

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

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller



**Untersuchungen zur Transaktivierung und
Degradation des Nukleären Hormonrezeptors
PPAR γ**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jan Adriaan Graw

aus Siegen

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 18. Oktober 2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: Prof. Dr. R. Jacob

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Transkription und Nukleäre Hormonrezeptoren	1
1.2 Der Nukleäre Transkriptionsfaktor PPARγ	4
1.3 Die physiologische Regulation von PPARγ	7
1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System	9
1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System und der Proteinabbau	10
1.4.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System und die Transkription	10
1.5 Transaktivierung und Degradation von NHRs	12
1.5.1 Die Bedeutung von Ligandbindung und Transaktivierung für die Degradation von NHRs	12
1.5.2 Die Regulation der Transkription bei NHRs durch Ubiquitin-Ligasen und das Proteasom	13
1.5.3 Die transkriptionelle Aktivität von NHRs bei Hemmung des Proteasoms	14
1.6 Zielsetzung	15
2. Material	17
2.1 Bakterienstämme und Zelllinien	17
2.1.1 Bakterienstämme	17
2.1.2 Säugerzellen	17
2.2 Medien	17
2.2.1 Medien für die Bakterienkultur	17
2.2.2 Medien für die Zellkultur	18

2.3	Oligonukleotide	18
2.3.1	Oligonukleotide für PCR-Klonierungsarbeiten	18
2.3.2	Oligonukleotide zur Expressionsanalyse mit PCR	19
2.4	Plasmide	19
2.4.1	Expressionsplasmide in eukaryontischen Zellen	19
2.5	Antikörper	20
2.5.1	Primäre Antikörper für immunologische Nachweisverfahren	20
2.5.2	Sekundäre Antikörper	20
2.6	Chemikalien	20
2.7	Lösungen	20
2.7.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	20
2.7.2	Lösungen für Luziferase Reporterversuche	25
2.7.3	Lösungen für die Zellkultur	26
2.7.4	PPAR γ -Liganden	26
2.7.5	Proteasom-Inhibitoren	27
2.7.6	Standards und Enzyme	27
2.7.6.1	<i>Standards</i>	27
2.7.6.2	<i>Sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen</i>	27
2.7.6.3	<i>Proteinverdauende Enzyme</i>	27
2.7.6.4	<i>RNA verdauende Enzyme</i>	28
2.7.6.5	<i>Polymerasen und reverse Transkriptasen</i>	28
2.8	KIT's	28
2.9	Geräte und Materialien	29
3.	Methoden	31
3.1	Zellbiologie	31
3.1.1	Zellkultur	31
3.1.1.1	<i>Allgemeine Kulturbedingungen</i>	31

3.1.1.2	<i>Passagieren von Zellen</i>	31
3.1.1.3	<i>Einfrieren von Zellen</i>	32
3.1.1.4	<i>Auftauen von Zellen</i>	32
3.1.1.5	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	33
3.1.2	Transiente Transfektionen und Transiente Assays	33
3.1.2.1	<i>Transiente Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamin 2000TM</i>	34
3.1.2.2	<i>Behandlung von Zellen mit dem PPARγ-Liganden GW347845</i>	34
3.1.2.3	<i>Behandlung von Zellen mit dem PPARγ-Liganden Rosiglitazon</i>	35
3.1.2.4	<i>Behandlung von Zellen mit dem Proteasominhibitor LLnL (ALLN)</i>	36
3.1.2.5	<i>Behandlung von Zellen mit dem Proteasominhibitor MG-132</i>	36
3.2	Biochemische Arbeitsmethoden	37
3.2.1	Bestimmung der Luziferaseaktivität	37
3.2.2	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	38
3.2.3	Berechnung der relativen Luziferaseaktivität und Statistik	38
3.2.4	Herstellung von Zelllysat (totale Zelllyse)	39
3.2.5	Proteinbestimmung nach Bradford	39
3.2.6	Aufkonzentrierung von Proteinen mittels TCA-Fällung	40
3.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	41
3.2.8	Analyse von Proteinen durch Westernblot	42
3.2.8.1	<i>Semi-dry Transfer mit 3-Puffersystem</i>	43
3.2.8.2	<i>Tankblot</i>	44
3.2.8.3	<i>Ponceau-Färbung der Westernblot-Membran</i>	44
3.2.8.4	<i>Detektion</i>	44
3.3	Molekularbiologische Methoden	45
3.3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	45
3.3.2	Kultivierung von Bakterien	46
3.3.3	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	46
3.3.4	Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Präp)	46
3.3.5	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi- bzw.	47

Midi-Präp)	
3.3.6 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren	48
3.3.7 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	49
3.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten	51
3.3.10 DNA-Sequenzierung	51
3.3.11 DNA-Gelelektrophorese	51
3.3.12 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
3.3.13 Arbeiten mit RNA	53
3.3.14 Isolierung von RNA	53
3.4 Expression und Analyse von Proteinen	54
3.4.1 Semiquantitative Expressions-Analyse von RNA-Proben mit RT-PCR	54
3.4.1.1 <i>Reverse Transkription von RNA und cDNA-Synthese</i>	55
3.4.1.2 <i>Spezifische Amplifizierung von cDNA</i>	55
3.4.2 In-vitro Translation	56
3.4.3 Protease-Protektions-Versuch	57
4. Ergebnisse	59
4.1 Klonierung der analogen PPARγ_2-Punktmutanten	59
4.1.1 Ermittlung der zu mutierenden Aminosäuren in PPAR γ_2	59
4.1.2 Klonierung der PPAR γ_2 -Punktmutanten	62
4.2 Die transkriptionelle Aktivität der PPARγ_2-Punktmutanten	65
4.2.1 Optimierung der Versuchsbedingungen	65
4.2.2 Die transkriptionelle Aktivität der PPAR γ_2 -Punktmutanten	68
4.3 Die transkriptionelle Aktivität der PPARγ_2-Punktmutanten ohne Einfluss ihrer DNA-Bindedomäne	71
4.3.1 Klonierung der Gal4-PPAR γ_2 -Punktmutanten	71

4.3.2	Optimierung der Untersuchungsbedingungen	72
4.3.3	Die transkriptionelle Aktivität der Gal4-PPAR γ_2 -Mutanten	72
4.4	Effekte der PPARγ_2-Mutanten auf die endogene Genexpression	74
4.4.1	Die transkriptionelle Aktivität bestimmt anhand der mRNA Mengen PPAR γ_2 -abhängiger Proteine ist ebenfalls deutlich reduziert	74
4.5	Das Abbauverhalten der PPARγ_2-Punktmutanten	76
4.5.1	Klonierung der myc-PPAR γ_2 -Mutanten	76
4.5.2	Die myc-Markierung hat keinen Einfluss auf die Expression von PPAR γ_2	77
4.5.3	Die myc-PPAR γ_2 -Mutanten werden nicht degradiert	79
4.5.4	Die myc-Markierung schwächt die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2	80
4.5.5	Der Abbau von PPAR γ_2 ist abhängig von der Ligandkonzentration	81
4.5.6	Die unterschiedliche Affinität des PPAR γ_2 -Wildtyps und der PPAR γ_2 -Punktmutanten zu Rosiglitazon	82
4.5.7	Die PPAR γ_2 -Punktmutanten sind in ihrem Abbauverhalten eingeschränkt	84
4.5.8	Transaktivierung und Degradation sind zumindest bei diesen PPAR γ_2 -Punktmutanten nicht zu trennen	85
4.6	Der Einfluss des Proteasoms auf die transkriptionelle Aktivität von PPARγ_2	86
4.6.1	Die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2 mit Proteasom-Inhibi- toren im Luziferase-Reporter-System	86
4.6.2	Die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2 mit Proteasom-Inhibi- toren in der RT-PCR gegen endogene PPAR γ_2 -Zielgene	89
5.	Diskussion	91
5.1	Die PPARγ_2-Punktmutanten sind transkriptionell inaktiv	91
5.2	Die Affinität der PPARγ_2-Punktmutanten zu Rosiglitazon ist reduziert	95

5.3	Abbau und Aktivierung von PPARγ_2 sind notwendig miteinander gekoppelt	96
5.4	Die Aktivität der Proteasoms ist notwendig für die Transaktivierung von PPARγ_2	99
5.5	Der Mechanismus der Regulation von PPARγ_2 über das Ubiquitin-Proteasom-System	101
6.	Literaturverzeichnis	104
7.	Zusammenfassung	128
8.	Anhang	130
8.1	Abkürzungsverzeichnis	130
8.2	Lebenslauf	134
8.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	136
8.4	Danksagung	137
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	138

1. Einleitung

1.1 Transkription und Nukleäre Hormonrezeptoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an spezifische DNA-Sequenzen in Promotoren von Genen binden und deren Transkription aktivieren bzw. reprimieren können (Johnson & McKnight, 1989; Maniatis *et al.*, 1987; Mitchell & Tjian, 1989).

Sie sind damit ein wesentliches Element von Signalwegen, die Zellprozesse wie die Zelldifferenzierung, den Zellmetabolismus oder den Zelltod steuern (Lodish *et al.*, 1999).

Nukleäre Hormonrezeptoren (NHRs) sind Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität von Liganden reguliert wird. Sie spielen eine bedeutende Rolle in einer großen Zahl von biologischen Vorgängen (Michalik *et al.*, 2004; Wahli, 2002).

Die Grundstruktur der NHRs ist immer ähnlich: Sie besitzen eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne (DBD), die zwei Zink-Finger-Module enthält und mit einer Ligandbindedomäne (LBD) verbunden ist. Die LBD der meisten NHRs besteht aus 11 – 13 α -Helizes, die antiparallel in drei Schichten charakteristisch angeordnet sind. Die am Carboxyl-Ende liegende α -Helix, die sogenannte Helix 12, besitzt eine kurze hochkonservierte Sequenz, die für die ligandabhängige transkriptionelle Aktivierung verantwortlich ist, die AF-2-Domäne (Nolte *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999). Viele NHRs besitzen zudem eine ligandunabhängige Aktivierungs-Funktion-1 (AF-1) am Amino-Terminus (Olefsky, 2001).

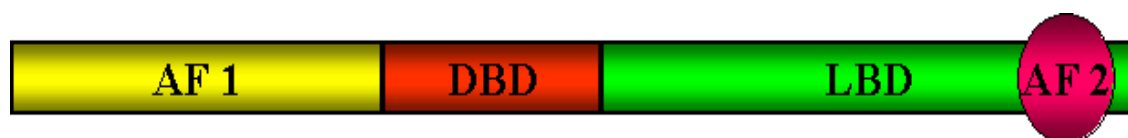


Abb.1.1: schematische Darstellung eines NHRs: AF-1 bezeichnet die ligandunabhängige Aktivierungsdomäne, DBD die DNA-Bindungsdomäne, LBD die Ligand-Bindungs- bzw. Heterodimerisierungsdomäne und AF-2 die ligandabhängige Aktivierungsdomäne.

Die meisten Nukleären Rezeptoren sind als Dimere aktiv. Sie binden an DNA-Sequenzen, die aus zwei gegenläufigen (palindromen) Sequenzmotiven oder aus zwei direkten Sequenzwiederholungen bestehen, den sogenannten „hormone response

elements“ (HREs). Diese liegen meistens nahe der transkriptionellen Initiationsstelle im 5'-Bereich der DNA (Aranda & Pascual, 2001).

Mangelsdorf et al. teilten 1995 die NHRs entsprechend ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in vier verschiedene Klassen ein (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

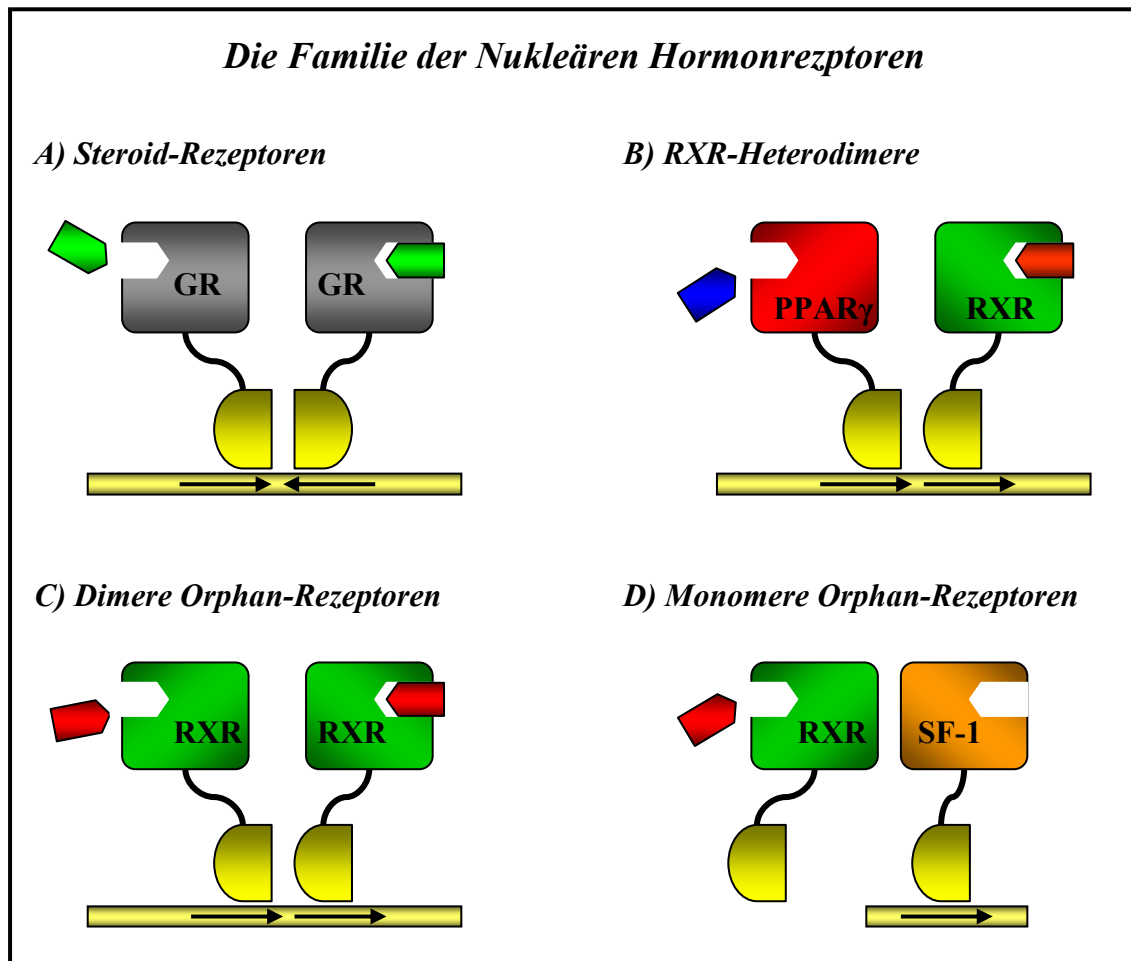


Abb.1.2: Einteilung der Nukleären Hormonrezeptoren: (A) zu den Steroidrezeptoren gehören u.a.: Glukokortikoid-Rezeptor (GR), Mineralkortikoid-R. (MR), Progesteron-R. (PR), Androgen-R. (AR), Östrogen-R. (ER), (B) RXR-Heterodimere bilden u.a.: Thyroid-Rezeptor (TR), Retinsäure-Rezeptor (RAR), Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren (PPARs), Ecdysone-Rezeptor (EcR), (C) Dimere Orphan-Rezeptoren bilden: Retinoic-X-Rezeptor (RXR), COUP, HNF-4, TR2, (D) Monomere Orphan-Rezeptoren bilden: SF-1, NGFi-B, ROR, ERR. (Als „Orphan-Rezeptoren“ („Waisen-Rezeptoren“) wurden die NHRs bezeichnet, die aufgrund ihrer Struktur zur Superfamilie der Kernrezeptoren zuzuordnen waren, für die aber noch kein natürlicher Ligand bekannt war.) (nach Mangelsdorf *et al.*, 1995)

Steroid-Rezeptoren wie zum Beispiel der Östrogen-Rezeptor (ER) liegen in Abwesenheit von Ligand in der Regel eingebunden in Multiprotein-Komplexe im Zytoplasma der Zellen (Knoblauch & Garabedian, 1999). Bei Ligand-Bindung dissoziieren diese Komplexe und der Rezeptor kann in den Zellkern transportiert werden (Aranda & Pascual, 2001).

Viele andere NHRs insbesondere die Heterodimere wie der Thyroid-Rezeptor (TR), der Retinsäure-Rezeptor (RAR), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) oder die „Peroxisome Proliferator-Activated Receptors“ (PPARs) befinden sich auch im nicht-ligandgebundenen Zustand im Zellkern gebunden an die DNA. Dabei binden viele von ihnen an sogenannte Korepressoren wie zum Beispiel N-CoR („nuclear receptor corepressor“) oder SMRT („silencing mediator of retinoid and thyroid receptors“) und unterdrücken so die Transkription ihrer Zielgene (Chen et al., 1997; Chen & Evans, 1995; Hörlein et al., 1995; Onate et al., 1995; Zamir et al., 1997).

Bindet allerdings ein Ligand an den NHR, durchläuft fast die gesamte LBD eine Konformationsänderung (Nolte *et al.*, 1998). Dadurch entledigt sich der Rezeptor der Korepressoren und schafft gleichzeitig Bindungsstellen für Koaktivator-Protein-Komplexe (Mangelsdorf & Evans, 1995; McKenna & O'Malley, 2000; Moras & Gronemeyer, 1998).

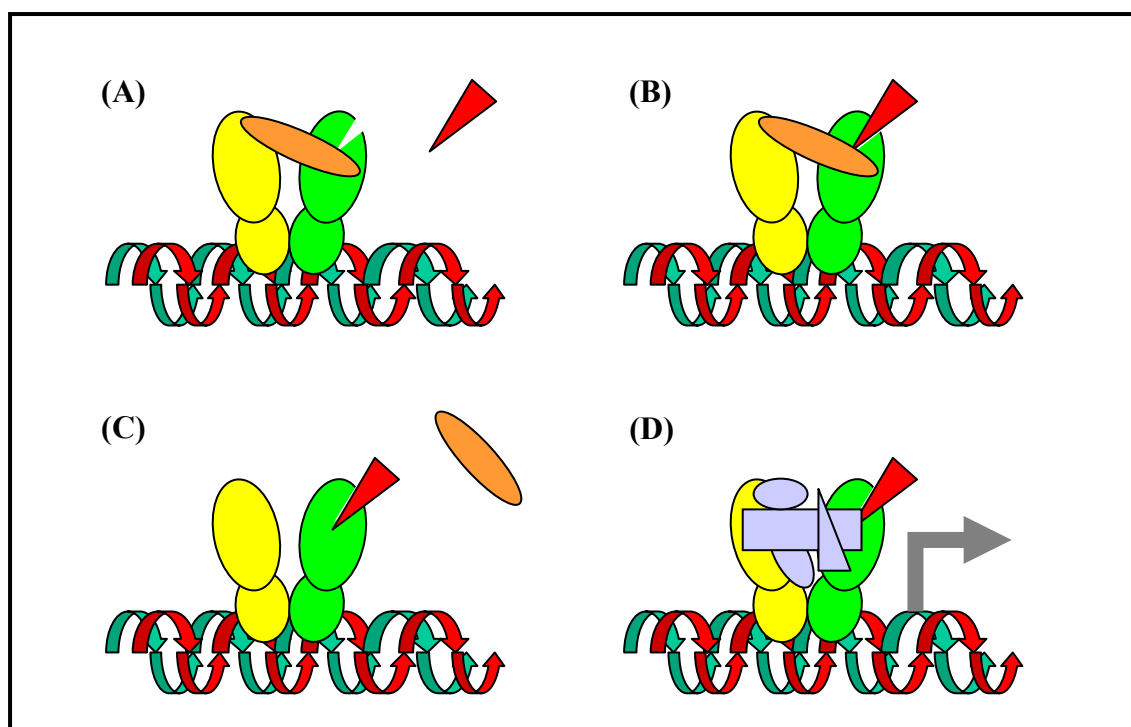


Abb.1.3: Transaktivierungsprinzip vieler NHRs: (A) im Ligand-ungebundenen Zustand unterdrücken Korepressoren (orange) die Transkription, (B) Bindung von Ligand (rot) führt zur Konformationsänderung in der AF-II-Region, (C) als Folge wird der Korepressor abgespalten, (D) dann können Kofaktoren (blau) rekrutiert werden und die Transkription der abhängigen Zielgene wird möglich.

Die Bindung an der AF-2-Region wird durch ein LXXLL-Motiv im Koaktivator vermittelt, das in einer hydrophoben Tasche des NHR binden kann, die sich nach Ligandbindung auftut (Glass & Rosenfeld, 2000; Heery *et al.*, 1997). Da es

verschiedene Typen von Koaktivator-Komplexen gibt, aber immer nur ein LXXLL an einen NHR binden kann, wird vermutet, dass ein zeitabhängiger Austausch zwischen den verschiedenen Koaktivator-Komplexen stattfindet.

Zu den wichtigen Koaktivator-Gruppen gehören solche mit Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) wie p300, CBP, SRC-1 und P/CAF bei denen Acetylierung der Histone zu einer erleichterten Transkription durch Auflockerung der Chromatin-Struktur führt (Chen *et al.*, 1997; Kodera *et al.*, 2000; Ogryzko, 1996; Spencer *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1996). Die zweite große Gruppe beinhaltet Koaktivatoren, die sogenannten Mediator-Komplexe, wie den TRAP/DRIP/ARC-Komplex, der zwar keine enzymatische Aktivität aber dafür Mediatoren aufweist, die den Kontakt zwischen Transkriptionsfaktor und basaler Transkriptionsmaschinerie vermitteln (Berger, 2002; Brown *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1997; Jenuwein & Allis, 2001; Kingston & Narlikar, 1999).

1.2 Der Nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR γ

In der großen Familie der Nukleären Hormonrezeptoren ist der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ) ein Mitglied der Unter-Familie der Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs).

Der Name PPAR entstand aus der initialen Klonierung einer Isoform, die nach Aktivierung von Xenobiotika in der Leber die Proliferation von Peroxisomen zu induzieren vermochte. Dieses also Peroxisome Proliferator-Activated Receptor getaufte Protein ist heute unter dem Namen PPAR α bekannt (Desvergne & Wahli, 1999).

PPAR γ hingegen spielt eine wichtige Rolle in so verschiedenen biologischen Prozessen wie der Regulation der Adipogenese, der Regulation der systemischen Insulin-Sensitivität, der Atherogenese, der Inflammation und der Tumor-Biologie (Kliwer *et al.*, 2001; Lehrke & Lazar, 2005). PPAR γ besteht aus zwei Isoformen, PPAR γ_1 und PPAR γ_2 , die durch alternatives Splicen generiert werden. PPAR γ_2 besitzt 30 Aminosäuren mehr als PPAR γ_1 und wird vorwiegend in Fettgewebe exprimiert, wobei PPAR γ_1 in geringen Mengen in sehr vielen Geweben exprimiert wird (Gurnell, 2003; Rosen & Spiegelman, 2001; Tontonoz *et al.*, 1994).

Große Bedeutung erlangte PPAR γ_2 durch seine Schlüsselrolle in der Fettzell-Differenzierung, wo es mit Hilfe von Mitgliedern der CAAT/enhancer-binding-protein-Familie (C/EBP-Familie) als Transkriptionsfaktor wirkt (Morrison & Farmer, 2000; Rosen & Spiegelman, 2000; Wu *et al.*, 1999). PPAR γ_2 ist ausreichend, aber zugleich auch absolut notwendig für die Fettzell-Entwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass ektope Expression und Aktivierung von PPAR γ_2 einen Fettzell-Phänotyp in Fibroblasten induzieren konnten (Tontonoz *et al.*, 1994). Zellen, denen beide Allele für PPAR γ_2 fehlten, konnten weder *in vitro* noch *in vivo* zu Fettzellen differenzieren. Eine Maus mit einem PPAR $\gamma(-/-)$ -Genotyp überlebte nur eine sehr kurze Zeitspanne nach der Geburt und besaß keine sichtbaren Fettspeicher (Barak *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 1999). Außerdem zeigten Zellen mit nur einem PPAR γ -Allel einen Phänotyp zwischen dem von Wild-Typ-Zellen und dem der PPAR $\gamma(-/-)$ -Zellen (Kubota *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 1999).

PPAR γ hat weiterhin Bedeutung bei der Regulation der systemischen Insulin-Sensitivität. Diese Beobachtungen wurden gemacht, als sich herausstellte, dass PPAR γ der Rezeptor für eine Gruppe synthetischer oraler Antidiabetika, der Thiazolidindione, ist. Thiazolidindione wirken als Insulinsensitizer und sind seit dem Jahr 2000 auch in Deutschland für die Kombinationstherapie mit Metformin oder einem Sulfonylharnstoff bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen (Heery *et al.*, 1997; Lehmann *et al.*, 1995; Nolan *et al.*, 1994). Weiterhin sind bestimmte Mutationen in PPAR γ mit schwerer Insulin-Resistenz und Diabetes mellitus assoziiert (Agostini *et al.*, 2006; Barroso *et al.*, 1999; Ristow *et al.*, 1998). Knock-out Mäuse, deren Fett-, Muskel- oder Lebergewebe kein PPAR γ exprimieren kann, sind prädisponiert, eine schwere Insulin-Resistenz zu entwickeln (He *et al.*, 2003; Hevener *et al.*, 2003; Matsusue *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 2003). Trotzdem ist die Sensibilität von PPAR $\gamma(+/-)$ -Mäusen zu Insulin größer als die der PPAR γ -Wildtyp-Mäuse (Kubota *et al.*, 1999; Miles *et al.*, 2000). Welche Rolle PPAR γ in der Regulation der Glucose- und Insulinhomöostase abhängig von verschiedenen Geweben wie Fett, Skelettmuskel oder Leber nun letztendlich spielt, bleibt vorerst weiterhin unbekannt (Kintscher & Law, 2005).

Bezogen auf die PPAR γ -gesteuerte Regulation der Insulin-Sensitivität kann man aber zwei wesentliche Funktionen von PPAR γ herausstreichen: 1): PPAR γ in Adipozyten schützt nicht-adipöse Gewebe wie den Skelettmuskel und die Leber vor exzessiver

Fettüberladung. 2): PPAR γ in Adipozyten garantiert eine balancierte und adäquate Sekretion von Adipokinen wie Adiponectin und Leptin, die wichtige Mediatoren der Insulinwirkung an peripheren Geweben sind (Kintscher & Law, 2005).

Obwohl PPAR γ in viel geringeren Mengen als in Fettzellen auch in anderen Zelltypen exprimiert wird, hat es einen Einfluss auf das Wachstum und/oder die Differenzierung speziell von Monozyten, Brust- und Kolonepithelzellen. Dabei hat die Fähigkeit von PPAR γ , Zellwachstum zu stoppen, Einflüsse auf die Tumorbiologie (Murphy & Holder, 2000; Ricote *et al.*, 1999; Rocchi *et al.*, 1999). Funktionseinschränkende Mutationen in einem Allel von PPAR γ wurden in menschlichen Kolonkrebszellen gefunden, was eine mögliche Funktion von PPAR γ als haploinsuffizienter Tumorsuppressor unterstützen würde (Sarraf *et al.*, 1999). Zusätzlich zeigen PPAR γ (+/-) Mäuse eine signifikant höhere Inzidenz, ein Kolonkarzinom zu entwickeln, als der PPAR γ -Wildtyp (Girnun *et al.*, 2002). Weiterhin wurde vorgeschlagen, PPAR γ -Liganden zur Chemoprävention von Krebs zu verwenden (Osawa *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 1999). Bei Patienten mit Liposarkom konnten die Thiazolidindione als PPAR γ -Liganden eine Differenzierung der Tumorzellen und eine Reduktion des Tumorwachstums bewirken (Demetri *et al.*, 1999; Tontonoz *et al.*, 1997). Auch bei Prostatakarzinom-Patienten konnten die Thiazolidindione eine Stabilisierung der Werte des Prostata Spezifischen Antigens (PSA) bewirken, die wiederum auf ein verringertes Tumorwachstum hinweisen (Mueller *et al.*, 2000). Bei einigen Typen des Kolon- und des Mammakarzinoms konnte ebenfalls eine generell proliferationshemmende Wirkung der PPAR γ -Liganden nachgewiesen werden (Grommes *et al.*, 2004). Allerdings gibt es im Maus-Modell auch einige Tumore wie zum Beispiel Kolonkarzinome auf der Basis von Mutationen im APC-Gen, bei denen Thiazolidindione als Tumorpromotoren wirken (Lefebvre *et al.*, 1998; Saez *et al.*, 1998). Dies und ähnliche Beobachtungen bei Haemangiosarkomen veranlasste im Jahre 2004 die US „Food and Drug Administration“ (FDA), für jede Neuzulassung eines Medikamentes mit Wirkung auf oder an PPAR γ eine zweijährige präklinische Beobachtungsstudie durchführen zu lassen, um die Kanzerogenität des Präparates zu untersuchen (Lehrke & Lazar, 2005).

Schließlich scheint PPAR γ auch als Entzündungsmarker und –regulator an Bedeutung zu gewinnen (Li *et al.*, 2000; Su *et al.*, 1999). Die Thiazolidindione (TZDs) zeigen bei Ischämie- und Reperfusionsgewebeschäden sowie im Schock organprotektive Effekte

und wirken hemmend auf die Atherogenese (Abdelrahman *et al.*, 2005; Chawla *et al.*, 2001; Cuzzocrea, 2004; Minamikawa *et al.*, 1998)

1.3 Die physiologische Regulation von PPAR γ

Primäre Zielgene eines NHRs sind Gene, die abhängig von vorgeschalteten sogenannten „Hormone-Response-Elementen“ (HREs) transkribiert werden. HREs sind DNA-Sequenzen, an welche die zugehörigen NHRs binden (Aranda & Pascual, 2001; Carlberg, 1995; Glass, 1994). Für Kernrezeptoren, die als Homo- bzw. Heterodimer an die DNA binden, besteht diese Konsensussequenz aus zwei Wiederholungen der Sequenz AGG/TTCA bzw. AGAA-CA (Beato *et al.*, 1995). Die Sequenzwiederholungen können in Form von Palindromen (Pal), umgekehrten Palindromen (IPs) oder direkten Wiederholungen (direct repeats, DR) vorliegen. PPAR γ bindet als Heterodimer-Komplex mit dem Retinoic-X-Receptor (RXR) an das sogenannte DR1-Element, eine Konsensussequenz, deren beide Hälften durch ein Nukleotid voneinander getrennt sind (Zhang *et al.*, 1992). Die von PPAR γ aktivierten DR1-Elemente werden als „PPAR-Response-Elements“ (PPREs) bezeichnet (Schoonjans *et al.*, 1995; Sueyoshi *et al.*, 1999). Das Bilden eines Heterodimers mit RXR ist absolut notwendig für die DNA-Bindung (Glass, 2006; Rosen & Spiegelman, 2001). In diesem Heterodimer können sowohl PPAR γ - als auch RXR-Liganden PPAR γ -abhängige Zielgene aktivieren. Es handelt sich daher um einen sogenannten permissiven Heterodimer. So zeigte sich z.B., dass auch RXR-Liganden die Insulin-Sensitivität verbessern können (Forman *et al.*, 2002).

In Abwesenheit von Ligand rekrutiert PPAR γ Korepressoren wie N-CoR und SMRT (Cohen, 2005; Dowell *et al.*, 1999). Gebunden an die PPREs können diese Komplexe dann aktiv die Transkription PPAR γ -abhängiger Gene unterdrücken (Lehrke & Lazar, 2005). Dieser Vorgang wird auch Transrepression genannt. Die Bindung von agonistisch wirkenden Liganden induziert bei PPAR γ eine Konformationsänderung in einer konservierten Helix am Carboxyl-Terminus der LBD (Nolte *et al.*, 1998). Die LBD besitzt Bindestellen für Koaktivatoren, die eine Transkription z.B. über Acetylierung von Histonen oder über die Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie induzieren können (McKenna *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den meisten anderen NHRs besitzt PPAR γ eine vergleichsweise große Ligand-

Bindungstasche, die die Bindung einer großen Variabilität von Liganden ermöglicht (Kliwer *et al.*, 2001). Synthetische PPAR γ -Liganden sind die erwähnten Thiazolidindione (Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon) sowie verschiedene Nicht-Steroidale Anti-Inflammatorika (Lee *et al.*, 2003; Lehmann *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 1997). Als natürliche Liganden wirken 15-desoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J₂, verschiedene ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure, Nitrolinolsäure, 15-Hydroxyeicosatetraensäure und Bestandteile von Low-Density-Lipoprotein-Partikeln (LDL) wie 9- und 13-Hydroxyoctadecadiensäure (Desvergne *et al.*, 2004; Forman *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1999; Kliwer *et al.*, 1995; Miyazaki *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 1998; Schopfer *et al.*, 2005). Interessanterweise weisen alle diese natürlichen Liganden eine nur geringe Affinität zu PPAR γ auf, und die Existenz von weiteren natürlichen Liganden mit einer ähnlich hohen Affinität zu PPAR γ wie z.B. die der Thiazolidindione konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden.

Es gibt zwei große Gruppen von Koaktivatoren, die an PPAR γ binden. Zum einen sind dies die Koaktivatoren der p160-Familie wie das „cAMP response element binding protein“ (CBP)/p300 und die „steroid receptor coactivators“ (SRC) -1, -2, -3, die histonmodifizierende Enzyme rekrutieren (Xu & Li, 2003). Des Weiteren sind PBP („PPAR-binding protein“), TRAP220 („thyroid hormone receptor-associated protein“) und DRIP205 („vitamin D receptor-associated protein“) zu nennen, die mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren (Fondell *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2002; Rachez & Freedman, 2001). TRAP220/DRIP205 interagieren direkt mit PPAR γ , wobei TRAP220 einen selektiven PPAR γ -Koaktivator darstellt, da TRAP220 (-/-) Fibroblasten nicht in der Lage sind die Adipogenese zu durchlaufen (Ge *et al.*, 2002). Ein weiterer selektiver PPAR γ -Koaktivator ist das „peroxisome proliferator-activated receptor gamma interacting protein“ (PRIP), das die Verbindung zwischen an PPAR γ gebundenem TRAP220/DRIP205 und CBP/p300 herstellt (Qi *et al.*, 2003). PRIP (-/-) Fibroblasten sind ebenfalls nicht in der Lage, sich nach Stimulation in Adipozyten zu differenzieren (Misra *et al.*, 2003).

Neben Ligand- und Koaktivator-Bindung wird PPAR γ weiterhin noch durch Phosphorylierung, durch Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Abbau und durch Sumoylierung reguliert.

MAP-Kinasen (Erk 1, Erk 2, Stress-activated Protein Kinase/c-Jun Amino-terminal Kinase) können PPAR γ an Serin 112 phosphorylieren und so seine transkriptionelle Aktivität inhibieren (Adams *et al.*, 1997; Camp *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999). Es wurde vermutet, dass die Phosphorylierung an Serin 112 die Bindung von Ligand hemmt (Shao *et al.*, 1998).

Des Weiteren wird durch Ligand-Aktivierung von PPAR γ der Ubiquitin-abhängige Abbau desselben Proteins durch das Proteasom induziert (Hauser *et al.*, 2000).

Interferon inhibiert die Fettzeldifferenzierung, vermindert die Aktivität der Lipoprotein-Lipase (LPL) und führt zu einer Degradation von PPAR γ durch das Proteasom (Floyd & Stephens, 2002; Waite *et al.*, 2001).

