.*, 2003; Bachelder *et al.*, 2002; Helbig *et al.*, 2003; Schioppa *et al.*, 2003). Studien von Salcedo *et al.* (2003) lieferten zudem erste Hinweise auf die Beteiligung von CXCR-4 bei der Angiogenese. So ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass in der jüngeren Vergangenheit bereits verschiedene CXCR-4-Inhibitoren für die Behandlung von Tumoren eingesetzt wurden, die das Tumorwachstum und die Bildung von Metastasen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* hemmen konnten (Tamamura *et al.*, 2003; Rubin *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2004). Einer dieser Inhibitoren (AMD3100) wird zurzeit in einer klinischen Studie vor dem Hintergrund von multiplen Myelom, sowie dem Nonhodgkin Lymphom getestet (Devine *et al.*, 2004).

Vor diesem Hintergrund erschien die weitere Charakterisierung von CXCR-4 als Zielgen von PPAR β äußerst viel versprechend, zumal die Analyse der Promotor-Sequenz des CXCR4 durch das Programm MatInspector (Fa. Genomatix) ein PPRE-Element im ersten Intron offenbarte, über das PPAR β die Expression von CXCR-4 steuern könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte die PPAR β -spezifische Regulation von CXCR-4 sowohl in murinen NIH3T3-Fibroblasten, als auch in humanen HCT-116-Zellen und HUVEC gezeigt werden (Abb. 27, 30). Hingegen konnte der Einsatz des Tet-induzierbaren Zellsystems keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Auch die Analyse der Expression von CXCR-4 in etablierten Fibroblasten eines syngenens Mausmodells mit Wildtyp-, sowie PPAR $\beta^{-/-}$ -Tieren konnte die PPAR β -abhängige Regulation von CXCR-4 nicht bestätigen (nicht gezeigte Daten). Bei diesem Testsystem ist jedoch zu beachten, dass das Expressionsniveau von CXCR-4 bereits innerhalb der Wildtyp-, aber auch

innerhalb der verschiedenen PPAR $\beta^{-/-}$ -Zelllinien teils deutlich variierte. Diese biologische Varianz kann auf unterschiedlich stark ausgeprägte Adaptionsmechanismen der kultivierten Zelllinien begründet sein. Generell muss bei Studien mit PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen bzw. daraus isolierten und etablierten Zelllinien immer beachtet werden, dass hier kompensatorische Mechanismen wirken können, die das Ergebnis beeinflussen (Peters *et al.*, 2000). Um dieses Problem zu umgehen, könnte das Cre-Lox-System genutzt werden, das im Folgenden kurz vorgestellt werden soll. Ursprünglich stammt dieses System aus dem Bakteriophagen P1 und wird heutzutage vor allem in transgenen Tieren genutzt, um konditionelle Mutanten zu generieren. Auch in Zellkultur-Experimenten findet das Cre-Lox-System Anwendung.

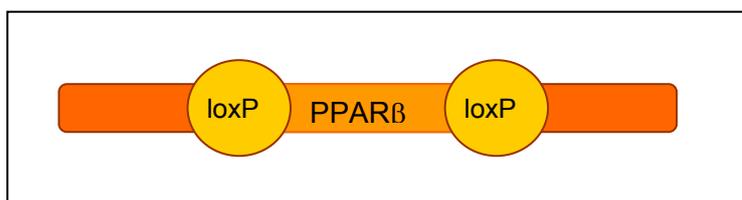


Abb. 35: Modell des Cre-LoxP-Systems. Die Ziel-DNA (PPAR β) wird auf beiden Seiten von einer so genannten LoxP-Stelle flankiert. Die Bindung des Cre-Enzyms an diese beiden LoxP-Stellen führt dazu, dass die Ziel-DNA, sowie die beiden LoxP-Stellen (jeweils zur Hälfte) heraus geschnitten und dann degradiert werden. Die verbleibende DNA wird durch die Cre-Rekombinase wieder verbunden.

Hier wird ein Vektor genutzt, der die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese schneidet das, durch zwei LoxP-Stellen flankierte, Transgen heraus und verbindet die DNA wieder. So könnte PPAR β zielgerichtet deletiert und die Auswirkung auf die Expression von putativen Zielgenen analysiert werden (Abb. 35).

Die *in vitro* gemachte Beobachtung der PPAR β -spezifischen Regulation der Expression von CXCR-4 konnte auch in dem hier vorgestellten, ersten *in vivo* Experiment gezeigt werden: Die Wildtyp-Mäuse mit subkutan injizierten LLC-Tumorzellen zeigten einheitlich eine deutlich stärkere Expression von CXCR-4 als die PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäuse (Abb. 34). Nun könnte man argumentieren, dass dies PPAR β -unspezifisch durch Faktoren bedingt wurde, die von den LLC-Tumorzellen sezerniert wurden. Da sich die Tumore in den PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäuse nach einer gewissen Zeit zurück bildeten, könnte dies die geringere Expression von CXCR-4 erklären. Dem ist entgegen zu setzen, dass eine der PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäuse (Maus 707 $^{-/-}$, siehe Abb. 34) zum Zeitpunkt der Isolierung der Lungen noch einen fühlbaren Tumor aufwies, jedoch im Vergleich zu den übrigen zwei PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen keine signifikant erhöhte Expression von CXCR-4 zeigte.

Zusammenfassend kann man daher festhalten, dass die vorliegenden Ergebnisse viel versprechende Hinweise dafür liefern, dass CXCR-4, als PPAR β -reguliertes Gen, die bereits mehrfach diskutierten positiven Effekte von PPAR β bezüglich des Tumorwachstums bzw. der Tumorigenese vermitteln könnte.

5.1.5.5.2.2 EGR-1

EGR-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Vergangenheit vor allem als Tumorsuppressorgen charakterisiert wurde (Baek *et al.*, 2004). Vermittelt wird die hemmende Wirkung von EGR-1 auf das Tumorwachstum hauptsächlich durch Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose (Ferraro *et al.*, 2005). Analog dazu konnte in Gliomen, aber auch in humanen NSCLC gezeigt werden, dass die Expression von EGR-1 deutlich runter reguliert war (Calogero *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2005). Jedoch gibt es auch widersprüchliche Daten bezüglich der Wirkung von EGR1. Im Zuge diverser Maus-Studien konnten Fahmy *et al.* (2003) zeigen, dass der Abbau der mRNA von EGR-1 zur Hemmung der Angiogenese führte. Analog dazu kam es in EGR-1^{-/-}-Mäusen zur Inhibition des Wachstums von injizierten MCF-7-Karzinomen. Davon nicht beeinflusst waren die Wundheilung, die Blutgerinnung oder andere hämatologische Parameter (Fahmy *et al.*, 2003). Die pro-angiogene Wirkung von EGR-1 wurde dabei vor allem über die Regulation der Expression von FGF-2 („fibroblast growth factor-2“), jedoch nicht von VEGF vermittelt.

Geht man davon aus, dass PPAR β seinen Tumor-fördernden Effekt durch Stimulation der Tumor-Angiogenese vermittelt, würde man, basierend auf den Daten von Fahmy *et al.* (2003), eine positive Regulation von EGR-1 durch PPAR β erwarten. In den hier vorgestellten Ergebnissen führte der „knock-down“ von PPAR β in murinen Fibroblasten (NIH3T3) jedoch zu einer erhöhten Expression von EGR-1 (Abb. 27). Diese reprimierende Wirkung von PPAR β auf die Expression von EGR-1 konnte lediglich nach 16-stündiger Aktivierung von PPAR β durch GW501516 in HUVEC, aber sonst in keinem der hier verwendeten Zellsysteme gezeigt werden (Abb. 30). Die Spezifität dieses späten Effekts ist zudem fraglich, da die Behandlung von murinen PPAR β ^{-/-}-Fibroblastenzelllinien mit GW501516 ebenfalls zu einer Abnahme der Expression von EGR-1 führte und daher auf eine PPAR β -unspezifische Wirkung hinweist (nicht gezeigte Daten).

Auch der Vergleich des Expressionsniveaus von EGR-1 in Tumorzellen, im vorliegenden Fall HCT-116-Wildtyp- bzw. HCT-116 PPAR β ^{-/-}-Zellen, konnte keinen signifikanten, PPAR β -spezifischen Unterschied zeigen. Zudem führte die Behandlung der Wildtypzel-

len mit dem PPAR β -spezifischen Agonisten GW501516 zu keiner überzeugenden Repression der EGR-1-Expression (Abb. 29 B). Es ist daher festzuhalten, dass in den hier untersuchten Zellsystemen kein Hinweis auf eine PPAR β -spezifische Regulation der Expression von EGR-1 geliefert werden konnte.

5.1.5.5.2.3 Angiopoietin-1 (Ang-1)

Kurz angerissen wurde in der vorliegenden Arbeit ferner, inwiefern PPAR β seine positive Rolle bei der Tumorentwicklung über Ang-1 vermittelt.

