

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.