Schließlich reguliert auch noch das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO (small ubiquitin-like modifier) die Stabilität und transkriptionelle Aktivität des Kernrezeptors (Floyd & Stephens, 2004; Ghisletti *et al.*, 2007; Hilgarth *et al.*, 2004; Ohshima *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2005). So senkt zum Beispiel die Sumoylierung des Lysin 107 die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ (Yamashita *et al.*, 2004). Allerdings scheinen die Mechanismen der Sumoylierung und der Phosphorylierung miteinander gekoppelt zu sein. An Serin 112 phosphoryliertes PPAR γ wird verstärkt sumoyliert (Yamashita *et al.*, 2004). Daher vermutet man, dass die beobachtete Hemmung der Transaktivierung von phosphoryliertem PPAR γ in einer verstärkten Sumoylierung des PPAR γ -Proteins begründet liegt (Shimizu *et al.*, 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Sumoylierung in der LBD von PPAR γ eine Dissoziation des Korepressors NCoR nach Ligandbindung verhindert und so eine Aktivierung von PPAR γ unterbindet (Pascual *et al.*, 2005). SUMO ist somit ein Element der Signalwege, die eine Transrepression PPAR γ -abhängiger Gene bewirken (Ghisletti *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2005).

1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der zielgerichtete Abbau intrazellulärer Proteine wird über die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse durchgeführt (Rock *et al.*, 1994). Zellen sind ohne dieses System nicht lebensfähig (Tanaka *et al.*, 1995). Es wurde außerdem entdeckt, dass das Ubiquitin-Proteasom-System eine bedeutende Rolle bei der Transkriptionsregulation einnimmt (Freiman & Tjian, 2003; Muratani *et al.*, 2003).

1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System und der Proteinabbau

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren großes Protein, das ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen exprimiert wird. In einer kaskadenartigen Reaktion wird Ubiquitin mit Hilfe der Enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin conjugating enzyme) und E3 (ubiquitin protein ligase) kovalent an Lysinreste zellulärer Proteine gebunden. Über dieselben Enzyme wird die Bindung weiterer Ubiquitin-Moleküle an das jeweils schon an das Zielprotein gebundene Ubiquitin katalysiert, wodurch sich eine Polyubiquitin-Kette formiert (Hershko & Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996; Ogryzko, 2000). Proteine, an die eine Polyubiquitin-Kette gebunden ist, werden in der Regel von einem Proteasom, einem 26S großen Multi-Proteinkomplex, abgebaut. Das Proteasom besteht aus einer katalytisch aktiven 20S Kernuntereinheit und zwei 19S Untereinheiten, die polyubiquitinierte Proteine, bestehend aus mindestens 4 Ubiquitin-Molekülen, erkennen und die Ubiquitinmoleküle von diesen wieder entfernen (Almond & Cohen, 2002; Elsasser *et al.*, 2002; Elsasser *et al.*, 2004; Hiyama *et al.*, 1999; Hofmann & Bucher, 1996; Rao & Sastry, 2002; Schaubert *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 2001;).

Das Enzym E1 initiiert den Ubiquitinierungs-Prozess, indem es ATP-abhängig kovalent an das Ubiquitin-Molekül bindet. Das E1-Enzym ist ebenfalls hochkonserviert und viele Organismen besitzen lediglich ein einziges Gen für E1 (Hershko & Ciechanover, 1998). Aktiviertes Ubiquitin wird dann auf E2 übertragen, von dem es in eukaryotischen Zellen mehrere Isoformen gibt und von denen verschiedene E2-Enzyme für die Ubiquitinierung verschiedener Substrate benötigt werden (Pickart, 2001). Das Enzym E3 schließlich erkennt das Zielprotein und überträgt das Ubiquitin-Molekül auf einen Lysinrest des Substrats bzw. eines bereits an das Protein gebundenen Ubiquitin-Moleküls (Glickman & Ciechanover, 2002). Durch sehr viele verschiedene E3-Ligasen in jeder Zelle wird gewährleistet, dass die charakteristischen Degradationssignale eines jeden abzubauenen Proteins erkannt werden und die Markierung spezifisch vorgenommen werden kann (Glickman & Ciechanover, 2002; Kisselev & Goldberg, 2001).

1.4.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System und die Transkription

Schon lange ist bekannt, dass Histone ubiquitiniert werden (Goldknopf *et al.*, 1975; Goldknopf & Busch, 1977; Hunt & Dayhoff, 1977). Da ubiquitinierte Histone spezifisch mit Orten der aktiven Gentranskription assoziiert werden konnten, waren sie

einer der ersten Marker, um transkriptionell aktives Chromatin nachzuweisen (Davie & Murphy, 1990; Davie *et al.*, 1991; Nickel *et al.*, 1989; Vavra *et al.*, 1982).

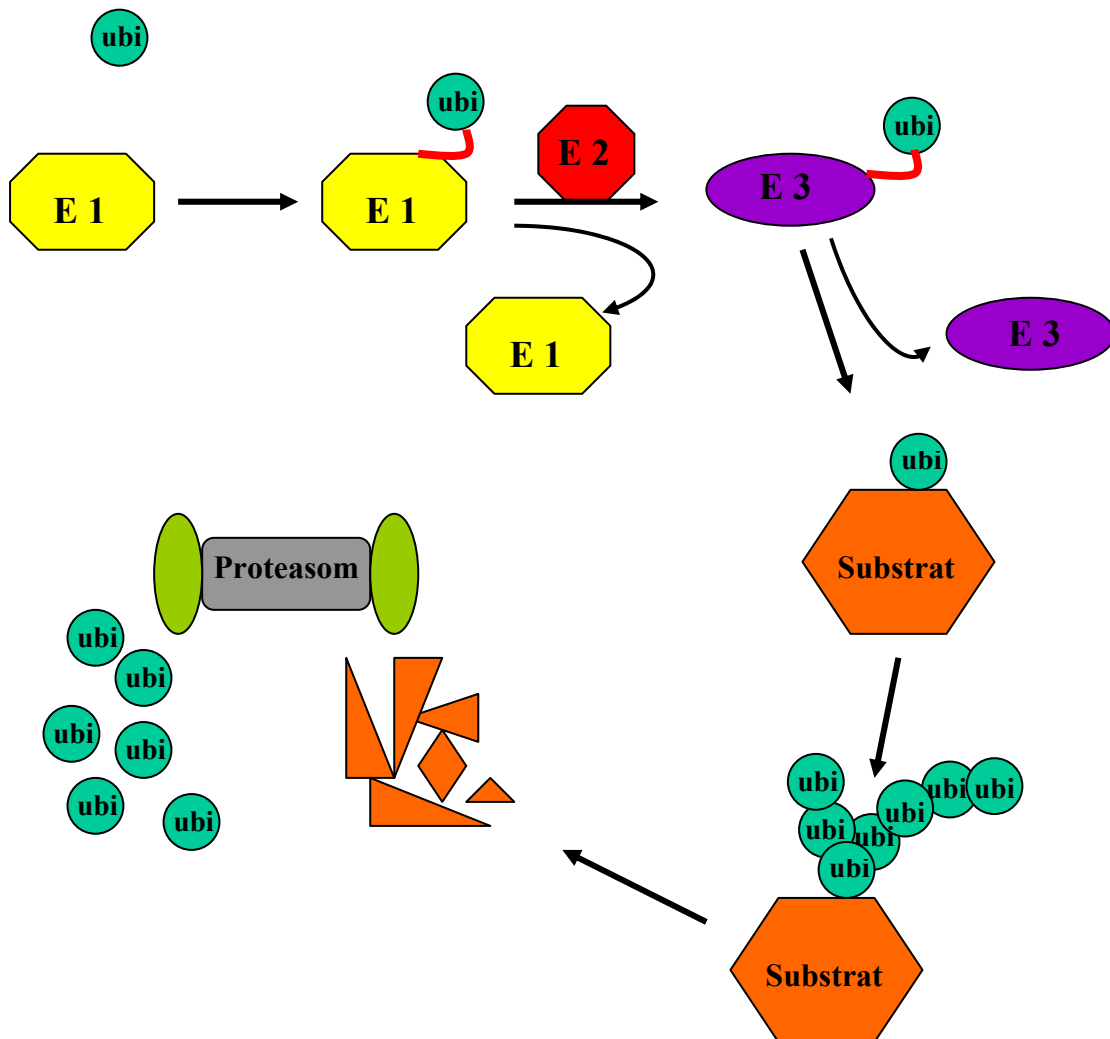


Abb1.4: Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 bindet ATP-abhängig kovalent das Ubiquitinmolekül. Über das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 wird Ubiquitin auf die Ubiquitin-Ligase E3 übertragen. E3 bindet Ubiquitin kovalent an einen Lysinrest eines spezifischen Proteins (Substrat) bzw. an schon daran gebundene Ubiquitinmoleküle. Daraufhin wird das Substrat vom Proteasom erkannt und degradiert.

Auch die RNA-Polymerase II ist ein Zielprotein von Ubiquitinligasen. In Bereichen geschädigter DNA leiten sie den Abbau der RNA-Polymerase II ein und verhindern so die Transkription mutierter Genabschnitte (Beaudenon *et al.*, 1999). Aber auch die Transkriptionsvorgänge selbst wie das Umschalten der RNA-Polymerase von Initiations- zur Elongationsphase der Transkription wird über Ubiquitinierung vermittelt (Mitsui & Sharp, 1999). Überdies ist der gesamte Vorgang der Transkription sehr eng mit dem Ubiquitin-Proteasom-System verknüpft, da dieses eine große Zahl an

Schlüsselfaktoren für die Transkriptionsregulation wie z.B. p53, c-Fos, c-Jun und natürlich die NHRs mit ihren Kofaktoren reguliert. (Muratani & Tansey, 2003; Nawaz & O'Malley, 2004; Salvat *et al.*, 1999; Woudstra *et al.*, 2002).

Sowohl die Initiation als auch die Elongation und Termination der Transkription durch die RNA-Polymerase werden durch die Untereinheiten des Proteasoms gefördert (Ferdous *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006). Die 19S Untereinheit wird von transkriptionell aktiven Genen rekrutiert, nicht nur in der Promotorregion, sondern über die gesamte transkribierte Sequenz des Gens (Gonzalez *et al.*, 2002). Ebenso binden Abschnitte der 20S Untereinheit an die gesamte Sequenz Steroid-Rezeptor-abhängiger Zeilgene. Sie werden dabei von SRC-Koaktivatoren rekrutiert (Zhang *et al.*, 2006).

Schließlich ist die Ubiquitinierung ein wichtiger Regulationsfaktor auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren. Dies erfolgt über zusammengefasst drei Mechanismen: Die Regulation der Lokalisation, der Aktivität und der Mengen von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren (Aberle *et al.*, 1997; Hoppe *et al.*, 2000; Ostendorf *et al.*, 2002; Palombella *et al.*, 1994).

1.5 Transaktivierung und Degradation von NHRs

1.5.1 Die Bedeutung von Ligandbindung und Transaktivierung für die Degradation von NHRs

Bei vielen NHRs aktiviert die Bindung von Ligand nicht nur die Transkription, sondern induziert auch den Abbau des Rezeptors durch das Proteasom. Eine Stabilisierung des NHRs nach Ligandaktivierung und gleichzeitiger Hemmung des proteasomalen Abbaus konnte beim Androgen Rezeptor (AR), dem Östrogen Rezeptor (ER), dem Glukokortikoid Rezeptor (GR), PPAR γ , dem Progesteron Rezeptor (PR), den Retinoic Acid Rezeptoren (RARs) und RXR beobachtet werden (Hauser *et al.*, 2000; Kopf *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2000; Lonard *et al.*, 2000; Wallace & Cidlowski, 2001). Je stärker ein Transkriptionsfaktor aktiviert wird, desto schneller wird er jedoch auch abgebaut (Molinari *et al.*, 1999; Salghetti *et al.*, 2000). Ursprünglich wurde angenommen, dass diese Art der Regulation wichtig sei, um die Aktivierung durch einen einzelnen Faktor zu limitieren, oder dass eine schnelle Degradation die Akkumulation von Aktivatoren verhindere und so einer Überforderung der basalen Transkriptionsmaschinerie vorbeuge (Tansey, 2001). Seit aber ermittelt wurde, dass Degradations- und

Transaktivierungsdomänen überlappen, wird davon ausgegangen, dass für beide Vorgänge oder zumindest Teile davon eine gemeinsame zelluläre Maschinerie verantwortlich ist (Muratani & Tansey, 2003; Salghetti *et al.*, 2000).

Daher ist es nicht verwunderlich, dass Proteine existieren, die z.B. wie die Ubiquitin-Ligasen E6AP und Rsp5 gleichzeitig eine Funktion als Koaktivatoren für Nukleäre Rezeptoren aufweisen (Imhof & McDonnell, 1996; Nawaz *et al.*, 1999).

Für ER ist bekannt, dass die Deaktivierung von ligandaktiviertem ER über das Ubiquitin-Proteasom-System erfolgt. Dieser Prozess ist selektiv, da zu dem gleichen Zeitpunkt nicht ligandgebundener ER vor dem proteasomalen Abbau geschützt wird. Die Rekrutierung der Ubiquitin-Ligase bzw. das Verhindern der Proteasom-Assoziation erfolgt dabei in unterschiedlichen Bereichen des Rezeptors (Tateishi *et al.*, 2006).

Für RXR konnte gezeigt werden, dass er zwar ligandabhängig transkriptionell aktiviert und auch degradiert wird, die beiden Prozesse selbst aber unabhängig voneinander ablaufen können (Osburn *et al.*, 2001). Osburn *et al.* konnten nämlich Punktmutationen in RXR einführen, die dazu führten, dass die Punktmutanten nach der Bindung von Ligand transkriptionell inaktiv sind, aber trotzdem degradiert werden. Die Mutationen befanden sich jeweils in der AF-2-Region bzw. in der Ligand-Bindungsdomäne. Nach der Ligandbindung sind also für die transkriptionelle Aktivierung von RXR andere Faktoren und Vorgänge notwendig als für die Degradation.

1.5.2 Die Regulation der Transkription bei NHRs durch Ubiquitin-Ligasen und das Proteasom

Wie oben schon erwähnt, nehmen einige Ubiquitin-Ligasen gleichzeitig eine Funktion als Koaktivator wahr. Für den ER konnte gezeigt werden, dass bei ihm z.B. die Ubiquitin-Ligasen Mdm2 und E6AP als Koaktivatoren wirken (Nawaz *et al.*, 1999; Saji *et al.*, 2001). Sie werden nach Rekrutierung der RNA-Polymerase II an Östrogen abhängige Promotoren gebunden (Reid *et al.*, 2003). Die Koaktivator-Funktion von E6AP scheint jedoch nicht mit seiner Ubiquitin-Ligase-Aktivität gekoppelt zu sein. Dominant-negative Mutationen in der Ubiquitin-Ligase Domäne von E6AP konnten die Östrogen-abhängige Transkription nicht hemmen (Nawaz *et al.*, 1999). Allerdings ist E6AP definitiv eine Komponente bei der Degradation von ER und wird in seinem Bindungsverhalten von Calcium-Ionen und Calmodulin moduliert (Li *et al.*, 2006).

Ubiquitin-Ligasen können also an Promotoren NHR-abhängiger Gene rekrutiert werden. Ob sie dort aber wie z.B. für ER jedes Mal auch wirklich als Ubiquitin-Ligasen wirken, ist noch nicht bekannt.

Wie das Proteasom selbst Einfluss auf die NHR-abhängige Transkription nehmen kann, zeigt sich am Beispiel des RAR γ 2-Rezeptors. Eine Untereinheit der 19 S Untereinheit des Proteasoms, Sug1, kann ligandabhängig an RAR γ 2 binden (vom Baur *et al.*, 1996). Überexpression von Sug1 hemmt den Abbau und die transkriptionelle Aktivität von RAR γ 2, wohingegen die Überexpression einer Sug1-Mutante, die unfähig ist, an RAR γ 2 zu binden, keinerlei Einfluss auf die RAR γ 2-abhängige Transkription und seine Degradation zeigt (Gianni *et al.*, 2002). Es ist also möglich, dass durch die Bindung von Sug1 an RAR γ 2 die Bindung und Rekrutierung von Kofaktoren an RAR γ 2 blockiert wird. Auch werden Sug1 und weitere Mitglieder des sogenannten APIS-Komplexes (19S ATPase proteins independent of 20S-Komplex) an Östrogen- oder Androgen-abhängige Promotorregionen gebunden (Kang *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2002). Beim ER wird der APIS-Komplex nach der RNA-Polymerase II und den Ubiquitin-Ligasen rekrutiert. Es ist daher möglich, dass Ubiquitinierung des Rezeptors die APIS-Bindung vermittelt. Welche Rolle jedoch der APIS-Komplex selbst spielt, ist noch nicht bekannt.

1.5.3 Die transkriptionelle Aktivität von NHRs bei Hemmung des Proteasoms

Einige NHRs benötigen ein aktives Proteasom für ihre Transaktivierung, andere zeigen eine erhöhte transkriptionelle Aktivität, wenn die Aktivität des Proteasoms gehemmt wird (Blanquart *et al.*, 2002; Deroo *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002; Lonard *et al.*, 2000; Wallace & Cidlowski, 2001). So wird die transkriptionelle Aktivität von ER, AR, PR, TR und RAR durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt, wohingegen aber GR und PPAR α eine stärkere transkriptionelle Aktivität zeigen (Blanquart *et al.*, 2002; Deroo *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002; Lonard *et al.*, 2000; Rochette-Egly, 2005; Wallace & Cidlowski, 2001).

Die Mechanismen sind noch weitgehend unklar, doch konnte für den ER gezeigt werden, dass dieser sowohl mit als auch ohne Ligand zyklisch an Östrogen-abhängige Promotoren bindet. Proteasom-Inhibitoren verhindern dieses Zirkulieren des ER und die Rezeptor-Untereinheiten dissoziieren vom ER-Promotor (Reid *et al.*, 2003). Auch der AR weist ein zirkulierendes Bindungsverhalten am PSA-Promotor auf, das durch

Proteasom-Inhibitoren unterbrochen wird, da diese die Lösung des AR vom PSA-Promotor hemmen. Überdies kann die 19S Proteasom-Untereinheit den PSA-Promotor blockieren (Kang *et al.*, 2002).

Eine andere Arbeitsgruppe postulierte jedoch, dass Proteasom-Inhibitoren, wie z.B. MG-132, ein Proteasom-Inhibitor der 26S Proteasom-Untereinheit, die Transaktivierung von AR hemmen, indem die nukleäre Translokation von AR und die Interaktion von AR mit Kofaktoren gehemmt wird (Lin *et al.*, 2002).

1.6 Zielsetzung

Bei der Fülle an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, die durch PPAR γ reguliert werden, stellt dieser NHR auch unter therapeutischen Aspekten ein Zielprotein mit großem Potential dar. Um einen maximalen therapeutischen Erfolg bei gleichzeitig minimalen Nebenwirkungen zu erzielen, bedarf es deshalb einer möglichst selektiven Beeinflussung der Aktivität von PPAR γ . Für die selektive Modulation von PPAR γ spielen die Interaktionen des Rezeptors mit den zahlreichen Kofaktoren die herausragendste Rolle. Es ist daher von sehr großer Bedeutung, die Vorgänge, die zur Aktivierung und Deaktivierung von PPAR γ führen, gründlich aufzuklären und zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war zunächst zu ermitteln, ob wie bei RXR die transkriptionelle Aktivierung und die Degradation von PPAR γ unabhängig voneinander verlaufende Prozesse sind oder nur gekoppelt miteinander ablaufen können. Dies sollte mit Hilfe von PPAR γ -Punktmutanten erfolgen, die analog zu den von Osburn *et al.* 2000 beschriebenen RXR-Mutanten generiert werden sollten (Osburn *et al.*, 2000). Da PPAR γ und RXR eine hohe Strukturhomologie aufweisen, war zu vermuten, dass die von Osburn *et al.* gewonnenen Ergebnisse auf PPAR γ übertragbar wären, es also PPAR γ -Mutanten gibt, die transkriptionell inaktiv sind, aber über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden. Eine Antwort auf die Frage, ob transkriptionelle Aktivierung und Degradation von PPAR γ als miteinander gekoppelte oder getrennt voneinander ablaufende Prozesse zu werten sind, würde wiederum neue Ansatzpunkte

für die Beeinflussung physiologischer und pathologischer Vorgänge liefern, für die ein Zusammenhang mit PPAR γ erforscht werden konnte.

Da auch das Proteasom selbst Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung vieler NHRs hat, wurde weiterhin untersucht, welche Rolle das Proteasom bei der Transaktivierung von PPAR γ spielt. Dazu sollte sowohl die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ als auch die Expression PPAR γ -abhängiger Gene bei inhibierter Proteasom-Funktion analysiert werden.

2. Material

2.1 Bakterienstämme und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

DH5 α E.coli F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAaegF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17
(r_Kⁱ,m_K⁺)phoAsupE44 1-thi-1 gyr A96 relA1

2.1.2 Säugerzellen

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
NIH3T3- Zellen	Maus-Fibroblasten	DSMZ,Braunschweig
CV1-Zellen	Monkey African Green kidney fibroblast	E. Slater
NIH3T3- PPAR γ ₂ -S112A	Maus-Fibroblasten, die stabil PPAR γ ₂ - S112A exprimieren	S. Hauser

2.2 Medien

2.2.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Agar Luria Bertani Agar (Roth)
40g Pulver auf 1l H₂O

LB-Medium Luria Bertani Medium (Roth)
25g Pulver auf 1l H₂O
Autoklavieren

Selektionszusatz 50 μ g/ml Ampicillin

2.2.2 Medien für die Zellkultur

Medien für die Zellkultur wurden von der Firma BioWhittaker (Verviers, Belgien) und Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS) von der Firma Gibco (Karlsruhe) bezogen.

DMEM Vollmedium

Dulbecco's modified Eagle's medium (4,5g/l Glukose mit Glutamin), versetzt mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml / 10mg/ml, Cambex).

Einfriermedium

DMEM Vollmedium + 10% DMSO (v/v; Merck), steril filtriert

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 Oligonukleotide für PCR-Klonierungsarbeiten

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5' → 3' Orientierung)
SH 12	3'T7-L496A	CAGGAACATCTAGAGGACCTCGCGACC
SH 13	3'Sp6-L496A	CTGTCTGTACTCGGAAGTGGGTTCGCGAGG
SH 17	3'Sp6-Y348A	CACATCTACTAGAGTACCTGCGGCCGGA
SH 18	3'T7-Y348A	CTGGTTCACTGAGACGAGTTCCGGCCGCA
SH 28	3'T7-L493A	GAGGACCTCGTCCCCACTCGCGAGT
SH 29	3'Sp6-L493A	CTTCTGTCTCTGTCTGTACTCGCGAGT
SH 30	3'T7-L496/97A	CAGGAACATCTAGAGGACACGGCGCCCCA
SH 31	3'Sp6-L496/97A	CTGTCTGTACTCGGAAGTGGGGCGCCGTG
SH 35	5' myc-tag	CCAGGTACCATGGAACAAAACCTTATTTCT GAAGAAGATCTGATGGGTGAAACTCTGGGA GAT

2.3.2 Oligonukleotide zur Expressionsanalyse mit PCR

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5' → 3' Orientierung)
SH 55	5' aP2	GAACCTGGAAGCTTGTCTTCG
SH 56	3' aP2	ACCAGCTTGTCACCATCTCG
SH 61	5' LPL	ATCCATGGATGGACGGTAACG
SH 62	3' LPL	CTGGATCCCAATACTTCGACCA
SG 106	5' Aktin	TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG
SG 107	3' Aktin	TTTGATGTCACGCACGATTTC

2.4 Plasmide

2.4.1 Expressionsplasmide in eukaryontischen Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3	pcDNA3 Expressionsvektor	Invitrogen
pCMV- β -Gal	β -Galaktosidase Expressionsvektor	S. Gaubatz
SV-Sport	SV-Sport Klonierungsvektor	Life Technology
SV-PPAR γ_2	PPAR γ_2 im SV-Sport Vektor	P. Tontonoz
SV-PPAR γ_2 S112A	PPAR γ_2 S112A im SV-Sport Vektor	S. Hauser
SV-PPAR γ_2 E499Q	PPAR γ_2 E499Q im SV-Sport Vektor	S. Hauser
SV-PPAR γ_2 M2	PPAR γ_2 M2 im SV-Sport Vektor	S. Hauser
SV-RXR	RXR im SV-Sport Vektor	Mangelsdorf
pCS MT cdh1	Myc-cdh1-Expressionsvektor	C. Pflieger/ M. Kirschner
DR1-Luciferase	Luziferase Reporterplasmid mit dreifacher DR1-Sequenz	B. Spiegelman

2.5 Antikörper

2.5.1 Primäre Antikörper für immunologische Nachweisverfahren

Antikörper <i>anti-</i>	Beschreibung	Herkunft
PPAR γ (E-8): sc-7273	Monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen C-Terminus von PPAR γ	Santa Cruz
c-Myc (9E10): sc-40	Monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen C-Terminus von c-Myc	Santa Cruz

2.5.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper <i>anti-</i>	Beschreibung	Herkunft
Prot.-A HRP	Protein A, Peroxidase gekoppelt	Amersham

2.6 Chemikalien

Soweit nicht besonders aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysenqualität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) und Applichem (Heidelberg) bezogen. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad wurden entweder von Sigma (Deisenhofen) oder Gibco-Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

2.7 Lösungen

2.7.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Puffer und Lösungen in aqua bidest. hergestellt.

Acrylamid-Stammlösung 30% (w/v) Acrylamid (Applichem)
0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (H₂O)
National Diagnostics; Ultra Pure
Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C

Acrylamid-Stammlösung für Harnstoffgele 30% (w/v) Acrylamid (Applichem)
0,3% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (H₂O)
Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C

Ampicillin 0,1g/ml in ddH₂O
Steril filtrieren, aliquotieren, -20 °C

Anodenpuffer I 30mM Tris-Base
20% Methanol

Anodenpuffer II 300mM Tris-Base
20% Methanol

Blocklösung 3% (w/v) Magermilchpulver (Merck)
(Western-Blot) in TBS-T

Bradford-Reagenz 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
4,75% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure
in ddH₂O; *filtrieren, lichtgeschützt lagern*

<u>Blot-Puffer</u>	25mM Tris-Base 150mM Glycin 15% (v/v) Methanol
<u>DEPC-H₂O</u>	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in ddH ₂ O <i>24h 37 °C, rühren, autoklavieren</i>
<u>2mM dNTP Lösung</u>	2mM dATP (alle 100mM, Amersham) 2mM dGTP 2mM dTTP 2mM dTTP in H ₂ O; <i>bei -20 °C gelagert</i>
<u>Elektrophoreseprobenpuffer</u>	60ml 0,5M Tris/HCl pH6,8 3ml 0,5m EDTA 2,3g DTT 12g SDS 15g Glycerol 30mg Bromphenolblau ad 100ml ddH ₂ O <i>aliquotieren, bei -20 °C lagern</i>
<u>Essigsäurelösung</u>	10% Essigsäure (v/v) in ddH ₂ O
<u>Ethidiumbromid</u>	10mg/ml in ddH ₂ O (Roth)
<u>Formalinlösung (10%)</u>	10ml 37% Formaldehyd 90ml ddH ₂ O
<u>IPTG</u>	1M Isopropylthio-β-D-Galaktosidase in ddH ₂ O

<u>Kathodenpuffer</u>	25mM Tris-Base 40mM 6-Aminohexansäure 20% Methanol 0,01% SDS
<u>10x MOPS Puffer</u>	0,4M MOPS pH7,0 0,1M NaAc 0,01M EDTA in DEPC H ₂ O; <i>im Dunkeln lagern</i>
<u>Naßblotpuffer</u>	25mM Tris 150mM Glycin 15% Methanol in ddH ₂ O
<u>PBS</u>	137 mM NaCl 3 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl eingestellt <i>autoklavieren</i>
<u>Phenol/Chlorophorm Lösung</u>	Phenol/Chlorophorm 1:1
<u>Ponceau Lösung</u>	0,1% Ponceau S 5% Essigsäure
<u>Proteingel-Marker</u>	SDS 7B Marker (Sigma) gelöst in 8M Urea in 1xESB
<u>RNA Probenpuffer</u>	1µl 10x MOPS 5µl deion. Formamid 1µl Ethidiumbromid (400µg/ml) 2µl Formaldehyde

<u>RNA Ladepuffer</u>	0,2% Xylenxyanol 0,2% Bromphenolblau 10mM EDTA 50% Glycerol
<u>10x SDS-Laufpuffer:</u>	0,25 M Tris, pH 8,3 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS in ddH ₂ O
<u>20xSSC</u>	3M NaCl 0,3M Na ₃ citrat . 2H ₂ O pH 7,0 mit HCl
<u>50x TAE:</u>	2 M Tris Base (AppliChem) 250 mM Eisessig 50 mM EDTA, pH 8,0 in ddH ₂ O
<u>1x TBE:</u>	89 mM Tris Base (AppliChem) 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
<u>TBS</u>	1M Tris-Cl, pH 7,4 3M NaCl
<u>TBST</u>	50mM Tris-Cl, pH 7,4 150mM NaCl 0,05% (v/v) Tween-20 (Sigma)
<u>TE:</u>	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 1 mM EDTA

10x TES : 0,1 M Tris-Cl, pH 7.5
10 mM EDTA
2 M NaCl

TNN-Lysepuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,5
120 mM NaCl
5mM EDTA
0,5% NP-40
10mM Na₄P₂O₇
2mM Na₃VO₄
100mM NaF
in ddH₂O

vor Verwendung Proteaseinhibitoren zugeben:

1mM DTT, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin,
10µg/ml PMSF

Triton-X 100 Triton-X 100 nichtionisches Surfactant (Spi supplies)

TrizolTM Lösung TrizolTM Gebrauchslösung (Invitrogen)

2.7.2 Lösungen für Luziferase Reporterversuche

ATP-Puffer 25mM Glycylglycin, pH 7,8
2mM ATP (Sigma)
10mM MgSO₄
in ddH₂O

LacZ-Puffer 60mM Na₂HPO₄ pH 8,0
1mM MgSO₄
10mM KCl
in ddH₂O

<u>Luziferin-Lösung</u>	1mM D-Luziferin (Sigma) 25mM Glycylglycin, pH 7,8 im Verhältnis 1:4,5 (v/v) in ddH ₂ O
<u>β-Mercaptoethanol</u>	β-Mercaptoethanol Gebrauchslösung
<u>ONPG</u>	6mg/ml in ddH ₂ O
<u>5x Passiv-Lysepuffer</u>	Lysispuffer Gebrauchslösung (Promega)

2.7.3 Lösungen für die Zellkultur

<u>DMSO</u>	Dimethylsulfoxid (100%)
<u>Lipofectamin 2000TM</u>	Transfektionsgebrauchslösung (Invitrogen)
<u>OptiMem1TM</u>	Optimem Gebrauchslösung mit Glutamax-I (Gibco)
<u>Puromycin</u>	20mg/ml in ddH ₂ O <i>Steril filtrieren, -20°C</i>
<u>Trypsin/EDTA</u>	1x Trypsin/EDTA Lösung (Invitrogen) gebrauchsfertig

2.7.4 PPAR γ -Liganden

PPAR γ -Ligand	Beschreibung	Herkunft
GW347845	Synthetischer PPAR γ -Ligand	GlaxoSmithKline
BRL49653	Rosiglitazon	Novo Nordisk A/S

2.7.5 Proteasom-Inhibitoren

Proteasom-Inhibitoren	Beschreibung	Herkunft
ALLN	Calpain Inhibitor I (Ac-LLnL-CHO)	Sigma
MG-132	N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-Leucin al	Sigma

2.7.6 Standards und Enzyme

2.7.6.1 Standards

Proteingel-Marker SDS 7B Marker (Sigma) gelöst in 0,5ml 8M Urea und 0,5ml 1x ESB; *aliquotieren*, -20 °C

DNA-Marker 1kb DNA-Marker (Invitrogen) in 1x DNA-Ladepuffer, -20 °C

2.7.6.2 Sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Amersham, Gibco und NEB bezogen und die Verwendung zur sequenzspezifischen, enzymatischen Hydrolyse von DNA erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen.

2.7.6.3 Proteinverdauende Enzyme

Trypsin Sigma

2.7.6.4 RNA verdauende Enzyme

<u>RNase A</u>	10mg/ml RNase A (Sigma) in: 10mM Tris pH 7,4 150mM NaCl <i>15 min bei 100°C (DNase Inaktivierung)</i>
RNasin Lösung	10.000 U/ml (Promega)

2.7.6.5 Polymerasen und reverse Transkriptasen

Taq-Polymerase	Invitrogen
Platinum-Pfx-DNA-Polymerase	NEB
MMLV-Reverse-Transkriptase	Invitrogen
Sp6-Polymerase	Roche

2.8 KIT's

Kit	Verwendung	Hersteller
DNA Maxi-Präparationskit TM	präparative DNA-Aufreinigung	Quiagene
ECL Western-Blot Detection TM	Entwicklerlösung	Amersham
PCR Purification Kit TM	Aufreinigung von PCR-Produkten	Quiagene
M-ML-V-RT Kit	cDNA Synthese mit reverser Transkription	Invitrogen
Translationskit	<i>in-vitro</i> Translation	Promega

2.9 Geräte und Materialien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Geräte und Werkzeuge verwendet.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklaven		Heraeus
Bakterieninkubatoren		Heraeus
Blotkammern	Trans-Blot Cell Trans-Blot <i>SemiDry</i>	BioRad
CO ₂ -Inkubatoren	AutoZero CO ₂	Heraeus
Einfrierröhchen	2ml	Nunc
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1,5ml 2ml	Eppendorf
Falkon-Röhrchen	15ml 50ml	Sarstedt
Film	ECL Hyperfilm X-OMAT AR	Amersham Kodak
Filmentwickler		Kodak
Gelelektrophorese-Apparatur	Criterion Cell	BioRad
Hamilton Kanüle	50µl	Hamilton
Heizblöcke	HBT 130	HLC
Luminometer	Lumat LB 9507	Berthold
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus
Pipetten	Pipetman	Gilson
PVDF	0,45µm Porengröße	Millipore
Präzisionswaage		Kern
Quarzküvette	104 QS	Hellma
Schüttelinkubatoren	Modell 25	New Brunswick Co.INC
Spannungsgeräte	PowerVac300	BioRad
Spektrophotometer		Pharmacia Biotech
Sterilbank	LaminAir HA 244865	Heraeus
Sterilfilter	FP30/0,45µm	Schleicher&Schuell
Thermocycler	T1 Thermocycler	Biometra

Tuchklemmen		Wironit
Whatman-Filterpapiere	Gel-Blotting Papier	Schleicher&Schuell
Wasserbäder	SW21C	Julabo
Zählkammer	Neubauer improved	Assistent, Germany
Zellkulturschalen	10cm, 6cm, 24-Loch-Platten	Nunc Brand Products
Zellschaber		Greiner
Zentrifugen	RC-5B Labofuge GL Mikrozentrifuge 5415D Mikrozentrifuge 5417R Megafuge 1.OR	Sorvall Heraeus Eppendorf Eppendorf Heraeus

3. Methoden

3.1 Zellbiologie

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen wurden im Wesentlichen nach Standardmethoden durchgeführt, wie sie z. B. bei Spector (Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1998) beschrieben sind. Alle verwendeten Säugerzelllinien wurden in Adhäsionskultur auf Polystyrol-Zellkulturschalen mit den Durchmessern 1,5 cm, 6 cm oder 10 cm (Nunc, Greiner) gehalten. Die verwendeten Zelllinien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert, dem zusätzlich, soweit ebenfalls nicht anders vermerkt, 10% fötales Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) zugesetzt waren. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Heraeus Begasungsbrutschrank bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre (96%) und 5% CO₂-Begasung. Alle Zellexperimente und Kulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Arbeitsbank (Heräus HeraSafe) durchgeführt.

