

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie



**Untersuchungen zur Regulation des Natrium-Iodid-Symporters (NIS)
und der Thyreoperoxidase (TPO) durch die
*sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. oec. troph.

am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement

der Justus-Liebig-Universität Gießen

(Dekan: Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer)

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Christine Rauer

Gießen 2014

1. Gutachter: **Prof. Dr. Klaus Eder**

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Interdisziplinäres Forschungszentrum

Heinrich-Buff-Ring 26-32

35392 Gießen

2. Gutachter: **Prof. Dr. Uwe Wenzel**

Institut für Ernährungswissenschaft

Justus-Liebig-Universität Gießen

Interdisziplinäres Forschungszentrum

Heinrich-Buff-Ring 26-32

35392 Gießen

Datum der Disputation: 29.04.2014

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind in folgende wissenschaftliche Originalarbeiten eingegangen:

Ringseis R., Rauer C., Rothe S., Gessner D.K., Schütz L.M., Luci S., Wen G., Eder K. (2013) Sterol regulatory element-binding proteins are regulators of the NIS gene in thyroid cells. *Mol Endocrinol.* 27: 781-800.

Rauer C., Ringseis R., Rothe S., Wen G., Eder K. (2014) Sterol regulatory element-binding proteins are regulators of the rat thyroid peroxidase gene in thyroid cells. *PLoS One.* 9: e91265.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Die Schilddrüsenhormonsynthese.....	1
1.2 Die <i>sterol regulatory element-binding proteins</i> (SREBPs)	6
1.3 Erste Hinweise auf einen regulierenden Einfluss der SREBPs auf die Schilddrüsenhormonsynthese.....	9
1.4 Zielstellung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.2 Chemikalien.....	13
2.1.3 Substanzen für die Mikrobiologie.....	15
2.1.4 Substanzen und Lösungen für die Zellbiologie.....	15
2.1.5 Organismen.....	16
2.1.5.1 Bakterien.....	16
2.1.5.2 Zelllinien.....	16
2.1.6 Proteine.....	16
2.1.6.1 Antikörper für den <i>Immunoblot</i>	16
2.1.6.2 Antikörper für die ChIP.....	16
2.1.6.3 Enzyme.....	17
2.1.6.4 Protein-Größenmarker.....	17
2.1.7 Nukleinsäuren.....	17
2.1.7.1 siRNA.....	17
2.1.7.2 Vektoren.....	18
2.1.7.3 Oligonukleotide.....	18
2.1.7.3.1 Oligonukleotide für die PCR.....	18
2.1.7.3.2 Oligonukleotide für die Hybridisierung.....	21

2.1.7.3.3	Oligonukleotide für die Sequenzierung	24
2.1.7.4	DNA-Größenmarker.....	24
2.1.8	Reaktionssysteme (<i>Kits</i>).....	25
2.1.9	Puffer, Medien und Lösungen.....	25
2.1.9.1	Medien und Lösungen für die Mikrobiologie.....	25
2.1.9.2	Medien und Lösungen für die Zellbiologie.....	26
2.1.9.3	Puffer und Lösungen für die Molekular - und Proteinbiochemie.....	27
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1.1	Sterilisation.....	29
2.2.1.2	Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.1.3	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	30
2.2.1.4	Transformation von <i>E.coli</i> mittels Elektroporation	30
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
2.2.2.1.1	Miniplasmidpräparation	30
2.2.2.1.2	Midiplasmidpräparation	31
2.2.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.2.2.3	Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.2.4	Zielgerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese	32
2.2.2.5	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	33
2.2.2.6	Analytische Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	33
2.2.2.7	Präparation von DNA aus einer Agarosematrix	33
2.2.2.8	Hydrolytische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	34
2.2.2.9	Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden	34
2.2.2.10	Ligation von DNA.....	35
2.2.2.11	DNA-Sequenzierung	35
2.2.2.12	Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryoten Zellen.....	35
2.2.2.13	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA	36

2.2.2.14	Reverse Transkription von <i>messenger</i> RNA.....	36
2.2.2.15	<i>Real-Time</i> quantitative PCR.....	36
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	37
2.2.3.1	Kultivierung und Subkultivierung eukaryoter Zellen.....	37
2.2.3.2	Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryoter Zellen.....	38
2.2.3.3	Mykoplasmentest.....	39
2.2.3.4	Transiente Transfektion eukaryoter Zellen.....	39
2.2.3.4.1	Lipofektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen.....	39
2.2.3.4.2	Lipofektion von <i>small interfering</i> RNA-Duplexen in FRTL-5-Zellen.....	40
2.2.3.5	Messung der Radioiodidaufnahme in FRTL-5-Zellen.....	41
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	42
2.2.4.1	Präparation von nukleärer und zytosolischer Proteinfraction aus FRTL-5-Zellen.....	42
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten.....	42
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
2.2.4.4	Luziferase-Assay.....	44
2.2.4.4.1	<i>Firefly</i> -Luziferase-Assay.....	44
2.2.4.4.2	<i>Renilla</i> -Luziferase-Assay.....	45
2.2.4.5	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	45
2.2.4.5.1	Gekoppelte <i>in vitro</i> -Transkription/Translation von Proteinen.....	45
2.2.4.5.2	DIG-Markierung der Oligonukleotide.....	46
2.2.4.5.3	<i>Gel Shift</i> -Reaktion.....	46
2.2.4.5.4	Kompetitionsanalyse.....	46
2.2.4.5.5	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
2.2.4.5.6	Transfer und Fixierung der DNA-Sonden.....	47
2.2.4.5.7	Detektion mittels Chemilumineszenz.....	47
2.2.5	Immunologische Methoden.....	47
2.2.5.1	<i>Immunoblot</i>	47
2.2.5.2	Chromatin-Immunpräzipitation.....	49
2.2.6	Statistische Analyse.....	49

3.	Ergebnisse	50
3.1.	Herstellung der rekombinanten SREBPs	50
3.1.1	Klonierung der nukleären SREBPs.....	50
3.1.2	Nachweis einer Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen ...	52
3.2	Klonierung des Kontrollvektors 2xSRE-1-Luc.....	52
3.3	Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der SREBPs bei der transkriptionellen Regulation des NIS-Gens von <i>Rattus norvegicus</i>	53
3.3.1	Einfluss einer sterol-induzierten Inhibierung der SREBPs auf die NIS-spezifische Iodidaufnahme in FRTL-5-Zellen.....	53
3.3.2	Einfluss eines SREBP- <i>knockdowns</i> auf die Expression des NIS in FRTL-5-Zellen	54
3.3.3	Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des NIS-Gens von <i>Rattus norvegicus</i> durch die SREBPs	56
3.3.3.1	<i>In silico</i> -Analyse der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von <i>Rattus norvegicus</i> ..	56
3.3.3.2	Klonierung der NIS-Reportergenvektoren.....	58
3.3.3.3	Reportergenanalyse der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens in HepG2-Zellen	58
3.3.3.4	Analyse der proximalen SREBP-responsiven Region des NIS-Gens	60
3.3.3.5	Mutationsanalyse der 5'-untranslatierten Region des NIS-Gens	62
3.3.3.6	Transaktivierung des Konstruktes NIS 2xSRE+59 nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen.....	63
3.3.3.7	Reportergenanalyse der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens in FRTL-5-Zellen.....	63
3.3.3.8	Sequenzvergleich der 5'-UTR des NIS zwischen <i>Rattus norvegicus</i> und <i>Mus musculus</i>	64
3.3.3.9	Nachweis einer spezifischen <i>in vitro</i> -Bindung der nukleären SREBPs in der 5'-UTR des NIS-Gens.....	65
3.3.3.10	Nachweis einer spezifischen <i>in vivo</i> -Bindung der nukleären SREBPs in der 5'-UTR des NIS-Gens.....	67
3.4	Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der SREBPs bei der transkriptionellen Regulation des TPO-Gens von <i>Rattus norvegicus</i>	69
3.4.1	Einfluss eines SREBP- <i>knockdowns</i> auf die Expression der TPO in FRTL-5-Zellen....	69

3.4.2	Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des TPO-Gens von <i>Rattus norvegicus</i> durch die SREBPs	71
3.4.2.1	<i>In silico</i> -Analyse der 5'-flankierenden Region des TPO-Gens von <i>Rattus norvegicus</i> .	71
3.4.2.2	Klonierung der TPO-Reportergenvektoren.....	72
3.4.2.3	Reportergenanalyse der 5'-flankierenden Region des TPO-Gens in HepG2-Zellen.....	72
3.4.2.4	Untersuchungen zur <i>in vitro</i> -Bindung der nukleären SREBPs im ersten Intron des TPO-Gens.....	74
3.4.2.4.1	Analyse der intronischen SREBP-responsiven Region des TPO-Gens.....	74
3.4.2.4.2	Nachweis einer spezifischen <i>in vitro</i> -Bindung des nukleären SREBP-1c im ersten Intron (nt +635 bis +654) des TPO-Gens.....	77
3.4.2.4.3	Identifizierung weiterer SREBP-responsiver <i>cis</i> -Elemente im ersten Intron des TPO-Gens.....	79
3.4.2.5	Sequenzanalyse	82
3.4.2.6	Überprüfung des Transaktivierungspotenzials der identifizierten SREBP-responsiven Elemente des TPO-Gens in HepG2-Zellen.....	85
3.4.2.7	Nachweis einer spezifischen <i>in vivo</i> -Bindung der nukleären SREBPs im Intron des TPO-Gens.....	86
4.	Diskussion	88
4.1	Regulation des Natrium-Iodid-Symporters durch die SREBPs.....	88
4.2	Regulation der Thyreoperoxidase durch die SREBPs	95
4.3	Schlussfolgerung	99
5.	Zusammenfassung	100
6.	Summary	102
7.	Literaturverzeichnis	104

Abkürzungsverzeichnis

25-HC	25-Hydroxycholesterol
abs.	absolut
AC	Adenylatzyklase
ACC	Acyl-CoA-Carboxylase
ADD1	<i>adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1</i>
AIT	apikaler Iodidtransporter
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ALLN	N-Acetyl-Leucinal-Leucinal-Norleucinal
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar
BC-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Motiv
bHLH/bLZip	Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bZip	basisches Leucin-Zipper-Motiv
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
C _t	<i>cycle threshold</i>
CLS	Cell Lines Service
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
CRE	<i>cAMP-response element</i>
CYP51A1	Lanosterol-14 α -Demethylase
Δ 6D	delta-6-Desaturase
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DIT	3,5'-Diiodyrosin
DMSO	Dimethylsulfoxid

DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DUOX2	Dual-Oxidase 2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Elovl	<i>fatty acid elongase</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	Formaldehyd
FAS	Fettsäuresynthase
FKS	fötales Kälberserum
FOXO1	<i>forkhead box E1</i>
FRTL	<i>Fischer rat thyroid cell line</i>
Gly-L-Lys-Acetat	Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat
GPAT	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' balanced salt solution
hLDLR	humaner LDL-Rezeptor
HMGCR	HMG-CoA-Reduktase
hNIS	humaner NIS
hRluc	<i>Renilla reniformis</i> Luziferase-Reportergen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV-TK	<i>herpes simplex virus thymidine kinase</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
Insig	<i>insulin induced gene</i>
InvE-Box	invers orientierte E-Box
InvSRE	invers orientiertes SRE
IU	<i>international units</i>
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor

LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Luziferase
LXR	<i>liver X receptor</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
ME	<i>malic enzyme</i>
minP	Minimalpromotor
MIT	3-Monoiodtyrosin
mNIS	NIS der Maus
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTPO	TPO der Maus
mut	mutiert
NF-1	<i>nuclear factor-1</i>
NF-Y	<i>nuclear transcription factor Y</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
nm	Nanometer
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
NKS	neonatales Kälberserum
NPF	nukleäre Proteinfraction
ns	nicht spezifisch
nSREBP-1/-2	nukleäre Form von SREBP-1/-2
nt	Nukleotid
NTF-1	<i>NIS TSH-responsive factor-1</i>
NUE	<i>NIS-upstream enhancer</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAX-8	<i>paired box 8</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLB	Passive Lysis Buffer
pSREBP-1/-2	Vorläuferform von SREBP-1/-2
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RLU	relative Lichteinheiten

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rNIS	NIS der Ratte
RT	Raumtemperatur
rTPO	TPO der Ratte
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
S1P	<i>site-1 protease / site-2 protease</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCAP	<i>SREBP-cleavage activating protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC5A	<i>solute carrier family 5A</i>
Sp-1	<i>specificity protein-1</i>
SRE	<i>sterol regulatory element</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SSD	sterolsensitive Domäne
T ₃	L-3,5,3'-Triiodthyronin
T ₄	L-3,5,3',5'-Tetraiodthyronin
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase
Tg	Thyreoglobulin
TC-H ₂ O	<i>tissue culture water</i>
TM7SF2	3β-Hydroxysterol Δ ¹⁴ -Reduktase
TPO	Thyreoperoxidase
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor (<i>thyroid hormone receptor</i>)
TRE	<i>thyroid hormone response element</i>
TRH	Thyreotropin <i>releasing</i> Hormon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TEN	Tris-EDTA-NaCl

TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
TSHR	TSH-Rezeptor
TTF-1/-2	<i>thyroid transcription factor-1/-2</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
ZPF	Zytosolische Proteinfraction

1. Einleitung

Die iodhaltigen Schilddrüsenhormone L-3,5,3'-Triiodthyronin (T_3) und sein Prohormon L-3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (T_4 , Thyroxin) sind essenzielle Mediatoren im Organismus, die für eine Vielzahl physiologischer Prozesse von Bedeutung sind. Unter anderem sind die Schilddrüsenhormone, speziell das biologisch aktive T_3 , für die Aufrechterhaltung einer metabolischen Homöostase sowie für Wachstums-, Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse unentbehrlich (Ribeiro *et al.*, 1995; Oetting und Yen, 2007). Aus diesem Grund ist eine Imbalance im Schilddrüsenhormonstatus mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert und von besonderem klinischen Interesse (Boelaert und Franklyn, 2005; Neves *et al.*, 2008; Tarım, 2011). Neue Strategien bei der Therapie von Schilddrüsendysfunktionen erfordern daher ein grundlegendes Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Hormonsynthese zugrundeliegen. Mit dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Aufklärung eines neuen molekularen Regulationsweges der für die Schilddrüsenhormonsynthese essenziellen Proteine Natrium-Iodid-Symporter (NIS) und Thyreoperoxidase (TPO) geliefert werden.

