



Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Abteilung für Biochemische Endokrinologie
Direktor Prof. Dr. H.-J. Seitz

**Die hepatische mitochondriale Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase:
Hormonregulierte Genexpression und funktionelle Promotorstudien**

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Sabine Kutz
aus Hamburg

Hamburg 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1999 bis August 2002 am Institut der medizinischen Biochemie und Molekularbiologie in der Abteilung für Biochemische Endokrinologie am Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf unter Leitung von Prof. Dr. H.-J. Seitz und Dr. J. M. Weitzel angefertigt.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Graduiertenkolleg 336 der DFG.

Gutachter Prof. Dr. H. Marquardt
 Prof. Dr. H.-J. Seitz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Regulation der Transkription	1
1.1.1	Steroidrezeptor-Superfamilie	2
1.1.2	Coregulatoren	3
1.2	Wirkungsweise von Schilddrüsenhormonen	5
1.2.1	Physiologische Wirkung von Schilddrüsenhormonen	5
1.2.2	Molekulare Mechanismen von Schilddrüsenhormonen	6
1.3	Mitochondriale Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase	8
1.3.1	Glycerolphosphat-Shuttle	8
1.3.2	Molekularbiologie der mGPDH	10
1.3.3	Hormonelle Regulation der mGPDH	11
1.3.3.1	Schilddrüsenhormone	11
1.3.3.2	Peroxisomenproliferator Clofibrat	12
1.3.4	Klinische Relevanz der mGPDH	12
2	Problemstellung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Chemikalien und Enzyme	16
3.1.2	Antikörper	16
3.1.3	Plasmide und Oligonukleotide	17
3.1.4	Zelllinien	18
3.1.5	Zusammensetzung von Medien, Standardlösungen und Puffern	18
3.1.6	Ansetzen und Verwahren der Stimulatoren	20
3.2	Tiere und Tierhaltung	20

3.3	Methoden	21
3.3.1	Zellkultur	21
3.3.1.1	Präparation und Kultivierung primärer Hepatozyten	21
3.3.1.2	Allgemeine Arbeitsweisen für permanente Zelllinien	21
3.3.1.3	Herstellung von „gestripptem“ Serum	22
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	22
3.3.2.1	Transformation	22
3.3.2.2	Plasmidpräparation	23
3.3.2.3	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	23
3.3.2.4	Automatische DNA-Sequenzierung	24
3.3.2.5	<i>In vitro</i> Mutation	25
3.3.2.6	<i>In vitro</i> Translation	26
3.3.2.7	Radioaktive Markierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden	26
3.3.3	Transiente Transfektion von permanenten und primären Zellen	27
3.3.3.1	Calciumphosphatpräzipitation	27
3.3.3.2	Liposomen-Methode	27
3.3.3.3	Stimulation der permanenten Zellen nach transienter Transfektion	28
3.3.3.4	Detektion der Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität	28
3.3.4	Proteinchemische Methoden	29
3.3.4.1	Proteinpräparation aus permanenten Zellen	29
3.3.4.2	Herstellung der Leberlysate	29
3.3.4.3	Proteinbestimmung	29
3.3.4.4	SDS-PAGE und Western Blotting	30
3.3.4.5	Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine	31
3.3.4.6	„Enhanced Chemiluminiscense“ (ECL)-Detektion der gebundenen Antikörper	31
3.3.5	Präparation der Zellkernextrakte	32
3.3.6	Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen	32
3.3.6.1	Band-Shift- oder Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	32
3.3.6.2	Shift-Western	33
3.4	EDV-Unterstützung und Statistik	34

4	Ergebnisse	35
4.1	Drei multiple mGPDH-Promotoren der Ratte	35
4.2	Aktivität der mGPDH-Promotoren in HepG2-, HEK293- und RatI-Zellen	35
4.3	Aktivitätsanalyse des mGPDH Promotors B	37
4.3.1	Aktivität der Deletionskonstrukte in HepG2- und RatI-Zellen	37
4.3.2	Analyse der SP1-Bindungsstellen	39
4.3.2.1	Aktivität der SP1-Mutanten in HepG2- und HEK293-Zellen	39
4.3.2.2	Band Shift-Analyse des SP1-Komplexes	41
4.4	Hormonelle Regulation der mGPDH-Promotoren	42
4.4.1	Regulation durch Schilddrüsenhormone	42
4.4.2	Regulation durch Clofibrat	45
4.4.3	Regulation durch all-trans Retinsäure	46
4.4.4	Regulation durch Estradiol	48
4.5	Untersuchung des DR+4+2-Elements	49
4.5.1	Aktivitätsanalyse des DR+4+2-Elements	50
4.5.1.1	Aktivitätsanalyse des DR+4+2-Elements durch Schilddrüsenhormone	50
4.5.1.2	Aktivitätsanalyse des DR+4+2-Elements durch Estradiol	51
4.5.2	Bindungsuntersuchungen des DR+4+2-Elements	53
4.5.2.1	Bindungsuntersuchungen des DR+4+2-Elements mit Kernextrakten	53
4.5.2.2	Bindungsuntersuchungen des DR+4+2 Elements mit HepG2 Kernextrakten durch Shift-Western	55
4.5.2.3	Bindungsuntersuchungen des DR+4+2 mit <i>in vitro</i> translatiertem TR α - und RXR γ -Protein	55
4.6	Induzierbarkeit des mGPDH-Proteins durch Schilddrüsenhormone	57
4.6.1	Induzierbarkeit in der Rattenleber <i>in vivo</i>	57
4.6.2	Induzierbarkeit in permanenten primären Zellen	58

5	Diskussion	60
5.1	Gewebsspezifität durch alternative Promotoren	60
5.2	T3-Induktion über ein Schilddrüsenhormon-responsibles Element	62
5.3	Interaktion des TREs mit der SP1-Bindungsstelle	65
5.4	DR+4+2-Element als mögliches HRE für andere nukleäre Rezeptoren	67
5.4.1	Rezeptorabhängige Aktivierung durch Estrogen	67
5.4.2	Das regulatorische DR+4+2-Element als mögliches RARE	68
5.4.3	Einfluss des Peroxisomenproliferators Clofibrat auf mGPDH	69
5.5	Molekularer Mechanismus der T3-abhängigen mGPDH-Regulation	70
5.6	T3-vermittelte mGPDH-Proteininduktion in der Leber	70
5.7	Vergleich der T3-Responsibilität der humanen mGPDH und der mGPDH der Ratte	71
5.8	Ausblick	73
6	Zusammenfassung	74
	Summary	76
7	Abkürzungen	78
8	Literaturverzeichnis	81
9	Anhang	89

Wissenschaftliche Arbeiten

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Es gehört zu den aufregendsten Erkenntnissen der letzten 50 Jahre, dass die benötigten Informationen für Aufbau und Differenzierung eines Organismus sowie der Aufrechterhaltung seiner individuellen Funktionen, in Form von DNA niedergelegt sind. Ihre kontrollierte Expression ermöglicht, auf äußere Einflüsse adäquat zu reagieren und sich dadurch der Umwelt anzupassen. Das aufeinander abgestimmte programmierte Zusammenspiel der Gene benötigt dafür einen komplizierten Regulationsmechanismus.

1.1 Regulation der Transkription

Diese Regulationsmechanismen finden auf mehreren Ebenen statt. Von der transkriptionellen Kontrolle bei der Initiation und Termination über die Regulation beim Prozessieren der primären Transkripte sowie beim Transport der mRNA aus dem Zellkern, bis zur Translation der mRNA (Darnell, 1985; Blau, 1998). Bei der Kontrolle der Genexpression hat die Transkriptionsinitiation die größte Bedeutung, denn die Effektivität der Initiation ist im Wesentlichen für die Effizienz der Transkription eines Gens verantwortlich. Die korrekte Genexpression wird auf der Transkriptionsebene durch das komplexe Zusammenspiel von hauptsächlich zwei Komponenten gewährleistet: einerseits durch die Steuerelemente (cis-aktive Elemente) die sich oberhalb des Transkriptionsstartpunktes befinden und andererseits durch Transkriptionsfaktoren (trans-aktive Elemente). Diese werden über Steuerelemente an das transkribierte Gen rekrutiert und können dadurch die Transkriptionseffizienz beeinflussen. Die Gesamtheit der Steuerelemente wird als Promotor bezeichnet, die sich in drei Gruppen (basale, proximale und distale) einteilen lassen. Basale Promotorelemente befinden sich um den Transkriptionsstart wie z. B. TATA-Box oder Initiator-Element und dienen seiner Lokalisation, da sie die korrekte Positionierung des RNA-Polymerase II-Komplexes gewährleisten. Die proximalen Promotorelemente liegen wenige 100bp über der TATA-Box, wobei es sich am häufigsten um GC- und CAT-Boxen handelt. Sie können als multiple Kopien im Gen vorkommen und in beiden Orientierungen aktiv sein. Die GC-Box enthält die Sequenz GGGCGG, welche vom ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1 gebunden wird. Diese Elemente sind maßgeblich für die Effektivität und Spezifität der Transkriptionsinitiation verantwortlich. Wichtig für die spezifische Regulierung sind distale Promotorelemente, dabei handelt es sich um regulatorische Steuerelemente. Sie befinden sich meist in einiger Entfernung von dem Transkriptionsstartpunkt, in einigen Fällen sogar mehrere tausend bp

stromaufwärts oder stromabwärts von der Initiationsstelle. Die distalen Promotorelemente bewirken durch die Anbindung von Transkriptionsfaktoren eine schnelle und leistungsstarke Expression des Gens und werden deshalb auch Responsible-Elemente (RE) genannt. Durch Anordnung der Steuerregion kann die Transkription von einem einzigen Promotor durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden. Allgemein enthalten Transkriptionsfaktoren mindestens zwei funktionelle Domänen, die eine vermittelt die DNA-Bindung und die andere moduliert die Transkriptionsaktivierung.

1.1.1 Steroidrezeptor-Superfamilie

Bei den Mitgliedern der Steroidrezeptor-Superfamilie, die über 100 verschiedene Proteine umfasst, handelt es sich um ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren. Zu ihrer Gruppe gehören die klassischen Steroidrezeptoren (Androgen-, Glucocorticoid-, Estrogen-, Progesteronrezeptoren) sowie die Schilddrüsenhormonrezeptoren, Retinsäurerezeptoren, Vitamin-D-Rezeptoren, Peroxisomenproliferator-aktivierende Rezeptoren und der Retinoid-X-Rezeptor. Die Rezeptoren haben einen ähnlichen Aufbau und gleiche funktionelle Domänen. Die N-terminale Region ist zwischen den Rezeptoren schwach konserviert, sie hat eine variable Länge und enthält eine selbstständige Aktivierungsdomäne. Die cysteinreiche DNA-Bindungsdomäne dagegen ist stark konserviert und besteht aus zwei Zink-Finger-Motiven (Glass, 1994; Ribeiro et al, 1998). In der multifunktionellen C-terminalen Hälfte liegt die Ligandenbindungsdomäne, eine zweite Aktivierungsdomäne, die Dimerisierungsdomäne und eine Region, die Verantwortlich für die Kernlokalisierung ist. Innerhalb der Zink-Finger-Strukturen, wie sie auch bei anderen Transkriptionsfaktoren bekannt sind (z. B. SP1, Kadonga und Tjian, 1986), befinden sich definierte Bereiche (P- und D-Box), die bei der DNA-Sequenzerkennung eine wichtige Rolle spielen (Umesono und Evans, 1989). Die Kernrezeptoren binden als Monomer, Homodimer oder Heterodimer an spezifische Steuerelemente im Promotor eines Zielgens, sogenannte Hormon-responsible-Elemente (HRE) (Beato, 1991; Evans, 1988). Die HRE bestehen aus mindestens zwei Hexameren mit einer bestimmten Basenfolge (half-site), die durch wenige Nukleotide (Spacer) voneinander getrennt sind. Die Anordnung und Orientierung der half-sites zueinander kann unterschiedlich sein. Sie können als Tandem-Wiederholung mit einer Anzahl von N Spacern (direct repeat, DR+N), als Palindrom (Pal+N) oder als inverses Palindrom (InvPal+N) vorliegen. Die Sequenz wird durch die P-Box und den Abstand der half-sites durch die D-Box der Rezeptoren erkannt (Umesono und Evans, 1989). Die Steroidrezeptoren

werden in zwei Klassen eingeteilt. Zu der 1. Klasse gehören die Steroidrezeptor-Familie (Estrogen-, Glucocorticoid-, Aldosteron-, Testosteron-, Progesteronrezeptor). Sie binden bevorzugt als Homodimere an ihre Hormon-responsiblen-Elemente. Mitglieder der 2. Klasse sind Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR), Retinsäurerezeptoren (RAR), Vitamin-D-Rezeptoren (VDR), Peroxisomen-Proliferator-aktivierende Rezeptoren (PPAR) und der Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Sie binden in erster Linie, bevorzugt mit dem Dimerisierungspartner RXR, als Heterodimere an HRE (Glass et al., 1997). Diese HRE gehorchen einer gewissen Konsensus-Sequenz 5'-AGGTCA-3'. Doch Sequenz, Abstand, Anordnung, Position und Rezeptorbindung weisen eine breite Variabilität auf (Wahli und Martinez, 1991; Umesono et al., 1991), und die Bindungsspezifität der einzelnen Rezeptoren ist dabei besonders von den Nukleotiden (Spacern) zwischen den beiden half-sites abhängig (Glass, 1994). Bei den meisten Heterodimerkomplexen (z.B. mit TR) ist RXR ein stiller Dimerisierungspartner und sein Ligand (9-cis-Retinoid) bewirkt keine Aktivierung der Genexpression. Doch es gibt auch Beispiele, in denen RXR ein aktiver Partner ist. Ein PPAR/RXR-Heterodimer zeigt beispielsweise eine unabhängige Verantwortlichkeit, bei der jeweils die Anwesenheit einer der beiden Liganden eine Aktivität bewirkt (Kliwer et al., 1992). Durch die Heterodimerisierung verschiedener Rezeptoren mit dem gleichen Partner ist eine Vernetzung der regulatorischen Signalwege unterschiedlicher Hormone möglich (Green, 1993).

1.1.2 Coregulatoren

Die transkriptionelle Regulierung der Kernrezeptoren wird durch die Rekrutierung von Coregulatoren vermittelt. In den letzten Jahren wurde über eine Vielzahl von Proteinen berichtet, die mit den Rezeptoren in Interaktion treten und als Coaktivatoren oder Corepressoren wirken (Übersicht: Robry et al., 2000). Der erste identifizierte Coaktivator ist der Steroidrezeptor-Coaktivator-1 (SRC-1) (Onate et al., 1995). Sein Einfluss wurde zuerst bei Steroidrezeptoren beobachtet, doch er erhöht auch die ligandenabhängige transkriptionelle Aktivität durch TR und RXR (Jeyakumar et al., 1997). Eine interessante Rolle spielt der SRC-1 bei der Aktivierung durch Schilddrüsenhormone, denn Mäuse ohne funktionellen SRC-1 zeigen eine T3-Resistenz (Weiss et al., 1999). SRC-1 assoziiert mit weiteren Coaktivatoren wie p300/CBP und PCAF (Voegel et al., 1998; Torchia et al., 1997; Chen et al., 1997) zu einem Coaktivator-Komplex, der die Transkription erhöht. Die Coaktivatoren besitzen eine Histon-Acetyltransferase-Aktivität (Yang et al., 1996; Ogryzko et al., 1996; Spencer et al.,

1997), dabei werden Histone an ihren aminoterminalen Lysinresten acetyliert. Seit langem ist eine positive Korrelation zwischen der Histonacetylierung und der Promotoraktivität bekannt. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, wie Coaktivatoren die Promotoraktivität durch Kernrezeptoren erhöhen, denn durch die Acetylierung der Histone wird die nukleosomale Struktur aufgelockert, was dem transkribierenden Enzymkomplex eine starke Anbindung an den Promotor und damit eine erhöhte Transkription erlaubt.

Analog zu den Coaktivatoren gibt es Corepressoren, die über unterschiedliche Mechanismen die Transkription reprimieren. Besonders interessant ist die Repression durch einige Mitglieder der Steroidrezeptor-Superfamilie (TR, RAR), die in Abwesenheit von Liganden an DNA meist mit dem Dimerisierungspartner RXR, binden und Corepressoren assoziieren. Es konnten bisher drei Corepressoren identifiziert werden: „Silencing Mediator for RARs und TRs“ (SMRT) (Chen und Evans, 1995), „Nuclear Receptor Corepressor“ (N-CoR) (Hörlein et al.; 1995, Kurokawa et al., 1995) und „Small Ubiquitous Nuclear Corepressor“ (SUN-CoR) (Zamir et al., 1997). Veröffentlichungen der letzten Jahre zeigen, die Rekrutierung weiterer Komponenten durch Corepressoren, die Histon-Deacetylase-Aktivität besitzen und dadurch die Transkription beeinflussen (Alland et al., 1997; Heinz et al., 1997; Nagy, 1997). Da aber die Transkriptionsreprimierung auch bei transienten Transfektionen und bei *in vitro* Transkriptionen (Banahmad et al., 1992; Damm et al., 1998; Sap et al., 1989) beobachtet wird, wo die Chromatinmodellierung keine Rolle spielt, müssen noch andere reprimierende Mechanismen existieren. Es konnte gezeigt werden, dass Corepressoren direkt mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren (Wong und Privalsky, 1998). Es wurde auch eine direkte Interaktion zwischen den ungebundenen Schilddrüsenhormonrezeptoren und TFIIB beobachtet (Banahmad et al., 1993).

Die Rekrutierung von Coaktivatoren oder Corepressoren ist abhängig von der Konformation der Kernrezeptoren. Der Schilddrüsenhormonrezeptor zeigt bei Anlagerung des Liganden eine Konformationsänderung, was eine Dissoziation des Corepressorkomplexes und eine Rekrutierung von Coaktivatoren zur Folge hat (wie in Abb. 1 dargestellt) (Übersicht: Mangelsdorf und Evans, 1995).

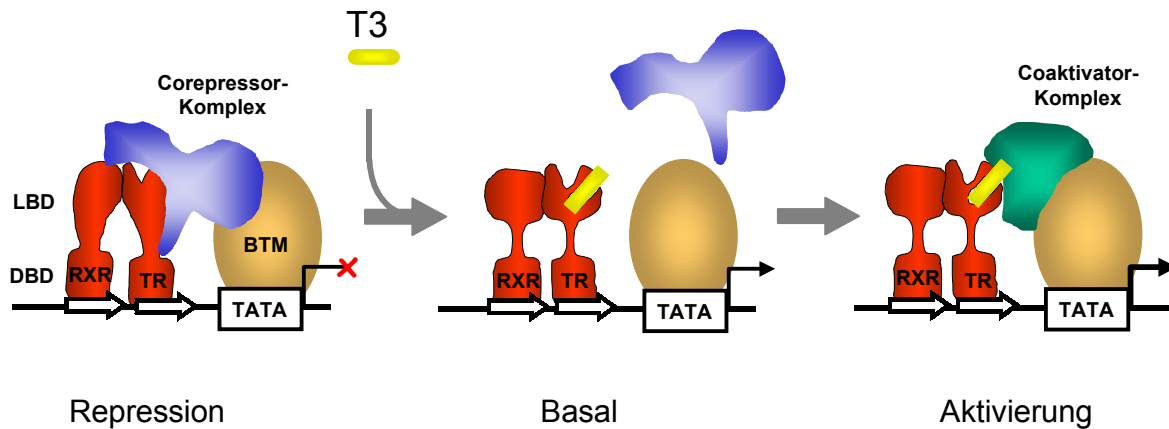


Abb. 1: Repression und Aktivierung der Transkription

Die Kernrezeptoren binden als Heterodimerkomplex an HRE, es lagern sich Corepressoren an und die basale Transkription wird reprimiert. Bei Anlagerung des Liganden (T3) verändert sich die Konformation von TR und der Corepressor-Komplex dissoziiert. Coaktivatoren werden rekrutiert und es kommt zur Aktivierung der basalen Transkription. BTM: basale Transkriptionsmaschinerie; DBD: DNA-Bindungsdomäne; LBD: Ligandenbindungsdomäne (Abbildung modifiziert nach Mangelsdorf und Evans, 1995).

1.2 Wirkungsweise von Schilddrüsenhormonen

In der Schilddrüse werden hauptsächlich die beiden Schilddrüsenhormone 3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin (T4, Thyroxin) und 3,5,3'-Triiod-L-thyronin (T3) durch Iodierung von Tyrosin synthetisiert. Synthese und Ausschüttung werden über einen negativen feedback-Mechanismus auf das hypothalamische-hypophysäre System kontrolliert. Schilddrüsenhormone werden mit Hilfe von Transportproteinen über das Blut vom Ort ihrer Sekretion zu ihrem Zielgewebe befördert. Es wird dabei überwiegend T4 synthetisiert, welches dann im peripheren Gewebe (Niere, Leber) durch 5'-Monodeiodierung in das biologisch wesentlich aktivere T3 umgewandelt wird.

1.2.1 Physiologische Wirkung von Schilddrüsenhormonen

Schilddrüsenhormone haben einen essentiellen Einfluss auf den Energiestoffwechsel, da sie den Sauerstoff und den Grundumsatz in fast allen Geweben steigern. Sie besitzen eine Schlüsselfunktion bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, vor allem bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Schilddrüsenhormone aktivieren die Gluconeogenese, Glycogenolyse und Lipogenese durch Induktion der jeweils beteiligten Schlüsselenzyme. Durch die Beeinflussung zahlreicher Intermediärstoffwechselwege hat die

Erkrankung der Schilddrüse (Hypothyreose, Hyperthyreose) eine komplexe Symptomatik zur Folge. Die Hypothyreose bewirkt im Säuglingsalter Kretinismus, der durch eine Wachstumsstörung, eine zum Schwachsinn führende Störung der Gehirnentwicklung und eine allgemeine Verlangsamung der Stoffwechselprozesse gekennzeichnet ist. Im Erwachsenenalter führt die Hypothyreose zur Verlangsamung des Grundumsatzes und damit zur Stoffwechselerlangsamung, zur Erniedrigung der Körpertemperatur und zur Verminderung der körperlichen und geistigen Leistungsfähigkeit. Demgegenüber ist die Hyperthyreose durch einen erhöhten Grundumsatz charakterisiert, was sich durch Tachycardie, Stoffwechselsteigerung, Abmagerung und Erregungszustände zeigt. Der erhöhte Grundumsatz ist mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch verbunden, der durch eine T₃-vermittelte Veränderung des mitochondrialen Metabolismus verursacht wird. So wurde 1962 (Hoch, 1962) schon die Hyperthyreose "as a disease of mitochondria" angenommen und tatsächlich zeigen isolierte Mitochondrien aus hyperthyreoten Tieren einen zwei- bis dreimal höheren Sauerstoffverbrauch als euthyreote Kontrollen (Shears und Bronk, 1979; Hoch, 1998).

1.2.2 Molekulare Mechanismen von Schilddrüsenhormonen

Es existieren zwei Arten von Schilddrüsenhormonwirkungen. Zum einen eine schnelle Wirkung, bei der innerhalb von Minuten über extranukleäre Signalwege eine Regulation bewirkt wird. Hierzu gehören die Effekte auf das Mitochondrium, die über einen mitochondrialen Rezeptor vermittelt werden und die Veränderungen der intrazellulären Konzentration von Ca²⁺ und cAMP über Wechselwirkungen mit der Ca²⁺-ATPase und Adenylatcyclase, wodurch in zwei wichtige Peptidhormon-Signalwege eingegriffen wird. Zum anderen existiert ein langsamer nukleärer Weg, über den die Schilddrüsenhormone überwiegend ihre Wirkung entfalten. Bei diesem Weg gelangt T₃ aus dem Cytosol der Zielzelle in den Zellkern, bindet dort an Kernrezeptoren und beeinflusst die Regulation der Genexpression.

Die Klonierung und molekulare Charakterisierung der Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) hat einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von Schilddrüsenhormonen geleistet (Weinberger et al., 1986; Sap et al., 1986). Die Schilddrüsenhormonrezeptoren wurden zuerst als zelluläre Homologe des viralen Onkogens v-erbA identifiziert. Ihre Charakterisierung ergab die Einordnung in die Steroidrezeptor-

Superfamilie. Es konnten zwei Hauptformen, TR α und TR β , charakterisiert werden, die durch zwei verschiedene Gene codiert sind (Lazar, 1993). Es entstehen durch alternatives Spleißen verschiedene Subtypen, welche teilweise nicht funktionell sind. Die drei funktionellen Rezeptoren TR α 1, TR β 1, TR β 2 regulieren die Expression von T3-responsiblen Genen, dabei lassen sich die gewebsspezifischen T3-Effekte möglicherweise durch die gewebsspezifische Expression dieser Subtypen erklären. Die TR binden bevorzugt an Schilddrüsenhormon-responsible-Elemente (TRE), die als Palindrom ohne Abstand (Pal0), als Tandem-Wiederholung mit vier Spacern Abstand (DR+4) oder als inverses Palindrom mit sechs Spacern Abstand (InvPal6) angeordnet sind (Bahniahmad et al., 1990; Umesono et al., 1991; Forman et al., 1992) (Siehe Abb. 2).

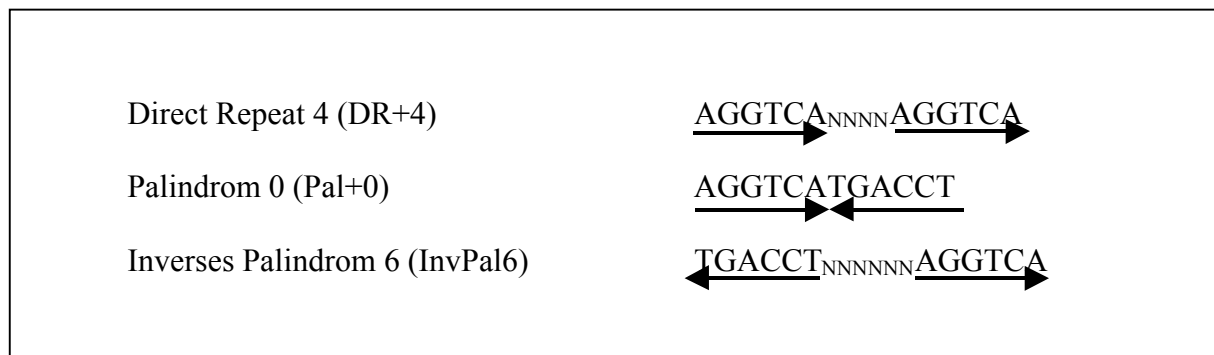


Abb. 2: Bevorzugte Strukturen von TRE

Durch gezielte Mutation der natürlichen TRE-half-sites vom Wachstumshormon der Ratte konnte die optimale Sequenz (AGGT(C/A)A) ermittelt werden (Brent et al., 1989). Doch die Sequenz und die Anordnung der half-sites von natürlichen TREs zeigen zahlreiche Variationen, so existieren Abstände zwischen den half-sites von null (Burnside et al., 1989; Chatterjee et al., 1989) bis zehn (Zhang et al., 1998; Jakobs, 1997) Spacern. An der dominierenden DR+4-Form bindet TR bevorzugt mit dem Dimerisierungspartner RXR (Miyamoto et al., 1994; Kato et al., 1995). Die Dimerisierung kann zu einer Steigerung der Bindungsaffinität von TR an das TRE führen und damit zur Verstärkung der T3-induzierten Steigerung der Transkription (Yu et al., 1991; Marks et al., 1992).

1.3 Mitochondriale Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase

Die FAD-abhängige mitochondriale Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (mGPDH) (EC 1.199.5) ist ein wichtiger Bestandteil des Glycerolphosphat-Shuttles. mGPDH ist ein kernkodiertes Enzym und besteht nativ aus einem tetrameren Protein, welches aus vier identischen 76 kDa großen Untereinheiten aufgebaut ist (Brown et. al., 1994; Cole et. al., 1978). Als kernkodiertes mitochondriales Protein wird die mGPDH im Cytosol translatiert, ins Mitochondrium importiert und ist anschließend an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Klingenberg, 1970). Die mGPDH zeigt eine besonders große Aktivität in Geweben mit sehr hohem ATP-Umsatz, wie in Spermatozoen, in den Inselzellen des Pankreas und in Braunem Fettgewebe (Schenkman et.al., 1965; MacDonald, 1981). Bereits 1958 konnten Estabrook und Sacktor im äußerst hohen energieverbrauchenden Insektenflugmuskel eine sehr starke mGPDH-Aktivität messen. Dieser Flugmuskel war daher lange Zeit ein bevorzugtes Untersuchungsobjekt. Hier wurde dabei zum ersten Mal die Existenz eines Glycerolphosphat-Shuttles postuliert (Estabrook und Sacktor, 1958; Bücher und Klingenberg, 1958). Mit dieser Entdeckung wurde der mGPDH eine zentrale Rolle im zellulären Glukose- und Energiestoffwechsel zugesprochen. Der Shuttle verbindet cytosolische mit mitochondrialen Stoffwechselwegen, indem er über ein Zusammenspiel eines cytosolischen mit einem mitochondrialen Enzym Reduktionsäquivalente in das Mitochondrium transportiert, wo diese über die Atmungskette weiter verstoffwechselt werden.

1.3.1 Glycerolphosphat-Shuttle

Der Glycerolphosphat-Shuttle (Abb. 3) regeneriert cytosolische Reduktionsäquivalente. Diese stammen hauptsächlich aus der Glykolyse und können die Mitochondrienmembran nicht passieren. Bei diesem Shuttle bewirken zwei Enzyme diesen zyklischen Prozess, bei dem das eine Enzym im Cytosol und das andere im Mitochondrium lokalisiert ist. Im Cytoplasma wird NADH zum NAD⁺ mit Hilfe der cytosolischen, NAD-abhängigen Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (cGPDH, EC 1.1.1.8) oxidiert, wobei Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerol-3-phosphat reduziert wird. An der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran wird dann Glycerol-3-phosphat durch die FAD-abhängige, mitochondriale Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase rückoxidiert, wobei FADH₂ entsteht. FADH₂ überträgt seine Elektronen an das Ubichinon der Atmungskette (Komplex II), dadurch entsteht aus einem Mol FADH₂ zwei

Mol ATP. Durch den Eintritt der Elektronen in die Atmungskette unter Umgehung von Komplex I entsteht weniger ATP, als bei einer Übertragung auf den Komplex I, wie beispielsweise beim Malat-Aspartat-Shuttle. Die restliche Energie geht durch die Reaktion der mGPDH als Wärme verloren und scheint eine wichtige Rolle bei der Thermogenese zu spielen (Chaffee et al., 1964). Es handelt sich folglich um eine stark exotherme und damit irreversible Reaktion (Dawson, 1979), was einen ausschließlich vom Cytosol ins Mitochondrium gerichteten Transfer gewährleistet. Die Kapazität des Shuttles wird über die mGPDH-Aktivität kontrolliert, da sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert (Werner und Berry, 1974).