Denn Ang-1, Ang-2, Tie-2 und VEGF bzw. andere pro-, aber auch anti-angiogenen Faktoren regulieren durch koordinierte Interaktion entscheidend die Struktur von Gefäßen. Während die Angiogenese in den meisten normalen Geweben ausgeschaltet ist, zeichnen sich viele Tumor- bzw. ihre Stromazellen durch eine erhöhte Produktion von pro-angiogenen Faktoren (wie Interleukin-8, Angiotropin, „epidermal growth factor“ EGF, „transforming growth factor“ TGF α , TGF β , VEGF) und eine gleichzeitig gehemmte Produktion von Inhibitoren der Angiogenese (Thrombospondin, Angiostatin, Endostatin) aus (Folkman *et al.*, 1995; Cameliot und Jain, 2000).

Daher wurde in dieser Arbeit kurz diskutiert, ob mit Angiopoietin-1 einer der Schlüsselfaktoren der Angiogenese von PPAR β reguliert wird. Die von Dr. Jürgen Adamkiewicz bzw. seinen Mitarbeitern durchgeführte Analyse der Expression von Ang-1 in diversen Fibroblastenlinien, die ursprünglich aus syngenen C57bl6 Mäusen (Peters J. M. *et al.*, 2000; siehe Kapitel 3.9) generiert wurden, zeigte sowohl eine deutlich stärkere Expression von Ang-1 in den Wildtyp- als in den PPAR β ^{-/-}-Zellen, als auch eine PPAR β -bzw. GW501516-abhängige Induktion von Ang-1. Infolge der hohen klonalen Variabilität des murinen Fibroblastensystems bzgl. des basalen Expressionsniveaus, sowie der Induktion von Ang-1 (siehe Kapitel 4.2.3) sollten für die weitere Charakterisierung von Ang-1 geeignetere Testsysteme eingesetzt werden. So könnte beispielsweise die Überexpression von PPAR β in PPAR β ^{-/-}-Zellen, sowie der Einsatz des Cre-LoxP-Systems (siehe Kapitel 5.1.5.5.2.1) aufschlussreiche Daten liefern.

5.1.5.6 *Antagonismus von PPAR β und PPAR γ*

Die antagonistische Wirkung von PPAR β und PPAR γ im Lipidstoffwechsel, sowie deren gegensätzliche Expression in diversen humanen NSCLC (Abb. 24) führten schließlich zu der Vermutung, dass PPAR γ einen direkten Einfluss auf die Expression von PPAR β ausüben könnte.

Wie die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. So beruht der Antagonismus der beiden Kernrezeptoren wahrscheinlich vor allem auf der Funktion von PPAR β , als intrinsischer Repressor die Transkription von Zielgenen von PPAR γ und PPAR α zu steuern (Shi *et al.*, 2002).

Durch diesen Mechanismus könnte PPAR β womöglich auch in die Regulation der Angiogenese eingreifen. Denn auch für PPAR γ konnte in der Vergangenheit eine Verbindung zur Angiogenese aufgezeigt werden, allerdings waren diese Ergebnisse teils recht widersprüchlich (Komar, 2005, sowie hier angegebene Referenzen). So führte die Aktivierung von PPAR γ durch PGJ₂ in HUVEC zur Inhibition der Expression der VEGF-Rezeptoren (Xin *et al.*, 1999). Außerdem hemmte PPAR γ sowohl die Zellproliferation, als auch die Migration von Endothelzellen (Margeli *et al.*, 2003). Durch die Regulation von Genen, über die PPAR γ seine anti-angiogene Funktion vermittelt, könnte PPAR β als Gegenspieler von PPAR γ also ebenfalls in die Angiogenese eingreifen.

Dagegen zeigten Studien von Yamakawa *et al.* (2000) in diesem Zusammenhang, dass die Aktivierung von PPAR γ in der glatten Muskulatur von Gefäßen die Expression von VEGF stimuliert. Die Wirkung von PPAR γ in der Angiogenese scheint daher vom verwendeten experimentalen Modell bzw. von der zelltypspezifischen Verfügbarkeit von Kofaktoren abzuhängen.

5.1.5.6.1 PPAR β und Artherosklerose

Neben der möglichen Bedeutung bei der Angiogenese könnte der beschriebene Antagonismus von PPAR β und PPAR γ auch vor dem Hintergrund der Artherosklerose von Interesse sein.

Unter Artherosklerose versteht man allgemein eine Gefäßverkalkung, die durch falsche Ernährung, Bewegungsmangel, unbehandelten hohen Blutdruck, Diabetes oder genetische Faktoren entsteht. Zur Behandlung von Artherosklerose werden heutzutage in erster Linie diverse Fibrate, also PPAR α -Agonisten eingesetzt, die das Verhältnis von LDL („low density lipids“) zu HDL („high density lipids“) im Blutplasma reduzieren. Studien von Olivier *et al.* (2001) lieferten erste Hinweise darauf, dass auch PPAR β den Ausstrom von Cholesterin aus Makrophagen induzieren kann (siehe Kapitel 2.6.1.2). Sollte sich diese Tendenz bestätigen, kann die zielgerichtete Aktivierung von PPAR β als Unterstützung der Behandlung von Artherosklerose genutzt werden. Zwar wurde auch für PPAR γ -Agonisten, die eigentlich zur Behandlung von Diabetes-Patienten des Typ II eingesetzt wurden, ein positiver Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System beobachtet, indem sie die Konzentration von Cholesterin im Blut senkten und die Bildung

von Schaumzellen regulierten (siehe Kapitel 2.5.2). Doch führte dies infolge der Lipidspeichernden Funktion von PPAR γ gleichzeitig zu einer unerwünschten Gewichtszunahme der Patienten. Insofern könnte PPAR β , als Gegenspieler von PPAR γ im Lipidmetabolismus (siehe Kapitel 2.5.2 und 5.1.5.3), eine interessante therapeutische Ergänzung zur Behandlung von Artherosklerose darstellen.

5.1.6 Ausblick

Infolge seiner weit gestreuten Expression und der daraus resultierenden, vielfältigen biologischen Funktionen stellt PPAR β im Kontext des Tumorwachstums und der Metastasierung, bei Störungen des Lipidstoffwechsels, sowie bei Diabetes, ein interessantes therapeutisches Zielprotein dar. Um die Funktion von PPAR β vor diesem Hintergrund näher zu beleuchten, befasste sich die vorliegende Arbeit vor allem mit verschiedenen Aspekten der Regulation und Funktion von PPAR β . Dabei konnte gezeigt werden, dass Prostazyklin entgegen der bisher vorherrschenden Meinung bei der Regulation von PPAR β keine wesentliche Rolle spielte. Falls PPAR β nicht konstitutiv aktiv ist, wie neueste Untersuchungen von Fyffe *et al.* (2006) andeuten, bleibt daher die Identifizierung des natürlichen Liganden von PPAR β ein besonders spannendes Projekt. Darüber hinaus bedarf es weiterer Untersuchungen, um zu klären, welche anderen Faktoren für die Regulation von PPAR β von Bedeutung sind.

In diesem Zusammenhang von Bedeutung ist sicherlich das Thema der Koaktivatoren und Korepressoren. Die Analyse ihrer unter Umständen zelltyp-spezifischen Verfügbarkeit, sowie ihrer Interaktion mit konkurrierenden Bindungspartnern könnte zur Klärung dieser Frage in entscheidendem Maß beitragen. Weiterhin sollte die Rolle von post-translationalen Modifizierungen, wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Sumoilierung geklärt werden.

Weiterhin ist für das Verständnis der Funktionen von PPAR β die Charakterisierung von Zielgenen von PPAR β unumgänglich. In dieser Arbeit wurde bereits darauf hingewiesen, dass PPAR β seine positive Wirkung auf das Tumorwachstum womöglich über Beeinflussung der Angiogenese (durch Regulation von CXCR-4 und Ang-1) ausübt und sich daher als therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Tumorpatienten eignen würde.

Ein zunehmend interessantes Thema vor dem Hintergrund von Tumorerkrankung sind diverse nichtsteroidale, entzündungshemmende Substanzen („nonsteroidal anti-inflammatory drugs“, NSAIDs), wie Sulindac und Indomethacin, die ursprünglich zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen angewendet wurden. Ihre Wirkung ist auf die Fähigkeit, die enzymatische Aktivität von Cyclooxygenasen (COX) zu inhibie-

ren, zurückzuführen. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass NSAIDs einen abwehrenden Effekt gegen Darmtumore und Herz-Kreislauf-Erkrankungen besitzen (Reddy *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1995; Mukamal *et al.*, 1999; Garcia-Rodriguez *et al.*, 2000). Sulindac und seine Metaboliten beeinflussen jedoch nicht nur den COX-Signalweg, sondern auch den Tumor-relevanten Wnt-Signalweg und andere wichtige Signalkaskaden (Goluboff, 2001; He *et al.*, 1999).