1.1 Die Schilddrüsenhormonsynthese

In den funktionellen Einheiten der Schilddrüse, den sogenannten Follikeln, werden die Schilddrüsenhormone synthetisiert und gespeichert. Jeder Follikel ist aus einer einschichtigen Lage Epithelzellen (Thyreozyten) aufgebaut, die das Kolloid-gefüllte Follikellumen begrenzen. Die Hauptkomponente des Kolloids bildet das Glykoprotein Thyreoglobulin (Tg), an dem die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 und deren inaktive Vorstufen 3-Monoiodyrosin (MIT) und 3,5'-Diiodyrosin (DIT) gebunden vorliegen (Abb. 1). Damit stellt das Kolloid, als Matrix für iodiniertes Tg, den zentralen Speicher für die Schilddrüsenhormone und Iod dar (Bizhanova und Kopp, 2009; Brent, 2012). An der äußeren basolateralen Plasmamembran der Thyreozyten wird ein Iodid-Ion im Kotransport mit zwei Natrium-Ionen sekundär aktiv in die Thyreozyten aufgenommen. Für den initialen Schritt der Schilddrüsenhormonsynthese ist der NIS verantwortlich (Abb. 1), ein integrales Plasmamembranprotein der *solute carrier family 5A* (SLC5A) (Dai *et al.*, 1996; Eskandari *et al.*, 1997; Mian *et al.*, 2001; Wright und Turk, 2004), der den aktiven Iodidtransport auch in einigen anderen Geweben, wie Magen, Dünndarm, Niere, Speicheldrüsen und laktierende Milchdrüse, vermittelt (Jhiang *et al.*, 1998; Spitzweg *et al.*, 1998 und 2001; Tazebay *et al.*, 2000; Perron *et al.*, 2001; Nicola *et al.*, 2009). Alle Mitglieder der SLC5A-Familie benötigen einen elektrochemischen Natriumgradienten, um Anionen in die Zelle aufnehmen zu können. Im Falle des NIS wird dieser Na^+ -Konzentrationsgradient durch die

basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase erzeugt (Carrasco, 1993; Levy *et al.*, 1998; Dohán und Carrasco, 2003). Anschließend findet an der apikalen Membran der Iodidefflux unter Beteiligung von zwei Transportproteinen, dem Pendrin (Iodid/Chloridtransporter) und dem apikalen Iodidtransporter (AIT), ins Follikellumen statt (Royaux *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002; Gillam *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2004), wo die letzten entscheidenden Schritte der Schilddrüsenhormonsynthese von der apikal lokalisierten TPO katalysiert werden (Strum und Karnovsky, 1970; Edwards und Morrison, 1976) (Abb. 1). In Anwesenheit von H_2O_2 vermittelt die TPO die Oxidation des Iodids zu Iod und dessen Inkorporation in das Tg (Taurog *et al.*, 1970 und 1996; Pommier *et al.*, 1973), wobei das für die Redoxreaktion benötigte Kosubstrat H_2O_2 durch die ko-lokalisierte Dual-Oxidase 2 (DUOX2) bereitgestellt wird (De Deken *et al.*, 2000 und 2002; Moreno *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2010a). Aus der Iodiniierung der Tyrosylreste des Tg (Organifizierung) gehen die Vorstufen MIT und DIT hervor, deren Verknüpfung die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 ergeben (Coval und Taurog, 1967; Lamas *et al.*, 1972; Dème *et al.*, 1975 und 1976; Sugawara, 1985) (Abb. 1). Zur Freisetzung von T_3 und T_4 wird das iodinierte

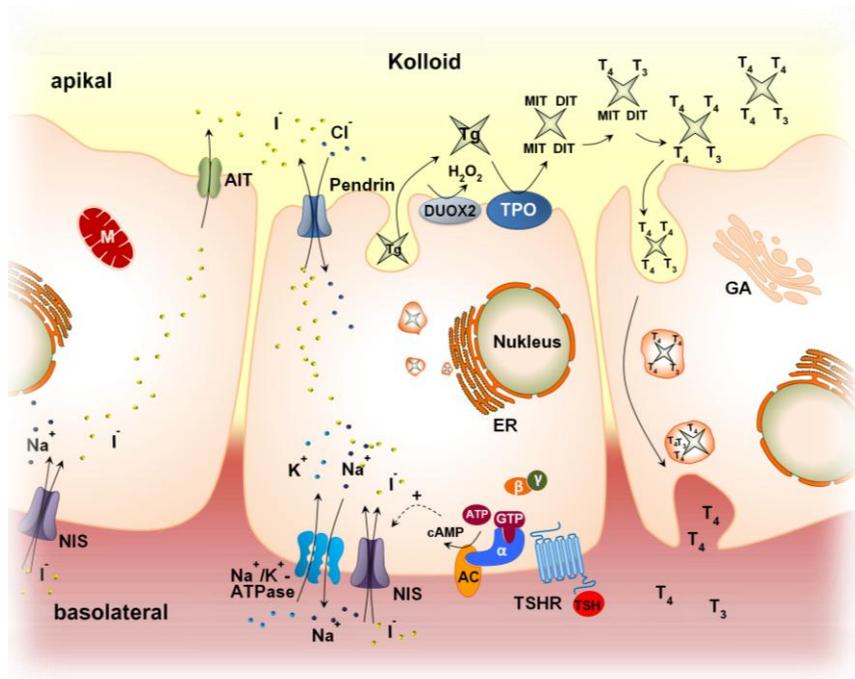


Abbildung 1: Synthese der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 im Thyreozyt. Nach Aktivierung des TSH-Rezeptors (TSHR) erfolgt an der basolateralen Membran des Thyreozyten die aktive Aufnahme des I^- durch den Natrium-Iodid-Symporter (NIS). Der hierfür erforderliche Na^+ -Konzentrationsgradient wird durch die ebenfalls basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase erzeugt. An der apikalen Membran findet der Iodidefflux ins Follikellumen statt, vermittelt durch Pendrin und dem apikalen Iodidtransporter (AIT). Die apikal lokalisierte Thyreoperoxidase (TPO) und die ko-lokalisierte Dual-Oxidase 2 (DUOX2) katalysieren die Oxidierung des I^- und die Iodiniierung der Tyrosylreste des Thyroglobulins (Tg), aus der die Schilddrüsenhormone hervorgehen. Bei Bedarf wird das iodinierte Tg durch Endozytose internalisiert, phagosomally hydrolysiert und anschließend ins Blut sezerniert (modifiziert nach Kogai *et al.*, 2012). AC, Adenylatcyclase; DIT, Diodotyrosin; ER, Endoplasmatisches Retikulum; GA, Golgi-Apparat; M, Mitochondrium; MIT, Monoiodotyrosin; T_3 , Triiodthyronin; T_4 , Tetraiodthyronin.

Tg an der apikalen Seite der Thyreozyten durch Endozytose internalisiert und in Phagolysosomen proteolytisch prozessiert. Unmittelbar danach wird das T₃ und T₄ unter Rückgewinnung von MIT und DIT an der basolateralen Membran der Thyreozyten in den Blutkreislauf sezerniert (Yen, 2001) (Abb. 1). Die Wirkung des T₃ wird über Schilddrüsenhormonrezeptoren (TRs) vermittelt, die der Familie der nukleären Rezeptoren angehören und als liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren agieren. Im Kern binden die TRs als Homodimere oder zusammen mit dem *retinoid X receptor* (RXR) als Heterodimere an die *thyroid hormone response elements* (TREs), die in der Promotorregion ihrer Zielgene lokalisiert sind (Evans, 1988; Song *et al.*, 2011). Bei Abwesenheit von T₃ liegt der homo- bzw. heterodimerisierte TR zunächst als Komplex mit Korepressorproteinen an den TREs gebunden vor und reprimiert die Transkription der Zielgene (Baniahmad *et al.*, 1992; Chen und Evans, 1995; Hörlein *et al.*, 1995; Ishizuka und Lazar, 2003). Durch Bindung des T₃ ändert sich die Konformation des TR, wodurch die Korepressoren vom TR dissoziieren und eine Interaktion mit Koaktivatoren ermöglichen, die die Transkription induzieren (Wagner *et al.*, 1995; Baniahmad *et al.*, 1995).

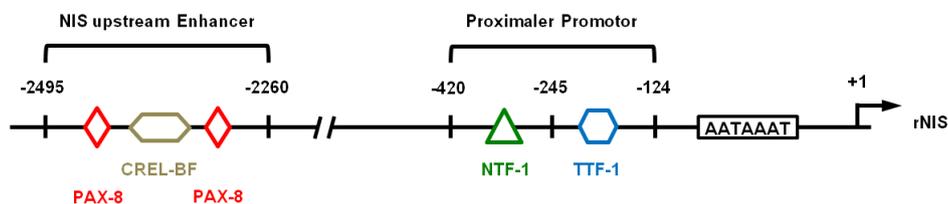
Der primäre hormonelle Regulator der Schilddrüsenfunktion ist das Thyreotropin (TSH, Thyreoidea stimulierendes Hormon), dessen übergeordneter Regulator das hypothalamische Hormon Thyreoliberin (TRH, Thyreotropin *releasing* Hormon) ist. Nach Stimulation durch TRH wird das in den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse synthetisierte TSH freigesetzt und gelangt über die Blutbahn zur Schilddrüse und anderen extrathyroidalen Geweben (Shupnik *et al.*, 1989; Vassart und Dumont, 1992; Chiamolera und Wondisford, 2009). Über den G-Proteingekoppelten TSH-Rezeptor (TSHR), der als transmembranäres Glykoprotein in der basolateralen Membran der Follikelzellen verankert ist (Allgeier *et al.*, 1994; Laugwitz *et al.*, 1996; Kero *et al.*, 2007), wird die physiologische Wirkung des TSH vermittelt. Durch Aktivierung des TSHR wird der intrathyroidale Iodmetabolismus über zwei Signaltransduktionswege reguliert: der Adenylatcyklase/cAMP/PKA-Kaskade und der PIP₂-Phospholipase C-Kaskade (Field *et al.*, 1987; Raspé *et al.* 1991; Laurent *et al.* 1987; Van Sande *et al.* 1990 und 2006). Letztere induziert die Hormonsynthese durch Stimulation des Iodideffluxes, der H₂O₂-Produktion und der Iodinierung des Tg. Die Adenylatcyklase/cAMP/PKA-Signalkaskade stimuliert hingegen die Synthese der schilddrüsenassoziierten Proteine Tg, TPO und NIS sowie die Hormonsekretion und die Iodidaufnahme (Weiss *et al.*, 1984a und 1984b; Chabaud *et al.*, 1988; Gérard *et al.*, 1989; Corvilain *et al.*, 1994; Kogai *et al.*, 1997; Saito *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2010b). Die Konsequenz aus all diesen Prozessen ist eine Zunahme an zirkulierendem T₃ und T₄, die wiederum die Freisetzung von TRH und TSH, im Sinne eines negativen *feedback*-Mechanismus, hemmen (Vassart und Dumont, 1992; Brent, 2012; Chiamolera und Wondisford, 2009).

Die Gene der Schilddrüsenhormonsynthese gliedern sich, aufgrund unterschiedlicher regulatorischer Bereiche, in zwei Subklassen. Der NIS repräsentiert gemeinsam mit dem TSHR eine dieser Subklassen, da diese Proteine nicht nur in der Schilddrüse, sondern auch in extrathyroidalen Geweben exprimiert werden. Der zweiten Subklasse, den schilddrüsen-spezifischen Genen, gehört die TPO und das Tg an, da diese Proteine ausschließlich in der Schilddrüse vorkommen (Christophe, 2004). Die gewebsspezifische Expression wird vor allem durch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren *paired box 8* (PAX-8), *thyroid transcription factor-1* (TTF-1), auch als *NK2 homeobox 1* (NKX2-1) bekannt, und *forkhead box E1* (FOXE1; früher TTF-2) erreicht, die selbst nicht schilddrüsen-spezifisch sind, jedoch in ihrer einzigartigen Kombination für die schilddrüsen-spezifische Genregulation bedeutsam sind (Damante *et al.*, 2001).

Die Expression des NIS wird primär durch TSH reguliert, welches auf transkriptioneller als auch posttranslationaler Ebene durch Aktivierung der Adenylatcyclase/cAMP/PKA-Kaskade Einfluss nimmt. Posttranslational stimuliert das TSH die Halbwertszeit des NIS-Proteins und dessen Translokation zur Plasmamembran (Riedel *et al.*, 2001). Auf transkriptioneller Ebene erfolgt die TSH-Induktion über zwei regulatorische Regionen im NIS-Gen, die speziesspezifisch reguliert werden. Unabhängig vom TSH-Stimulus wird der NIS auch auf basalem Niveau exprimiert, vermittelt durch den Minimalpromotor. Dieser minimale Promotorbereich ist in verschiedenen Zelltypen funktionell und verfügt über ein TATA-like Motiv sowie eine GC-Box, wobei letztere durch Interaktion mit dem *specificity protein-1* (Sp-1) bzw. Sp-1-like Protein zur vollständigen Basalaktivität des NIS-Promotors beiträgt (Tong *et al.*, 1997; Behr *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2002). Die beiden TSH-induzierbaren regulatorischen Regionen im NIS-Gen sind der proximale Promotor und der *NIS-upstream enhancer* (NUE) (Abb. 2A). Der proximale NIS-Promotor der Ratte (rNIS) enthält neben einem Bindungsmotiv für *NIS TSH-responsive factor-1* (NTF-1) zusätzlich ein Bindungsmotiv für TTF-1, die gemeinsam die TSH/cAMP-induzierte Transkription des NIS vermitteln (Endo *et al.*, 1997; Ohmori *et al.*, 1998) (Abb. 2A). Dagegen existieren im proximalen Bereich des humanen NIS-Promotors (hNIS) Bindungsmotive für NTF-1, TTF-1 und PAX-8, jedoch konnte weder für NTF-1 noch für TTF-1 eine Funktionalität im hNIS nachgewiesen werden (Kogai *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2001). Der NUE, der sowohl für das murine als auch für das humane NIS-Gen beschrieben wurde, ist für die schilddrüsen-spezifische Aktivierung erforderlich und verstärkt die Basalexpression (Ohno *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2002; Taki *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004). Der NUE des murinen NIS weist zwei PAX-8-Elemente auf, in deren Mitte sich eine *cAMP-response element* (CRE)-like Sequenz (TGACGCA) befindet (Ohno *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004) (Abb. 2A), wohingegen bei dem humanen NUE eines dieser PAX-8-Elemente fehlt (Taki *et al.*, 2002).