3.1.1.2 Passagieren von Zellen

Material:

- 10cm Zellkulturschalen (Nunc, Greiner)
- Vollmedium (DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin)
- 0,05% Trypsin-EDTA

Zur Vermeidung eines Wachstumsarrests durch Kontaktinhibition wurden die Zellen abhängig von ihrer Wachstumsdichte alle 2-5 Tage im Verhältnis von 1:2 bis 1:20 verdünnt und erneut auf frischen Zellkulturschalen plattiert. Zu diesem Zweck wurden sie nach Absaugen des Mediums zunächst mit sterilem 1x PBS gewaschen, so dass nach Möglichkeit alle Serumreste, die Proteaseinhibitoren enthalten, entfernt wurden. Zum Ablösen der Zellen von den Kulturschalen wurden sie 3-5 min bei 37 °C

(Temperaturoptimum der Trypsinprotease) mit 1ml einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Ein leichtes Klopfen der Kulturschale erleichterte das Ablösen der Zellen. Die abgelösten Zellen wurden dann in frischem, 37 °C warmen Medium resuspendiert und in Zellkulturschalen überführt, die mit frischem Medium vorbereitet waren. Überschüssiges Trypsin wurde dabei durch einen im Serum vorhandenen Trypsininhibitor inaktiviert.

3.1.1.3 *Einfrieren von Zellen*

Material:

Materialien aus 3.1.1.2 sowie zusätzlich:

- Einfrier-Medium (Vollmedium mit 10% DMSO)
- Einfriergefäße (Nunc, Greiner)
- Styroporbox

Sollen Säugerzellen über einen längeren Zeitraum gelagert werden, bietet sich eine Aufbewahrung bei -180 °C in flüssigem Stickstoff an. Um während des Einfrierens das Entstehen von Eiskristallen, welche die Zellen irreversibel schädigen können, zu vermeiden, wurden sie in einem speziellen Einfriermedium langsam auf Lagertemperatur abgekühlt.

Dazu wurden die Zellen nach Trypsin/EDTA-Behandlung (siehe 3.1.1.2) in Suspension genommen und für 5 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in eiskaltem Einfriermedium (ca. 2ml pro 90% konfluenter 10cm-Durchmesser-Schale) aufgenommen. Dieses Medium enthält zu 90% das üblicherweise verwendete Zellkulturmedium (siehe 2.2.2) und zu 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Die erhaltene Zellsuspension wurde in Nunc Cryogefäßen (1ml) abgefüllt, 5 min auf Eis (-20 °C) inkubiert und dann in einer Styroporbox bei -80 °C gelagert. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.1.1.4 *Auftauen von Zellen*

Material:

Materialien aus 3.1.1.2 sowie zusätzlich:

- 15ml Falcon-Tubes

Das Auftauen von zuvor in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C gelagerten Zellen sollte möglichst schnell erfolgen, um Zellschäden während des Auftauens zu vermeiden. Die tiefgekühlten Zellaliquots wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, bis die Zellsuspension gerade flüssig wurde. Daraufhin wurde die Zellsuspension sofort mit 9 ml vorgewärmten Vollmedium gemischt und danach für 5 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 9 ml vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät.

3.1.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Material:

Materialien aus 3.1.1.2 sowie zusätzlich:

- Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zu diesem Zweck wurde auf das Zählgitter der Kammer ein Deckglas so aufgebracht, dass die sogenannten „Newton’schen Ringe“ erkennbar wurden. Frisch trypsinierte und in einem definierten Volumen resuspendierte Zellen wurden dann mit Hilfe einer Pasteurpipette auf die Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Anschließend wurden die Zellen in 3×16 Feldern gezählt. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 10.000 erhält man die Anzahl der Zellen pro ml Medium.

$$\text{Zellen [ml}^{-1} \text{]} = (\text{Zellzahl/Zahl der gezählten Großquadrate}) \times 10.000$$

3.1.2 Transiente Transfektionen und Transiente Assays

In der vorliegenden Arbeit wurden die transienten Transfektionen in CV1-Zellen und in NIH3T3-Zellen mit Hilfe von Lipofectamin 2000TM durchgeführt, da diese Zellen nicht effektiv nach der Methode der Kalziumphosphatpräzipitation transfiziert werden können.

3.1.2.1 *Transiente Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamin 2000TM*

Material:

Materialien aus 3.1.1 sowie zusätzlich:

- 24-Loch- bzw. 6-Loch-Zellkulturplatte
- Lipofectamin 2000TM
- OptiMem1TM-Medium

Für die schwierig mit Calciumphosphat-Präzipitat zu transfizierenden NIH3T3-Zellen wurden transiente Transfektionen mit der Reagenz Lipofectamin 2000TM (Invitrogen) durchgeführt. Es wurden Zellen von einer Kulturschale abgelöst, gezählt und die Zellen anhand der so ermittelten Zelldichte entsprechend in Vollmedium verdünnt und $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung auf einer 24-Loch Zellkulturplatte bzw. ebenfalls $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung auf einer 6-Loch Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen transfiziert, wobei die Transfektion der 24-Loch Zellkulturplatten in Triplikaten erfolgte. Für die 6-Loch Zellkulturplatten wurden pro zu transfizierender Vertiefung 2µg der Plasmid-DNA in 250µl OptiMem1TM-Medium und für die 24-Loch Zellkulturplatten pro Triplikate 750ng Luziferase-Expressionsplasmid, 500ng β-Galaktosidase-Expressionsplasmid und 750ng PPARγ- bzw. PPARγ-Mutanten-Plasmid-DNA in 150µl OptiMem1TM-Medium gemischt. Dann wurden 6µl Lipofectamin 2000TM pro Triplikate (10µl pro 6-Loch) in einem separaten Eppendorf-Gefäß mit weiteren 150µl OptiMem1TM (250µl für 6-Loch) gemischt und für mindestens 4, aber höchstens 5 Minuten bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf das zuvor pipettierte Gemisch aus Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Zur Transfektion wurden dann 100µl des Ansatzes (bei den 6-Loch-Platten: 500µl) direkt in das Medium zu den Zellen gegeben.

3.1.2.2 *Behandlung von Zellen mit dem PPARγ-Liganden GW 347845*

Material:

- gestripptes Vollmedium (DMEM, 10% gestripptes FCS-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin)
- GW347845 (10mM in DMSO)
- DMSO

GW 347845 ist ein PPAR γ -Ligand, der hochaffin an die AFII-Region der Ligand-bindungsdomäne (LBD) von PPAR γ bindet. Mit ihm wurden Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität und zur Protein- und mRNA-Bestimmung von PPAR γ durchgeführt.

In der Regel wurden die Zellen 20 h nach der Transfektion mit GW 347845 behandelt. Da der Ligand lichtempfindlich ist, sollte man das Licht an der Arbeitsbank dimmen und zügig arbeiten. Es wurden in Falcon-Reaktionsgefäßen die benötigten Volumina von Vollmedium vorgelegt (0,5 ml pro 24-Loch-, 2 ml pro 6-Loch-Zellkulturplatte). Die benötigten Konzentrationen von GW 347845 wurden mittels Verdünnungsreihen mit DMSO hergestellt (GW 347845 ist in DMSO gelöst), in das Medium gegeben und gründlich vermischt. In das Medium für die Zellen, die als Kontrolle nicht mit Ligand behandelt werden sollten, wurde die äquivalente Menge DMSO gegeben. Es ist darauf zu achten, dass das Volumenverhältnis von GW 347845 + DMSO zu Vollmedium den Wert 1 : 1000 nicht überschreitet, da die hohe DMSO-Konzentration ansonsten toxisch auf die Zellen wirkt. Die transfizierten Zellen wurden nach diesen Vorbereitungen einmal mit 1x PBS gewaschen und dann recht zügig mit dem Medium und dem darin enthaltenen Ligand bzw. DMSO versetzt.

3.1.2.3 *Behandlung von Zellen mit dem PPAR γ -Liganden Rosiglitazon*

Material:

- gestripptes Vollmedium (DMEM, 10% gestripptes FCS-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin)
- Rosiglitazon (10mM in DMSO)
- DMSO

Rosiglitazon ist ebenfalls ein PPAR γ -Ligand, der in der AFII-Region der Ligand-bindungsdomäne (LBD) von PPAR γ bindet. Auch er ist lichtempfindlich, in DMSO gelöst und das Protokoll für die Behandlung von Zellen mit Rosiglitazon gleicht dem für GW 347845. Rosiglitazon wurde vor allem als Alternative zu GW 347845 bei Reporterassays, Western-Blots und RT-PCRs eingesetzt.

3.1.2.4 *Behandlung von Zellen mit dem Proteasominhibitor LLnL (ALLN)*

Material:

- gestripptes Vollmedium (DMEM, 10% gestripptes FCS-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin)
- LLnL (10mM in DMSO)
- DMSO

Um den proteasomabhängigen Abbau von Proteinen in Zellen zu unterbinden, können diese Multienzymkomplexe mit chemischen Inhibitoren wie LnLL (N-Acetyl-Leu-Leu-Nor-Leuzinal) blockiert werden. LLnL wurde dem normalen Kulturmedium gleichzeitig mit dem Schritt der Ligandbehandlung in den bei den Experimenten angegebenen Endkonzentrationen beigegeben. Die Verdünnung des Proteasominhibitors und der Ausgleich bei unbehandelten Zellen erfolgte wieder mit DMSO.

3.1.2.5 *Behandlung von Zellen mit dem Proteasominhibitor MG-132*

Material:

- gestripptes Vollmedium (DMEM, 10% gestripptes FCS-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin)
- MG-132 (10mM in DMSO)
- DMSO

MG-132 ist wie LnLL ein Proteasominhibitor. Es hemmt allerdings spezifischer den proteasomabhängigen Abbau und hat keinen Effekt auf die endogenen unspezifischen Phosphatasen, die auch eine Rolle bei der Degradation von Proteinen spielen und von LnLL mitaktiviert werden. Die Behandlung mit MG-132 erfolgt analog derer mit LnLL, jedoch lässt schon eine Endkonzentration von $> 25 \mu\text{M}$ MG-132 fast 100% der NIH3T3-Zellen zu Grunde gehen.

3.2 Biochemische Arbeitsmethoden

3.2.1 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Material:

- PBS, eiskalt
- 5x Passiv-Lysepuffer (Promega)
- Luziferin-Substratmix
- ATP-Puffer
- Luminometer-Reagenzröhrchen

Das Enzym Luziferase aus *Lamprohiza Splendidula* (Glühwürmchen) spaltet Luziferin in einer ATP-abhängigen Reaktion unter Emission von Licht. Die entstehenden Lichtblitze (*Relative Light Units*, RLU) können mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden.

Durch Kopplung regulierender DNA-Sequenzen (Promotoren) mit dem Luziferase-Gen auf einem entsprechenden Plasmid erfolgt die Luziferase-Expression unter der Kontrolle dieser Sequenz. Die Lumineszens aus Lysaten Luziferase exprimierender Zellen ist ein direktes Maß für den Luziferase Proteingehalt der Zelle. Somit kann auf die Aktivität eines Promotors indirekt zurückgeschlossen und diese quantifiziert werden.

Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Ligandbehandlung (30–48 Stunden nach der Transfektion) bei 4 °C zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde pro 1,5 cm Zellkulturschale jeweils 100 µl eines „Passiven Lysepuffers“ zugegeben und der Ansatz mindestens 20 Minuten auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Dann wurden jeweils 30 µl des Zelllysates in einem Luminometer-Reagenzröhrchen frisch mit 350 µl Reaktionspuffer (2 mM ATP pH 7,0; 0,1 M MgSO₄; 25 mM Gly-Gly pH 7,8) versetzt und die Lichtemission im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) nach Zugabe von 150 µl Substratmix (0,2 mM D-Luziferin (Applichem); 25 mM Gly-Gly pH 7,8) gemessen.

3.2.2 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Material:

- LacZ-Puffer
- ONPG- Lösung (6mg/ml ONPG in ddH₂O)
- β -Mercaptoethanol
- Halbmikro-Einmalküvetten

Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in den Lysaten diente dem Abgleich möglicherweise unterschiedlicher Transfektionseffizienzen der einzelnen Proben. Zur Normalisierung der Werte wurde bei den Reporterassays daher der Quotient aus Luziferaseaktivität / β -Galaktosidaseaktivität gebildet und der Mittelwert jeder Transfektion (3-fach Ansatz) berechnet.

Die β -Galaktosidaseaktivität in den Lysaten von Zellen, in die das CMV- β -Gal Expressionsplasmid transfiziert worden war, wurde in einer Farbreaktion bestimmt. Dazu wurden 50 μ l des Zelllysats zu 932 μ l Reaktionspuffer (LacZ Puffer: 60 mM Na₂HPO₄ pH 8,0; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄) und 2,4 μ l β -Mercaptoethanol in eine Halbmikro-Einmalküvette gegeben und mit 65,6 μ l Substratlösung (6 mg/ml ONPG, O-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid in Wasser) gemischt. Dann wurden die Küvetten bei 37 °C für ½ - 10 Stunden inkubiert, bis eine deutlich sichtbare Gelbfärbung auftrat. Die Konzentrationsbestimmung des entstandenen Produktes und damit die Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase erfolgte durch Messung der Absorption bei 420 nm.

3.2.3 Berechnung der relativen Luziferase-Aktivität und Statistik

Zur Bestimmung der korrigierten Luziferase-Aktivität wurden die gemessenen RLU aus der Luziferase-Messung, abzüglich des arithmetischen Mittelwertes der Leerwerte, durch die entsprechenden Absorptionswerte des β -Galaktosidasetests dividiert. Für jedes der Triplikate wurde der arithmetische Mittelwert berechnet und sämtliche Mittelwerte zur Vereinfachung durch den Bezugswert dividiert. Dadurch ergibt sich für den Bezugspunkt der Betrag 1 bzw. 100%. Zur Berechnung der Standard-Abweichung wurden die Werte der korrigierten Luziferase-Aktivität verwendet und die Ergebnisse ebenfalls durch den Bezugswert dividiert. Aus den so gewonnenen Daten wurden

Balkendiagramme erstellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Analyse und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit *Microsoft ExcelTM*.

3.2.4 Herstellung von Zellysat (totale Zellyse)

Material:

- PBS, eiskalt
- TNN Lysepuffer + Proteaseinhibitoren (frisch: 1mM DTT 1:1000, 10 µg/ml Aprotinin 1:1000; 10 µg/ml Leupeptin 1:1000; 10 µg/ml PMSF 1:200)
- Plastikspatel

Die komplette Lyse der Zellen erfolgte mit Detergenzien des Lysepuffers. Dieser enthielt 1xPBS, das frisch im Verhältnis von 1000 : 1 mit Proteaseinhibitoren versetzt war (1 mM DTT; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml PMSF (PMSF 1:200)), und zu einem Anteil von 1% mit Triton-X-100 und zu 0,5% mit Desoxycholat. Die Zellen wurden bei 4 °C zweimal mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen, bevor 750 µl (10 cm Zellkulturschale; bei 3 cm Schalen 200 µl) Lysepuffer auf den Zellrasen gegeben wurde. Die Zellen wurden dann mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers von der Unterlage entfernt und in Suspension gebracht. Diese Suspension, Zellen und Puffer, wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 20 Minuten auf Eis (4 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einer Heräus Biofuge Fresco mit 14.000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde das Zellysat von Zelltrümmern befreit. Der klare Überstand der Zentrifugation wurde für weitere Experimente in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellysaten wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode durchgeführt (Bradford, 1976). Sofern die Zellysate nicht sofort verwendet wurden, wurden sie bei -80 °C eingefroren.

3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Material:

- Bradford-Reagenz
- 150mM NaCl
- TNN-Lysepuffer
- Halbmikro-Einmalküvetten

Die von Bradford 1976 beschriebene Methode basiert auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn Proteine gebunden werden. Dabei verhalten sich Extinktion und der Proteingehalt annähernd proportional. Es wurde ein Aliquot der Proteinlösung (2-10 µl) mit 100 µl einer 150 mM NaCl-Lösung und 1 ml Bradfordlösung in einer Mikroküvette gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben gegen einen Leerwert bei 595 nm gemessen. Für die Western-Blot-Experimente reichte es, die relativen Proteinkonzentrationen berechnen zu können, da nur gleiche Mengen an Protein auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden sollten. Sollten noch die absoluten Proteinkonzentrationen ermittelt werden, so musste parallel eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen an Rinderalbumin (BSA, 1 mg/ml Stammlösung) erstellt werden.

3.2.6 Aufkonzentrierung von Proteinen mittels TCA-Fällung

Material:

- 20% TCA-Lösung
- 100% Aceton
- 1x SDS-Probenpuffer

Da die Taschen eines Polyacrylamid-Gels nur ein begrenztes Volumen an Proteinlösung fassen können, war es nötig, das Protein aus den Zelllysaten höher zu konzentrieren.

Es wurden äquivalente Stoffmengen der verschiedenen Zelllysate in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt (Volumen konnte über die Proteinbestimmung nach Bradford berechnet werden.). Dann wurde 20%-ige TCA-Lösung im Volumenverhältnis 1 : 1 zu dem jeweiligen Ansatz zugegeben und die Suspension für 10 Minuten auf Eis (4 °C) inkubiert. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation in einer Heräus Biofuge Fresco bei 4 °C mit 14.000 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen (Eppendorf-Reaktionsgefäß gründlich vortexen). Der Ansatz wurde erneut für 3 Minuten bei 4 °C mit 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet sofort in 30 – 300 µl 1xSDS-Probenpuffer aufgenommen. Nachdem sich das auf einem Schüttler bei RT inkubierte Pellet vollständig gelöst hatte,

wurde der Ansatz 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Wurde die Proteinlösung danach nicht sofort verwendet, wurde sie bei -80 °C eingefroren.

3.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Material:

- für das Trenngel: Acrylamid-Stammlösung, 1,5M Tris-Puffer pH 8,8, 20% SDS, 10% APS, TEMED
- für das Harnstoffgel: 8g Harnstoff, 11,6 ml Acrylamid-Lösung für Harnstoffgele, 8,7ml 1,5M Tris-Cl pH 8,8, 175µl 20% SDS, 23µl TEMED, 230µl 10% APS auf eine Gesamtlösung von 35ml mit ddH₂O
- für das Sammelgel: Acrylamid-Stammlösung, 0,5 M Tris-Puffer pH 6,8, 20% SDS, 10% APS, TEMED
- EBS-Probenpuffer
- SDS 7B Proteinmarker (Sigma) als molekularer Massenstandard
- 1x SDS-Laufpuffer
- Elektrophoresekammer, Gelkamm, Glasplatten, Spacer, Klammern, Gummibezug, Ethanol

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). SDS denaturiert Proteine und geht nichtkovalente Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen ein. Dabei ist das Verhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäure annähernd konstant. Durch die komplette Entfaltung und den Besatz mit SDS werden Ladungsunterschiede ausgeglichen, alle Proteine erhalten eine negative Ladung und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Da die spezifische Ladung gleich ist, hängt die Wanderung neben der Durchlässigkeit der Matrix nur vom Molekulargewicht der Proteine ab.

Für die Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Diese bestehen aus einem oberen Sammelgel, welches dazu dient, scharfe Banden zu erreichen, und einem unteren Trenngel, welches die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten gründlich mit Ethanol gesäubert, mit Spacern und Klammern zusammengesetzt und die Kanten mit einer Gummiform abgedichtet. Für 15ml Trenngel wurden 5ml Acrylamid-

Stammlösung, 3,7 ml 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8, 75µl 20% SDS, 100µl APS (10%) und 10µl TEMED mit ddH₂O gemischt und nach kurzem Vortexen in die Gelapparatur gegossen. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das noch unpolymersierte Gel mit ddH₂O überschichtet. Nach vollständigem Auspolymerisieren wurde das Wasser entfernt. Alternativ wurden Harnstoffgele als Trenngel eingesetzt, da das entstehende Harnstoffkristall-Gitternetzwerk eine noch feinere molekulargewichtsabhängige Auftrennung der Proteinbanden, z.B. in Phospho-Isoformen zulässt. Für das Sammelgel wurde 0,8ml Acrylamid-Stammlösung mit 0,7ml 0,5M Tris-Puffer pH 6,8, 25µl 20% SDS, 25µl 10% APS, 2,5µl TEMED und 3447,5µl ddH₂O gemischt, über das Trenngel gegossen und sofort unter Vermeidung von Luftblasen ein Gelkamm eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Gelkamm entfernt, das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und in 1xSDS-Laufpuffer in der Anoden- und der Kathodenkammer äquilibriert.

Sofern nicht schon geschehen, wurden die aufzutrennenden Proteinproben in 1xSDS-Probenpuffer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach kurzem Herunterzentrifugieren wurden sie dann in die Taschen des Gels geladen. Als molekularer Massenstandard wurde der Proteinmarker (SDS 7B Sigma) in einer der Geltaschen mitgeführt (10µl). Bei einer Stromstärke von ca. 35 mA für ein reines Polyacrylamid-Trenngel und 30mA für ein Harnstoff-Trenngel wurden die Proteine aufgetrennt bis das Bromphenolblau aus dem ESB-Probenpuffer am unteren Ende des Gels angelangt war. Die weitere Analyse des Gels vollzog sich dann mit der Methode des Western-Blots.

3.2.8 Analyse von Proteinen durch Western-Blot

Material:

- PVDF-Membran
- 100% Methanol
- Whatman-3M-Filterpapier
- Anodenpuffer I und II
- Kathodenpuffer
- Blotpuffer
- Blotkammer (BioRad) mit Schwämmen, Gelkassetten und Kühlelement bzw. Semi-dry-Blotkammer
- Ponceau S-Lösung (0,1% Ponceau S (Sigma), 5% Essigsäure)

- Antikörper/Antiserum gegen gesuchtes Protein
- TBS-T
- Blocklösung (5% Magermilchpulver in TBS-T)
- ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham) [Lösung 1 und 2]
- Frischhaltefolie („Saran-Wrap“)
- Autoradiographie-Kassette (Fisher Scientific)
- ECL-Hyperfilm (Amersham)
- Kodak Filmentwickler

Mit dieser Methode erfolgte der Nachweis der durch SDS-Page aufgetrennten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Im ersten Schritt lässt man die Proteine durch ein transversal zur Oberfläche des Gels angelegtes elektrisches Feld auf der anodischen Seite aus dem Gel austreten und transferiert sie auf eine Nitrozellulose-Membran. Dort nehmen die Proteine genau die Position ein, die sie schon im Gel belegten. Die auf der Oberfläche der Nitrozellulose immobilisierten Proteine sind nun immunologischen Reaktionen zugänglich. Dazu wird die Membran in einer Lösung, die gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Antikörper enthält, inkubiert. Nach Abwaschen des nicht gebundenen Antikörperüberschusses wird ein Zweitantikörper, der gegen die konstanten Domänen der schweren Kette des Erstantikörpers gerichtet ist, hinzugegeben. Dieser Zweitantikörper ist mit einer Markierung gekoppelt, meist einem Enzym, dessen Reaktionen den hochspezifischen Nachweis des erwünschten Proteins erlauben.

3.2.8.1 *Semi-dry Transfer mit 3-Puffersystem*

Zunächst wurde die Nitrozellulose-Membran (PVDF-Membran) jeweils unter Vermeidung von Verunreinigungen auf die Größe des Acrylamid-Gels zurechtgeschnitten. Außerdem wurden neun Whatman-3M Papiere in derselben Größe wie die PVDF-Membran hergestellt. Die PVDF-Membran wurde eine Minute in 100% Methanol und anschließend in Anodenpuffer I inkubiert. Der elektrophoretische Transfer der Proteine wurde in einer Transblot SD Apparatur (Bio-Rad) vorgenommen. Drei Whatman-3M Papiere wurden in Anodenpuffer II getränkt und luftblasenfrei übereinander auf die Anode der Blot-Apparatur gelegt. Darauf wurden drei weitere in Anodenpuffer I getränkte Whatman-3M Papiere, die vorbehandelte PVDF-Membran, dann das Polyacrylamidgel und schließlich nochmals drei in Kathodenpuffer getränkte

Whatman-3M Papiere gelegt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte dann für 1,5 Stunden bei konstanten 25 V.

3.2.8.2 Tankblot

Genau wie beim Semidryblot wurden die PVDF-Membran und zwei Whatman-3M Papiere auf die Größe des Acrylamid-Gels zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde eine Minute in 100% Methanol und anschließend in Blot-Puffer inkubiert. Die zwei Schaumstoffkissen der Tankblotapparatur (Trans-Blot Cell) sowie die beiden Whatman-3M Papiere wurden mit Blot-Puffer getränkt. Auf das Blot-Gerüst wurden dann die folgenden Elemente von der Anodenseite ausgehend luftblasenfrei übereinandergeschichtet: Zunächst ein Schaumstoffkissen, darauf eines der Whatman-3M Papiere, es folgte die PVDF-Membran, dann das Polyacrylamidgel, das weitere Whatman-3M Papier und schließlich das zweite Schaumstoffkissen. Das Blot-Gerüst wurde zusammen mit einem Kühlaggregat in der Blot-Kammer platziert. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte dann für 1 – 1,5 Stunden bei konstanten 300 mA oder für 2 Stunden bei 200 mA (konstant).

3.2.8.3 Ponceau-Färbung der Westernblot-Membran

Um zu kontrollieren, ob das Gel homogen gelaufen war, gleiche Mengen an Protein geladen worden waren und ob der Proteintransfer überhaupt erfolgreich war, wurde das transferierte Protein auf der PVDF-Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Nach einer kurzen Inkubation der PVDF-Membran in Ponceau S-Lösung wurde die Membran mit deionisiertem Wasser gespült, worauf die Proteinbanden sichtbar wurden. Bei weiterem Spülen konnte die Membran schließlich wieder entfärbt werden.

3.2.8.4 Detektion

Die auf der Oberfläche der Nitrozellulose immobilisierten Proteine waren nun in weiteren Schritten immunologischen Reaktionen zugänglich. Zur Vermeidung von unspezifischer Bindung der Antikörper an die Nitrozellulose wurde die Membran anschließend an den Transfer bzw. die Ponceau-Färbung sofort in Blocklösung überführt und für 15 Minuten bis 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Dadurch wurde die Membran abgesättigt. Wurde der Blot länger als über eine Nacht (bei 4 °C) inkubiert, musste Natrium Azid-Lösung (5%) bis zu einer Endkonzentration von 0,05% zugeführt werden. Die Inkubation mit dem ersten

Antikörper erfolgte (standardmäßig in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocklösung) 2-4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde danach einmal 10 Minuten und zweimal 5 Minuten mit TBS-T (1x TBS; 0,05% Tween-20) gewaschen und für eine Stunde in TBS-T-Lösung mit dem sekundären Antikörper (standardmäßig anti-mouse, an horse radish peroxidase (HRP) gekoppelt; 1:5000) inkubiert. Danach wurde erneut mit TBS-T gewaschen: einmal 10 Minuten und zweimal 5 Minuten. Daraufhin wurde die Membran eine Minute lang in Entwicklungslösung (125 µl Detection Reagent Lösung 1 und 125 µl Detection Reagent Lösung 2 sowie 2,25 ml H₂O) inkubiert und zur Exposition dann in Klarsicht-Frischhaltefolie verpackt. Die Luminol enthaltende Lösung 2 erzeugte zusammen mit der Peroxidase enthaltenden Lösung 1 eine Chemolumineszenz, die sich mit geeigneten Filmen nachweisen lässt. Die Expositionszeit auf einem ECL Hyperfilm erfolgte je nach erwarteter Signalstärke zwischen 5 Sekunden und 15 Minuten. Die Schwärzung des Filmes ist in gewissen Grenzen der Menge an gebundenem Antikörper und damit der Menge an nachzuweisendem Protein proportional.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt. Verwendete Puffer, Medien und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert. Ihre Zusammensetzung kann, sofern nicht angegeben, den Methodenbüchern „Molecular Cloning; A Laboratory Manual“ (Sambrook *et al.*, 1989), bzw. den „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1987) entnommen werden. Als E.-Coli Stamm wurden sofern nicht anders angegeben DH5α Bakterien verwendet (Hanahan, 1983). Standardmethoden wie Plasmidpräparationen in analytischem Umfang, Ligationen, Herstellung kompetenter Bakterienzellen, Transformationen, Verdau mit Restriktionsendonukleasen, sowie analytische und präparative Agarosegelelektrophorese, Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung wurden entsprechend der oben genannten Protokollbücher durchgeführt.

Plasmidpräparationen in präparativem Umfang wurden säulenchromatographisch mit einem System der Firma Qiagen nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt.

3.3.2 Kultivierung von Bakterien

Standardmäßig wurden für die Molekularbiologie die superkompetenten E. coli-Bakterien DH 5 α eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit oder ohne 100 μ g/ml Ampicillin bei 37 °C in Schüttelinkubatoren. Zur dauerhaften Lagerung wurden 0,5ml einer Übernachtskultur mit 0,5ml Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.3.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Material:

- LB-Agarplatten mit Selektionszusatz
- LB-Medium
- kompetente Bakterien

Transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und das gewünschte Plasmid (1 μ l) oder der Ligationsansatz (5 μ l – gesamter Ansatz) zu 150 μ l der Bakterienlösung zugegeben. Die Bakterien wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann 2 Minuten bei 42 °C hitzegeschockt (Öffnung der Poren). Sofort danach wurden 750 μ l LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben. Die Kultur wurde für 30 – 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend entweder in eine Flüssigkultur überführt oder auf LB-Amp-Agarplatten in geeigneter Konzentration ausgestrichen.

3.3.4 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Präp)

Material:

- TE-Puffer
- Lysepuffer [200mM NaOH, 1% SDS]
- Neutralisationspuffer [3 M Kaliumacetat pH 4,8]

- Phenol/Chlorophorm (1:1)
- Ethanol 100%
- Ethanol 70%

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde je eine Kolonie von dem Bakterienrasen einer LB-Amp-Agarplatte gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Amp-Medium bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert.

1,5 ml dieser Übernachtskultur von transformierten E. coli wurde für 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Rest der Übernachtskultur wurde bei 4 °C gelagert. Das Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer (E2, Gibco Maxiprep Kit) aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 150 µl Neutralisationspuffer (E3, Gibco Maxiprep Kit) zugegeben und der Ansatz sanft gevortext. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen pro Minute und der Überstand (ca. 400 µl) wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 200 µl Phenol-/Chlorophorm-Lösung (1:1) zugegeben, gründlich gemischt (vortex) und der Ansatz eine weitere Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. 350 µl der wässrigen, oberen Phase wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl 4 °C kaltem 100%igen Ethanol versetzt. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand verworfen, das Pellet kurz getrocknet und dann in 20 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

3.3.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi- bzw. Midi-Präp)

Material:

- QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) [Qiafilter Maxi Filtrationseinheit, QIAGEN-tip 500 Säule, Puffer E1 mit Rnase A, E2, E3, E4, E5, E6]
- Isopropanol
- Ethanol 70%
- TE-Puffer

Um größere Mengen eines Plasmides zu gewinnen, wurden 250 ml [Midi-Präp: 25 ml] einer E. coli Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen) für den DNA-Maxi Kit verarbeitet. Die nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 4 °C mit

5.000 Umdrehungen pro Minute gewonnenen Pellets wurden in 10 ml E1-Puffer (mit RNase A) [4 ml P1] resuspendiert. 10 ml E2-Lysepuffer [4 ml P2] wurden zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml E3-Neutralisationspuffer [4 ml P3] zugegeben, vorsichtig gemischt und der gesamte Ansatz mit 8.000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde die Maxiprep-Kit-Anionenauschersäule mit 30 ml Äquilibrierungspuffer [4 ml QBT-Puffer] äquilibriert. Das mit Filterpapier grob gereinigte Lysat wurde dann auf die Anionenauschersäule pipettiert. Danach wurde die Säule zweimal mit 30 ml E5-Waschpuffer [10 ml QC-Puffer] gewaschen bevor dann die DNA mit 15 ml E6-Elutionspuffer [5 ml QC-Puffer] in ein neues 30 ml Sarstedt Zentrifugen-Reaktionsgefäß eluiert wurde. Zur Elution wurden dann 10,5 ml Isopropanol [3,5 ml] zugegeben, durch vortexen gut gemischt und der ganze Ansatz dann für 30 Minuten mit 8.000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol (4 °C) [2 ml] gewaschen. Nach 10 Minuten weiterer Zentrifugation mit 8.000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C wurde das Ethanol abgesaugt, das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 200 – 400 µl TE-Puffer [100 µl] aufgenommen. Die Konzentration wurde dann nach photometrischer Bestimmung auf 1 µg/µl eingestellt.

3.3.6 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde durch photometrische Messung ihrer Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda_{260\text{nm}}$ (A_{260}) in einer Quarzküvette (Hellma 104 QS, Schichtdicke: 1 cm) bestimmt. Dazu wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Die Reinheit einer Präparation wurde aus dem Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm zu 280 nm bestimmt, wobei der Quotient für DNA bei 1,8 (+/- 0,2) und für RNA bei 2,0 (+/- 0,2) liegen sollte.

3.3.7 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Material:

- Restriktionsendonuklease (Amershem, Gibco, NEB)
- 10x Reaktionspuffer, je nach Enzym (Amershem, Gibco, NEB)
- RNase A

Die sequenzspezifische, enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den vom jeweiligen Hersteller vorgegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen.

Das Volumen der eingesetzten Restriktionsenzymlösung überschritt in keinem Fall 1/10 des Gesamtvolumens des Reaktionsansatzes, um die Reaktion durch das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin nicht zu beeinträchtigen.

Folgende Ansätze wurden standardmäßig verwendet:

Analytischer Verdau:

- 0,5 – 1,0 µg DNA
- 2 µl 10xPuffer
- 0,5 µl Restriktionsenzym
- mit ddH₂O auf 20 µl Gesamtvolumen

Präparativer Verdau:

- 1,0 – 5,0 µg DNA (bei Vektoren 1 µg)
- 5 µl 10xPuffer
- 2,5 µl Restriktionsenzym
- mit ddH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen

3.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Material:

- 10x Pfx-Polymerase-Puffer
- Pfx-DNA-Polymerase
- dNTPs (dATP + dGTP + dCTP + dTTP), 2mM
- 2 Oligonukleotide als Primer
- DNA mit zu amplifizierender Sequenz

Für die Klonierungsarbeiten sowie zur Expressionsanalyse spezifischer Gene wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die Polymerase-Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) ist ein automatisiertes *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation und Modifikation von DNA-Abschnitten definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Dabei werden zwei Oligonukleotide als Primer verwendet, die nach Hitzedenaturierung der zu amplifizierenden DNA bei 94°C mit der Zielsequenz hybridisieren („*Annealing*“). Die Synthese des Komplementärstranges erfolgte durch eine thermostabile DNA-abhängige Pfx-Polymerase, abgeleitet von *Thermococcus sp.*, bei 72°C. Durch vielfaches Durchlaufen dieser Zyklen wird die Zielsequenz exponentiell amplifiziert. Für jedes PCR-Produkt wurde zunächst ein dem folgenden entsprechender Ansatz pipettiert:

0,5 µl “Mutter”-DNA („template“)

5 µl 10x Pfx-Puffer

5 µl dNTPs (2mM)

1 µl MgSO₄

2,5 µl 10 µM 5' Primer

2,5 µl 10 µM 3' Primer

0,5 µl Pfx-Polymerase (NEB)

auf 50 µl mit destilliertem H₂O auffüllen

Die Reaktionen wurden im T1-Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

Das Flussdiagramm zeigt den Ablauf der PCR (Abb.3.1).

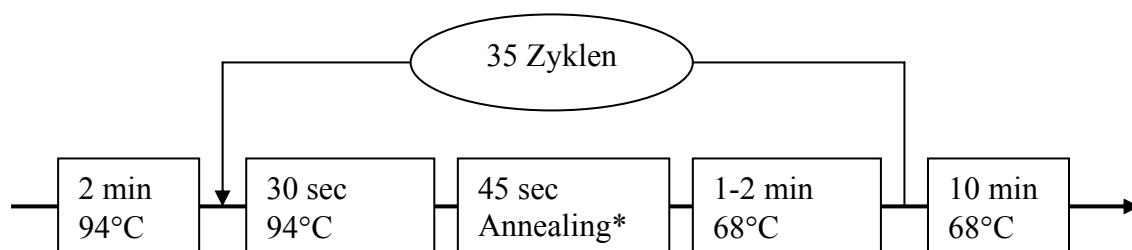


Abb.3.1: Flussdiagramm zum Ablauf der PCR-Reaktion.