So hemmt Sulindacsulfon, der oxidierte Metabolit von Sulindac, welcher keine COX-Inhibierung aufweist, als Inhibitor von Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie Tie-2, VEGFR-3 („vascular endothelial growth factor receptor-3“), FGFR-1 („fibroblast growth factor receptor-1“) und dem IGF-(„insulin-like growth factor“-1)-Rezeptor, die Angiogenese (Jones *et al.*, 1999). Denn diese ist von der Bindung von Ang-2 an die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 abhängig, die zur Destabilisierung der Gefäßintegrität führt und dadurch in Gegenwart von VEGF die Aussprossung neuer Gefäße ermöglicht. Ein gänzlich Aushungern und Absterben des Tumors wurde durch den Einsatz solcher Inhibitoren allerdings bisher nicht erreicht. Dies könnte womöglich in der Zukunft durch den gleichzeitigen Angriff verschiedener Faktoren, zum Beispiel von Angiogenese-relevanten Rezeptor-Tyrosinkinasen und PPAR β erreicht werden. Denn infolge seiner Ligandenbindungstasche, sowie der für die PPARs typischen Promiskuität bezüglich der Ligandenbindung, würde sich PPAR β sehr gut als therapeutisches Ziel von entsprechenden, pharmakologischen Inhibitoren eignen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die weitere Analyse der Regulationsmechanismen, Bindungspartner, Liganden und die Identifizierung weiterer Zielgene von PPAR β ein spannendes, vielfältiges Forschungsgebiet darstellt, das auf bedeutende medizinische Fortschritte in den kommenden Jahren hoffen lässt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adams, R. H, Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U., Klein, R. (2001). The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell* **104**: 57 - 69

Alberts B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1995). Molekularbiologie der Zelle (3. Auflage), *VCH Verlagsgesellschaft mbH*, Viernheim

Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., et al. (2003). Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* **197**: 221 - 232

Aranda, A., Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* **81**(3): 1269 - 1295

Aubert, J., Saint-Marc, P., Belmonte, N., Dani, C., Negrel, R., Ailhaud, G. (2000). Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **160** (1): 149 - 156

Bachelder, R. E., Wendt, M. A., Mercurio, A. M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res.* **62**: 7203 - 7206

Baek, S. J., Kim, J.-S., Moore, S. M. Lee, S.-H., Martinez, J., M., Eling, T. E. (2004). COX inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR1 and results in the up-regulation of an anti-tumorigenic protein, NAG-1. *Mol. Pharm.* (doi: 10.1124/mol.104.005108)

Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin. Cancer Biol.* **14** (3): 171 - 179

Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E. S., Nelson, M. C., Olefsky, J. M., Boland, R., Evans, R. M. (2002). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placenta, adiposity, and colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 303–308

Barbero, S. Bonavia, R., Bajetto, A., Porcile, C., Pirani, P., Ravetti, J. L., Zona, G. L., Spaziante, R., Florio, T., Schettini, G. (2003). Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res.* **63**: 1969 - 1974

Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergne, B., Honegger, P., Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor b regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *JBC* **274** (50): 35881 - 35888

Beato, M., Herrlich, P. und Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**: 851 - 857

Berger, J., Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* **53**: 409 - 435

- Biesiada, E., Razandi, M., Levin, E. R. (1996).** Egr-1 activated basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *JBC* **271**: 18576 - 18581
- Bissell, M. J., Radisky, D. (2001).** Putting tumors in context. *Nature Reviews Cancer* **1**: 46 - 54
- Blaine, S. A., Wick, M., Dessev, C., Nemenoff, R. A. (2001).** Induction of cPLA2 in lung epithelial cells and non-small cell lung cancer is mediated by Sp1 and c-Jun. *JBC* **276**: 42737 - 42743
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J.-C., Staels, B., Glineur, C. (2003).** Peroxisome Proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *JBC* **277** (40): 37254 - 37259
- Blaine, S. A., Meyer, A. M., Hurteau, G., Wick, M., Hankin, J. A., Murphy, R. C. et al. (2005).** Targeted over-expression of mPGES-1 and elevated PGE2 production is not sufficient for lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* **26** (1): 209 - 217
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J.-C., Staels, B., Glineur, C. (2002).** Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *JBC* **277** (40): 37254 - 37259
- Bren-Mattison Y., Zhang, Z., Yao, R., Jia, D. (2005).** Prevention of lung cancer progression by bexarotene in mouse models. *Oncogene* **24** (8): 1412 – 1422
- Brogi, E., Schatteman, G., Wu, T. (1996).** Hypoxia-induced paracrine regulation of VEGF receptor expression. *J. Clin. Invest.* **97**: 469 - 476
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., et al. (1997).** Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**: 753 – 758
- Burger, M., Glodek, A., Hartmann, T., Schmitt-Graff, A., Silberstein, L. E., Fujii, N., Kipps, T. J., Burger, J. A. (2003).** Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* **22**: 8093 - 8101
- Calogero, A., Lombardi, V., De Gregorio, G., Porcellini, A., Ucci, S., Arcella, A., Caruso, R., Gagliardi, F. M., Gulino, A., Lanzetta, G., Frati, L., Mercola, D., Ragona, G. (2003).** Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int.* **4** (1): 1 - 12
- Cameliet, P., Jain, R. K. (2000).** Angiogenesis in cancer and other disease. *Nature* **407**: 249 - 257
- Cardones, A. R., Murakami, T., Hwang, S. T. (2003).** CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin. *Cancer Res.* **63**: 6751 - 6757
- Chang, F., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Lee, J. T., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R., McCubrey, J. A. (2003).** Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (review). *Int. J. Oncol.* **22**: 469 - 480

- Chapman, M. J. (2003).** Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* **171** (1): 1 - 13
- Chen, J., Lin, J., Levine, A. J. (1995).** Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol. Med.* **1**: 142 - 152
- Chen, J. D., Evans, R. M. (1995).** A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**: 454 – 457
- Chen, H., Lin, R. J., Schlitz, R. L. Chakravarti, D., Nash, A. (1997).** Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**: 569 - 580
- Chen, N. G., Sarabia, S. F., Malloy, P. J., Zhao, X. Y., Feldmann, D., Reaven, G. M. (1999).** PPAR γ agonists enhance vascular endothelial adhesiveness by increasing ICAM-1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 718 - 722
- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J., Roussel, M.F. (1998).** Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27^{Kip1} regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1091–1096.
- Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Pineda Torra, I., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.-C., Chapman, J., Najib, J., Staels, B. (1998).** Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *JBC* **273** (40): 25573 – 25580
- Chong, H, Guan, K.-L. (2003).** Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. *JBC* **278** (38): 36269 - 36276
- Coleman, M. L., Marshall, C. J., Olson, M. F. (2003).** Ras promotes p21Waf1/Cip1 protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *EMBO J.* **22**: 2036 - 2046
- Conneely, O. M., O'Malley, B. W. (1994).** Orphan receptors: structure and function relationships. *Mol. Biol. Intelligence Unit: Mechanism of steroid hormone regulation of gene transcription.* Sai, M.-J., O'Malley, B. W. (Austin, Texas: R. G. Lands Company): 111 - 133
- Cui, Y., Miyoshi, K., Claudio, E., Siebenlist, U. K., Gonzalez, F. J., Flaws, J., Wagner, K. U., Hennighausen, L. (2002).** Loss of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *JBC* **277** (20): 17830 – 17835
- Cutler, N. S., Graves-Deal, R., LaFleur, B. J., Gao, Z., Boman, B. M., Whitehead, R. H., Terry, E., Morrow, J. D., Coffey, R. J. (2003).** Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Res.* **63**: 1748 - 1751
- Dannenberg, A. J., Subbaramaiah, K. (2003).** Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell* **4**: 431 - 436
- Demetrick, D. J., Matsumoto, S., Hannon, G. J., Okamoto, K., Xiong, Y., Zhang, H., et al. (1995).** Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogen. Cell Genet.* **69**: 190 - 192

- Desvergne, B., Wahli, W. (1999).** Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Reviews* **20** (5): 649 - 688
- Devine, S. M, Flomenberg, N., Vesole, D. H., Liesveld, J., Weisdorf, D., Badel, K., Calandra, G., DiPersio, J, F. (2004).** Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and nonHodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **22**: 1095 - 1102
- Devir, A., Conaway, J. W., Conaway, R. C. (2001).** Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Cur. Opin. Genet. Dev.* **11**: 209 - 214
- Di Poi, N., Tan, N.S., Michalik, L., Wahli, W. and Desvergne, B. (2002).** Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol. Cell* **10**, 721–733
- Dolphin, A. C. (2003).** G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **55**: 607 – 622
- Dusting, G. J., Moncada, S., Vane, J. R. (1979).** Prostaglandins, their intermediates and precursors: cardiovascular actions and regulatory roles in normal and abnormal circulatory systems. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **21** (6): 405 - 430
- Elstner, E., Müller, C., Koshizuka, K., Williamson, E. A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J. W., Heber, D., Koeffler, H. P. (1998).** Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXH mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8806 - 8811
- Elstner, E., Williamson, E. A., Zang, C., et al. (2002).** Novel therapeutic approach: ligands for PPAR γ and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **74**: 155 - 165
- Enmark, E., Gustafsson, J.-A. (1996).** Orphan nuclear receptors – the first eight years. *Mol. Endocrinol.* **10**: 1293 - 1307
- Escher, P., Wahli, W. (2000):** Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation Research* **448**: 121 – 138
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M. (2000).** Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* **60**: 4366 - 4371
- Fahmy, R. G., Dass, C. R., Sun, L.-Q., Chesterman, C. N., Khachigian, L. M. (2003).** Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nature Medicine* **9**: 1026 - 1032
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.-M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M. et al. (1997).** The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *JBC* **272** (30): 18779 - 18789
- Fauti, T., Müller-Brüsselbach, S., Kreutzer, M., Rieck, M., Meissner, W., Rapp, U., Schweer, H., Kömhoff, M., Müller, R. (2006).** Induction of PPAR β and prostacyclin (PGI $_2$) synthesis by Raf signaling: failure of PGI $_2$ to activate PPAR β . *FEBS letters* **273**: 170 - 179