Die Regulation der schilddrüsenpezifischen TPO erfolgt hauptsächlich auf Ebene der Transkription und wird wie beim NIS primär über TSH durch Aktivierung der Adenylatcyclase/cAMP/PKA-Kaskade sowie durch Insulin und dem *insulin-like growth factor* (IGF) induziert (Gérard *et al.*, 1989; Zarilli *et al.*, 1990; Aza-Blanc *et al.*, 1993). Auch das TPO-Gen verfügt über zwei regulierende Bereiche: einen proximalen Promotor und einen Enhancer, die ausschließlich die schilddrüsenpezifische Transkription des TPO-Gens vermitteln (Kikkawa *et al.*, 1990; Francis-Lang *et al.*, 1992) (Abb. 2B). Der proximale Promotor der TPO weist drei Bindungsmotive für TTF-1 sowie jeweils ein Bindungsmotiv für PAX-8, FOXE1 und den *nuclear factor-1* (NF-1) auf (Abb. 2B), wobei insbesondere FOXE1 und NF-1 die wichtigsten hormonellen Mediatoren bei der transkriptionellen Regulation des TPO-Gens sind (Francis-Lang *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1997 und 1999). Beide Faktoren werden durch TSH/cAMP und Insulin auf transkriptioneller Ebene stimuliert, die wiederum nach Bindung an ihr *cis*-Element die Transkription des TPO-Gens induzieren (Ortiz *et al.*, 1999). 5,5 Kilobasen stromaufwärts vom Translationsstart (ATG) befindet sich die Enhancerregion (Kikkawa *et al.*, 1990). Darin sind zwei Bindungsmotive für TTF-1 und ein Bindungsmotiv für PAX-8 lokalisiert (Abb. 2B), die für die maximale Aktivierung des TPO-Gens erforderlich sind (Mizuno *et al.*, 1991; Esposito *et al.*, 1998).

A



B

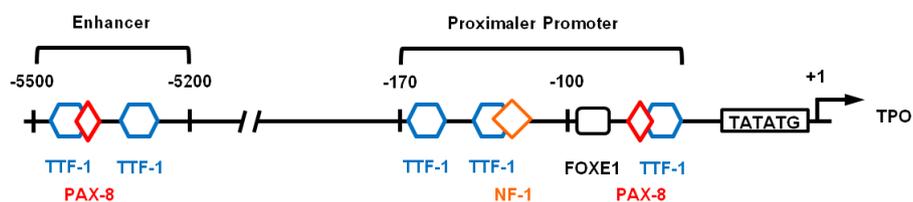


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Promotorstruktur des rNIS- und des TPO-Gens. Die regulatorischen Elemente des NIS (A) und der TPO (B) sind durch Symbole gekennzeichnet. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart, der mit +1 gekennzeichnet ist, dargestellt (modifiziert nach De La Vieja *et al.*, 2000).

1.2 Die *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs)

Die SREBPs werden im Säugetiergenom durch zwei Gene kodiert. Das Gen für SREBP-1 befindet sich im humanen Genom auf Chromosom 17p11.2 und kodiert für zwei Transkriptvarianten, die als SREBP-1a und -1c bekannt sind. Beide Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich in ihrem ersten Exon, aufgrund unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte im SREBP-1-Gen (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995a). Das Rattenhomolog des SREBP-1c wurde unabhängig von der humanen Variante durch Tontonoz *et al.* (1993) kloniert und aufgrund seiner Rolle bei der Adipozytendifferenzierung ursprünglich als *adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1* (ADD1) bezeichnet. Hinsichtlich ihrer Expression unterscheiden sich beide SREBP-1-Isoformen. In Organen, wie Leber und Fettgewebe, dominiert das SREBP-1c, dessen Expressionsprofil sich auch in seiner Funktion widerspiegelt. So reguliert das SREBP-1c primär den Fettsäurenmetabolismus, der vor allem im hepatischen Gewebe eine zentrale Rolle einnimmt (Shimomura *et al.*, 1997). Das SREBP-1a wird hingegen hauptsächlich in kultivierten Zellen exprimiert und ist in der Lage alle SREBP-responsiven Gene des Cholesterol-, Fettsäuren- und Triacylglyceridmetabolismus zu aktivieren (Horton *et al.*, 2002). Das auf Chromosom 22q13 des humanen Genoms lokalisierte SREBP-2-Gen kodiert für das dritte Mitglied der SREBP-Familie und wird wie das SREBP-1c hauptsächlich in fettstoffwechselaktiven Geweben exprimiert, reguliert hingegen primär Gene des Cholesterolmetabolismus (Hua *et al.*, 1993 und 1995a; Miserez *et al.*, 1997; Shimomura *et al.*, 1997).

Die SREBPs repräsentieren eine Subfamilie der basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (bHLH/bZip)-Proteine, die als Transkriptionsfaktoren das basische Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH) mit dem basischen Leucin-Zipper-Motiv (bZip) vereinen. Ihre Struktur ist innerhalb der bHLH/bZip-Familie einzigartig, da sie im Gegensatz zu den anderen Vertretern dieser Familie als membrangebundene, inaktive Vorläuferproteine vorkommen, die aus drei Domänen aufgebaut sind: (1) eine transaktivierende N-terminale Domäne; (2) eine mittlere membranüberspannende hydrophobe Region und (3) eine lange C-terminale regulatorische Domäne. Die im Zytoplasma lokalisierten N- und C-terminalen Domänen der SREBPs bilden zusammen mit den zwei transmembranären hydrophoben Helices und dem hydrophilen luminalen Loop eine Haarnadelstruktur, die über den mittleren hydrophoben Bereich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert ist (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1993; Tontonoz *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995b). Die inaktiven SREBPs bilden unmittelbar nach ihrer Synthese mit dem membrangebundenen *SREBP-cleavage activating protein* (SCAP) einen Komplex (Abb. 3). Das SCAP selbst nimmt eine zentrale Stellung bei der

Kontrolle der Cholesterolumhomöostase ein, da es als Eskort- und Sensorprotein fungiert. Die Eskortfunktion wird durch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen der C-terminalen *WD-repeat* Domäne des SCAP und der am C-Terminus lokalisierten regulatorischen Domäne der SREBPs ermöglicht. Die Sensorfunktion wird durch die aus acht transmembranären Helices bestehende N-terminale Domäne des SCAP vermittelt, die den intrazellulären Cholesterolgehalt erfasst. Insbesondere die Helices 2 bis 6 agieren hierbei als Sensor und bilden die sterolsensitive Domäne (SSD) (Hua *et al.*, 1996; Sakai *et al.*, 1997; Nohturfft *et al.*, 1998). Eine Schlüsselfunktion bei der Feedback-Regulation nimmt die Konformation des SCAP-Proteins ein. Ein Anstieg der intrazellulären Sterolkonzentration induziert eine Konformationsänderung des SCAP, wodurch die Interaktion mit einer weiteren membrangebundenen Proteinfamilie, den *Insulin induced genes* (Insigs), erfolgen kann (Abb. 3). Zusammen bilden diese drei Membranproteine einen stabilen Komplex, der in dieser Form in der ER-Membran verankert bleibt (Brown *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Yabe *et al.*, 2002). Bezüglich der Art des Sterols unterscheiden sich die Bindungspartner. Während Cholesterol direkt an die SSD des SCAP bindet, interagieren die oxidierten Derivate des Cholesterols, wie beispielsweise 25-Hydroxycholesterol (25-HC) mit den Insigs, woraus eine starke Assoziation mit dem SCAP resultiert (Adams *et al.*, 2004; Radhakrishnan *et al.*, 2004 und 2007).

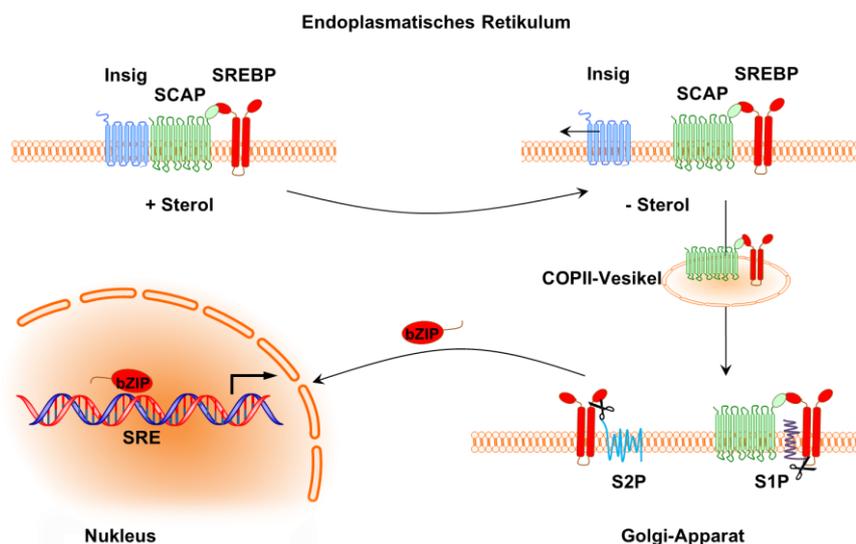


Abbildung 3: Sterol-abhängige Prozessierung der *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs). Bei erhöhten intrazellulären Sterolkonzentrationen bilden die SREBPs zusammen mit dem *SREBP-cleavage activating protein* (SCAP) und den *Insulin induced genes* (Insigs) einen stabilen membrangebundenen Komplex im Endoplasmatischen Retikulum. Nimmt die intrazelluläre Sterolkonzentration ab, dissoziiert der SCAP/SREBP-Komplex vom Insig und der vesikuläre Transport zum Golgi-Apparat kann erfolgen. Durch zwei membranständige Proteasen im Golgi-Apparat, der *site-1 protease* (S1P) und der *site-2 protease* (S2P), wird die transkriptionell aktive N-terminale Domäne (bZIP) freigesetzt und transloziert in den Kern, wo sie an die *sterol regulatory elements* (SREs) im Promotorbereich von SREBP-Zielgenen bindet und deren Transkription induziert (modifiziert nach DeBose-Boyd, 2008).

Umgekehrt führt das Absinken der intrazellulären Sterolkonzentration zu einer Dissoziation des SCAP/SREBP-Komplexes vom Insig, woraufhin der vesikuläre Transport zum Golgi-Apparat erfolgen kann (Nohturfft *et al.*, 2000; Espenshade *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007) (Abb. 3). Im Golgi findet die zweistufige proteolytische Freisetzung der transaktivierenden N-terminalen Domäne durch zwei membranständige Proteasen statt, die mit der serinhaltigen *site-1 protease* (S1P) am luminalen Loop beginnt. Hierdurch ändert sich die Konformation der ersten transmembranären Helix, sodass die zweite Schnittstelle, an der die zinkhaltige *site-2 protease* (S2P) ansetzen kann, freigelegt wird (Sakai *et al.*, 1996 und 1998; Duncan *et al.*, 1997 und 1998; Ye *et al.*, 2000) (Abb. 3). Nach Abspaltung der transkriptionell aktiven N-terminalen Domäne der SREBPs, wandert diese in den Kern und bindet dort an ihre spezifischen *cis*-Elemente im Promotorbereich von SREBP-responsiven Genen (Horton *et al.*, 2002) (Abb. 3).

Wie bei allen bHLH/bZip-Proteinen erfolgt die Bindung der transaktivierenden N-terminalen Domäne an die DNA über die basische Region des bHLH/bZip-Segmentes. Darüber hinaus können Homo- bzw. Heterodimerisierungen über die benachbarte HLH/bZip-Region vermittelt werden. Für die transaktivierende Eigenschaft der N-terminalen Domäne ist primär die saure Region am äußeren N-terminalen Ende verantwortlich, die zwischen den SREBP-Mitgliedern variiert (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1994). Aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl an sauren Aminosäureresten ergeben sich heterogene Wirkpotentiale. Insbesondere die SREBP-1-Isoformen unterscheiden sich, durch Verwendung verschiedener Exon 1-Transkripte, in der Länge ihrer Transaktivierungsdomäne. Infolge des verkürzten sauren Bereiches stellt SREBP-1c den schwächsten Aktivator dieser Transkriptionsfaktorfamilie dar (Shimano *et al.*, 1997).

Neben ihrer einzigartigen Struktur besitzen die SREBPs eine weitere Besonderheit, die sie von den klassischen bHLH/bZip-Proteinen unterscheiden. Während bHLH/bZip-Proteine E-Box-Sequenzen mit dem *inverted repeat* 5'-CANNTG-3' (N - beliebige Base) erkennen, sind SREBPs in der Lage sowohl die E-Box-Sequenz als auch Sequenzen mit dem *direct repeat* 5'-PyCAPy-3' (Py - Pyrimidinbase) zu erkennen. Die erste dieser als *sterol regulatory elements* (SREs) bezeichneten SREBP-responsiven Sequenzen wurde im humanen *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor (LDLR) beschrieben und ist seither als SRE-1 (5'-ATCACCCCAC-3') bekannt (Brown und Goldstein, 1997; Osborne und Espenshade, 2009). Verantwortlich für die duale Bindungsspezifität ist ein atypischer Tyrosinrest in der konservierten basischen Region des bHLH-Proteins der SREBPs, wohingegen die klassischen bHLH-Proteine der bHLH/bZip-Familie für gewöhnlich ein Argininrest aufweisen. Dieser Tyrosinrest erhöht die Beweglichkeit der DNA-Bindungsdomäne, wodurch die Erkennung von zwei verschiedenen DNA-

Sequenzhälften ermöglicht wird. Im Falle des SRE-1 setzt sich die Erkennungssequenz aus einer 5'-ATCAC-3' und 5'-GTGGG-3'-Sequenzhälfte zusammen. Da die SREBPs als Homodimere mit der DNA interagieren, kann das SREBP mit einem seiner Monomere an die E-Box-Hälfte des SREs (5'-ATCAC-3') oder an die nicht-E-Box-Hälfte (5'-GTGGG-3') und mit dem zweiten Monomer an die typische E-Box-Sequenz binden (Kim *et al.*, 1995; Párraga *et al.*, 1998).

Die bis dato identifizierten SREBP-responsiven Gene weisen stark variierende Bindungsmotive auf, die dennoch ein Muster erkennen lassen und aufgrund dessen in cholesterogene und lipogene Gene eingeteilt werden können (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002). Die cholesterogenen Gene, wie die HMG-CoA-Synthase, die Farnesyldiphosphatase-Synthase, die Squalensynthase oder der bereits erwähnte LDLR, weisen in ihren Promotorregionen die klassische SRE-Sequenz, d.h. eine von der SRE-1-Sequenz abgeleitete Variante, auf. Darüber hinaus befinden sich meist in unmittelbarer Nähe zum SRE weitere Bindungssequenzen für Kofaktoren, wie beispielsweise das Sp-1 und der *nuclear transcription factor Y* (NF-Y), die zur sterol-regulierten Transkriptionsaktivierung beitragen (Sanchez *et al.*, 1995; Ericsson *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1998). Dagegen sind die Bindungsmotive in den Promotorregionen von lipogenen Genen, wie die Fettsäuresynthase (FAS), die Acyl-CoA-Carboxylase (ACC), die Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) oder die Stearoyl-CoA-Desaturase-1 und -2, weniger einheitlich als das klassische SRE und werden aus diesem Grund als SRE-like-Sequenzen zusammengefasst (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002).