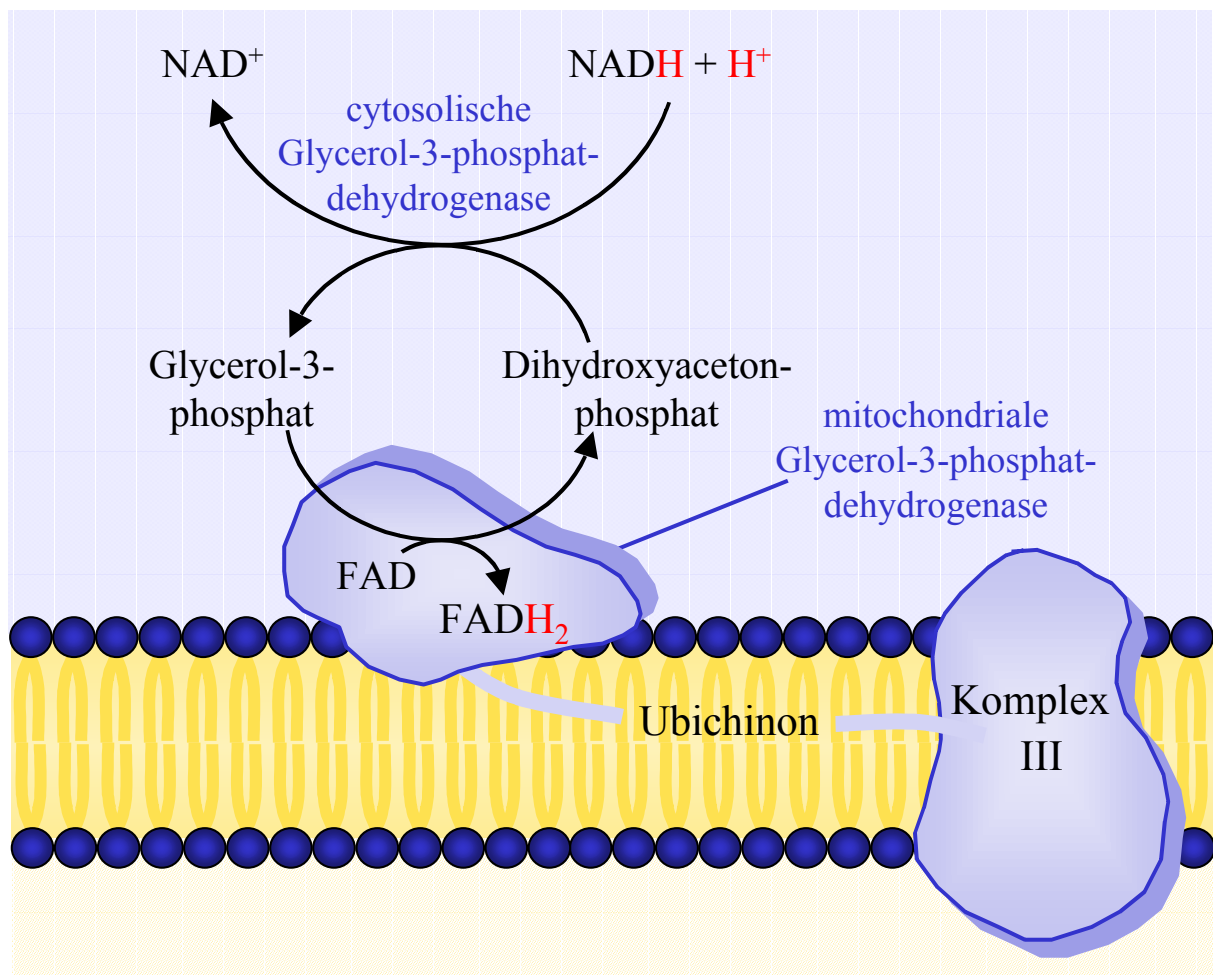


Abb. 3: Glycerolphosphat-Shuttle
Erklärung im Text

(modifiziert nach Lehninger et al., 1998)

1.3.2 Molekularbiologie der mGPDH

Durch Isolierung und Sequenzierung der mGPDH-cDNA konnte eine Aminosäuresequenz abgeleitet werden, die eine putative mitochondriale Signalsequenz (Brown, et al., 1994; Müller und Seitz, 1994), eine FAD- und eine Substratbindungsstelle sowie zwei „EF-Hand“-Calcium-Bindungsdomänen enthält. Bei dem mGPDH-Gen handelt es um ein single-copy Gen mit einer Größe von ~100 kbp. Es umfasst 17 Exons mit drei verschiedenen ersten Exons, wobei die drei ersten Exons drei verschiedene 5'-nichttranslatierte Bereiche (UTR) kodieren (Gong et al., 1998). Das am weitesten stromaufwärts liegende Exon 1a ist aus humanen Insulinomzellen isoliert (Ferrer et al., 1996) und liegt nur ca. 460bp vor dem Exon 1b, welches in Leberzellen identifiziert wurde (Müller und Seitz, 1994). Das Exon 1c (isoliert aus Hoden: Brown et al., 1994) wurde weiter entfernt bei ca. ~27kb stromabwärts lokalisiert. Diese unterschiedlichen ersten Exons werden durch alternatives Spleißen so auf das gemeinsame Exon 2 gespleißt, dass Transkripte entstehen, die an ihrem 5'-Ende entweder die Sequenzen von Exon 1a, 1b oder 1c enthalten (Abb. 4). Da die ersten Exons nicht proteinkodierend sind, sondern das Translationsstartcodon sich im gemeinsamen Exon 2 befindet, bleibt die kodierende Sequenz des Genproduktes unbeeinflusst. Die drei alternativen Promotoren sind gewebsspezifisch aktiv: Promotor A im Gehirn, Braunem Fettgewebe und Pankreas; Promotor B ubiquitär; Promotor C im Hoden.

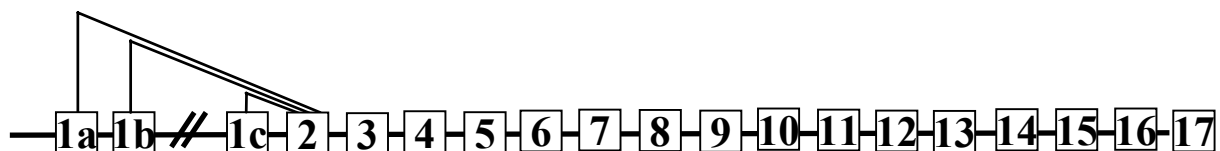


Abb. 4: Schematische Darstellung der genomischen Organisation der mGPDH der Ratte.

1.3.3 Hormonelle Regulation der mGPDH

1.3.3.1 Schilddrüsenhormone

Bereits in den 60er Jahren wurde die Regulation der mGPDH durch Schilddrüsenhormone (T3) in der Ratte untersucht. Lee und Lardy (1965) beschrieben erstmals, dass sich die mGPDH-Enzymaktivität drastisch mit dem Hormonstatus in vielen Organen ändert. Die mGPDH der Ratte erwies sich als eines der am stärksten durch Schilddrüsenhormone aktivierbares Enzym. Ein Aktivitätsanstieg ist dabei in Niere (6fach), Herzmuskel (4fach) und am stärksten in der Leber mit einer 10-20fachen Erhöhung, zu beobachten (Lee und Lardy, 1965; Cederbaum et al., 1973; Ruegamer et al., 1964). Bei Geweben, die eine T3-induzierte mGPDH-Aktivierung zeigen, ist auch eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch T3 zu detektieren (Lee und Lardy, 1965). Der Zeitverlauf der mGPDH-Aktivitätssteigerung in der Leber durch T3 korreliert hierbei mit dem gesteigerten Sauerstoffverbrauch (Ruegamer et al., 1964). Die Aktivitätserhöhung durch T3 ist dabei einzig bei Geweben zu beobachten, in denen eine eher geringe basale mGPDH Expression herrscht (Lee und Lardy, 1965; MacDonald et al., 1995), während Gewebe mit hoher basaler mGPDH-Aktivität (z. B. Pankreas, Braunem Fettgewebe, Hoden und Gehirn) keine oder kaum eine Steigerung durch Schilddrüsenhormone aufweisen.

In unserem Labor wurde bei hyperthyreoten Ratten nach T3-Gabe eine 10fache Erhöhung der mRNA-Konzentration in der Leber gemessen (Dümmeler et al., 1996). Bei diesen Untersuchungen korreliert die Erhöhung der mRNA-Konzentration mit der mGPDH-Aktivität, was für eine T3-Regulation der mGPDH auf der Transkriptionsebene spricht. Die mRNA-Konzentration steigt dabei schnell an, bereits zwei Stunden nach T3-Gabe ist die Konzentration um das 5fache erhöht und nach spätestens sechs Stunden ist die maximale mRNA-Induktion erreicht. Der Anstieg der mRNA-Konzentration kann prinzipiell durch die Induktion der Transkription oder durch die Stabilisierung und damit durch die Verlängerung der mRNA-Halbwertszeit ermöglicht werden. Die in Arbeiten detektierte Verhinderung der T3-vermittelten mGPDH-Aktivität durch Transkriptionshemmstoffe (Lee und Miller, 1967) weist daraufhin, dass die Aktivierung über eine *de novo* mRNA-Synthese verläuft.

Für die T3-vermittelte Regulation eines Gens existieren grundsätzlich zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen die direkte Induktion, welche über Schilddrüsenhormonrezeptoren vermittelt wird, die an TRE binden und bei Anwesenheit von T3 die Transkriptionsrate

erhöhen. Zum anderen der indirekte Mechanismus, hier induziert T3 zunächst die Synthese eines Transkriptionsfaktors, der dann seinerseits die Expression des Zielgens aktiviert.

1.3.3.2 Peroxisomenproliferator Clofibrat

In der Literatur wird auch die Aktivierung von mGPDH durch Peroxisomenproliferatoren *in vivo* (Krishnakantha und Kurup, 1972) und *in vitro* (Shoemaker und Yamazaki, 1991) beschrieben. Shoemaker und Yamazaki (1991) konnten zeigen, dass die mGPDH-Enzymaktivität durch den Peroxisomenproliferator Clofibrat in kultivierten Hepatozyten gesteigert werden kann. Es wurde dabei eine synergistische Wirkung von Schilddrüsenhormonen und Clofibrat detektiert. Peroxisomenproliferatoren sind eine strukturell heterogene Gruppe, welche die Peroxisomenbildung beschleunigen und die selektive Transkription von Genen erhöhen, die bei der peroxisomalen Fettsäuren- β -Oxidation eine Rolle spielen (Reddy et al., 1986). Die Peroxisomenproliferatoren vermitteln ihre Wirkung auf die Genexpression über Mitglieder der Steroidrezeptor-Superfamilie, die Peroxisomenproliferatoren-aktivierenden Rezeptoren (PPARs). Von den PPARs existieren mindestens drei verschiedene Subtypen: PPAR α , PPAR γ und PPAR β/δ (Dreyer et al., 1992; Reviews: Green, 1995; Schoonjans et al., 1996). Die physiologische Hauptfunktion der α und γ Subtypen ist die Regulation beim Lipidmetabolismus und der Adipogenese (Tugwood et al., 1992), während die Rolle des PPAR β/δ noch nicht geklärt ist. Die regulatorische Wirkung der Genexpression der Peroxisomenproliferatoren wird über PPAR/RXR-Heterodimere vermittelt (siehe 1.1.1.) (Gearing et al, 1993; Kliewer et al., 1992). Eine Heterodimerisierung konnte auch zwischen TR und PPAR *in vitro* nachgewiesen werden (Marks et al., 1992) und könnte eine mögliche Erklärung für die synergistischen Effekte von T3 und Clofibrat auf die mGPDH sein.

1.3.4 Klinische Relevanz der mGPDH

In den Inselzellen des Pankreas herrscht eine um das 40-60fache höhere mGPDH-Aktivität als in der Leber (MacDonald, 1981). Eine Reihe von Publikationen (Malaisse, 1992; Dukes et al., 1994; MacDonald, 1990) demonstrieren, dass der Glycerolphosphat-Shuttle eine wichtige Rolle im „Glucose-Sensing“ spielt. „Glucose-Sensing“ bewirkt bei einem erhöhten Blutglukosespiegel die Sekretion von Insulin. Es wird postuliert, dass bei diesem Signalweg Reduktionsäquivalente, die bei der Glykolyse entstanden sind, durch NADH-Shuttle-Systeme (überwiegend durch den Glycerolphosphat-Shuttle) in die Atmungskette transportiert

werden. Der daraus resultierende ATP-Anstieg ist die initiale Ursache der Insulinfreisetzung, denn die Veränderung des ATP/ADP-Verhältnisses vermindert die Durchlässigkeit der ATP-abhängigen Kaliumkanäle in der Plasmamembran. Dies führt zur Depolarisation der Membran und damit zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Ca^{2+} kann in die Zelle einströmen und die Freisetzung von Insulin durch Exocytose aus den Speichervesikeln bewirken (Malaisse, 1996; MacDonald, 1990) (siehe Abb. 5).

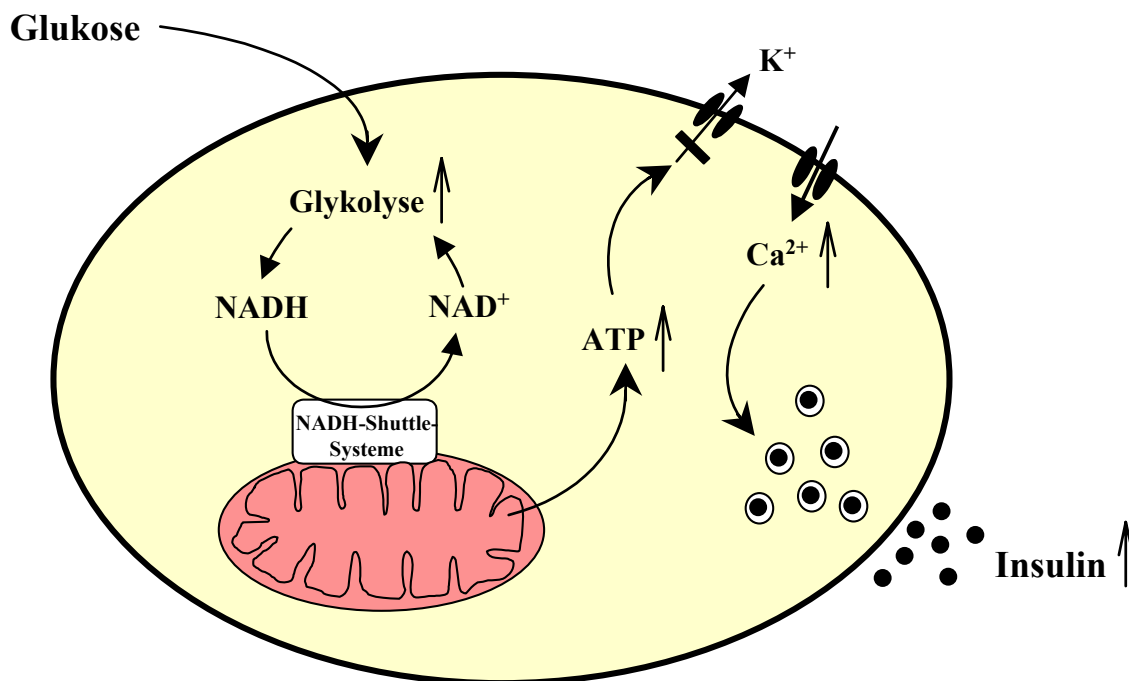


Abb. 5: Schematisches Modell des „Glucose-Sensing“

Glukose gelangt über eine pankreas- und leberspezifische Glukokinase zur Glykolyse. Die Reduktionsäquivalente der Glykolyse werden durch NADH-Shuttle-Systeme in die Atmungskette geschleust. Der ATP-Anstieg bewirkt eine verminderte Durchlässigkeit der ATP-abhängigen Kaliumkanäle, was über die Depolarisation zum Ca^{2+} -Einstrom und damit zur Insulinfreisetzung führt.

Folgerichtig ist für die Sekretion von Insulin eine Verkettung zwischen cytosolischen und mitochondrialen Prozessen notwendig. Es wurde demonstriert, dass die NADH-Shuttle-Systeme wichtig für die Verbindung zwischen der Glykolyse und der mitochondrialen ATP-Produktion sind, welche die Glukose-induzierte Insulinsekretion auslösen (Eto et al., 1999 b). Existiert also kein aktiver NADH-Shuttle gibt es auch kein „Glucose-Sensing“. Da der Glycerolphosphat-Shuttle eine besonders hohe mGPDH-Aktivität in den Inselzellen besitzt,

wird ihm eine wichtige Rolle beim „Glucose-Sensing“ zugeschrieben. (MacDonald, 1990, Sekine et al., 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein bedeutender Faktor bei der Insulinsekretion die Bildung von NADH während der Rückoxidation von Glycerolaldehyd-3-phosphat ist (Dukes et al., 1994). Die beim Diabetes mellitus Typ II verminderte mGPDH-Aktivität könnte für die gestörte Insulinsekretion der β -Zellen verantwortlich sein. So wurde bei Nagermodellen für Diabetes (Giroix et al., 1991; Österson et al., 1993) und bei Typ II Diabetikern (Fernandez-Alvarez et al., 1994; Novials et al., 1997) in den Inselzellen eine reduzierte mGPDH-Aktivität gemessen. In mGPDH-Knockout-Mäusen zeigte sich eine Kompensation der Funktion des Glycerolphosphat-Shuttles durch den Malat-Aspartat-Shuttle. Die Inhibierung des Malat-Aspartat-Shuttles in den mGPDH-Knockout-Mäusen bewirkt einen drastischen Abfall der Insulinsekretion, was die Bedeutung des Transports von Reduktionsäquivalenten für die Insulinfreisetzung belegt (Eto et al., 1999 a).

2 Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den molekularen Mechanismus der funktionellen und hormonregulierten Genexpression der mGPDH aufzuklären. Die mitochondriale Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase katalysiert im Glycerolphosphat-Shuttle den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und hat damit eine wichtige Funktion im oxidativen Glukosestoffwechsel und beim Übergang zur Atmungskette. Das Enzym gehört zu den klassischen T3-abhängigen Enzymen und ist ein sogenanntes Markerprotein, da es sich um das stärkste durch Schilddrüsenhormon aktivierte mitochondriale Enzym handelt. Die bisherigen Befunde zur mGPDH-Regulation weisen daraufhin, dass die Aktivierung durch T3 über eine *de novo* mRNA-Synthese verläuft. Die Genexpression der mGPDH der Ratte wird über drei alternative Promotoren gewährleistet. Ihre basale und hormonelle Regulation sollte in dieser Arbeit unter anderem durch transiente Transfektionen untersucht werden. Im Vordergrund stand dabei die Analyse von Promotorregionen, die an dem T3-Einfluss beteiligt sind. Eingesetzt werden sollten gezielte Mutationen und weiterführend sollte mit Hilfe von Band-Shift-Experimenten untersucht werden, ob an diesen Regionen tatsächlich Proteine binden, die in der Lage sind, eine T3-abhängige Aktivierung auf die Transkription auszuüben. Die Untersuchungen der mGPDH-Aktivierung durch T3 sollte nicht nur auf transkriptioneller Ebene erfolgen, sondern auch der T3-Einfluss auf die Proteinkonzentration durch Western-Blot-Methode analysiert werden. Als Resultat ergibt sich die Aufklärung der T3-Aktivierung vom Promotor bis zur Enzymaktivität.

Da mit Peroxisomenproliferatoren auch eine mGPDH-Aktivitätssteigerung beschrieben ist, wurden die Versuche mit diesem Stimulator ausgeweitet. Parallel dazu wurde der Einfluss von anderen möglichen Induktoren, wie Retinsäure und Steroidhormonen auf die mGPDH-Promotoraktivität untersucht. Mit diesen Hormonen sind unter anderem Interaktionen zu T3 beschrieben, so dass ihre Regulationsanalyse für die Aufklärung der hormonellen Aktivierung von mGPDH neue Erkenntnisse darlegen kann. Dies soll schließlich zur Aufklärung der komplexen Zusammenhänge der mGPDH-Regulation führen.

Die Aufklärung des molekularen Mechanismus der mGPDH-Aktivierung ist von besonderer Bedeutung, da sie einen Beitrag zum Verständnis der Stimulierung mitochondrialer Aktivität durch Schilddrüsenhormone und andere Induktoren leisten kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Restriktionsenzyme und DNA-Größenmarker wurden von der Firma Pharmacia (Amersham) bezogen. Feinchemikalien stammten, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Roche, Merck, Sigma, Serva und Fluka. Es wurden die Proteingrößenmarker Precision Protein Standard und Kaleidoscope Prestained Standard von der Firma BioRad sowie der BenchMark Prestained Protein Ladder von der Firma GibcoBRL (LifeTechnologies) verwendet. Alle angewandten Chemikalien wurden nach den jeweiligen aktuellen Vorschriften des Herstellers behandelt und dementsprechend entsorgt. Dabei wurden alle relevanten R- und S-Sätze beachtet und die eingeholten organischen Lösungsmittel in entsprechende Sammelbehälter nach Schadstoffkategorie getrennt. Beim Arbeiten mit biologischem Zellmaterial der Sicherheitsstufe 1 sind ebenfalls die aktuellen Vorschriften eingehalten worden.

3.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Generierte Antikörper gegen mGPDH

Der spezifische Antikörper gegen mGPDH wurde in unserem Labor generiert. Dafür sind Peptide von Aminosäuren 42 bis 206 bakteriell exprimiert und Kaninchen damit immunisiert worden (Weitzel et al. 2001). Serum und Antiserum wurden nach Standardprotokollen präpariert.

Kommerziell erworbene Antikörper

Antikörper anti-	Organismus	Firma
SP1	Ziege, Polyclonal	Santa Cruz, Biotechnology USA
Retinoid-X-Rezeptorα(RXRα)	Kaninchen, Polyclonal	Santa Cruz, Biotechnology USA
Schilddrüsenhormon-Rezeptorα (TRα1)	Kaninchen, Polyclonal	Santa Cruz, Biotechnology USA
Sekundärer Antikörper Kaninchen IgG HRP-Konjugat	Ziege	Dianova

3.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

Plasmide

- pCH110: Expressionsvektor für das *lacZ*-Gen (β -Galaktosidase) unter Kontrolle von SV40 Promotor (Pharmacia)
- pGL2-Basic: promotorloser Reportergenvektor mit *luc*-Gen (*Photinus pyralis* Luciferase): Grundlage für die Promotorkonstrukte (Promega)
- pGL2-Promotor: Reportergenvektor mit *luc*-Gen (*Photinus pyralis* Luciferase) unter Kontrolle von SV40 Promotor (Promega)
- Oxytocinpromotor: Vom Institut der Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt (Walther et al. 1999).

Expressionsplasmide für Kernrezeptorgene

- hRXR α : Humaner Retinoid-X-Rezeptor α im pCMV6-XL4-Expressionsvektor (Omnigene)
- hRXR β : Humaner Retinoid-X-Rezeptor β im pCMV6-XL4-Expressionsvektor (Omnigene)
- mRXR γ : mouse Retinoid-X-Rezeptor γ im pCMV6-XL4-Expressionsvektor (Omnigene)
- hRAR α : Humaner Retinsäurerezeptor α in pGEM-TEasy-Expressionsvektor (Promega)
- cTR α 1: Schilddrüsenhormonrezeptor α 1 vom Huhn im pSG5-Expressionsvektor (Stratagene)
- xPPAR α : Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor α des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) im pSG5-Expressionsvektor (Stratagene)
- hER α : Humaner Estradiolrezeptor α im pRC/CMV-Expressionsvektor

Oligonukleotide

Radioaktiv markierte Nukleotide wurden bei der Firma Amersham bestellt und die synthetischen Oligonukleotide von MWG Biotech bezogen.

3.1.4 Zelllinien

HepG2:	Humane Hepatoblastomzellen (ATCC: HB-8065)
RatI:	Rattenfibroblasten (Topp, 1991)
HEK293:	Humane embryonale Nierenzellen (ATCC: CRL-1573)
H-35:	Rattenhepatozyten, „Reuber“-Zellen (ATCC: CRL-1548)
H-4-II-E:	Subkultur von H-35
FAO:	Subkultur von H-4-II-E

3.1.5 Zusammensetzung von Medien, Standardlösungen und Puffern

Medien

LB-Medium	0.5% (w/v) Bacto Yeast (Difco), 1% (w/v) Bacto Trypton (Difco), 1% NaCl, pH 7.2
LB-Agar	LB-Medium, 1.5% (w/v) Bacto-Agar (Difco)
Zellkulturmedien	Dulbecco`s modified Eagle`s medium plus Glutamax (Gibco), 10% fetales Kälberserum (Biochrom), 40U/mL Penicillin, 40U/mL Streptomycin

Standardlösungen und Puffer

Fibronektinpuffer	140mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgSO ₄ , 15mM CaCl ₂ , 10mM HEPES, 150µg/mL Fibronektin (Boeringer Mannheim)
PBS	4mM KH ₂ PO ₄ , 6mM Na ₂ HPO ₄ , 115mM NaCl, pH 7.2
TBE	89mM Tris-HCl, 89mM Borsäure, 2mM EDTA, pH 8.3
10x PCR-Puffer	500mM KCl, 15mM MgCl ₂ , 100mM Tris-HCl, pH 9.0 (Pharmacia)
Luciferinlösung	25mM Glycyl-Glycin, pH 7.8, 10mM DTT, 0.2mM Luciferin (Roche)
Luciferin-Assay-Puffer	25mM Glycyl-Glycin, pH 7.8, 15mM MgSO ₄ *7 H ₂ O, 12mM K ₂ HPO ₄ , 3.5mM KH ₂ PO ₄ , 4mM EGTA, 1mM DTT, 2mM ATP pH 7.8

Qiagenpuffer	
P1 Puffer	100µg/mL RNaseA, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA
P2 Puffer	20mM NaOH, 1% SDS
P3 Puffer	3mM Kaliumacetat, pH 5.5
QBT Puffer	750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100, pH 7.0
QC Puffer	1M NaCl, 50mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0
QF Puffer	1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl, 15% Ethanol, pH 8.5
Zellkernextraktpuffer	
Puffer A	10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA pH 8.0, 10mM EGTA pH 8, 0.1mM DTT, 0.05mM AEBSF
Puffer B	20mM HEPES pH 7.9, 0.1mM NaCl, 0.1mM EDTA pH 8.0, 10mM EGTA pH 8, 0.1mM DTT, 0.1mM AEBSF
10x Nick-Puffer (nach Maniatis)	500mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 500µg/mL BSA
10x Band-Shift-Puffer	100mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM DTT, 5mM MgCl ₂ , 1mg/ml BSA, 50% Glycerin
10x HeBS	8.2% NaCl, 0.2% Na ₂ HPO ₄ , 5.94% HEPES, pH 7.2 (steril filtriert); 2x HeBS als Arbeitsverdünnung mit sterilem Wasser hergestellt
Proteinlyse-Puffer	50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2% Aprotinin, 2mM EDTA, 50mM NaF, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 10% Glycerin, 1mM AEBSF
SDS-PAGE-Puffer	
2x Probenpuffer	2% SDS, 62.5mM Tris-HCl, 10% Glycerin, 2% Mercaptoethanol, 0.01% Bromphenolblau, pH 6.8
1x Sammelgelpuffer	125mM Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 6.8
1x Trenngelpuffer	375mM Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 8.8
Elektrophoresepuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0.1% SDS
Björum- und Schäfer-Nielsen-Puffer	
	48mM Tris, 39mM Glycin, 20% Methanol, pH ca. 9.2: Keine pH-Justierung erforderlich
Shift-Western-Blot-Puffer	48mM Tris, 39mM Glycin, 20% Methanol, pH 8.5

3.1.6 Ansetzen und Verwahren der Stimulatoren

3,5,3'-Triiod-L-thyronin (T3)

3,5,3'-Triiod-L-thyronin (Sigma) wurde als eine 10 μ M Stammlösung mit 0.1 % Albumin, als 1mL Aliquots bei -20°C maximal 6 Monate verwahrt. Bereits einmal aufgetaute Aliquots konnten bei einer Aufbewahrung von -4°C maximal bis zu fünf Tagen verwendet werden,

All-trans-Retinsäure (RA)

Eine Ampulle mit 50mg all-trans-Retinsäure (Sigma) wurde in 1.66 mL DMSO aufgenommen, als 100 μ L Aliquots mit flüssigem Stickstoff überschichtet und bei -80°C als 0.1M Stammlösung gelagert. Die 0.1M Stammlösung ist für die Arbeitslösung mit 100% Ethanol eine Konzentration von 2mM verdünnt und höchstens eine Woche bei -20°C aufbewahrt worden. Alle Arbeiten mit der all-trans Retinsäure geschahen möglichst ohne oder geringem Lichteinfluss.

Clofibrat

Das von der Firma Sigma stammendem Clofibrat (Ethylester der Clofibrinsäure) wurde mit 100% Ethanol direkt als 300mM Arbeitslösung angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

β -Estradiol

Mit β -Estradiol von der Firma Sigma wurde mit 100% Ethanol eine 1mM Stammlösung angesetzt und als 0.5mL Aliquots bei -80°C gelagert. Die Stammlösung wurde mit Wasser (steril) auf eine 100nM Arbeitslösung verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2 Tiere und Tierhaltung

Ratten

Die verwendeten männlichen Wistar Ratten wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten: 23°C, 60% Luftfeuchtigkeit, 12/12h Hell-Dunkel Rhythmus, Futter und Wasser *ad libitum*. Die Hyperthyreose wurde durch einmalige Injektion von T3 (50 μ g/100g Körpergewicht) ausgelöst. Durch Messung der Serum T3- und T4-Konzentrationen wurde der Hormonstatus der Tiere kontrolliert. Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Gesundheitsbehörde Hamburg durchgeführt.

Kaninchen

Die Kaninchen wurden von der Tierpflegeabteilung des Universitätsklinikums-Hamburg-Eppendorf nach den UKE-Tierpflegerichtlinien gepflegt.

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultur

3.3.1.1 Präparation und Kultivierung primärer Hepatozyten

Prinzip: Die Isolierung und Kultivierung der Hepatozyten erfolgte nach der Methode von Süßmuth et al. (1984) durch Kollagenaseperfusion.

Durchführung: Die Hepatozyten stammten jeweils aus der Leberperfusion von ca. 200g schweren juvenilen Wistar Ratten nach Süßmuth et al. (1984). Zur Auflösung der Zellen aus dem Zellverband wurde eine Perfusion mit Kollagenase durchgeführt. Die nun isolierten Hepatozyten wurden dreimal mit L15 Medium (Life Technologies)/20mM HEPES (Seromed) gewaschen und auf Fibronectin-beschichteten Gewebekulturschalen in einer Zelldichte von $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ausplattiert. Die Beschichtung der Gewebekulturschale geschah vorher, indem 1mL Fibronectinpuffer 30min bei RT auf jeder Schale inkubiert wurde. Nach drei Stunden wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt. Ihre Kultivierung erfolgte in serumhaltigem Dulbecco Minimum Eagle Medium mit Dexamethason und Insulin über 48h, wobei nach 24h ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

3.3.1.2 Allgemeine Arbeitsweisen für permanente Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Heraeus B 5060 EC CO₂). Die verwendeten Medien und Lösungen waren im Wasserbad auf 37°C temperiert. Die Zellen wurden je nach Zelldichte (Wachstum) alle drei bis fünf Tage gesplittet. Es war notwendig dafür das Medium abzusaugen, die Zellen zweimal mit PBS zu waschen und kurz mit Trypsin-EDTA zu inkubieren. Danach erfolgte die Abnahme der Trypsin-EDTA-Lösung und die Inkubation der Zellen für 5-10min bei 37°C im Brutschrank. Durch Klopfen lösten sich die Zellen von der Zellkulturflasche und konnten im Zellkulturmedium resuspendiert werden. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und Ausplattierung der Zellen für die laufende Kultur in einer Zelldichte von $1 \times 10^5/\text{cm}^2$. Für die Versuche wurden typischerweise 24h vor der Transfektion 1×10^6 Zellen auf je eine 8.7cm^2 Gewebekulturschale ausplattiert.

3.3.1.3 Herstellung von „gestripptem“ Serum

Prinzip: Durch die Absorptionskräfte der Aktivkohle werden dem Serum lipophile Bestandteile entzogen.

Durchführung: 1g Aktivkohle wurde mit 0.1g Dextran T 70 (Sigma) und 200mL H₂O über Nacht bei 4°C gerührt. Es fand eine Verteilung der Aktivkohle-Lösung auf zwanzig 50mL-Röhrchen statt (10mL/Röhrchen), die 10min bei 4°C bei 4000rpm zentrifugiert wurden. 500mL FCS (Fetales Kälber Serum) (Biochrom) inkubierten mit 1000U Sulfatase (Sigma) zwei Stunden in einem 37°C warmen Wasserbad, danach wurden jeweils 50mL FCS-Lösung bei 4°C auf ein Aktivkohle-Pellet gegeben, resuspendiert und 30min bei 56°C hitzeinaktiviert. Nach der Inaktivierung kamen die Röhrchen 5min auf Eis und wurden 15min bei 4°C bei 4000rpm zentrifugiert. Die FCS-Lösungen wurden danach erneut auf unbenutzte Aktivkohle-Pellets gegeben und 15min bei 4°C bei 4000rpm zentrifugiert. Nun wurde die FCS-Lösung über 0.2µM Filter sterilfiltriert, in 50mL-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

3.3.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie DNA-Gelelektrophorese, DNA-Restriktionsverdau, DNA-Fällung durch Ethanol wurden nach Maniatis et al. (1982) durchgeführt.

3.3.2.1 Transformation

Prinzip: Kompetente Zellen haben durch Vorbehandlung mit CaCl₂ oder RbCl die Fähigkeit DNA-Plasmid in größeren Umfang als unbehandelte Bakterien aufzunehmen. Kompetente Bakterien sind außerdem bei -80°C lagerfähig. Während eines Hitzeschocks nimmt ein kleiner Anteil der kompetenten Bakterien die DNA in das Zellinnere auf. Die Selektion der transformierten Bakterien von den nicht transformierten Bakterien geschieht auf Selektionsplatten mit Hilfe der Antibiotikaresistenz, die in dem transformierten Plasmid kodiert ist.