- Ferraro, B., Bepler, G., Sharma, S., Cantor, A., Haura, E. B. (2005).** EGR1 predicts PTEN and survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J. of Clin. Oncol.* **23** (9): 1921 - 1926
- Ferré, P. (2004).** The biology of peroxisome proliferator-activated receptors. *Diabetes* **53**: 43 - 50
- Folkman, J. (2003).** Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* **3**: 643 - 651
- Folkman, J. (1995).** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* **1**: 27 - 32
- Folkman, J., Haudenschild, C. (1980):** Angiogenesis in vitro. *Nature* **288** (5791): 551 - 556
- Folkman, J., Klagsbrun, M. (1987).** Angiogenic factors. *Science* **235** (4787): 442 - 447
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., Evans, R. M. (1995).** 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPARgamma. *Cell* **83**: 803 - 812
- Forman, B. M., Chen, J., Evans, R. M. (1997).** Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4312 - 4317
- Fukumoto, K., Yano, Y., Virgona, N., Hagiwara, H., Sato, H., Senba, H., Suzuki, K., Asano, R., Yamada, K., Yano, T. (2005).** Peroxisome proliferator-activated receptor δ as a molecular target to regulate lung cancer cell growth. *FEBS Letters* **579** (17): 3829 - 3836
- Furuyama, T., Kitayama, K., Yamashita, H., Mori, N. (2003).** Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem. J.* **375** (2): 365 - 371
- Fyffe, S. A., Alphey, M. S., Buetow, L., Smith, T. K., Ferguson, M. A., Sorensen, M. D., Bjorkling, F., Hunter, W. N. (2006).** Reevaluation of the PPAR-beta/delta ligand binding domain model reveals why it exhibits the activated form. *Mol. Cell* **21** (1): 1 - 2
- Gale, N. W., Baluk, P., Pan, L., Kwan, M., Holash, J., DeChiara, T. M., McDonald, D. M., Yancopoulos, G. D. (2001).** Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Developm. Biol.* **230**: 151 - 160
- Garcia-Rodriguez, L., Varas, C., Patrono, C (2000).** Differential effects of aspirin and non-aspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs in the primary prevention of myocardial infarction in post-menopausal women. *Epidemiology* **11**: 382 - 387
- Gardner, L. B., Li, Q., Park, M. S., Flanagan, W. M., Semenza, G. L., Dang, C. V. (2001).** Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *JBC* **276** (11): 7919 - 7926

- Gelman, L., Fruchart, J.-C., Auwerx, J. (1999).** An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell. & Mol. Life Sciences* **55**: 932 - 943
- Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W. (2005).** Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **17**: 216 - 222
- Gervois, P., Porra, I. P., Chinetti, Grötzinger, T., Dubois, G., Fruchart, J.-C., Fruchart-Najib, J., Leitersdorf, E., Staels, B. (1999).** A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor α splice variant with dominant negative activity. *Mol. Endocrinol.* **13**: 1535 - 1549
- Giguère, V. (1999).** Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Reviews* **20**: 689 - 725
- Glinghammar, B., Skogsberg, J., Hamsten, A., Ehrenborg, E. (2003).** PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308** (2): 361 - 368
- Goldberg, Y. P., Parker, M. I., Gevers, W. (1991).** The Philadelphia chromosome in human macrophages. *Blood* **49**: 367 - 370
- Goluboff, E. T. (2001).** Exisulind, a selective apoptotic antineoplastic drug. *Expert Opin. Invest. Drugs* **10**: 1875 - 1882
- Gourzoulidou, E., Carpintero, M., Baumhof, P., Giannis, A., Waldmann, H. (2005).** Inhibition of angiogenesis-relevant receptor tyrosine kinases by sulindac analogues. *ChemBioChem* **6**: 1 - 5
- Gupta, R. A., Tan, J., Krause, W. F., Geraci, M. W., Willson, T. M., Dey, S. K., DuBois, R. N. (2000).** Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 13275 - 13280
- Gupta, R. A., DuBois, R. N. (2001).** Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 11 - 21
- Gupta, R. A., Wang, D., Katkuri, S., Wang, H., Dey, S. K., DuBois, R. N. (2004).** Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat. Med.* **10**: 245 - 247
- Han, S., Sidell, N., Fisher, P. B., Roman, J. (2004).** Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ in human lung carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **10**: 1911 - 1919
- Hansen, J. B., Zhang, H., Rasmussen, T. H., Petersen, R. K., Flindt, E. N. and Kristiansen, K. (2001).** Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *JBC* **276**: 3175-3182
- Han, J. A., Kim, J.-I., Ongusaha, P. P., Hwang, D. H., Ballou, L. R., Mahale, A., Aaronson, S. A., Lee, S. W. (2002).** p53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. *EMBO J.* **21**: 5635 - 5644

- Han, S., Ritzenthaler, J. D., Wingerd, B., Roman, J. (2005).** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) increases the expression of prostaglandin E2 receptor subtype EP4. The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and CCAAT/enhancer-binding protein beta. *JBC* **280** (39): 33240 - 33249
- Hao, C. M., Redha, R., Morrow, J., Breyer, M. D. (2002).** Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation promotes cell survival following hypertonic stress. *JBC* **277**: 21341 - 21345
- Harbour, J. W., Dean, D. C. (2000).** The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14** (19): 2393 - 2409
- Harmon, M. A., Boehm, M. F., Heymann, R. A., Mangelsdorf, D. J. (1995).** Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6157 - 6160
- Hatae, T., Wada, M., Yokoyama, C., Shimonishi, M. & Tanabe, T. (2001).** Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *JBC* **276**: 46260 - 46267.
- Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H. M., Mueller, E., Spiegelmann, B. M. (2000).** Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ is linked to ligand-dependent activation. *JBC* **275** (24): 18527 - 18533
- He, T. C. , Chan, T. A. , Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1999).** PPAR δ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**, 335-345
- Heasley, L. E., Thaler, S., Nicks, M., Price, B., Skorecki, K., Nemenoff, R. A. (1997).** Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. *JBC* **272**: 14501 - 14504
- Helbig, G., Christopherson, K. W., Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K. D., Broxmeyer, H. E., Nakshatri, H. (2003).** NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *JBC* **278**: 21631 - 21638
- Hellemans, K., Michalik, L., Dittie, A., Knorr, A., Rombouts, K., De Jong, J., Heirman, C., Quartier, E., Schuit, F., Wahli, W. and Geerts, A. (2003).** Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **124**: 184–201
- Hihi, A. K., Michalik, L., Wahli, W. (2002).** PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 790 - 798
- Hirotsu, M., Tsukamoto, T. Bourdeaux, J., Sadano, H., Osumi, T. (2001).** Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor α by the ligand. *Biochem & Biophys. Res. Comm.* **288**: 106 - 110
- Holstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., Harris, C. C. (1994).** Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3551 – 3555
- Hörlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. (1995).** Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**: 397 - 404

- Hui, R., MacMillan, D., Kenny, F. S., Musgrove, E. A., Blamey, R. W., Nicholson, R. I., Robertson, J. F. R., Sutherland, R. L. (2000). INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: Overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Mol. Onc.* **6**: 2777 - 2787
- Ihrie, R. A., Reczek, E., Horner, J. S., Khachatryan, L., Sage, J., Jacks, T., Attardi, L. D. (2003). Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types. *Curr. Biol.* **13**: 1985 - 1990
- Inoue, H., Tanabe, T., Umesono, K. (2000). Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR γ . *JBC* **275** (36): 28028 - 28032
- Isseman, I., Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**: 645 - 650
- Jaeckel, E. C., Raja, S., Tan, J., Das, S. K., Dey, S. K., Girod, D. A., Tsue, T. T., Sanford, T. R. (2001). Correlation of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and peroxisome proliferator-activated receptor α with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **127**: 1253 - 1259
- Jaenisch R. und Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**: 245 – 254
- Jaffe, E. , *et al.* (1986). Biology of endothelial cells. *Martinus Nijhoff Publishers*, Boston
- Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K., Sladek, F. M. (1995). Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5131 - 5143
- Jones, M. K., Wang, H., Peskar, B. M., Lewin, E., Itani, R. M., Sarfeh, I. J., Tarnawski, A. S. (1999). Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature Med.* **5**: 1418 - 1423
- Josko, J., Boleslaw, G., Jedrzejowsk-Szypulka, H., Hendryk, S. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med. Sci. Monit.* **6**: 1047 – 1052
- Juge-Aubry, C. E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W. W., Burger, A. G., Meier, C. A. (1999). Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor α by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *JBC* **274**: 10505 - 10510
- Khan, S.A., Vanden Heuvel, J. P. (2003). Regulation of gene expression by dietary fatty acids: Role of fatty acid activated nuclear receptors. *J. Nutr. Biochem.* **14**: 554 - 567
- Kandioler-Eckersberger, D., Ludwig, C., Rudas, M., Kappel, S., Janschek, E., Wenzel, C., Schlagbauer-Wadl, H., Mittlbock, M., Gnant, M., Steger, G., Jakesz, R.