1.3 Erste Hinweise auf einen regulierenden Einfluss der SREBPs auf die Schilddrüsenhormonsynthese

Bekannt geworden sind die SREBPs als sterolsensitive Transkriptionsfaktoren, die die Fett- und Cholesterolumöostase der Zelle regulieren. Ihre Identifizierung erfolgte daher vornehmlich in Geweben, die durch eine hohe Fettstoffwechselaktivität, wie Leber, Darm, Fettgewebe und Milchdrüse, gekennzeichnet sind. Durch die Verwendung von verschiedenen Modellorganismen sowie Genomanalysen offenbarten sich jedoch neue Funktionen in den verschiedensten zellulären Prozessen, die über den Fett- und Cholesterolumetabolismus hinausgehen (Osborne und Espenshade, 2009). Aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen nun, dass die SREBPs ebenso in der Schilddrüse von Bedeutung sind (Rothe, Dissertation 2011). Im Rahmen der Untersuchungen von Rothe (2011) konnte nun erstmalig die Existenz der SREBPs in den Thyreozyten verschiedener Spezies belegt und darüber hinaus deren Funktionalität bestätigt werden. Dass die Schilddrüsenzelle zur Cholesterolsynthese und -aufnahme befähigt ist, zeigten bereits Grieco *et al.* (1990) und Bifulco *et al.* (1990) vor über zwanzig Jahren mit der

Identifizierung der HMG-CoA-Reduktase (HMGCR), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Cholesterolsynthese, und des LDLR. Darüber hinaus konnten Grieco *et al.* (1990) eine gesteigerte Expression und Aktivität der HMGCR nach TSH-Stimulation nachweisen. Auch das lipogene Enzym *malic enzyme* (ME) sowie die Triacylglyceridsynthese sind durch TSH induzierbar (Aloj *et al.*, 1990; Grieco *et al.*, 1990). Da die cholesterogenen Enzyme HMGCR und LDLR sowie das lipogene Enzym ME durch die damals noch unbekanntenen SREBPs reguliert werden, lag die Vermutung nahe, dass die SREBPs ebenso in der Schilddrüse eine Rolle spielen könnten. Für die Relevanz der SREBPs in der Schilddrüse spricht zudem ihre TSH-Abhängigkeit. Es konnte gezeigt werden, dass die SREBPs in den thyroidalen FRTL-5-Zellen über den TSH/TSHR/cAMP-Weg reguliert werden. Ferner konnte die TSH-abhängige Regulation der SREBPs in einem TSHR-*knockout*-Mausmodell immunhistochemisch veranschaulicht werden, da die Expression des SREBP-1/-2, infolge der gestörten TSH/TSHR/cAMP-Kaskade, deutlich vermindert war (Ringseis *et al.*, 2013). TSH stellt den wichtigsten hormonellen Regulator der Schilddrüsenfunktion dar und ist für die schilddrüsenpezifischen Proliferations- und Differenzierungsprozesse unabdingbar (Vassart und Dumont, 1992). Im Zuge dieser Zellproliferationsprozesse werden Lipide als strukturelle Komponente von Membranen benötigt, darüber hinaus dient das bei der Cholesterolsynthese gebildete Zwischenprodukt Mevalonat als Vorstufe für viele nicht-steroidale Isoprenoide, die für die DNA-Replikation von Bedeutung sind (Grieco *et al.*, 1990). Vor diesem Hintergrund erscheint es als plausibel, dass TSH ebenso die Expression der SREBPs induziert, um in Situationen erhöhten Bedarfs die benötigten Lipide bereitstellen zu können. Daneben konnte noch eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Rothe (Dissertation 2011) konnte erstmals eine Beeinflussbarkeit der schilddrüsenassoziierten Proteine NIS und TPO durch die SREBPs aufzeigen. Untersucht wurden hierbei die Isoformen SREBP-1c und SREBP-2, deren Ausreifung zu den transkriptionell aktiven Proteinen sterol-abhängig inhibiert wurde. Die Abnahme an aktiven SREBP-1c und SREBP-2 war mit einer verminderten Expression des NIS und der TPO assoziiert, eine Beobachtung, die bereits für zahlreiche andere SREBP-Zielgene beschrieben wurde (Bennett *et al.*, 1995; Tabor *et al.*, 1998; Nagasaki *et al.*, 2009; Daimiel *et al.*, 2012). Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, unterliegen die Gene des NIS und der TPO einer komplexen hormonellen Regulation, hauptsächlich unter Mitwirkung der Transkriptionsfaktoren PAX-8, TTF-1 und FOXE1. Neben der beschriebenen endogenen hormonellen Stimulation können ebenso exogene Stimuli Einfluss auf die Gene des NIS und der TPO nehmen. Erst kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Nicola und Nazar (2010 und 2012) zeigen, dass das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) den stressresponsiven Transkriptionsfaktor *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) aktiviert, der wiederum durch Interaktion mit seinem κ B-Element die Transkription des NIS und der TPO induziert. Das Potenzial von exogenen

Stressoren, wie eine bakterielle Infektion, in die Synthese der Schilddrüsenhormone einzugreifen, sehen die Autoren als möglichen Faktor bei der Entstehung von Schilddrüsendysfunktionen (Nicola *et al.*, 2010; Nazar *et al.*, 2012). Bereits in den Jahren 2006/2007 gab es erste Indizien, dass auch nutritive Faktoren als exogene Stimuli Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese nehmen können. So führte die Verabreichung einer hypercholesterolämischen Diät bei Ratten, neben der erwarteten Hypercholesterolämie, zu einer Absenkung der T₃- und T₄-Spiegel im Serum, deren Ursache zum damaligen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt wurde (Jatwa und Kar, 2006; Parmar und Kar, 2007). Mit der Identifizierung funktioneller SREBPs in den Thyreozyten der Schilddrüse konnte nun erstmals ein Erklärungsansatz für die sterol-induzierte Hypothyreose geliefert werden, die von Jatwa und Kar (2006) sowie Parmar und Kar (2007) beschrieben wurde.

1.4 Zielstellung der Arbeit

In den *in vitro*-Studien von Rothe (Dissertation 2011) wurden die SREBPs als potenzielle Regulatoren der schilddrüsenassoziierten Gene NIS und TPO identifiziert. Ein wesentliches Charakteristikum der SREBP-Isoformen ist ihre posttranslationale Modifikation, das heißt ihre sterol-abhängige Prozessierung vom membrangebundenen inaktiven Vorläuferprotein zum sequenziell gespaltenen aktiven Transkriptionsfaktor. Die Frage zur isoformspezifischen Regulation der Gene NIS und TPO konnte daher nicht eindeutig beantwortet werden, da beide SREBP-Isoformen auf gleiche Weise auf die Gabe von Sterolen reagierten.

Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung von SREBP-1c und SREBP-2 bei der transkriptionellen Regulation der Gene NIS und TPO zu charakterisieren sowie deren Bindungselemente in den regulatorischen Regionen der DNA zu identifizieren. Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden, basierend auf den Untersuchungen von Rothe (Dissertation 2011), deren wichtigste Erkenntnisse in FRTL-5-Zellen, einer Schilddrüsenzelllinie der Ratte (*Rattus norvegicus*), gewonnen wurden, die Gene des NIS und der TPO von *Rattus norvegicus* untersucht. Mit dem direkten Nachweis der Bindung von SREBP-1c/-2 in den regulatorischen Regionen des NIS- und TPO-Gens sollte damit auch der Beweis erbracht werden, dass diese Gene direkt durch die SREBPs reguliert werden und als deren Zielgene anzusehen sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier Rotilabo [®]	Roth, Karlsruhe
CELLSTAR [®] Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLSTAR [®] Mikroplatten (96-Well Format)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Advanced TC [™] Multiwell (6- und 24-Well Format)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLSTAR [®] Zellkulturschale (145 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLSTAR [®] Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CO ₂ -Inkubator APT.line [™] CB 150	Binder, Tuttlingen
Counter Vials (PP-Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht
Doppelgelsystem, PerfectBlue [™] Twin	Peqlab, Erlangen
Electrophoresis Power Supply	Peqlab, Erlangen
Fiber Pads	Bio-Rad, München
G:BOX Chemi Imaging System	Syngene, Cambridge, UK
Gamma-Counter Wizard 3 1480	Perkin Elmer, Rodgau
Gelsystem Midi S PerfectBlue [™]	Peqlab, Erlangen
Gene Pulser [®] Cuvette, 0,2 cm	Bio-Rad, München
Gene PulserXcell [™] Electroporation System	Bio-Rad, München
GeneFlash Geldokumentationssystem	Syngene, Cambridge, UK
Heraeus [™] Fresco [™] 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Osterode
Heraeus [™] Herasafe [™] Zellkulturbank	Thermo Fisher Scientific, Hanau
Heraeus [™] Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Heraeus [™] Megafuge [™] 1.0	Thermo Fisher Scientific, Osterode
Heraeus [™] Multifuge [™] X1R	Thermo Fisher Scientific, Osterode
HybriLinker [™] UVP HL-2000	Ultra-Violet Products, Cambridge, UK
Inkubationsschüttler IKA [®] KS 4000i control	IKA [®] -Werke, Staufen
Inversmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss MicroImaging, Jena

Kompaktschüttler KS-15	Edmund Bühler, Hechingen
Kryoröhrchen	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer IKA [®] RCT Classic	IKA-Werke, Staufen
Microplate Reader Infinite [®] M200	Tecan, Crailsheim
Mikrozentrifuge GalaxyMiniStar	VWR, Darmstadt
Mini-Elektrophoresesystem (Hofer SE 250 Mighty Small II)	Hofer Inc., Holliston, USA
Multimode Reader Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
NanoQuant Plate [™]	Tecan, Crailsheim
Nitrozellulosemembran BioTrace [™] NT	Pall, Dreieich
Nylonmembran	Roche, Mannheim
Pasteurpipetten (ohne Wattestopfen)	Roth, Karlsruhe
PCR-Tubes (0,1 ml)	LTF Labortechnik, Wasserburg
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Rotorgene 2000	Corbett Research, Mortlake, Australia
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelwasserbad	JULABO Labortechnik, Seelbach
Spritzenfilter, Filtropur S 0,2µm	Sarstedt, Nümbrecht
Thermocycler TProfessional Basic	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
ThermoShaker TS1	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator	Biostep, Jahnsdorf
Vakuumzentrifuge Concentrator plus	Eppendorf, Hamburg
Video Copy Processor	Mitsubishi Electric, Ratingen
Vortex-Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Western Trans-Blot System (Mini Trans-Blot [®] Cell)	Bio-Rad, München
Wippschüttler	Edmund Bühler, Hechingen

2.1.2 Chemikalien

25-Hydroxycholesterol (25-HC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid Rotiphorese [®] Gel40	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max [®]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	GeneCraft, Lüdinghausen
Essigsäure ROTIPURAN [®] (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol ROTIPURAN [®]	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA x 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
FuGENE [®] 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
GelRed [™] NucleicAcid Gel Stain, 10.000x	Biotium, Hayward, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin, analytical grade	Serva, Heidelberg
Green GoTaq [®] Flexi Buffer, 5x	Promega, Mannheim
2-Propanol ROTISOLV [®] HPLC (Isopropanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumperchlorat (KClO ₄)	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine [®] 2000	Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt
Lithiumdodecylsulfat (LDS)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	VWR, Darmstadt
Na ¹²⁵ I	Perkin Elmer, Rodgau
N-Acetyl-Leucinal-Leucinal-Norleucinal (ALLN)	Enzo Life Sciences, Lörrach
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Passive Lysis Buffer (PLB), 5x	Promega, Mannheim
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab, Erlangen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe

RNA loading dye, 2x	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot
Roti [®] -Load	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris, research grade	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt
Tween [®] 20	Serva, Heidelberg

2.1.3 Substanzen für die Mikrobiologie

Ampicillin Natriumsalz (≥ 99%)	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol (≥ 98%)	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Substanzen und Lösungen für die Zellbiologie

fötale Kälberserum (FKS)	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
Gentamicin	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
Ham's F12 (Basalmedium)	Biochrom, Berlin
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
TC-H ₂ O	Biochrom, Berlin
neonatales Kälberserum (NKS)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640 (Basalmedium)	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
Antibiotikum/Antimykotikum (100x)	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05%)	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
Transferrin, human	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin, bovin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Somatostatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat (Gly-L-Lys-Acetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Thyreotropin, bovin (TSH)

Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 Organismen

2.1.5.1 Bakterien

Escherichia coli (*E. coli*) Top 10

Genotyp: F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80

lacZ ΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ

(ara-leu)⁷⁶⁹⁷ galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

Invitrogen / Life Technologies,

Darmstadt

2.1.5.2 Zelllinien

FRTL-5 (Ratte, Schilddrüsenepithelzelle)

CLS, Eppelheim

HepG2 (human, Leberzellkarzinom)

DSMZ, Braunschweig

2.1.6 Proteine

2.1.6.1 Antikörper für den *Immunoblot*

anti-β-Aktin IgG (*mouse*, monoklonal)

Abcam, Cambridge, UK

anti-SREBP-1 IgG (*mouse*, monoklonal)

Abcam, Cambridge, UK

anti-SREBP-2 IgG (*rabbit*, polyklonal)

Abcam, Cambridge, UK

anti-NIS IgG (*rabbit high-affinity*, polyklonal)

Prof. N. Carrasco, New Haven, USA

anti-*mouse* IgG (*goat*, polyklonal, HRP)

Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

anti-*rabbit* IgG (*goat*, polyklonal, HRP)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.6.2 Antikörper für die ChIP

anti-SREBP-1 IgG (*rabbit*, polyklonal)

Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg

anti-SREBP-2 IgG (*rabbit*, polyklonal)

Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg

normal rabbit IgG

Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.6.3 Enzyme

Restriktionsenzyme	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
<i>shrimp alkaline phosphatase</i> (SAP)	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
peqGOLD RNase A	Peqlab, Erlangen
RevertAid™ Reverse Transcriptase	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

2.1.6.4 Protein-Größenmarker

Broad Range Protein Molecular Weight Markers	Promega, Mannheim
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

2.1.7 Nukleinsäuren

2.1.7.1 siRNA

In den RNAi-Experimenten diente die BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control (Kat. # 14750-100, Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt) als Kontrolle, deren Sequenz nicht homolog zu irgendeinem bekannten Gen ist sowie in ihrer Länge und Konfiguration einer Standard-siRNA entspricht.