*die Annealing-Temperaturen sind Primer-abhängig

Die Annealing-Temperaturen wurden aus den Schmelztemperaturen der Primer entwickelt und ggf. empirisch modifiziert. Für die Klonierungsarbeiten wurden 52 °C als Annealing-Temperatur verwendet.

3.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Material:

- 10x T4-DNA-Ligasepuffer (NEB)
- T4-DNA-Ligase (NEB)

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde das Enzym T4-DNA-Ligase (NEB) verwendet. 1 µl linearisiertes Plasmid wurde zusammen mit 7,5 µl des einzuklonierenden DNA-Fragmentes, 1 µl 10x T4-Puffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert. Sollten zwei Fragmente gleichzeitig in einen Vektor kloniert werden, verwendete man 1 µl T4-DNA-Ligase und 3,5 µl von jedem DNA-Fragment, wenn diese ungefähr dieselbe Größe aufwiesen. War ein DNA-Fragment über 100 bp kleiner als das andere, wurden vom kleineren 4,5 µl und vom größeren nur 2,5 µl eingesetzt. Die Ansätze der „Zwei-Fragment-Klonierung“ wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von seqlab Sequence Laboratories Göttingen GmbH unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide durchgeführt. Die gewonnenen Sequenzdaten wurden mit DNASTARTM Software verarbeitet.

3.3.11 DNA-Gelelektrophorese

Material:

- Elektrophoresekammer, Gelkämme
- Agarosegel [Agarose (Gibco BRL) in 1x TAE in der Mikrowelle kochen, abkühlen lassen, Ethidiumbromid (Sigma) zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugeben, in Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gießen, erstarren lassen]
- 1x TAE-Puffer, verdünnt aus 50x TAE

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- 10x Ladepuffer- 100bp oder 1kb Leiter (Gibco BRL) als Massenstandard |
|---|

Für die Analyse von Plasmiden, die Überprüfung von Restriktionsreaktionen und die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,7 – 1,5 % gewählt. Die jeweilige Menge Agarose (Gibco) wurde in 1xTAE-Puffer aufgekocht, auf 50 °C abgekühlt, mit 10mg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen geeigneten Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen des DNA-Ladepuffer (5x Stopp-Puffer) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Das Gel wurde dann mit einer Spannung von 10 – 130 Volt (konstant) gefahren. Die DNA Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht.

3.3.12 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Material:

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) [QIAquick-Säulen, Puffer QG, PE, EB] |
|---|

Um DNA-Fragmente aufzureinigen, wurden sie zunächst anhand ihrer Größe im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande mit der gewünschten Größe wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Agarosestückchen eingewogen. Die Extraktion der DNA erfolgte dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen. Es wurden 3 µl QG-Puffer pro mg Gelstückchen in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und der gesamte Ansatz bei 50°C inkubiert, bis sich das Gelstückchen vollständig in dem Puffer gelöst hatte (ca. 10 min). Die Lösung wurde dann auf eine „Qiaquick spin column“ aufgetragen und 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen und die Säule mit 0,75 ml PE-Waschpuffer gefüllt und erneut 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Durchsatz wurde erneut verworfen und die Säule noch einmal mit 13.000 Umdrehungen pro Minute 1 Minute lang zentrifugiert. Die Säule wurde daraufhin in einem frischen Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert und es wurden 45 µl EB-Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Während der

folgenden Zentrifugation (2 min, 13.000 Umdrehungen pro Minute) wurde dann die DNA aus der Säule eluiert und im Eppendorf-Gefäß aufgefangen.

3.3.13 Arbeiten mit RNA

Ribonukleasen (RNAsen) sind sehr stabile Enzyme und nur durch extreme chemische Behandlungen inaktivierbar. Alle hier verwendeten Lösungen wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt, Ausnahme waren TRIS-gepufferte Lösungen, die mit DEPC behandeltem ddH₂O angesetzt wurden. Glasgefäße, Gelelektrophoresekammern und sonstige Gebrauchsmaterialien zum Arbeiten mit RNA wurden vor Gebrauch sorgfältig gereinigt und zur Inaktivierung von RNAsen mit 0,2M NaOH gespült.

3.3.14 Isolierung von RNA

Material:

- TrizolTM-Lösung
- Latex-Einmalhandschuhe
- Plastikspatel
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol 75%
- DEPC-H₂O

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde mit Hilfe von TrizolTM-Reagenz, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, durchgeführt.

Wichtig für alle Experimente mit RNA ist das Tragen von Latex-Einmalhandschuhen, da so die Kontamination mit RNAsen, die in nicht geringer Zahl an den menschlichen Händen vorkommen, vermieden wird. Außerdem müssen alle Arbeiten der RNA-Isolation mit TrizolTM wegen der Giftigkeit dieses Stoffes unter dem Abzug durchgeführt werden.

Zunächst wurde das Medium von den 10 cm Zellkulturschalen abgesaugt und danach wurde pro Schale unter dem Abzug 1 ml TrizolTM-Lösung zugegeben. Daraufhin wurde der Zellrasen mechanisch mit Hilfe eines Plastikspatels von der Schale gelöst und die Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Ansätze wurden

zunächst 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 Sekunden gevortext. Es folgte eine 2-3 minütige Inkubation bei Raumtemperatur, wonach die Ansätze dann 10 Minuten mit 12.000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C zentrifugiert wurden. Die obere wässrige Phase wurde sodann in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt und der Ansatz wieder gevortext. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gemische noch einmal 10 Minuten mit 12.000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet, in dem sich jetzt die RNA befand, einmal mit 1 ml 75% Ethanol (4 °C) gewaschen, gevortext und dieser Ansatz dann mit 9.000 Umdrehungen bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Während aller Verzögerungen im Versuchsablauf wurden die Ansätze sofort auf Eis (4 °C) gestellt, um jegliche Zersetzungs- oder Abbaureaktionen zu unterbinden oder zu verlangsamen. Schließlich wurde der Überstand der letzten Zentrifugation verworfen, die RNA in DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration wie unter 3.3.6 bestimmt.

3.4 Expression und Analyse von Proteinen

3.4.1 Semiquantitative Expressions-Analyse von RNA-Proben mit RT-PCR

Material:

- M-ML-V-RT Kit (Invitrogen)
- MMLV-Reverse-Transkriptase
- für PCR: Materialien aus 3.3.8 ohne Pfx-Polymerase bzw. -Puffer
- Taq-Polymerase

Das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase (RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Es ist also in der Lage, an einer RNA einen komplementären Einzelstrang zu synthetisieren. Kombiniert man diese Reaktion mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), kann dieser DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang komplettiert und dann beliebig vervielfältigt werden. Diese Methode wurde zur semiquantitativen Expressionsanalyse von RNA verwendet. Hierzu wurde die RNA-abhängige retrovirale reverse Transkriptase des Maus Moloney Virus (M-MLV-RTase) verwendet. Als Oligonukleotide für die reverse Transkription wurden „Random Primer“ eingesetzt, deren komplementäre Sequenz häufig und gleichmäßig im Genom verteilt ist.

3.4.1.1 Reverse Transkription von RNA und cDNA-Synthese

Für eine reverse Transkriptionsreaktion wurden 0,5µg RNA mit 0,5µl *Random* Oligonukleotiden (0,5 µg/µl) und 5µl 2mM dNTPs versetzt und das Reaktionsvolumen auf 12µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann für 5 min in einem T1 Thermocycler bei 65 °C zur Denaturierung erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 4µl Reaktionspuffer, 2µl 0,1 mM DTT und zur Stabilisierung 1µl RNasin zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 25 °C zur Hybridisierung der Oligonukleotide inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch Zugabe von 1µl M-MLV-RT gestartet und für 50min bei 37 °C durchgeführt. Es folgte die Inaktivierung des Enzyms durch 15 minütige Erhitzung auf 70 °C. Auf diese Weise wurden 20µl cDNA erhalten. Eine Reaktion wurde ohne reverse Transkriptase angesetzt, um DNA Kontaminationen in den RNA Proben auszuschließen.

3.4.1.2 Spezifische Amplifizierung von cDNA

Zur spezifischen Amplifizierung der cDNA wurden PCR Reaktionen durchgeführt (siehe: 3.3.8). Pro Ansatz wurden 2µl cDNA eingesetzt. Die Temperatur- und Reaktionsbedingungen für die jeweiligen genspezifischen Oligonukleotide wurden optimiert und angepasst, so dass die Menge des Endprodukts im linearen Bereich lag und eine semiquantitative Analyse der Expression spezifischer Gene möglich war. In einem T1 Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

- | | | |
|----------------------------|------|----------------------------|
| (1) Initiale Denaturierung | 94°C | 3min |
| (2) Denaturierung | 94°C | 30sec (LPL: 20sec) |
| (3) Hybridisierung | X°C | x sec zurück zu (2); x-mal |
| (4) Polymerisation | 72°C | 1min (LPL: 40sec) |
| (5) Endstrangsynthese | 72°C | 10min |
| (6) Aufbewahrung | 4°C | Pause |

Für alle Reaktionen wurde die Magnesiumkonzentration und die Anzahl der Zyklen optimiert:

Gen	Primer	MgCl ₂ +/-DMSO	Hybridisierung	Hybr.- Zeit	Zyklen	Größe
β-Aktin	SG106xSG107	1,5mM	55°C	30sec	25	500bp
LPL	SH53xSH54	1,5mM	52°C	40sec	33	241bp
aP2	SH55xSH56	4,5mM	48°C	45sec	40	325bp

Tabelle 3.1: Oligonukletide und PCR Bedingungen für die Amplifizierung von cDNA zur semiquantitativen Expressionsanalyse

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert.

3.4.2 In-vitro Translation

Material:

- TNT Coupled Reticulocyte Lysate SystemTM (Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, Reaktionspuffer, Sp6-RNA-Polymerase, Aminosäurenmix (methioninfrei))
- RNasin Ribonukleaseninhibitor
- ³⁵S-Methionin
- Plasmid kodierend für Zielprotein

Die gezielte Synthese von Proteinen in zellfreiem System ist eine wichtige molekularbiologische Methode, die es nicht nur ermöglicht, Genprodukte schnell zu identifizieren oder Mutationen zu lokalisieren, sondern auch modifizierte oder unnatürliche Aminosäuren für Funktionsstudien in ein Protein einzubauen.

Für die In-vitro Translation wurde das „TNT coupled Transcription/Translation System^{TMcc}“ von Promega verwendet. Ein Lysat aus Kaninchen-Retikulozyten enthält dabei alle zur Transkription und Translation notwendigen Faktoren. Da eine Sp6 RNA-Polymerase hinzugegeben wird, muss das verwendete Plasmid in 5'-Richtung eine Sp6-Promotor-Region aufweisen.

Es wurde der folgende Ansatz pipettiert:

- 25µl TNT Rabbit Reticulocyten Lysate
- 2µl TNT Reaction Buffer
- 1µl Aminosäuremix minus Methionin
- 2µl ³⁵S-Methionin
- 1µl RNAsin Ribonukleaseinhibitor
- 1µg für Zielprotein kodierendes Plasmid unter Kontrolle des SP6-Promotors

Der gesamte Ansatz wurde vorsichtig gemischt und mit DEPC-H₂O auf 49µl aufgefüllt. Dann wurde 1µl Sp6-RNA-Polymerase hinzugegeben, das Gemisch wurde für 2 Stunden bei 30°C inkubiert und schließlich bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.3 Protease-Protektions-Versuch

Material:

- BRL49653
- Binding Buffer (NEB)
- Trypsin/EDTA
- 3x SDS-Probenpuffer
- Material wie 3.2.7
- Fixierlösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, in ddH₂O)
- Whatman-3M-Filterpapier
- Vakuum-Gel-Trockner
- Frischhaltefolie („Saran-Wrap“)
- Autoradiographie-Kassette (Fisher Scientific)
- X-OMAT AR Film (Kodak)

Um die Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor zu untersuchen, wurde sich der von Elbrecht et al. (1999) beschriebenen Methode des Protease-Protektions-Versuchs bedient.

Nukleäre Hormonrezeptoren durchlaufen üblicherweise nach Ligandbindung eine Konformationsänderung, die andere Peptidsequenzen und Proteindomänen für

Kofaktoren und Proteine der Transkriptionsmaschinerie erreichbar macht. Damit verschieben sich aber auch die einzelnen Aminosäuren im Verhältnis zur Proteinoberfläche, so dass diese nun leichter oder auch schwerer durch spezifische Proteasen angegriffen werden können. Diese Gegebenheiten wurden in dieser Arbeit ausgenutzt, um die Effektivität der Ligandbindung an einen Nukleären Rezeptor zu untersuchen. Bindet eine Protein-Punktmutante Ligand nämlich genauso effektiv wie der Wildtyp, müssten nach Behandlung der Proteine mit unterschiedlichen Ligandkonzentrationen, einem folgenden zeitabhängigen Trypsinverdau und anschließender Gelelektrophorese die Nachweisbilder des Verdaus der Mutante mit denen des Wildtyps übereinstimmen. In diesem Fall hätte nämlich die Punktmutante dann dieselbe Konformationsänderung durchlaufen wie der Wildtyp und wäre damit gleichgut für Proteasen angreifbar.

Zunächst wurden 2µl einer In-vitro Translation mit 23µl eines Gemisches aus Binding Buffer (NEB) und der entsprechenden Konzentration an Ligand (BRL49653) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für den Verdau mit einer Protease wurde Trypsin, eine Protease, die Peptidbindungen immer spezifisch am C-Terminus der Aminosäuren Lysin oder Arginin hydrolysiert, bis auf eine Endkonzentration von 12,5µg/ml hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 13µl 3xSDS-Probenpuffer gestoppt und 5 Minuten lang bei 95°C erhitzt.

Die denaturierten Proteinfragmente wurden schließlich über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei sollte das Gel nur so weit laufen, dass der Probenpuffer gerade nicht aus dem Gel ausläuft, damit er die Pufferlösung und Elektrophoreseapparatur nicht radioaktiv kontaminiert. Anschließend wurde das Gel für mindestens 1 Stunde in der Fixierlösung auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde das Gel auf einem Whatman-3M-Filterpapier gelagert, mit Frischhaltefolie bedeckt und im Vakuum-Gel-Trockner bei 80°C für mindestens 2 Stunden getrocknet. Aufgrund ihrer radioaktiven Aktivität konnten die Proteinfragmente dann durch die Exposition der getrockneten und in Frischhaltefolie eingeschlagenen Gele in einer Autoradiographie-Kassette mit einem X-OMAT AR Film (Kodak) detektiert werden. Die Expositionszeit auf dem X-OMAT AR Film erfolgte je nach erwarteter Signalstärke zwischen 10 und 32 Stunden. Die Schwärzung des Filmes ist der Menge an nachzuweisendem Protein proportional.

4. Ergebnisse:

4.1 Klonierung der analogen PPAR γ_2 -Punktmutanten

4.1.1 Ermittlung der zu mutierenden Aminosäuren in PPAR γ_2

Der Transkriptionsfaktor RXR wird sowohl unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität als auch unabhängig von Interaktionen mit bekannten Koaktivatoren proteasomal degradiert. Diese Erkenntnisse wurden mit Hilfe von RXR-Punktmutanten erhalten. In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Degradationsvorgänge von PPAR γ_2 , einem der Heterodimer-Partner von RXR, mit einer vergleichbaren Strategie untersucht werden. Dazu wurden den RXR-Punktmutanten entsprechende PPAR γ_2 -Punktmutanten erstellt.

h1RXR	135	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRDNDCLIDXXXXXXXXXXXXXXXXX	194
		C +CGD++SG HYGV++CEGCKGFF+RT+R L Y R + +C I	
PPAR γ	139	CRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRLKLIIYD-RCDLNCRIHKKSRNKCQYCRFQK	197
h1RXR	195	XLAMGMKREAVQEERQRGKDRNENEVESTSSANEDMPVERILEAELAVE-----PK	245
		LA+GM A++ R ++ + E +S ++ P L LA P	
PPAR γ	198	CLAVGMSHNAIRFGRIAQAEKEKLLAEISSDIDQLNPESADLRQALAKHLYDSYIKSFPL	257
h1RXR	246	TETYVEANMGLNPSSPNDP-----VTNICQAADKQLF-----	277
		T+ A + ++ P + ++ DK F	
PPAR γ	258	TKAKARAIL-TGKTTDKSPFVIYDMNSLMGDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQF	316
h1RXR	278	-----TLVEWAKRIPHFSELPLDDQVILLRAGWNELLIASFHRSIAVKDGI LLATGL	330
		+ E+AK IP F L L+DQV LL+ G +E++ + S+ KDG+L++ G	
PPAR γ	317	RSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTL LKYGVHEIIYTMLA--SLMNKDGVLISEGQ	374
h1RXR	331	-HVHRNSAHSAGVG-AIFDRVLTELVS KM RDMQMDKTELGCLRAIVLFNPD SKGLSNPAE	388
		+ R S F E K +++D ++L A+++ + D GL N	
PPAR γ	375	GFMTREFLKSRLKPF GDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAI FIAV IILSGDRPGLLN VKP	434
h1RXR	389	VEALREKVYASLEAYCKHKYPEQGRFAKLLLR L PALRSIGLKCLEHLFFFK LIGDTPID	448
		+E +++ + +LE K +PE FAKLL ++ LR I EH+ ++I T D	
PPAR γ	435	IEDIQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQI---VTEHVQLLQVIKKTETD	491
h1RXR	449	TFLMEMLE	456
		L +L+	
PPAR γ	492	MSLHPLLQ	499

Abb.4.1: Die homologen Aminosäure-Sequenzen von humanem-RXR und humanem PPAR γ_2 .

Die Sequenzen wurden aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ der „National Library of Medicine“ entnommen und mit dem Programm „MegAlign“ von „DNA Star“ einander gegenübergestellt. Identische Aminosäuren sind jeweils in der Zwischenreihe aufgeführt und Aminosäuren mit den gleichen chemischen Eigenschaften werden dort durch ein „+“ repräsentiert.

Um die zu den beschriebenen RXR-Punktmutanten korrespondierenden Aminosäuren in der Ligandbindungsdomäne von PPAR γ_2 zu finden, wurden die Aminosäuresequenzen von humanem RXR und humanem PPAR γ_2 mit dem Programm „MegAlign“ von „DNA Star“ verglichen.

Die Mutationen wurden in die Maus-cDNA von PPAR γ_2 eingeführt, weil die PPAR γ_2 -Maus-cDNA unserem Labor zur Verfügung stand. Da die Aminosäuresequenz von humanem und Maus-PPAR γ_2 in der Ligandbindungsdomäne identisch ist, konnten dieselben Aminosäuren mutiert werden, die sich in der humanen cDNA ergeben hatten.

In Tab.4.1 sind die den RXR-Punktmutanten entsprechenden PPAR γ_2 -Punktmutanten sowie die dabei veränderten DNA- und Aminosäuresequenzen gezeigt. Alle Mutationen befinden sich im Bereich der Ligandbindungsdomäne (Abb.4.2). Drei der Mutationen befinden sich außerdem im ligandabhängigen AF-2-Bereich, der für die Koaktivatorbindung verantwortlich ist. Abb.4.2 zeigt die Lage der Mutationen in der Aminosäuresequenz, Abb.4.3 und Abb.4.4 zeigen eine schematische Darstellung der PPAR γ_2 -Punktmutanten im Vergleich zu den RXR-Punktmutanten.

<u>PPARγ_2-Mutante</u>	<u>DNA-Sequenz/ Aminosäure wt</u>	<u>DNA-Sequenz/ Aminosäure Mut</u>
Y348A	TAT = Tyrosin	GCC = Alanin
L493A	CTT = Leuzin	GCT = Alanin
L496A	CTG = Leuzin	GCG = Alanin
L496A/L497A	CTG/CTC =Leuzin/Leuzin	GCG/GGA = Alanin/Alanin

Tab.4.1: Die DNA-/Aminosäure-Sequenzen vor bzw. nach Mutation des PPAR γ_2 -Wildtyps.
 “wt” bezeichnet den PPAR γ_2 -Wildtyp, “Mut” die klonierte PPAR γ_2 -Mutante.

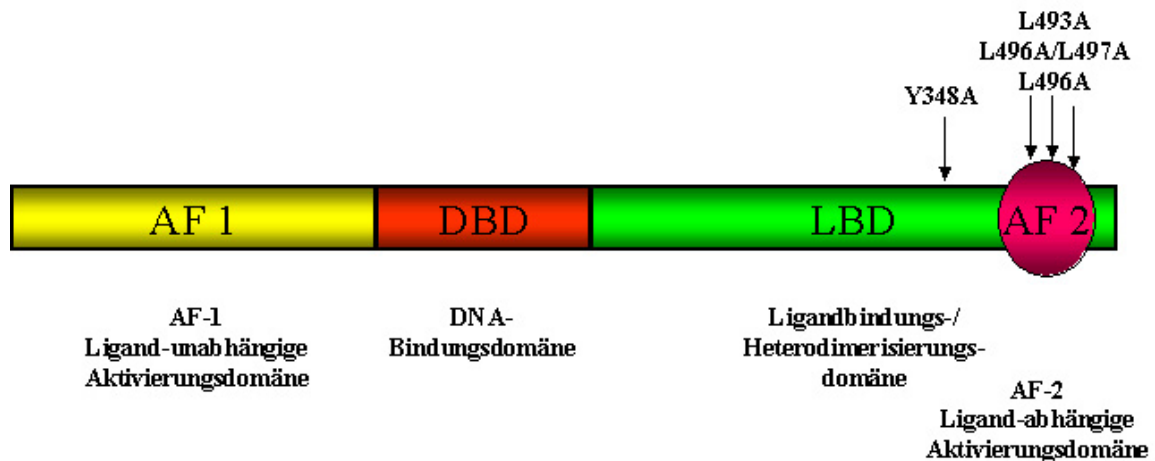


Abb.4.4: schematische Darstellung von Maus-PPAR γ_2 .

Die Lokalisierung der Aminosäuren, die analog zu den von Osburn et al. 2001 beschriebenen RXR-Mutanten (Abb.4.3) zu mutieren sind, ist mit Pfeilen markiert.

4.1.2 Klonierung der PPAR γ_2 -Punktmutanten

Zunächst wurden mit Hilfe der PCR mutationstragende Abschnitte des PPAR γ_2 -Gens erstellt. Dazu wurden zwei PCRs durchgeführt, die an der Mutationsstelle überlappten und dort auch von einem Restriktionsenzym spezifisch geschnitten wurden. Beide PCR-Produkte wurden danach in einen Expressionsvektor kloniert.

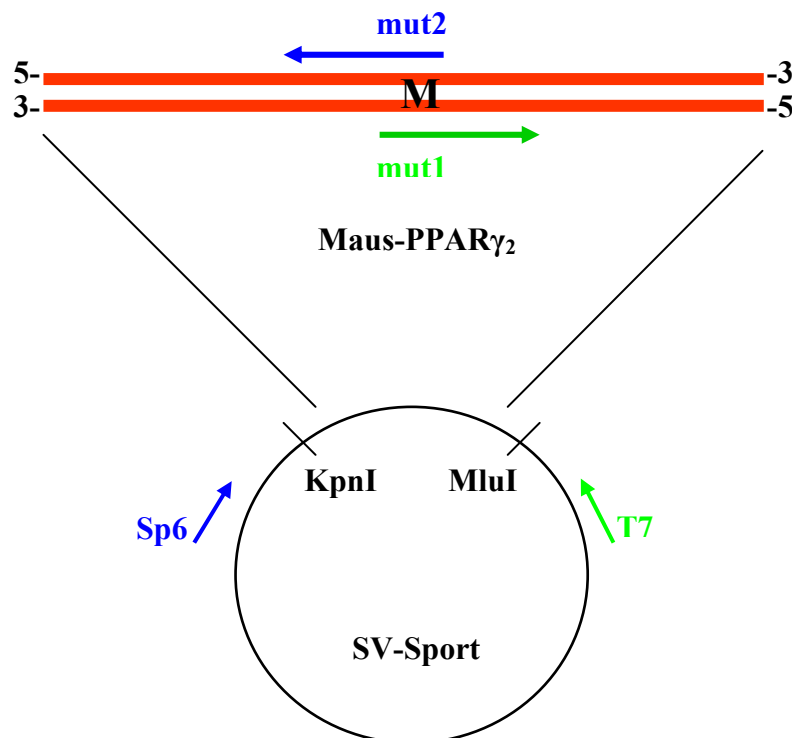


Abb.4.5: schematische Darstellung der korrespondierenden PCR-Ansätze:

PCR A (primer: Sp6 ; mut1) und PCR B (primer: mut2 ; T7). Als „Mutterstrang“ wurde jeweils die mouse-PPAR γ_2 -DNA im SV-Sport-Vektor verwendet.

Da die PPAR γ_2 -cDNA im SV-Sport-Expressionsvektor am 5'-Ende eine Sp6- und am 3'-Ende eine T7-Promotor-Sequenz trägt, wurde im ersten PCR-Ansatz (PCR A) für das 5'-Ende der Sp6-Primer verwendet. Der Primer am 3'-Ende des ersten PCR-Produktes war ein speziell für die Mutation erstellter Primer (mut1), der homolog zur DNA-Sequenz im Bereich der gewünschten Mutationsstelle an die Mutter-DNA binden konnte und nur im Bereich des zu mutierenden Triplets eine veränderte Nukleotidsequenz aufwies. Analog wurde für den zweiten PCR-Ansatz (PCR B) ein Primer (mut2) verwendet, der ebenfalls im gewünschten Mutationsbereich an die Mutter-DNA binden konnte und im Bereich des zu mutierenden DNA-Triplettes eine zum ersten Primer (mut1) komplementäre Sequenz aufwies. Das 3'-Ende des zweiten PCR-Produktes wurde von dem T7-Primer aus synthetisiert (siehe Abb.4.5). Es wurde bei der Konstruktion der mut-Primer darauf geachtet, dass in der Nähe des Codons für die zu mutierende Aminosäure durch „stillen“ Basenaustausch auch eine Restriktionsenzym-Schnittstelle eingeführt wurde, die für die Klonierung der PCR-Produkte benötigt wurde (siehe Tab.4.2 und Abb.4.6). Diese Restriktionsenzym-Schnittstelle kommt im Rest der PPAR γ_2 -Sequenz nicht vor.

<u>PPARγ_2-Mutante</u>	<u>Primer</u>	<u>Restrikt.-enzym</u>	<u>AS wt</u>	<u>AS Mut</u>
Y348A	mut1): SH17 mut2): SH18	NgoMIV	Tyr	Ala
L493A	mut1): SH29 mut2): SH28	AfeI	Leu	Ala
L496A	mut1): SH13 mut2): SH12	AfeI	Leu	Ala
L496A/L497A	mut1): SH31 mut2): SH30	SstII	2x Leu	2x Ala

Tab.4.2: „mut1)“ bezeichnet den jeweils für die PCR A verwendeten, „mut2)“ den jeweils für die PCR B verwendeten Primer. „wt“ steht für den PPAR γ_2 -Wildtyp, „Mut“ für die PPAR γ_2 -Punktmutanten und „AS“ für die betreffende Aminosäure.

Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und aus dem Gel eluiert. Danach wurden die PCR-Produkte einem doppelten präparativen Restriktionsverdau unterzogen. Die korrespondierenden PCR-Produkte für einen Klon wurden jeweils mit der Restriktionsendonuklease inkubiert, die genau im Bereich der amplifizierten Mutation schneidet (siehe Tabelle 4.2, Abb.4.6 und Abb.4.7).

mut2mut1

5´-AGGCCGGCGTCCATGAGATCATCTACAC-3´ SH17
SH18 3´-CTGGTTCAGTCTGAGACGAGTTCCGGCCGCA-5´

5´-CCAGCGCTCCAGGAGATCTACAAGGAC-3´ SH12
SH13 3´-CTGTCTGTACTCGGAAGTGGGTCGCGAGG-5´

5´-TGAGCGCTCACCCCCTGCTCCAGGAG-3´ SH28
SH29 3´-CTTCTGTCTCTGTCTGTACTTCGCGAGT-5´

5´-ACCCCGCGGCACAGGAGATCTACAAGGAC-3´ SH30
SH31 3´-CTGTCTGTACTCGGAAGTGGGCGCCGT-5´

Abb.4.6: Hybridisierung der korrespondierenden Primer der jeweiligen Mutanten-PCR-Ansätze (PCR A) und (PCR B). Die Stellen des mutierten Triplets sind rot unterstrichen. Die Veränderung eines weiteren Triplets bei SH18/SH17 (G/C) und SH13/SH12 (T/A) jeweils an der Nukleotidposition 3 des Triplets (blau) verändert die zu kodierende Aminosäure nicht. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind gelb unterlegt.

Zusätzlich wurden dann jeweils das Produkt der PCR A mit dem Restriktionsenzym KpnI und das Produkt der PCR B mit dem Enzym MluI inkubiert, welche das 5´- bzw. das 3´-Ende des „open reading frame“ der PPAR γ_2 -cDNA schneiden.

Für einen passenden Klonierungsvektor wurde die PPAR γ_2 -cDNA mit den Restriktionsenzymen KpnI und MluI aus dem SV-Sport-PPAR γ_2 -Expressionsplasmid ausgeschnitten und dieser wiederum über ein Agarosegel aufgereinigt und eluiert.

Die Klonierung in den SV-Sport-Vektor erfolgte als „3-Fragment-Ligation“, wobei die PCR-Produkte A und B mit dem KpnI und MluI geschnittenen SV-Sport-Vektor ligiert wurden (siehe Abb.4.7).

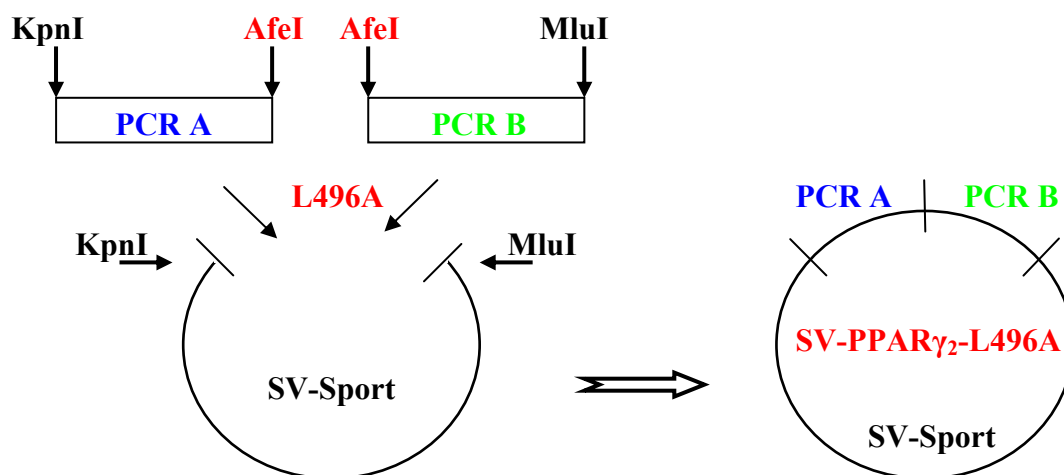


Abb.4.7: schematische Darstellung der „3-Fragment-Ligation“ in den SV-Sport-Vektor. als Beispiel dient die mouse-PPAR γ_2 -L496A-Punktmutante.

Nach Transformation in E.coli-Bakterien und Plasmidpräparation wurden die mutierten cDNAs durch Kontrollverdaus und anschließend mit einer Sequenzierung durch die Firma „seqlab“ in Göttingen auf Korrektheit überprüft.

4.2 Die transkriptionelle Aktivität der PPAR γ_2 -Punktmutanten

4.2.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

Die transkriptionelle Aktivität der PPAR γ_2 -Punktmutanten am PPRE, dem PPAR γ -abhängigen Promotor, wurde mit Hilfe von Luziferase-Reporter-Systemen untersucht. Luziferase-Reporter-Systeme werden verwendet, um die transkriptionelle Aktivität eines Promotors zu analysieren. In dieser Arbeit wurde das System als Indikator dafür genutzt, wie effizient ein Transkriptionsfaktor seinen Promotor aktivieren kann. Für die Versuche mit SV-PPAR γ_2 wurde ein Reporterplasmid verwendet, welches drei synthetische DR1-Elemente hintereinander in der Promotorregion aufwies. Unmittelbar hinter dem DR1-Promotor folgte der für das Luziferaseenzym kodierende Genabschnitt. Die Expression der Luziferase wurde also von PPAR γ_2 reguliert, da PPAR γ_2 an DR1-Elemente bindet. Zusätzlich wurde ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid kotransfiziert, um Unterschiede in der Transfektionseffizienz ausgleichen zu können.

RXR ist der heterodimere Partner von PPAR γ_2 und wird *in vivo* für die Transkription PPAR γ -abhängiger Gene benötigt. Es stellte sich also die Frage, ob im vorliegenden Luziferase-Reporter-System auch RXR-Expressionsplasmide kotransfiziert werden müssen, um eine erfolgreiche Transkriptionsaktivierung zu ermöglichen, oder ob endogene Mengen an RXR ausreichen.

Generell wurden Ligand-behandelte Ansätze mit nicht Ligand-behandelten verglichen. Für die nicht Ligand-behandelten Ansätze wurde anstelle des Liganden nur das Lösungsmittel DMSO in derselben Menge verwendet. Bei Transfektion von Reporterplasmid und SV-PPAR γ_2 alleine zeigte sich eine 2,08 fach höhere Luziferase-Aktivität von mit dem PPAR γ_2 -Liganden GW 347845 behandelten Zellen gegenüber den nur mit DMSO behandelten Zellen. Die Basalaktivität von mit SV-PPAR γ_2

transfizierten Zellen gegenüber denen, die nur mit leerem SV-Sport Vektor transfiziert worden waren, war um 75 % erhöht (Abb.4.8 (A)).

Zusätzliche Kotransfektion von SV-RXR erhöhte die Basalaktivität weiter, aber die Luziferaseaktivität nach Behandlung mit GW 347845 unterschied sich nicht signifikant von jener in den nur mit SV- PPAR γ_2 transfizierten Zellen. Eine Ligandinduzierbarkeit der Transkription war in diesem Falle nicht gegeben. Die weiteren Versuche wurden deshalb nur mit SV-PPAR γ_2 durchgeführt (Abb.4.8 (A)).

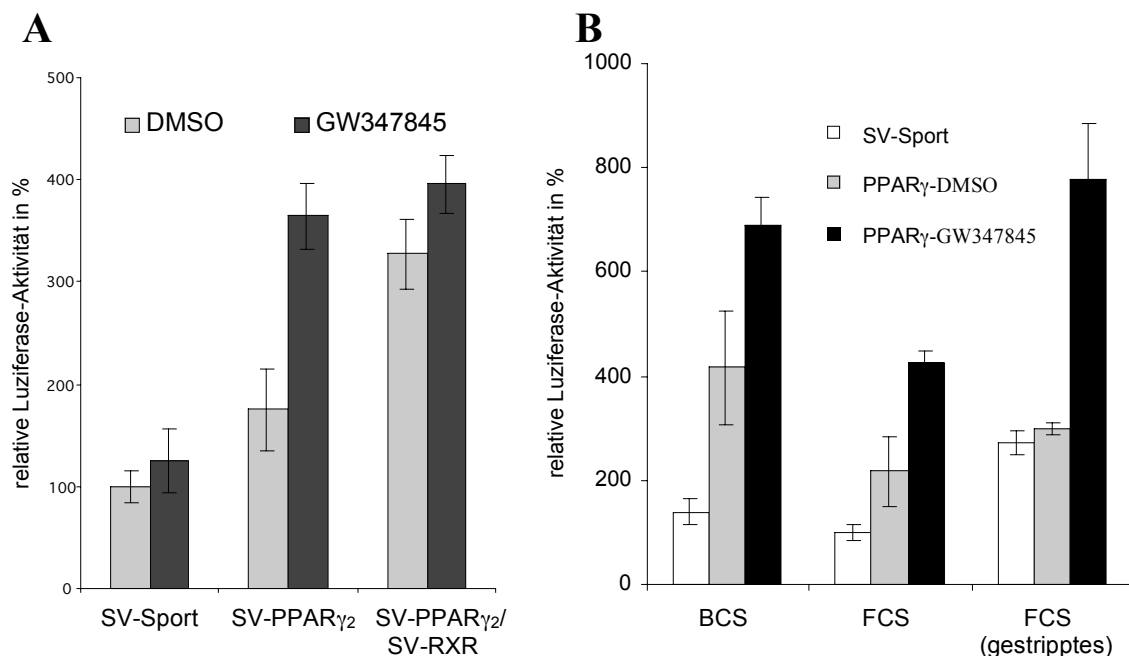


Abb.4.8: (A) Kotransfektion von RXR erhöht die ligandabhängige Transaktivierung nicht.