(2000). TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **6** (1): 50 -56

Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27/Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**: 487 - 496

Kerkhoff, E. und Rapp, U. (1998). Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* **17**: 1457 - 1462

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer Research* **26**, 239 - 257

Kijima, T., Maulik, G. Ma, P. C., Tibaldi, E. V., Turner, R. E., Rollins, B., Sattler, M., Johnson, B. E., Salgia, R. (2002). Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **62**: 6304 - 6311

Kim, S. J., Jeang, K. T., Glick, A. B., Sporn, M. B., Roberts, A. B. (1989). Promoter sequences of the human transforming growth factor- β 1 gene responsive to transforming growth factor- β 1 autoinduction. *JBC* **264**: 7041 - 7045

Kim, D. J., Akiyama, T. E., Harman, F. S., Burns, A. M., Shan, W., Ward, J. M., Kennett, M. J., Gonzalez, F. J., Peters, J. M. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor β (δ)-dependent regulation of ubiquitin c expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *JBC* **279**: 23719 - 23727

Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., Lehmann, J. M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (**94**): 4318 – 4323

Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C., Lehmann, J. M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**: 813 – 819

Knoblauch, R., Garabedian, M. J. (1999). Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **19** (5): 3748 - 3759

Knowles, M. A. und Selby, P. J. (2005). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer (4. Auflage). *Oxford University Press*, New York

Komar, C. M. (2005). Peroxisome proiferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**: 41 - 54

Koshiba, T., Hosotani, R., Miyamoto, Y., Ida, J., Tsuji, S., Nakajima, S., et al. (2000). Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **6**: 3530 - 3535

Krey, G. Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G. et al. (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of

peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* **11**: 779 - 791

Krogsdam, A. M., Nielsen, C. A., Neve, S., Holst, D., Helledie, T., Thomsen, B., Bendixen, C., Mandrup, S., Kristiansen, K. (2002). Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. *Biochem. J.* **363**, 157 – 165

Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E. A., et al. (1998). Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **58**: 3344 - 3352

Kullander, K., Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signaling. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **3**: 475 - 486

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203 - 209

Lane, D. P., Lu, X., Hupp, T., Hall, P. A. (1994). The role of p53 protein in the apoptotic response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **345**: 277 - 280

Larsen, L. K., Amri, E.-Z., Mandrup, S., Pacot, C., Kristiansen, K. (2002). Genomic organization of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor β/δ gene: alternative promoter usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency. *Biochem. Journal* **366**: 767 - 775

Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* **19**: 207 – 226.

Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D., Wahli, W. (2000). Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol. Endocrinol.* **14** (12): 1962 - 1975

Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J. M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, B., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., Losson, R. (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* **14**: 2020 - 2033

Lefebvre, A.-M., Chen, I., Desreumaux, P., et al. (1998). Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat. Med.* **4**: 1053 - 1057

Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkinson, W. O., Willson, T. M., Kliewer, S. A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* **270** (22): 12953 - 12956

Lei, E. P., Krebber, H., Silver, P.A. (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev.* **15**: 1771 - 1782

Leibowitz, M. D., Fievet, C., Hennuyer, N., Peinado-Onsurbe, J., Duez, H., Bergera, J., Cullinan, C. A., Sparrow, C. P., Baffic, J., Berger, G. D. et al. (2000). Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett.* **473**, 333 – 336

Leid, M., Kastner, P., Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci.* **176**: 427 - 433

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246** (4935): 1306 - 1309

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323 - 331

Liang, Z., Wu, T., Lou, H., Yu, X., Taichmann, R. S., Lau, S. K., Nie, S., Umbreit, J., Shim, H. (2004). Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res.* **64**: 4302 - 4308

Libura, J., Drukala, J., Majka, M., Tomescu, O., Navenot, J. M., Kucia, M., Marquez, L., Peiper, S. C., Barr, F. G., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M. Z. (2002). CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* **100**: 2597 - 25606

Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* **91**: 197 - 208

Lim, H., Gupta, R. A., Ma, W., Paria, B. C., Moller, D. E., Morrow, J. D., DuBois, R. N., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. (1999). Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . *Genes and Dev.* **13**: 1561 - 1574

Lim, H. & Dey, S. K. (2002). A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology.* **143**: 3207 - 3210

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (1999). Molecular Cell Biology (4. Auflage). *W. H. Freeman & Company*, New York

Maissonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J. et al. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**: 55 - 60

Mangelsdorf, D. J., Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83** (6): 841 - 850

Margeli, A., Kouraklis, G., Theocharis, S. (2003). Peroxisome proliferators-activated receptor- γ (PPAR γ) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis* **6**: 165 - 169

- Massague, J., Blain, S., Lo, R. (2000).** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**: 295 - 309
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., O'Malley, B. w. (1999).** Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* **20**: 321 - 344
- McKenna, N. (2003).** Regulation of nuclear receptor activity by lipids. *NURSA e-Journal* **1** (1): ID#2.06192003.5 ISSN 1550-7629
- Meade, E. McIntyre, T., Zimmerman, G., Prescott, S. (1999).** Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *JBC* **274** (12): 8328 - 8334
- Medema, R. H. und Bos J. L. (1993).** The role of p21Ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Critical Reviews in Oncogenesis* **4**: 615 - 661
- Meuwissen, R., Berns, A. (2005).** Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev.* **19** (6): 643 - 664
- Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N. S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusser, J. et al (2001).** Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *Cell Biol.* **154**: 799 - 814
- Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W. (2004).** Peroxisome proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nature Reviews* **4**: 61 - 70
- Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, W. E., Givol, D. (1994).** Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* **54** (13): 3391 - 3395
- Moncada, S. (1982).** 1982 Eighth Gaddum Memorial Lecture. University of London Institute of Education, December 1980. Biological importance of prostacyclin. *Br. J. Pharmacol* **76**: 3 - 31
- Mori, S., Ito, G., Usami, N., Yoshika, H., Ueda, Y., Kodama, Y., Takahashi, M., Fong, K. M., Shimokata, K., Sekido, Y. (2004).** p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **100**: 1673 - 1682
- Mukamal, K. J., Muller, J. E., Maclure, M., Sherwood, J. B., Mittleman, M.A. (2000).** Increased risk of congestive heart failure among infarctions with nighttime onset. *Am. Heart J.* **140** (3): 138 - 442
- Muller, A., Horney, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., et al. (2001).** Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**: 50 - 56
- Müller, R. (2004).** Crosstalk of oncogenic and prostanoid signaling pathways. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **130**: 429 - 444
- Muoio, D. M., Way, J. M., Tanner, C. J., Winegar, D. A., Kliewer, S. A., Houmard, J. A., Kraus, W. E., Dohm, G. L. (2002).** Peroxisome proliferator-activated receptor- α regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* **51**: 901 - 909

- Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T. Yoshida, N., Ueno, A., Oh-ishi, S., Narumiya, S. (1997).** Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* **388**: 678 - 682
- Nagase, I., Yoshida, S., Canas, X., Irie, Y., Kimura, K., Yoshida, T., Saito, M. (1999).** Up-regulation of uncoupling protein 3 by thyroid hormone, peroxisome proliferator-activated receptor ligands and 9-*cis* retinoic acid in L6 myotubes. *FEBS letters* **461** (3): 319 - 322
- Nagase, I., Yoshida, S., Saito, M. (2001).** Up-regulation of uncoupling proteins by β -adrenergic stimulation in L6 myotubes. *FEBS letters* **494** (3): 175 - 180
- Nahlé, Z. (2004).** PPAR trilogy from metabolism to cancer. *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care* **7**: 397 - 402
- Namba, T., Oida, H., Sugimoto, Y., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1994).** cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signalling pathways and expression in thymic medulla. *JBC* **269**: 9986 - 9992
- Nevins, J. R. (1992).** E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424 - 429
- Nijsten, T., Geluyckens, E., Colpaert, C., Lambert, J. (2005).** Peroxisome proliferator-activated receptors in squamous cell carcinoma and its precursors. *J. of Cutaneous Pathol.* **32** (5): 340 - 345
- Oliver, Jr, W. R., Shenk, J. L., Snaith, M. R., Russell, C. S., Plunket, K. D., Bodkin, N. L., Lewis, M. C., Winegar, D. A., Sznaidman, M. L., Lambert, M. H. et al. (2001).** A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 5306-5311
- Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. (1995).** Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**: 1354 - 1357
- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M., Ikawa, S. (1998).** Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat. Med.* **4**: 839 - 843
- Pai, R., Sorgehan, B. Szabo, I. L., Pavelka, M., Baatar, D., Tarnawski, A. S. (2002).** Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat. Med.* **8**: 289 - 293
- Palmer, C. N. A., Hsu, M.-H., Griffin, K. J., Raucy, J. L., Johnson, E. F. (1998).** Peroxisome proliferator-activated receptor- α expression in human liver. *Mol. Pharmacol.* **53**: 14 - 22
- Park, B. H., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (2001).** Genetic disruption of PPAR δ decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2598 - 25603
- Paul, S. und Lombroso, P. J. (2003).** Receptor and nonreceptor protein tyrosine phosphatases in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 2465 - 2482

- Peters J. M., Lee, S. T., Li, W., Ward, J. M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M. L., Hudson, L. D., Gonzalez, F. J. (2000).** Growth, Adipose, Brain, and Skin Alterations Resulting from Targeted Disruption of the Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β (\square). *Mol. and Cell. Biol.* **20** (14): 5119 – 5128
- Pignatelli, M., Cocca, C., Santos, A., Perez-Castillo, A. (2003).** Enhancement of BRCA1 gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor γ in the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncogene* **22**: 5446 - 5450
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J. Massague, J., Roberts, J. M. et al. (1994).** P27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**: 9 - 22
- Rao, C. V., Rivenson, A., Simi, B., Zang, E., Kelloff, G., Steele, V., Reddy, B. S. (1995).** Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res.* **55**: 1464 - 1472
- Ravitz, M. J., Wenner, C. E. (1997).** Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv. Cancer Res.* **71**: 165 – 207
- Reddy, B. S., Rao, C. V., Seibert, K. (1996).** Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **56**: 4566 - 4569
- Reddy, J. K., Hashimoto, T. (2001).** Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α : an adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* **21**: 193 - 203
- Reese, J., Brown, N., Paria, B. C., Morrow, J., Dey, S. K. (1999).** COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. *Mol. Cell Endocrinol.* **150**: 23 - 31
- Reginato, M. J., Krakow, S. L., Bailey, S. T., Lazar, M. A. (1998).** Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *JBC* **273**: 1855 - 1858
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., Massague, J. (1995).** Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* **9**: 1831 – 1845
- Rosenbaum, C., Baumhof, P., Mazitschek, R., Müller, O., Giannis, A., Waldmann, H. (2004).** Synthesis and Biological Evaluation of an Indomethacin Library Reveals a New Class of Angiogenesis-Related Kinase Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**: 224 - 228
- Rossi, D. J., Ylikorkala, A., Korsisaari, N., Salovaara, R., Luukko, K., Launonen, V., et al. (2002).** Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (19): 12327 - 12332
- Roth, J., Dobbelstein, M. (1999).** Failure of viral oncoproteins to target the p53-homologue p51A. *J. Gen. Virol.* **80**: 3251 - 3255
- Rubin, J. B., Kung, A. L., Klein, R. S., Chan, J. A., Sun, Y., Schmidt, K., Kieran, M. W., Luster, A. D., Segal, R. A. (2003).** A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 13513 - 13518

- Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M. C., et al. (1998).** Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat. Med.* **4**: 1058 - 1061
- Sakamoto, A., Yokoyama, Y., Umemoto, M., Futagami, M., Sakamoto, T., Bing, X., Mizunuma, H. (2004).** Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor γ in epithelial ovarian tumors. *British J. Cancer* **91**: 633 - 638
- Saluja, I., Granneman, J. G., Skoff, R. P. (2001).** PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* **33**, 191–204
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M. (2005).** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR complex. *Science* **307**: 1098 - 1101
- Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., et al. (1998).** Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat. Med.* **4**: 1046 - 1052
- Sato, N., Matsubayashi, H., Fukushima, N., Goggins, M. (2005).** The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. *Cancer Biol. & Therapy* **4** (1): 70 - 76
- Saur, D., Seidler, B., Schneider, G., Algul, H., Beck, R., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Schmid, R. M. (2005).** CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* **129** (4): 1237 - 1250
- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Sacconi, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Sacconi, S., Nebuloni, M., Vago, L., Mantovani, A., Melillo, G., Sica, A. (2003).** Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J. Exp. Med.* **198**: 1391 - 1402
- Schmitz, M. L., Bacher, S., Dienz, O. (2003).** NF-kappaB activation pathways induced by T cell costimulation. *FASEB J.* **17**: 2187 - 2193
- Schwarte-Waldhoff, I., Volpert, O., Bouck, N., Sipos, B., Hahn, S., Klein-Scory, S., Luttgies, J., Kloppel, G., Graeven, U., Eilert-Micus, C., Hintelmann, A., Schmiegel, W. (2000).** Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 9624 – 9629
- Schweer, H., Watzer, B., Seyberth, H. W. (1994).** Determination of seven prostanoids in 1 ml of urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization triple stage quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **652**: 221 - 227
- Schwiebert, E. M. und Zsembery, A. (2003).** Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **1615**: 7 – 32
- Scotton, C. J., Wilson, J. L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G. D., Fricker, S., Bridger, G., Balkwill, F. R. (2002).** Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res.* **62**: 5930 - 5938
- Seno, H., Oshima, M., Ishikawa, T. O., Oshima, H., Takaku, K., Chiba, T., Narumiya, S., Taketo, M. M. (2002).** Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* **62**: 506 - 511

- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., Lowe, S. W. (1997).** Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593 - 602
- Seyffert, W., Gassen, H. G., Hess, O., Jäckle, H., Fischbach, K.-F. (1998).** Lehrbuch der Genetik (1. Auflage). *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart
- Shalev, A., Siegrist-Kaiseer, C. A., Yen, P. M., Wahli, W., Burger, A. G., Chin, W. W., Meier, C. A. (1996).** The peroxisome proliferator-activated receptor α is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinol.* **137**: 4499 - 4502
- Shao, D. und Lazar, M. A. (1999).** Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.* **103**: 1617 - 1618
- Shao, J., Sheng, H., Aramandla, R., Pereira, M. A., Lubet, R. A., Hawk, E. et al. (1999).** Coordinate regulation of cyclooxygenase-2 and TGF- β 1 in replication error-positive colon cancer and azoxymethane-induced rat colonic tumors. *Carcinogenesis* **20** (2): 185 - 191
- Shao, J., Sheng, H., DuBois, R. N. (2002).** Peroxisome proliferator-activated receptors modulate K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. *Cancer Res.* **62**: 3282 - 3288
- Shearer, B. G., Hoekstra, W. J. (2002).** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Choreographie of metabolic gene transcription. *Celltransmissions* **18** (3): 3 – 9
- Shi, Y., Hon, M. and Evans, R. M. (2002).** The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2613–2618
- Shibuya, A., Wada, K., Nakajima, A., Saeki, M., Katayama, K., Mayumi, T., Kadowaki, T., Niwa, T., Kamiski, Y. (2002).** Nitration of PPAR γ inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line RAW 264. *FEBS letters* **525**: 43 - 47
- Shikama, N., Lyon, J., La Thangue, N. B. (1998).** The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell. Biol.* **7**: 230 - 236
- Shirakawa, Y., Naomoto, Y., Kimura, M., Kawashima, R., Yamatsuji, T., Tamaki, T., Hamada, M., Haisa, M., Tamaka, N. (2000).** Topological analysis of p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin. Cancer Res.* **6**: 541 - 550
- Sieweke, M. H., Bissell, M. J. (1994).** The tumor-promoting effect of wounding: a possible role for TGF- β -induced stromal alterations. *Crit. Rev. Oncog.* **5**: 297 - 311
- Smith, W. L. (1992).** Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol.* **263**: F181 – F191
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., Garavito, R. M. (2000).** Cyclooxygenases: structural cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 145 - 182
- Smyth, E. M., FitzGerald, G. A. (2002).** Human prostacyclin receptor. *Vitam. Horm.* **65**: 149 – 165