Durchführung: 20µL kompetente NovaBlue Zellen (Novagen) wurden 30min mit 15-30ng DNA-Plasmid auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 90sec bei 42°C mit anschließender Kühlung auf Eis. Nach Zugabe von 80µL SOC-Medium (Novagen) wurden die Bakterien 1h bei 37°C inkubiert, auf LB-Agar (Ampicillin 50µg/mL) Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

3.3.2.2 Plasmidpräparation

Prinzip dieser Methode ist die Reinigung von Plasmiden aus transformierten Bakterien an geeigneten Säulen. Nach alkalischer Lysierung und RNaseA-Behandlung ermöglichen Qiagen Säulen, die ein spezielles Anionenaustauscherharz enthalten, die Trennung von RNA, chromosomaler Bakterien-DNA und Plasmiden.

Durchführung: Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen). Eine entsprechende Bakterieneinzelkolonie wurde zunächst in 5mL antibiotikahaltigem (Amp 50µg/mL) LB-Medium in einem Inkubator Shaker Model G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) bis zur Sättigung angezogen. Die Starterkultur wurde in 100mL Amp-LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Inkubator angezogen. Die Bakteriensuspension wurde 15min bei 6000g zentrifugiert, das Pellet in 4mL P1 Puffer resuspendiert und mit 4mL P2 Puffer 5min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 4mL Neutralisationspuffer P3 wurde die Lösung 15min auf Eis inkubiert und 30min bei 30000g zentrifugiert. Der Überstand wurde über Gaze auf eine mit QBT Puffer äquilibrierte Säule (Qiagen-Tip 100) gegeben und zweimal mit 10mL QC Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit 5mL QF Puffer eluiert und mit 3.5mL 2-Propanol gefällt. Danach wurden die Präzipitate 30min bei 15000g bei 4°C gefällt, das DNA-Pellet mit 2mL 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde dann in 50µL-100µL Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration fand über die optische Dichte (ΔOD) bei 260nm im LKB Ultrospec III Photometer (Pharmacia) statt.

3.3.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Prinzip der PCR ist die selektive und hocheffiziente Anreicherung *in vitro* amplifizierter DNA definierter Länge und Sequenz. In einem zyklischen Prozess aus Denaturierung, Annealing und Elongation synthetisiert die thermostabile Taq DNA Polymerase in einem exponentiellen Reaktionsverlauf DNA Fragmente, die von spezifischen Oligonukleotidprimern flankiert sind (siehe Anhang).

Durchführung: Die 50µL PCR-Reaktionsansätze enthielten in 1x PCR-Puffer: je 50pmol Primer, jeweils 200µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0.5-1µg DNA-Template und 2.5U Taq Polymerase (Pharmacia). Die Ansätze wurden im T3Thermocycler (Biometra) mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert: 95°C 5min (1 Zyklus); 95°C 30sec, die

entsprechende Annealingtemperatur der Primer 30sec, 72°C 30sec (30 Zyklen), 72°C 10min. (1 Zyklus).

3.3.2.4 Automatische DNA-Sequenzierung

Prinzip: Die Sequenziermethode basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977). Hierbei wird von einem Primer aus der Gegenstrang zu einzelsträngiger DNA synthetisiert. In vier verschiedenen Ansätzen befindet sich zusätzlich zu den Desoxynukleotiden jeweils eines der vier Didesoxynukleotide (ddNTP`s: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Durch zufälligen Einbau der ddNTP`s an den jeweiligen Positionen der Sequenz, kommt es zum Syntheseabbruch und damit zur Entstehung verschieden langer DNA-Fragmente. Durch parallele Auftrennung der Ansätze in einem denaturierendem Polyacrylamidgel ist die Sequenz ablesbar. Der Gellauf und die Detektion wurden als Dienstleistung im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie der Universität Hamburg durchgeführt. Hierfür wurde der DyeTerminator-Sequencing-Kit (Applied Biosystem) verwendet, bei dem die Abbruch-Nukleotide mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Damit kann die Sequenzierung mit einer einzigen PCR computergestützt automatisch durchgeführt werden.

Durchführung: Die 20µL PCR-Ansätze enthielten 500-1000ng DNA, 2µL BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix und 8µL 2.5x Sequencing Puffer von Applied Biosystem, sowie 12.5pmol Sequenzierprimer. Die Ansätze durchliefen im T3Thermocycler (Biometra) folgendes Temperaturprogramm: 95°C 5min (1 Zyklus); 96°C 10sec; 50°C 15sec; 60°C 4min (35 Zyklen). Nach dem Durchlauf der PCR-Reaktion erhielten die Ansätze 80µL 0.3M Natriumacetat und 300µL 100%iges Ethanol die, 10min bei Raumtemperatur inkubiert und dann über 30min bei 1400rpm bei 4°C zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde mit 200µL 75%igem Ethanol gewaschen, über 10min bei 1400rpm bei 4°C zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Die Proben wurden in 4µL Formamid /50mM EDTA pH 8.0 (5:1) resuspendiert, 2min bei 90°C denaturiert und auf Eis gekühlt, bis sie auf ein 6%iges Polyacrylamidgel in TBE-Puffer aufgetragen und die Farbstoff-Terminatoren im ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) detektiert wurden.

3.3.2.5 *In vitro* Mutation

Prinzip: Bei der „Site Directed Mutagenesis“ werden 25-45mer Primern, welche die gewünschte Mutation enthalten (siehe Anhang) verwendet und mit einer PfuTurbo DNA Polymerase in einer PCR von doppelsträngiger Wildtyp-DNA mutierte DNA hergestellt. Nach der PCR wird die Wildtyp-DNA durch Behandlung mit der für methylierten und hemimethylierten DNA spezifischen Dpn I Endonuklease selektiv verdaut. Es wird hierbei ausgenutzt, dass die meisten Bakterienstämme das *dam*-Methylierungssystem besitzen. Die Wildtyp-DNA wird so automatisch methyliert und abgebaut (siehe Abb. 6).

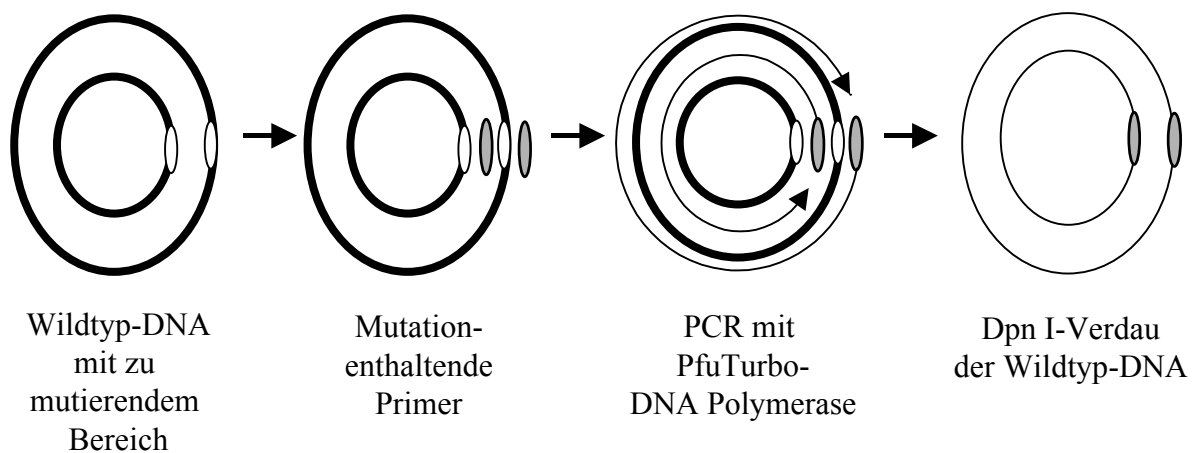


Abb. 6: *In vitro* Mutation

Durchführung: Die Methode wurde mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der PCR Ansatz enthielt 5µL 10x Reaction Buffer, 0,5µg Wildtyp-DNA, jeweils 20pmol Primer (forward und reverse), jeweils 200µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, und 1µL PfuTurbo DNA Polymerase (2.5U/µL) in 50µL Reaktionsvolumen. Nach dem Durchlaufen des PCR-Programms: (95°C 30sec [1 Zyklus]; 95°C 30sec, 50°C 1min, 68°C 12min [2 Zyklen]; 95°C 30sec, 55°C 1min, 68°C 12min [18 Zyklen]) im T3Thermocycler (Biometra) wurde unter Zugabe von 1µL Dpn I Restriktionsenzym (10U/µL) die Wildtyp-DNA bei 37°C für 1h verdaut. Anschließend fand eine Transformation des mutierten Plasmids in Epicurian Coli XL1-Blue superkompetente Zellen (Stratagene) statt.

3.3.2.6 *In vitro* Translation

Prinzip: Es wird ein DNA-Template generiert, das für ein Protein kodiert. Üblicherweise kloniert man dazu cDNA in einen Vektor mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase. Von diesem Template wird mittels *in vitro* Transkription RNA. Diese wird durch ein eukaryotisches Translationssystem (hier: Reticulocytenlysate) translatiert und dadurch zellfrei Protein synthetisiert (Krieg und Melton, 1987; Promega, 1996).

Durchführung: Es wurde das TNT Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Reaktionslösung aus 25µL TNT Rabbit Reticulocyte Lysate, 2µL TNT Reaktionspuffer, 1µL TNT RNA Polymerase (SP6), aus jeweils 0.5µl Aminosäure Mixture, ohne Leucin und 0,5µl Aminosäure Mixture, ohne Methionin und 1µL RNasin Ribonuclease Inhibitor (40U/µL) wurde mit 1µg DNA versetzt auf ein Reaktionsvolumen von 50µL gebracht und 90min bei 30°C inkubiert. Die verwendete DNA war im pSPUTK *in vitro* Translationsvektor (Stratagene) mit SP6 Promotor kloniert. Als Positivkontrolle wurde die Luciferase Control DNA (Promega) verwendet und seine Luciferaseaktivität bestimmt.

3.3.2.7 Radioaktive Markierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Prinzip: Bei dieser Methode werden annealte Oligonukleotide, die 5'-Überhänge besitzen, radioaktiv markiert. Die Klenow Polymerase füllt die 3'-Enden mit den entsprechenden Nukleotidtriphosphaten auf. Dabei ist eines ³²P markiert und man erhält ein markiertes, doppelsträngiges Oligonukleotid mit stumpfen Enden.

Durchführung: Je 200pmol des komplementären Oligonukleotide wurden in 180mM NaCl über Nacht im 95°C heißen Wasserbad abgekühlt und dabei annealt. Die einzelsträngigen Oligonukleotide (siehe Anhang) waren so gestaltet, dass die annealten Oligonukleotide 5'-Überhänge besitzen. 5pmol annealte Oligonukleotide wurden mit 4µL 2mM dATP, dGTP, dTTP, 2µL 10x Nick-Puffer, 5µL ³²P dCTP (3000Ci/mmol) und 1U Klenow-Fragment (Pharmacia) in einem 20µL Ansatz 20min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2µL 0.5M EDTA gestoppt und auf Nick G 25-Säulen gegeben, die markierte DNA von den nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden trennt.

3.3.3 Transiente Transfektion von permanenten und primären Zellen

3.3.3.1 Calciumphosphatpräzipitation

Prinzip: Aus DNA, Calcium und Phosphatpuffer bilden sich Präzipitate, die auf die Zellen gebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen werden.

Durchführung: 7×10^5 Zellen wurden in 8.7cm^2 Zellkulturschalen mit 1.5mL Medium ausplattiert, für 24h kultiviert und 4h vor der Transfektion ein Mediumwechsel vorgenommen. Es wurde jeweils ein Ansatz für drei Zellkulturschalen angesetzt. Dabei wurden 6 μg Promotor-Plasmid in pGL2-Basic, 300ng pCH110 sowie 600ng Kernrezeptor-Expressionsplasmide oder Salmon Sperm single stranded DNA, je nach Fragestellung in ein steriles Eppendorf-Tube gegeben. Die Plasmide wurden mit 125mM CaCl_2 in einem Endvolumen von 375 μL tropfenweise, durch gleichzeitiges „Blubbern“ der Lösung mit einer Pasteurpipette, in 375 μL 2x HeBS-Puffer gegeben. Nach 30min wurde jeweils 250 μL der DNA/Calciumphosphat-Präzipitate unter Schwenken auf eine Zellkulturschale getropft und 24h in einem Brutschrank (Heraeus) mit 3% CO_2 und 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen entweder geerntet oder nach einem Mediumwechsel mit Stimulatoren (z. B. T3, Clofibrat etc.) 24h stimuliert.

3.3.3.2 Liposomen-Methode

Prinzip: Aus negativ geladenen Nukleinsäuren und synthetisch hergestellten, positiv geladenen Liposomen bildet sich ein Komplex, der auf die Zellen gebracht wird und mit der Zellmembran fusioniert, so dass sein Inhalt durch Endocytose in das Zellinnere gelangt.

Durchführung: Die Liposomen-Methode wurde mit dem FuGene 6 Reagenz (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden 7×10^5 Zellen in 8.7cm^2 Zellkulturschalen mit 1.5mL Medium ausplattiert und für 24h kultiviert. Für drei Zellkulturschalen wurde 9 μL FuGene 6 Reagenz mit 300 μL serumfreiem Medium 5min vorinkubiert und dann in ein Eppendorf-Tube mit 4.5 μg Promotorplasmid, 300ng pCH100 sowie 600ng Kernrezeptor-Expressionsplasmide oder Salmon Sperm single stranded DNA, je nach Fragestellung, gegeben. Nach 15minütiger Inkubation wurde jeweils 100 μL dieser Lösung tropfenweise auf eine Zellkulturschale gegeben, welche vorher 1.5mL frisches Medium erhielt und 24h in einem Brutschrank (Heraeus) mit 5% CO_2 und 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen entweder geerntet oder nach einem Mediumwechsel mit den Stimulatoren 24h stimuliert.

3.3.3.3 Stimulation der permanenten Zellen nach transienter Transfektion

Für die Untersuchung der hormonabhängigen Aktivität der mGPDH-Promotorkonstrukte wurden die Zellen 24h nach der Transfektion stimuliert. Es war nötig das Medium abzunehmen und frisches Medium auf die Zellen zu geben. Die zu stimulierenden Zellen erhielten Zellkulturmedium mit frisch zugesetzten Stimulatoren. Die nicht zu stimulierenden Zellen erhielten Zellkulturmedium, welches das Lösungsmittel der Stimulatoren enthielt, um dessen Einfluß zu berücksichtigen. Die Zellen wurden dann weitere 24h im Brutschrank inkubiert. Die unter 3.1.6 dargestellten Arbeitslösungen der Stimulatoren wurden dem Medium in entsprechender Verdünnung zugesetzt.

Endkonzentrationen der Stimulatoren: 100nM T3, 300 oder 600µM Clofibrat, 1µM oder 2µM all-trans Retinsäure, 100nM Estradiol

3.3.3.4 Detektion der Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität

Prinzip: Die Expression des Promotors wird über ein Luciferase-Reportergen, dem pGL2-Basic Vektor, analysiert. Luciferase oxidiert Luciferin in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} , dabei entsteht AMP, Kohlendioxid und Photon. Die Lichtemission ist proportional zur Luciferasemenge (deWet et al., 1987) und lässt sich mit Hilfe eines Luminometers in Relativen Licht-Einheiten (RLU) messen.

Durchführung: Die Zellen wurden zweimal mit PBS (4°C) gewaschen, in 100µL Lysispuffer (+ 1mM DTT) (Tropix, Bedford, MA, USA) aufgenommen und 6min bei 4°C und 1400rpm zentrifugiert. Für die Messung der Luciferaseaktivität wurde 10µL des Zelllysats-Überstandes in 100µL Luciferase-Assay-Puffer gegeben und im halbautomatischen Luminometer Lumat LB9501 (Berthold) unter Injektion von 100µL Luciferinlösung 10sec gemessen.

Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die β -Galaktosidaseaktivität in 10µL Lysat-Überstandes mit dem Galacto-Light Plus Kit (Tropix) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Enzymaktivität wird mittels „Chemiluminiscense“ im Luminometer für 5sec gemessen.

Die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivitäten wurden jeweils doppelt bestimmt und aus den beiden RLU-Werten ist der Mittelwert gebildet worden. Die Luciferaseaktivität wurde dann

auf die Transfektionseffizienz normiert, d.h. durch die dazugehörige β -Galaktosidaseaktivität geteilt. Weitere Auswertung siehe 3.4.

3.3.4 Proteinchemische Methoden

3.3.4.1 Proteinpräparation aus permanenten Zellen

Prinzip: Die Zellen werden mit Nonidet P-40 lysiert, dabei gehen die löslichen Proteine in Lösung. Um den Abbau der Proteine zu verhindern, enthält die Lösung Proteasen-Inhibitoren.

Durchführung: Die fast konfluent gewachsenen Zellen jeder 8.7cm² Zellkulturschale wurden mit kaltem PBS gewaschen, dann mit 200 μ L kaltem Proteinlyse-Puffer (Zusammensetzung siehe 3.1.5) 10min auf Eis unter Schütteln lysiert und mit Hilfe eines Schabers geerntet. Jeweils drei Zellkulturschalen mit gleichen Bedingungen wurden zu einer Probe vereint. Für die Immunpräzipitation wurde Proteinlysate verwendet, das aus einer konfluent bewachsenen 75cm² großen Zellkulturflasche durch 2mL Proteinlyse-Puffer, welcher zusätzlich 1mM Natriumvanadat enthielt, gewonnen wurde. Die Lysate wurden 5min bei 4°C bei 14000g zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Proteinkonzentrations-Bestimmung wurde 2 μ L der Lysate nach der Bradford-Methode (siehe 3.3.4.3) untersucht.

3.3.4.2 Herstellung der Leberlysate

Jeweils 0.5g Lebergewebe von euthyreoten und T3-injizierten Ratten wurden mit 2mL kaltem frisch angesetzten Proteinlyse-Puffer gepottert und jeweils die Gesamtproteinkonzentration nach der Bradford-Methode (siehe 3.3.4.3) bestimmt.

3.3.4.3 Proteinbestimmung

Prinzip: Die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliantblau G250 verwendet wird. Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen zu einem Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 595nm aufweist, wobei der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465nm zeigt.

Durchführung: Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BioRad Proteinassay. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden 2 μ L des Zelllysates in 98 μ L PBS aufgenommen und mit 1mL Proteinassay-Puffer bei Raumtemperatur 30min inkubiert. Die Proben wurden anschließend in einem Photometer

(Pharmacia LKB Ultrospec III) bei 595nm gemessen. Als Referenz zur Berechnung der Δ OD-Werte diente ein substratfreier Ansatz.

3.3.4.4 SDS-PAGE und Western Blotting

Prinzip: Bei der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts elektrophoretisch getrennt. Anschließend kann im elektrischem Feld ein Transfer auf Trägermaterial, wie z. B. Nitrocellulose erfolgen.

Durchführung: Die Präparation der Proteine ist in 3.3.4.1 dargestellt. Die Proteinproben enthielten 10-50 μ g Protein und die jeweils aufgetragene Menge ist bei den Ergebnissen angegeben. Die Proben wurden mit 5 bzw. 10 μ L 2x Probenpuffer versetzt und mit Wasser auf gleiche Volumina von 10 μ L bzw. 20 μ L gebracht. Nun wurden die Proben 5min bei 95°C im Heizblock denaturiert, dann eisgekühlt und kurz abzentrifugiert. Die Polyacrylamidgele, bestehend aus 4%igem Sammelgel und 12% oder 8%igem Trenngel (Laemmli, 1970) wurden mit den Proben beladen, wobei eine Probe immer aus 5 μ L Proteingrößenmarker bestand und über 30min bei 90V und 1h bei 120V in Elektrophoresepuffer aufgetrennt wurde. Nach der Elektrophorese wurden die Taschenstege und nicht relevante Bereiche der Gele entfernt. Die Gelstücke wurden in Björnum- und Schäfer-Nielsen-Puffer äquilibriert. Die verwendete Nitrocellulose-Membran (0.45 μ m, Schleicher&Schüll) wurde auf das entsprechende Maß des Gels zurechtgeschnitten und ebenfalls im Björnum- und Schäfer-Nielsen-Puffer äquilibriert. Auf die untere Elektrode der semi-dry Blotapparatur (Phase) wurden drei Lagen 3 MM Whatman Papier gelegt, die gut mit Björnum- und Schäfer-Nielsen-Puffer getränkt waren. Darauf wurden erst das Gel, dann die Nitrocellulose-Membran und schließlich wieder drei Lagen durchtränktes 3 MM Whatman Papier gelegt. Mit einer Walze wurden vorsichtig eventuelle Luftblasen und überschüssiger Puffer entfernt. Dann wurde die obere Platinelektrode aufgesetzt und die Spannung angelegt. Der Proteintransfer erfolgte über 60min bei 0.8mA/cm² Gelfläche. Das SDS-Gel wurde 1h mittels Coomassie-Blue Lösung angefärbt um den Proteintransfer zu überprüfen. Das Gel wurde über Nacht bei 4°C mit Entfärbelösung entfärbt.

3.3.4.5 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer bei Raumtemperatur mit 5%iger Magermilchlösung in PBS 1h inkubiert um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blocken und so unspezifische Absorptionen der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit 2.5%iger Magermilch-PBS-Lösung inkubiert, die den spezifischen Antikörper gegen mGPDH Ab0 in der Verdünnung 1:1000 enthielt. Nachdem die Membran sechsmal für 15min mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation bei RT für 60min mit einem HRP-konjugierten Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 2.5%iger Magermilch-PBS-Lösung. Vor der ECL-Detektion (siehe 3.3.4.6) des Immunkomplexes wurde die Membran erneut sechsmal für 15min mit PBS gewaschen.

3.3.4.6 „Enhanced Chemiluminiscense“ (ECL)-Detektion der gebundenen Antikörper

Prinzip: Bei der ECL-Detektion (Amersham) werden, durch das an den zweiten Antikörper gebundene Peroxidase-Enzym, Luminolmoleküle gespalten, wodurch ein Lichtsignal erzeugt wird. Mit diesen Lichtsignalen lässt sich ein Röntgenfilm belichten, so dass sich die auf der Membran gebundenen Antikörper auf dem Röntgenfilm in äquivalenten Positionen als belichtete Banden wiederfinden. Dieses System hat gegenüber der direkten Detektion auf der Membran den Vorteil, dass zum einen die ECL-Detektion wesentlich empfindlicher ist, zum anderen lässt sich die Membran mehrmals mit verschiedenen Antikörpern inkubieren, nachdem man die alten Antikörper durch Strippen von der Membran entfernt hat. Ferner hält das Lichtsignal nach dem Auftragen der Luminollösung etwa 1h an, so dass mehrere Röntgenfilme hintereinander mit unterschiedlicher Intensität belichtet werden können.

Durchführung: Zur Detektion wurde die Membran nach dem Waschen trocken getupft und die proteinbindende Seite 1min mit ECL-Lösung benetzt, welche vorher nach Vorschrift des Herstellers (Amersham) zubereitet wurde. Danach wurde die Membran wieder gut trocken getupft, luftblasenfrei mit Frischhaltefolie bedeckt und mit der proteinbindenden Seite nach oben in die Röntgenkammer gelegt. Die Anfangsbelichtung mit dem Röntgenfilm (Kodak XAR 5) betrug 30sec. In Abhängigkeit des Signals auf dem Röntgenfilm wurde ein neuer Röntgenfilm entweder länger oder kürzer auf der Membran exponiert um ein optimales Signal zu erhalten.

3.3.5 Präparation der Zellkernextrakte

Prinzip: Gewinnung von Zellkernen aus permanenten Zellen nach Hamanaka et al. (1992) für weiterführende Versuche, wie z.B. EMSA.

Durchführung: Ca. 3×10^7 Zellen wurden zweimal mit 15mL PBS (4°C) gewaschen und mit Hilfe eines Schabers mit 5mL PBS (4°C) geerntet. Das Lysat wurde auf 40mL mit PBS (4°C) aufgefüllt und 10min bei 4°C mit 2500g zentrifugiert. Das erhaltende Pellet wurde mit 1.5mL Puffer A (4°C) resuspendiert. Zum Schwellen wurden die Zellen für 15min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 100µL einer 10%igen TritonX-100-Lösung in Puffer A lysiert und 5min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden durch niedertourige Zentrifugation sedimentiert (5min, 4°C, 1500g) und zur Entfernung cytoplasmatischer Proteine mit 5mL Puffer A (4°C) gewaschen. Die Kernproteine wurden durch Schütteln mit 100µL Puffer B 30min bei 4°C extrahiert. Dann wurden die Kernextrakte 10min bei 4°C mit 14000g zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration der Zellkernextrakte wurde mit 2µL nach der Bradford-Methode bestimmt.

3.3.6 Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen

3.3.6.1 Band-Shift- oder Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Prinzip: Freie DNA wandert in einem nativen PAGE schneller wandert als DNA-Protein-Komplexe. Die zu untersuchende Sequenz ist radioaktiv markiert und wird mit Proteinextrakt inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden auf einem Polyacrylamidgel unter Bedingungen analysiert, bei denen gebundenes Protein an dem DNA-Fragment verbleibt. Ein proteingebundenes Fragment wandert langsamer als ein freies Fragment und erscheint als eine nach oben verschobene (Shift) DNA-Bande. Zur Identifizierung der gebundenen Proteine können zusätzlich Antikörper in die Bindungsreaktion eingesetzt werden. Erkennen diese ein DNA-bindendes Protein, wird der entstehende Komplex noch größer und dadurch noch stärker retardiert als das proteingebundene Fragment allein (Supershift). Die Bindungsspezifität lässt sich durch Kompetitionsexperimente nachweisen. Dabei werden nicht markierte Kompetitoren eingesetzt. Ein unspezifischer Kompetitor (Oligonukleotid mit nicht verwandter Sequenz) ist bei einer spezifischen Bindung auch im großen molaren Überschuss nicht in der Lage, die retardierte Bande zu verdrängen, während es ein spezifischer Kompetitor vermag. Die Kompetitormenge, die zur Verhinderung des Komplexes nötig ist, ist ein Maß für die Affinität der Bindung.

Durchführung: 3µg Zellkernextrakt (siehe 3.3.5) oder 3µL *in vitro* translatiertes Protein (siehe 3.3.2.6), 1µL 10xBand-Shift-Puffer und 1µL radioaktiv markierte Oligonukleotide (siehe 3.3.2.7) wurden in einem 10µL Ansatz 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Wettbewerbsversuchen wurden die Oligonukleotide im 100fachen Überschuss dazugegeben. Bei Supershift-Experimenten wurden die 2µg Antikörper 30 bis 60min vorinkubiert. Die Reaktionsansätze wurden über ein 3 oder 5%iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch bei 200V über 2h bei 4°C in 0.5x TBE getrennt. Das Gel wurde anschließend auf einem Gelrockner unter Vakuum bei 60°C getrocknet und die DNA-Banden durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm (KODAK XAR 5) detektiert.

3.3.6.2 Shift-Western

Prinzip: Beim Shift-Western bildet sich wie beim EMSA ein Protein-DNA Komplex. Um das Protein des Komplexes zu detektieren, wird das Gel auf Nitrocellulose-Membran geblottet und dann mit Hilfe von spezifischen Antikörper detektiert.

Durchführung: Die Durchführung gleicht der EMSA-Methode (3.3.6.1). Auf der Hälfte des 5%igen Polyacrylamidgels wurden Reaktionsansätze aufgetragen, die radioaktiv markierte Oligonukleotide enthielten, um die gebildeten Komplexe zu detektieren. Bei der anderen Hälfte wurden die gleichen Ansätze mit nicht markierten Oligonukleotiden aufgetragen. Dieser Teil des Gels wurde nach der Elektrophorese in der semi-dry Blotapparatur auf Nitrocellulose mit Shift-Western-Blot-Puffer 2 h bei 150mA geblottet und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern untersucht (siehe 3.3.4.5).

3.4 EDV-Unterstützung und Statistik

Zur DNA-Sequenzanalyse wurde das Computerprogramm GeneWorks (IntelliGenetics, Version 2.45) verwendet.

Die Suche nach putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen der Promotoren erfolgte mit TFSEARCH 1.3 durch den Vergleich mit der TRANSFAC MATRIX Database Rel. 3.3., <http://transfac.gpf.de/TRANSFAC>.

Die Auswertung der Röntgenfilme bei den Western-Blots Versuchen wurde mit dem CAMAC TLC Scanner II unter Verwendung der TLG Software CatsVersion 3.15 vorgenommen.

Die Auswertung und Darstellung der Daten der transienten Transfektionen erfolgte mit der Software Microsoft Excel 97. Bei den Ergebnissen sind jeweils die Mittelwerte, sowie die Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) dargestellt. Mit Hilfe des Student's t-test für unabhängige Stichproben wurden die Signifikanzen zweier Gruppen überprüft. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. Als Vortest wurde der F-Test durchgeführt um zu überprüfen, ob die Stichproben normalverteilten Grundgesamtheiten entstammen.

4 Ergebnisse

4.1 Drei multiple mGPDH-Promotoren der Ratte

Das mGPDH-Gen umfaßt 100kb und enthält 17 Exons. Es besitzt drei verschiedene erste Exons (Exon 1a, 1b und 1c) (Gong et al. 1998), woraus drei multiple Promotoren resultieren (siehe Einleitung 1.3.2). In der Arbeitsgruppe konnten die mGPDH-Promotoren der Ratte sowie ihre entsprechenden ersten Exons identifiziert und kloniert werden. Mittels der RT-PCR mit Exon-spezifischen Primern und mRNA von verschiedenen Rattengeweben wurde eine gewebsspezifische Verteilung der ersten Exons festgestellt. Exon 1a wurde nur im Pankreas, Gehirn und im Braunem Fettgewebe exprimiert. Exon 1b hingegen war ubiquitär in allen untersuchten Geweben zu finden, während Exon 1c ausschließlich im Hoden detektierbar war. Dies bedeutet, dass Promotor A im Pankreas, Gehirn und Braunem Fettgewebe, Promotor B ubiquitär und Promotor C einzig im Hoden aktiv ist. Die drei alternativen Promotoren A, B, C gewährleisteten eine gewebsspezifische Expression. Die Aktivität und Regulation der einzelnen Promotoren sollte in dieser Arbeit detailliert untersucht werden.

4.2 Aktivität der mGPDH-Promotoren in HepG2-, HEK293- und RatI-Zellen

Die Funktionalität der Promotorregionen sollte durch Transfektionsexperimente untersucht werden. Dafür wurden die direkt vor den drei verschiedenen 1. Exons (1a, 1b, 1c) stromaufwärts befindlichen Bereiche vor das Luciferase Reportergen in pGL2-Basic kloniert (Promotor A (-909/+26), Promotor B (-316/+109), Promotor C (-757/+55)). Die Expressionsaktivität dieses Reportergens lässt sich durch Messung der relativen Luciferaseaktivität detektieren. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein Expressionsplasmid für die β -Galaktosidase (pCH110) cotransfiziert. Die β -Galaktosidaseaktivität diente als interner Normierungsstandard. Die Promotorkonstrukte wurden mit Hilfe der Liposomen-Methode in permanente Zelllinien transient transfiziert, und diese nach 24h lysiert und die Luciferase- sowie die Galaktosidaseaktivität mittels Luminiszenzmessung bestimmt. Die Aktivität der drei Promotoren A, B und C wurde in drei unterschiedlichen permanenten Zellsystemen untersucht: in Rattenfibroblasten (RatI), humanen Hepatomazellen (HepG2) und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293).

Um die Aktivitäten der verschiedenen, unabhängigen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde als Bezugspunkt das Reportergenplasmid pGL2-Promotor (=1 gesetzt) verwendet, das zusätzlich zu dem pGL2-Basic-Plasmid eine SV40 Promotorregion enthält.

Das pGL2-Basic (Leervektor) erwies sich als Bezugspunkt für ungeeignet, da seine geringe Luciferaseaktivität außerhalb des linearen Messbereiches lag, in dem die gemessenen relativen Lichteinheiten proportional zur Promotoraktivität sind. Die in Abbildung 7 angegebenen Aktivitäten sind relative Werte, bezogen auf den pGL2-Promotor. Promotor B zeigte in allen drei untersuchten Zellsystemen die höchsten Aktivitäten: in HepG2-Zellen war eine 3.8fache-, in HEK293-Zellen eine 4.4fache- und in RatI-Zellen 2.8fache-Erhöhung gegenüber pGL2-Promotor zu detektieren. Dagegen zeigten die Promotoren A und C in allen drei Zelllinien keine signifikant höheren Aktivitäten als das promotorlose Reportergen pGL2-Basic.