NIH3T3-Zellen wurden mit einem 3xDR1-Luziferase-Reporterplasmid und einem leeren Vektor (SV-Sport) bzw. Expressionsplasmiden für PPAR γ_2 und RXR kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO bzw. 100 nM GW347845 behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

(B) Unspezifische endogene Liganden im Serum erhöhen die PPAR γ_2 -Basalaktivität.

NIH3T3-Zellen, die in den verschiedenen Kulturmedien BCS, FCS und gestripptem FCS inkubiert wurden, wurden mit einem 3xDR1-Luziferase-Reporterplasmid und einem leeren Vektor (SV-Sport) bzw. einem Expressionsplasmid für PPAR γ_2 kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO (SV-Sport wurde nur mit DMSO behandelt) bzw. 100 nM GW347845 behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Da PPAR γ eine relativ große Anzahl von Liganden binden kann, u.a. auch Fettsäuren wie z.B. Linolsäure, war es wichtig zu untersuchen, ob verschiedene Seren einen Einfluss auf die ligand-induzierte transkriptionelle Aktivität von PPAR γ haben.

Verwendet wurden bovines Kälberserum (BCS), fötales Kälberserum (FCS) sowie FCS, das durch Aktivkohle gestrippt worden war und damit keine Lipide mehr enthielt. Abb.4.8 (B) zeigt, dass die basale Aktivität (Aktivität von PPAR γ_2 ohne Ligand gemessen gegenüber der Transfektion mit leerem SV-Sport Vektor) in gestripptem FCS am geringsten ist. Beim Verwenden von BCS und FCS zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Basalaktivität, die wahrscheinlich auf die Präsenz endogener Liganden zurückzuführen ist. Ligandbehandlung (GW 347845) führte in gestripptem Serum zur deutlichsten transkriptionellen Aktivierung (160% bzw. 2,6 fach). Alle weiteren Versuche wurden daher mit diesem gestrippten Serum durchgeführt.

Um die Ligandkonzentration zu ermitteln, die die Transkription bestmöglich aktiviert, wurden jeweils Titrationen der PPAR γ_2 -Liganden GW 347845 und Rosiglitazon im Luziferase-Reporter-System durchgeführt.

Es zeigte sich, dass bei Behandlung mit GW 347845 bei einer Konzentration von 100 nM eine maximale Luziferaseinduktion von 340 % gegenüber dem Wert der Basalaktivität von SV-PPAR γ_2 gemessen wurde (Abb.4.9).

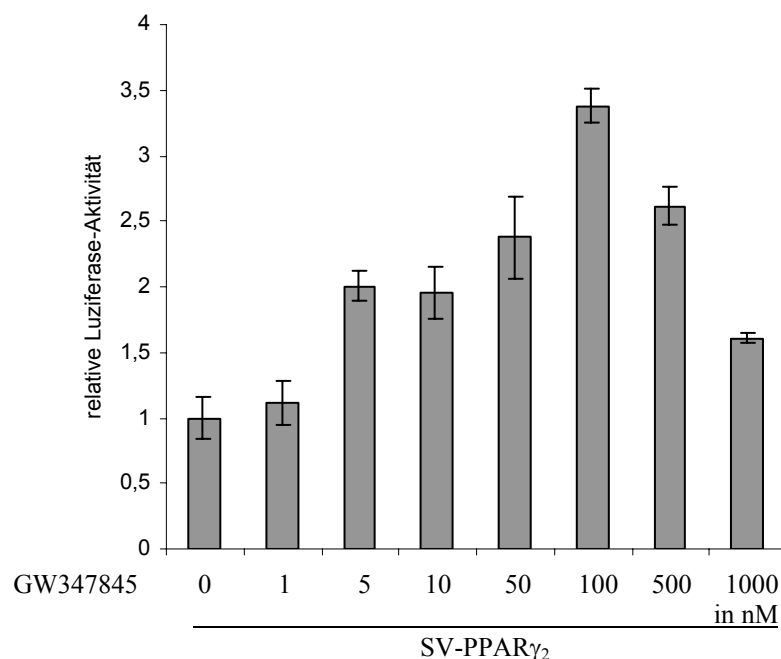


Abb.4.9: Die optimale GW347845-Konzentration liegt bei 100nM.

NIH3T3-Zellen wurden mit einem 3xDR1-Luziferase-Reporterplasmid und einem Expressionsplasmid für PPAR γ_2 kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO bzw. den angegebenen Konzentrationen an GW347845 behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Bei dem entsprechenden Versuch mit Rosiglitazon erreichte die relative Induktion der transkriptionellen Aktivität ihr Maximum bei einer Konzentration von 500 nM (Abb.4.10).

Nicht nur geringere, sondern auch höhere Konzentrationen statt der Optimalkonzentration von GW 347845 und Rosiglitazon führten zu einer geringeren Luziferaseinduktion.

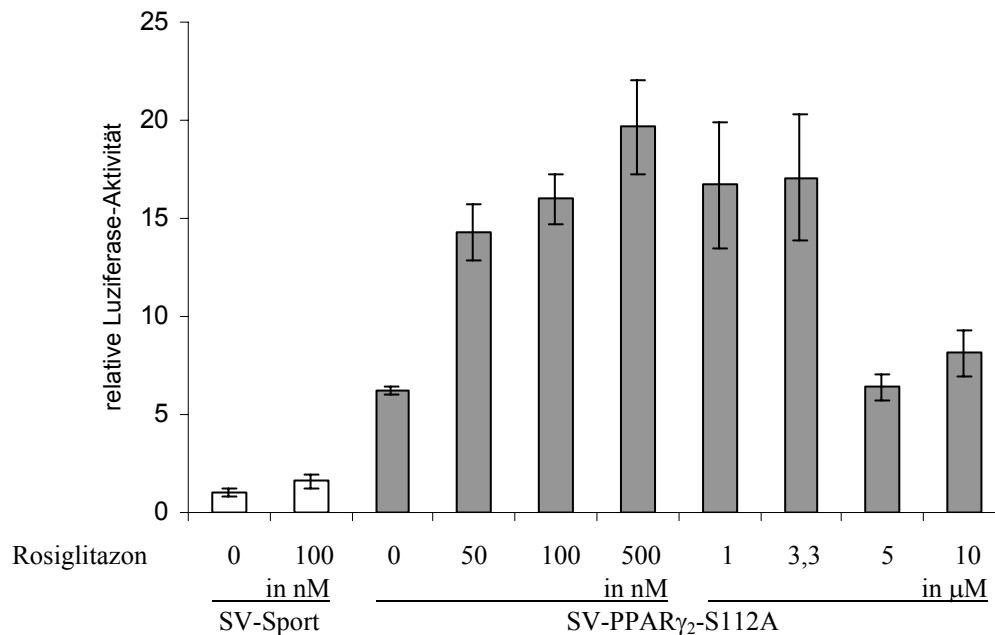


Abb.4.10: Die optimale Rosiglitazon-Konzentration liegt bei 500nM.

NIH3T3-Zellen wurden mit einem 3xDR1-Luziferase-Reporterplasmid und einem leeren Vektor (SV-Sport) bzw. einem Expressionsplasmid für PPAR γ_2 -S112A kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO bzw. den angegebenen Konzentrationen an Rosiglitazon behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

4.2.2 Die transkriptionelle Aktivität der PPAR γ_2 -Punktmutanten

Um die transkriptionelle Aktivität der PPAR γ_2 -Punktmutanten zu ermitteln, wurden transiente Transfektionen von PPAR γ_2 -Wildtyp bzw. den PPAR γ_2 -Punktmutanten zusammen mit dem DR1-Luziferase-Reporterplasmid in NIH3T3-Zellen durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem PPAR γ -Liganden GW347845 behandelt, bevor weitere 24 Stunden später die Luziferaseaktivität gemessen wurde. Zusätzlich wurden bei diesem Versuch drei weitere bekannte PPAR γ_2 -Mutanten verwendet:

SV-PPAR γ_2 -S112A gleicht dem SV-PPAR γ_2 -Wildtyp bis auf die Aminosäureposition 112, an der Serin zu Alanin mutiert wurde. Dadurch kann PPAR γ_2 nicht mehr durch MAP-Kinasen phosphoryliert und inhibiert werden (siehe Einleitung).

Die Mutante PPAR γ_2 -E499Q mit der Mutation in der AF-2-Region bindet Ligand vergleichbar gut wie der PPAR γ_2 -Wildtyp, ist aber in der Koaktivatorenbindung eingeschränkt und nicht transkriptionell aktiv.

PPAR γ_2 -M2 schließlich besitzt zwei Punktmutationen im Zinkfinger der DNA-Bindedomäne, kann deshalb nicht mehr an DNA binden und ist damit transkriptionell inaktiv.

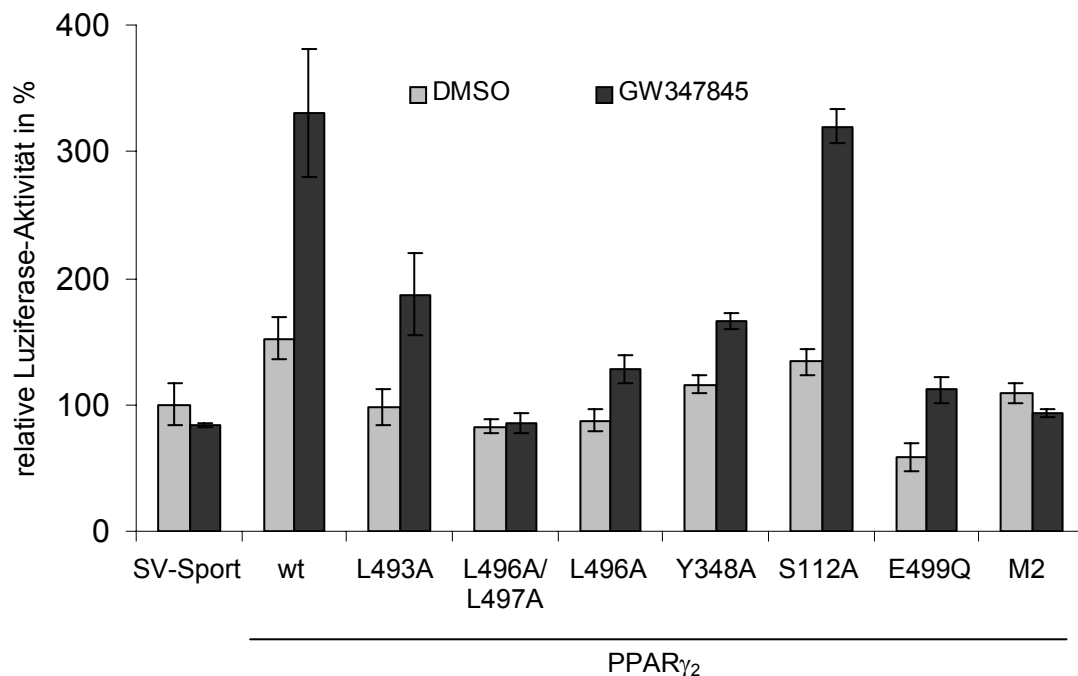


Abb.4.11: Die Mutationen verändern die Transaktivierung von PPAR γ_2 im Reporter-Versuch.

NIH3T3-Zellen wurden mit einem 3xDR1-Luziferase-Reporterplasmid und einem leeren Vektor (SV-Sport) bzw. den Expressionsplasmiden für PPAR γ_2 und die PPAR γ_2 -Punktmutanten kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmids transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO bzw. 100 nM GW347845 behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Wurden Zellen, in die kein PPAR γ transfiziert wurde (Abb.4.11 SV-Sport) mit GW347845 behandelt, so führte dies nicht zu einer Induktion der Luziferase-Aktivität.

Bei Transfektion mit SV-PPAR γ_2 zeigte sich eine leichte Erhöhung der Basalaktivität ohne Ligandbehandlung und relativ dazu dann eine 2,2 fache Induktion nach Behandlung mit GW347845.

Das gleiche Bild bot sich in den mit SV-PPAR γ_2 -S112A transfizierten Zellen.

Die PPAR γ_2 -Mutante SV-PPAR γ_2 -M2, die keine DNA-Bindedomäne mehr besitzt, konnte wie erwartet keine höhere Luziferaseaktivität erzeugen als der leere SV-Sport-Vektor. Sie zeigte keinerlei transkriptionelle Aktivität.

Auch die PPAR γ_2 -Mutante E499Q konnte nach Ligandbehandlung keine höhere Luziferaseaktivität als der SV-Sport-Vektor induzieren.

PPAR γ_2 -L493A zeigte eine deutliche 1,9 fache Induktion im Vergleich ligandbehandelter/-nichtbehandelter Ansatz. Die induzierte Luziferaseaktivität erreichte allerdings nur 60% des Wertes, den der SV-PPAR γ_2 -Wildtyp erreichte. Auch die basale Aktivität von L493A war geringer als die des SV-PPAR γ_2 -Wildtyps und entsprach der basalen Aktivität von SV-Sport.

Die PPAR γ_2 -Doppelmutante L496A/L497A bewirkte nach Behandlung mit GW347845 keinerlei Induktion der Luziferaseaktivität. Zudem konnte sowohl in den mit Ligand behandelten als auch in den nicht behandelten und mit SV-PPAR γ_2 L496A/L497A transfizierten Zellen keine höhere Luziferaseaktivität gemessen werden als in dem SV-Sport-Kontrollansatz.

Schließlich entsprach die basale Luziferaseaktivität der PPAR γ_2 -Mutanten L496A und Y384A der Basalaktivität der SV-Sport-Kontrolle. Nach Ligandinduktion zeigte sich bei beiden Mutanten eine leichte (1,5 fache) Erhöhung der transkriptionellen Aktivität, wobei aber die basale Luziferaseaktivität vom PPAR γ_2 -Wildtyp nicht oder nur leicht überschritten wurde.

PPAR γ_2 -wt	PPAR γ_2 -L493A	PPAR γ_2 -L496/497A	PPAR γ_2 -L496A
+++	+	-	-
PPAR γ_2 -Y348A	PPAR γ_2 -S112A	PPAR γ_2 -E499Q	PPAR γ_2 -M2
+	+++	-	-

Tab.4.3 : Zusammenfassung der transkriptionellen Aktivität vom PPAR γ_2 -Wildtyp und den PPAR γ_2 -Punktmutanten gemessen im Luziferase-Reporter-Versuch.

„+++“ beschreibt eine transkriptionelle Aktivität entsprechend des PPAR γ_2 -Wildtyps, „+“ eine schwache und „-“ keine transkriptionelle Aktivität.

In der Regel gelten NHR-Mutanten, deren ligandinduzierte transkriptionelle Aktivität die Basalaktivität des NHR-Wildtyps nicht übersteigt, als nicht durch Ligand induzierbar. Somit ist die transkriptionelle Aktivität des PPAR γ_2 -Wildtyps und von PPAR γ_2 -S112A stark, die von PPAR γ_2 -L493A mehr als von PPAR γ_2 -Y348Q leicht

ligandinduzierbar. Die restlichen Mutanten sind nach diesem Kriterium nicht transkriptionell aktiv (vgl. Tab.4.3).

4.3 Die transkriptionelle Aktivität der PPAR γ_2 -Punktmutanten ohne Einfluss ihrer DNA-Bindedomäne

4.3.1 Klonierung der Gal4-PPAR γ_2 -Punktmutanten

Um auszuschließen, dass die Veränderungen der transkriptionellen Aktivität von PPAR γ_2 bei den PPAR γ_2 -Mutanten auf eine fehlende DNA-Interaktion oder Probleme bei der Heterodimerisierung von PPAR γ_2 mit RXR zurückzuführen sind, wurde in dieser Arbeit ein von diesen Einflussfaktoren unabhängiges System verwendet. Dabei wurde die Ligandbindedomäne vom PPAR γ_2 -Wildtyp bzw. von den Mutanten an die DNA-Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert und die Transkription eines Luziferasegens unter der Kontrolle eines Gal4-Promotors untersucht (Abb.4.12). Die myc-PPAR γ_2 -Mutantenplasmide (siehe unten, Kap. 4.5) wurden einem Verdau mit BamHI/XbaI unterzogen und die Ligandbindedomäne als Fragment isoliert. Das Fragment wurde in einen mit BamHI/NheI verdauten pCMX-Expressionsvektor eingefügt und die korrekte Verknüpfung des Produktes durch Kontrollverdau mit EcoRI verifiziert. Diese Ligation war möglich, da die von XbaI und NheI erzeugten Schnittstellen zueinander kompatibel sind.

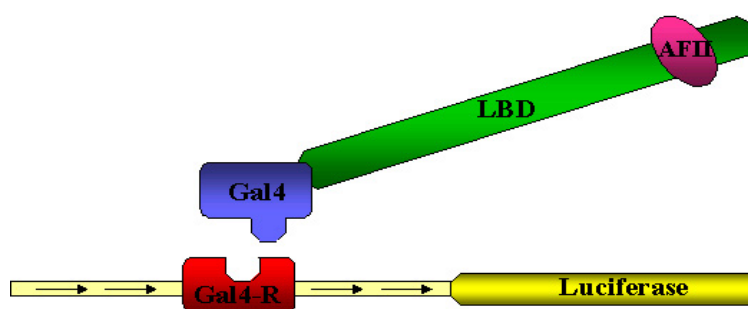


Abb.4.12: Schematische Darstellung des Gal4-PPAR γ_2 -Punktmutanten-Reporter-Systems.

Eine Gal4-Domäne ist an die Ligandbindedomäne von PPAR γ_2 -Wildtyp bzw. der PPAR γ_2 -Punktmutanten fusioniert und kann spezifisch an ein „Gal4-response-element“ (Gal4-R) binden, welches als Promotor im Luziferase-Expressionsplasmid agiert.

4.3.2 Optimierung der Untersuchungsbedingungen

Auch für die Versuche mit den Gal4-PPAR γ_2 -Konstrukten wurde die Konzentration von GW347845 ermittelt, die zu einer optimalen Induktion der Luziferaseaktivität beim Gal4-PPAR γ_2 -Wildtyp führte. Dabei zeigte sich, dass die höchstmögliche Luziferaseaktivität (6,2-fach) vergleichbar der Ergebnisse mit dem PPAR γ_2 -Wildtyp bei einer Ligandkonzentration (GW347845) zwischen 100 und 500 nM erreicht wurde. Höhere und geringere Konzentrationen von GW347845 zeigten eine vergleichsweise weniger effiziente Induktion der Luziferaseaktivität (Abb.4.13).

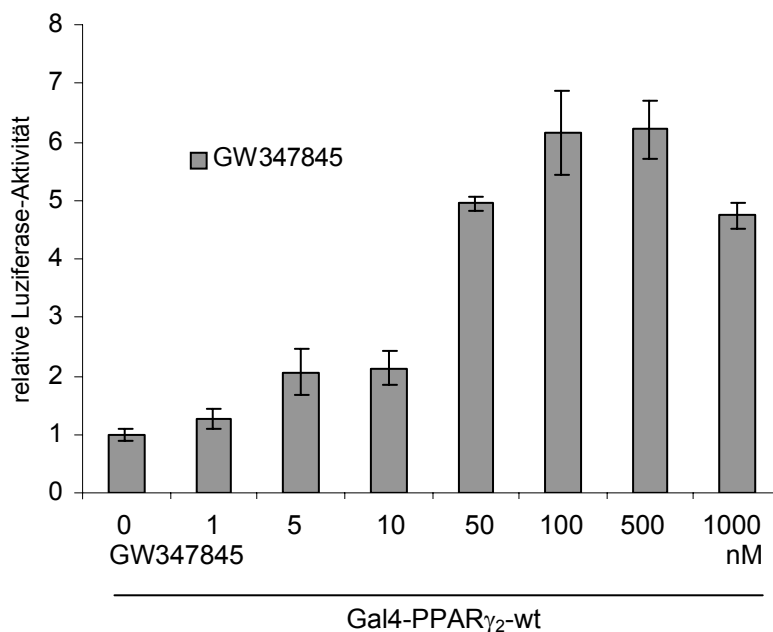


Abb.4.13: Die optimale GW347845-Konzentration für Gal4-PPAR γ_2 liegt zwischen 100 und 500nmol/l.

NIH3T3-Zellen wurden mit einem Gal4-Luziferase-Reporterplasmid und einem Expressionsplasmid für Gal4-PPAR γ_2 kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO bzw. den angegebenen Konzentrationen an GW347845 behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

4.3.3 Die transkriptionelle Aktivität der Gal4-PPAR γ_2 -Mutanten

Es wurden dann in NIH3T3-Zellen transiente Transfektionen vom Gal4-PPAR γ_2 -Wildtyp bzw. den jeweiligen Gal4-PPAR γ_2 -Punktmutanten durchgeführt, jeweils zusammen mit einem Luziferase-Reporterplasmid, dessen Transaktivierung unter der Kontrolle eines Gal4-Promoters stand.

Nach Behandlung mit oder ohne GW347845 und der Bestimmung der Luziferase-Aktivität ergab sich ein ähnliches Bild wie bei Verwendung des vollen PPAR γ_2 -Proteins (Abb.4.14).

Der Gal4-PPAR γ_2 -Wildtyp zeigte nach Ligandbehandlung eine ca. 8,5 fache Induktion der Luziferase-Aktivität.

Die Punktmutanten verhielten sich unterschiedlich, doch war deutlich zu sehen, dass die basale Induktion, also die Induktion ohne Ligandbehandlung, bei allen Mutanten deutlich geringer ausfiel als beim Wildtyp.

Die Doppelmutante Gal4-L496A/L497A zeigte keine Veränderungen der Luziferase-Aktivität vor wie nach Ligandbehandlung.

Gal4-L496A zeigte eine 4 fache Induktion, erreichte dabei aber nicht einmal den Wert der basalen Induktion der Luziferaseaktivität des Gal4-PPAR γ_2 -Wildtyps.

Die Mutanten Gal4-PPAR γ_2 -L493A und Gal4-PPAR γ_2 -Y348A zeigten beide eine ca. 9 fache Induktion nach Ligandbehandlung. Allerdings betrug auch diese Luziferaseaktivität nur etwa 25% der relativen Luziferaseaktivität des mit GW347845 induzierten Gal4-PPAR γ_2 -Wildtyps.

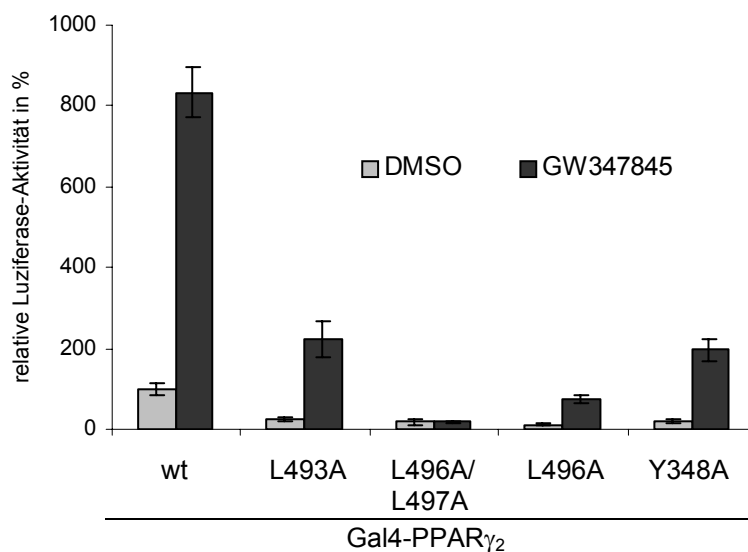


Abb.4.14: Die Mutationen in der LBD haben essentiellen Einfluss auf die Transaktivierung.

NIH3T3-Zellen wurden mit einem Gal4-Luziferase-Reporterplasmid und den angegebenen Expressionsplasmiden für Gal4-PPAR γ_2 bzw. die Gal4-PPAR γ_2 -Punktmutanten kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO bzw. 500 nM GW347845 behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Die Ergebnisse dieses Versuches bestätigten die mit dem kompletten PPAR γ_2 bzw. den kompletten PPAR γ_2 -Mutanten gewonnenen Resultate (siehe Tab.4.3 und Tab.4.4). Somit ist die Reduktion der transkriptionellen Aktivität der PPAR γ_2 -Mutanten nicht auf eine veränderte DNA-Bindung bzw. eine veränderte Heterodimerisierung zurückzuführen.

Wildtyp	L493A	L496A/L497A	L496A	Y348A
+++	+	-	(+)	+

Tab.4.4 : Zusammenfassung der transkriptionellen Aktivität vom Gal4-PPAR γ_2 -Wildtyp und den Gal4-PPAR γ_2 -Punktmutanten im Luziferase-Reporter-Versuch.

„+++“ beschreibt eine transkriptionelle Aktivität entsprechend des PPAR γ_2 -Wildtyps, „+“ eine schwache, „(+“ eine fragliche schwache und „-“ keine transkriptionelle Aktivität.

4.4 Effekte der PPAR γ_2 -Mutanten auf die endogene Genexpression

4.4.1 Die transkriptionelle Aktivität bestimmt anhand der mRNA-Mengen PPAR γ_2 -abhängiger Proteine ist ebenfalls deutlich reduziert

Da in den Luziferase-Reporter-Systemen die sich ändernde Basalaktivität und die Diskrepanzen im Vergleich von absoluter zu relativer Induktion keine eindeutige Interpretation zuließen, sollte in einem weiteren Versuch die transkriptionelle Aktivität der PPAR γ_2 -Mutanten anhand der Aktivierung endogener PPAR γ_2 -Zielgene ermittelt werden. Dazu wurde sich der Methode der semiquantitativen RT-PCR bedient. Bei diesem Versuchsansatz wird RNA mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und von dieser cDNA werden PCRs mit spezifischen Primern für verschiedene Gene durchgeführt.

Die SV-PPAR γ_2 -Punktmutanten und der SV-PPAR γ_2 -Wildtyp wurden jeweils in NIH3T3-Zellen, die kein endogenes PPAR γ_2 enthalten, transfiziert und 14 Stunden nach der Transfektion mit dem PPAR γ_2 -Liganden Rosiglitazon inkubiert. 24 Stunden später wurde aus den Zellen RNA isoliert und diese wurde in äquivalenten Mengen revers transkribiert. Mit der erhaltenen cDNA wurde dann eine PCR mit Primern, spezifisch für die endogenen Zielgene von PPAR γ_2 : Apolipo-binding-protein-2 (aP2) und Lipoprotein-Lipase (LPL) sowie β -Aktin als Ladekontrolle, durchgeführt.

Das Ergebnis zeigte eine prominente Induktion von aP2 und LPL durch PPAR γ_2 nach Induktion mit 1 μ M Rosiglitazon. Diese Induktion war sogar noch steigerbar durch Behandlung mit 10 μ M Rosiglitazon.

Generell zeigte sich ohne Ligandbehandlung weder beim PPAR γ_2 -Wildtyp noch bei den PPAR γ_2 -Punktmutanten eine Induktion der endogenen Zielgene (Abb.4.15). Das heißt, es konnte keine Basalaktivität des Rezeptors beobachtet werden.

PPAR γ_2 -L493A war als einzige der getesteten PPAR γ_2 -Punktmutanten nach Behandlung mit Rosiglitazon konzentrationsabhängig leicht transkriptionell aktiv, jedoch bedeutend schwächer als der PPAR γ_2 -Wildtyp.

Die PPAR γ_2 -Punktmutanten L496A und L348A zeigten keinerlei transkriptionelle Aktivität und die Doppelmutante L496A/L497A wurde nicht getestet, da sie schon im Luziferase-Reporter-System eindeutig keine transkriptionelle Aktivität aufwies und ihre Affinität zu Rosiglitazon noch schwächer als die der übrigen Mutanten ist (siehe 4.5.6).

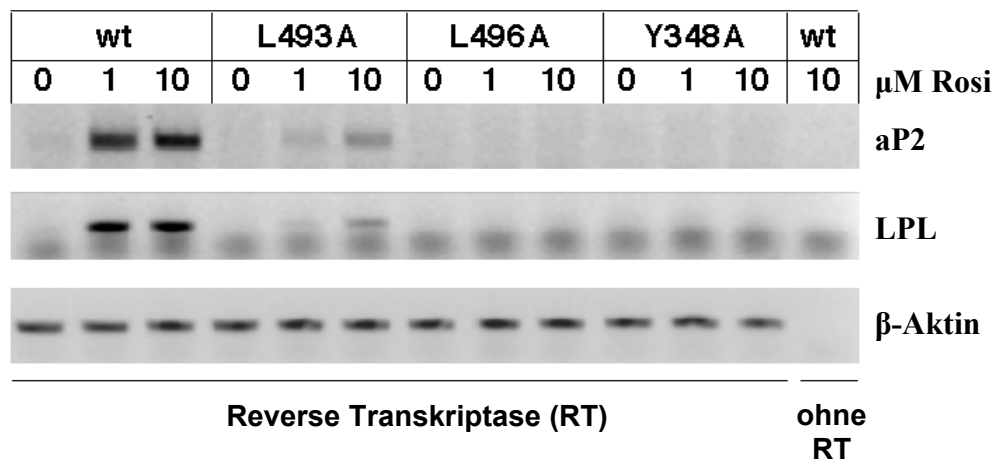


Abb.4.15: Die transkriptionelle Aktivität bestimmt anhand endogener PPAR γ_2 -Zielgene ist ebenfalls vermindert.

Mit PPAR γ_2 -wt bzw. den Mutanten transfizierte NIH3T3-Zellen wurden 14h mit den angegebenen Konzentrationen an Rosiglitazon inkubiert. 24h darauf wurden die mRNA-Mengen der endogenen PPAR γ_2 -Zielgene aP2, LPL und β-Aktin mittels RT-PCR bestimmt.

Anders als in den Versuchen zuvor zeigte sich hier nun, dass auch die PPAR γ_2 -Punktmutante Y348A nicht mehr transkriptionell aktiv ist (vgl. Tab.4.3 – 4.5).

Wildtyp	L493A	L496A	Y348A
+++	+	-	-

Tab.4.5: Zusammenfassung der transkriptionellen Aktivität vom PPAR γ_2 -Wildtyp und den PPAR γ_2 -Punktmutanten in der RT-PCR PPAR γ_2 -abhängiger Gene.

„+++“ beschreibt eine transkriptionelle Aktivität entsprechend des PPAR γ_2 -Wildtyps, „+“ eine schwache und „-“ keine transkriptionelle Aktivität.

4.5 Das Abbauverhalten der PPAR γ_2 -Punktmutanten

4.5.1 Klonierung der myc-PPAR γ_2 -Mutanten

Die Expressions- und Abbaustudien der PPAR γ_2 -Punktmutanten sollten unter anderem in CV1-Zellen durchgeführt werden. Dabei bestand die Befürchtung, dass mit dem vorhandenen PPAR γ_2 -Antikörper vor allem endogenes PPAR γ_2 detektiert würde. Zudem wäre es möglich gewesen, dass die PPAR γ_2 -Punktmutanten aufgrund der Mutationen nicht mehr oder nur noch eingeschränkt mit dem PPAR γ_2 -Antikörper, dem E8-PPAR γ_2 -Antikörper von Santa Cruz, der am C-Terminus von PPAR γ_2 bindet, reagieren würden.

Um die Expression eines Proteins unabhängig von einem Antikörper, der gegen das Protein selbst gerichtet ist, zu detektieren, kann man dieses Protein mit einer kurzen Aminosäuresequenz, einem sogenannten „Tag“, versehen, der dann durch einen gegen eben diesen „Tag“ gerichteten Antikörper erkannt werden kann. In dieser Arbeit wurde ein „myc-Tag“ verwendet, der an das aminoternale Ende von PPAR γ_2 fusioniert wurde. Der „Tag“ muss am N-terminalen Ende angebracht werden, da eine C-terminale Fusion an die AF-2-Region die Funktion von PPAR γ_2 inhibiert (persönliche Mitteilung von Frau Dr. S. Hauser).

Der myc-Tag wurde wie bei den Punkt- und Gal4-Mutanten in das Leseraster von in SV-Sport kloniertem PPAR γ_2 -Wildtyp bzw. den PPAR γ_2 -Punktmutaten eingefügt.

Es wurde jeweils eine PCR der SV-PPAR γ_2 -Wildtyp-cDNA bzw. der SV-PPAR γ_2 -Punktmutanten-cDNAs mit den Primern T7 und SH35 durchgeführt (Abb.4.16). Dabei enthält der Primer SH35 die für den myc-Tag notwendige Sequenz und den Beginn der PPAR γ_2 -kodierenden Sequenz. Die PCR-Produkte wurden dann einem Restriktionsverdau mit KpnI und SnaB1 unterzogen und als 568 bp-Fragmente isoliert. Die Fragmente wurden jeweils in den mit KpnI und EcoRV geschnittenen Vektor pcDNA3 ligiert. Dies ist möglich, da SnaB1 und EcoRV kompatible Enden haben. Sämtliche myc-Plasmide wurden durch Kontrollverdau mit KpnI/XhoI, XbaI/BamHI und EcoRI auf Korrektheit überprüft.

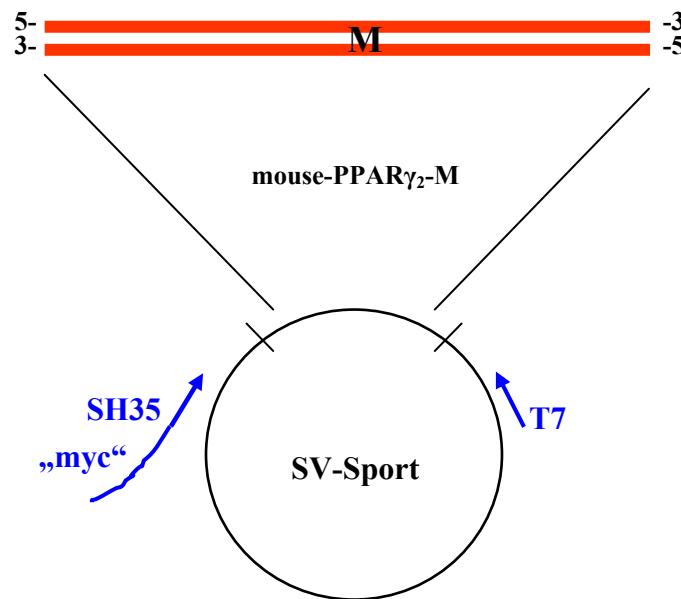


Abb.4.16: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die myc-tag-PPAR γ_2 -Mutanten. Kloniert wird mit Hilfe der PCR. Der 5'-Primer SH35 trägt die 63 Basen lange myc-Sequenz, welche dann nach der Translation N-terminal der AF-1-Region zu finden ist.