- Smyth, E. M., Austin, S. C., Keilly, M. P., FithGerald, G. A. (2000).** Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *JBC* **275**: 32037 - 32045
- Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., Taketo, M. M. (2001).** Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat. Med.* **7**: 1048 - 1051
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N., Onate, S. A., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. (1997).** Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**: 194 - 198
- Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E. J., Krek, W. (2003).** Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumor suppressor pVHL. *Nature* **425**: 307 - 311
- Strohmaier, H., Spruck, C. H., Kaiser, P., Won, K. A., Sangfelt, O. und Reed, S. I. (2001).** Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* **413**: 316 - 322
- Stryer, L. (1996).** Biochemie (4. Auflage). *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg
- Subbaramaiah, K., Liu, D. T., Hart, J. C., Dannenberg, A. J. (2001).** Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. *JBC* **276** (15): 12440 - 12448
- Sugden, M. C., Holness, M. J. (2002).** Therapeutic potential of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases in the prevention of hyperglycaemia. *Curr. Drug Targets* **2** (2): 151 - 165
- Sumanasekera, W. K., Tien, E. S., Davis, J., Turpey, R., Perdew, G. H., Vanden Heuvel, J. P. (2003).** Heat shock protein-90 (Hsp90) acts as a repressor of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) activity: evidence for differential effect of Hsp90 on PPAR α relative to PPAR β and PPAR γ . *Biochem.* **42**: 10726 - 10735
- Sutherland, R. L., Hamilton, J. A., Sweeney, K. J., Watts, C. K. und Musgrove, E. A. (1995).** Expression and regulation of cyclin genes in breast cancer. *Acta Oncol.* **34**: 651 - 656
- Tachibana, K., Kobayashi, Y., Tanaka, T., Tagami, M., Sugiyama, A., Katayama, T., Ueda, C., Yamasaki, D., et al. (2005).** Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms. *Nuclear Receptor* **3**: doi: 10.1186/1478-1336-3-3
- Tamamura, H., Hori, A., Kanzaki, N., Hiramatsu, K., Mizumoto, M., Nakashima, H., Yamamoto, N., Otaka, A., Fujii, N. (2003).** T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett.* **550**: 79 - 83
- Tan, N. S., Michalik, L., Noy, N., Yasmin, R., Pacot, C., Heim, M., Fluhmann, B., Desvergne, B., Wahli, W. (2001).** Critical roles of PPARbeta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev.* **15**, 3263 - 3277

- Tan, N. S., Michalik, L., Di-poi, N., Desvergne, B., Wahli, W. (2004).** Critical roles of the nuclear receptor PPAR β (peroxisome proliferator-activated receptor β) in skin wound healing. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 97 - 102
- Thornton, S. C., Mueller, S. N., Levine, E. M. (1983).** Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* **222** (4624): 623 – 625
- Tien, E. S., Davis, J. W., Vanden Heuvel, J. P. (2004).** Identification of the CREB-binding protein/p300-interacting protein CITED2 as a peroxisome proliferator-activated receptor α coregulator. *JBC* **279** (23): 24053 - 24063
- Tong, B. J., Tan, J., Tajeda, L., Das, S. K., Chapman, J. A., DuBois, R. N., Dey, S. K. (2000).** Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- δ in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia* **6**: 483 - 490
- Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B. M. et al. (1997).** Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 237 - 241
- Tsujie, M., Yamamoto, H., Tomita, N., Sugita, Y., Ohue, M., Sakita, I., Tamaki, Y., Sekimoto, M., Doki, Y., Inoie, M., Matsuura, N., Monden, T., Shiozaki, H., Monden, M (2000).** Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology* **58** (2): 126 - 136
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., Bos, J. L. (1988).** Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* **319** (9): 525 – 532
- Wafik, S., El-Deiry, M. D. (2004).** HIF-1 blockade inhibits gastric cancer growth in mice. *Cancer Biology* **3**, online ISSN: 1555-8576
- Wahli, W. (2002).** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med. WKLY Review* **132**: 83 - 91
- Wakino, S., Collins, A. R., Kintscher, U., Kim, S., Noh, G., Moller, D. E., Hsueh, W. A., Law, R. E. (2001):** PPARgamma Ligands Inhibit Angiotensin II-Induced Egr-1 Expression In Vivo and In Vitro. *Circulation* **104** (“abstract supplement”)
- Waldmann, T., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1995).** P21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**: 1169 - 1174
- Wang, H. U., Chen, Z. F., Anderson, D. J. (1998).** Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93** (5): 741 - 753
- Wang, Y. X., Lee, C. H., Tjep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., Evans, R. M. (2003).** Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113**, 159–170
- Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Wahli, W., Desvergne, B., Das, S. K., Dey, S. K., DuBois, R. N. (2004).** Prostaglandin E₂ promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor δ . *Cancer Cell* **6**: 285 - 295

- Wang, Y.-X., Zhang, C.-L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., Ham, J., Kang, H., Evans, R. M. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biology* 2: 10 (online version)
- Watanabe, K., Fujii, H., Takahashi, T., Kodama, M., Aizawa, Y., Ohta, Y., Ono, T., Hasegawa, G., Naito, M., Nakajima, T., Kamijo, Y., Gonzalez, F. J., Aoyama, T. (2000). Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *JBC* 275 (29): 22293 – 22299
- Way, J. M., Harrington, W. W., Brown, K. K., Gottschalk, W. K. Sundseth, S. S., Mansfield, T. A., Ramachandran, R. K., *et al.* (2001). Comprehensive mRNA profiling reveals that PPAR γ activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinol.* 142: 1269 - 1277
- Willert, K., Nusse, R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signalling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 95 - 102
- Williams, C. S., Tsujii, M., Reese, J., Dey, S. K., DuBois, R. N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 18: 7908 - 7916
- Wise, H. (2003). Multiple signalling options for prostacyclin. *Acta Pharmacol. Sin.* 24 (7): 625 - 630
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., *et al.* (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targetet by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281 – 1284
- Wollheim, F. A. (1999). New functions for Cox-2 in health and disease. *Arthritis Res.* 1: 45 - 49
- Worm, J., Christensen, C., Gronbaek, K., Tulchinsky, E., Guldberg, P. (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* 23 (30): 5215 - 5226
- Xin, X., Yang, S., Kowalski, J., Gerritsen, M. E. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands are potent inhibitors of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *JBC* 274 (13): 9116 - 9121
- Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J., Sternbach, D. D., Lehmann, J. M., Wisely, G. B. and Willson, T. M. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* 3: 397 - 403
- Yamakawa, K., Hosoi, M., Koyama, H., Tanaka, S., Fukumoto, S., Morii, H., Nishizawa, Y. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 271: 571 - 574
- Yang, X. J., Ogryzko, W., Nishikawa, J., Howard, B. H., Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382: 319 - 324

- Yasmin, R., Yeung, K. T., Chung, R. H., Gaczynska, M. E., Osmulski, P. A., Noy, N. (2004).** DNA-looping by RXR tetramers permits transcriptional regulation "at a distance". *J. Mol. Biol.* **343**: 327 - 338
- Yasmin, R., Williams, R. M., Xu, M., Noy, N. (2005).** Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor, and their mutual heterodimer. *JBC*, (published online ahead of print) 10.1074/jbcM507708200
- Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Lazar, M. A. (1997).** Cloning and characterization of a novel component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14400 - 14405
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., et al. (1994).** An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* **372**: 635 - 641
- Zhang, X. K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M. I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P., Pfahl, M. (1992).** Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-*cis* retinoic acid. *Nature* **358**: 587 - 591
- Zhang, B., Berger, J., Zhou, G., Elbrecht, A., Biswas, S., White-Carrington, S., Szalkowski, D., Moller, D. E. (1996).** Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *JBC* **271**: 31771 - 31774
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J. R., Chen, X.-N., Noya, D., Rao M. S., Reddy, J. K. (1995).** Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor- γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 7921 - 7925

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
6-k-PGF _{1α} :	6-keto-Prostaglandin F _{1α}
AA	Arachidonsäure
ABCA1	„ATP-binding cassette transporter“
Amp	Antibiotikum Ampicillin
ARF	Synonym für den Tumorsuppressor p14 („alternative reading frame“)
ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin)
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Zyclin-abhängige Kinasen
CL-100/ MKP-1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Phosphatase 1
cPGI	Carbaprostazyklin
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
COUP	„chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor“
Cox	Cyclooxygenase
CRE	„cAMP response element“
DBD	DNA-Bindedomäne
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulphoxid
Dox	Doxyzyklin
DR	„direct repeats“
E2F	Transkriptionsfaktor
EDTA	Ethylenediamintetra-Essigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	„estrogen receptor“
ERK	„extracellular-signal related kinase“
FGF	„fibroblast growth factor“
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GF	Wachstumsfaktor
GTP	Guanosintriphosphat
FAAR	„fatty acid activated receptor“, Synonym für PPAR β/δ
HDM2	Ubiquitin-Protein-Ligase „murine double minute gene 2“
HNF-4	„hepatocyte nuclear factor 4“
IGF	„insulin-like growth factor“
INF γ	Interferon γ
INK4b	Synonym für den Tumorsuppressor p16
LB	Luria-Bertani Medium
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAP	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MPF	„maturation promoting factor“
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E ₂ Synthase
N-CoR	„nuclear receptor co-repressor“
NGFI-B	„nerve growth factor receptor-induced orphan receptor“