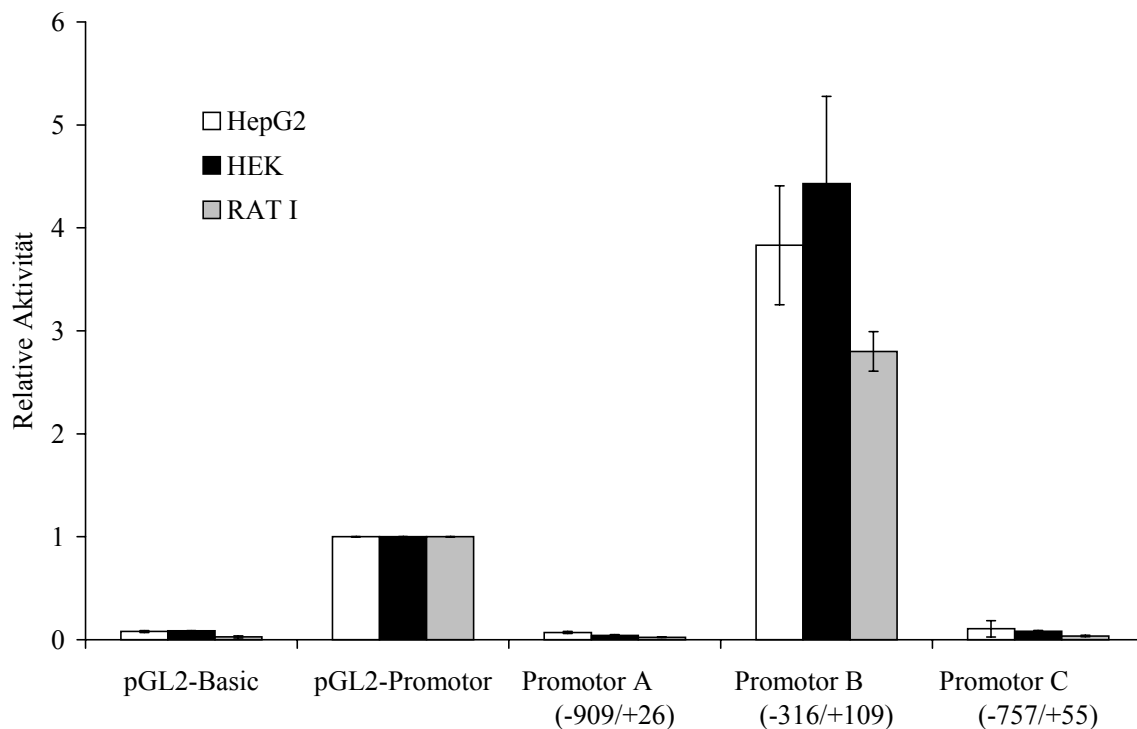


Abb. 7: Funktionsanalyse der mGPDH Promotoren durch transiente Transfektion
Aktivität der mGPDH-Promotoren A, B und C in HepG2-, HEK293- und RatI-Zellen. Der promotorlose pGL2-Basic Vektor wurde als Kontrolle verwendet. Das cotransfizierte β -Galaktosidase Reportergen diente als interner Standard zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Um die Ergebnisse mehrerer Experimente zusammenführen zu können, wurden die Werte auf den pGL2-Promotor normiert. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen.

4.3 Aktivitätsanalyse des mGPDH Promotors B

4.3.1 Aktivität der Deletionskonstrukte in HepG2- und RatI-Zellen

Um die für die Aktivität von Promotor B wichtige regulatorische Sequenzen identifizieren zu können, mussten Deletionskonstrukte hergestellt werden, die in Abbildung 8 graphisch dargestellt sind. Hierbei diente als Ausgangskonstrukt das längste Fragment (1408bp), welches stromaufwärts direkt vor Exon 1b liegt und somit aus Promotor A und B besteht, da diese nur durch ca. 460bp getrennt sind (Vgl. Einleitung 1.3.2). Die Positionsangaben der Konstrukte beziehen sich auf den Transkriptionsstart von Exon 1b, der als +1 gesetzt wurde. Das 1408bp große Promotorfragment (PF1) wurde schrittweise am 5'Ende um jeweils 200-350bp gekürzt. Dabei entstanden sechs Deletionskonstrukte, die wiederum in das pGL2-Basic-Plasmid kloniert wurden, um die Aktivitäten der einzelnen Fragmente untersuchen zu können.

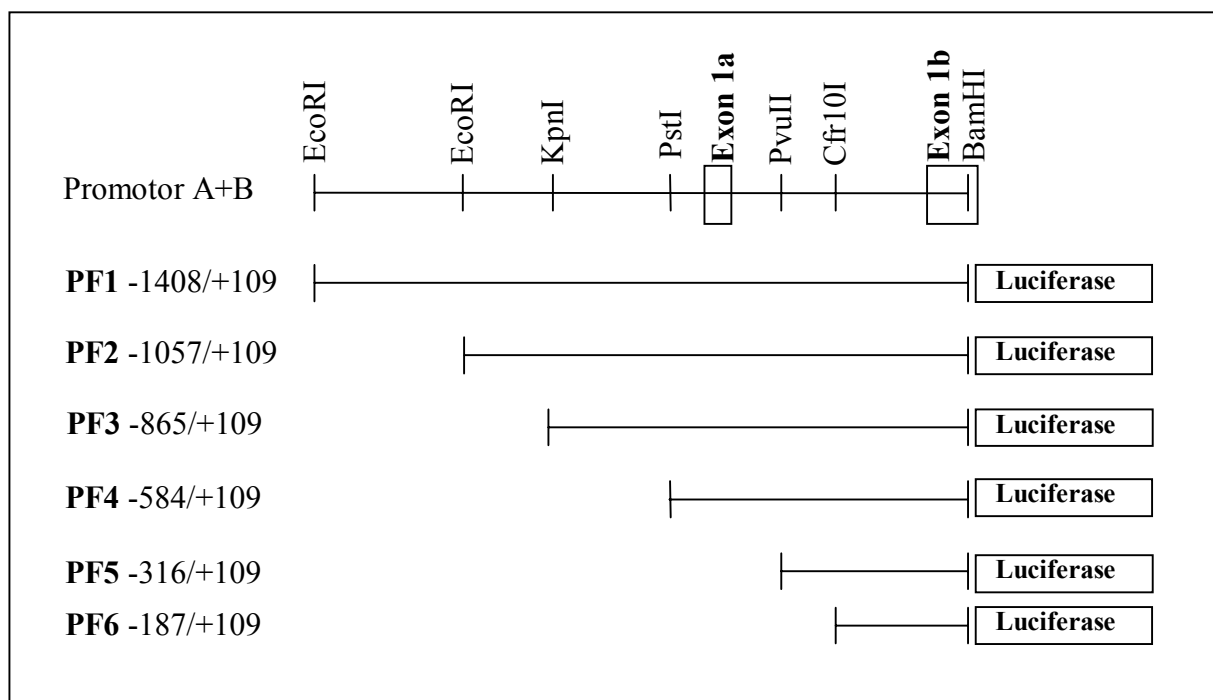


Abb. 8: Deletionskonstrukte

Die Promotorfragmente (PF1-PF6) sind durch Restriktionsverdau an den angegebenen Restriktionsschnittstellen entstanden und wurden stromaufwärts vor das Luciferase-Reporterplasmid pGL2-Basic kloniert worden. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Transkriptionsstart (+1) von Exon 1b.

Die 5'-Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe der Liposomenmethode in RatI- und HepG2-Zellen transient transfiziert und nach 24h in den Lysaten die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Versuche wurden auf das längste Fragment PF1 normiert (=1) und sind in Abbildung 9 dargestellt. Vom Fragment PF1 ausgehend, stieg nach Deletion von 353bp am 5'-Ende (=PF2) die Aktivität in HepG2-Zellen und RatI-Zellen um das 2.1 bzw. 2.8fache an. Bei einer weiteren Entfernung von 192bp (=PF3) ist die Aktivität in HepG2-Zellen 1.5fach und bei RatI-Zellen 1.8fach höher als bei PF1. Nach der Deletion von weiteren 281bp entstand PF 4. In beiden Zellsystemen hatte PF4 die größte Aktivität mit einem 3.8fachen Anstieg in HepG2-Zellen und einem 2.9fachen Anstieg in RatI-Zellen gegenüber dem längsten Fragment PF1. Durch weitere Deletion von 267bp (PF5) wurde das Exon 1a entfernt und die Aktivität lag in HepG2-Zellen 3.1fach höher als bei PF1, während in RatI-Zellen die Aktivität fast auf den Ausgangswert von PF1 absank (1.3fach). Mit der zusätzlichen Entfernung von 129bp (PF6) verminderte sich die Aktivität auf das 1.2fache in HepG2-Zellen und das 0.3fache in RatI-Zellen bezogen auf PF1.

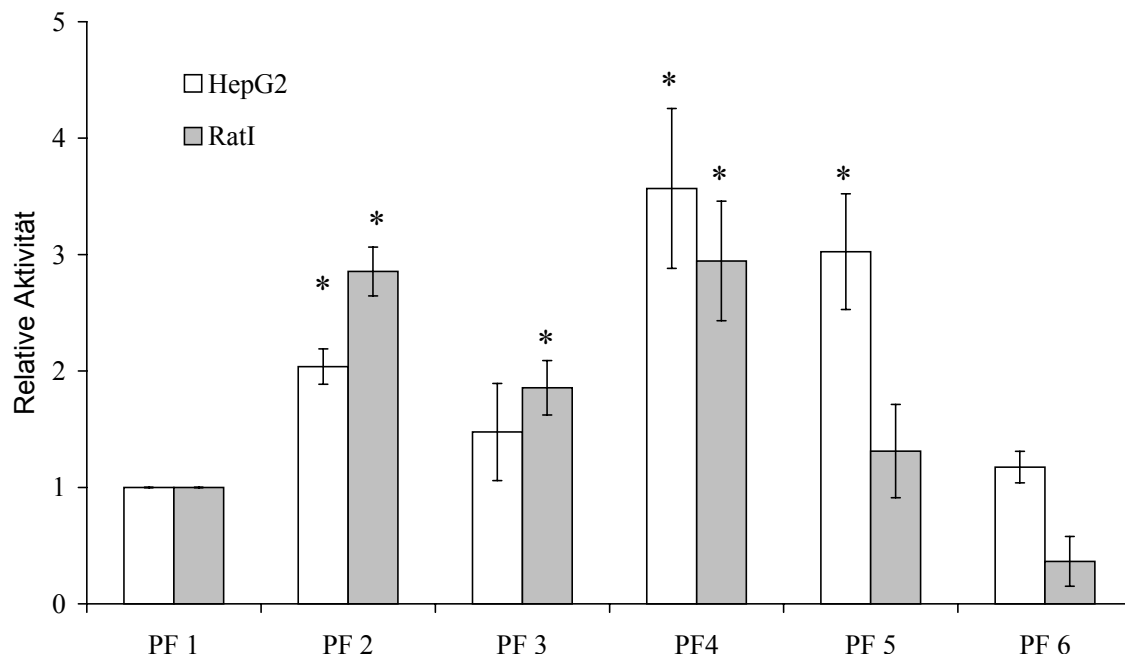


Abb. 9: Deletionsanalyse von Promotor B durch transiente Transfektion

Relative Aktivitäten der 5'-Deletionsprodukte von Promotor B in HepG2- und RatI-Zellen. Die Werte sind auf das längste Promotorfragment PF1 (=1) normiert. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen (* $p \leq 0.05$ bezogen auf PF1).

4.3.2 Analyse der SP1-Bindungsstellen

4.3.2.1 Aktivität der SP1-Mutanten in HepG2- und HEK293-Zellen

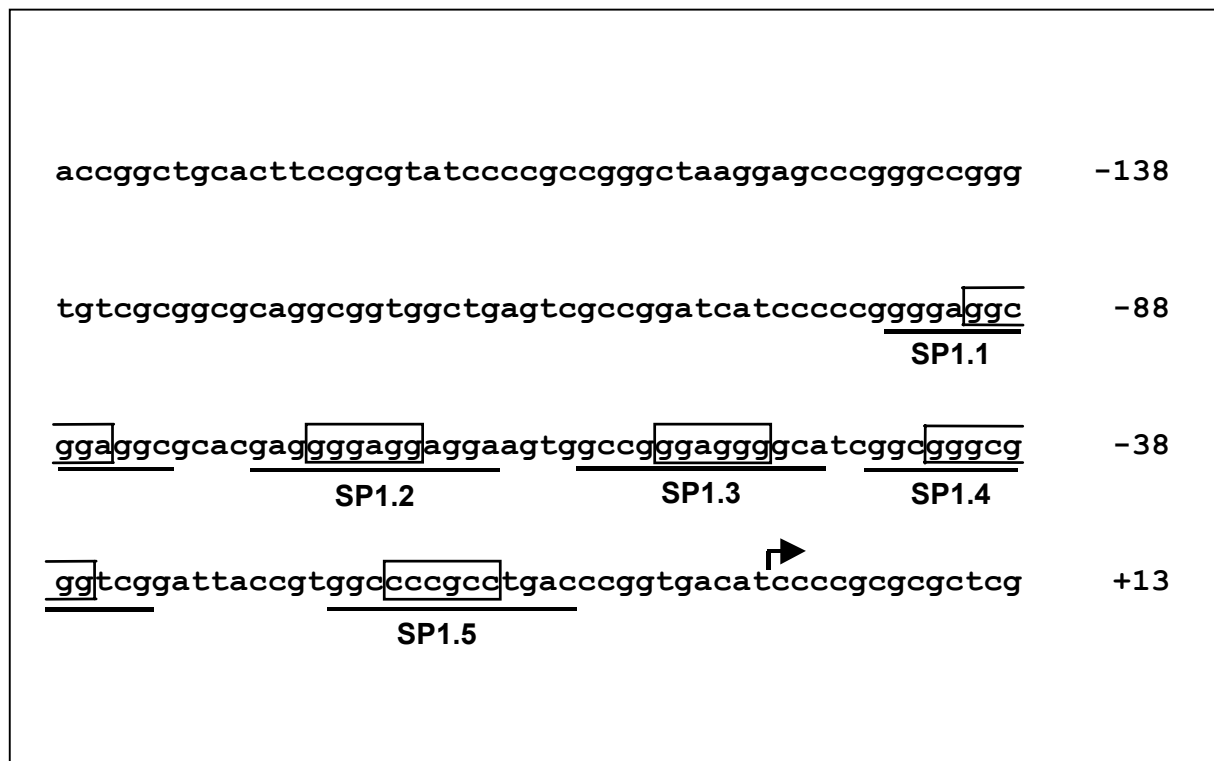


Abb. 10: Nukleotidsequenz von Promotor B mit putativen SP1-Bindungsstellen

Der Transkriptionsstart (+1) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die putativen SP1-Bindungsstellen sind unterstrichen und die mutierten Abschnitte umrandet. Die Abschnitte wurden durch eine EcoR I-Schnittstelle (GAATTC) ersetzt.

Der Promotor B enthält keine TATA- oder CAAT-Box und ist besonders GC-reich. Da die basale Promotoraktivität gut im kürzesten Fragment (-187/+109) konserviert war (Vgl. Punkt 4.3.1.) wurde dieser Bereich auf Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen mit der TRANSFAC MATRIX Datenbank untersucht. Bei dieser Analyse wurden fünf putative SP1-Bindungsstellen lokalisiert, die in der Abbildung 10 dargestellt und als SP1.1 (-94/-82), SP1.2 (-77/-65), SP1.3 (-60/-48), SP1.4 (-45/-33) und SP1.5 (-23/-11) bezeichnet sind. Die SP1-Konsensussequenz ist 5'-GGGCGG-3'. Um nun die Bedeutung dieser fünf putativen SP1-Bindungsstellen zu analysieren, wurde jeweils der wichtigste Sequenzabschnitt jeder Bindungsstelle mit Hilfe der *in vitro* Mutation (siehe 3.3.2.4) in eine EcoR I-Schnittstelle (5'-GAATTC-3') umgewandelt. Diese mutierten Abschnitte sind in Abbildung 10 umrandet dargestellt. Die SP1-Mutanten wurden in das pGL2-Basic-Plasmid kloniert und wie oben beschrieben durch transiente Transfektionen in HEK293- und HepG2-Zellen untersucht. Um die Bedeutung der einzelnen SP1-Bindungsstellen für die basale Aktivität von Promotor B

beurteilen zu können, wurden die basalen Aktivitäten der mutierten Promotoren mit der des Wildtyppromotors verglichen. Die Ergebnisse der Transfektionsversuchen sind in Abbildung 11 aufgeführt. Bei dem SP1.1-mutierten Plasmid (SP1.1-Mut) war die Aktivität drastisch vermindert. Sie fiel in HepG2- und HEK293-Zellen auf ein Viertel im Vergleich zur basalen Aktivität des Wildtyppromotors. Eine ähnliche Verminderung der basalen Aktivität war bei dem Plasmid mit der SP1.5-mutierten Sequenz (SP1.5-Mut) in HepG2- und HEK293-Zellen zu beobachten. Im Gegensatz dazu veränderte sich die basale Aktivität in den Konstrukten mit SP1.2-, SP1.3- oder SP1.4-mutierten Bindungsstellen (SP1.2-Mut, SP1.3-Mut, SP1.4-Mut) nicht signifikant gegenüber der basalen Aktivität des Wildtyps in beiden Zelltypen. Die SP1.1- und SP1.5-Bindungsstelle scheinen somit besonders wichtig für die basale Aktivität des ubiquitären Promotor B zu sein.

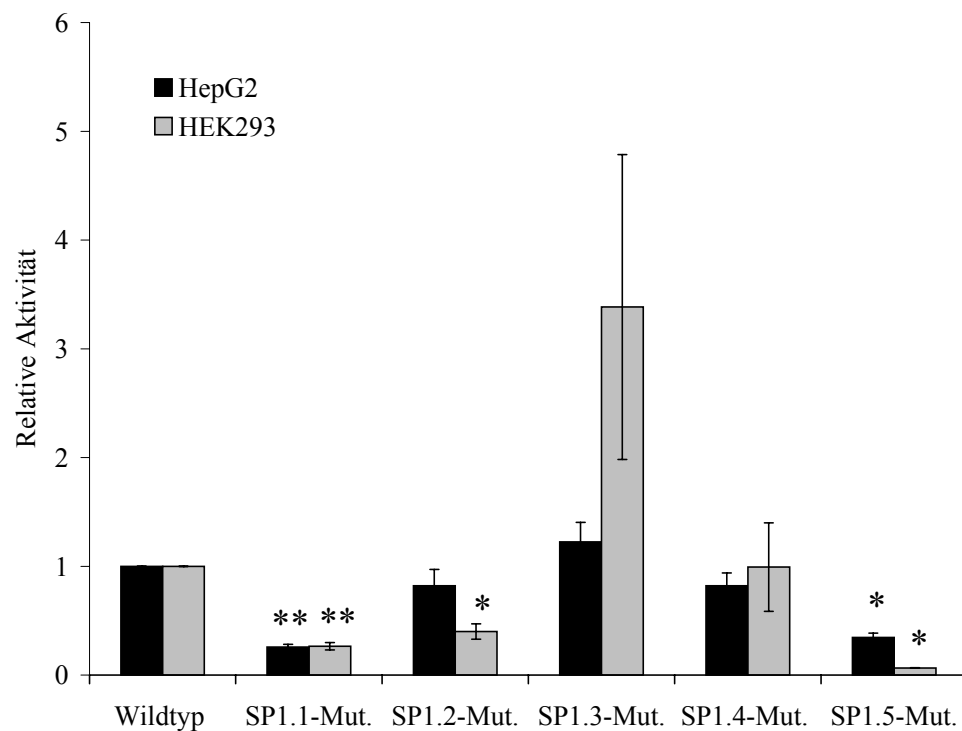


Abb. 11: Mutationsanalyse der SP1-Elemente von Promotor B im Bereich von –187 bis +109 durch transiente Transfektion

Relative Aktivitäten der SP1-Mutanten normiert auf die Aktivität des Wildtyppromotors in HepG2- und HEK293-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte bei HEK293 aus vier und bei HepG2 aus zehn unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen (* $p \leq 0.005$ bezogen auf Wildtyp, ** $p \leq 0.0001$ bezogen auf Wildtyp).

4.3.2.2 Band Shift-Analyse des SP1-Komplexes

Um die identifizierten SP1-Bindungsstellen verifizieren zu können, wurde nun die Band-Shift-Methode (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981) eingesetzt. Dabei wurden synthetische doppelsträngige Oligonukleotide, die der Sequenz von SP1.1.1 (-94/-82) mit seinen flankierenden Bereichen entsprechen (siehe Anhang), radioaktiv markiert und mit Zellkernextrakt von HepG2-Zellen inkubiert. Die Auftrennung des Bindungsgemisches erfolgte elektrophoretisch auf einem nativen Polyacrylamidgel. In Abbildung 12 sind die Bindungsansätze nach Elektrophorese und Autoradiographie dargestellt.

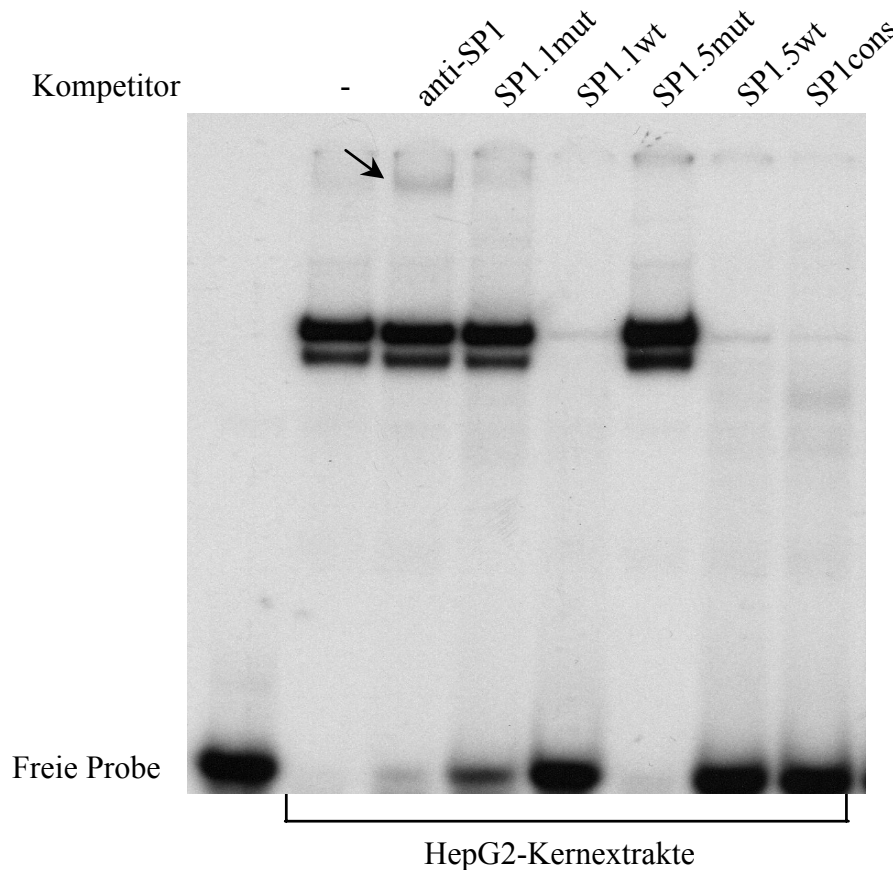


Abb. 12: Band-Shift-Analyse des SP1-Komplexes in Promotor B

10 fmol ^{32}P -markierte SP1.1 Sequenz wurde mit $1\mu\text{g}$ Kernextrakt von HepG2-Zellen 30min inkubiert und der Protein-DNA-Komplex elektrophoretisch auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für den Supershift (Pfeil) wurde $2\mu\text{l}$ SP1-spezifischer Antikörper zugesetzt. Die Kompetitionsversuche wurden mit einem 100fachen molaren Überschuss von unmarkierten spezifischen (SP1cons, SP1.1wt oder SP1.5wt) und unspezifischen (SP1.1mut oder SP1.5mut) Kompetitoren durchgeführt.

Es kam zu einer Bindung von Kernprotein an die SP1.1-Sequenz, was sich als eine retardierte Bande darstellt. Um das am Komplex gebundene Protein zu identifizieren wurde ein spezifischer Antikörper gegen SP1 dazugegeben, was zu einem Supershift führte (in Abb.12 mit Pfeil gekennzeichnet). Dies belegt, dass SP1-Protein an diesem Komplex beteiligt ist. Die Spezifität der Bindung ließ sich durch Konkurrenzexperimente nachweisen. Denn die Komplexbildung zwischen SP1-Protein und markierter SP1.1-DNA-Sequenz wurde durch einen 100fachen molaren Überschuss von unmarkierter SP1.1-Konsensussequenz (SP1cons), unmarkierter SP1.1-DNA-Sequenz (SP1.1wt) oder unmarkierter SP1.5-DNA-Sequenz (SP1.5wt) verhindert. Im Gegensatz dazu aber führte ein 100facher molarer Überschuss von unmarkierter mutierter SP1.1-DNA-Sequenz (SP1.1mut) oder unmarkierter mutierter SP1.5-DNA-Sequenz (SP1.5mut) zu keiner Verdrängung des Komplexes. Da auch SP1.5wt in der Lage ist den SP1.1-DNA/SP1-Protein-Komplex zu verdrängen, lässt sich schließen, dass die putative SP1.5-Bindungsstelle den Transkriptionsfaktor SP1 bindet. Resultierend lässt sich die Aussage treffen, dass die SP1.1- und SP1.5-Bindungsstelle den ubiquitären SP1-Transkriptionsfaktor binden.

4.4 Hormonelle Regulation der mGPDH-Promotoren

Als zentrale Schlüsselstelle des Energiestoffwechsels ist die mGPDH hormonell reguliert. Die hormonelle Regulation der drei multiplen mGPDH-Promotoren wurde daher näher untersucht, besonders der Einfluss von Mitgliedern der Steroidrezeptor-Superfamilie und deren Liganden.

4.4.1 Regulation durch Schilddrüsenhormone

Dass Schilddrüsenhormone (T3) die Regulation von mGPDH beeinflussen, ist durch viele Arbeiten eindeutig belegt (siehe 1.3.3.1). Um den Mechanismus der T3-Regulation auf mGPDH näher zu analysieren, sollte in dieser Arbeit die Induzierbarkeit der verschiedenen mGPDH-Promotorkonstrukte durch T3 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden neben den Promotorkonstrukten Plasmide cotransfiziert, welche den Schilddrüsenhormonrezeptor α_1 (TR α) bzw. den Retinoid-X-Rezeptor β (RXR β) tragen. Diese Cotransfektion war notwendig, weil viele permanente Zelllinien endogen keine funktionellen nukleären Rezeptoren besitzen. Der RXR ist der bevorzugte Dimersierungspartner für TR α (Vgl. 1.1.1). Für die Transfektionsexperimente wurden vier parallele Ansätze zur Bestimmung des Einflusses von T3 auf die Promotoraktivität durchgeführt:

1. zur Messung der basalen Aktivität der Promotoren
2. zur Messung des T3-Einflusses ohne Cotransfektion von Kernrezeptoren
3. zur Bestimmung des Einflusses der Cotransfektion von Kernrezeptoren
4. zur Detektion des T3-Effektes bei gleichzeitiger Cotransfektion von Kernrezeptoren

Die Stimulation erfolgte durch einmalige Gabe von 100nM T3. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Promotoren A und C zeigten keine signifikanten Aktivitätsänderungen durch T3, auch nicht bei gleichzeitiger Cotransfektion von TR α /RXR β . Beim Promotor B war allein durch eine T3-Applikation keine Änderung der Aktivität detektierbar. Eine Cotransfektion von TR α und RXR β hingegen bewirkte eine signifikante Aktivitätsminderung von Promotor B auf das 0.7fache, bezogen auf seine basale Aktivität. Nur bei gleichzeitiger Cotransfektion und Applikation von T3 stieg die Aktivität des Promotors B signifikant um das ~3fache an gegenüber der Promotoraktivität mit Cotransfektion ohne Stimulation.

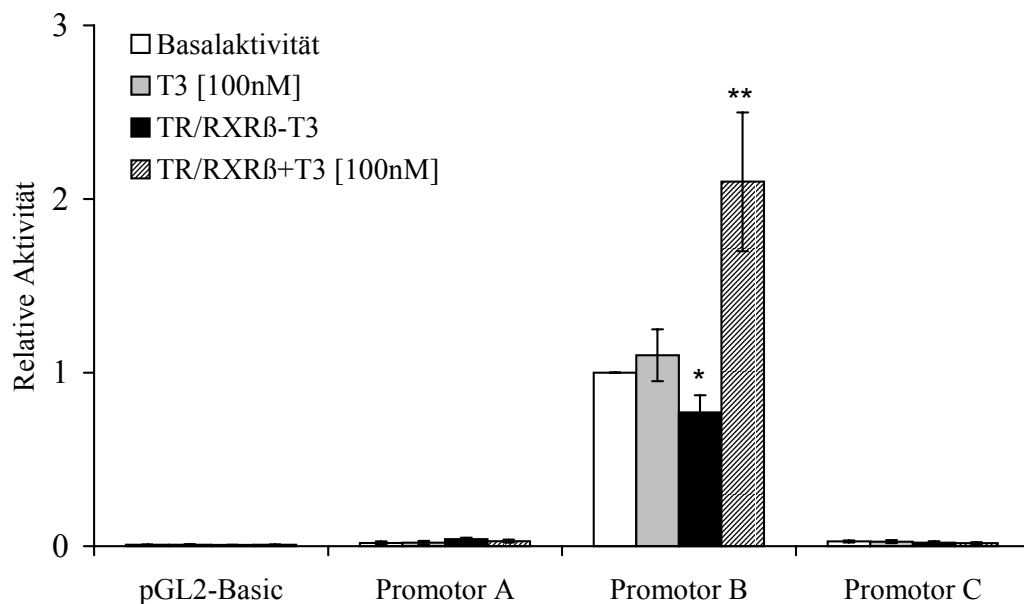


Abb. 13: Regulation der mGPDH-Promotoren A, B und C durch T3

Relative Aktivitäten der drei Promotoren unter dem Einfluss von 100nM T3 in HepG2-Zellen. Die basalen Promotoraktivitäten sind weiß und unter T3-Stimulation grau dargestellt. Die Promotoraktivitäten mit Cotransfektion von TR α /RXR β sind schwarz, mit Cotransfektion und Stimulation gestreift dargestellt. Die Aktivitäten sind normiert auf die basale Aktivität von Promotor B. Der promotorlose pGL2-Basic Vektor diente als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen (* $p \leq 0.05$ bezogen auf die Basalaktivität; ** $p \leq 0.002$ bezogen auf die Aktivitäten mit Cotransfektion ohne Stimulation).

Die Daten zeigen somit, dass einzig der ubiquitäre mGPDH-Promotor B durch Schilddrüsenhormone reguliert wird und diese Regulation von den Kernrezeptoren abhängig ist.

Da T3 in den Vorversuchen bei allen sechs Deletionskonstrukten von Promotor B eine ähnliche Aktivitätssteigerung bewirkte (nicht gezeigt), wurde bei weiteren Stimulationsversuchen mit T3 mit dem kürzesten Deletionskonstrukt PF6 gearbeitet.

Nun sollte in einem weiteren Schritt der Einfluss der drei verschiedenen Isoformen des Retinoid-X-Rezeptors auf die Aktivitätssteigerung durch T3 beim ubiquitären Promotor B untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Isoformen von RXR mit dem Schilddrüsenhormonrezeptor cotransfiziert. In Abbildung 14 sind die Aktivitäten normiert auf die basale Aktivität von PF6 dargestellt.

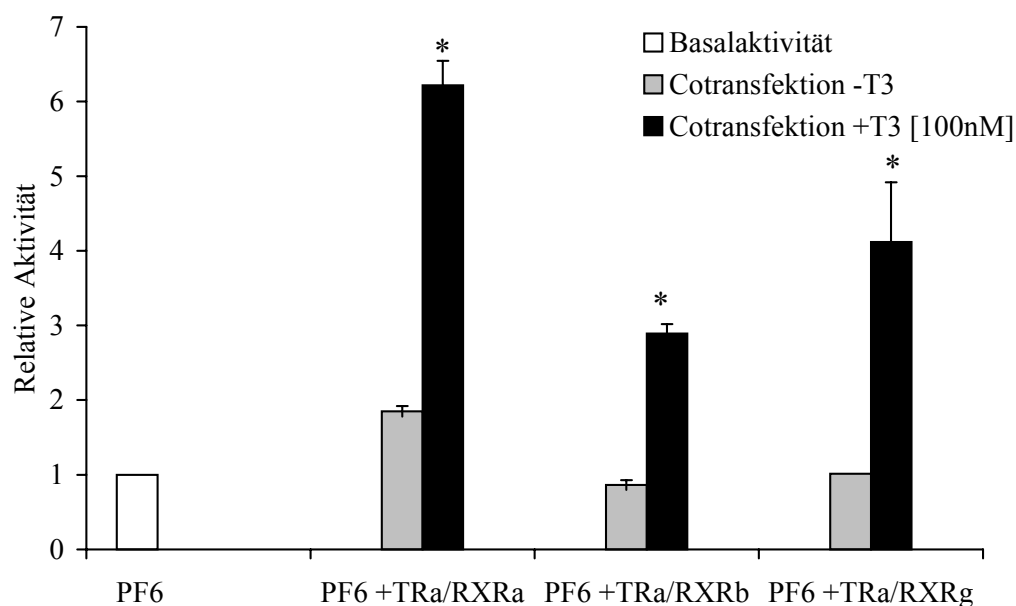


Abb. 14: Einfluss der Rezeptoren auf den T3-Effekt bei Promotorfragment PF6 in transienten Transfektionen

Relative Aktivitäten von PF6 unter Einfluss von 100nM T3 in HepG2-Zellen. Die basale Promotoraktivität ist weiß dargestellt. Die Promotoraktivitäten mit Cotransfektionen von TR/RXRrs sind grau und bei gleichzeitiger Stimulation mit T3 schwarz dargestellt. Die Aktivitäten sind normiert auf die basale Aktivität von PF6. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen (* $p \leq 0.002$ bezogen auf die nicht stimulierte cotransfizierte Gruppe).