Tabelle 1: *Stealth RNAi*™ siRNA (Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt)

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	siRNA ID / Kat. #
siSREBP-1	AGGCCAUCGACUACAUCCGCUUCUU AAGAAGCGGAUGUAGUCGAUGGCCU	Sreb1f1 MSS209482 / # 1320001
siSREBP-2	GGCUUCUUGGCUAGCUACUUCUUA UUAAGAAGUAGCUAGCCAAGAAGCC	Sreb2f2 RSS312552 / # 1330001

2.1.7.2 Vektoren

Tabelle 2: Expressions- und Reportergernektoren

Vektor	Charakteristika	Herkunft
pcDNA3.1(+)	Expressionsvektor, CMV-Promotor, Neomycin- und Ampicillin-Resistenz, 5428 bp	Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt
pcDNA3.1(+)-nSREBP-1c	nSREBP-1c-Expressionsvektor, kodiert für das nukleäre SREBP-1c der Ratte (Aminosäure 1-448), in HindIII/BamHI kloniert	diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-nSREBP-2	nSREBP-2-Expressionsvektor, kodiert für das nukleäre SREBP-2 der Ratte (Aminosäure 1-460), in HindIII/BamHI kloniert	diese Arbeit
pGL4.74[<i>hRluc</i> /TK]-Vektor	<i>Renilla</i> -Luziferase-Reportergerne, HSV-TK-Promotor, Ampicillin-Resistenz, 4237 bp	Promega, Mannheim
pGL4.10[<i>luc2</i>]-Vektor	<i>Firefly</i> -Luziferase-Reportergerne ohne Promotor, Ampicillin-Resistenz, 4242 bp	Promega, Mannheim
pGL4.23[<i>luc2</i> /minP]-Vektor	<i>Firefly</i> -Luziferase-Reportergerne mit Minimal-promotor, Ampicillin-Resistenz, 4283 bp	Promega, Mannheim

2.1.7.3 Oligonukleotide

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und entsalzt geliefert. Die Orientierungen der Oligonukleotide sind mit S (*Sense*) und A (*Antisense*) kenntlich gemacht. Die *Annealing*-Temperatur ist mit T_A abgekürzt.

2.1.7.3.1 Oligonukleotide für die PCR

Die Oligonukleotide (*Primer*) für die qPCR wurden in sterilem DEPC-ddH₂O (100 µM), die der konventionellen PCR in sterilem ddH₂O (100 µM) gelöst und anschließend 1:10 verdünnt.

Tabelle 3: *Primer* für die qPCR (*Rattus norvegicus*)

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]	T_A [°C]	NCBI GenBank
SREBP-1c_S	GGAGCCATGGATTGCACATT	191	60	AF286470.2
SREBP-1c_A	AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA			

Fortsetzung Tabelle 3: Primer für die qPCR (*Rattus norvegicus*)

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]	T _A [°C]	NCBI GenBank
SREBP-2_ <i>S</i>	CTGACCACAATGCCGGTAAT	204	60	NM_001033694.1
SREBP-2_ <i>A</i>	CTTGTGCATCTTGGCATCTG			
NIS_ <i>S</i>	GCTGTGGCATTGTCATGTTC	219	60	NM_052983.2
NIS_ <i>A</i>	TGAGGTCTTCCACAGTCACA			
TPO_ <i>S</i>	CAGGTGTTGAGAAGCAGTTG	255	60	NM_019353.1
TPO_ <i>A</i>	CTTTGAAAGCTGTAGCCAGG			
FAS_ <i>S</i>	AGGTGCTAGAGGCCCTGCTA	281	60	X62888.1
FAS_ <i>A</i>	GTGCACAGACACCTTCCCAT			
GPAT_ <i>S</i>	CAGCGTGATTGCTACCTGAA	194	60	U36771.2
GPAT_ <i>A</i>	CTCTCCGTCTGGTGAGAAG			
HMGCR_ <i>S</i>	CGAGCAAGTGATTACCCTGA	223	60	NM_013134.2
HMGCR_ <i>A</i>	GTCTTGGTTCAGTCCTGGAT			
LDLR_ <i>S</i>	ACAGTGTCTCCCAAGTCCAA	221	60	NM_175762.2
LDLR_ <i>A</i>	GCAAATGTGGATCTCGTCCTC			
β-Aktin_ <i>S</i>	GACCTCTATGCCAACACAGT	154	60	NM_031144.2
β-Aktin_ <i>A</i>	CACCAATCCACACAGAGTAC			

Tabelle 4: Primer für die ChIP

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]	T _A [°C]
<i>random</i> -KoSeq-ChIP_ <i>S</i>	TGCTTGCATAGCACCAGGAA	168	60
<i>random</i> -KoSeq-ChIP_ <i>A</i>	GGAGAAAGCAGAGGACATCA		
NIS-ChIP_ <i>S</i>	CATGGAGACAGGTGACTCG	144	60
NIS-ChIP_ <i>A</i>	GCTGACCCCGGAGTTCAAT		
TPO-ChIP_ <i>S</i>	TCTGGGGTTGCAGTGGGGA	270	60
TPO-ChIP_ <i>A</i>	CCTGAATGTTAGCCATTCACT		

Tabelle 5: *Primer* für die Herstellung der Expressionsvektoren[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]	T _A [°C]
nSREBP-1c- <i>HindIII</i> _S	TATA <u>AAGCTT</u> TATGGATTGCACATTTGAAGACA	1344	60
nSREBP-1c- <i>BamHI</i> _A	TA <u>AGGATCCT</u> CACATGCCTCGGCTATGTGAA		
nSREBP-2- <i>HindIII</i> _S	TATA <u>AAGCTT</u> TATGGATGAGAACAGCGAGCT	1380	60
nSREBP-2- <i>BamHI</i> _A	TAT <u>GGATCCT</u> CAGTCCGGTTCATCCTTGACC		

[#] Die integrierten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Tabelle 6: *Primer* für die Herstellung der Reporter-Genvektoren[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]	T _A [°C]
NIS- <i>BglII</i> _S	TCA <u>AAGATCT</u> CATGGAGACAGGTGACTCG		
NIS-3002/+87- <i>XhoI</i> _A	AT <u>CCTCGAGT</u> ACCGAATGCGAATCTTTGCA	3089	60
NIS-1887/+87- <i>XhoI</i> _A	AT <u>CCTCGAGC</u> ATGAACATAATCCAGGCC	1974	62
NIS-1022/+87- <i>XhoI</i> _A	AT <u>CCTCGAGG</u> CATGGCAATCCAGCCTAC	1109	60
NIS-385/+87- <i>XhoI</i> _A	TAT <u>CCTCGAGG</u> GAGAAAGGTAGATGCTCTC	472	60
NIS-112/+87- <i>XhoI</i> _A	TAT <u>CCTCGAGC</u> CAGGACCGAAAGGGTGCG	199	60
NIS-112/+83- <i>BglII</i> _S	TCA <u>AAGATCT</u> GAGACAGGTGACTCGGTGA	195	60
NIS-112/+83- <i>XhoI</i> _A	TAT <u>CCTCGAGC</u> AGCGGTGACTCGCGCT		
NIS-112/-40- <i>BglII</i> _S	TGT <u>AGATCTT</u> GAACTCCGGGGTCAGC	73	60
NIS-112/-40- <i>XhoI</i> _A	TAT <u>CCTCGAGC</u> CAGGACCGAAAGGGTGCG		
NIS-57/+16- <i>BglII</i> _S	AAG <u>AGATCTC</u> AGCGCGAGTCACCGCT	73	60
NIS-57/+16- <i>XhoI</i> _A	TAT <u>CCTCGAGC</u> TGACCCCGGAGTTCAA		
NIS-2/+83- <i>BglII</i> _S	TCA <u>AAGATCT</u> GAGACAGGTGACTCGGTGA	85	60
NIS-2/+83- <i>XhoI</i> _A	TAT <u>CCTCGAGC</u> AGCGGTGACTCGCGCT		
TPO- <i>BglII</i> _S	TCA <u>AAGATCTT</u> CTGGGGTTGCAGTGGGGA		
TPO-1310/+697- <i>XhoI</i> _A	AT <u>CCTCGAGG</u> CAAGTGTTAAAGAGGTTAGT	2007	60
TPO-1110/+697- <i>XhoI</i> _A	AAT <u>CCTCGAGG</u> ATGTCAATCTGCCTTGCA	1807	60
TPO-719/+697- <i>XhoI</i> _A	AAT <u>CCTCGAGC</u> GTCTGCTGGGTGAAGTCTC	1416	60
TPO+1/+697- <i>XhoI</i> _A	ATT <u>CCTCGAGG</u> CACAGCCTGCTTCTTCAGT	697	60
TPO+598/+697- <i>XhoI</i> _A	ATT <u>CCTCGAGC</u> ACTTGGGAGGACCCACCTGA	100	60

[#] Die integrierten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Tabelle 7: *Primer* für die Herstellung der Reporter-genmutanten[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']
NIS-SRE+59mut_ <i>S</i>	ACAGGTGACTCGGTGAtTAGAGGATGCGGAGGAC
NIS-SRE+59mut_ <i>A</i>	GTCCTCCGCATCCTCTaaTCACCGAGTCACCTGT
NIS-SRE+37mut_ <i>S</i>	GATGCGGAGGACGTCTGtGACTCTCGGTTCAGTGG
NIS-SRE+37mut_ <i>A</i>	CCACTGACCGAGAGTCaCaGACGTCTCCGCATC
NIS-SRE+19mut_ <i>S</i>	GACTCTCGGTTCAGTaaGAGAGTCGCAGCGGAGT
NIS-SRE+19mut_ <i>A</i>	ACTCGCGCTGCGACTCTCtACTGACCGAGAGTC

[#] Die substituierten Basen sind durch Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

2.1.7.3.2 Oligonukleotide für die Hybridisierung

Die Oligonukleotide für die Hybridisierung wurden in TEN-Puffer gelöst (1 µg/µl) und anschließend 1:10 verdünnt.

Tabelle 8: Oligonukleotide für die Herstellung der Reporter-genvektoren[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]
2xSRE-1- <i>HindIII</i> _S (hLDLR)	<u>AGCT</u> GGGAGGAGTTTGCAGTGGGGTGATTTTC AATTTGCAGTGGGGTGATTTTCAAATGTCTTC	64
2xSRE-1- <i>XhoI</i> _A (hLDLR)	<u>TCGAGA</u> AAGACATTTGAAAATCACCCCACTGCA AATTGAAAATCACCCCACTGCAAATCCTCCC	64
NIS 2xSRE+59- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCT</u> TAGACAGGTGACTCGGTGAGGAGAGGATG CGGACTCGGTGAGGAGAGGATGCGGAGGACGT	64
NIS 2xSRE+59- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGAAC</u> GTCTCCGCATCCTCTCCTCACCGAG TCCGCATCCTCTCCTCACCGAGTCACCTGTCT	64
NIS 2xSRE-481- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCT</u> TTTCTTCTGCTTTAGGACTCCCCACCTGT ACCTTTAGGACTCCCCACCTGTACAAGGGCAC	64
NIS 2xSRE-481- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGAGT</u> GCCCTTGTACAGGTGGGGAGTCCTAA AGGTACAGGTGGGGAGTCCTAAAGCAGAAGAA	64
TPO+676/+697- <i>BglII</i> _S	<u>GATCT</u> TGGGGTTGCAGTGGGGAAGA	26
TPO+676/+697- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGAT</u> CTTCCCCACTGCAACCCAGAA	26
TPO 2xSRE+640- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCT</u> CAGCAGAATACTGTGGGATGTACCATAA AATACTGTGGGATGTACCATAAATACCC	60
TPO 2xSRE+640- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGAG</u> GGTATTTATGGTACATCCCACAGTATT TTATGGTACATCCCACAGTATTCTGCTG	60

[#] Die integrierten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und die substituierten Basen sind durch Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Fortsetzung Tabelle 8: Oligonukleotide für die Herstellung der Reporter-genvektoren[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]
TPO 2xSRE+640mut- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCT</u> CAGCAGAATACTGTGttActTACCATAA AATACTGTGttActTACCATAAATACCC	60
TPO 2xSRE+640mut- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGAGGGTATTTATGGTA</u> aagTaaCACAGTATT TTATGGTAaagTaaCACAGTATTCTGCTG	
TPO 2xInvSRE-like+654- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCTGAGATAATCAGAAAGTCAGCAGAATACT</u> GATCAGAAAGTCAGCAGAATACTGTGGGAT	62
TPO 2xInvSRE-like+654- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGAATCCCACAGTATTCTGCTGACTTTCTGA</u> TCAGTATTCTGCTGACTTTCTGATTATCTC	
TPO 2xInvSRE-like+654mut- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCTGAGATAATCAGAAAGTC</u> gtattAATACT GATCAGAAAGTCgtattAATACTGTGGGAT	62
TPO 2xInvSRE-like+654mut- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGAATCCCACAGTATTaatacGACTTTCTGA</u> TCAGTATTaatacGACTTTCTGATTATCTC	
TPO 2xSRE/InvSRE- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCTAAATACCCAGGCCTCTCCTCAGGTGGGT</u> CCCAGGCCTCTCCTCAGGTGGGTCTCCCA	62
TPO 2xSRE/InvSRE- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGATGGGAGGACCCACCTGAGGAGAGGCCTG</u> GGACCCACCTGAGGAGAGGCCTGGGTATTT	
TPO 2xSRE/InvSREmut- <i>HindIII</i> _S	<u>AGCTAAATACCCAGGCCTCTCagataGTGGGT</u> CCCAGGCCTCTCagataGTGGGTCTCCCA	62
TPO 2xSRE/InvSREmut- <i>XhoI</i> _A	<u>TCGATGGGAGGACCCACTatctGAGAGGCCTG</u> GGACCCACTatctGAGAGGCCTGGGTATTT	