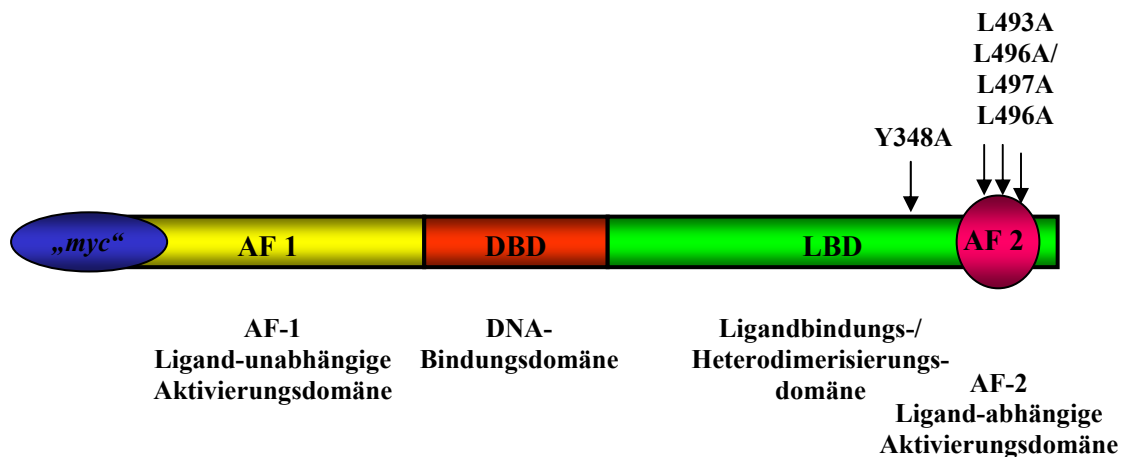


Abb.4.17: Schematische Darstellung des myc-PPAR γ_2 -Proteins. Die myc-Einheit wurde am Aminoende der AF-1-Region eingebaut. Die Pfeile markieren jeweils die verschiedenen myc-PPAR γ_2 -Mutanten.

4.5.2 Die myc-Markierung hat keinen Einfluss auf die Expression von PPAR γ_2

Die mit einem myc-Tag versehenen PPAR γ -Proteine sollten ein höheres Molekulargewicht aufweisen, als die Proteine ohne myc-Sequenz.

In NIH3T3-Zellen, in die SV-PPAR γ_2 -Wildtyp bzw. der myc-PPAR γ_2 -Wildtyp transfiziert worden war, und dann gleiche Proteinmengen des Lysates über ein SDS-Polyacrylamid-Harnstoffgel (SDS-PAGE-Harnstoffgel) elektrophoretisch getrennt und als Western-Blot mit PPAR γ_2 -Antikörper inkubiert worden waren, konnte man eine deutliche Größenzunahme von myc-PPAR γ um 2,3 kDa im Vergleich zu SV-PPAR γ erkennen (Abb.4.18).

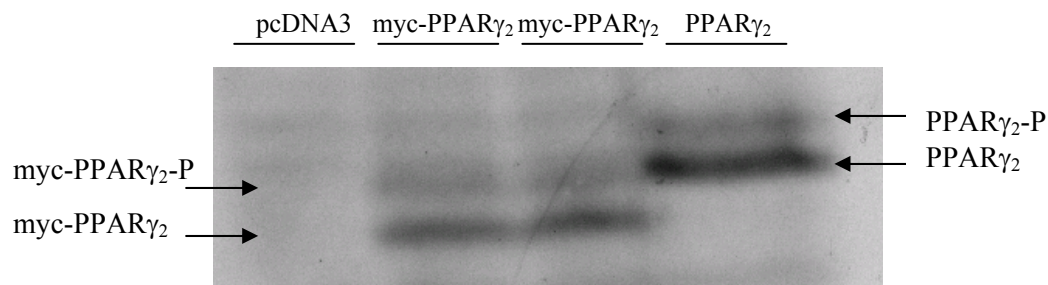


Abb.4.18: myc-PPAR γ_2 wird in NIH3T3 Zellen exprimiert

Western-Blot von in NIH3T3-Zellen transfiziertem myc-PPAR γ_2 bzw. PPAR γ_2 -wt gegen E8-PPAR γ -Antikörper. Man erkennt deutlich die durch Gelelektrophorese auf einem SDS-PAGE-Harnstoffgel aufgetrennten Phosphoisoformen (-P) sowie das gegenüber dem PPAR γ_2 -wt 2,3 kDa schwerere myc-PPAR γ_2 .

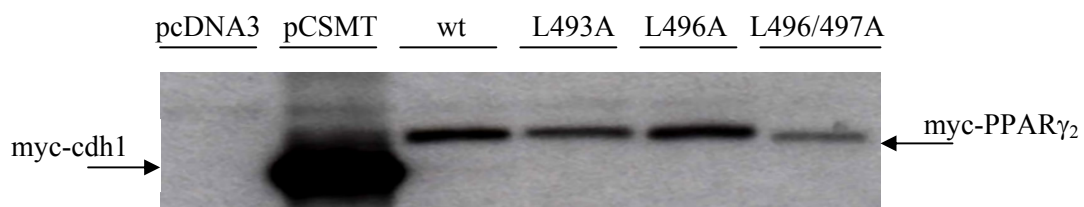


Abb.4.19: Die myc-PPAR γ_2 -Mutanten werden in CV1-Zellen exprimiert.

Western-Blot von in CV-Zellen transfiziertem myc-cdh1, myc-PPAR γ_2 (wt) bzw. den myc-PPAR γ_2 -Mutanten L496A, L496A und L496A/L497A gegen myc-Antikörper.

Um sicherzustellen, dass auch die myc-PPAR γ_2 -Mutanten exprimiert und ausschließlich das transfizierte PPAR γ_2 erkannt wurde, wurden CV1-Zellen mit myc-PPAR γ_2 bzw. den jeweiligen myc-PPAR γ_2 -Mutanten transfiziert, gleiche Proteinmengen des Lysates über ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrennt (SDS-PAGE) und als Western-Blots mit myc-Antikörper inkubiert.

Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu den nur mit pcDNA3-Vektor bzw. der myc-Kontrolle pCSMTcdh1 transfizierten Zellen die mit myc-PPAR γ_2 transfizierten Zellen in den Lysaten eine scharfe Bande erkennen ließen. Weiterhin zeigte sich, dass auch

alle transfizierten myc-PPAR γ_2 -Mutanten exprimiert und detektiert werden konnten. Die reduzierte Menge an detektiertem myc-PPAR γ_2 -L496A/L497A könnte an einer schlechteren Transfektionseffizienz in diesem Ansatz liegen (Abb.4.19).

4.5.3 Die myc-PPAR γ_2 -Mutanten werden nicht degradiert

Für die Untersuchung des ligandabhängigen Abbaus der myc-PPAR γ_2 -Mutanten wurden diese und der myc-PPAR γ_2 -Wildtyp jeweils in CV1-Zellen transfiziert und anschließend in GW347845 bzw. DMSO inkubiert. Nach Gelelektrophorese äquivalenter Proteinmengen über ein Harnstoffgel wurde der Western-Blot mit myc-Antikörper inkubiert.

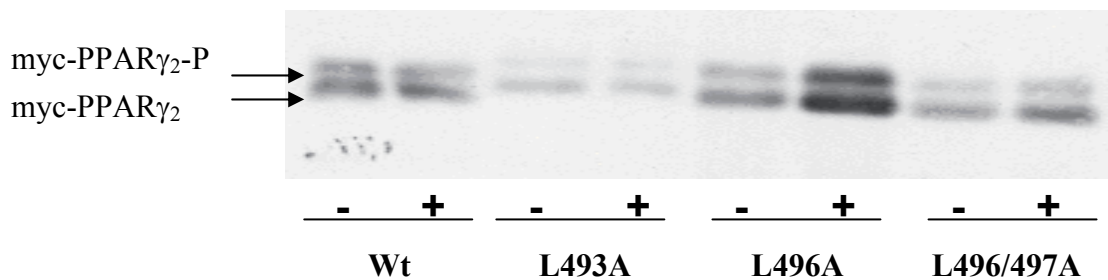


Abb.4.20: Western-Blot von in CV-1-Zellen transfiziertem myc-PPAR γ_2 bzw. der myc-PPAR γ_2 -Punktmutanten gegen myc-Antikörper.

CV-1-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für myc-PPAR γ_2 bzw. den angegebenen myc-PPAR γ_2 -Punktmutanten transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO („-“) bzw. 100nM GW347845 („+“) behandelt und anschließend mit myc-Antikörper inkubiert.

Man erkennt deutlich die durch Gelelektrophorese auf einem Harnstoffgel aufgetrennten Isoformen myc-PPAR γ_2 und Phospho-myc-PPAR γ_2 („myc-PPAR γ_2 -P“).

Man sieht deutlich, wie das detektierte myc-Protein auf dem Harnstoffgel in die Isoformen myc-PPAR γ_2 und Phospho-myc-PPAR γ_2 aufgetrennt wurde. Interessanterweise zeigt sich weder beim myc-PPAR γ_2 -Wildtyp noch bei den myc-PPAR γ_2 -Punktmutanten eine reduzierte Menge des unphosphorylierten Proteins. Es scheint also kein ligandabhängiger Abbau stattzufinden. Bei myc-PPAR γ_2 -L496A entsteht sogar der Eindruck, dass Ligand das Protein stabilisiert (Abb.4.20).

4.5.4 Die myc-Markierung schwächt die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2

Bisher wurde gezeigt, dass nur transkriptionell aktives PPAR γ_2 abgebaut wird. Deshalb wurde die transkriptionelle Aktivität von myc-PPAR γ_2 untersucht. Falls der Ligand bei myc-PPAR γ_2 keine wie für den PPAR γ_2 -Wildtyp übliche transkriptionelle Aktivität induzieren kann, könnte dies ein Grund für den eingeschränkten Abbau darstellen.

Es wurden Luziferase-Reporter-Versuche mit myc-PPAR γ_2 unter Titration des Liganden GW347845 durchgeführt.

Die Induktion der Luziferaseaktivität erreichte für myc-PPAR γ_2 zwischen 50 und 100 nM GW347845 ihren Maximalwert. Allerdings wies myc-PPAR γ_2 eine sehr hohe ligandunabhängige transkriptionelle Aktivität auf. Die ligandabhängige Transaktivierung war mit dem 1,5 fachen Wert der Luziferaseaktivität im Vergleich zu unbehandeltem myc-PPAR γ_2 deutlich geringer als die durchschnittliche 3,4 fache relative Luziferaseaktivität von SV-PPAR γ_2 bei 100 nM GW347845 (vgl. Abb.4.9 und Abb.4.21). Daher ist es möglich, dass diese schwache ligandabhängige Transaktivierung von myc-PPAR γ_2 nicht ausreicht, um eine ligandabhängige Degradation zu bewirken.

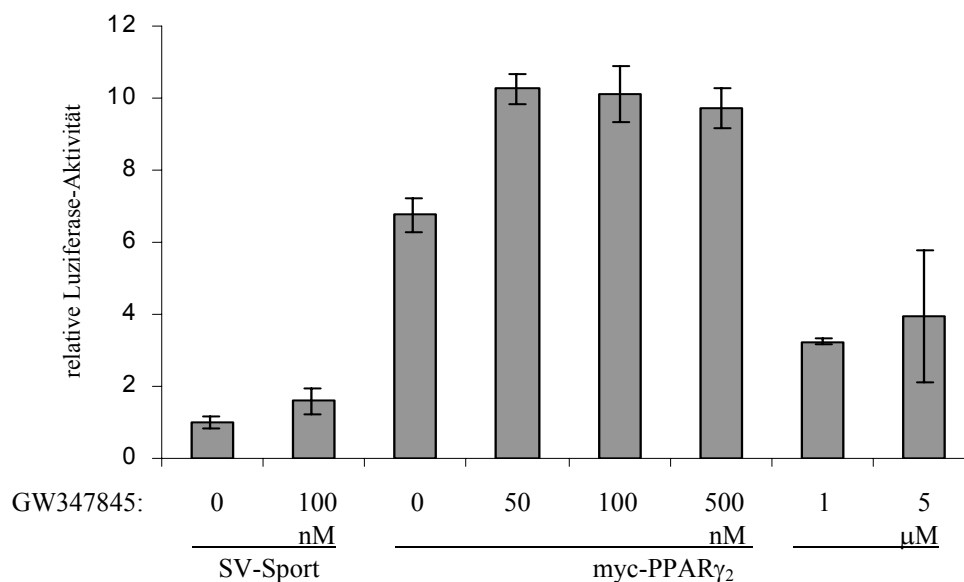


Abb.4.21: Die relative Luziferase-Aktivität in NIH3T3-Zellen nach transienter Transfektion von SV-Sport bzw. myc-PPAR γ_2 ist maximal zwischen 50 und 100nM GW347845.

NIH3T3-Zellen wurden mit einem 3xDR1-Luziferase-Reporterplasmid und einem leeren Vektor (SV-Sport) bzw. einem Expressionsplasmid für myc-PPAR γ_2 kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit DMSO bzw. den angegebenen Konzentrationen an GW347845 behandelt und anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Dies gilt insbesondere, wenn bei PPAR γ_2 transkriptionelle Aktivität und Abbau immer gekoppelt sind. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen nun nur noch nicht mit myc „getaggetes“ PPAR γ_2 verwendet.

4.5.5 Der Abbau von PPAR γ_2 ist abhängig von der Ligandkonzentration

Aufgrund der von der Ligand-Konzentration abhängigen transkriptionellen Aktivität von PPAR γ_2 (vgl. Abb.4.9, Abb.4.10 und Abb.4.21) wurde auch für den Abbau von PPAR γ_2 die optimale Ligandkonzentration bestimmt. Dazu wurde SV-PPAR γ_2 in NIH3T3-Zellen transfiziert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen von GW347845 behandelt. Gleiche Mengen der Zellysate wurden auf einem Harnstoffgel aufgetrennt und als Western-Blot mit PPAR γ_2 -Antikörper inkubiert. Falls ein Abbau von PPAR γ_2 zu detektieren ist, wäre er nur bei nicht-phosphoryliertem PPAR γ_2 zu beobachten.

Abb.4.22 zeigt, dass die untere, nicht-phosphorylierte Bande von PPAR γ_2 in den Spuren 4 (500 nM) und 5 (1 μ M) stark an Intensität verloren hat, also bei steigender Ligandkonzentration weniger PPAR γ_2 -Protein detektiert werden konnte, während die Menge an phosphoryliertem PPAR γ_2 gleich blieb. Diese Degradation kann jedoch bei einer Konzentration von 50 nM nicht beobachtet werden (vgl. auch Kontrolle Spur 1 pcDNA3 und Spur 2 SV-PPAR γ_2 ohne Ligand). Somit scheint die Degradation von PPAR γ_2 bei einer Ligandkonzentration stattzufinden, bei der auch die Transaktivierung stattfindet (vgl. Abb.4.9, Abb.4.10 und Abb.4.22).

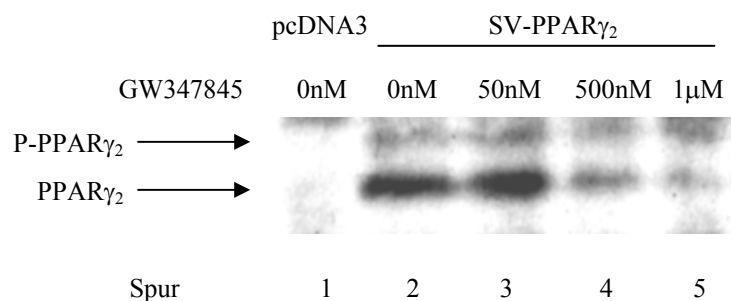


Abb.4.22: Der Abbau von PPAR γ_2 ist abhängig von der Ligandkonzentration

Mit leerem Vektor (pcDNA3) bzw. Expressionsplasmiden für PPAR γ_2 transfizierte NIH3T3-Zellen wurden nach 24h mit den angegebenen Konzentrationen von GW347845 inkubiert und weitere 24h später lysiert. Anschließend wurde ein Western-Blot gegen PPAR γ_2 durchgeführt. Man erkennt deutlich die durch Gelelektrophorese auf einem Harnstoffgel aufgetrennten Isoformen von PPAR γ_2 und Phospho-PPAR γ_2 („P-PPAR γ_2 “).

4.5.6 Die unterschiedliche Affinität des PPAR γ_2 -Wildtyps und der PPAR γ_2 -Punktmutanten zu Rosiglitazon

Der Großteil der Mutationen der klonierten PPAR γ_2 -Punktmutanten liegt in der AF-2-Region, dem Ort, an dem der Ligand bindet. Es stellte sich daher die Frage, ob durch die Mutationen die Ligandbindung beeinflusst wird.

Um die Effektivität der Bindung eines Liganden an einen NHR zu untersuchen, können sogenannte „Proteaseverdau-Schutzexperimente“ durchgeführt werden.

Nukleäre Hormonrezeptoren durchlaufen üblicherweise nach Ligandbindung eine Konformationsänderung, die andere Peptidsequenzen und Proteindomänen für Kofaktoren und Proteine der Transkriptionsmaschinerie erreichbar macht. Durch diese Konformationsänderungen können spezifische Proteasen einzelne Aminosäuresequenzen nun leichter bzw. schwerer angreifen. Spezifische Proteasen hydrolysieren Peptidbindungen immer an spezifischen Stellen. So spaltet z.B. die Protease Trypsin die Peptidbindung immer C-terminal der Aminosäuren Lysin oder Arginin. Unterzieht man das PPAR γ_2 -Protein einem zeitlich begrenzten Trypsinverdau mit einer anschließenden Gelelektrophorese, so zeigt sich ein charakteristisches Verdauemuster. Wiederholt man den Verdau mit ligandgebundenem PPAR γ_2 , so ergibt sich ein anderes Verdauemuster und es entsteht ein neues Fragment von 27 kD. Die Trypsinschnittstellen in diesem Fragment sind nun durch den Liganden vor dem Angriff der Protease geschützt. Führt man dann die entsprechenden Versuche mit den PPAR γ_2 -Punktmutanten durch, dann müssten nach Ligandbindung ähnlich große Mengen dieses geschützten Fragmentes zu detektieren sein, für den Fall, dass die PPAR γ_2 -Punktmutanten den Liganden genauso effektiv binden wie der PPAR γ_2 -Wildtyp.

Es wurden also der PPAR γ_2 -Wildtyp und die PPAR γ_2 -Punktmutanten in Gegenwart von ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiert. Die Produkte wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rosiglitazon inkubiert, dann dem Trypsinverdau unterzogen und über ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Am Verdau des PPAR γ_2 -Wildtyps sieht man, dass Konzentrationen von Rosiglitazon im Bereich von 100 nM bis 1 μM große Bereiche des Proteins vor dem Abbau schützen, da man ab diesen Konzentrationen zwei prominente PPAR γ_2 -Verdau-Banden detektieren kann (Abb.4.23).

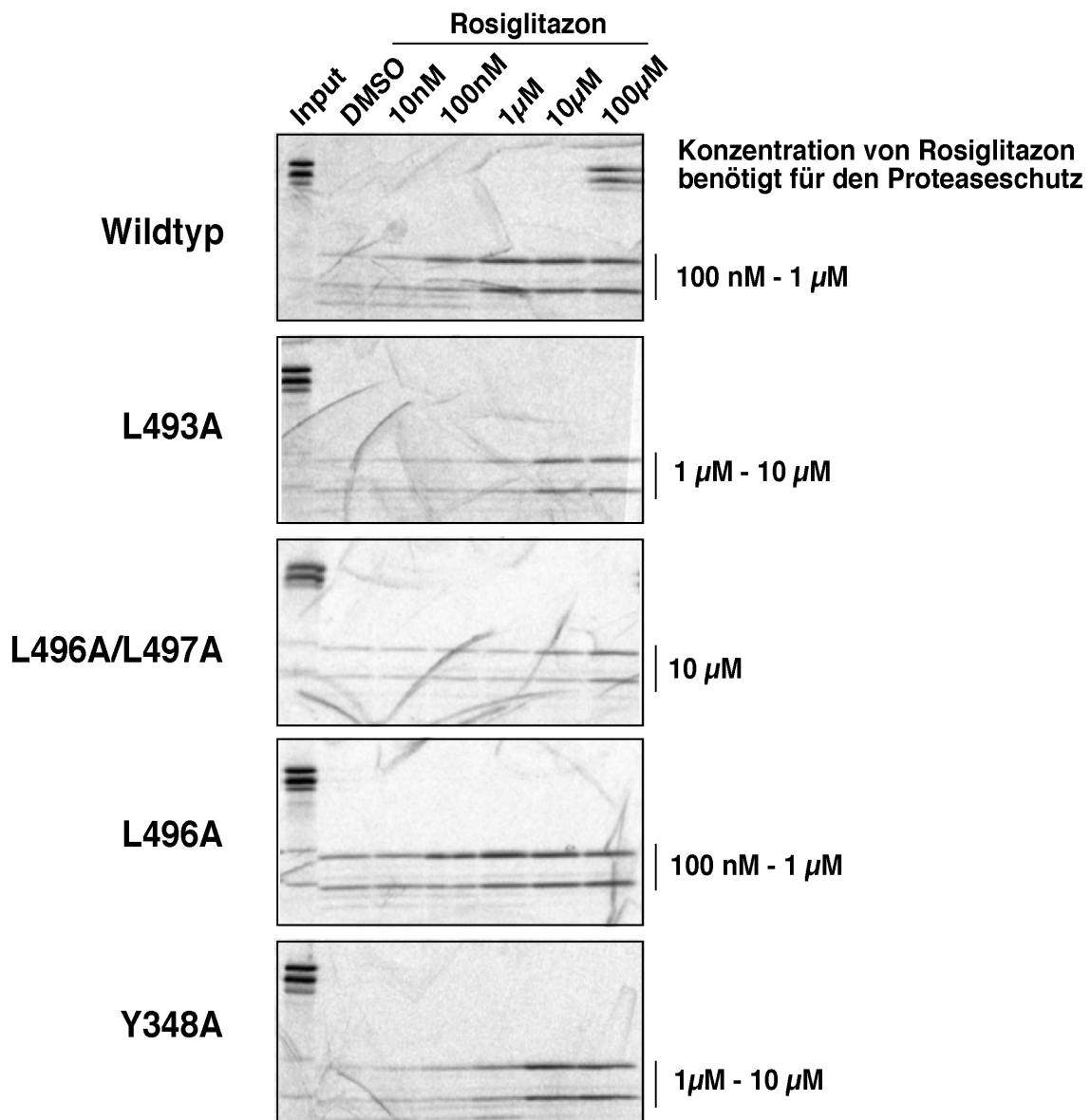


Abb.4.23: PPAR γ_2 -Wildtyp und PPAR γ_2 -Punktmutanten unterscheiden sich untereinander in der Affinität zu Rosiglitazon.

Der PPAR γ_2 -Wildtyp und die PPAR γ_2 -Punktmutanten wurden in Gegenwart von 35 S-Methionin *in vitro* translatiert, die Produkte wurden jeweils mit den angegebenen Konzentrationen von Rosiglitazon inkubiert und dann dem Trypsinverdau unterzogen. Dieser wurde anschließend über ein 10%SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Ein vergleichbares Bild bietet lediglich die PPAR γ_2 -Mutante L496A. Auch hier wurden im Bereich von 100 nM bis 1 μM Rosiglitazon PPAR γ_2 -Mengen derselben Größe detektiert.

Bei PPAR γ_2 -L496A/L497A wurde erst bei 10 μM Rosiglitazon eine effektive Protein-Ligand-Bindung erreicht, die durch die dann eingeleitete Konformationsänderung die Protease am weiteren Abbau des Proteins hinderte.

Die Punktmutanten PPAR γ_2 -Y348A und PPAR γ_2 -L493A wurden im Konzentrationsbereich von 1 μ M bis 10 μ M Rosiglitazon vor dem kompletten Verdau geschützt.

Wildtyp	L493A	L496A/L497A	L496A	Y348A
100nM	>1 μ M	10 μ M	100nM	1 μ M

Tab.4.6 : Zusammenfassung der unterschiedlichen Affinitäten des PPAR γ_2 -Wildtyps und der PPAR γ_2 -Punktmutanten zu Rosiglitazon.

Angegeben ist die Konzentration von Rosiglitazon, bei der Bindung an PPAR γ_2 stattfindet.

4.5.7 Die PPAR γ_2 -Punktmutanten sind in ihrem Abbauverhalten eingeschränkt

Um den ligandabhängigen Abbau der SV-PPAR γ_2 -Punktmutanten zu untersuchen, wurden diese bzw. der SV-PPAR γ_2 -Wildtyp jeweils in NIH3T3-Zellen, die kein endogenes PPAR γ_2 enthalten, transfiziert und anschließend mit dem PPAR γ_2 -Liganden Rosiglitazon behandelt (10 μ M Rosiglitazon). Nach Gelelektrophorese äquivalenter Proteinmengen über ein SDS-Polyacrylamid-Harnstoffgel wurde der Western-Blot mit Antikörper gegen PPAR γ inkubiert.

Es wurde ein Ansatz mit einer Rosiglitazon-Konzentration von 10 μ M durchgeführt, da bei dieser Rosiglitazon-Konzentration auch die PPAR γ_2 -Punktmutante mit der geringsten Ligand-Affinität Rosiglitazon bindet (vgl. Abb.4.23).

Der Western-Blot der mit SV-PPAR γ_2 -Wildtyp transfizierten und mit 10 μ M Rosiglitazon behandelten NIH3T3-Zellen zeigt deutlich, wie die unphosphorylierte PPAR γ_2 -Wildtyp-Bande unter Ligandbehandlung verschwindet, PPAR γ_2 also degradiert wurde (Abb.4.24). Betrachtet man dann die Banden der nicht-phosphorylierten PPAR γ_2 -Punktmutanten, so sieht man, dass keine der Mutanten nach Behandlung mit 10 μ M Rosiglitazon effektiv abgebaut wurde. Die Rosiglitazon-Bande der Mutante L493A ist etwas schwächer als die der unbehandelten mit L493A transfizierten Zellen, aber die Banden von L496A und Y348A zeigen keinerlei Unterschied. Weiterhin scheint Rosiglitazon die Doppelmutante L496A/L497A sogar zu stabilisieren, da in diesen Zellen mehr PPAR γ_2 -Protein zu detektieren war als in den unbehandelten Zellen.

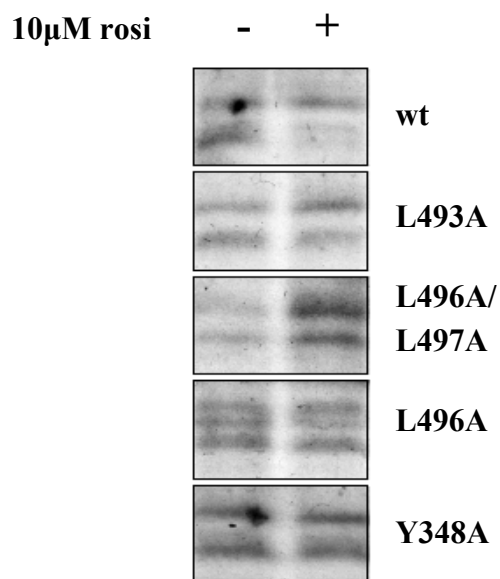


Abb.4.24: Die PPAR γ_2 -Punktmutanten werden nach Ligandaktivierung nicht abgebaut.

NIH3T3-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für PPAR γ_2 bzw. den angegebenen PPAR γ_2 -Punktmutanten transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden sie für 24h mit DMSO („-“) bzw. 10 µM Rosiglitazon („+“, rosi) behandelt und anschließend wurde ein Westernblot mit einem Antikörper gegen PPAR γ_2 durchgeführt.

Zusammenfassend wird also nur der PPAR γ_2 -Wildtyp sowie mit Einschränkungen die PPAR γ_2 -Punktmutante L493A nach Ligandaktivierung degradiert (vgl. Tab.4.6)

Wildtyp	L493A	L496A/L497A	L496A	Y348A
+++	+	-	-	-

Tab.4.6: Zusammenfassung der Degradationseigenschaften vom PPAR γ_2 -Wildtyp und den PPAR γ_2 -Punktmutanten nach Behandlung mit Rosiglitazon.

„+++“ beschreibt eine ligandabhängige Degradation entsprechend des PPAR γ_2 -Wildtyps, „+“ eine leichte und „-“ keine Degradation.

4.5.8 Transaktivierung und Degradation sind zumindest bei diesen PPAR γ_2 -Punktmutanten nicht zu trennen

Fasst man nun die Ergebnisse der Untersuchungen zu den PPAR γ_2 -Punktmutanten zusammen (siehe Kap.4.2 – 4.5.7), so zeigt sich, dass zumindest bei diesen PPAR γ_2 -Punktmutanten Transaktivierung und Degradation nicht unabhängig voneinander ablaufen, sondern sogar korrelieren. Weiterhin ist bekannt, dass die transkriptionell aktiven und abbaubaren PPAR γ_2 -Punktmutanten auch effektiver Koaktivatoren rekrutieren als die inaktiven und stabilen Punktmutanten (S. Trumm, unpublizierte Daten). Die Interaktion von PPAR γ_2 und RXR ist aber bei keiner der PPAR γ_2 -Punktmutanten gestört (S. Trumm, unpublizierte Daten).

PPAR γ_2 - Mutanten	Ligand- Affinität	Transkriptionelle Aktivität	Degradation	RXR- Interaktion	Koaktivator- Rekrutierung
Wildtyp	100nM	+++	+++	+++	+++
Y348A	1 μ M	-	-	+++	-
L493A	>1 μ M	+	+	+++	+
L496A	100nM	-	-	+++	-
L496A/ L497A	10 μ M	-	-	+++	-

Tab.4.8: Zusammenfassung der Eigenschaften der klonierten PPAR γ_2 -Punktmutanten. Die Untersuchungen zur RXR-Interaktion und Koaktivator-Rekrutierung wurden von S. Trumm in Yeast-2-hybrid-Systemen durchgeführt.

4.6 Der Einfluss des Proteasoms auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2

4.6.1 Die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2 mit Proteasom-Inhibitoren im Luziferase-Reporter-System

Einige NHRs benötigen ein aktives Proteasom für ihre Transaktivierung, andere zeigen eine bessere transkriptionelle Aktivität bei einer Hemmung der proteasomalen Aktivität.

Um der Frage nachzugehen, wie sich Inhibitoren des Proteasoms auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2 auswirken, wurde sich zunächst eines Luziferase-Reporter-Systems bedient.

Da Proteasom-Inhibitoren, insbesondere das hier verwendete ALLN, Stress-aktivierte Kinasen wie z.B. JNK/SAPK stimulieren, wurde für alle Experimente SV-PPAR γ_2 -S112A verwendet, da dieses nicht mehr durch Stress-Kinasen am Serin 112 phosphoryliert werden kann. Phosphorylierung an diesem Serin inhibiert die Ligandbindung, wodurch die transkriptionelle Aktivität des PPAR γ_2 -Proteins gehemmt wird (siehe Kap.1.3).

Es wurden transiente Transfektionen von SV-PPAR γ_2 -S112A zusammen mit einem 3xDR1-Luziferase-Expressionsplasmid in NIH3T3-Zellen durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 14 Stunden mit dem PPAR γ -Liganden GW347845 bzw. dessen Lösungsmittel DMSO behandelt und in normalem

oder in mit den Proteasom-Inhibitoren ALLN bzw. MG-132 versetztem gestripptem FCS-Medium inkubiert.

Nach Transfektion von SV-Sport und Ligandbehandlung ergab sich wie erwartet keine Induktion der Luziferaseaktivität.

SV-PPAR γ_2 -S112A zeigte eine leichte Erhöhung der Basalaktivität gegenüber von SV-Sport, und die Stimulierung mit GW347845 ergab wie gewohnt eine 3,6 fache Induktion von PPAR γ_2 -S112A (siehe Abb.4.25).

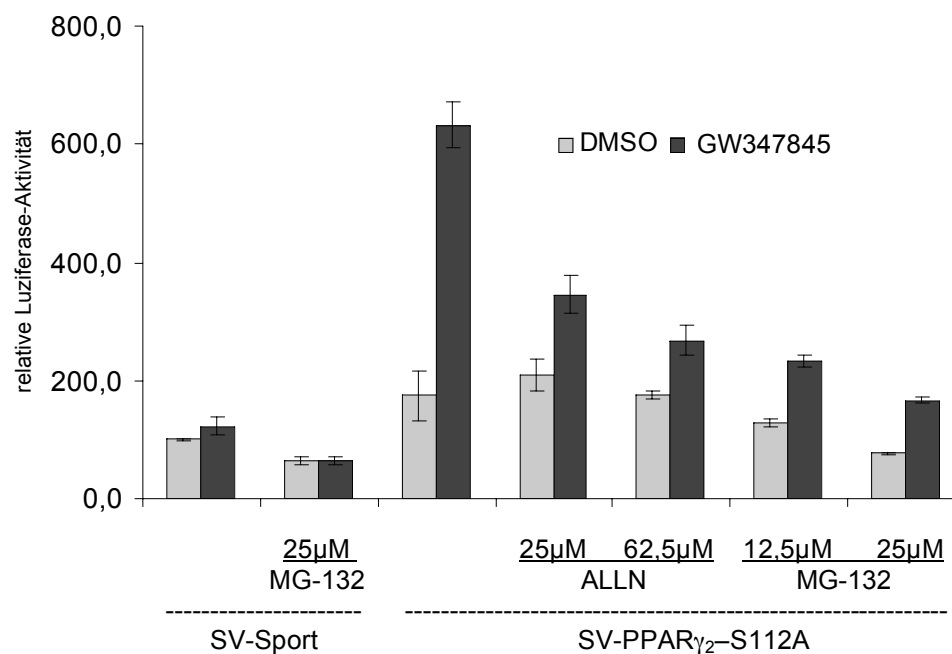


Abb.4.25: Proteasom-Inhibitoren vermindern die Transaktivierung von PPAR γ_2 .

NIH3T3-Zellen wurden mit einem 3xDR1-Luziferase-Reporterplasmid und den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 14h mit DMSO bzw. 100 nM GW347845 sowie den angegebenen Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren ALLN bzw. MG-132 behandelt. Anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Die Basalaktivität von PPAR γ_2 -S112A in den mit ALLN inkubierten Zellen bewegte sich in der Größenordnung der Basalaktivität von PPAR γ_2 -S112A, jedoch sank die Induktion nach Ligandbehandlung deutlich auf das ca. 2 fache bei 25 µM bzw. auf das ca. 1,5 fache bei 62,5 µM ALLN.

Die Werte für die in MG-132 inkubierten Zellen fielen noch geringer aus. Allerdings sank auch die Basalinduktion der mit MG-132 inkubierten Zellen auf das Niveau der mit SV-Sport transfizierten NIH3T3-Zellen (siehe Abb.4.25).

Betrachtete man nun die relative Induktion eines jeden Ansatzes, also den Quotienten der Luziferase-Aktivität mit bzw. ohne Ligandbehandlung, so zeigte sich eine deutliche Einschränkung der Luziferase-Aktivität bei den mit Proteasom-Inhibitor behandelten NIH3T3-Zellen. PPAR γ_2 -S112A wies eine relative Induktion von 3,6 auf, die mit ALLN behandelten Zellen, ähnlich wie zuvor gesehen, 1,6 bzw. 1,5.

Bei den mit 25 μ M MG-132 behandelten Zellen kann bei dieser Art der Darstellung nun sogar eine relative Induktion von 2,1 angegeben werden, obwohl die absolute Induktion vor dieser Art der Berechnung unter dem Grenzwert der Basalaktivität von PPAR γ_2 -S112A lag (vgl. Abb.4.25 und Abb.4.26).