Die Cotransfektion von RXR α /TR α bewirkte eine geringfügige Erhöhung um das ~1.9fache ($p \geq 0.05$) bezogen auf die basale Aktivität. Eine Cotransfektion von RXR β /TR α bewirkte hingegen eine signifikante Minderung der Aktivität, wie bereits in Abbildung 13 zu sehen. Während bei der Cotransfektion von RXR γ /TR α wiederum keine Aktivitätsänderung bezogen auf die basale Aktivität zu detektieren war. Die Isoformen der Retinoid-X-Rezeptoren beeinflussen also unterschiedlich die basale Aktivität von PF6. Jedoch war bei allen eine ähnliche Aktivitätssteigerung gegenüber der nicht stimulierten cotransfizierten Gruppe durch T3 auf das 3-4fache zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Steigerung der Promotoraktivität durch T3 unabhängig von der jeweiligen Isoform des Retinoid-X-Rezeptors ist.

4.4.2 Regulation durch Clofibrat

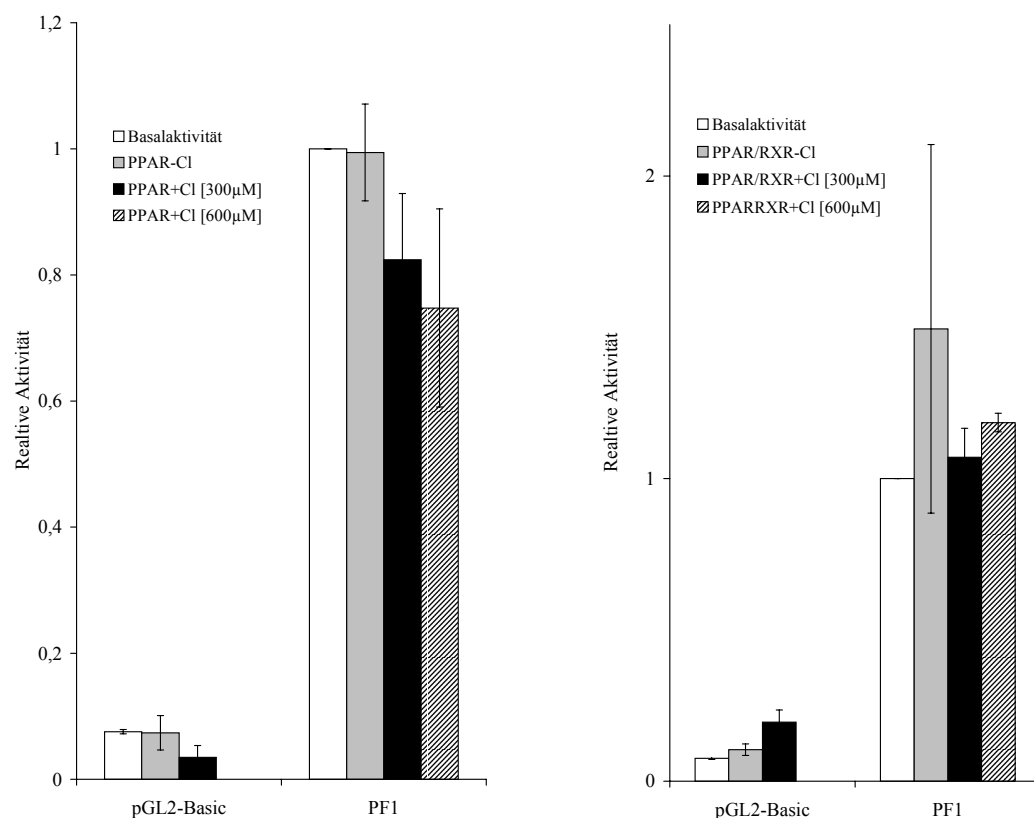


Abb. 15: Regulation des Promotorfragment PF1 durch Clofibrat

Relative Aktivitäten von PF1 unter Einfluss von 300 μ M und 600 μ M Clofibrat in HepG2-Zellen. Die basalen Promotoraktivitäten sind weiß und mit Cotransfektion von PPAR α bzw. PPAR α und RXR β sind grau dargestellt. Die Promotoraktivitäten mit Cotransfektion und Stimulation durch 300 μ M Clofibrat sind schwarz und durch 600 μ M Clofibrat gestreift gekennzeichnet. Die Aktivitäten sind normiert auf die basale Aktivität von PF1. Der promotorlose pGL2-Basic Vektor diente als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen.

Arbeiten von Shoemaker et al. (1991) zeigten Erhöhungen der mGPDH-Enzymaktivität nach Zugabe des Peroxisomenproliferators Clofibrat. Aufgrund dieser Befunde sollte nun die Regulation der mGPDH-Promotoren durch Clofibrat untersucht werden. Da in Vorversuchen keine Beeinflussung auf die mGPDH-Promotoren A, B, und C beobachtet werden konnte, wurde hier die Regulation mit unterschiedlichen Bedingungen getestet. Die Versuche wurden zum einen mit der alleinigen Cotransfektion von PPAR α und zum anderen mit der gleichzeitigen Cotransfektion von PPAR α und RXR β durchgeführt, dabei wurde jeweils mit 300 und 600 μ M Clofibrat stimuliert (Abb. 15). Die Cotransfektion von PPAR α bewirkte hierbei keine Aktivitätsänderung, während die gleichzeitige Cotransfektion von PPAR α und RXR β eine Erhöhung (nicht signifikant, $p \geq 0,05$) der Aktivität bewirkte.

Durch die Stimulation mit Clofibrat (300 und 600 μ M) war jeweils eine nicht signifikante Erniedrigung ($p \geq 0,05$) der Promotoraktivität zu detektieren, die sich auf die nicht stimulierte cotransfizierte Gruppe bezieht. Aus diesen durchgeführten Versuchsbedingungen ist ersichtlich geworden, dass Promotor B nicht durch Clofibrat reguliert wird.

4.4.3 Regulation durch all-trans Retinsäure

Mit Hilfe der transienten Transfektion wurde der Einfluss von 1 oder 2 μ M all-trans-Retinsäure (RA) auf die drei verschiedenen mGPDH-Promotoren A, B, C in HepG2-Zellen untersucht. Für diese Untersuchung wurden drei parallele Ansätze durchgeführt:

1. zur Messung der basalen Aktivität der Promotoren
2. zur Bestimmung des Einflusses der Cotransfektion von Kernrezeptoren
3. zur Detektion des RA-Effektes bei gleichzeitiger Cotransfektion von Kernrezeptoren

Bei diesen Versuchen wurde ein Plasmid für den Retinsäurerezeptor α (RAR α) und ein Retinoid-X-Rezeptor-Mix aus den Plasmiden für die drei Isoformen RXR α , β und γ cotransfiziert. Das promotorlose Reporter-gen pGL2-Basic diente wieder als Negativkontrolle. Um zu überprüfen, ob die Versuchsdurchführung zur Detektierung von Effekten durch RA geeignet ist, diente als Positivkontrolle der humane 5'-Deiodinase-Promotor. Die Aktivitätssteigerung des humanen 5'-Deiodinase-Promotors durch all-trans-Retinsäure ist in der Literatur belegt (Jakob et al., 1997). Die 5'-Deiodinase zeigte bei den einzelnen Versuchen durch all-trans-Retinsäure jeweils eine signifikante Aktivitätserhöhung ($p \leq 0,01$) um das 2.3fache gegenüber ihrer nicht stimulierten cotransfizierten Gruppe (Daten nicht gezeigt) und belegt damit die Funktionsfähigkeit der Versuchsanordnung. Als Besonderheit

bei diesen Experimenten war es notwendig einen anderen Normierungsfaktor zu wählen, weil das üblicherweise verwendete Expressionsplasmid für β -Galaktosidase durch RA reguliert wird. Diese Versuche wurden deshalb auf Gesamtprotein der Lysate normiert, welches durch die Bradford-Methode bestimmt wurde. Bei diesen Experimenten kam es zwischen den einzelnen unabhängigen Versuchen ($n=4$, mit jeweils 3 Zellkulturschalen) zu großen Schwankungen der Ergebnisse, was ein Zusammenfassen der einzelnen Versuche nicht zuließ. Doch alle Versuche zeigten, dass all-trans-Retinsäure bei den drei Promotoren der mGPDH keine Aktivitätssteigerung bewirkt. Ein repräsentativer Versuch ist in Abbildung 16 dargestellt. Ganz im Gegenteil, es war eher eine Minderung der Promotoraktivität B durch all-trans-Retinsäure um den Faktor ~ 0.7 zu verzeichnen. Jedoch war der Effekt bei den einzelnen Versuchen nicht signifikant ($p \geq 0.05$).

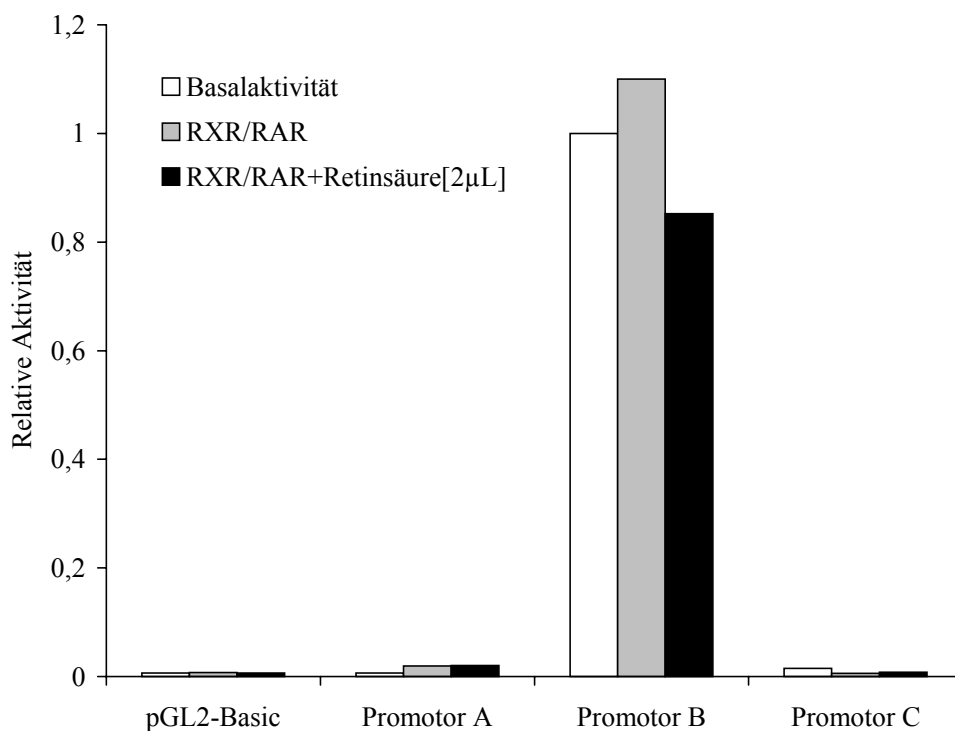


Abb. 16: Regulation der mGPDH Promotoren A, B und C durch all-trans Retinsäure

Relative Aktivitäten der drei Promotoren unter Einfluss von $2\mu\text{M}$ all-trans Retinsäure in HepG2-Zellen. Die basalen Promotoraktivitäten sind weiß. Die Promotoraktivitäten mit Cotransfektionen von RAR/RXRs sind grau und bei gleichzeitiger Stimulation mit RA schwarz dargestellt. Die Aktivitäten sind normiert auf die basale Aktivität von Promotor B. Der promotorlose pGL2-Basic Vektor diente als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte aus einem repräsentativen Versuch von 4 Experimenten mit jeweils drei Zellkulturschalen.

4.4.4 Regulation durch Estradiol

Im Folgenden sollte nun der Einfluss von einem weiteren Mitglied der Steroidrezeptor-Superfamilie auf die multiplen mGPDH Promotoren A, B, C untersucht werden. Die Regulation der mGPDH-Genexpression durch das Steroidhormon Estradiol wurde durch transiente Transfektion in HepG2-Zellen mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode analysiert. Für diese Versuche mussten die Zellen in einem Medium, welches kein Phenolrot und nur „gestripptes“ Serum (siehe 3.3.1.2) enthielt, kultiviert werden. In den gewöhnlich verwendeten Medien und Seren waren Steroidhormone oder steroidverwandte Stoffe enthalten, die sich bei den Experimenten als störend erwiesen. Für die Versuche wurden die drei mGPDH-Promotoren transfiziert, sowie ein Plasmid für den Estrogenrezeptor α (ER α) cotransfiziert. Als Positivkontrolle wurde der Oxytocinpromotor der Ratte verwendet. Dieser besitzt ein funktionelles ERE (Walther et al., 1999) und sollte gewährleisten, dass die Versuchsanordnung geeignet ist, um Estradioleffekte zu detektieren. Die Positivkontrolle belegte mit einer signifikanten 15fachen Aktivitätssteigerung durch Estradiol bei gleichzeitiger Cotransfektion von ER (nicht dargestellt) die Funktionsfähigkeit der Versuchsbedingungen. Um den Einfluß von Estradiol zu bestimmen, wurden analog zu den Schilddrüsenhormon-Versuchen (siehe 4.4.1) parallel vier Ansätze durchgeführt. Die Aktivitäten sind auf die basale Aktivität des Promotors B normiert und in Abbildung 17 dargestellt. Die Promotoren A und C zeigten keine signifikante Aktivitätssteigerung durch Estradiol, auch nicht bei gleichzeitiger Cotransfektion von ER α . Die Quotienten aus den Werten der Stimulation mit gleichzeitiger Cotransfektion und den Werten der Cotransfektion ergaben bei Promotor A und C eine 1.8fache Erhöhung. Diese Erhöhung war aber jeweils nicht signifikant ($p \geq 0.05$), und die Messwerte der Lumineszenzmessung (RLU) lagen hier immer unterhalb des auswertbaren linearen Messbereiches. Der Promotor B zeigte allein durch die Gabe von Estradiol keine signifikante Änderung der Aktivität. Die Cotransfektion von ER bewirkte eine signifikante Aktivitätsminderung um die Hälfte, bezogen auf die basale Aktivität. Bei gleichzeitiger Cotransfektion und Stimulation steigerte sich die Aktivität des Promotors B signifikant um das ~6fache, bezogen auf die Promotoraktivität mit Cotransfektion ohne Stimulation. Die Ergebnisse demonstrieren damit eine rezeptorabhängige Aktivitätssteigerung des ubiquitären Promotors B durch das Steroidhormon Estradiol.

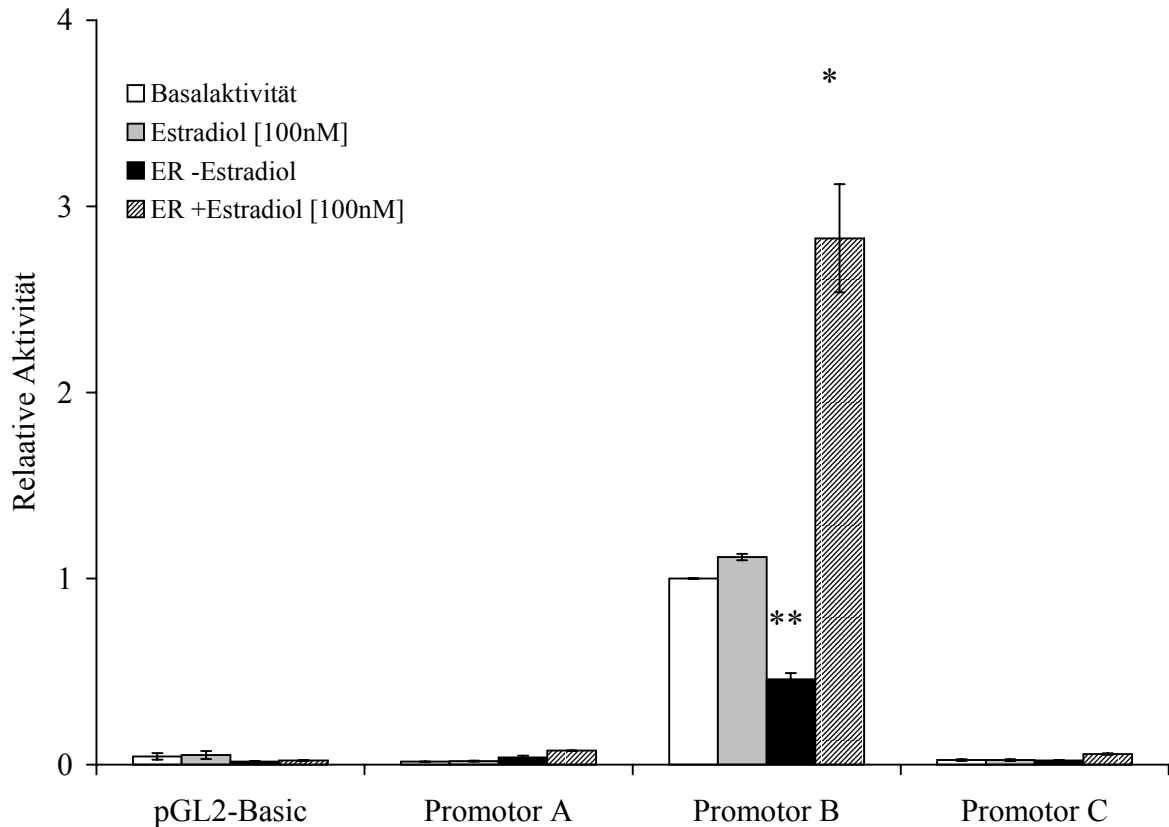


Abb. 17: Regulation der mGPDH Promotoren A, B und C durch Estradiol

Relative Aktivitäten der drei Promotoren unter dem Einfluss von 100nM Estradiol in HepG2-Zellen. Die basalen Promotoraktivitäten sind weiß dargestellt und unter Estradiolstimulation grau. Die Promotoraktivitäten sind unter Cotransfektion von ER schwarz und unter Cotransfektion und Estradiolstimulation gestreift dargestellt. Die Aktivitäten sind normiert auf die basale Aktivität von Promotor B. Der promotorlose pGL2-Basic Vektor diente als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen (* $p \leq 0.01$ bezogen auf die nicht stimulierte cotransfizierte Gruppe; ** $p \leq 0.002$ bezogen auf die Basalaktivität).

4.5 Untersuchung des DR+4+2-Elements

Das Promotorfragment PF6 zeigte wie die anderen 5'-Deletionskonstrukte von Promotor B eine signifikante rezeptorabhängige Aktivitätssteigerung durch Schilddrüsenhormone. Dafür müssen die für die Beeinflussung durch T3 wichtigen regulatorischen Strukturen im kürzesten Fragment (PF6) lokalisiert sein. Es ließen sich drei putative Hormon-responsive Element (HRE)-half-sites durch computerunterstützte Analyse der Promotorsequenz PF6 (-187/+109) detektieren. Die drei half-sites und deren Lokalisation sind in Abbildung 18 gezeigt. Die ersten beiden half-sites sind durch vier Nukleotid-Spacer voneinander getrennt und die dritte

half-site folgt zwei Nukleotid-Spacer später. Diese Form entspricht einem „direct repeat+4+2“ Element (DR+4+2).

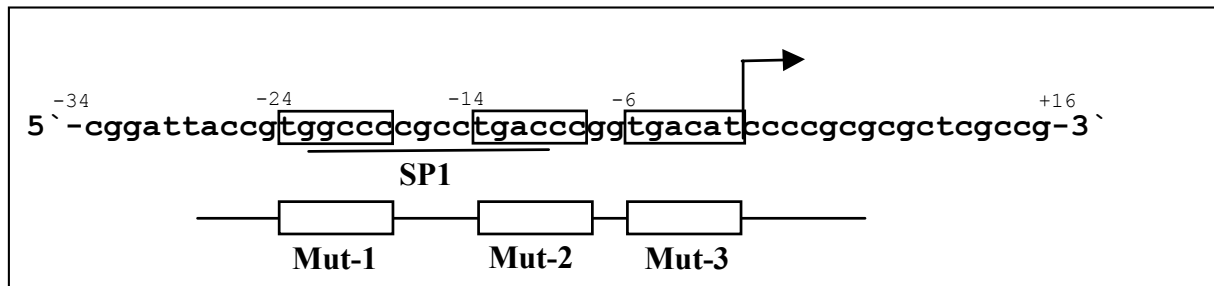


Abb. 18: Die Sequenz und Lokalisation des DR+4+2 Element im Promotor B

Die putativen HRE-half-sites des PF6 sind schwarz umrandet. Jeweils eine half-site wurde durch eine EcoR I-Schnittstelle (GAATC) ersetzt und als Mut-1 bis Mut-3 bezeichnet. Der Transkriptionsstart (+1) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die überlappende SP1-Bindungsstelle ist unterstrichen. Unter der Sequenz ist das DR+4+2-Element nochmals schematisch dargestellt.

4.5.1 Aktivitätsanalyse des DR+4+2-Elements

4.5.1.1 Aktivitätsanalyse des DR+4+2-Elements durch Schilddrüsenhormone

Um die Bedeutung dieses interessanten DR+4+2-Elements bei der Genregulation durch T3 zu untersuchen, wurde jeweils eine der drei half-sites mit Hilfe der *in vitro* Mutation (siehe Punkt 3.3.2.4) in eine EcoR I Schnittstelle (5'-GAATTC-3') umgewandelt (Abb. 18). Für diese Versuche wurden wieder drei parallele Ansätze durchgeführt. Die Aktivitäten sind auf die basale Aktivität des Wildtyps-PF6 normiert und in Abbildung 19 dargestellt. Die Mutation der ersten und zweiten half-site (Mut-1 und Mut-2) bewirkte eine Veränderung der Regulation durch T3 gegenüber dem Wildtyp (PF6). T3 bewirkte eine Erhöhung der Aktivität vom Wildtyppromotor um das ~2.5fache, während bei Mut-1 und Mut-2 keine Aktivitätssteigerung zu detektieren war. Die Mutation der dritten half-site (Mut-3) hingegen hatte eine ähnliche Aktivitätssteigerung (~2fache) durch T3 wie der Wildtyp. Somit sind die ersten beiden half-sites (DR+4) an der Regulation der mGPDH-Genexpression durch Schilddrüsenhormon maßgeblich beteiligt. Die basale Aktivität von Mut-1 fiel auf ein Viertel, bezogen auf die basale Aktivität des Wildtyppromotors, da bei dieser Mutation auch die Sequenz der funktionellen SP1.5 Bindungsstelle beeinflusst wurde (siehe Abb. 18).

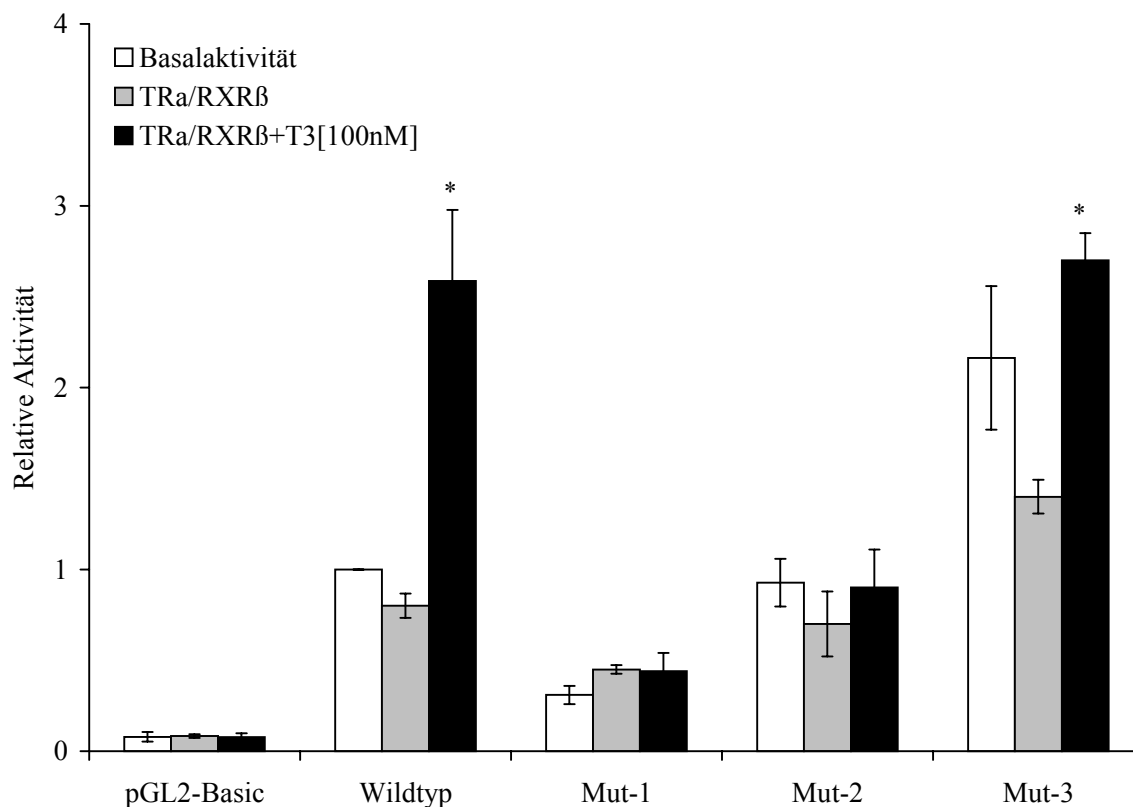


Abb. 19: Mutationsanalyse des DR+4+2-Elements von Promotor B im Bereich von -187 bis +109 durch transiente Transfektion

Relative Aktivitäten der mutierten putativen Hormon-responsiblen-half-sites-Konstrukte unter Einfluss von 100nM T3 in HepG2-Zellen. Die basalen Aktivitäten sind weiß, die Aktivitäten mit Cotransfektion grau und unter Cotransfektion und T3-Stimulation schwarz dargestellt. Die Aktivitäten sind auf die basale Wildtypaktivität (PF6) normiert. Der promotorlose pGL2-Basic Vektor diente als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen (* $p \leq 0.02$ bezogen auf die nicht stimulierten cotransfizierten Gruppen).

4.5.1.2 Aktivitätsanalyse des DR+4+2-Elements durch Estradiol

Um die Regulation des ubiquitären Promotors durch Estradiol näher zu durchleuchten, wurde die Bedeutung des DR+4+2-Elementes bei der Aktivitätssteigerung des Promotors B durch Estradiol untersucht. Dafür wurde der Einfluss von Estradiol auf die drei Mutationskonstrukte der half-sites (Mut-1, Mut-2 und Mut-3) mit Hilfe der transienten Transfektion in HepG2-Zellen analysiert. Das experimentelle Design gleicht dem Vorangegangenen mit vier Ansätzen (siehe 4.4.4). Überraschenderweise zeigten die Mut-1, Mut-2 und Mut-3 Konstrukte wie der Wildtyp eine rezeptorabhängige Stimulation durch Estradiol um das 3 bis 3.8fache gegenüber der nicht stimulierten cotransfizierten Gruppe (Abb. 20). Es wurde daraufhin ein

Plasmid mittels der *in vitro* Mutation konstruiert, bei dem alle drei half-sites mutiert waren (Mut-1, 2, 3). Auch dieses Konstrukt ließ sich rezeptorabhängig durch Estradiol aktivieren. Resultierend zeigen diese Versuche, dass bei der Regulation des ubiquitären Promotors B durch Estradiol das DR+4+2-Element keine Rolle spielt.

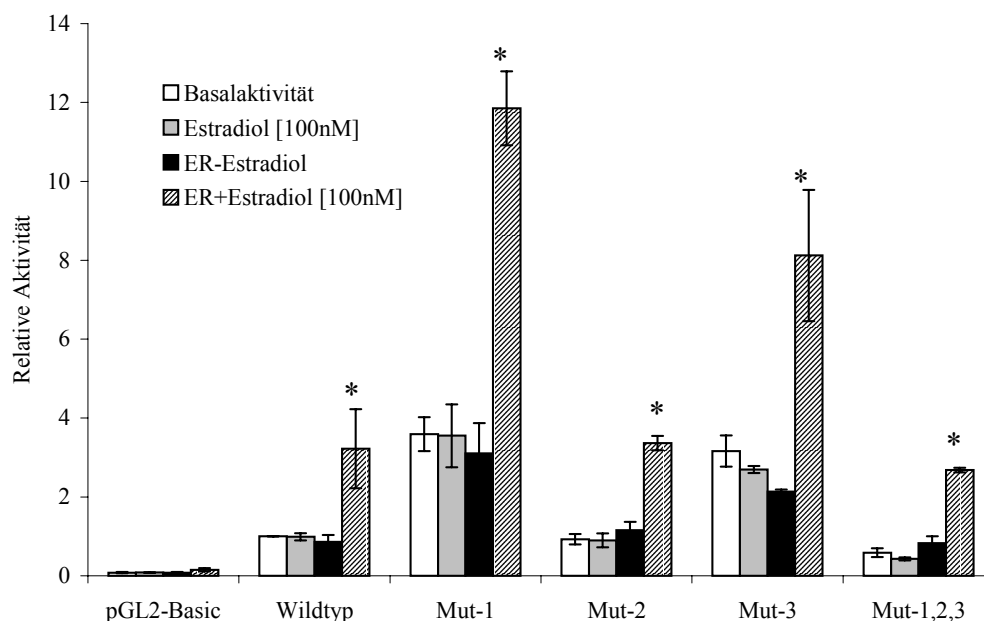


Abb. 20: Mutationsanalyse des DR+4+2-Elements von Promotor B im Bereich von -187 bis +109 durch transiente Transfektion

Relative Aktivitäten der mutierten putativen Hormon-responsiblen-half-sites-Konstrukte unter Einfluss von 100nM Estradiol in HepG2-Zellen. Die basalen Aktivitäten sind weiß und unter Estradiolstimulation grau dargestellt. Die Aktivitäten unter Cotransfektion von ER sind schwarz und unter Cotransfektion und Estradiolstimulation gestreift veranschaulicht. Die Aktivitäten sind normiert auf die basale Wildtypaktivität. Der promotorlose pGL2-Basic Vektor diente als Kontrolle. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten (\pm SEM) mit jeweils drei Zellkulturschalen (* $p \leq 0.05$ bezogen auf die nicht stimulierten cotransfizierten Gruppen).

4.5.2 Bindungsuntersuchungen des DR+4+2-Elements

4.5.2.1 Bindungsuntersuchungen des DR+4+2-Elements mit Kernextrakten

Analog zur Untersuchung der SP1.1-Bindungsstelle wurde das DR+4+2-Element mit Hilfe der Band-Shift-Methode analysiert. Ein radioaktiv markiertes doppelsträngiges synthetisches Oligonukleotid (DR+4+2) (siehe Anhang), welches das DR+4+2-Element des Promotors B sowie dessen flankierende Bereiche enthält (Sequenz -28 bis +8), wurde mit Kernextrakt von HepG2-Zellen inkubiert.