[#] Die integrierten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und die substituierten Basen sind durch Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Tabelle 9: Oligonukleotide für EMSA[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]
SRE-1wt_EM_S (LDLR)	GTAGATTTTTGAAAATCACCCACTGCAAACCTCC	34
SRE-1wt_EM_A (LDLR)	GGGAGGAGTTTGCAGTGGGGTGATTTTCAAAAAT	
SRE-1mut_EM_S (LDLR)	GTAGATTTTTGAAAgTCAaaCCgtTGCAAACCTCC	34
SRE-1mut_EM_A (LDLR)	GGGAGGAGTTTGCaaCGgttTGAcTTTCAAAAAT	
NIS-SRE+59wt_EM_S	ACGTCCTCCGCATCCTCTCCTCACCGAGTCACCT	34
NIS-SRE+59wt_EM_A	AGACAGGTGACTCGGTGAGGAGAGGATGCGGAGG	
NIS-SRE+59mut_EM_S	ACGTCCTCCGCATCCTCTaaTCACCGAGTCACCT	34
NIS-SRE+59mut_EM_A	AGACAGGTGACTCGGTGAttAGAGGATGCGGAGG	

[#] Zusätzlich integrierte Basen sind unterstrichen und die substituierten Basen sind durch Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Fortsetzung Tabelle 9: Oligonukleotide für EMSA[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]
TPO I_S	<u>GATC</u> TCTGGGGTTGCAGTGGGGAAGA	26
TPO I_A	<u>TCGATC</u> TTCCCCACTGCAACCCCAGA	
TPO II_S	<u>AGCT</u> TTGCAGTGGGGAAGAGATAA	24
TPO II_A	<u>TCGATT</u> TATCTCTTCCCCACTGCAA	
TPO III_S	<u>AGCT</u> GATAATCAGAAAGTCAGCAGAATACT	30
TPO III_A	<u>TCGA</u> AGTATTCTGCTGACTTTCTGATTATC	
TPO IIImut1_S	<u>AGCT</u> GATAATCAGAAAGTCAGCAGttctag	30
TPO IIImut1_A	<u>TCGA</u> ActagaaCTGCTGACTTTCTGATTATC	
TPO IIImut2_S	<u>AGCT</u> GATAATCAGAAAGTCgtattaATACT	30
TPO IIImut2_A	<u>TCGA</u> AGTATTaatacGACTTTCTGATTATC	
TPO IIImut3_S	<u>AGCT</u> GATAATCAGAttcgaAGCAGAATACT	30
TPO IIImut3_A	<u>TCGA</u> AGTATTCTGCTtcgaaTCTGATTATC	
TPO IIImut4_S	<u>AGCT</u> GATAAgattcAAGTCAGCAGAATACT	30
TPO IIImut4_A	<u>TCGA</u> AGTATTCTGCTGACTTgaatcTTATC	
TPO IIImut5_S	<u>AGCT</u> tcgttTCAGAAAGTCAGCAGAATACT	30
TPO IIImut5_A	<u>TCGA</u> AGTATTCTGCTGACTTTCTGAaacga	
TPO IV_S	<u>AGCT</u> TATACTGTGGGATGTACCATA	24
TPO IV_A	<u>TCGAT</u> ATGGTACATCCCACAGTAT	
TPO IVmut_S	<u>AGCT</u> TATACTGTGttActTACCATA	24
TPO IVmut_A	<u>TCGAT</u> ATGGTAagTaaCACAGTAT	
TPO V_S	<u>AGCT</u> GTGGGATGTACCATAAATACCCAGG	29
TPO V_A	<u>TCGAC</u> CTGGGTATTTATGGTACATCCCAC	
TPO VI_S	<u>AGCT</u> CAGGCCTCTCCTCAGGTGGGTCCTCCCAAGT	35
TPO VI_A	<u>TCGA</u> ACTTGGGAGGACCCACCTGAGGAGAGGCCTG	
TPO VImut1_S	<u>AGCT</u> CAGGCCTCTCCTCAGGTGGGTCCTCatggct	35
TPO VImut1_A	<u>TCGA</u> agccatGAGGACCCACCTGAGGAGAGGCCTG	
TPO VImut2_S	<u>AGCT</u> CAGGCCTCTCCTCAGGTGGGgttgaCCAAGT	35
TPO VImut2_A	<u>TCGA</u> ACTTGGTcaacCCCACCTGAGGAGAGGCCTG	
TPO VImut3_S	<u>AGCT</u> CAGGCCTCTCCTCAGactaaTCCTCCCAAGT	35
TPO VImut3_A	<u>TCGA</u> ACTTGGGAGGAttagtCTGAGGAGAGGCCTG	

[#] Zusätzlich integrierte Basen sind unterstrichen und die substituierten Basen sind durch Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Fortsetzung Tabelle 9: Oligonukleotide für EMSA[#]

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']	Länge [bp]
TPO VImut4_S	<u>AGCT</u> CAGGCCTCTCagataGTGGGTCCCTCCCAAGT	35
TPO VImut4_A	<u>TCGAACT</u> TGGGAGGACCCACt atctGAGAGGCCTG	
TPO VImut5_S	<u>AGCT</u> CAGGCg gaaCTCAGGTGGGTCCCTCCCAAGT	35
TPO VImut5_A	<u>TCGAACT</u> TGGGAGGACCCACCTGAGtttccGCCTG	
TPO VImut6_S	<u>AGCT</u> tgtaaCTCTCCTCAGGTGGGTCCCTCCCAAGT	35
TPO VImut6_A	<u>TCGAACT</u> TGGGAGGACCCACCTGAGGAGAGttaca	

[#] Zusätzlich integrierte Basen sind unterstrichen und die substituierten Basen sind durch Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

2.1.7.3.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung**Tabelle 10: Primer für die Sequenzierung**

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz [5' → 3']
pGL4 seq_1	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
pGL4 seq_2	GCATCTTCCATGGTGGCTTT
SP6 seq	ATTTAGGTGACACTATAGAA
T7 seq	TAATACGACTCACTATAGGG
NIS seq_1	GAGGTCCTTCTGCCTTAGC
NIS seq_2	AGTTGCATGAATACGGGTGC
NIS seq_3	CTGGAGACTGCAGAAACAGC
NIS seq_4	GTAGAACCCTCCTGATTCACTC
TPO seq_1	GTGCACAGCTGGGTGTGTTC
TPO seq_2	GAGACTTCACCCAGCAGACG

2.1.7.4 DNA-Größenmarker

GeneRuler™ 100 bp DNA Leiter	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

2.1.8 Reaktionssysteme (*Kits*)

ECL Plus Kit	GE Healthcare, München
BC Assay protein Quantitation Kit	Uptima-Interchim, Montlucon, Frankreich
Beetle-Juice	PJK, Kleinblittersdorf
DIG Gel Shift Kit, 2 nd Generation	Roche, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche, Mannheim
Illustra TM PuReTaq Ready-To-Go TM PCR beads	GE Healthcare, München
KAPA TM SYBR [®] FAST Universal	Peqlab, Erlangen
Magna ChIP TM G Chromatin	
Immunoprecipitation Kit	Merck Millipore, Darmstadt
Mykoplasmentest Venor [®] GeM	Minerva Biolabs, Berlin
Nuclear Extract Kit	Activ Motif, La Hulpe, Belgien
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange [®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene / Agilent Technologies, Böblingen
Renilla-Juice	PJK, Kleinblittersdorf
TnT [®] Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim

2.1.9 Puffer, Medien und Lösungen

Die Puffer, Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit bidestillierten Wasser (ddH₂O) hergestellt.

2.1.9.1 Medien und Lösungen für die Mikrobiologie

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml, steril filtriert
Chloramphenicol-Stammlösung	34 mg/ml, in abs. Ethanol steril filtriert
LB-Medium	20 g/l, autoklaviert
LB-Agar	14 g/l, autoklaviert

SOC- Medium (pH 7,0)	2% (w/v) Trypton/Pepton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 M KCl autoklaviert, nach Abkühlung Zugabe von 20 mM Glukose
----------------------	--

2.1.9.2 Medien und Lösungen für die Zellbiologie

25-HC-Stammlösung	20 mM, in abs. Ethanol
ALLN-Stammlösung	25 mg/ml, in DMSO
Gly-L-Lys-Acetat-Stammlösung	100 µg/ml, in TC-H ₂ O
Hydrocortison-Stammlösung	1 mM, in abs. Ethanol
Somatostatin-Stammlösung	100 µg/ml, in TC-H ₂ O
Transferrin-Stammlösung	50 mg/ml, in TC-H ₂ O
Insulin-Stammlösung	10 mg/ml, in TC-H ₂ O
TSH-Stammlösung	10 U/ml, in HBSS
4-Hormoncocktail-Stammlösung	1000 ng/ml Gly-L-Lys-Acetat 1000 pmol/ml Hydrocortison 1000 ng/ml Somatostatin 500 µg/ml Transferrin in HBSS
6H-Medium (FRTL-5)	Ham's F12 Basalmedium 5% (v/v) NKS 1% (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum-Mix 6 Hormonmix (nach den Empfehlungen des American Type Culture Collection, ATCC): TSH (10 mU/ml) Insulin (10 µg/ml) Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat (10 ng/ml) Hydrocortison (10 nM)

	Somatostatin (10 ng/ml) Transferrin (5 µg/ml)
Kryomedium (FRTL-5)	Ham's F12 Basalmedium 5% (v/v) NKS 5% (v/v) DMSO
RPMI-Medium (HepG2)	RPMI 1640 Basalmedium 10% (v/v) FKS 0,5% (v/v) Gentamicin
Kryomedium (HepG2)	RPMI 1640 Basalmedium 10% (v/v) FKS 10% (v/v) DMSO

2.1.9.3 Puffer und Lösungen für die Molekular - und Proteinbiochemie

Puffer 1 (pH 8,0)	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer 2	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer 3 (pH 5,5)	3 M Kaliumacetat
PBS (pH 7,4)	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
TEN (pH 8,0)	10 mM Tris 1 mM EDTA 0,1 M NaCl

RNA-Puffer (pH 7,0), 10x	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 5 mM EDTA in sterilem DEPC-ddH ₂ O
RNA/FA-Laufpuffer, 1x	RNA-Puffer, 1x 1% (v/v) Formaldehyd in sterilem DEPC-ddH ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC Inkubation bei 37°C für 24 Stunden autoklavieren
TAE-Puffer (pH 8,3), 50x	2 M Tris 1 M Eisessig 50 mM EDTA
TBE-Puffer (pH 8,5), 10x	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris pH mit HCl einstellen
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris pH mit HCl einstellen
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS pH nur kontrollieren
Transferpuffer nach Towbin <i>et al.</i> (1979) (pH ~8,3)	25 mM Tris 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol pH nur kontrollieren
Transferpuffer nach Kaminsky <i>et al.</i> (1994) (pH ~8,3)	siehe Transferpuffer nach Towbin <i>et al.</i> (1979) 0,05% (w/v) Lithiumdodecylsulfat (LDS)

Ponceau S-Lösung	0,5% (w/v) Ponceau S 1% (v/v) Eisessig
TBS-T (pH 7,5), 5x	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% (v/v) Tween 20

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Sterilisation

Hitzestabile Lösungen und Feststoffe wurden vor ihrer Verwendung im Autoklav für 15 Minuten bzw. 20 Minuten bei 2,1 bar Überdruck und 121°C dampfsterilisiert. Die Sterilisierung hitzebeständiger Glaswaren erfolgte im Sterilisationsschrank für 4 Stunden bei 180°C trockener Hitze. Hitzelabile Lösungen wurden mit einem Filter (Porengröße 0,2 µm) steril filtriert.

2.2.1.2 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli*

Voraussetzung für die Plasmidisolierung ist die Vermehrung der plasmidtragenden *Escherichia coli* (*E. coli*) in antibiotikahaltigem LB-Medium. Das verwendete Antibiotikum richtete sich hierbei nach dem vom Plasmid bzw. BAC vorgegebenen Selektionsmarker (50 µg/ml Ampicillin bzw. 34 µg/ml Chloramphenicol). Für eine Miniplasmidpräparation (Kap. 2.2.2.1.1) wurden 5 ml eines antibiotikahaltigen LB-Mediums mit einem zuvor auf Agarplatten selektierten Bakterienklon angeimpft und im Inkubationsschüttler bei 37°C und 225 rpm über Nacht inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 500 µl der Bakteriensuspension abgenommen und bis zur Midiplasmidpräparation bei 4°C für maximal 4 Wochen gelagert.

Für eine Midiplasmidpräparation (Kap. 2.2.2.1.2) wurden 100 ml eines antibiotikahaltigen LB-Mediums mit 3 µl Bakterienkultur von einem aus der Miniplasmidpräparation sequenzierten positiven Bakterienklon angeimpft und in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 225 rpm über Nacht inkubiert. Für die dauerhafte Lagerung und Bereitstellung der *E. coli* wurden äquivalente Volumina von der Bakteriensuspension und sterilem 50%igen (v/v) Glycerol vorsichtig gemischt und anschließend bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

5 ml antibiotikafreies LB-Medium wurden mit 10 µl eines *E. coli* Top 10-Glycerolstocks angeimpft und im Inkubationsschüttler bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 100 ml antibiotikafreies LB-Medium mit der vorinkubierten Bakteriensuspension angeimpft und bis Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in einer Multifuge (Thermo Fisher Scientific) für 15 Minuten bei 4°C und 3.000 x g zentrifugiert und anschließend in 25 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Der Überstand wurde entfernt und die Bakterien in gleicher Weise nacheinander in 10 ml eiskaltem ddH₂O und in 5 ml eiskaltem 10%igen Glycerol resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde nochmals für 15 Minuten bei 4°C und 3.000 x g sedimentiert und zuletzt in 1 ml eiskaltem 10%igen Glycerol resuspendiert. 50 µl der Bakteriensuspension wurden aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Transformation von *E.coli* mittels Elektroporation

Bei der physikalischen Form der Transformation werden durch einen elektrischen Schock Poren erzeugt, die die Permeabilität der Zellmembran erhöhen und das Einschleusen rekombinanter DNA ermöglichen. 50 µl der elektrokompetenten *E. coli* wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt und nach einminütiger Inkubation auf Eis in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach erfolgter Elektroporation bei 3000 V und Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz in ein Reaktionsgefäß überführt und im Inkubationsschüttler bei 37°C und 225 rpm für eine Stunde inkubiert. Zur Selektion von plasmidtragenden *E. coli* wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und im Inkubator bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.2.2.1.1 Miniplasmidpräparation

Zur Isolierung geringer Mengen DNA wurde die auf alkalischer Lyse beruhende Miniplasmidpräparation angewendet, die allein zur qualitativen Beurteilung der gewonnenen Plasmid-DNA dient. Zunächst erfolgte die Anzucht der *E. coli* wie in Kapitel 2.2.1.2

beschrieben. Die in einer Mikrozentrifuge (Thermo Fisher Scientific) für 10 Minuten bei 14.000 x g pelletierten Bakterien wurden in 250 µl Puffer 1 vollständig resuspendiert und nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 unter Schwenken lysiert. Nach Erhalt eines klaren, viskösen Bakterienlysats wurde die Reaktion mit 300 µl Puffer 3 unter Schwenken neutralisiert und die Lösung für 30 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Zum Ausfällen der DNA wurde der Überstand in 800 µl abs. Ethanol überführt, kurz gevortext und durch erneute Zentrifugation bei 14.000 x g für 30 Minuten pelletiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge für 5 min bei 45°C getrocknet und zuletzt in 50 µl sterilem ddH₂O gelöst. Unmittelbar danach wurde die isolierte Plasmid-DNA durch einen analytischen Restriktionsverdau kontrolliert (Kap. 2.2.2.8).