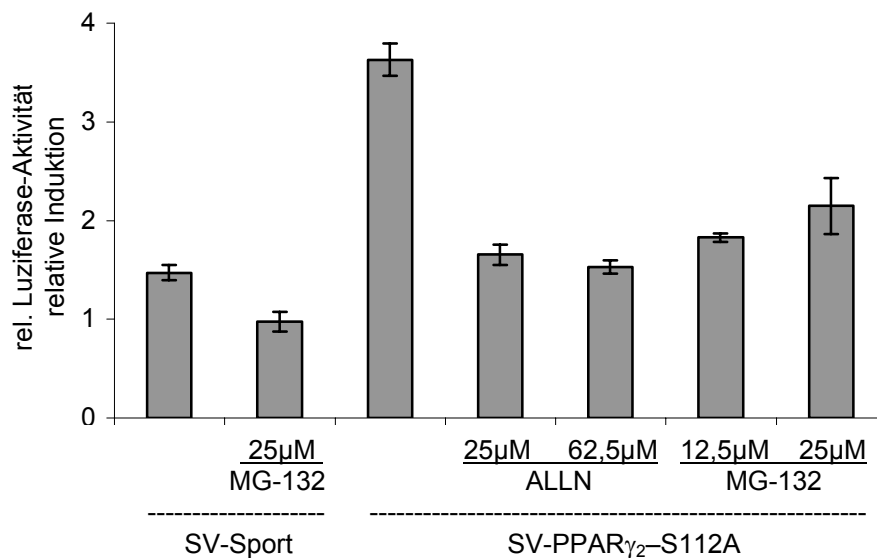


Abb.4.26: Die relative Induktion wird von Proteasom-Inhibitoren nicht so deutlich eingeschränkt. Für die Berechnung der relativen Induktion der relativen Luziferase-Aktivität wird für jeden Ansatz jeweils der Quotient gebildet aus der Luziferase-Aktivität mit bzw. ohne Ligand-Behandlung. Die Versuchsdaten entsprechen denen der Abbildung 4.25.

Proteasom-Inhibitoren haben in der Luziferase und der β -Galaktosidase weitere Angriffsziele. Es ist bekannt, dass Proteasom-Inhibitoren Luziferase und β -Galaktosidase stabilisieren, gleichzeitig aber auch deren Aktivität hemmen. Auf diese Weise könnte die Aussagekraft der Luziferase-Reporter-Systeme eingeschränkt sein. Aus diesem Grund wurde das Transkriptionsverhalten von PPAR γ_2 -S112A noch mit einem RT-PCR-Ansatz gegen endogene PPAR γ_2 -Zielgene untersucht.

4.6.2 Die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2 mit Proteasom-Inhibitoren in der RT-PCR gegen endogene PPAR γ_2 -Zielgene

Für die Untersuchungen der transkriptionellen Aktivität von PPAR γ_2 mittels RT-PCR gegen endogene PPAR γ_2 -Zielgene wurden NIH3T3-Zelllinien verwendet, die PPAR γ_2 -S112A stabil exprimieren. Diese Zellen wurden 24 Stunden in Medium mit ALLN oder MG-132 mit oder ohne Rosiglitazon bzw. DMSO inkubiert. Danach wurde die RNA isoliert und eine RT-PCR gegen aP2 und LPL sowie β -Aktin als Kontrolle, durchgeführt.

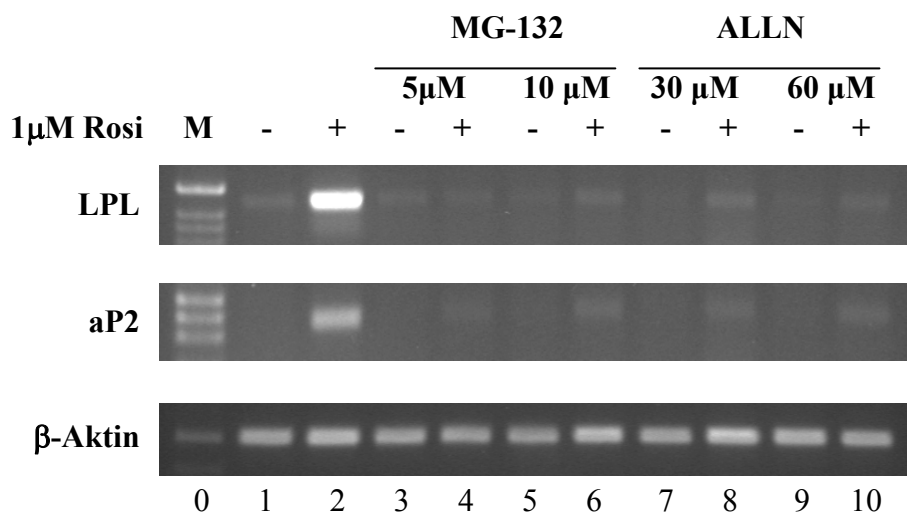


Abb.4.27: Proteasom-Inhibitoren reduzieren die Transkription endogener PPAR γ_2 -Zielgene.

Stabile PPAR γ_2 -S112A-NIH3T3-Zelllinien wurden für 24h mit den angegebenen Mengen an Proteasom-Inhibitoren (MG-132 und ALLN) und DMSO („-“) bzw. 1 μ M Rosiglitazon („+“, Rosi) inkubiert. Die isolierte RNA wurde quantitativ mit Hilfe der RT-PCR untersucht. „M“ steht für den DNA-Marker.

In den PPAR γ_2 -S112A-Zellen, die nicht mit Proteasom-Inhibitor behandelt wurden, zeigte sich nach Behandlung mit 1 μ M Rosiglitazon eine prominente Aktivierung von LPL und aP2 (vgl. Spuren 1 und 2, Abb.4.27). Im Vergleich dazu bemerkte man bei allen mit MG-132 bzw. ALLN behandelten Zellen nach Induktion mit 1 μ M Rosiglitazon eine deutliche Reduktion im Signal von LPL und aP2.

Das β -Aktin wurde in allen Zellen weder von der Ligand- noch von der Proteasom-Inhibitor-Behandlung beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die ligandabhängige Aktivierung der endogenen PPAR γ_2 -Zielgene LPL und aP2 und rückschließend davon die

ligandvermittelte Transaktivierung von PPAR γ ₂-S112A durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt wird.

5. Diskussion

5.1 Die PPAR γ_2 -Punktmutanten sind transkriptionell inaktiv

Da der Nukleäre Hormonrezeptor PPAR γ so viele bedeutende und vielfältige biologische Funktionen aufweist, wäre es auch unter therapeutischen Gesichtspunkten sehr hilfreich, wenn es gelänge, die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors selektiv zu beeinflussen. Daher ist es wichtig, die Mechanismen der Transaktivierung von PPAR γ genauer zu verstehen.

Um die Beziehung zwischen Transkriptionsmaschinerie und dem Ubiquitin-Proteasom-System für den Nukleären Hormonrezeptor PPAR γ_2 zu untersuchen, sollte analysiert werden, ob die transkriptionelle Aktivität und die Degradation von PPAR γ_2 unabhängig voneinander verlaufen können. Mutanten, die transkriptionell inaktiv sind, aber degradiert werden, sind für RXR bekannt (Osburn *et al.*, 2001). Da RXR und PPAR γ_2 eine sehr ähnliche Primärstruktur besitzen und die analogen Mutanten PPAR γ_2 -E499Q und RXR-E456K ein ähnliches Verhalten zeigen (Hauser *et al.*, 2000; Osburn *et al.*, 2001), wurden zu den von Osburn *et al.* beschriebenen RXR-Mutanten analoge PPAR γ_2 -Mutanten generiert. Im einzelnen wurden die folgenden PPAR γ_2 -Punktmutanten kloniert: PPAR γ_2 -Y348A (analog zu RXR-K284D), PPAR γ_2 -L493A (analog zu RXR-L451A), PPAR γ_2 -L496A und PPAR γ_2 -L496A/L497A (analog zu RXR-M454A/L455A).

Alle PPAR γ_2 -Punktmutanten wurden in zwei verschiedenen Systemen auf ihre transkriptionelle Aktivität untersucht. Zum einen wurde ein transientes Luziferase-Reporter-System mit einem synthetischen Promotor, in diesem Fall drei aufeinander folgenden DR1-Elementen, verwendet, zum anderen wurde mit Hilfe der RT-PCR die endogene Genexpression analysiert.

Im Luziferase-Reporter-System zeigte sich, dass die PPAR γ_2 -Punktmutanten in ihrer transkriptionellen Aktivität nach Ligandaktivierung im Vergleich zum PPAR γ_2 -Wildtyp deutlich eingeschränkt sind.

Mutanten, die nach Ligandaktivierung in ihrer transkriptionellen Aktivität deutlich eingeschränkt sind und auch keine größere transkriptionelle Aktivität aufweisen als die Basalaktivität des Wildtyps, werden üblicherweise als transkriptionell inaktiv betrachtet (Chen *et al.*, 2000; Osburn *et al.*, 2001; Slagsvold *et al.*, 2000).

Beim Betrachten der relativen Luziferase-Aktivität von mit Ligand behandelten gegenüber unbehandelten Zellen desselben Transfektionsansatzes zeigte allerdings insbesondere PPAR γ_2 -L493A eine relative Induktion, die in der Größenordnung des PPAR γ_2 -Wildtyps liegt. Deshalb stellte sich die Frage, ob es wirklich eindeutig möglich ist, diese Mutanten wie üblich als transkriptionell inaktiv zu bezeichnen (Chen *et al.*, 2000; Osburn *et al.*, 2001; Slagsvold *et al.*, 2000). Die Mutanten sind durch die Mutationen vielleicht nur in ihrer Ligandantwort abgeschwächt, aber durchaus noch transkriptionell aktiv.

Bei der Untersuchung der ligandabhängigen endogenen Expression der PPAR γ_2 -Zielgene aP2 und LPL mittels RT-PCR stellte sich dann heraus, dass PPAR γ_2 -L493A zwar noch eine sehr schwache ligandvermittelte Aktivität zeigt, die übrigen Mutanten jedoch tatsächlich nicht mehr transkriptionell aktiv sind.

Vergleicht man die beiden grundlegenden Versuchsansätze, so erscheint die Aussagekraft des Systems mit dem Nachweis der endogenen PPAR γ_2 -Zielgene größer, da dort keine ligandunabhängige Basalaktivität beobachtet werden kann. Die Begründung dafür könnte in der unterschiedlichen Chromatineinbettung der DNA der jeweiligen PPAR γ_2 -abhängigen Gene liegen.

Bei den Luziferase-Reporter-Versuchen wurde ein Luziferase-Expressionsplasmid unter Kontrolle eines synthetischen Promotors aus drei aufeinander folgenden DR1-Elementen in eine eukaryotische Zelle transfiziert. Zwar scheinen auch diese Plasmide von Histonen umgeben zu werden, aber sie werden nicht in die Chromatinstruktur der endogenen DNA integriert.

Untersucht man hingegen die Aktivierung endogener Gene, sind diese in das Chromatin der Zelle integriert und stehen zudem unter der Kontrolle endogener Promotoren (Weis *et al.*, 1992; Bustin, 2000). Es liegt nahe zu vermuten, dass für die Transkription dieser Gene Kofaktoren benötigt werden, die für die Transkription des synthetischen, nicht in Chromatin eingebetteten Promotors nicht erforderlich sind. So ist z.B. eine der Voraussetzungen für die Transkription eukaryotischen Chromatins die Lösung der DNA von den Histonen. Dies geschieht in der Regel durch Acetylierung der Histone durch spezielle Enzyme, die Histon-Acetyl-Transferasen (Brown *et al.*, 2000; Glass & Rosenfeld, 2000; Kim *et al.*, 2001; Kingston & Narlikar, 1999). Weiterhin könnten auch andere Promotorelemente oder Transkriptionsfaktoren die Expression dieser PPAR γ_2 -Zielgene regulieren. Diese scheinen jedoch in den in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Systemen keine Rolle zu spielen, da die Gabe von PPAR γ -Liganden ausreichend ist, um zu einer Aktivierung der Gene zu führen.

In der AF-2-Region treten fast alle Koaktivatoren ligandabhängig über das hochkonservierte LXXLL-Motiv in der Aminosäuresequenz mit der LBD in Kontakt (Heery *et al.*, 1997). Viele Mitglieder der LXXLL-bindenden Koaktivator-Familien, die an PPAR γ_2 binden, wie z.B. p160/SRC, p300/CBP, zeigen eine intrinsische Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität (Chen *et al.*, 1997; Kodera *et al.*, 2000; Ogryzko *et al.*, 1996; Spencer *et al.*, 1997;). Eingeschränkte Bindungsfähigkeit für Koaktivatoren mit HAT-Aktivität durch die Mutationen in der AF-2-Region von PPAR γ_2 könnte also die Transkription der endogenen PPAR γ_2 -abhängigen Gene stärker beeinflussen als in den Luziferase-Reporter-Systemen (vgl. hierzu auch 5.2). Da die Expressionsplasmide in den Luziferase-Reporter-Versuchen nicht entsprechend der übrigen Chromatinstruktur mit Histonen verpackt sind, entfällt dieser Teil der eukaryotischen Genregulation. Allerdings könnte auch allein die noch wenig verstandene AF-1-Region von PPAR γ_2 ähnlich wie bei anderen NHRs auch (Deblois & Giguere, 2003; Ford *et al.*, 1997; Henriksson *et al.*, 1997; Wärnmark *et al.*, 2003) durch die ligandbindungsunabhängige Rekrutierung von Koaktivatoren wie TBP oder AdaP2 eine schwache Transkription des Luziferase-Gens induzieren (Ohshima *et al.*, 2004; Valley *et al.*, 2005; Wärnmark *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 2004).

Die Theorie der ligandbindungsunabhängigen Rekrutierung von Koaktivatoren könnte zugleich auch eine Erklärung für eine weitere interessante Beobachtung im Reporter-

Versuch mit PPAR γ_2 liefern. Die basale transkriptionelle Aktivität des PPAR γ_2 -Wildtyps und auch der transkriptionell voll aktiven Mutante PPAR γ_2 -S112A zeigten einen höheren Wert, als in nur mit SV-Sport transfizierten Zellen gemessen werden konnte. Auch Molnar et al. machten 2005 diese Beobachtung und folgerten aus ihren Experimenten, dass eine Gruppe von hochkonservativ vererbten Aminosäuren in der AF-2 bzw. Helix-12-Region der LBD in der PPAR-Familie für eine ligand-unabhängige Koaktivator-Assoziation und eine damit verbundene erhöhte Basalaktivität von PPAR γ_2 verantwortlich sei (Molnar *et al.*, 2005). Sie konnten jedoch nicht ausschließen, dass dieser Effekt nicht auf die Bindung eines ubiquitär z.B. im Kulturmedium vorhandenen endogenen PPAR γ_2 -Liganden mit geringer Affinität zurückzuführen war. Auf diese Weise zeigen nämlich z.B. die Retinoid Orphan Rezeptoren (RORs) oder der Hepatozyten Nukleäre Faktor 4 α (HNF4 α) eine konstitutionelle Aktivität (Dhe-Paganon *et al.*, 2002; Kallen *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde für alle Reporter-Versuche gestripptes FCS-Zellkulturmedium verwendet, das von lipophilen Substanzen und Hormonen durch Inkubation mit Aktivkohle befreit worden war. Eine Aktivierung von PPAR γ_2 mit einem endogenen Liganden war daher sehr unwahrscheinlich.

Demnach könnte die AF-2 Region von PPAR γ_2 ähnlich wie bei den RARs oder dem Konstitutiven Androstanen Rezeptor (CAR) schon in Abwesenheit von Ligand Koaktivatoren binden (Baes *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2005).

Diese Befunde stützen auch die Evolutionstheorie der NHRs. So geht man davon aus, dass die ersten NHRs zunächst konstitutionell aktive Transkriptionsfaktoren waren, die mit der Zeit die Ligand-Bindung und später dann auch die Transkriptionskontrolle durch Ligand-Bindung „erlernt“ haben (Laudet, 1997).

Um der Frage nachzugehen, ob noch andere Transkriptionsfaktoren an der unterschiedlichen Regulation der Transaktivierung in den beiden verwendeten Nachweissystemen eine Rolle spielen, oder ob der Chromatinverpackung alleine diese Bedeutung zukommt, könnte man eine Zelllinie verwenden, bei der der DR1-Luziferase-Reporter stabil im Genom integriert ist. Dieser sollte damit betreffend der Chromatineinbettung denselben Regulationsmechanismen der Transkription unterliegen wie die endogenen Gene. Als Nachteil dieser Methode gereicht die Unkontrollierbarkeit

der Integrationsstelle der zu transfizierenden DNA-Sequenz im Chromatin. Wird der DNA-Abschnitt z.B. direkt hinter einem weiteren endogenen Promotor integriert, würde die Transkription des Luziferasegens noch zusätzlich von diesem reguliert.

5.2 Die Affinität der PPAR γ_2 -Punktmutanten zu Rosiglitazon ist reduziert

Da mit Hilfe der Gal4-Luziferase-Reporter-Versuche ermittelt werden konnte, dass die reduzierte Transkriptionsaktivierung weder auf ein gestörtes Heterodimerisierungsvermögen noch eine abgeschwächte DNA-Bindung von PPAR γ_2 zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe von Proteaseverdau-Schutzexperimenten das Ligandbindungsvermögen von PPAR γ_2 untersucht. Die von Osburn et al. beschriebenen RXR-Mutanten sind alle in der Lage, Ligand mit Wildtyp-Affinität zu binden (Osburn *et al.*, 2001; Schulman *et al.*, 1995). Bei den PPAR γ_2 -Mutanten zeigte sich, dass lediglich die transkriptionell inaktive Mutante L496A eine PPAR γ_2 -Wildtyp-ähnliche Affinität zu Rosiglitazon aufweist. Die übrigen Mutanten können den Liganden nur signifikant schwächer binden und auch die noch leicht transkriptionell aktive Mutante L493A zeigte eine deutlich geringere Ligandaffinität.

Es scheint also nicht die Ligandbindung per se entscheidend für die Transaktivierung zu sein, sondern vielmehr die sich dadurch einstellenden Konformationsänderungen in der LBD bzw. am gesamten Rezeptor. Diese Konformationsänderungen legen dann wiederum Proteinabschnitte auf PPAR γ_2 frei, die für die Bindung von Koaktivatoren zur Verfügung stehen (Darimont *et al.*, 1998; McKenna & O'Malley, 2000; Moras & Gronemeyer, 1998; Nolte *et al.*, 1998; Shiao *et al.*, 1998).

Mit den durchgeführten Proteaseverdau-Schutzexperimenten konnte so nun aber auch die Konzentration an Rosiglitazon ermittelt werden, bei der alle PPAR γ_2 -Mutanten den Liganden optimal binden. Mit dieser wurden dann die Versuche zu den Transaktivierungs- und Degradationseigenschaften von PPAR γ_2 und den Mutanten durchgeführt.

5.3 Abbau und Aktivierung von PPAR γ_2 sind notwendig miteinander gekoppelt

Für viele NHRs ist die Ligandaktivierung notwendige Bedingung für die Degradation des Rezeptors (Boudjelal *et al.*, 2000; Dace *et al.*, 2000; Kopf *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2000; Lonard *et al.*, 2000; Nawaz *et al.*, 1999; Wallace & Cidlowski, 2001). Für RXR, dessen Abbau sowohl durch RXR-Liganden als auch durch Liganden des jeweiligen Heterodimer-Partners induziert wird, konnte mit Hilfe der von Osburn *et al.* beschriebenen Punktmutanten gezeigt werden, dass zwar die Ligandbindung, nicht aber die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors essentiell für seine Degradation ist (Osburn *et al.*, 2001). Das Abbauverhalten der PPAR γ_2 -Punktmutanten sollte zunächst mit Hilfe der mit einem „myc-tag“ markierten PPAR γ_2 -Proteine untersucht werden (Rowan & Bodmer, 1997).

Bei der Untersuchung der Transkriptionseigenschaften von myc-PPAR γ_2 wurde deutlich, dass die ligandunabhängige Basalaktivität von myc-PPAR γ_2 im Vergleich zum PPAR γ_2 -Wildtyp deutlich erhöht ist. Nach Ligandaktivierung zeigte sich jedoch nur noch eine äußerst schwache Steigerung der transkriptionellen Aktivität. Denkbar ist, dass die Konformation von PPAR γ_2 durch die myc-Sequenz so verändert wird, dass schon ohne Ligand Transkription stattfinden kann, eine weitere ligandvermittelte Induktion der Transkription jedoch verhindert wird. Ob dies an einem durch die neue Tertiärstruktur veränderten Ligand- oder Kofaktorinteraktionsverhalten von PPAR γ_2 liegt, ist fraglich.

Bei der Analyse des Abbaus von myc-PPAR γ_2 zeigten sich weder beim Wildtyp noch bei irgendeiner der Mutanten Degradationserscheinungen. Insbesondere das veränderte Verhalten des Wildtyps zeigt, dass der gewählte Ansatz mit einem „myc-tag“ nicht das Verhalten des PPAR γ_2 -Proteins widerspiegelt. Auch hierbei könnte eine eventuell veränderte Tertiärstruktur es z. B. einer vielleicht direkt an PPAR γ_2 bindenden Ubiquitin-Ligase unmöglich machen, überhaupt eine Bindung einzugehen (Lingbeck *et al.*, 2003). Bindet die Ubiquitin-Ligase über einen Kofaktor an PPAR γ_2 , würde es sogar genügen, wenn die myc-Sequenz im Rahmen der Vorgänge der transkriptionellen Aktivierung die Interaktion von PPAR γ_2 mit diesem Kofaktor hemmen würde. Dies

wäre ein weiterer Hinweis für eine notwendige Kopplung zwischen transkriptioneller Aktivität des Proteins und seiner Degradation.

Einige Ubiquitin-Ligasen von NHRs wirken sogar selbst als Koaktivatoren (Brower *et al.*, 2002; Imhof & McDonnell, 1996; Nawaz *et al.*, 1999; Saji *et al.*, 2001). Bei Koaktivator-Rekrutierungs-Studien mit Hilfe von Hefe-Zwei-Hybridsystemen („yeast two hybrid system“) (Fields & Song, 1989) zeigten lediglich der Wildtyp und sehr schwach die PPAR γ_2 -Punktmutante L493A Interaktionen mit einigen Koaktivatoren wie z.B. PBP (PPAR γ -binding-Protein) oder CBP (CREB-binding protein) (S. Trumm unpublizierte Daten). Diese Theorie unterstützen auch Untersuchungen am PPAR-Familienmitglied PPAR α . PPAR α -Protein, das mit dem Koaktivator CBP inkubiert wurde, wurde schneller abgebaut, wohingegen Inkubation mit dem die Transkription hemmenden Korepressor N-CoR stabilisierend wirkte (Blanquart *et al.*, 2004). RIP140 hingegen ist ein Korepressor, der ligandunabhängig in der AF-2-Region von PPAR γ_2 bindet, aber so ebenfalls den Abbau des Rezeptors blockiert (Hauser *et al.*, 2000). Es könnte sein, dass mit der Degradationsmaschinerie assoziierte Kofaktoren mit RIP140 um dieselbe AF-2-Bindestelle konkurrieren und dies somit ein weiteres Regulationselement im Ubiquitin-vermittelten Abbau von PPAR γ_2 darstellt.

Da der „myc-tag“ offensichtlich sowohl ligandabhängige Transaktivierung als auch Degradation von PPAR γ_2 inhibiert, wurde das Abbauverhalten der PPAR γ_2 -Punktmutanten ohne myc-Markierung getestet. Bei für alle Mutanten optimaler Rosiglitazon-Konzentration konnte man beim PPAR γ_2 -Wildtyp eine sehr deutliche und bei der nur leicht transkriptionell aktiven PPAR γ_2 -Punktmutante L493A eine äußerst schwache Degradation erkennen. Im Gegensatz dazu waren bei den übrigen Mutanten, insbesondere auch bei der mit Wildtyp-Affinität ligandbindenden PPAR γ_2 -Punktmutante L496A, keine Abbauerscheinungen zu sehen.

Diese Befunde unterstreichen die Theorie, dass offensichtlich anders als für RXR (Osburn *et al.*, 2001) transkriptionelle Aktivität und Degradation von PPAR γ_2 zumindest bei den untersuchten Mutanten miteinander gekoppelt sind.

Zumindest die PPAR γ_2 -Punktmutante L493A kann aber nun für spezifischere Studien über die Rolle der Koaktivatoren bei der transkriptionellen Aktivierung und dem Abbauverhalten von PPAR γ_2 verwendet werden.

Zusammenfassend verhalten sich die Punktmutanten von PPAR γ_2 betreffend transkriptioneller Aktivität und Degradation also anders als ihre strukturgleichen analogen Pendanten von RXR. Welche weiteren Faktoren für den ligandabhängigen Abbau entscheidend sind, bleibt weiterhin aufzuklären.

Die für den Abbau von PPAR γ_2 verantwortliche Ubiquitin-Ligase bindet möglicherweise über einen oder mehrere bei der Transkription oder Transkriptionsinitiation rekrutierte Kofaktoren das PPAR γ_2 -Protein und markiert es so für den Abbau (vgl. Abb.5.1 Modell rechts). Die Assoziation dieser Kofaktoren mit PPAR γ_2 kann in den vorliegenden PPAR γ_2 -Punktmutanten gestört sein. Allerdings ist es auch möglich, dass die Ubiquitin-Ligase über dieselben strukturellen Eigenschaften, die auch für die ligandabhängige transkriptionelle Aktivierung verantwortlich sind, direkt an PPAR γ_2 bindet (vgl. Abb.5.1 Modell links).

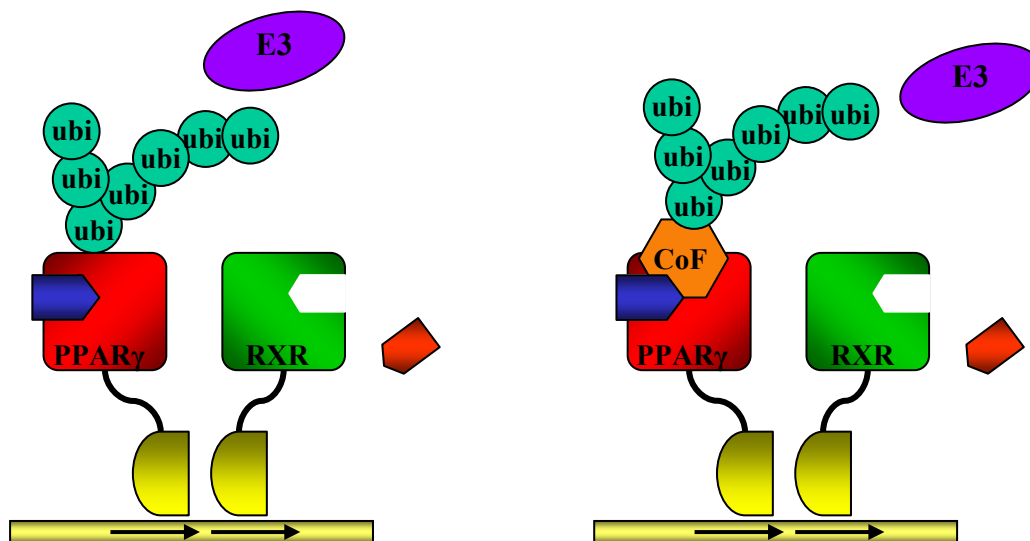


Abb.5.1: Modelle für den ligandabhängigen Abbau von PPAR γ : Erkennt die Ubiquitin-Maschinerie PPAR γ allein aufgrund von Konformationsänderungen in der AF-2-Region nach Ligandbindung (*links*) oder nur im Komplex zusammen mit einem Kofaktoren (CoF) (*rechts*) ?

5.4 Die Aktivität des Proteasoms ist notwendig für die Transaktivierung von PPAR γ_2

Da für PPAR γ_2 Transkription und Degradation notwendig miteinander gekoppelt scheinen, stellte sich die Frage, ob und in welcher Weise das Proteasom an der Regulation der transkriptionellen Aktivität von PPAR γ_2 beteiligt ist. Einige NHRs benötigen ein aktives Proteasom für die Transaktivierung, andere zeigen eine erhöhte transkriptionelle Aktivität, wenn die Aktivität des Proteasoms gehemmt wird (Blanquart *et al.*, 2002; Deroo & Archer, 2002; Kang *et al.*, 2002; Lonard *et al.*, 2000; Wallace & Cidlowski, 2001). Um das Verhalten von PPAR γ_2 in Abhängigkeit vom Proteasom zu untersuchen, wurde sich erneut sowohl eines transienten Luziferase-Reporter-Systems als auch der RT-PCR zur Analyse der endogenen Genexpression bedient.

Der Luziferase-Reporter-Versuch wurde mit PPAR γ_2 -S112A durchgeführt und zeigte, dass die beiden verwendeten Proteasom-Inhibitoren ALLN und MG-132 zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität von PPAR γ_2 führen. Allerdings fiel auch hier beim Betrachten der relativen Induktionen auf, dass sich die relative Luziferaseaktivität nicht dementsprechend verändert hatte. Ergebnisse dieser Art waren jedoch nicht überraschend, da Proteasom-Inhibitoren sowohl die Luziferase- als auch die β -Galaktosidase-Proteine stabilisieren und zugleich deren Aktivität hemmen (Deroo & Archer, 2002).

Daher wurde dann mit einer RT-PCR die Expression der endogenen PPAR γ_2 -Zielgene in PPAR γ_2 -S112A stabil exprimierenden NIH3T3-Zellen nach der entsprechenden Behandlungen mit bzw. ohne Proteasom-Inhibitoren und Ligand analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung von aP2 und LPL in der Tat durch Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren deutlich reduziert wird.

Wird bei dem oben genannten Ansatz noch ein DR1-Luziferaseexpressionsplasmid kotransfiziert, so zeigt sich, dass die Menge an Luziferase-Transkript mit steigenden Proteasom-Inhibitor-Konzentrationen zunimmt (Frau Dr. S. Hauser, unpublizierte Daten). Dies ist auf eine Stabilisierung des Luziferase-Proteins durch die Proteasom-

Inhibitoren zurückzuführen. Zugleich kann aber immer auch noch eine Mengenzunahme des Luziferase-Transkriptes nach Behandlung mit PPAR γ -Ligand festgestellt werden (Frau Dr. S. Hauser, unpublizierte Daten). Diese entsteht durch die ligandinduzierte transkriptionelle Aktivität von PPAR γ_2 . Somit wird deutlich, dass Proteasom-Inhibitoren zwar die Transkription endogener PPAR γ_2 -Zielgene hemmen, nicht aber die von transient transfizierten Reporterplasmiden.

So kommt es auch, dass im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit Floyd & Stephens erklärten, dass der Proteasom-Inhibitor MG-132 die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ deutlich steigere (Floyd & Stephens, 2004). Allerdings führte die genannte Gruppe lediglich Luziferase-Reporter-Versuche durch und ermittelte dabei auch nur die Werte der relativen Induktion von mit Darglitazon stimuliertem Wildtyp-PPAR γ .

Auch Tsao et. al. publizierten 2005, dass Proteasom-Inhibitoren die Transaktivierung von PPAR γ erhöhen (Tsao et. al., 2005). Eine Erklärung dafür sollte in der Akkumulation von RXR unter MG-132-Behandlung von HEK293-Zellen zu suchen sein. Gleichzeitig konnte in dem von ihnen verwendeten Zellsystem jedoch keine parallele Akkumulation von PPAR γ detektiert werden. Dies steht im Widerspruch zu älteren Daten aus anderen Zellkulturen (Hauser et al., 2000; Floyd & Stephens, 2002) und lässt somit die Frage offen, ob die Regulation von PPAR γ_2 durch Proteasom-Inhibitoren zelltypabhängig sein kann. Zusätzlich basierten aber auch die Beobachtungen von Tsao et. al. zur transkriptionellen Aktivität von PPAR γ_2 allein auf Experimenten in Luziferase-Reporter-Systemen.

Blanquart et. al. (Blanquart *et al.*, 2002) beschrieben, dass der Proteasom-Inhibitor MG-132 die transkriptionelle Aktivität von PPAR α , verstärkt. Doch auch diese Gruppe hat zum Beweis dieser Aussage lediglich Luziferase-Reporter-Versuche durchgeführt, so dass auch diese Ergebnisse vor dem Hintergrund dieser Arbeit nicht mehr eindeutig sind.

Im Bezug auf die Ergebnisse zu PPAR α scheint es allerdings auch problematisch, Ergebnisse, die zu einer PPAR-Untergruppe gewonnen wurden, auf die gesamte Protein-Familie zu verallgemeinern. Obwohl derselben Unterfamilie der NHRs angehörend, scheinen sich PPAR γ und PPAR α nämlich trotzdem bezüglich ihrer

Regulation über das Ubiquitin-Proteasom-System gegensätzlich zu verhalten. An PPAR α gebundenes Ubiquitin wird bei Ligandeinwirkung abgespalten und der gesamte Rezeptor wird folglich stabilisiert, bei PPAR γ hingegen leitet Ligandbehandlung eine verstärkte Ubiquitinierung mit folgender Degradation ein (Blanquart *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2000).

5.5 Der Mechanismus der Regulation von PPAR γ_2 über das Ubiquitin-Proteasom-System

Da also eine offensichtliche Verbindung zwischen transkriptioneller Aktivität von PPAR γ_2 und dem Ubiquitin-Proteasom-System besteht, stellt sich die Frage, auf welche Weise das Proteasom oder Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Weges in die Regulation der Transaktivierung von PPAR γ_2 eingreifen.

Für den ER und den AR sind die Zusammenhänge schon etwas weiter entschlüsselt worden. ER bindet sowohl mit als auch ohne Ligand zyklisch an Östrogen-abhängige Promotoren. Proteasom-Inhibitoren verhindern dieses Zirkulieren des ER und die ER-Proteine assoziieren sich in der Zellkernmatrix. Weiterhin ist ubiquitiniertes ER nicht mehr in der Lage, die RNA-Polymerase II zu binden und damit transkriptionell wirksam zu sein (Reid *et al.*, 2003).

Auch der AR weist ein durch Proteasom-Inhibitoren unterbindbares zirkulierendes Bindungsverhalten am PSA-Promotor auf. Überdies kann die 19S Proteasom-Untereinheit den PSA-Promotor blockieren (Kang *et al.*, 2002) und MG-132, ein Proteasom-Inhibitor der 26S Proteasom-Untereinheit, unterdrückt die Transaktivierung von AR, indem er die nukleare Translokation von AR und dessen Interaktion mit Kofaktoren hemmt (Lin *et al.*, 2002).

Inwieweit Untereinheiten des Proteasoms PPAR γ_2 durch Bindung an PPAR γ_2 selbst oder an den PPAR γ_2 -Promotor regulieren, ist noch nicht bekannt. Auch das für ER oder AR beschriebene zyklische DNA-Bindungsverhalten ist für PPAR γ_2 noch nicht

untersucht worden und könnte weiter zum Verständnis der bei der Transaktivierung von PPAR γ_2 ablaufenden Vorgänge beitragen.