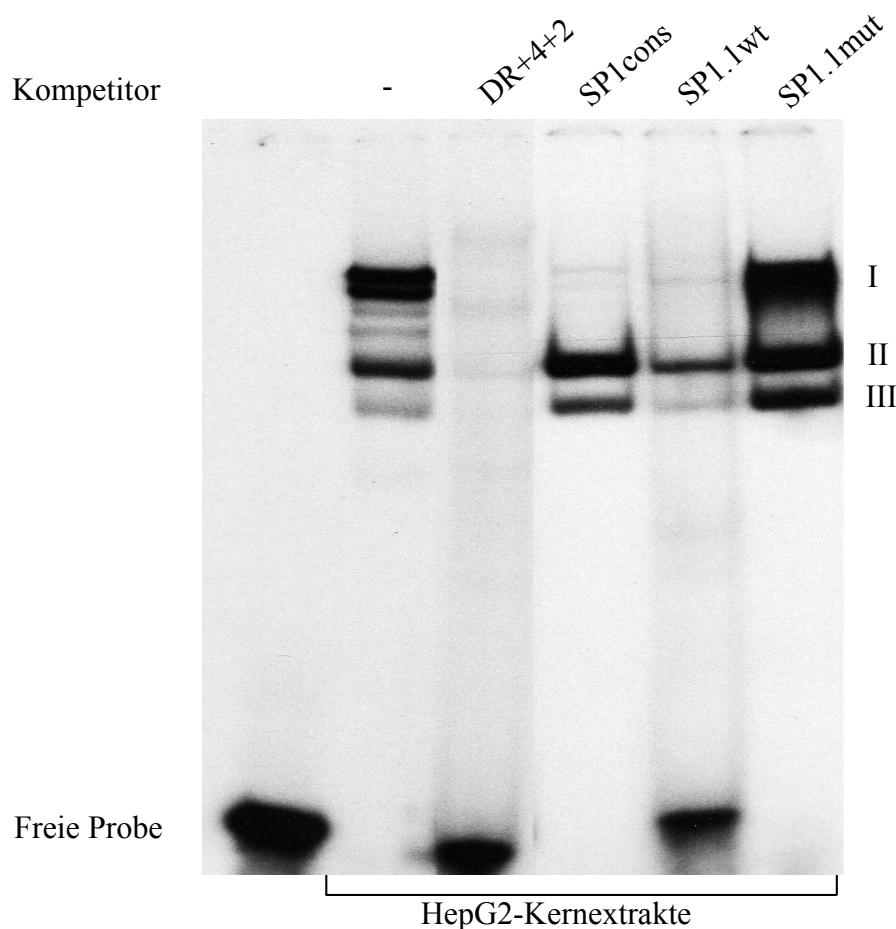


Abb. 21: Band-Shift-Analyse mit DR+4+2 und nukleären Proteinen aus HepG2

1fmol ^{32}P -markierte DR+4+2-Sequenz wurde mit 3 μg Kernextrakt von HepG2-Zellen 30min auf Eis inkubiert und die Ansätze elektrophoretisch auf einem 5%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Kompetitionsversuche wurden mit einem 100fachen molaren Überschuss von unmarkierten Kompetitoren (DR+4+2, SP1cons, SP1.1wt oder SP1.1mut) durchgeführt.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, entstehen dabei drei Banden (I, II und III). Die Spezifität dieser Bindungen wurde durch vollständige Konkurrenz mit einem 100fachen molaren Überschuss von unmarkiertem DR+4+2 nachgewiesen. Der Komplex I konnte mit einem 100fachen molaren Überschuss von unmarkierter SP1-Konsensus- (SP1cons) oder SP1.1wt-Sequenz vollständig verdrängt werden, während die SP1.1mut-Sequenz die Bildung nicht verhinderte. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der Bande I um einen SP1-DNA Komplex handelt. Die Bandenstärke von Komplex II und III verstärkte sich bei Verwendung des Kompetitors SP1cons.

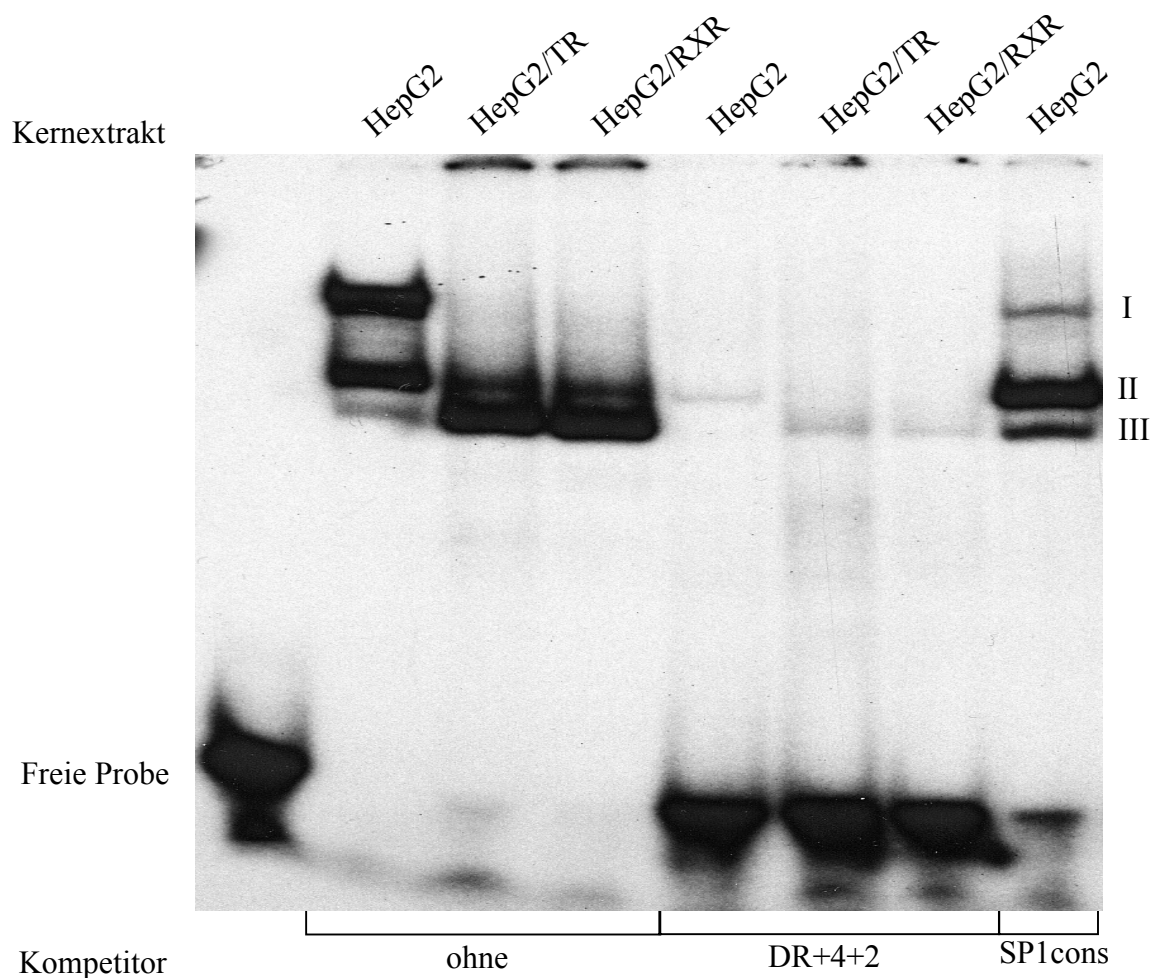


Abb. 22: Band-Shift-Analyse mit überexprimierten cTR α 1 oder hRXR α aus HepG2-Zellenextrakten und DR+4+2-Element

Jeweils 10fmol 32 P-markierte DR+4+2-Sequenz wurde mit verschiedenen behandelten 3 μ g Zellkernextrakt 30min auf Eis inkubiert. Die Zellkernextrakte wurden aus HepG2-Zellen, welche 24h mit Expressionsplasmide für cTR α 1 oder hRXR α transient transfiziert waren, hergestellt. Die Wettbewerbsversuche wurden mit einem 100fachen molaren Überschuss von unmarkierten DR+4+2 sowie SP1cons durchgeführt.

Um jetzt die Bindung zwischen dem DR+4+2-Element und den Kernrezeptoren TR α und RXR α zu analysieren, wurden Band-Shift-Experimente mit überexprimiertem cTR α 1 oder hRXR α in HepG2-Zellen durchgeführt. Das Bandenmuster dieser überexprimierten Kernextrakte unterschied sich, wie in Abbildung 22 dargestellt vom Bandenmuster mit Kernextrakten aus unbehandelten HepG2-Zellen. Der vorher detektierte SP1-DNA-Komplex (siehe Abb. 21; Komplex I) wurde bei Verwendung von cTR α 1 oder hRXR α überexprimierten Extrakten nicht gebildet. Statt dessen kam es mit den überexprimierten Kernextrakten zu einer Verstärkung der Bande III und einer Abschwächung der Bande II, als bei unbehandelten Extrakten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es sich bei der Bande II um Homodimerbindungen von cTR α 1 oder hRXR α an das DR+4+2 handelt und bei der Bande III um Heterodimerkomplexe. Die Bindungen mit Zellkernproteinen von unbehandelten und behandelten Zellen an die DR+4+2-DNA ließen sich wiederum jeweils mit einem 100fachen molaren Überschuss von unmarkierter DR+4+2-DNA verhindern, was ihre Spezifität belegt.

4.5.2.2 Bindungsuntersuchungen des DR+4+2 Elements mit HepG2 Kernextrakten durch Shift-Western

Es wurde versucht die Proteinzusammensetzung der Homo- und Heterodimerkomplexe näher zu analysieren, indem die Shift-Western-Methode (Demczuk et al., 1993) eingesetzt wurde. Die Methode ist eine Kombination der Band-Shift-Methode mit der immunologischen Detektion der Bindungspartner (siehe 3.3.6.2). Dazu wurden Oligonukleotide, die dem DR+4+2-Element entsprachen, mit Kernextrakten von HepG2-Zellen inkubiert. Die an den gebildeten Komplexen beteiligten Proteine wurden immunologisch mit spezifischen Antikörpern gegen TR α oder RXR α untersucht. Die Versuche ermöglichten keine eindeutige Aussage über die Proteine, die an den Komplexen beteiligt sind.

4.5.2.3 Bindungsuntersuchungen des DR+4+2 mit *in vitro* translatiertem TR α - und RXR γ -Protein

Da die Shift-Western-Methode keine weitere Aufklärung zur Zusammensetzung des Homo- und Heterodimerkomplexes erbrachte, wurde die Komplexität des Band-Shift-Systems reduziert. Es wurde der Schilddrüsenhormonrezeptor α 1 oder der Retinoid-X-Rezeptor γ in den *in vitro* Translationsvektor pSPUTK kloniert und mittels *in vitro* Translation im

Reticulocystenlysat induziert. Die *in vitro* translatierten TR α - und RXR γ -Lysate wurden mit dem radioaktiv markierten DR+4+2 inkubiert. Bei diesem Band-Shift (siehe Abb. 23) entstand mit TR α bzw. RXR γ jeweils ein Protein-DNA Komplex (Komplex a). Komplex a ließ sich durch Zugabe von einem 100fachen molaren Überschuss an unmarkiertem DR+4+2 vollständig verdrängen. Um nun das am spezifischen Komplex a gebundene Protein zu identifizieren, wurde ein schilddrüsenhormonrezeptorspezifischer Antikörper dazugegeben, was zu einem Supershift führte und beweist, dass TR α an dem Komplex a beteiligt ist.

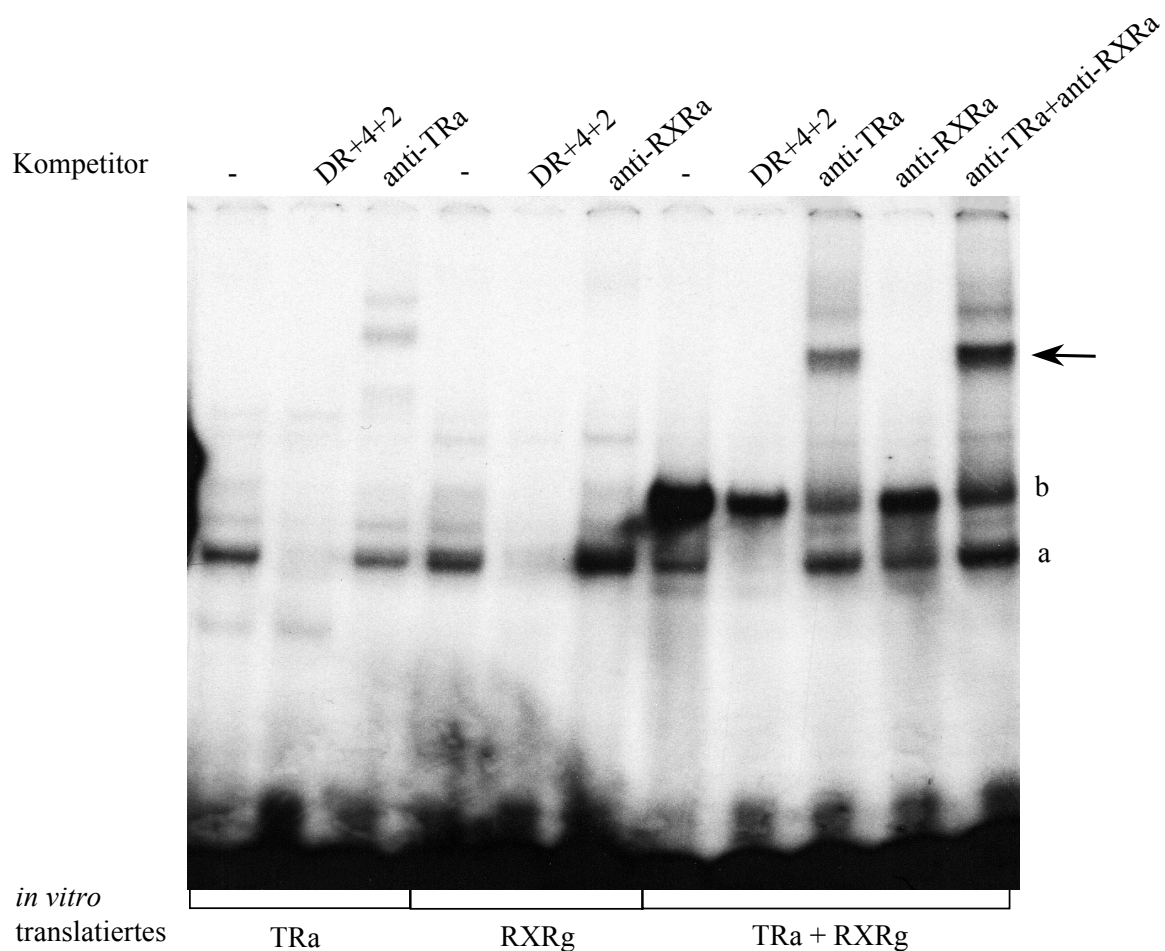


Abb. 23: Band-Shift-Analyse mit *in vitro* translatierten TR α oder RXR γ und DR+4+2 Element des Promotors B

Jeweils 10 fmol 32 P-markierte DR+4+2-Sequenz wurde mit 3 μ l *in vitro* translatierten TR α - oder RXR γ -Lysat 30min auf Eis inkubiert und die Ansätze elektrophoretisch auf einem 3% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Ansätze mit den Antikörpern wurden 30min auf Eis vorinkubiert. Die Wettbewerbsversuche wurden mit 100fachen molaren Überschuss von unmarkierten DR+4+2 durchgeführt. Der Supershift ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Bei der Inkubation von DR+4+2 mit einer Mischung von *in vitro* translatierten TR α - und RXR γ -Lysaten entstand eine zusätzliche Bande (Komplex b), die mit den einzelnen Lysaten nicht vorhanden war. Bei dieser Bande handelte es sich höchstwahrscheinlich um einen Heterodimerkomplex, auch hier bewirkte die Inkubation mit TR α -spezifischen Antikörper einen Supershift. Bei Supershift-Experimenten mit Antikörpern gegen RXR α war allerdings kein Supershift detektierbar. Der Grund hierfür war, dass der eingesetzte spezifische RXR α -Antikörper den *in vitro* translatierten RXR γ nicht detektieren konnte, wie sich in späteren Laborarbeiten zeigte.

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass der Schilddrüsenhormonrezeptor α und der Retinoid-X-Rezeptor γ an dem DR+4+2-Hormon-responsiblen-Element des Promotors B binden. Die Rezeptoren können also als Homo- oder Heterodimer *in vitro* an dem Element binden.

4.6 Induzierbarkeit des mGPDH-Proteins durch Schilddrüsenhormone

4.6.1 Induzierbarkeit in der Rattenleber *in vivo*

Die Generierung eines Antikörpers gegen mGPDH in unserem Labor ermöglichte Untersuchungen auf der Proteinebene. Es sollte die zeitabhängige Induktion des mGPDH-Proteins durch Schilddrüsenhormone in der Rattenleber *in vivo* untersucht werden.

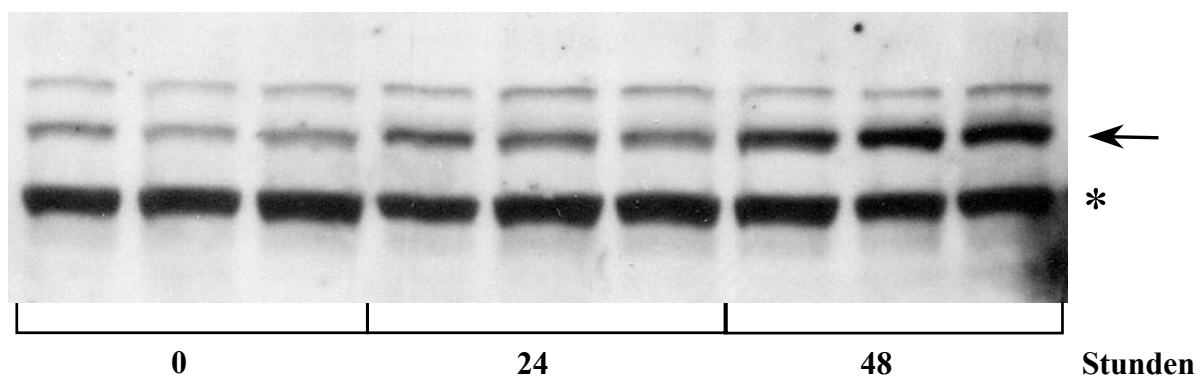


Abb. 24: Western-Blot-Analyse des mGPDH-Proteins in euthyreoten und T3-behandelten Ratten

Leberlysate von drei euthyreoten Ratten und sechs mit T3 behandelten (drei für 24h, drei für 48h T3 behandelt) Tieren. Jeweils 50 μ g Gesamtprotein der Leberlysate wurden auf einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit einem mGPDH spezifischem Antikörper inkubiert. Der Pfeil zeigt das mGPDH-Protein an und der Stern markiert eine unspezifische Standardbande.

Dafür wurde Ratten einmalig T3 (50µg Trijod-L-thyronin/100g Körpergewicht) injiziert und nach 24 bzw. 48 Stunden die Leber entnommen. Als Kontrolle dienten dabei unbehandelte euthyreote Tiere. Die Rattenlebern wurden in Proteinlyse-Puffer gepottert, die Gesamtproteinkonzentrationen bestimmt und gleiche molare Mengen von Gesamtprotein auf SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt. Abbildung 24 zeigt den Western-Blot von mGPDH mit den Leberlysaten. Die mGPDH-Proteinkonzentration war 24 Stunden nach Gabe von T3 im Mittel um das 3fache höher als bei den euthyreoten Proben und stieg nach 48 Stunden im Mittel auf das 7fache an.

4.6.2 Induzierbarkeit in permanenten und primären Zellen

Nun wurde das System vereinfacht und primäre Hepatozyten sowie verschiedene permanente Zelllinien wurden unterschiedlich lange mit 100nM T3 behandelt. Die Proteine der Zellen wurden dann auf SDS-PAGE Gele aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und das mGPDH-Protein immunologisch mit dem spezifischen Antikörper gegen mGPDH detektiert. Die primären Hepatozyten wurden für 24 oder 48 Stunden mit 100nM T3 stimuliert, dabei dienten unbehandelte Zellen als Kontrolle. Je Bahn wurden 15µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 veranschaulicht, wobei das mGPDH-Protein mit einem Pfeil gekennzeichnet ist.

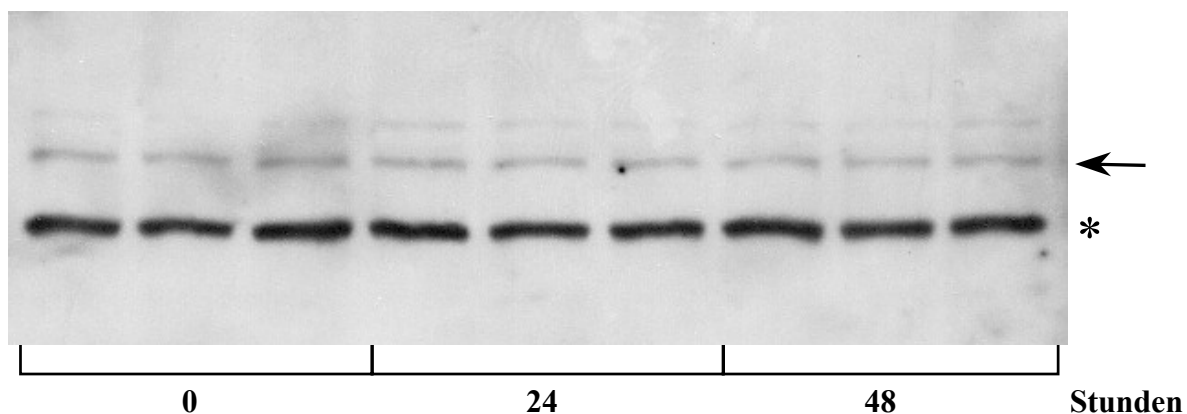


Abb. 25: Western-Blot-Analyse des mGPDH-Proteins in primären Hepatozyten nach Applikation von 100nM T3 für 24 und 48 Stunden

Western-Blot von 15µg Gesamtprotein aus primären Hepatozyten, die für 0, 24 und 48h mit 100nM T3 stimuliert wurden. Jeweils drei Proben mit gleichen Behandlungsbedingungen wurden nebeneinander in einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit einem spezifischen Antikörper gegen mGPDH inkubiert. Der Pfeil zeigt das mGPDH-Protein an und der Stern markiert eine unspezifische Standardbande.

Die mGPDH-Proteinkonzentration blieb in allen Proben konstant. Das bedeutet, dass T3 keine Erhöhung der mGPDH-Proteinkonzentration in primären Hepatozyten bewirkt. Die permanenten Zelllinien (H-35, H4-II-E, FAO, RatI, und HepG2) wurden 2, 4, 6, 8, 24, oder 48 Stunden mit T3 behandelt und aus jeweils 10µg Gesamtprotein wurde die mGPDH-Proteinkonzentration detektiert. Es zeigte sich, dass in allen untersuchten permanenten Zellen die mGPDH-Proteinkonzentration konstant blieb. In Abbildung 26 ist exemplarisch der Western-Blot mit H-35-Zellen dargestellt.

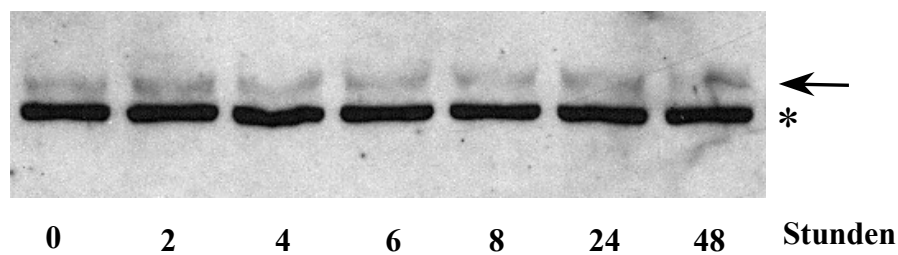


Abb. 26: Western-Blot-Analyse des mGPDH-Proteins in H-35-Zellen nach Applikation von 100nM T3 über 0-48 Stunden

Western-Blot von 10µg Gesamtprotein aus H-35-Zellen, die für 0, 2, 4, 6, 8, 24 und 48h mit 100nM T3 stimuliert wurden. Jeweils drei Zellkulturschalen mit gleicher Behandlungsdauer wurden zu einer Probe vereint, in einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit spezifischem Antikörper gegen mGPDH inkubiert. Der Pfeil zeigt das mGPDH-Protein an und der Stern markiert eine unspezifische Standardbande.

Die Western-Blot-Versuche belegen, dass Schilddrüsenhormone die mGPDH-Proteinkonzentration in der Leber *in vivo* erhöhen, aber nicht in permanenten und primären Leberzellkulturen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der mitochondrialen Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (mGPDH) auf transkriptioneller Ebene und auf Proteinebene untersucht. Der Hauptteil dieser Arbeit bestand in der Analyse der funktionellen und hormonellen Regulation der mGPDH-Promotoren. Besonderes Augenmerk wurde auf die Aufklärung des molekularen Mechanismus der mGPDH-Aktivierung durch Schilddrüsenhormone gelegt. Darüber hinaus wurde die schilddrüsenhormonvermittelte Induktion des mGPDH-Proteins untersucht.

5.1 Gewebsspezifität durch alternative Promotoren

Es existieren drei alternative mGPDH-Promotoren der Ratte (Promotor A, B, und C), die eine gewebsspezifische Aktivität besitzen (siehe 4.1). Transiente Transfektionsexperimente zeigen, dass sowohl in Rattenfibroblasten (Rat1-Zellen), in humanen Hepatocarcinoma Zellen (HepG2-Zellen) und in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) ausschließlich der ubiquitäre Promotor B benutzt wird, während die Promotoren A und C in diesen Zellsystemen nicht aktiv sind (siehe Abb. 7).

Dies korreliert mit unseren Erkenntnissen über die Gewebsverteilung der Exon-1-enthaltenden Transkripte in den verschiedenen Geweben (Weitzel et al., 2000). Exon-1b-enthaltende-Transkripte werden ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert, wohingegen Exon-1a-enthaltende Transkripte nur im Gehirn, Braunem Fettgewebe und Pankreas exprimiert werden und Exon-1c-enthaltende Transkripte einzig im Hoden zu detektieren sind. Promotor B scheint für die basale mGPDH-Expression in den Geweben verantwortlich zu sein, während in Geweben wie Gehirn, Braunem Fettgewebe und Pankreas zur Erhöhung der mGPDH-Transkriptkonzentration der gewebsspezifische Promotor A und im Hoden der Promotor C zusätzlich genutzt werden kann. Auch die Aktivität des mGPDH-Enzyms zeigt große Unterschiede in den einzelnen Geweben. In β -Zellen des Pankreas, im Gehirn, im Braunen Fettgewebe und im Hoden werden hohe Enzymaktivitäten von mGPDH gemessen (MacDonald, 1981; Schenkman et al., 1965; Koza et al., 1996). Dies wird über Promotor A und Promotor C reguliert. Die Existenz der drei alternativen Promotoren scheint somit die gewebsspezifische Regulation der mGPDH zu gewährleisten. Solche multiplen und gewebsspezifischen Promotoren sind auch bei einigen anderen Genen beschrieben, wie bei der Pyruvatcarboxylase, Acyl-CoA-Synthase, und dem Glucocorticoid-Rezeptor (Jitrapakdee et al., 1998; Zhang et al., 1994; Strähle et al., 1992). Trotz der Unterschiede in den 5'-

nichttranslatierten Bereichen der mGPDH-Transkripte, bleibt die kodierende Region unbeeinflusst. Bei Genen mit unterschiedlichen 5'-UTR, aber mit einer identischen proteinkodierenden Region wird häufig die Benutzung von alternativen gewebsspezifischen Promotoren beobachtet (Strähle et al., 1992; Crofts et al., 1998; Zennaro et al., 1995).

Die drei multiplen mGPDH-Promotoren enthalten weder CAAT- noch TATA-Boxen in der Nähe ihres jeweiligen Transkriptionsstarts. Der ubiquitäre Promotor B ist aber besonders GC-reich, was häufig bei Housekeeping-Genen zu beobachten ist. Aktivitätsanalysen von 5'-Deletionspromotorkonstrukten zeigen, dass die basale Aktivität von Promotor B in einer Kernpromotorregion 316bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart konserviert ist (siehe Abb. 9). In diesem Bereich sind einige GC-reiche Elemente lokalisiert, dabei handelt es sich um 5 putative SP1-Bindungsstellen (nummeriert als SP1.1-SP1.5, siehe Abb. 10). In der Kernpromotorregion spielen die SP1.1- und die SP1.5-Bindungsstellen für die basale Transkriptionsrate des ubiquitären Promotors eine wichtige Rolle. Denn durch transiente Transfektionsstudien in HepG2- und HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass die basale Aktivität von Promotor B mindestens um 65% bis 90% vermindert ist, wenn die putative SP1.1- oder SP1.5-Bindungsstelle mutiert ist (siehe Abb. 11). Dagegen führt die Mutation der putativen SP1.2-, SP1.3- und SP1.4-Bindungsstelle zu keiner signifikanten basalen Aktivitätsänderung im Vergleich zum Wildtyp. Des Weiteren ließ sich mit Band-Shift-Analysen nachweisen, dass an der SP1.1-Sequenz und der SP1.5-Sequenz tatsächlich der Transkriptionsfaktor SP1 bindet (Vgl. Punkt 4.3.2.2). Durch Bindung des ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1 an die funktionellen SP1-Bindungsstellen (SP1.1 und SP1.5) wird die ubiquitäre basale Genexpression des Promotors B gewährleistet.

Während der Promotor B ubiquitäre Aktivität besitzt, ist der Promotor C hoch spezifisch für den Hoden. Neue Untersuchungen aus unserem Labor zeigen, dass der hodenspezifische mGPDH-Promotor C eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREM- τ (cAMP-response-Element Modulator-tau) besitzt (Shiryayeva, 2002). CREM- τ ist ein möglicher essentieller Regulator für viele hodenspezifische Gene und könnte bei der gewebsspezifischen Aktivität des Promotors C von entscheidender Bedeutung sein. Auffällig ist, dass der hodenspezifische Promotor bislang nur in der Ratte nachgewiesen werden konnte (Gong et al., 2000; Weizel et al., 2001; Urcelay et al., 2000). Das Fehlen eines Homologs zu Promotor C bei anderen Spezies könnte erklären, warum nur die Ratte eine hohe mGPDH-Aktivität im Hoden aufweist (Gong et al., 2000).

5.2 T3-Induktion über ein Schilddrüsenhormon-responsible Element

Die mGPDH ist eines der am stärksten durch Schilddrüsenhormone aktivierten Enzyme. Eine Vielzahl von Arbeiten geben Hinweise darauf, dass die Regulation der mGPDH durch Schilddrüsenhormone auf mRNA-Ebene erfolgt (vgl. Punkt 1.3.3.1). Dabei läßt die rasche Erhöhung von mGPDH-mRNA durch T3 (Dümmler et al., 1996) auf eine direkte Induktion über Schilddrüsenhormon-responsible Elemente (TRE) schließen. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Regulation durch Schilddrüsenhormone allein über den ubiquitären Rattenpromotor B vermittelt wird, während Promotor A und C keine Aktivierung zeigen (siehe Abb. 13). Auch Exon1-spezifische RT-PCRs mit mRNA aus Lebergewebe von hypo- und hyperthyreoten Ratten zeigen eine drastische Expressionssteigerung von Exon 1b enthaltenden Transkripten (Gong et al., 1998), während bei Exon 1a und 1c enthaltenden Transkripten keine oder nur eine minimale Erhöhung zu detektieren ist.

Durch 5'-Deletionskonstruktanalyse von Promotor B ließ sich nachweisen, dass eine unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstarts gelegene 187bp große DNA-Sequenz ausreicht, um eine Schilddrüsenresponsibilität aufzuweisen (vgl. Punkt 4.4.1). In diesem DNA-Bereich sind drei Sequenzbereiche lokalisiert, die komplementär gelesene Ähnlichkeiten zu der typischen TRE-half-site-Konsensussequenz (5'-AGGTCA-3') aufweisen (siehe Abb. 18). Die drei putativen half-sites liegen in Form eines DR+4+2-Elements vor, welches um vier Basen von der Idealsequenz abweicht. Mutationen der einzelnen half-sites zeigen, dass die T3-Regulierung des Promotors B über die ersten beiden half-sites (DR+4) erfolgt (Vgl. Punkt 4.5.1.1), während die dritte half-site bei der T3-Responsibilität keine Rolle spielt. Einzig bei dieser half-site weicht die Sequenz an der Position +2 von der Konsensussequenz in Form eines Ausstausches der Pyrimidinbase durch eine Purinbase ab, während bei den anderen half-sites Purin- gegen Purin- oder Pyrimidin- gegen Pyrimidinbasen ersetzt sind. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum es sich bei der dritten half-site nicht um eine TRE-half-site handelt. Das mGPDH-TRE entspricht mit seiner direct-repeat-Anordnung und seinem vier Spacern einem idealen TRE (Umesono, 1991). Seine Lage nahe beim Transkriptionsstart ist ungewöhnlich, denn die bekannten positiv wirkenden TREs liegen überwiegend 100 bis 500 bp weiter stromaufwärts (Jakobs et al., 1997; Izumo und Mahsavi, 1998; Taylor et al., 1996). So nahe am Transkriptionsstart werden hauptsächlich negativ regulierende TREs beschrieben (Chatterjee et al., 1989; Wood et al., 1989). Sie besitzen meist die Form eines DR+0-Elements oder bestehen nur aus einer half-site und ihre Wirkung wird über die sterische Hinderung der Transkriptionsinitiation durch den Hormon-Rezeptor-Komplex vermutet. Doch

ein positiv wirkendes TRE nahe dem Transkriptionsstart wurde interessanterweise auch für das xTR β A-Gen detektiert. Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein DR+4-TRE und der Promotor besitzt auch keine TATA-Box sondern, wie beim mGPDH Promotor B, GC-reiche Elemente (Ranjan et al., 1994).