2.2.2.1.2 Midiplasmidpräparation

Die präparative Midiplasmidpräparation dient der Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* unter Verwendung von Anionen-Austauscher-Säulen. Zur Isolierung von genomischer DNA für die Generierung der Reportergenvektoren und von Plasmid-DNA für die Transfektion wurde das Midi Plasmid Kit (Qiagen) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration einer wässrigen RNA- bzw. DNA-Lösung wurde mit der NanoQuant Plate™ (Tecan) bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm im Microplate Reader (Tecan) quantifiziert. Eine OD von 1 bei 260 nm (E_{260}) entspricht hierbei etwa 50 µg/ml an doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml an RNA. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren wurde parallel die Absorption bei 280 nm quantifiziert, um den Reinheitskoeffizienten (E_{260}/E_{280}) ermitteln zu können. Dieser sollte einen Wert von < 1,8 für DNA bzw. < 2,0 für RNA aufweisen.

2.2.2.3 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) beruht auf einer enzymatischen *in vitro*-Amplifikation von Nukleotidsequenzen, die durch spezifische *Primer* definiert werden. Bei der Vervielfältigung der *Template*-DNA unterscheidet man drei sich

zyklisch wiederholende Phasen: Die thermische Denaturierung doppelsträngiger DNA bei 90°C bis 95°C, die Hybridisierung der *Primer* an die komplementären DNA-Einzelstränge (*Annealing*) bei 50°C bis 70°C und die Elongation dieser *Primer* durch eine thermostabile DNA-Polymerase unter Verwendung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) bei 72°C. Durch mehrfache Wiederholung dieser Phasen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der *Template*-DNA.

Die Amplifikation der DNA-Sequenzen erfolgte mit den IllustrTM PuReTaq Ready-To-GoTM PCR Beads, wobei ein gelöstes Bead in 25 µl Endvolumen 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM eines jeden dNTP und 2,5 Units puReTaq-DNA-Polymerase entspricht.

In einem PCR-Ansatz (25 µl) wurden 100 ng *Template*-DNA, ein *Bead* und jeweils 2 µl des *Sense*- und *Antisense-Primers* (10 µM) eingesetzt und mit sterilem ddH₂O aufgefüllt. Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler (Biometra) und startete mit einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten zur Aktivierung der Polymerase. Es folgte ein Drei-Schritt-Zyklus mit 35 Wiederholungen, bestehend aus einer Denaturierungsphase von 60 Sekunden bei 95°C, einer *Annealing*phase von 60 Sekunden bei 60°C und einer Extensionsphase von 30 Sekunden bis 120 Sekunden bei 72 °C. Abschließend wurde eine finale Elongation bei 72°C für 7 Minuten durchgeführt.

Nach Ende der Amplifikation wurde die DNA mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers von PCR-Rückständen (Enzyme, *Primer*, dNTPs und Salze) befreit und einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.6) unterzogen.

2.2.2.4 Zielgerichtete *in vitro*-Mutagenese

Das Einbringen einer Deletion, Insertion oder Substitution in die Sequenz der DNA kann durch zielgerichtete *in vitro*-Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) erreicht werden. In dieser Arbeit wurden die verwendeten DNA-Sequenzen durch Substitution unter Verwendung des QuikChange[®]XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) modifiziert, wobei nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen wurde. Bei dieser Form der Mutation hybridisieren synthetische Oligonukleotide (Tab. 7), die die gewünschte Mutation mittig enthalten, mit dem komplementären Strang der Matrizen-DNA und erzeugen eine Änderung in der Basenabfolge. Katalysiert wird die Mutagenesereaktion durch die PfuTurbo[®] DNA-Polymerase, einer *proofreading* DNA-Polymerase mit 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, wodurch eine hohe Genauigkeit durch Korrektur falsch eingebauter Nukleotide erzielt wird.

2.2.2.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotide wurden in einem äquivalenten Volumen (100 ng/µl in TEN-Puffer) zusammengeführt und im Thermomixer (Eppendorf) bei 95°C für 10 Minuten inkubiert. Für eine erfolgreiche Anlagerung der Oligonukleotide ruhte der Ansatz für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

2.2.2.6 Analytische Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Im Allgemeinen dient die Agarose-Gelelektrophorese der Auftrennung von negativ geladenen Nukleinsäuremolekülen im elektrischen Feld. Die Konzentration an eingesetzter Agarose bestimmt hierbei den Vernetzungsgrad der Gelmatrix, sodass aufgrund des Siebeffektes der Agarosematrix eine Größenauftrennung der Nukleinsäuren erfolgt.

Die analytische DNA-Gelelektrophorese wird vor allem zur qualitativen Beurteilung der DNA genutzt und schließt sich daher meist einer PCR (Kap. 2.2.2.3) an. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Gelsystem Midi S (Peqlab) in einer 0,8%igen bis 2%igen (w/v), horizontalen Agarosematrix bei einer Spannung von 120 V. Die Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlung auf 60°C mit 0,2x GelRed™ NucleicAcid Gel Stain (Biotium) versetzt. Nach Erstarren der Agaroselösung im Gelelektrophoreseschlitten wurde dieser in die 1xTAE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer positioniert. Das Agarosegel wurde anschließend mit den DNA-Proben, versetzt mit 1x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), und dem Größenmarker beladen. Die Visualisierung und Dokumentation der PCR-Produkte unter UV-Licht erfolgte mit dem Geldokumentationssystem GeneFlash (Syngene).

2.2.2.7 Präparation von DNA aus einer Agarosematrix

Zur Isolierung und Aufreinigung eines bestimmten DNA-Fragmentes aus einem DNA-Gemisch wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese analog der analytischen Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.6) durchgeführt. Alle verwendeten Materialien, Geräte und Puffer wurden vor Beginn der Elektrophorese gereinigt bzw. frisch angesetzt. Mit einem sterilen Skalpell wurde die betreffende DNA-Bande auf einem horizontalen UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm isoliert und nachfolgend mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aus der Agarosematrix eluiert.

2.2.2.8 Hydrolytische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die Phosphodiesterbindungen an Erkennungssequenzen innerhalb eines DNA-Moleküls hydrolysieren. Diese Tetra-, Hexa- oder Oktanukleotidsequenzen weisen häufig eine palindromische Struktur auf und sind spezifisch für jede Restriktionsendonuklease. Das Wirkprinzip der Restriktionsendonukleasen wird bei der Klonierung genutzt, um inserierte DNA-Fragmente identifizieren zu können. Mithilfe von Restriktionskarten, die für Genome und Plasmide existieren, kann anhand der Position von Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme die Länge eines DNA-Fragmentes bestimmt werden.

Zu analytischen Zwecken wurde in einem Ansatz (30 µl) 0,5 µg Vektor-DNA, 3 µl 10x Restriktionspuffer und jeweils 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) eingesetzt und mit sterilem ddH₂O aufgefüllt. In einem präparativen Restriktionsansatz (40 µl) wurde 1 µg Vektor-DNA mit der entsprechenden Menge an Enzym und Puffer verwendet. Der analytische Restriktionsansatz inkubierte für 2 Stunden bei 37°C, der präparative Restriktionsansatz unter gleichen Bedingungen über Nacht. Bei Verwendung von zwei Enzymen mit nicht kompatibel Puffersystem wurde die Restriktion in zwei Schritten durchgeführt. Nach Ende des ersten Restriktionsschritts (etwa 1 Stunde) erfolgte die Inaktivierung von Enzym 1 bei 65°C für 10 Minuten im Thermomixer (Eppendorf), gefolgt von einer kurzen Abkühlung auf Eis. Im zweiten Restriktionsschritt wurde unter Erhöhung des Endvolumens um mindestens 20 µl das Enzym 2 mit passendem Restriktionspuffer zugegeben. Entsprechend ihrer weiteren Verwendung wurde die hydrolysierte DNA mittels analytischer (Kap. 2.2.2.6) bzw. präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.2.2.7).

2.2.2.9 Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden

Die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen führt zur Freilegung einer Phosphatgruppe am 5'-Ende der Vektor-DNA, die eine Religation der linearisierten DNA möglich macht. Zur Vermeidung einer erneuten intramolekularen Verknüpfung wurde der Phosphatrest am 5'-Ende mittels SAP entfernt.

Die Dephosphorylierung erfolgte unmittelbar nach einer präparativen Restriktion (Kap. 2.2.2.8) der Vektor-DNA in zwei Dephosphorylierungsschritten. Im ersten Dephosphorylierungsschritt mit einem Endvolumen von 60 µl wurde der Restriktionsansatz (1 µg Vektor-DNA) mit 6 µl 10x SAP-Puffer sowie 1 µl SAP (1 U/µl) versetzt und mit sterilem ddH₂O aufgefüllt. Nach 30-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37°C erfolgte eine kurze Abkühlung auf Eis und die nochmalige Zugabe von 1 µl SAP (1 U/µl) und 1x SAP-Puffer unter Erhöhung des Endvolumens

um mindestens 10 µl. Der fertige Ansatz inkubierte anschließend nochmals für 30 Minuten bei 37°C. Nach Ende der Dephosphorylierung wurde die DNA mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.2.2.10 Ligation von DNA

Kennzeichnend für die Ligation ist die enzymkatalysierte Verknüpfung der Vektor-DNA mit der Insert-DNA unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende der zu ligierenden DNA-Stränge. In Vorbereitung einer Ligation wurden sowohl Vektor- als auch Insert-DNA in einem präparativen Restriktionsansatz mit identischen Restriktionsenzymen hydrolysiert (Kap. 2.2.2.8).

Für die Ligation wurden 100 ng Vektor-DNA und 100 ng Insert-DNA mit 1 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl) versetzt und mit sterilem ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte bei 16°C über Nacht im Thermomixer (Eppendorf).

2.2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Nukleotidabfolge der generierten Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von sequenzspezifischen *Primern* (Tab. 10) von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) sequenziert und anschließend mit dem Programm DNASTar/EditSeq (DNASTAR, Inc., Madison, USA) analysiert.

2.2.2.12 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryoten Zellen

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus FRTL-5-Zellen erfolgte mittels TRIzol® Reagent (Invitrogen) in einem Volumen von 500 µl pro Well einer 6-Well Platte. Die folgenden Arbeitsschritte wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in 20 µl sterilem DEPC-ddH₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Überprüfung der RNA-Integrität erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA (Kap. 2.2.2.13).

2.2.2.13 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA dient der Überprüfung der RNA-Integrität, die anhand der Qualität der ribosomalen RNA beurteilt werden kann. Bei Vorliegen von intakter RNA sollte das Fluoreszenzsignal der 28S- und 18S-Untereinheit der ribosomalen RNA ein Verhältnis von 2:1 (28S:18S) aufweisen.

Das 1,2%ige Agarosegel wurde unter Verwendung von 1x RNA-Puffer, wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben, hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte im RNA/FA-Laufpuffer bei 80 V. Vor Beginn der Elektrophorese wurde 1 µg der Gesamt-RNA mit sterilem DEPC-ddH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und mit 2xRNA loading dye (Fermentas) versetzt. Zur Denaturierung der Sekundärstrukturen erfolgte eine Inkubation bei 65°C für 10 Minuten im Thermomixer (Eppendorf).

2.2.2.14 Reverse Transkription von *messenger* RNA

Als Reverse Transkription versteht man in der Regel das Umschreiben von RNA in DNA. Ausgehend vom einzelsträngigen *messenger* RNA (mRNA)-Strang kann nach Anlagerung spezifischer *Primer* die Synthese des komplementären DNA-Strangs erfolgen. Katalysiert wird die Reaktion, in deren Verlauf ein RNA/DNA-Hybrid entsteht, durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase. In dieser Arbeit wurde die Reverse Transkriptase-Reaktion mit der RevertAid™ Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

In einem Reverse Transkriptase-Ansatz (25 µl) wurden 1,2 µg *Template*-RNA, 5 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Oligo-dT18-*Primer* (100 µM), 1,25 µl dNTPs (10 mM) und 0,3 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 U/µl) eingesetzt und mit sterilem DEPC-ddH₂O aufgefüllt. Der Reverse Transkriptase-Ansatz inkubierte im Thermocycler (Biometra) bei 42°C für 60 Minuten. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde der Reaktionsansatz bei 70°C für 10 Minuten inkubiert und abschließend auf 4°C abgekühlt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.2.15 *Real-Time* quantitative PCR

Die *Real-Time* quantitative PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR (Kap. 2.2.2.3) und erlaubt eine direkte Quantifizierung der amplifizierten DNA in Echtzeit. Durch Verwendung von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen kann die exponentielle Vervielfältigung der DNA detektiert werden, wobei das Fluoreszenzsignal proportional zur

amplifizierten DNA zunimmt. Um die Expression eines Gens quantifizieren zu können, wird der *cycle threshold* (C_t) ermittelt, der den Zyklus definiert, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Durch Vergleich der C_t -Werte des Zielgens mit denen eines konstitutiv exprimierten Referenzgens können Rückschlüsse auf die relative Expression gezogen werden.

Die verwendeten genspezifischen *Primer* von *Rattus norvegicus* und deren Eigenschaften sind Tabelle 3 zu entnehmen. Zur Normalisierung wurde das konstitutiv exprimierte Referenzgen β -Aktin herangezogen. Zur Quantifizierung der PCR-Amplifikate mit dem Rotorgene 2000 (Corbett Research) wurde der KAPA™ SYBR® FAST qPCR MasterMix Universal (Peqlab) verwendet. In einem qPCR-Ansatz (20 μ l) wurden 2 μ l cDNA, 10 μ l KAPA™ SYBR® FAST qPCR MasterMix und jeweils 0,4 μ l des *Sense*- und *Antisense-Primers* (10 μ M) eingesetzt und mit sterilem DEPC-ddH₂O aufgefüllt. Nach einer initialen Denaturierung für 3 Minuten bei 95°C folgte ein Zwei-Schritt-Zyklus mit durchschnittlich 35 Wiederholungen, bestehend aus einer Denaturierungsphase von 5 Sekunden bei 95°C und einer kombinierten Annealing-/Extensionsphase von 20 Sekunden bei 60°C. Zur Überprüfung spezifischer Amplifikationsprodukte folgte zuletzt eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die Temperatur schrittweise von 50°C auf 95°C erhöht wurde. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte in einem Agarosegel (Kap. 2.2.2.6) elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größe und Qualität des Amplifikationsproduktes bestimmen zu können.