NSCLC	„non-small lung cancer“ (nicht-kleinzelliger Lungenkrebs)
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PAK	p21-aktivierte Kinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGIS	Prostaglandin I ₂ Synthase
PKC	Proteinkinase C
PPAR	„peroxisome proliferator activated receptor“
PPRE	„peroxisome proliferator response element“
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Q-PCR	quantitative PCR (real-time PCR)
RMICs	„renal medullary interstitial cells“
RNA pol I	RNA Polymerase I
ROR	„retinoid-related orphan receptor“
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinsäurerezeptor
SCLC	„small cell lung cancer“ – kleinzelliger Lungenkrebs
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF-1	„steroidogenic factor“
SMRT	„silencing mediator for RARs and TRs“
SRC	„steroid coactivator-1 protein“
Tet	Antibiotikum Tetrazyklin
TGFβ	„transforming growth factor β“
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumornekrosisfaktor
TR	Thyroidrezeptor
TxB2	Thromboxan B2 (Produkt der Thromboxansynthese)
ün	über Nacht
VDR	Vitamin D-Rezeptor

7.2 Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Tanja Fauti, geb. Bilz
Geburtsdatum: 22.11.1976
Geburtsort: Bad Dürkheim
Familienstand: verheiratet
Anschrift: In der Badestube 35; 35039 Marburg

■ Schulausbildung

06/1983 – 07/1987 Grundschule Pestalozzi in Bad Dürkheim

08/1987 – 06/1996 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Bad Dürkheim
Abschluss: Abitur

■ Universitätsausbildung

10/1996 – 04/2000 Biologie-Grundstudium an der Justus-Liebig-Universität
Gießen

18.04.2000 Vordiplom

05/2000 – 07/2001 Biologie-Hauptstudium an der Justus-Liebig-Universität
Gießen
Schwerpunkte: Genetik, Molekularbiologie, Biochemie,
Mikrobiologie

08/2001 – 06/2002 Diplomarbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen
„Enzymologie der Caspase-aktivierten, apoptotischen
Nuklease CAD aus *Mus musculus*“

27.06.2002 Diplom-Biologin

Prüfungsfächer: Genetik, Biochemie, Zoologie und Molekularbiologie

08/2002 – 12/2005

Promotionsstudiengang Humanbiologie an der Phillips-Universität Marburg

Prüfungsfächer: Biochemie, Humangenetik, Molekularbiologie

06/2003 – 12/2005

Promotionsarbeit am Institut für Molekularbiologie & Tumorforschung der Phillips-Universität Marburg unter der Betreuung von PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach:
„Charakterisierung der Regulation und Funktion von PPAR β “

■ Wissenschaftliche Beschäftigungen

08/2002 – 05/2003

vectron therapeutics AG in Marburg

Forschungsarbeit mit dem Thema: „Entwicklung und Evaluierung von liposomal enkapsulierten Wirkstoffen zur immunologischen und zytotoxischen Therapie von Tumoren“

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Gießen waren die Damen und Herren:

Baniahmad, Beck, Eggert, Eichelberg, Gruehn, Hevert, Hipke, Jauker, Klug, Kühn, Kunze, Meiss, Pingoud, Renkawitz, Ringe, Schipp, Schulte, Seibt, Schwartz, Voland, Wolters

In Marburg:

Müller, Müller-Brüsselbach

7.4 Danksagungen

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Müller für die Überlassung dieses spannenden und abwechslungsreichen Promotionsthemas, für seinen Ideenreichtum und seine realistische Einschätzung der Auf's und Ab's im praktischen Laboralltag. Auch für die Möglichkeit, während meiner Zeit bei *vectron therapeutics AG* erste Erfahrungen in der pharmazeutischen Industrie zu sammeln und für die vertrauensvolle Übernahme ans IMT möchte ich mich besonders bedanken.

Ein großes Dankeschön dafür geht auch an Dr. Sabine Müller-Brüsselbach, die mich in den letzten Jahren stets als geduldige, engagierte und sympathisch-kompetente Betreuerin begleitet hat. Die besondere und tatkräftige Unterstützung, weit über die Belange der Doktorarbeit hinaus, werden mir immer äußerst positiv in Erinnerung bleiben! Beiden sei an dieser Stelle auch für die von mir eingeforderte, meist positive, aber auf jeden Fall stets konstruktive und hilfreiche Kritik während der letzten Jahre gedankt.

Besonderen Rückhalt hatte ich während meiner Promotion am IMT vor allem durch ‚mein Mädels-Labor‘ (Margitta, Mihaela, Sabine) und unseren ‚Quotenmann Markus‘. Gerade bei den vielen kleinen, manchmal völlig unerwarteten Schwierigkeiten des Laboralltags konnte ich mich jederzeit auf sie verlassen und durch ihre kompetente Unterstützung das eine oder andere Problem lösen.

Margitta Alt möchte ich an dieser Stelle nicht nur für diverse nützliche Tipps zur Vereinfachung mancher Technik danken, sondern vor allem für die tolle, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, unzählige unterhaltsame Diskussionen, ihre herzliche Aufmunterung in Krisensituationen, sowie für die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit. Gleiches gilt für Mihaela Kreutzer, der ich im Speziellen für die Bereitstellung der Northern Blots, ihre unermüdliche und selbstlose Hilfe, sowie für diverse interessante Einblicke in die rumänische Kultur danken will.

Markus Rieck und Dr. Wolfgang Meißner sei an dieser Stelle nicht nur für die hilfreiche und rasche Korrektur gedankt, sondern vor allem für die vielen motivierenden Gespräche, die mir in manch schlechter Phase gedanklich neue Türen geöffnet und mich neu motiviert haben. Bei Markus Rieck möchte ich mich außerdem besonders dafür bedanken, dass er sich selbst in für ihn stressigen Phasen die Zeit genommen hat, mir unter die Arme zu greifen – auch wenn er dadurch bestimmt die eine oder andere ‚Spätschicht‘ einlegen musste. Dr. Wolfgang Meißner sei besonders für die positiven Wellen beim Microarray und im Kampf gegen miserable PPAR β -Antikörper, sowie für die „leckere, süße Rundum-Versorgung“ gedankt! Dem Sonnenschein Kerstin Kaddatz, meiner ‚Nachfolgerin‘, wünsche ich viel Spaß und Erfolg mit ‚der alten Truppe‘!

Ein großes Dankeschön geht außerdem an „Jürgens Labor“ (Dr. Jürgen Adamkiewicz, Bernhard Wilke, Steffi Wick, Katja Stolpa) für die umfassende Hilfe, das großzügige Überlassen der murinen Fibroblasten-RNAs, sowie die wertvolle Kaffee-Kooperation in Momenten, in denen eine Energiespritze nötig war. Ebenfalls nicht vergessen werden, soll an dieser Stelle das Eicosanoid-Labor der Kinderklinik (Bernhard Watzer und Mitarbeiter), ohne das ich auf ein paar der interessantesten Ergebnisse hätte verzichten müssen.

Bei Ulrike Schülke, dem Herzen unseres Instituts, möchte ich mich für die unzähligen Tipps, Ratschläge und Hilfestellungen während der letzten Jahre bedanken. Ulla Kopiniak, sowie allen anderen Kollegen des IMT sei an dieser Stelle für die vielen aufmunternden Worte und unterhaltsamen, fröhlichen Gespräche zwischendurch gedankt. Der Weg war manchmal nicht einfach, aber die Zeit mit euch umso schöner. Ich werde euch alle sehr vermissen!

Weiterhin geht mein Dank an alle meine Freunde, unsere Nachbarn Jenny Rohde und Christian Scherp, sowie an meine Familie, die mir stets den Rücken gestärkt haben. Vor allem Bille (Sibylle von Rüden) sei an dieser Stelle für das gemeinsame Durchleiden der Tiefs, den Zuspruch, aber auch für das ausgiebige Feiern der Hochs und diverser anderer Anlässe gedankt!

Ein ganz spezieller Dank geht schließlich an meinen Mann Christoph, der nie den Glauben an mich verloren und mich in guten, wie in schlechten Tagen ertragen und unterstützt hat. Ohne seine moralische und seelische Unterstützung wäre diese Arbeit womöglich nie zustande gekommen.

7.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tanja Fauti, geborene Bilz, am 22.11.1976 in Bad Dürkheim, ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung der Regulation und Funktion von PPAR β “ im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Phillips-Universität Marburg/Lahn unter der Leitung von Prof. Dr. R. Müller und Frau PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation angeführten, Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher in keinem in- und ausländischen, medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den _____, _____
(Tanja Fauti)

Die während der Promotion durchgeführten Arbeiten wurden in folgenden Fachartikeln veröffentlicht oder liegen zur Veröffentlichung bereit:

**Fauti, T., Müller-Brüsselbach, S., Kreutzer, M., Rieck, M., Meissner, W., Rapp, U.,
Schweer, H., Kömhoff, M., Müller, R. (2006).** Induction of PPAR β and prostacyclin
(PGI $_2$) synthesis by Raf signaling: failure of PGI $_2$ to activate PPAR β . *FEBS letters* **273**:
170 - 179