Die T3-Induktion des mGPDH-Promotors wird vermittelt über ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, den Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) (siehe Abb. 13). Seit langem ist bekannt, dass die T3-induzierte Steigerung der Genexpression durch den Heterodimersierungspartner RXR verstärkt wird (Yu et al., 1991; Marks et al., 1992). Auch bei der mGPDH bewirkt T3 über TR/RXR-Heterodimere eine deutlich höhere Induktion als mit der alleinigen Cotransfektion von TR α (Daten nicht gezeigt). Die Stärke der Genexpression ist dabei unabhängig von der Isoform des Dimerisierungspartners RXR (siehe Abb. 14). Die Verstärkung der T3-induzierten Genexpressionssteigerung durch den Heterodimerisierungspartner RXR lässt sich durch eine hohe Bindungsaffinität von TR/RXR-Heterodimeren an DR+4-TRE erklären. Bei der Inkubation von synthetischen, radioaktiv-markierten Oligonukleotiden, die diese DR+4+2-Sequenz darstellen, mit HepG2-Kernextrakten bilden sich drei Komplexe (Bande I, II, III) (Vgl. Punkt 4.5.2.1; Abb. 21). Zum besseren Verständnis sind die Komplexe in Form eines Ausschnittes in Abbildung 27 dargestellt.

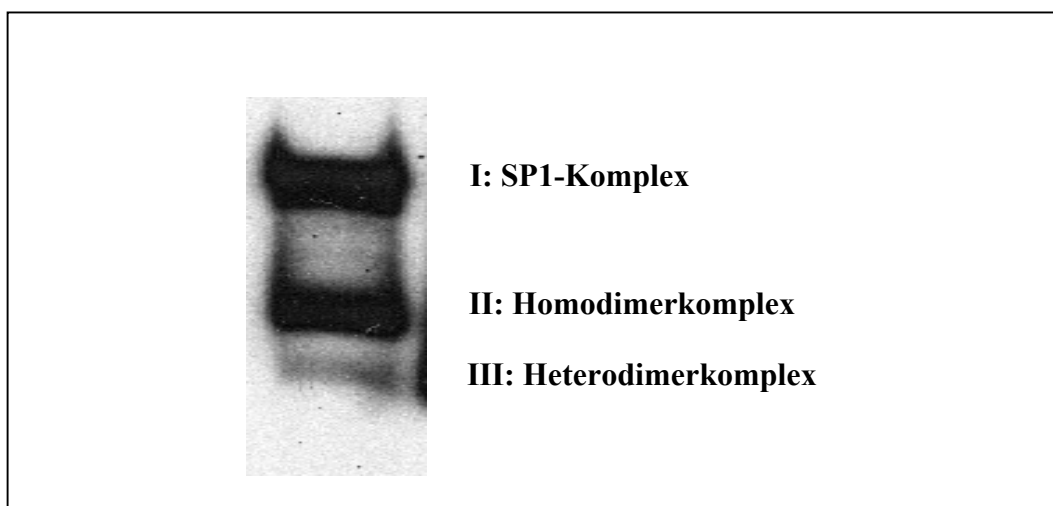


Abb. 27: Ausschnitt einer Band-Shift-Analyse mit DR+4+2 und nukleären Proteinen aus HepG2
(weitere Daten im Ergebniskapitel, Abbildung 21)

Bei diesen Komplexen handelt es sich um einen SP1-DNA Komplex (Bande I), um einen Heterodimerkomplex von TR und RXR (Bande II) und um einen Homodimerkomplex (Bande III) (Vgl Punkt 4.5.2.1). Der Heterodimerkomplex ist wesentlich dominanter als der Homodimerkomplex. Dies spricht dafür, dass die Kernrezeptoren bevorzugt als Heterodimere an das TRE binden. Durch die Verwendung von *in vitro* translatierten TR und RXR ließ sich die starke Bindungsaffinität des dominanten Heterodimerkomplexes demonstrieren. Hier reicht ein 100facher molarer Überschuss von spezifischen Kompetitoren nicht aus, um den Heterodimerkomplex zu verdrängen, während die Bildung des Homodimerkomplexes vollständig verhindert wird (siehe Abb. 23). Diese Befunde unterstreichen deutlich die wichtige Rolle des RXR bei der T3-abhängigen Aktivierung der mGPDH-Transkription. Untersuchungen der RXR/TR-Heterodimerbindung an synthetischen DR+4-Elementen haben ergeben, dass der RXR dabei ausschließlich die 5'-gelegene half-site besetzt (Perlman et al., 1993). RXR wird ubiquitär exprimiert und so wird die Heterodimerisierung durch die Anwesenheit von TR reguliert. Die Stabilität der Bindung von TR/RXR-Heterodimeren an DR+4-Elemente wird durch die Zugabe von T3 nicht beeinflusst (Desvergne, 1993), während TR/TR-Homodimere an diesem Element durch T3 zerstört werden (Yen et al., 1992; Anderson et al., 1992). Die physiologische Bedeutung von TR/TR-Homodimeren bei der T3-vermittelten Genexpression von mGPDH ist noch unklar. Die beobachtete T3-Aktivierung der mGPDH-Promotoren nach der alleinigen Cotransfektion von TR α (Daten nicht gezeigt) kommt wahrscheinlich durch die Heterodimerisierung mit endogenem RXR zustande.

In Abwesenheit von Schilddrüsenhormonen wird die mGPDH-Aktivität, gegenüber der basalen Aktivität, bei alleiniger Cotransfektion von TR α /RXR β vermindert (Vgl. Punkt 4.4.1). Diese ligandenunabhängige Repression wird auch bei anderen T3-responsiblen Genen beschrieben (Graupner et al., 1989; Ranjan et al., 1994). Die ligandenungebundenen Rezeptoren rekrutieren aufgrund ihrer Konformation Corepressoren wie SMRT (Chen und Evans, 1995), N-CoR (Hörlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995) sowie SUN-CoR (Zamir et al., 1997) und bewirken damit die Reprimierung der Transkription. Die Reprimierung wird oft als Folge der Histon-Deacetylierung durch die Corepressoren diskutiert (Vgl. Punkt 1.1.2). Da die Repression der mGPDH mit der transienten Transfektion detektiert wurde, spielt die Modellierung der Chromatinstruktur hier offenbar keine Rolle. Es werden aber noch andere reprimierende Wege beschrieben, so können Corepressoren und sogar TR selbst mit basalen Transkriptionsfaktoren wie TFIIB in Interaktion treten (Wong und Privalsky, 1998; Baniahmad et al., 1993) und dadurch die Transkription beeinflussen.

5.3 Interaktion des TREs mit der SP1-Bindungsstelle

Der ubiquitäre mGPDH-Promotor besitzt ein DR+4-Element, an dem TR bevorzugt mit dem Dimerisierungspartner RXR bindet und bei Anwesenheit von Schilddrüsenhormonen die Genexpression aktiviert wird (Vgl. Punkt 5.2). Das DR+4-TRE überlappt interessanterweise mit der funktionellen SP1.5-Bindungsstelle (Vgl. Punkt 4.5, Abb.18). Untersuchungen mit der Band-Shift-Methode zeigen, dass die Kernrezeptoren mit dem ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1 um die DR+4+2-Bindungsstelle konkurrieren. Wird nämlich der Transkriptionsfaktor SP1 durch die SP1-Konsensussequenz abgefangen, bildet sich keine SP1-DNA-Bande, sondern es kommt zur Verstärkung der Hetero- und Homodimerbindung durch die Kernrezeptoren (Vgl. Punkt 4.5.2.1, Abb. 21). Auch die Verwendung von Kernextrakten aus TR- oder RXR überexprimierten HepG2-Zellen bewirkt eine Verstärkung der Homo- bzw. Heterodimerbildung, während die Bindung von SP1 an das DR+4+2-Element aufgrund des Überschusses von Kernrezeptoren verhindert wird (siehe Abb. 22).

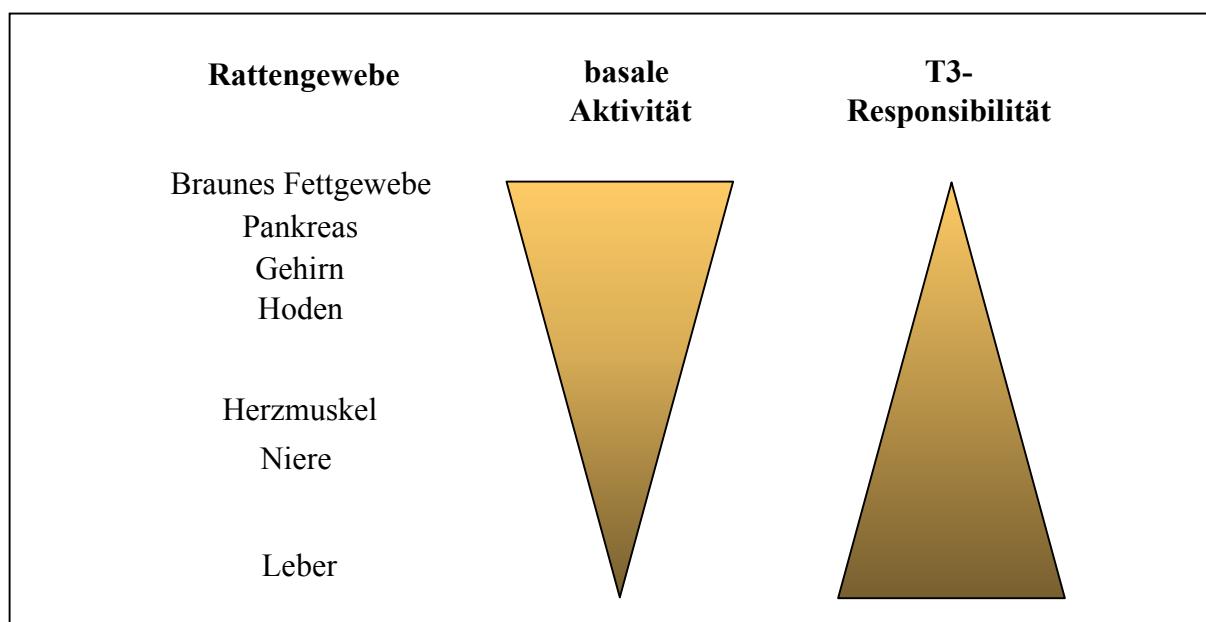


Abb. 28: Zusammenfassung der basalen Aktivität und der T3-Responsibilität

Gewebe mit hoher basaler Aktivität besitzen keine oder nur geringe T3-Responsibilität, während Gewebe mit geringer basaler Aktivität eine hohe Aktivierung durch T3 aufweisen.

Die mGPDH zeigt nur in Gewebe mit geringer basaler mGPDH-Expression eine T3-Responsibilität, wogegen sie in Geweben mit hoher basaler mGPDH-Aktivität (Pankreas, Braunem Fettgewebe, Gehirn und Hoden: Koza et al., 1996; Dümmler et al.; 1996; Gong et al., 1998) keine oder nur eine geringe Aktivitätssteigerung durch T3 aufweist. (Als Modell in Abbildung 28 dargestellt). Denkbar ist, dass dies durch die Konkurrenz zwischen den Kernrezeptoren und dem SP1 um das DR+4-Element zustande kommt. In Geweben mit niedriger Basalexpression kann TR an das DR+4-TRE binden und dadurch die T3-Responsibilität bewirken. Herrscht eine hohe mGPDH-Basalexpression, belegt wahrscheinlich der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor SP1 die SP1.5-Bindungsstelle und verhindert bzw. vermindert die Bindung von TR und damit die T3-Induktion (Modell siehe Abb. 29).

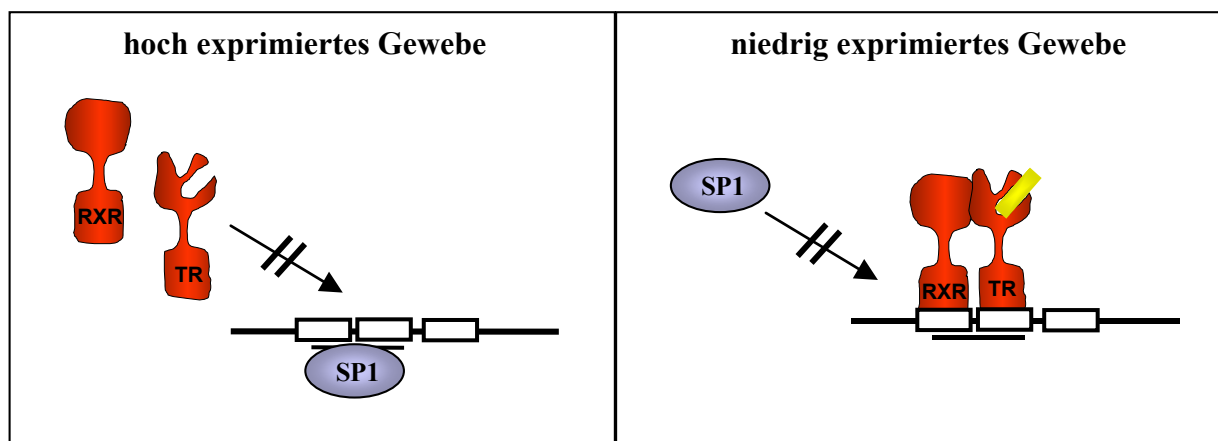


Abb. 29: Modell zur Konkurrenz um die Bindung an das DR+4+2-Element
(Erklärung im Text)

5.4. DR+4+2-Element als mögliches HRE für andere nukleäre Rezeptoren

Das Hormon-responsible-Element ist in seiner Form als DR+4+2 mit überlappender SP1-Bindungsstelle sehr komplex. Deshalb wurde nicht nur die Vermittlung der Schilddrüsenhormonwirkung untersucht, sondern auch die mögliche Aktivierung durch verwandte Hormon-Rezeptor-Komplexe.

5.4.1 Rezeptorabhängige Aktivierung durch Estrogen

Die computergestützte Analyse mit der TRANSFAC-Datenbank detektierte das DR+4+2-Element des Promotors B als ein mögliches Estrogen-responsible-Element (ERE). Wie in Kapitel 4.4.4 gezeigt, bewirkt die Stimulation mit Estradiol, eines der drei wichtigsten Estrogene, eine vom Estrogenrezeptor abhängige Aktivierung des ubiquitären Promotors B. Die Promotoren A und C zeigten hingegen keine Regulation durch Estradiol. In der Literatur wird meist eine Bindung des Estrogenrezeptor (ER) als Monomer oder Homodimer an ERE postuliert, während einige wenige Autoren auch von Heterodimeren berichten (Übersicht: Klinge, 2001). Die natürlichen EREs können in ihrem Aufbau und ihrer Sequenz stark variieren. So werden auch EREs in Form eines DR+4 beschrieben (Mangelsdorf et al., 1995), was das DR+4+2-Element vom mGPDH-Promotor B als putatives ERE so interessant macht. Des Weiteren überlappt, wie in Abbildung 18 dargestellt, das DR+4+2-Element mit der SP1-Bindungsstelle. In vielen neueren Arbeiten wird die Estrogeninduktion auch über einen SP1-ER α -Komplex beschrieben (Vyhlidal et al., 2000; Xie et al., 1999; Duan et al., 1998; Wang et al., 1998). Dabei bindet der SP1-ER α -Komplex an ein DNA-Element, welches eine SP1-Erkennungssequenz in der Nachbarschaft zu einer ER α half-site enthält. Solche Mechanismen wären auch für die rezeptorabhängige Aktivierung des ubiquitären Promotors durch Estradiol denkbar gewesen. Überraschenderweise bewirkte die Mutation einzelner oder auch aller drei half-sites des DR+4+2-Elements und somit auch der SP1.5-Bindungsstelle keine Verminderung der Estradiolstimulation (siehe Abb. 20). Das DR+4+2-Element ist damit für die Estradiolresponsibilität der mGPDH unerheblich. Die schnelle Genexpression der mGPDH durch Estradiol spricht eher gegen einen indirekten Regulationsweg, bei dem zuerst ein anderer Transkriptionsfaktor synthetisiert werden muss, sondern für einen direkten Regulationsweg. In den Arbeiten von Porter et al. (1997) und Saville et al. (2000) wird ein direkter Weg der Estrogenrezeptor-abhängigen Transkription beschrieben, der unabhängig von Estrogen-responsible-Elementen ist. Dabei bildet sich ein Komplex aus SP1 und ER α ,

der an GC-reiche Promotorelemente bindet und nach Anlagerung des Liganden die Transkriptionsmaschinerie aktiviert. Auch mit anderen Kernrezeptoren wurden diese Interaktionen mit SP1-Proteinen und GC-reichen Elementen beschrieben (Shimada, et al., 2001). Solch ein direkter HRE-unabhängiger Weg wäre auch bei der Estrogenstimulation des ubiquitären mGPDH-Promotors denkbar.

Es muss jedoch bei der Beurteilung der hier vorgestellten Ergebnisse berücksichtigt werden, dass die transienten Transfektionen unter artifiziellen Bedingungen durchgeführt wurden und ihre Aussagen nicht ohne Weiteres auf ein weit komplexeres *in vivo* System übertragen werden können. Die Cotransfektion von Kernrezeptoren bewirkt ihre Expression in unphysiologisch hoher Konzentration und könnte so die beobachteten Interaktionen gewissermaßen erzwingen. Um eine Aussage über die physiologische Estrogen-induzierte mGPDH-Regulation machen zu können, müssten weitere Untersuchungen auf anderen Ebenen unternommen werden.

5.4.2 Das regulatorische DR+4+2-Element als mögliches RARE

Wie in Punkt 4.5.1.1 gezeigt, sind nur die ersten beiden half-sites (DR+4) an der T3-Induktion beteiligt, während die dritte half-site für die Aktivierung durch T3 keine bedeutende Rolle spielt. Es existieren Gene mit ähnlichen Hormon-responsiblen Elementen, die als Retinsäurerezeptor-responsible-Elemente (RARE) fungieren und eine Aktivierung durch all-trans Retinsäure zeigen. So besitzt der Promotor der humanen Typ I 5'-Deiodinase auch ein DR+4+2-Element, bei dem der DR+2-Part eine wichtige Rolle bei der rezeptorabhängigen RA-Regulierung spielt (Jakobs, 1997). Auch beim Myeloperoxidase-Gen mit seinem komplexen TRE aus vier half-sites in Form eines DR+2+4+2-Elements (Piedrafita, 1996), bildet die dritte half-site mit der benachbarten half-site ein DR+2-HRE, welches als RARE diskutiert wird. Retinsäurerezeptoren vermitteln die RA-Wirkung indem sie bevorzugt an DR+2-HRE oder auch DR+5-HRE mit dem Dimerisierungspartner RXR binden (Glass, 1994). Beim DR+4+2-HRE der mGPDH handelt es sich jedoch nicht um ein funktionelles RARE, denn die Promotoren zeigen keine Aktivierung durch all-trans Retinsäure (siehe Abb. 16) in transienten Transfektionen, während der als Kontrolle mitgeführte humane 5'-Deiodinase-Promotor eine signifikante Aktivierung zeigt.

5.4.3 Einfluss des Peroxisomenproliferators Clofibrat auf mGPDH

Die Aktivität der Ratten-mGPDH wird durch den Peroxisomenproliferator Clofibrat *in vivo* (Krishnakantha und Kurup, 1972) und *in vitro* (Shoemaker und Yamazaki, 1991) in Leberzellen gesteigert. Peroxisomenproliferatoren vermitteln ihre Wirkung auf die Genexpression rezeptorabhängig über Peroxisomenproliferatoren-responsible-Elemente (PPRE) (Vgl Punkt 1.1.1.). Bei der Stimulation der mGPDH-Aktivität durch Clofibrat wäre auch eine Vermittlung über das identifizierte HRE denkbar gewesen. Es zeigte jedoch keiner der drei mGPDH-Promotoren 24 Stunden nach Clofibrat-Applikation eine Aktivitätssteigerung (siehe Abb. 15). Die Versuchsbedingungen waren dabei so gewählt, dass sie eine Detektion der Clofibrataktivierung ermöglichten. So wurden HepG2-Zellen und ähnliche Transfektionsbedingungen angewendet, bei denen beispielsweise auch die Aktivitätssteigerung des humanen Apolipoprotein-Promotors durch Clofibrat detektiert werden konnte (Vu-Dac et al., 1995). Weiterhin wurde eine Clofibratkonzentration verwendet, die von Shoemaker und Yamazaki (1990) als optimal für eine Aktivitätssteigerung der mGPDH in primären Hepatozyten detektiert worden ist. Die beobachteten mGPDH-Enzymaktivitätssteigerungen beginnen dabei erst 72 Stunden nach Clofibrat-Applikation und erreichen ihr Maximum sogar erst nach 144 Stunden (Shoemaker und Yamazaki, 1990). Diese lange Zeit bis zum maximalen Anstieg der Aktivität spricht auch gegen einen direkten Weg über eine PPRE. Für Clofibrat und andere Peroxisomenproliferatoren werden auch PPAR-unabhängige Wirkmechanismen diskutiert, die z.B. auf zellulären Proteininteraktionen basieren (Okochi et al., 1999).

Die hier verwendeten Versuchsmethoden, insbesondere die transienten Transfektionen, scheinen also für die Untersuchung von späten hormonellen Effekten nicht geeignet zu sein. Es ist auch denkbar, dass die für den Clofibrat-Effekt regulatorisch verantwortliche Sequenz außerhalb des klonierten Promotorbereiches liegt und deshalb keine Aktivierung detektierbar ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Hormon-responsible-Element des ubiquitären mGPDH-Promotors die Wirkung von Schilddrüsenhormonen über TR vermittelt, aber keine Funktion bei der mGPDH-Aktivierung durch Estradiol und Clofibrat besitzt.

5.5 Molekularer Mechanismus der T3-abhängigen mGPDH-Regulation

In den bisher gezeigten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der mGPDH durch Schilddrüsenhormone über die Induktion der Genexpression erfolgt. Die T3-vermittelte mGPDH-Induktion erfolgt allein über den ubiquitären Promotor B durch eine direkte rezeptorabhängige Aktivierung mit einem funktionellem TRE. Der ubiquitäre Promotor zeigt nach 24 Stunden eine ca. 3fache Erhöhung seiner Aktivität durch T3 (siehe Abb. 13). Die direkte Induktion wird auch durch den schnellen Anstieg der mRNA nach T3-Applikation in der Leber bestätigt (Dümmler et al., 1996). Die von Müller (1995) detektierten mRNA-Änderungen in Lebern aus euthyreoten und hyperthyreoten Tieren (~6fach) korrelieren außerdem mit der hier detektierten Erhöhung der mGPDH-Proteinkonzentration (~7fach) (siehe Abb. 24) und mit dem gemessenen Anstieg der mGPDH-Enzymaktivität (Müller, 1995). Die mGPDH ist somit eines der ersten mitochondrialen Enzyme, bei dem eine direkte Induktion durch T3 nachgewiesen wurde.

5.6 T3-vermittelte mGPDH-Proteininduktion in der Leber

Der Effekt der T3-Induktion auf die mGPDH-Proteinkonzentration in der Leber wurde *in vivo* untersucht. Mit Hilfe der Western-Blot-Methode wurde bei der Analyse von gleicher Menge Gesamtprotein in hyperthyreoten Tieren eine 3fach (24 h nach T3-Gabe) bis zu 7fach (48h nach T3-Gabe) höhere mGPDH-Konzentration im Vergleich zu den euthyreoten Tieren detektiert (siehe Abb. 24).

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei primären Hepatozyten durch T3 keine Erhöhung der Proteinkonzentration (siehe Abb. 27). In der Literatur werden öfter Unterschiede zwischen den *in vivo* und *in vitro* Effekten von T3 beschrieben. Dabei wird als Ursache die Inaktivierung leberspezifischer Transkriptionsfaktoren (Clayton und Darnell, 1983) oder der Verlust der biologischen Aktivität verschiedener Kernrezeptoren während der Zellkultur diskutiert (Yamamoto et al., 1992). Zum Beispiel konnte bei dem T3-abhängigen Spot-14-Rattenpromotor erst nach der Cotransfektion der Schilddrüsenhormonrezeptoren in primären Hepatozyten eine Stimulierung der Promotoraktivität durch T3 gemessen werden (Zilz et al., 1990).

Die Leber besteht zwar zu 65% aus Hepatozyten, doch die komplexen Funktionen dieses Organs resultieren aus der Interaktion der verschiedenen Zelltypen der Leber (Rojkind und

Greenwel, 1988). Denkbar ist deshalb auch, dass bei den Hepatozyten keine Effekte zu detektieren sind, weil es sich um ein Einzelzellkultursystem handelt und die T3-Effekte durch Interaktionen entstehen, die nur im ganzen Organ oder vielleicht sogar nur im ganzen Tier möglich sind. In isolierten Hepatozyten ist aber eine geringe Erhöhung der mGPDH-mRNA durch T3 detektierbar (Müller, 1995), was für einen intrazellulären Effekt spricht. Doch auch bei Untersuchungen der mRNA-Induktion wurde eine quantitative Diskrepanz zwischen der mGPDH-mRNA-Mengenerhöhung durch T3 in permanenten Hepatozyten (Erhöhung ~2fach) und *in vivo* in der Leber (Erhöhung ~10fach) (Dümmler et al., 1996) detektiert. Unterschiedliche T3-Effekte zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten existieren auch hinsichtlich der mGPDH-Enzymaktivität. In permanenten Hepatozyten kommt es nur zu einem 1,8fachen Aktivitätsanstieg (Wilson und McMurray, 1981), während in der Leber ein drastischer Anstieg (10fach) der Aktivität beschrieben wird (Lee und Lardy, 1965). Es sind somit andere Regulationsmechanismen denkbar oder noch weitere, bisher unbekannte Faktoren beteiligt.

5.7 Vergleich der T3-Responsibilität der humanen mGPDH und der mGPDH der Ratte

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Schilddrüsenhormone die Aktivität des ubiquitären Ratten mGPDH-Promotors steigern. Der orthologe humane mGPDH-Promotor hingegen wird nicht durch T3 reguliert (Urcelay et al., 2000). Die Aktivitätssteigerung des Rattenpromotors wird rezeptorabhängig über ein DR+4-TRE vermittelt, welches nahe dem Transkriptionsstart liegt.

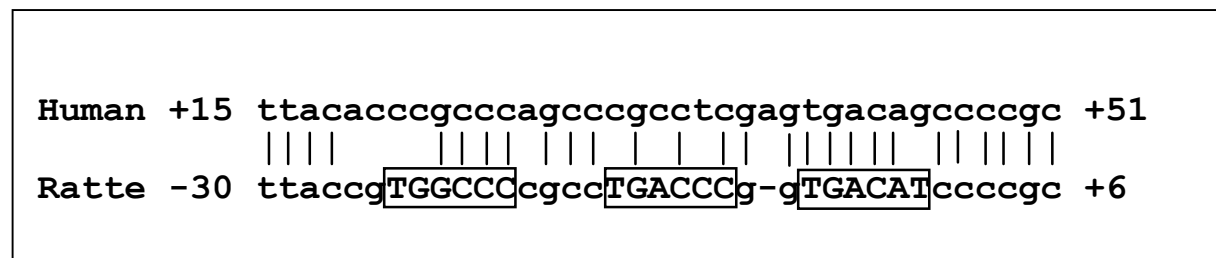


Abb. 30: Vergleich der orthologen mGPDH-Promotor B Sequenz von Ratte und Mensch.

Identische Nukleotide sind durch einen Strich verbunden. Die Nummerierung bezieht sich auf den jeweiligen Transkriptionsstart, der eins gesetzt wurde. Die half-sites des DR+4+2-Elements sind umrandet.

Der Vergleich der Ratten- mit der humanen Sequenz in diesem Bereich (siehe Abb. 30) zeigt deutlich die signifikanten Unterschiede in der orthologen Region zwischen den beiden Spezies. Der humane mGPDH-Promotor besitzt kein TRE und wird deshalb nicht durch T3 reguliert.

In diese Beobachtungen passen sich nun bisher unverständliche biochemische Befunde nahtlos ein:

- Bei humanen und Ratten-Adipozyten wird eine unterschiedliche Aktivitätssteigerung des mGPDH-Enzyms durch Schilddrüsenhormone beschrieben. In kultivierten humanen Adipozyten bewirkte T3 keine Aktivierung, in Ratten-Adipozyten hingegen eine 40%ige Steigerung (Urcelay et al., 2000).
- Befunde von Lardy zeigten, dass bei hypothyreoten Affen die hepatische mGPDH-Enzymaktivität durch T3 nicht gesteigert wurde (persönlich mitgeteilt), ebenso wie beim Menschen (Nolte et al., 1972). In Leberbiopsien von eu- bzw. hyperthyreoten Patienten zeigten sich identische mGPDH-Enzymaktivitäten, während die entsprechenden Werte für die Ratte eine 10fache Steigerung aufwiesen.

Die mGPDH ist damit einer der ersten beschriebenen Fälle einer differentiellen Regulation durch T3 zwischen den beiden Spezies.

Wenn damit für den Menschen auch die T3-abhängige Regulation der mGPDH widerlegt ist, behalten die in dieser Arbeit dargelegten Promotor-Befunde an der Ratte zur T3-abhängigen Regulation mitochondrialer Aktivität ihre grundsätzliche Bedeutung für den Menschen. Denn die T3-induzierte Steigerung des Energiestoffwechsels steht auch für den Menschen außer Frage und ist die Konsequenz nicht nur einer Aktivitätssteigerung der mGPDH, sondern des ganzen „Sets“ mitochondrialer Enzyme.

5.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte eindrucksvoll und eindeutig gezeigt werden, dass die Regulation der mGPDH der Ratte durch Schilddrüsenhormone über eine direkte rezeptorabhängige Kontrolle der Genexpression verläuft. Die Regulation wird dabei über den ubiquitären Promotor B durch ein Schilddrüsenhormon-responsible-Element vermittelt.

Aber nicht nur T3 sondern auch Estrogene aktivieren den ubiquitären mGPDH-Promotor. Die physiologische Relevanz dieses Befundes muss durch weitere Untersuchungen, z. B. an weiblichen Ratten nach einer Ovariectomie mit nachfolgender Estrogensubstitution, aufgezeigt werden.

Die Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen mGPDH in unserem Labor eröffnet ein weiteres spannendes Feld. Es lassen sich T3-abhängige Veränderungen am GPDH-Protein (wie z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung) untersuchen. Außerdem ist es nun möglich, eine zellspezifische Zuordnung des Enzyms in verschiedenen Geweben, beispielsweise eine Zonalisierung in der Leber, vorzunehmen.

Des Weiteren wäre es interessant, die Regulation der anderen beiden mGPDH-Promotoren (A, C) näher zu verstehen:

- Beispielsweise die genaue Analyse des hodenspezifischen Promotors C, der bisher lediglich in der Ratte identifiziert werden konnte und wahrscheinlich für die im Hoden extrem hohe mGPDH-Enzymaktivität verantwortlich ist.
- Die mGPDH spielt beim „Glucose-Sensing“ im endokrinen Pankreas eine zentrale Rolle. In diesem Gewebe ist der Promotor A aktiv und somit wäre es interessant, die Regulation dieses Promotors in pankreatischen Zellsystemen zu untersuchen und seinen Einfluss auf die Insulinsekretion zu verstehen. So zeigt sich eine reduzierte mGPDH-Aktivität bei Typ II Diabetikern und Nagermodellen für Diabetes in den Inselzellen. Die mGPDH gehört damit zu einer grossen Anzahl von Kandidatengen, denen eine Bedeutung bei der multifaktoriellen Entstehung des Diabetes mellitus Typ II zugeschrieben wird. Die Aufklärung ihrer molekularen Regulation, wie in dieser Arbeit beispielhaft für den mGPDH-Promotor aufgeführt, kann nach der (praktisch erfolglosen) Mutationssuche im mGPDH-Gen einen Beitrag zur Ursache der Fehlsteuerung der Insulinsekretion beim Diabetes Typ II liefern.