Wie in den transienten Luziferase-Reporter-Versuchen gesehen, kann PPAR γ_2 anders als z. B. ER, AR oder PR bei einer Hemmung des Proteasoms zumindest noch transkriptionell aktiv sein. Die Vorgänge auf Chromatinebene müssen jedoch etwas differenzierter betrachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Regulation der Transkription PPAR γ_2 -abhängiger Gene durch das Proteasom eben diesen Zielgenen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Die Expression der Mehrzahl der PPAR γ_2 -Zielgene wird durch Proteasom-Inhibitoren inhibiert, doch existieren einige PPAR γ_2 -abhängige Gene, deren Expression dadurch nicht beeinflusst wird (Frau Dr. S. Hauser, unpublizierte Daten). Somit ist es möglich, dass das Proteasom oder Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Weges in der Lage sind, einzelne PPAR γ_2 -abhängige Gene selektiv zu regulieren. Dies lässt auf eine kontext-abhängige Regulation schließen und anders als bei den übrigen NHRs scheinen also die Promotoren der PPAR γ_2 -abhängigen Gene bei der proteasomabhängigen Transkriptionsregulation eine entscheidende Bedeutung zu haben.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass weder die Acetylierung der Histone H3 und H4 noch die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den PPAR γ_2 -abhängigen Promotor durch Proteasom-Inhibitoren gestört werden (Frau Dr. S. Hauser, unpublizierte Daten). Somit ist der Einfluss von Korepressoren bei der proteasomabhängigen Transkriptionsregulation unwahrscheinlich, da diese normalerweise die Bindung von Histon-Acetylasen hemmen. Auch wenn die initiale Rekrutierung der RNA-Polymerase II problemlos verläuft, könnte es sein, dass folgende Prozesse im Verlauf der Transkription durch die Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden. So könnten sie z.B. die Assoziation weiterer Koaktivatoren mit der RNA-Polymerase II inhibieren oder sogar verhindern, dass Untereinheiten des Proteasoms gebunden werden können. Um diesen Fragen weiter nachzugehen, könnte man RT-PCR-Versuche durchführen, bei denen die Primer noch näher an den endogenen PPAR γ_2 -abhängigen Genen an die DNA binden und sozusagen an einem späteren Zeitpunkt des Transkriptionsablaufes ansetzen.

Schließlich wäre es interessant, noch weitere PPAR γ_2 -abhängige Gene zu entdecken, deren Transkription durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt oder aber nicht gehemmt wird. Diese Gene hätten folglich unterschiedliche Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung und könnten so dazu beitragen, die Vorgänge bei der kontext-abhängigen selektiven Regulation durch PPAR γ_2 genauer zu verstehen und für therapeutische Interventionen nutzbar zu machen.

6. Literaturverzeichnis

Abdel-Hafiz H, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB (2002)

The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression.

J Biol Chem 277: 33950-33956

Abdelrahman M, Sivarajah A, Thiemermann C (2005)

Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock.

Cardiovasc Res 65: 772-781

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997)

Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.

EMBO J 16: 3797-3804

Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK (1997)

Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site.

J Biol Chem 272: 5128-5132

Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L, Zalin A, Labib M, Kumar S, Simpson H, Blom D, Marais D, Schwabe J, Barroso I, Trembath R, Wareham N, Nagy L, Gurnell M, O'Rahilly S, Chatterjee K (2006)

Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR γ mutations cause lipodystrophic insulin resistance

Cell Metab 4: 303-311

Almond JB, Cohen GM (2002)

The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy.

Leukemia 16: 433-443

Aranda A, Pascual A (2001)

Nuclear hormone receptors and gene expression.

Physiol. Rev. 81: 1269-1295

Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Stuhl K (1987)

Current protocols in molecular biology

Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences, New York

Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD (1994)

A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements.

Mol Cell Biol 14: 1544-1552

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999)

PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development.
Mol Cell 4: 585-595

Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S (1999)

Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension.
Nature 402: 880-883

Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995)

Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot.
Cell 83: 851-857

Beaudenon SL, Huacani MR, Wang G, McDonnell DP, Huibregtse JM (1999)

Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol 19: 6972-6979

Berger SL (2002)

Histone modifications in transcriptional regulation.
Curr Opin Genet Dev 12:142-148

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2002)

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes.
J Biol Chem 277: 37254-37259

Blanquart C, Mansouri R, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2004)

Different ways to regulate the PPARalpha stability.
Biochem Biophys Res Commun 319: 663-670

Boudjelal M, Wang Z, Voorhees JJ, Fisher GJ (2000)

Ubiquitin/proteasome pathway regulates levels of retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha in human keratinocytes.
Cancer Res 60: 2247-2252

Bradford MM (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem 72: 248-254

Brower CS, Sato S, Tomomori-Sato C, Kamura T, Pause A, Stearman R, Klausner RD, Malik S, Lane WS, Sorokina I, Roeder RG, Conaway JW, Conaway RC (2002)

Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase.

Proc Natl Acad Sci U S A 99: 10353-10358

Brown CE, Lechner T, Howe L, Workman JL (2000)

The many HATs of transcription coactivators.

Trends Biochem Sci 25: 15-9

Bustin SA (2000)

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.

J Mol Endocrinol 25: 169-193

Camp HS, Tafuri SR (1997)

Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase.

J Biol Chem 272: 10811-10816

Carlberg C (1995)

Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D3. Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling

Eur J Biochem 231: 517-527

Chauchereau A, Amazit L, Quesne M, Guiochon-Mantel A, Milgrom E (2003)

Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1.

J Biol Chem 278: 12335-12343

Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P (2001)

A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.

Mol Cell 7: 161-171

Chen JD, Evans RM (1995)

A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.

Nature 377: 454-457

Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM (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 S, Cui J, Nakamura K, Ribeiro RC, West BL, Gardner DG (2000)**
Coactivator-vitamin D receptor interactions mediate inhibition of the atrial natriuretic peptide promoter.
J Biol Chem 275: 15039-15048
- Cohen RN (2005)**
Nuclear Receptor Corepressors and PPAR γ
NRS 4: 1-4
- Cuzzocrea S (2004)**
Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury.
Vascul Pharmacol 41: 187-195
- Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, West BL, Hanover JA, Cheng S (2000)**
Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors.
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8985-8990.
- Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR (1998)**
Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions.
Genes Dev 12: 3343-3356
- Davie JR, Murphy LC (1990)**
Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription.
Biochemistry 29: 4752-4757
- Davie JR, Lin R, Allis CD (1991)**
Timing of the appearance of ubiquitinated histones in developing new macronuclei of *Tetrahymena thermophila*.
Biochem Cell Biol 69: 66-71
- Deblois G, Giguere V (2003)**
Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation.
J Steroid Biochem Mol Biol 85: 123-131
- Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM, Singer S (1999)**
Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma.
Proc Natl Acad Sci U S A 96: 3951-3956.
- Deroo BJ, Rentsch C, Sampath S, Young J, DeFranco DB, Archer TK (2002)**
Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking.
Mol Cell Biol 22: 4113-4123

Deroo BJ, Archer TK (2002)

Proteasome inhibitors reduce luciferase and beta-galactosidase activity in tissue culture cells.

J Biol Chem 277: 20120-20123

Desvergne B, Wahli W (1999)

Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.

Endocr Rev 20: 649-688

Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2004)

Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road.

Mol Endocrinol 18: 1321-1332

Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi YI, Shoelson SE (2002)

Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand.

J Biol Chem 277: 37973-37976

Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M (1999)

Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor α interacting protein.

J Biol Chem 274: 15901-15907

Elbrecht A, Chen Y, Adams A, Berger J, Griffin P, Klatt T, Zhang B, Menke J, Zhou G, Smith RG, Moller DE (1999)

L-764406 is a partial agonist of human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. The role of Cys313 in ligand binding.

J Biol Chem 274: 7913-7922

Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, Finley D (2002)

Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains.

Nat Cell Biol 4: 725-730

Elsasser S, Chandler-Militello D, Muller B, Hanna J, Finley D (2004)

Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome.

J Biol Chem 279: 26817-26822

Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA (2001)

The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II.

Mol Cell 7: 981-991

Fields S, Song O (1989)

A novel genetic system to detect protein-protein interactions.

Nature 340: 245-246

Floyd ZE, Stephens JM (2002)

Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPAR γ in adipocytes.

J Biol Chem 277: 4062-4068

Floyd ZE, Stephens JM (2004)

Control of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 stability and activity by SUMOylation.

Obes Res 12: 921-928

Fondell JD, Ge H, Roeder RG (1996)

Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex.

Proc Natl Acad Sci U S A 93: 8329-8333

Ford J, McEwan IJ, Wright AP, Gustafsson JA (1997)

Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor in vitro.

Mol Endocrinol 11: 1467-1475

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995)

15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ .

Cell 83: 803-812

Forman BM (2002)

The antidiabetic agent LG100754 sensitizes cells to low concentrations of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands.

J Biol Chem 277: 12503-12506

Freiman RN, Tjian R (2003)

Regulating the regulators: lysine modifications make their mark.

Cell 112: 11-17

Ge K, Guermah M, Yuan CX (2002)

Transcriptional coactivator TRAP220 is required for PPAR γ 2-stimulated adipogenesis.

Nature 417: 563-567

Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK (2007)

Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPAR γ

Mol Cell 25: 57-70

Gianni M, Bauer A, Garattini E, Chambon P, Rochette-Egly C (2002)
Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation.
EMBO J 21: 3760-3769

Girnun GD, Smith WM, Drori S, Sarraf P, Mueller E, Eng C, Nambiar P, Rosenberg DW, Bronson RT, Edelmann W, Kucherlapati R, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002)
APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma.
Proc Natl Acad Sci U S A 99: 13771-13776

Glass CK (1994)
Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers.
Endocr Rev 15: 391-407

Glass CK (2006)
Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease.
J Clin Invest 16: 556-560

Glass CK, Rosenfeld MG (2000)
The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.
Genes Dev 14: 121-141

Glickman MH, Ciechanover A (2002)
The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.
Physiol Rev 82: 373-428

Goldknopf IL, Taylor CW, Baum RM, Yeoman LC, Olson MO, Prestayko AW, Busch H (1975)
Isolation and characterization of protein A24, a "histone-like" non-histone chromosomal protein.
J Biol Chem 250: 7182-7187

Goldknopf IL, Busch H (1977)
Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24.
Proc Natl Acad Sci U S A 74: 864-868

Gonzalez F, Delahodde A, Kodadek T, Johnston SA (2002)
Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter.
Science 296: 548-550

Grommes C, Landreth GE, Heneka MT (2004)
Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists.
Lancet Oncol. 5: 419-429

Gurnell M (2003)

PPARgamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants
Clin Endocrinol (Oxf) 59: 267-277

Hanahan D (1983)

Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.
J Mol Biol 166: 557-580

Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM (2000)

Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation.
J Biol Chem 275: 18527-18533.

He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM (2003)

Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle.
Proc Natl Acad Sci U S A 100: 15712-15717

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997)

A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors.
Nature 387: 733-736

Henever AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, Wilkes J, Evans RM, Olefsky J (2003)

Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance.
Nat Med 9: 1491-1497

Henriksson A, Almlöf T, Ford J, McEwan IJ, Gustafsson JA, Wright AP (1997)

Role of the Ada adaptor complex in gene activation by the glucocorticoid receptor.
Mol Cell Biol 17: 3065-3073

Hershko A, Ciechanover A (1998)

The ubiquitin system.
Annu Rev Biochem 67: 425-479

Hilgarth RS, Murphy LA, Skaggs HS, Wilkerson DC, Xing H, Sarge KD (2004)

Regulation and function of SUMO modification.
J Biol Chem 279: 53899-53902

Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugasawa K, Maekawa T, Tanaka K, Høeijmakers JH, Hanaoka F (1999)

Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome.
J Biol Chem 274: 28019-28025

Hochstrasser M (1996)

Ubiquitin-dependent protein degradation.
Annu Rev Genet 30: 405-439

Hörlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamel Y, Söderström M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995)

Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.
Nature 377: 397-404

Hofmann K, Bucher P (1996)

The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway.
Trends Biochem Sci 21: 172-173

Hoppe T, Matuschewski K, Rape M, Schlenker S, Ulrich HD, Jentsch S (2000)

Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing.
Cell 102: 577-586

Hsu MH, Savas U, Griffin KJ, Johnson EF (2001)

Identification of peroxisome proliferator-responsive human genes by elevated expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in HepG2 cells.
J Biol Chem 276: 27950-27958

Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM (1996)

Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma.
Science 274: 2100-2103

Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK (1999)

Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase.
Nature 400: 378-382

Hunt LT, Dayhoff MO (1977)

Amino-terminal sequence identity of ubiquitin and the nonhistone component of nuclear protein A24.
Biochem Biophys Res Commun 74: 650-655

Imhof MO, McDonnell DP (1996)

Yeast RSP5 and its human homolog hRPF1 potentiate hormone-dependent activation of transcription by human progesterone and glucocorticoid receptors.
Mol Cell Biol 16: 2594-2605

Jenuwein T, Allis CD (2001)

Translating the histone code.
Science 293: 1074-1080

Johnson PF, McKnight SL (1989)

Eukaryotic transcriptional regulatory proteins.
Annu Rev Biochem 58: 799-839

Kallen JA, Schlaeppli JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, Fournier B (2002)

X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha.
Structure (Camb) 10: 1697-1707

Kang Z, Pirskanen A, Janne OA, Palvimo JJ (2002)

Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex.
J Biol Chem 277: 48366-48371

Kim KI, Baek SH, Chung CH (2002)

Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function.
J Cell Physiol 191: 257-268

Kim MY, Hsiao SJ, Kraus WL (2001)

A role for coactivators and histone acetylation in estrogen receptor alpha-mediated transcription initiation.
EMBO J 20: 6084-6094

Kingston RE, Narlikar GJ (1999)

ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity.
Genes Dev 13: 2339-2352

Kintscher U, Law RE (2005)

PPAR γ -mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle.
Am J Physiol Endocrinol Metab 288: 287-291

Kisselev AF, Goldberg AL (2001)

Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates.
Chem Biol 8: 739-758

Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995)

A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation.
Cell 83: 813-819

Kliwer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM (2001)

Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology.
Recent Prog Horm Res 56: 239-263

Knoblauch R, Garabedian MJ (1999)

Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction.
Mol. Cell Biol. 19: 3748-3759

Kodera Y, Takeyama K, Murayama A, Suzawa M, Masuhiro Y, Kato S (2000)

Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators.
J Biol Chem 275: 33201-33204

Kopf E, Plassat JL, Vivat V, de The H, Chambon P, Rochette-Egly C (2000)

Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway.
J Biol Chem 275: 33280-33288

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. (1999)

PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.
Mol Cell 4: 597-609

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH (1994)

Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB.
Nature 370: 223-226

Laemmli UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685

Lange CA, Shen T, Horwitz KB (2000)

Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome.
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 1032-1037

Laudet V (1997)

Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor.
J Mol Endocrinol 19: 207-226

Le Drean Y, Mincheneau N, Le Goff P, Michel D (2002)

Potential of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation.
Endocrinology 143: 3482-3489

Lee CH, Olson P, Evans RM (2003)

Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors

Endocrinology 144: 2201-2207

Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ (1995)

Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators.

Mol Cell Biol 15: 3012-3022

Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchard JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J (1998)

Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice.

Nat Med 4: 1053-1057

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995)

An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma).

J Biol Chem 270: 12953-12956

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA (1997)

Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs.

J Biol Chem 272: 3406-3410

Lehrke M, Lazar MA (2005)

The many faces of PPAR γ .

Cell 123: 993-999

Leng X, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ (1993)

Ligand-dependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoic X receptor.

J Steroid Biochem Mol Biol 46: 643-661

Li L, Li Z, Howley PM, Sacks DB (2006)

E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability.

J Biol Chem 281: 1978-1985

Li M, Pascual G, Glass CK (2000)

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene.

Mol Cell Biol 20: 4699-4707

- Lin HK, Altuwajri S, Lin WJ, Kan PY, Collins LL, Chang C (2002)**
Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells.
J Biol Chem 277: 36570-36576
- Lingbeck JM, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL (2003)**
Determinants of nuclear and cytoplasmic ubiquitin-mediated degradation of MyoD.
J Biol Chem 278: 1817-1823
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Damell J (1999)**
Molecular Cell Biology, 4th edition
W.H. Freeman & Company, New York
- Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW (2000)**
The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation.
Mol Cell 5: 939-948
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995)**
The nuclear receptor superfamily: the second decade.
Cell 83: 835-839
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995)**
The RXR heterodimers and orphan receptors.
Cell 83 (6): 841-850
- Maniatis T, Goodbourn S, Fischer JA (1987)**
Regulation of inducible and tissue-specific gene expression.
Science 236: 1237-1245
- Martin PJ, Lardeux V, Lefebvre P (2005)**
The proliferating cell nuclear antigen regulates retinoic acid receptor transcriptional activity through direct protein-protein interaction.
Nucleic Acids Res 33: 4311-4321
- Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, Jr., Reitman ML, Gonzalez FJ (2003)**
Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes.
J Clin Invest 111: 737-747
- McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1999)**
Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions.
J Steroid Biochem Mol Biol 69: 3-12

McKenna NJ, O'Malley BW (2000)

From ligand to response: generating diversity in nuclear receptor coregulator function.
J Steroid Biochem Mol Biol 74: 351-356

McKenna NJ, O'Malley BW (2002)

Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators.
Cell 108: 465-474

Melchior F (2000)

SUMO--nonclassical ubiquitin.
Annu Rev Cell Dev Biol 16: 591-626

Meng G, Zhao Y, Nag A, Zeng M, Dimri G, Gao Q, Wazer DE, Kumar R, Band H, Band V (2004)

Human ADA3 binds to ER and functions as a coactivator for ER-mediated transactivation.
J Biol Chem 279: 54230-54240

Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2004)

Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories.
Nature Reviews 4: 61-70

Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM (2000)

Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency.
J Clin Invest 105: 287-292

Misra P, Chakrabarti R, Vikramadithyan RK (2003)

PAT5A: a partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor is a potent antidiabetic thiazolidinedione yet weakly adipogenic.
J Pharmacol and Exper Therap 306: 763-771

Mitchell PJ, Tjian R (1989)

Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.
Science 245: 371-378

Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H (1998)

Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes.
J Clin Endocrinol Metab 83: 1818-1820

Mitsui A, Sharp PA (1999)

Ubiquitination of RNA polymerase II large subunit signaled by phosphorylation of carboxyl-terminal domain.
Proc Natl Acad Sci U S A 96: 6054-6059

Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Matsuda M, Cusi K, Mahankali A, Mahankali S, Mandarino LJ, DeFronzo RA (2001)

Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients.

Diabetologia 44: 2210-2219

Molinari E, Gilman M, Natesan S (1999)

Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo.

EMBO J 18: 6439-6447

Molnar F, Matilainen M, Carlberg C (2005)

Structural determinants of the agonist-independent association of human peroxisome proliferator-activated receptors with coactivators.

J Biol Chem 280: 26543-26556

Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA (2000)

Orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor and pregnane X receptor xenobiotic and steroid ligands.

J Biol Chem 275: 15122-15127

Morrison RF, Farmer SR (2000)

Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation.

J Nutr 130: 3116-3121

Moras D, Gronemeyer H (1998)

The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function.

Curr Opin Cell Biol 10: 384-391

Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW (2000)

Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer.

Proc Natl Acad Sci U S A 97: 10990-10995

Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S (2001)

SUMO, ubiquitin's mysterious cousin.

Nat Rev Mol Cell Biol 2: 202-210

Murphy GJ, Holder JC (2000)

PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer.

Trends Pharmacol Sci 21: 469-474

Muratani M, Tansey WP (2003)

How the ubiquitin-proteasome system controls transcription.

Nat Rev Mol Cell Biol 4: 192-201

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM (1998)

Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.

Cell 93: 229-240

Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1999)

The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily.

Mol Cell Biol 19: 1182-1189

Nawaz Z, O'Malley BW (2004)

Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription?

Mol Endocrinol 18: 493-499

Nayeri S, Carlberg C (1997)

Functional conformations of the nuclear 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor.

Biochem J 327: 561-568

Nickel BE, Allis CD, Davie JR (1989)

Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin.

Biochemistry 28: 958-963

Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J (1994)

Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone.

N Engl J Med 331: 1188-1193

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV (1998)

Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.

Nature 395: 137-143

Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, Kahn CR (2003)

Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones.

J Clin Invest 112: 608-618

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996)

The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases.

Cell 87: 953-959

Ogryzko VV (2000)

Mammalian histone acetyltransferase complexes.

Medicina (B Aires) 60 Suppl 2: 21-26

Ohshima T, Koga H, Shimotohno K (2004)

Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification.

J Biol Chem 279: 29551-29557

Olefsky JM (2001)

Nuclear receptor minireview series.

J Biol Chem 276: 36863-36864

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995)

Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.

Science 270: 1354-1357

Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsushashi N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H, Nakagama H (2003)

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice.

Gastroenterology 124: 361-367

Osburn DL, Shao G, Seidel HM, Schulman IG (2001)

Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions.

Mol Cell Biol 21: 4909-4918

Ostendorff HP, Peirano RI, Peters MA, Schluter A, Bossenz M, Scheffner M, Bach I (2002)

Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors.

Nature 416: 99-103

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T (1994)

The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B.

Cell 78: 773-785

Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK (2005)

A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ

Nature 437: 759-763

Pickart CM (2001)

Ubiquitin enters the new millennium.

Mol Cell 8: 499-504.

Pickart CM (2001)

Mechanisms underlying ubiquitination.

Annu Rev Biochem 70: 503-533

Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ (2000)

Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1).

Proc Natl Acad Sci U S A 97: 14145-14150

Qi C, Surapureddi S, Zhu Y-J (2003)

Transcriptional coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)-interacting protein, is required for PPAR γ -mediated adipogenesis.

J Biol Chem 278: 25281-25284

Rachez C, Freedman LP (2001)

Mediator complexes and transcription.

Curr Opin Cell Biol 13: 274-280

Rao H, Sastry A (2002)

Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23.

J Biol Chem 277: 11691-11695

Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F (2003)

Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling.

Mol Cell 11: 695-707

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK (1999)

The peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function.

J Leukoc Biol 66: 733-739

Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR (1998)

Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation.

N Engl J Med 339: 953-959

Rocchi S, Auwerx J (1999)

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ : a versatile metabolic regulator.

Ann Med 31: 342-351

Rochette-Egly C (2005)

Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription.

J Biol Chem 280: 32565-32569

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994)

Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules.

Cell 78: 761-771

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999)

PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.
Mol Cell 4: 611-617

Rosen ED, Spiegelman BM (2000)

Molecular regulation of adipogenesis.
Annu Rev Cell Dev Biol 16: 145-171

Rosen ED, Spiegelman BM (2001)

PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth.
J Biol Chem 276: 37731-37734

Rowan AJ, Bodmer WF (1997)

Introduction of a myc reporter tag to improve the quality of mutation detection using the protein truncation test.
Hum Mutat 9: 172-176

Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA (1999)

The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair.
Mol Cell 3: 687-695

Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM (1998)

Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation.
Nat Med 4: 1058-1061

Saji S, Okumura N, Eguchi H, Nakashima S, Suzuki A, Toi M, Nozawa Y, Saji S, Hayashi S (2001)

MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun 281: 259-265

Salghetti SE, Muratani M, Wijnen H, Futcher B, Tansey WP (2000)

Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis.
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 3118-3123

Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP (2001)

Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin.
Science 293: 1651-1653

Salvat C, Aquaviva C, Jariel-Encontre I, Ferrara P, Pariat M, Steff AM, Carillo S, Piechaczyk M (1999)

Are there multiple proteolytic pathways contributing to c-Fos, c-Jun, and p53 protein degradation in vivo?
Mol Biol Rep 26: 45-51

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis Z (1989)

Molecular Cloning: A laboratory manual
Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Spiegelman BM, Eng C (1999)

Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer.
Mol Cell 3: 799-804

Schauber C, Chen L, Tongaonkar P, Vega I, Lambertson D, Potts W, Madura K (1998)

Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway.
Nature 391: 715-718

Schoonjans K (1995)

Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter.
J Biol Chem 270: 19269-19276

Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE, Freeman BA (2005)

Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand.
Proc Natl Acad Sci U S A 102: 2340-2469

Schulman IG, Chakravarti D, Juguilon H, Romo A, Evans RM (1995)

Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation.
Proc Natl Acad Sci U S A 92: 8288-8292

Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA (1998)

Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma.
Nature 396: 377-380

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL (1998)

The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen.
Cell 95: 927-937

Shimizu M, Yamashita D, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T (2006)

Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation.
Mol Cell Biochem 286: 33-42

Slagsvold T, Kraus I, Bentzen T, Palvimo J, Saatcioglu F (2000)

Mutational analysis of the androgen receptor AF-2 (activation function 2) core domain reveals functional and mechanistic differences of conserved residues compared with other nuclear receptors.

Mol Endocrinol 14: 1603-1617

Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D (2000)

Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain.

Cell 102: 67-76

Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1997)

Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase.

Nature 389: 194-198

Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD (1999)

A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response.

J Clin Invest 104: 383-389

Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M (1999)

The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene.

J Biol Chem 274: 6043-6046

Suh N, Wang Y, Williams CR, Risingsong R, Gilmer T, Willson TM, Sporn MB (1999)

A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis.

Cancer Res 59: 5671-5673

Sun L, Johnston SA, Kodadek T (2002)

Physical association of the APIS complex and general transcription factors.

Biochem Biophys Res Commun 296: 991-999

Tanaka K (1995)

Molecular biology of proteasomes.

Mol Biol Rep 21: 21-26

Tansey WP (2001)

Transcriptional activation: risky business.

Genes Dev 15: 1045-1050

Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, Hirota R, Kawabe Y, Murayama A, Kato S, Kimura K, Yanagisawa J (2006)

Turning Off Estrogen Receptor β -Mediated Transcription Requires Estrogen-Dependent Receptor Proteolysis

Mol Cell Biol 26: 7966-7976

Tian S, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA (2002)

Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor.

Biochem J 367: 907-911

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994)

Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor.

Cell 79: 1147-1156

Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM (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 U S A 94: 237-241

Tsao WC, Wu HM, Chi KH, Chang YH, Lin WW (2005)

Proteasome inhibitors induce peroxisome proliferator-activated receptor transactivation through RXR accumulation and a protein kinase C-dependent pathway.

Exp Cell Res 304: 234-243

Valley CC, Metivier R, Solodin NM, Fowler AM, Mashek MT, Hill L, Alarid ET (2005)

Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor alpha N terminus.

Mol Cell Biol 25: 5417-5428

Vavra KJ, Allis CD, Gorovsky MA (1982)

Regulation of histone acetylation in Tetrahymena macro- and micronuclei.

J Biol Chem 257: 2591-2598

vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, Le Douarin B, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R (1996)

Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1.

EMBO J 15: 110-124

Wahli W (2002)

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing.

Swiss Med. WKLY Review 132: 83-91

Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM (2001)

Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and STATs in adipocytes.

J Biol Chem 276: 7062-7068

Walczak R, Tontonoz P (2002)

PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism.

J Lipid Res 43: 177-186

Wallace AD, Cidlowski JA (2001)

Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids.

J Biol Chem 276: 42714-42721

Wärnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA (2003)

Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation.

Mol Endocrinol 17: 1901-1909

Weis JH, Tan SS, Martin BK, Wittwer CT (1992)

Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR.

Trends Genet 8: 263-264

Wilkinson CR, Seeger M, Hartmann-Petersen R, Stone M, Wallace M, Semple C, Gordon C (2001)

Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains.

Nat Cell Biol 3: 939-943

Woudstra EC, Gilbert C, Fellows J, Jansen L, Brouwer J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2002)

A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage.

Nature 415: 929-933

Wu Z, Puigserver P, Spiegelman BM (1999)

Transcriptional activation of adipogenesis.

Curr Opin Cell Biol 11: 689-694

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV (1999)

Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors.

Mol Cell 3: 397-403

Xu J, Li Q (2003)

Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family.

Mol Endocrinol 17: 1681-1692

Yang XJ, Ogryzko W, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y (1996)

A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A.

Nature 382: 319-324

Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, Osumi T (2004)

The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain.

Genes Cells 9: 1017-1029

Zamir I, Dawson J, Lavinsky RM, Glass CK, Rosenfeld MG, Lazar MA (1997)

Cloning and characterization of a novel component of the nuclear hormone receptor repression complex.

Proc Natl Acad Sci U S A 94: 14400-14405

Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE (1996)

Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

J Biol Chem 271: 31771-31774

Zhang H, Sun L, Liang J, Yu W, Zhang Y, Wang Y, Chen Y, Li R, Sun X, Shang Y (2006)

The catalytic subunit of the proteasome is engaged in the entire process of estrogen receptor-regulated transcription.

EMBO J 25: 4223-4233

Zhang XK, Lehmann J, Hoffmann B, Dawson MI, 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

Zhou YC, Waxman DJ (1999)

Cross-talk between janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) signaling pathways. Growth hormone inhibition of pparalpha transcriptional activity mediated by stat5b.

J Biol Chem 274: 2672-2681

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK (1997)

Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.

J Biol Chem 272: 25500-25506

Zhu J, Gianni M, Kopf E, Honore N, Chelbi-Alix M, Koken M, Quignon F, Rochette-Egly C, de The H (1999)

Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A 96: 14807-14812

7. Zusammenfassung

Nukleäre Hormonrezeptoren (NHRs) spielen eine bedeutende Rolle in einer großen Zahl physiologischer und pathologischer Vorgänge des menschlichen Organismus. Sie wirken als Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität von Liganden reguliert wird.

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ) ist ein Mitglied der Familie der NHRs und hat unter anderem Einfluss auf die Adipogenese, die Regulation der systemischen Insulin-Sensitivität, den Fettstoffwechsel, die Tumorbio­logie und die Inflammation. PPAR γ reguliert Gene, indem er als Heterodimer mit dem Retinoic X Rezeptor (RXR) an Promotorregionen bindet. Die in der Therapie des Diabetes Typ 2 als „Insulin-Sensitizer“ verwendeten Thiazolidinedione (TZDs), wie z.B. Rosiglitazon, sind hochpotente synthetische PPAR γ -Liganden. Die Aktivierung von PPAR γ durch Ligand führt aber auch zu einer Ubiquitinierung des Rezeptors mit nachfolgendem proteasomalen Abbau des Proteins. Aufgrund der verschiedenen Effekte von PPAR γ wäre es von großer biologischer und therapeutischer Bedeutung, wenn es gelänge, die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors selektiv zu beeinflussen. Dazu ist es notwendig, die Prozesse bei der Aktivierung von PPAR γ genauer zu verstehen. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die ligandabhängige transkriptionelle Aktivität und Degradation miteinander gekoppelt sind. Für RXR wurden Punktmutanten beschrieben, deren Transaktivierung und Degradation unabhängig voneinander ablaufen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu diesen RXR-Punktmutanten strukturgleiche, analoge PPAR γ -Punktmutanten zu klonieren und zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass bestimmte PPAR γ -Punktmutanten eine reduzierte Affinität zu PPAR γ -Ligand aufwiesen. Unter optimaler Ligandkonzentration wiesen alle PPAR γ -Punktmutanten eine stark verringerte transkriptionelle Aktivität auf.

In weiteren Versuchen zeigte sich, dass nur transkriptionell aktive PPAR γ -Allele ligandabhängig abgebaut werden. Dagegen wurden die transkriptionell inaktiven PPAR γ -Mutanten nicht abgebaut bzw. sogar stabilisiert.

Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass für PPAR γ transkriptionelle Aktivität und Degradation notwendig miteinander gekoppelt sind.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit untersucht, auf welche Weise das Proteasom an der Regulation der transkriptionellen Aktivität von PPAR γ beteiligt ist.

Eine Reihe von Studien, die die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ mittels exogener Reporterkonstrukte maß, ergab, dass die Hemmung der Proteasomaktivität zu einer Steigerung der Transaktivierung von PPAR γ führt. Demgegenüber konnte hier gezeigt werden, dass die ligandabhängige Expression von endogenen PPAR γ -Zielgenen durch Proteasom-Inhibition gehemmt wird. Dies ist ein Hinweis darauf, dass anders als bisher vermutet die transkriptionelle Aktivierung der hier untersuchten endogenen Zielgene durch PPAR γ die Aktivität des Proteasoms benötigt.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Sofern hier nicht aufgeführt, wurden Abkürzungen entsprechend den Maßangaben der IUPAC (International union of pure and applied chemistry) und denen des SI-Systems (System Internationale de l'Unité) verwendet. Spezielle Abkürzungen für Fachtermini, die nicht in dieser Liste enthalten sind, werden jeweils im Text erläutert.

α	Alpha
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AF-1	Aktivierungs-Funktion-1
AF-2	Aktivierungs-Funktion-2
Ala	Alanin
ALLN	<i>Calpain Inhibitor I</i>
Amp	Ampicillin
aP2	<i>apolipo-binding-protein-2</i>
APIS	<i>19S ATPase proteins independent of 20S</i>
AR	Androgen-Rezeptor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
β -Gal.	B-Galaktosidase
BCS	<i>bovine calf serum</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAR	Konstitutive Androstane Rezeptoren
CBP	CREB-binding protein
cDNA	copy DNA

C/EBP	<i>CAAT/enhancer-binding-protein</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CREB	cAMP response element binding protein
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
ddH ₂ O	<i>double distilled water</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DR	<i>direct repeat</i>
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL TM	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EcR	Ecdysone-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogen-Rezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
G	Guanosin
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase-Aktivität
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
HEPES	N ₂ -Hydroxyethylpiperazin-N ₂ -Ethansulfonsäure
HNF	Hepatozyten Nukleärer Faktor
HRP	Horseradish-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
JNK/SAPK	Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LBD	Ligandbindedomäne
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
Leu	Leucin
LLnL	N-Acetyl-Leu-Leu-Nor-Leuzinal
LPL	Lipoprotein-Lipase
m	milli
M	molar
max	maximal
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MG-132	N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-Leucin al
min	Minute
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
Mut	Mutante
myc	Myelocytomatose Protein
μ	mikro
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
N-CoR	<i>nuclear co-repressor</i>
NEB	New England Biolabs
NHR	Nukleärer Hormonrezeptor
nm	nanometer
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	<i>Peroxisome-Proliferator-activated-Receptor</i>
PPRE	<i>PPAR response element</i>
PR	Progesteron-Rezeptor

PSA	<i>prostata specific-antigen</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAR	<i>Retinoic-Acid-Receptor</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROR	Retinoid Orphan Rezeptoren
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RXR	<i>Retinoic-X-Receptor</i>
S	Serin
SDS	sodiumdodecylphosphate
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TR	Thyroid-Rezeptor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tyr	Tyrosin
TZD	Thiazolidindion
TZDs	Thiazolidindione
u.a.	unter anderem
UBA	ubiquitin-assoziiierende Domäne
UBL	ubiquitin-ähnliche Domäne
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Barth, Bertalanffy, Behr, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhardt-Cabilic, Fruhstorfer, Geuss, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Hofmann, Kann, Kern, Klenk, Klose, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Max, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mueller, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Rothmund, Röhm, Schäfer, Schwarz, Seitz, Seyberth, Steiniger, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Werner, Weihe, Wulf *in Marburg*

Baird, Bremner, Brooker, Coleman, Crowley, Forrester, Green, Herd, Jennings, Kerry, Laing, Potts, Sclare, Walton *in Aberdeen*

Conrad, Landsberg, Muchmore, Daniels, Carrera, Krawetz *in San Diego*

Szabo und Zapol *in Boston*

Freudenberg und Willeke *in Siegen*

8.4 Danksagung

Zum Schluss sei all denen gedankt, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt, gefördert, beraten und begleitet haben. Sie alle haben jeder auf seine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen:

Frau Dr. Stefanie Hauser unter deren wissenschaftlicher Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Ihr gilt mein ganz besonderer Dank für die Themenstellung, die hervorragende Einführung in die molekularbiologischen Techniken und das wissenschaftliche Arbeiten, die Betreuung der Arbeit und die ständige Bereitschaft zu helfen, wenn ich nicht mehr weiter wusste.

Prof. Dr. Martin Eilers für die Begleitung dieser Arbeit, die produktiven und kritischen Ratschläge und sein Interesse am Verlauf des PPAR γ -Projektes.

Prof. Dr. Stefan Gaubatz für das Interesse an meinem Projekt, seine zahlreichen Ratschläge und die Möglichkeit, seine Laboreinrichtungen nutzen zu dürfen.

Stephan Trumm, meinem „PPAR γ -Kollegen“, wie auch allen Mitarbeitern der Gaubatz-Gruppe: Jörg Storre, Yvonne Wruck, Sladjana Gagrca, Martina Seitz und Diana Ullmann für die zahlreichen größeren und kleineren Tips zur Meisterung des Laboralltags sowie für den regen wissenschaftlichen aber auch den ebenso wichtigen weniger wissenschaftlichen Austausch.

Meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und deren fortwährender moralischer Unterstützung ich gewiss sein konnte.