6 Zusammenfassung

Die mitochondriale FAD-abhängige Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (mGPDH) (E.C. 1.1.99.5) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Glycerolphosphat-Shuttle, der cytosolische Reduktionsäquivalente aus der Glycolyse in die mitochondriale Atmungskette transferiert. Sie hat somit eine grosse Bedeutung für den metabolischen Crosstalk zwischen Cytosol und Mitochondrium. Die gewebsspezifische Expression der mGPDH wird über drei alternative mGPDH-Promotoren (A, B, C) reguliert.

Ziel der Arbeit war es, die funktionelle und hormonelle Regulation dieser Promotoren am Beispiel der Ratte aufzuklären. Promotor B ist ubiquitär aktiv, während Promotor A im Gehirn, Braunen Fettgewebe und Pankreas benutzt wird und Promotor C einzig im Hoden aktiv ist. In den untersuchten Zellkultursystemen (Rat1, HepG2, HEK293) zeigte bei transienten Transfektionsexperimenten nur der Promotor B eine basale Aktivität, während Promotor A und C inaktiv blieben. Durch Mutations- und Band-Shift-Analysen stellte sich heraus, dass die ubiquitäre basale Genexpression des Promotors B über zwei funktionelle SP1-Bindungsstellen (lokalisiert: von -94 bis -82 und von -23 bis -11) gewährleistet wird.

Da die mGPDH ein klassisches Markerprotein für die Wirkung von Schilddrüsenhormonen (T3) ist, wurde ihre Regulation durch T3 auf molekularer Ebene untersucht. Es zeigte sich mittels transienter Transfektion, dass einzig Promotor B durch T3 reguliert wird. Parallel zu diesen Versuchen wurde die Stimulation durch Clofibrat, all-trans Retinsäure und Estradiol analysiert. Clofibrat und all-trans Retinsäure bewirkten bei keinem der drei mGPDH-Promotoren eine Aktivierung, während überraschenderweise Estradiol die Aktivität von Promotor B erhöhte. Der Effekt durch T3 wurde detaillierter untersucht. 5'-Deletionsanalysen von Promotor B zeigten, dass eine unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstarts gelegene 187bp große DNA-Sequenz ausreicht, um eine Schilddrüsenhormonresponsibilität aufzuweisen. Innerhalb dieses Bereichs wurde ein putatives Schilddrüsenhormon-responsibles Element (TRE) in Form eines ‚direct repeat +4+2‘-Element (DR+4+2) (-24/-1) nachgewiesen. Durch gezielte Mutationen konnte gezeigt werden, dass die T3-Regulation von Promotor B über das DR+4-Element (-24/-9) rezeptorabhängig vermittelt wird, während die rezeptorabhängige Estradiolstimulation von diesem Element unabhängig ist. Weiterführende Untersuchungen belegen, dass der Schilddrüsenhormonrezeptor (TR) und der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an dem DR+4-TRE binden, die Bindung erfolgt bevorzugt als Heterodimer- aber auch als Homodimerkomplex.

Das DR+4-TRE überlappt mit einer funktionellen SP1-Bindungsstelle, was zu einer nachweislichen Konkurrenz zwischen den Kernrezeptoren (TR und RXR) und dem ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1 um die DR+4-Bindungsstelle führt. Diese Konkurrenz könnte ein Grund für die in der Literatur beschriebene unterschiedliche T3-Responsibilität in den verschiedenen Rattengeweben sein.

Die Analyse des T3-Effekts auf die hepatische mGPDH-Proteinkonzentration mittels Western-Blot-Methode zeigte, dass parallel zum Anstieg der spezifischen mRNA auch die mGPDH-Proteinkonzentration *in vivo* durch Schilddrüsenhormone nach 24 Stunden auf das 3fache und nach 48 Stunden auf das 7fache erhöht wird.

Während in der Ratte erstmals die mGDPH-Induktion durch T3 über die direkte rezeptorabhängige Genexpression mittels eines Schilddrüsenhormon-responsiblen-Elements nachgewiesen werden konnte, zeigte der orthologe humane mGPDH-Promotor überraschenderweise keine Aktivierung durch T3. Dies ist der erste beschriebene Fall einer differenzierten T3-abhängigen Genregulation zwischen Ratte und Mensch.

6 Summary

The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPDH) (E.C. 1.1.99.5) catalyzes the rate-limiting step of the glycerol phosphate shuttle, which transfers reduction equivalents from the cytosol to the mitochondrial respiratory chain. The gene of mGPDH expression is regulated in a tissue-restricted manner through three mGPDH-promoters.

The aim of this work was to analyse the functional und hormonal regulation of these multiple rat promoters. Promoter B is ubiquitously active, while promoter A is used in the brain, brown adipose tissue and pancreas, and promoter C is proved to be testis-specific. Using of transient transfection analyses in the examined cell culture systems (RatI, HepG2, HEK293) only promoter B showed a detectable activity, while promoters A and C remained inactive. Mutation and electrophoretic mobility shift analyses showed that the basal promoter B activity is ensured over two functional SP1-recognition sites (from -94 to -82 and from -23 to -11).

mGPDH serves as a classical marker of thyroid hormone (T3) mediated action and their regulation was examined on molecular level. Transient transfection experiments demonstrated that only Promotor B was induced by T3. Furthermore, other possible regulators were studied e. g. clofibrate, all-trans-retinoic acid and estradiol. Clofibrate und all-trans-retinoic acid had no effects on the three mGPDH promoter activities. Surprisingly estradiol increased the activity of promoter B. The effect by T3 was examined in more detail. Deletion mutation analyses of promoter B showed that a sequence from -187 to +109 is responsible for the stimulation by T3. A putative thyroid hormone-response element (TRE) (-24/+1) containing a 'direct repeat +4+2' form (DR+4+2) was detected in this promoter region. Site-directed mutation analyses showed that the T3 regulation via the DR+4 hormone-response element (-24/-9) is mediated in a receptor-dependent manner. In contrast, the receptor-dependent activation by estradiol is independent of this element. Electrophoretic mobility shift analyses indicated that the DR+4-TRE bind to the thyroid hormone receptor and the cis-retinoic acid receptor as homodimeric- and, preferentially, as heterodimeric-complex.

The DR+4-TRE overlaps with a functionally active SP1-recognition site, resulting in competition between the receptor (TR and RXR) and the ubiquitous transcription factor SP1 at the DR+4 element. This competition could explain the contradicting reports of different activation of mGPDH by T3 in different rat tissue.

In vivo analyses of T3 regulation of hepatic mGPDH protein levels showed that the mGPDH concentration is 3-fold higher after 24 hours and 7-fold higher after 48 hours compared to euthyroid rats.

While the rat mGDPH induction by T3 is regulated in a the receptor-dependent manner via a thyroid hormone-response element, the orthologous human mGPDH gene promoter appears not to be regulated by T3. This is the first reported case of a differentially thyroid hormone regulated gene promoter in rat and man.

7 Abkürzungen

A	Adenin
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzylsulfonylfluorid
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaar (-e)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
cGPDH	cytosolische Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
cpm	counts per minute
CREM- τ	cAMP-response-Element Modulator-tau
(d)dNTP	(Di)-Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
D1	humane Typ I 5'-Deiodinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	direct repeat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EC	Enzyme Commission
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratories
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ER	Estradiolrezeptor
ERE	Estrogen-responsible-Element
FAD/FADH ₂	Flavinadenin nucleotid (oxidierte/reduzierte Form)
FCS	Foetales Kälberserum
G	Guanin

h	Stunden
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethyl-piperazin- <i>N'</i> -2-Ethan-Sulfonsäure
HRE	Hormon-responsibles-Element
InvPal	Inverses Palindrom
k	Kilo
kDa	Kilodalton
LBD	Ligandenbindungs-Domäne
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mA	milliAmpere
mGPDH	mitochondriale Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase
min	Minuten
MOPS	4-Morpholinpropan-Sulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAD/NADH	Nikotinadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
N-CoR	Nuclear Receptor Corepressor
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	Palindrom
PBS	Phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF	Promotorfragment
PPAR	Peroxisomen-Proliferatoren-aktivierender Rezeptor
PPRE	Peroxisomen-Proliferatoren-responsibles-Element
RA	all-trans-Retinsäure
RAR	Retinsäurerezeptor
RARE	Retinsäure-responsibles-Element
RE	Responsibles-Element
RLU	relative Licht-Einheiten (light-units)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
R-Sätze	Gefahrenhinweise
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCR-1	Steroidrezeptor-Coaktivator-1
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SMRT	Silencing Mediator for RARs und TRs
S-Sätze	Sicherheitsratschläge
β-Gal	β-Galaktosidase
SUN-CoR	Small Ubiquitous Nuclear Corepressor
SV 40	simian virus 40
T	Thymin
T3	3,5,3'-Triiod-L-thyronin
T4	3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin
TBE	Tris-gepufferte Borsäure-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor
TRE	Schilddrüsenhormon-responsibles-Element
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyreotropin
U, Unit	Enzymeinheit
UTR	nichttranslatierte Region
V	Volt
VDR	Vitamin D3-Rezeptor

8 Literaturverzeichnis

- Alland, L., Muhle, R., Hou, H. J., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N. & DePinho, R. A. (1997) *Nature* **387**, 49-55.
- Anderson, M. L., Nordström, K., Demczuk, S., Harbers, M. & Vennström, B. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 4803-4810. Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M.-J. & O'Malley, B. W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8832-8836.
- Baniahmad, A., Köhne, A. C. & Renkawitz, R. (1992) *EMBO J.* **11**, 1015-1023.
- Baniahmad, A., Steiner, C., Köhne, A. C. & Renkawitz, R. (1990) *Cell* **61**, 505-514.
- Beato, M. (1991) *FASEB J.* **5**, 2044-2051.
- Blau, H. M. (1988) *Cell* **53**, 673-674.
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 544-546.
- Brent, G. A., Harney, J. W., Chen, Y., Warne, R. L., Moore, D. D. & Larsen, P. R. (1988) *Mol. Endocrinol.* **2**, 797-7998.
- Brent, G. A., Harney, J. W., Chen, Y., Warne, R. L., Moore, D. D. & Larsen, P. R. (1989) *Mol. Endocrinol.* **3**, 1996-2004.
- Brown, L. J., MacDonald, M. J., Lehn, D. A. & Moran, S. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14363-14366.
- Bücher, T. & Klingenberg, M. (1958) *Angew. Chem.* **70**, 551-570.
- Burnside, J., Darling, D. S., Carr, F. E. & Chin, W. W. (1998) *J. Biol. Chem.* **264**, 6886-6891.
- Cederbaum, A. I., Lieber, C. S., Beattie, D. S. & Rubin, E. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 763-781.
- Chaffee, R. R. J., Allen, J. R., Cassuto, Y. & Smith, R. E. (1964) *Am. J. Physiol.* **207**, 1211-1214.
- Chatterjee, V. K. K., Lee, J.-K., Rentoumis, A. & Jameson, J. L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9114-9118.
- Chen, H., Lin, R. J., Schlitz, R. L., Chakravarti, D. & Nash, A. (1997) *Cell* **90**, 569-580.
- Chen, J. D. & Evans, R. M. (1995) *Nature* **377**, 454-457.
- Clayton, D. F. & Darnell, J. E. (1983) *Mol Cell. Biol.* **3**, 1552-1561.

- Cole, E. S., Lepp, C. A., Holohan, P. D. & Fondy, T. P. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7952-7959.
- Crofts, L. A., Hancock, M. S., Morrison, N. A. & Eisman, J. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **95**, 10529-10534.
- Damm, K., Thompson, C. C. & Evans, R. M. (1989) *Nature* **336**, 593-597.
- Darnell, J. E. (1982) *Nature* **297**, 365-371.
- Dawson, A. G. (1979) *Trends Biochem. Sci.* **4**, 171-176.
- Desvergne, B. (1994) *Mol. Cell Endocrinol.* **100**, 125-131.
- deWet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helsinki, D. R. & Subramani, S. (1987) *Mol. Cell Biol.* **7**, 725-737.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. & Wahli, W. (1992) *Cell* **68**;879-887.
- Duan, R., Porter, W. & Safe, S. (1998) *Endocrinology* **139**, 1981-1990.
- Dukes, I. D., McIntyre, M. S., Mertz, R. J., Phillipson, L. H., Roe, M. W., Spencer, B. & Worley, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10979-10982.
- Dumczuk, S., Harbers, M. & Vennström, B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **90**, 2574-2578.
- Dümmeler, K., Müller, S. & Seitz, H.-J. (1996) *Biochem. J.* **317**, 913-918.
- Estabrook, R. W. & Sacktor, B. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 1014-1019.
- Eto, K., Suga, S., Wakui, M., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Taka, J., Aizawa, S., Noda, M., Kimura, S., Kasai, H. & Kadowaki, T. (1999 a) *J. Biol. Chem.* **274**, 25386-25392.
- Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y. & Kadowaki, T. (1999 b) *Science* **283**, 981-985.
- Evans, R. M. (1988) *Science* **240**, 889-895.
- Fernandez-Alvarez, J., Conget, I., Rasschaert, J., Sener, A., Gomis, R. & Malaisse, W. J. (1994) *Diabetologia* **37**, 177-181.
- Ferrer, J., Aoki, M., Behn, P., Nestorowicz, A., Riggs, A. & Permutt, M. A. (1996) *Diabetes* **45**, 262-266.
- Forman, B. M., Casanova, J., Raaka, B. M., Ghysdael, J. & Samuel, H. H. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 429-442.

- Fried, M. & Crothers, D. M. (1981) *Nucleic Acid Res.* **9**, 6505-6509.
- Garner, M. M. & Revzin, A. (1981) *Nucleic Acid Res.* **9**, 3047-3052.
- Gearing, K L., Göttlicher, M., Teboul, M., Widmark, E. & Gustafsson, J.-A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1440-1444.
- Giroix, M. H., Rasschaert, J., Bailbe, D., Leclercq-Meyer, V., Sener, A., Portha, B. & Malaisse, W. J. (1991) *Diabetes* **40**, 227-232.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M. G., Rose, D. W., Kurokawa, R., Kamei, Y., Xu, L., Torchia, J., Oliastro, M. H. & Westin, S. (1997) *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 602-605.
- Glass, C. K. (1994) *Endocr. Rev.* **15**, 391-407.
- Gong, D.-W., Bi, S., Weintraub, B. D. & Reitman, M. (1998) *DNA Cell Biol.* **17**, 301-309.
- Gong, Q., Brown, L. J. & MacDonald, M. J. (2000) *Biol. Chem.* **275**, 38012-38021.
- Graupner, G., Wills, K. N., Tzukerman, M., Zhank, X.-K. & Pfahl, M. (1989) *Nature* **340**, 653-656.
- Green, S. (1995) *Mutat. Res.* **333**, 101-109.
- Hamanka, R., Kohno, K., Segucchi, T., Okamwo, K., Morimoto, A., Oho, M., Ogato, J. & Kuwano, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13155-13160.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Söderström, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W.-M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenmann, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (1997) *Nature* **387**, 43-48.
- Hoch, F. L. (1962) *N. Engl. J. Med.* **266**, 446-452.
- Hoch, F. L. (1998) *J. Bioenerg. Biochem.* **30**, 511-532.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L. & Stallcup, M. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4948-4952.
- Hörlein, A. J., Näär, A. M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (1995) *Nature* **377**, 397-404.
- Izumo, S. & Mahdavi, V. (1988) *Nature* **334**, 539-542.
- Jakobs, T. C., Schmutzler, C., Meissner, J. & Köhrle, J. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247**, 288-297.
- Jekakumar, M., Tanen, M. R. & Bagchi, M. K. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 755-767.

- Jitrapakdee, S., Gong Q., MacDonald, M. J. & Wallace, J. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34422-34428.
- Kadonga, J. T. & Tjian, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5889-5893.
- Kato, S., Sasaki, H., Suzawa, M., Masushige, S., Tora, L. Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15**, 5858-5867.
- Kim, S.-W., Ahn, I.-M. & Larsen, P. R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4465-4477.
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. & Evans, R. M. (1992) *Nature* **358**, 771-774.
- Klinge, C. M. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 2905-2919.
- Klinge, C. M., Brolly, C. L., Bambara, R. A. & Hilf, R. (1997) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **63**, 283-301.
- Klingenberg, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* **13**, 247-252.
- Koza, R. A., Kozak, U. C., Brown, L. J., Leiter, E. H., MacDonald, M. J. & Kozak, L. P. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **336**, 97-104.
- Krieg, P.A. & Melton D.A. (1987) *Methods Enzymol.* **155**, 397-415.
- Krishnakantha, T. P. & Kurup, C. K. P. (1972) *Biochem. J.* **130**, 167-175.
- Kurakawa, R., Yu, V. C., Näär, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. (1993) *Genes Dev.* **7**, 1423-1435.
- Lämmli, U. K. (1970) *Nature* **272**, 680-685.
- Lazar, M. A. (1993) *Endocr. Rev.* **14**, 184-193.
- Lee, K.-L. & Miller, O. N. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 638-645.
- Lee, Y. P. & Lardy, H. A. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1427-1436.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. (1998) *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- MacDonald, M. J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8287-8290.
- MacDonald, M. J. (1990) *Diabetes* **39**, 1461-1466.
- MacDonald, M. J., Moran, S. M. & Simonson, G. D. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 305-308.
- Malaisse, W. J. (1992) *Int. J. Biochem.* **24**, 693-701.

- Malaisse, W. J. (1996) *Acta Diabetol.* **33**, 173-179.
- Mangelsdorf, D. J. & Evans R. M. (1995) *Cell* **83**, 814-850.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P & Evans R. M. (1995) *Cell* **83**, 835-839.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY)
- Marks, M. S., Hallenbeck, P. L., Nagata, T., Segars, J. H., Appella, E., Nikodem, V. M. & Ozato, K. (1992) *EMBO J.* **11**, 1419-1435.
- Miyamoto, T., Suzuki, S., & DeGroot, L. J. (1994) *Mol. Cell Endocrinol.* **102**, 111-117.
- Müller, S. & Seitz, H.-J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10581-10585.
- Müller, S.: Dissertation, FB Chemie, Universität Hamburg, 1995.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. & Evans, R. M. (1997) *Cell* **89**, 373-380.
- Nolte, J., Pette, B., Bachmaier, P., Kiefhaber, P., Schneider, H. & Scriba, P. C. (1972) *Europ. J. clin. Invest.* **2**, 141-149.
- Novials, A. Vidal, J., Franco, C., Ribera, F., Sener, A., Malaisse, W. J. & Gomis, R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 570-572.
- Ogryzko, W., Schlitz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. & Nakatani, Y. (1996) *Cell* **87**, 953-959.
- Okochi, E., Nishimaki-Mogami, T., Suzuki, K. & Takahashi, A. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* **1437**, 393-401.
- Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1995) *Science* **270**, 1354-1357.
- Österson, C. C., Abdel-Halim, S. M. Rasschaert, J., Malaisse-Lagae, F., Meuris, S., Sener, A., Efendic, S. & Malaise, W. J. (1993) *Diabetologia* **36**, 722-726.
- Perlmann, T., Rangarajan, P. N. Umesono, K. & Evans, R. M. (1993) *Genes Dev.* **7**, 1411-1422.
- Piedrafita, F. J., Molander, R. B., Vansant, G., Orlova, E. A., Phal, M. & Reynolds, W. F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 14412-14420.
- Porter, W. Saville, B., Hoivik, D. & Safe, S. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 1569-1580.
- Promega (1996): Protocols and Application Guide, 260-276.

- Ranjan, M., Wong, J. & Shi, Y.-B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24699-24705.
- Reddy, J. K., Goel, S. K., Nemali, M. R., Carrino, J. J., Laffler, T. G., Reddy, M. K., Sperbeck, S. J., Osumi, T., Hashimoto, T., Lalwani, N. D. & Rao, M. S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1747-1751.
- Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W., Wagner, R. L., West, B. L., Feng, W., Huber, R. C. J., Kushner, P. J., Nilsson, S., Scanlan, T. S., Fletterick, R. J., Schaufele, F. & Baxter, J. D. (1998) *Recent Prog. Horm. Res.* **53**, 351-355.
- Robry, D., Wolffe, A. P. & Wahli, W. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**, 329-347.
- Rojkind, M. & Greenwel, P. (1988) *The liver: biology and pathobiology* **73**, 1269-1285.
- Ruegamer, W. R., Westerfeld, W. W. & Richert, D. A. (1964) *Endocrinology* **75**, 908-916.
- Sanger, F., Niklen, S. & Coulsen, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 5463-5476.
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Lentz, A., Beug, H. & Vennström, B. (1989) *Nature* **324**, 635-640.
- Sap, J., Munoz, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H. & Vennström, B. (1986) *Nature* **340**, 242-244.
- Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J.-A. & Safe, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5379-5387.
- Schenkman, J. B., Richert, D. A. & Westerfeld, W. W. (1965) *Endocrinology* **76**, 1055-1061.
- Schoonjans, K., Staels, B. & Auwerx, J. (1996) *Biochem. Biophys. Acta* **1302**, 93-109.
- Schreck, R., Schnieders, F., Schmutzler, C. & Köhrle, J. (1994) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 791-798.
- Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L. J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M. J., Wollheim, C. B. & Rutter, G. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4895-4902.
- Shears, S. B. & Bronk, J. R. (1979) *Biochem. J.* **178**, 505-597.
- Shimada, J., Yasuhiro, S., Kim, S.-J., Wang, P.-C., Matsumura, M. & Kojima, S. (2001) *Mol. Endocrinol.* **15**, 1677-1692.
- Shiryayeva, N.: Dissertation, FB Medizin, Universität Hamburg, 2002.
- Shoemaker, R. L. & Yamazaki, R. K. (1991) *Biochem. Pharmacol.* **41**, 652-655.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y. & O'Malley, B. W. (1997) *Nature* **389**, 194-198.

- Strähle, U., Schmidt, A., Kelsey, G., Stewart, A. F., Cole, T. J., Schmid, W. & Schütz, G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6731-6735.
- Süßmuth, W., Höppner, W. & Seitz, H.-J. (1984) *Eur. J. Biochem.* **143**, 607-611.
- Taylor, A. H., Wishart, P., Lawless, D. E., Raymond, J. & Wong, N. C. W. (1996) *Biochemistry* **35**, 8281-8288.
- Topp, W. (1981) *Virology* **113**, 408-411.
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostraza, J., Kamei, Y. & Westin, S. (1997) *Nature* **387**, 677-684.
- Tugwood, J. D., Isseman, I., Anderson, R. G., Bell, K. R., McPheat, W. L. & Green, S. (1992) *EMBO J.* **11**, 433-439.
- Umesono, K. & Evans, R. M. (1989) *Cell* **57**, 1139-1156.
- Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C., & Evans, R. M. (1991) *Cell* **65**, 1255-1266.
- Urcelay, E., Jareno, M. A., Menaya, J., Parrilla, R., Ayuso, M. S. & Martin-Requero, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 7209-7217.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Tini, M., Vivat, V. & Chambon, P. (1998) *EMBO J.* **17**, 507-519.
- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.-C., Staels, B. & Auwerx, J. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 741-750.
- Vyhlidal, C, Samudio, I., Kladdé, M. P. & Safe, S. (2000) *J. Mol. Endocrinol.* **24**, 329-338.
- Wahli, W. & Martinez, E. (1991) *FASEB J.* **5**, 2243-2249.
- Walther, N., Lioutas, C., Tillmann, G. & Ivell, R. (1999) *Mol. Cell Endocrinol.* **152**, 37-45.
- Wang, F., Hoivik, D., Pollenz, R. & Safe, S. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 3044-3052.
- Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Guol, D. J. & Evans, R. M. (1986) *Nature* **324**, 641-646.
- Weiss, R. E., Xu, J., Ning, G., Pohlenz, J. & O'Malley, B. W. (1999) *EMBO J.* **18**, 1900-1904.
- Weitzel, J. M., Grott, S., Radtke, Ch., Kutz, S. & Seitz, H.-J. (2000) *Biol. Chem.* **381**, 611-614.
- Weitzel, J. M., Kutz, S., Radtke, Ch., Grott, S. & Seitz, H.-J. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 4095-4103.
- Werner, H. V. & Berry, M. N. (1974) *Eur. J. Biochem.* **42**, 315-324.

- Wilson, E. J. & McMurray, W. C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1157-1164.
- Wong, C.-W. & Privalsky, M. L. (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 5500-5510.
- Wood, W. M., Kao, M. Y., Gordon, D. F. & Ridgway, E. C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14840-14847.
- Xie, W., Duan, R. & Safe, S. (1999) *Endocrinology* **140**, 219-227.
- Yamamoto, N., Inoue, A., Takahashi, K., Li, Q., Nakamura, H., Tagami, T., Sasaki, S., Imura, H. & Morisawa, S. (1992) *Biochem. J.* **281**, 669-673.
- Yang, X. J., Ogryzko, W., Nishikawa, J., Howard, B. H. & Nakatani, Y. (1996) *Nature* **382**, 319-324.
- Yen, P. M., Darling, D. S., Charter, R. L., Forgione, M., Umeda, P. K. & Chin, W. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3565-3568.
- Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Näär, A. M. Kim, S. Y., Boutin, J. M., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (1991) *Cell* **67**, 1251-1266.
- Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. & Lazar, M. A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14400-14405.
- Zennaro, M. C., Keightley, M. C., Kotelevtsev, Y., Conway, G. S., Soubrier, F., & Fuller, P. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21016-21020.
- Zhang, C.-K., Kim, S., Horney, J. W. & Larsen, P. R., (1998) *Endocrinologie* **139**, 1156-1163.
- Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Chen, H. M. & Tenen, D. G. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**, 373-381.
- Zilz, N. D., Murray, M. B. & Towle, H. C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8136-8143.

9 Anhang

Primer für die in vitro Mutation der SP1-Bindungsstellen

SP1.1.-Mut	forward	5′ GATCATCCCCCGGGGAGAATTCGGCGCACGAGGGGAG	3′
	reverse	5′ CTCCCCTCGTGCGCCGAATTCTCCCCGGGGGATGATC	3′
SP1.2.-Mut	forward	5′ GCGGAGGCGCACGAGGGAATTCGGAAGTGGCCGGGAG	3′
	reverse	5′ CTCCCGGCCACTTCCGAATTCCTCGTGCGCCTCCGC	3′
SP1.3.-Mut	forward	5′ GAGGAGGAAGTGGCCGGAATTCGCATCGGCGGGCGGG	3′
	reverse	5′ CCCGCCCGCCGATGCGAATTCGGCCACTTCTCCTC	3′
SP1.4.-Mut	forward	5′ GGGAGGGGCATCGGCGGAATTCGCGATTACCGTGGC	3′
	reverse	5′ GCCACGGTAATCCGAGAATTCGCGCGATGCCCTCCCC	3′

Primer für die in vitro Mutation des DR+4+2-Elementes

Mut-1	forward	5′ GCGGGCGGGTCGGATTACCGGAATTCGCCTGACCCGG	3′
	reverse	5′ CCGGGTCAGGCGGAATTCGGTAATCCGACCCGCCCGC	3′
Mut-2	forward	5′ CGGATTACCGTCGCCCCGCCGAATTCGGTGACATCCCC	3′
	reverse	5′ GGGGATGACACCGAATTCGGCGGGGCCACGGTAATCCG	3′
Mut-3	forward	5′ CGTGGCCCCGCCTGACCCGGGAATTCCCCCGCGGCTC	3′
	reverse	5′ GAGCGCGCGGGGGAATTCCTGGGTCAGGCGGGGCCACG	3′
Mut-1.2.3	forward	5′ CCGGAATTCGCGCGAATTCGGGAATTCCCCCGCGCG	3′
	reverse	5′ CGCGCGGGGGAATTCCTGAATTCGGCGGAATTCGG	3′

Oligonukleotide für die Bandshift-Methode

SP1.1wt	5' CCCGGGGAGGCGGAGG 3' CCTCCGCCTCCGCGTG	3' 5'
SP1.1mut	5' CCCGGGGAGAATTCGGCGCAC 3' GGGCCCCTCTTAAGCCGCGTG	3' 5'
SP1.5wt	5' CCGGGTCAGGGCGGGGCCACGG 3' GGCCCAGTCCCGCCCCGGTGCC	3' 5'
SP1.5mut	5' CCGGGTCAGAATTCGCCACGC 3' GGCCCAGTCTTAAGCGGTGCG	3' 5'
SP1cons	5' GAGATTCGATCGGGGCGGGGCGAGCAGGA 3' AGCTAGCCCGGCCCGCTCGTCCTGGACT	3' 5'
DR+4+2	5' ACCGTGGCCCCGCCTGACCCGGTGACAT 3' ACCGGGGCGGACTGGGCCACTGTAGGGG	3' 5'

Wissenschaftliche Arbeiten

Veröffentlichungen

Weitzel, J. M., Grott, S., Radtke, Ch., Kutz, S. & Seitz, H.-J. (2000) Multiple promoters direct the tissue-specific expression of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biol. Chem.* 381, 611-614.

Weitzel, J. M., Kutz, S., Radtke, Ch., Grott, S. & Seitz, H.-J. (2001) Hormonal regulation of multiple promoters of the rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene. *Eur. J. Biochem.* 268, 4095-4103.

Abstracts/Kongresse:

Weitzel, J. M., Kutz, S., Radtke, C. & Seitz, H.-J.: Hormonal and tissue-specific expression of mGPDH. Second International Conference on Signal Transduction, Dubrovnik-Cavtat/Croatia, May 2000.

Kutz, S., Weitzel, J. M. & Seitz, H.-J.: Hormonal and tissue-specific regulation of rat mGPDH promoters. Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, München/Germany, October 2000.

Kutz, S., Weitzel, J. M. & Seitz, H.-J.: Hormonal regulation of rat mGPDH promoters. European Federation of Endocrine Societies, 5th European Congress of Endocrinology, Turin/Italy, June 2001.

Kutz, S., Weitzel, J. M. & Seitz, H.-J.: Hormonal regulation of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene promoters. 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Lissabon/Portugal, June/July 2001.

Kutz, S., Weitzel, J. M. & Seitz, H.-J.: Regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene expression by steroid-receptor-superfamily. 5th Joint Meeting of the Signal Transduction Society, Weimar/Germany, November 2001.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. H.-J. Seitz für die Aufnahme in seine Abteilung und für die anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. Marquardt danke ich für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Chemie.

Ich möchte mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Joachim M. Weitzel bedanken, der mir die Bearbeitung eines interessanten Themas überließ und für diese Arbeit ein wichtiger Berater und Diskussionspartner war.

Mein besonderer Dank gilt:

Christiane Radtke	für die nette Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung.
Angelika Harneit	für die vielen wertvollen Tips beim experimentellen Arbeiten und beim „Retten des Genitivs“.
Dr. Kerstin Pioch	für die hervorragende Unterstützung und Geduld beim Erstellen der Poster und Abbildungen.
allen Mitarbeitern	für die freundliche Zusammenarbeit.
Heidi Lösekann	für das Korrekturlesen der Arbeit.
Markus Mendach	für seine moralische Unterstützung

und besonders meiner Familie, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Sabine Kutz
geb. am 22. März 1972 in Hamburg

Schulausbildung:

1978 - 1982 Grundschule Friedrich-Frank-Bogen, Hamburg
1982 - 1991 Gesamtschule Bergedorf, Hamburg
Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

Studium:

01. 10. 1991 Beginn des Studiums der Chemie (Diplom) an der
Universität Hamburg
29. 04. 1994 Diplomvorprüfung
08. 09. 1998 Diplomhauptprüfung, Problemstellung der Diplomarbeit
„Induktion der Cyclooxygenase-2 durch 2,3,7,8 - Tetrachlor-
dibenzo-p-dioxin (TCDD) in Zellkulturen“ angefertigt in der
Abteilung für Toxikologie der Universität Hamburg
bei Prof. Dr. H. Marquardt
seit 02/1999 Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit

Weiterbildung:

05/1996 Sachkenntnisprüfung nach § 5 Chemikalien-
Verbotsverordnung
10/1997 Teilnahme an der „Einführung in den gewerblichen
Rechtsschutz“
10/1999 – 03/2000 Teilnahme an der „Einführung in die Betriebslehre für
NichtökonomInnen“
10/2000 – 03/2001 Betriebswirtschaftliches Anfängerseminar
04/2001 – 10/2001 Betriebswirtschaftliches Proseminar

Studienbegleitende Tätigkeiten:

10/1997 – 08/2002 Lehrbeauftragte an der Universität Hamburg im Fachbereich
Chemie für „Das kleine chemische Praktikum für Mediziner
und Nebenfächler“
02/1999 – 02/2002 Stipendiatin im Graduiertenkolleg 336 „Molekulare
Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel“ der
Deutschen Forschungsgemeinschaft

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und die Arbeit bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 19. August 2002

(Sabine Kutz)