Die C_t -Werte der untersuchten Gene wurden mit der Rotorgene Software 5.0 (Corbett Research) ermittelt und zur Berechnung der relativen Genexpression nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) herangezogen.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung und Subkultivierung eukaryoter Zellen

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle Arbeiten in der Zellkultur unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der adhären wachsenden Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator (Binder) bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchte von 95%. Alle sterilen Kulturmedien, Lösungen und sonstigen Zusätze wurden vor ihrer Verwendung im Wasserbad auf 37°C vortemperierte.

HepG2 sind epithelial-ähnliche humane Leberkarzinomzellen, die als *Monolayer* in Form kleiner Zellaggregate wachsen. Ihre Kultivierung erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80%, wobei das RPMI-Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Um

eine Kontaktinhibition zu vermeiden, wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz subkultiviert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 5 ml PBS gespült und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung im CO₂-Inkubator für 5 Minuten inkubiert. Nach Abkugeln der Zellen wurde die Trypsin/EDTA-Lösung abgesaugt und die Zellen durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Durch Zugabe von 10 ml RPMI-Medium und mehrmaligen Auf- und Abpipettieren erfolgte die Resuspension, aus der nachfolgend die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Kammer bestimmt wurde. Der errechnete Mittelwert aus allen vier ausgezählten Quadranten entsprach der Zellanzahl in 0,1 µl der Zellsuspension. Es wurden 0,5 bis 0,7 x 10⁶ Zellen in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche subkultiviert.

FRTL-5 sind epitheliale Schilddrüsenzellen der Ratte, die zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen neigen. Die Kultivierung der FRTL-5-Zellen erfolgte analog dem Vorgehen bei HepG2-Zellen mit einigen Modifikationen. Ein wichtiges Merkmal von FRTL-5-Zellen ist ihre Abhängigkeit von TSH, ein Hormon, welches für Proliferations- und Differenzierungsprozesse unverzichtbar ist. Zur optimalen Versorgung der Zellen mit den erforderlichen Hormonen und Nährstoffen wurde vor jedem Mediumwechsel ein nach Coon modifiziertes Ham's F12-Medium frisch angesetzt. Im Folgenden als 6-Hormon (6H)-Medium bezeichnet, enthielt es neben 5% neonatalem Kälberserum (NKS) und einem 1%igen Antibiotikum-Antimykotikum-Mix, zusätzlich einen Mix aus 6 Hormonen bzw. Wachstumsfaktoren nach den Empfehlungen des ATCC (Kap. 2.1.9.2). Die Subkultivierung der FRTL-5-Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 80%, beginnend mit dem Absaugen des verbrauchten Mediums und der Zugabe von 5 ml Hanks' balanced salt solution (HBSS). Nach dem Waschschrift wurde der Zellrasen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und im CO₂-Inkubator für 3 Minuten inkubiert. Um die proteolytische Reaktion abzustoppen, wurde 10 ml unsupplementiertes Ham's F12-Basalmedium zugegeben und der Flaschenboden mehrmals gespült. Die Zellsuspension wurde anschließend auf zwei 15 ml-Röhrchen verteilt und in einer Megafuge (Thermo Fisher Scientific) bei 170 x g für 5 Minuten ohne Kühlung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit 6H-Medium resuspendiert. Nach der Zellzählung wurden 1,0 bis 1,2 x 10⁶ Zellen in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche subkultiviert.

2.2.3.2 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryoter Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zelllinien HepG2 und FRTL-5, wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, trypsinisiert und ausgezählt. Anschließend wurden 1,5 x 10⁶ Zellen in 15 ml-Röhrchen portioniert und bei 170 x g für 5 Minuten ohne Kühlung zentrifugiert. Der Überstand

wurde abgesaugt, mit 1,8 ml Kryomedium resuspendiert und in 2 ml-Kryoröhrchen aliquotiert. Bevor die endgültige Einlagerung in flüssigen Stickstoff bei -196°C erfolgte, wurden die Zellen für eine schonendere Abkühlung bei -80°C für 24 Stunden zwischengelagert.

Für die Revitalisierung der Zellen wurde das Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, zügig mit 5 ml RPMI-Medium bzw. un-supplementiertem Ham's F12-Basalmedium verdünnt und in einem 15 ml-Röhrchen bei $170 \times g$ für 5 Minuten ohne Kühlung zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet mit 5 ml frischem RPMI-Medium bzw. 6H-Medium resuspendiert und in eine 25 cm^2 -Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden wie gewohnt im CO_2 -Inkubator kultiviert.

2.2.3.3 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontamination mit Mykoplasmen unter Verwendung des Venor[®]GeM Mykoplasmentests (Minerva Biolabs) nach Angaben des Herstellers kontrolliert.

2.2.3.4 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Methode, mit der man Fremd-DNA oder auch RNA in eukaryote Zellen einbringen kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Transfektion auf chemischem Wege mittels Lipofektion, wobei die Nukleinsäuren transient, d.h. temporär, in die Zellen eingebracht wurde. Das Prinzip der Lipofektion beruht auf einer Wechselwirkung zwischen negativ geladener DNA/siRNA und kationischer Lipide unter Ausbildung eines Lipoplexes, der die Aufnahme der DNA/siRNA in die Zelle via Endozytose ermöglicht (Jacobsen *et al.*, 2004).

2.2.3.4.1 Lipofektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen

Zur Lipofektion von Plasmid-DNA wurde FuGENE[®] 6 Transfection Reagent (Roche) verwendet. Die eukaryoten Zellen wurden hierzu in ihrer exponentiellen Wachstumsphase bei einer Konfluenz von 70% bis 80% in einem Verhältnis von 3:1 (FuGENE[®]6 : Plasmid-DNA) transfiziert. Die Transfektion der Zellen und die nachfolgende Inkubation wurden in antibiotikafreiem RPMI-Medium bzw. 6H-Medium (Kap. 2.1.9.2) durchgeführt.

Die HepG2-Zellen wurden 24 Stunden vor ihrer Transfektion in eine 96-Well Platte mit 4×10^4 Zellen pro Well subkultiviert. Pro Ansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA der generierten Reporter-genkonstrukte sowie 50 ng Plasmid-DNA der jeweiligen Expressionsvektoren eingesetzt. Im Rahmen der Untersuchungen zum TPO-Gen wurden zusätzlich 5 ng des *Renilla*-Luziferase-Reportergens verwendet. Bei einem Endvolumen von 5 μ l pro Well des Transfektionsansatzes wurde das Volumen an RPMI 1640-Basalmedium bzw. FuGENE[®]6 den Konzentrationen an eingesetzter Plasmid-DNA angepasst. Der Einsatz der Komponenten und die Inkubationszeiten sind dem Protokoll des Herstellers entnommen. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und mit einer Multikanalpipette durch 95 μ l frisches RPMI-Medium ersetzt. Unmittelbar danach folgte die separate Zugabe von 5 μ l Transfektionsansatz pro Well und die Inkubation für 12 Stunden bei 37°C. Nach Ende der Transfektionszeit wurde das Medium abgesaugt und durch 200 μ l frisches RPMI-Medium ersetzt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für das Luziferaseassay (Kap. 2.2.4.4) aufbereitet.

Die FRTL-5-Zellen wurden 72 Stunden vor ihrer Transfektion in eine 24-Well Platte mit $0,1 \times 10^6$ Zellen pro Well subkultiviert. Bei einem Endvolumen von 20 μ l pro Well des Transfektionsansatzes wurden 250 ng Plasmid-DNA der generierten Reporter-genkonstrukte sowie 250 ng Plasmid-DNA der jeweiligen Expressionsvektoren in einem angepassten Volumen an Ham's F12-Basalmedium bzw. FuGENE[®]6 eingesetzt. Das verwendete 6H-Medium wurde vor jeder Transfektion mit den entsprechenden Supplementen frisch angesetzt. Nach einmaligem Waschen mit HBSS wurden jeweils 480 μ l des Transfektionsmediums pro Well vorgelegt und mit 20 μ l des Transfektionsansatzes ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch 500 μ l frisches 6H-Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden bei 37°C folgte die Lyse der Zellen.

2.2.3.4.2 Lipofektion von *small interfering* RNA-Duplexen in FRTL-5-Zellen

Die Lipofektion der Stealth RNAi[™] *small interfering* RNA (siRNA)-Duplexe (Tab. 1) in FRTL-5-Zellen erfolgte mit Lipofectamine[®] 2000 Transfection Reagent (Invitrogen). Zur Transfektion und Inkubation der FRTL-5-Zellen wurde antibiotikafreies 6H-Medium (Kap. 2.1.9.2) verwendet.

Die FRTL-5-Zellen wurden 72 Stunden vor ihrer Transfektion mit $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Well in eine 6-Well Platte subkultiviert und bei einer Konfluenz von 60% bis 70% mit den entsprechenden sequenzspezifischen siRNA-Duplexen in einer finalen Konzentration von 50 nM nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurde das

verbrauchte Medium abgesaugt und durch 1,5 ml frisch supplementiertes 6H-Medium ersetzt. Pro Well wurden 500 μ l Transfektionsansatz zugegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Transfektionszeit erfolgte der Austausch des Mediums gegen 2 ml bzw. 3 ml frisches 6H-Medium. Nach weiteren 24 Stunden bzw. 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für die Präparation der RNA (Kap. 2.2.2.12) bzw. der Proteinfractionen (Kap. 2.2.4.1) aufbereitet.

2.2.3.5 Messung der Radioiodidaufnahme in FRTL-5-Zellen

Der aktive NIS-spezifische Iodidtransport in die FRTL-5-Zellen wurde durch Einsatz von radioaktiv markiertem Iodid (Na^{125}I) bestimmt und in Anlehnung an die Studien von Luci *et al.* (2006) und Tran *et al.* (2008) mit wenigen Modifikationen umgesetzt. Zur Berechnung der NIS-spezifischen Iodidaufnahme wurde der gesamte Versuchsansatz in An- und Abwesenheit von Kaliumperchlorat (KClO_4), einem selektiven Inhibitor des NIS, durchgeführt.

Zur Ermittlung der Radioiodidaufnahme wurden in eine 6-Well Platte $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Well subkultiviert. Bei einer Konfluenz von 60% bis 70% wurden die FRTL-5-Zellen für fünf Tage auf 5-Hormon (5H)-Medium umgestellt und am fünften Tag mit den entsprechenden Medien A bis D (Tab. 11) inkubiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Es folgten die Zugabe von 2 ml Behandlungsmedium und die Inkubation für 24 Stunden bei 37°C im CO_2 -Inkubator. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Behandlungsmedien abgesaugt und die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Zur Bestimmung der NIS-spezifischen Iodidaufnahme wurden in die Wells 2 ml einer radioaktiven Na^{125}I -Lösung ($0,3 \mu\text{Ci Na}^{125}\text{I}/\text{ml HBSS}$) bzw. in die Kontrollwells 2 ml einer KClO_4 versetzten Na^{125}I -Lösung (KClO_4 -Endkonzentration 1 mM) gegeben und für 60 Minuten im CO_2 -Inkubator inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die radioaktive Lösung vorsichtig abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit eiskalter HBSS kurz gespült und die Lyse der Zellen mit 2 ml eiskalter NaOH (0,5 M) eingeleitet. Das radioaktive Zelllysat wurde nach 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler in *Counter Vials* überführt und die Gamma-Strahlung im *Gamma-Counter* (Perkin Elmer) detektiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Behandlungsmedien für die 25-HC-Inkubation

6H-Medium	siehe Kap. 2.1.9.2, ohne Antibiotikum
5H-Medium	6H-Medium ohne TSH-Supplementierung
Medium A	5H-Medium supplementiert mit 0,1% Ethanol
Medium B	5H-Medium supplementiert mit 5 μ M 25-HC
Medium C	6H-Medium supplementiert mit 0,1% Ethanol
Medium D	6H-Medium supplementiert mit 5 μ M 25-HC

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Präparation von nukleärer und zytosolischer Proteinfraction aus FRTL-5-Zellen

Drei Stunden vor Beginn der Proteinpräparation wurden den FRTL-5-Zellen 25 μ g/ml des Calpain-Inhibitors N-Acetyl-Leucinal-Leucinal-Norleucinal (ALLN) verabreicht, um einer gesteigerten Degradierung der SREBPs entgegenzuwirken (Wang *et al.*, 1994). Für die Gewinnung der zytosolischen (ZPF) und nukleären Proteinfraction (NPF) aus FRTL-5-Zellen wurde das Nuclear Extract Kit (Active Motif) verwendet und der Zelllinie angepasst. Um ausreichende Proteinmengen gewährleisten zu können, wurden jeweils zwei Well einer 6-Well Platte gepoolt. Die Resuspendierung der ZPF erfolgte in 70 μ l *Hypotonic Buffer*, die der NPF in 15 μ l *Lysis Buffer*.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten

Für die quantitative, kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Bicinchoninsäure (BC)-Assay durchgeführt. Das Prinzip der BCA-Reaktion beruht auf einer temperaturabhängigen Reduktion der Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺ in alkalischer Lösung, verursacht durch die Peptidbindung des Proteins (Biuret-Reaktion). Die Menge an reduziertem Cu²⁺ ist dabei proportional zu der in der Lösung vorhandenen Proteinmenge. Mit hoher Spezifität komplexieren anschließend zwei Moleküle der Bicinchoninsäure ein Cu⁺-Ion unter Ausbildung eines wasserlöslichen, blau-violetten Farbkomplexes, der bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm quantifiziert werden kann.

Die Bestimmung des Proteingehalts im Zelllysate erfolgte mit dem BC Assay (Uptima-Interchim) nach Angaben des Herstellers. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Standardreihe von 0 μ g/ml bis 750 μ g/ml mitgeführt. 25 μ l des BSA-Standards bzw. 25 μ l der Probe wurden jeweils in Doppelbestimmung in die Kavitäten einer 96-Well Platte pipettiert und

nach Zugabe von 200 µl BCA-Reagenz (50:1 [A + B], v/v) im Inkubationsschrank für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Für die SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.3) wurden die Proben 1:25 verdünnt und die Proteinkonzentrationen mit einer herkömmlichen BSA-Standardreihe, unter Verwendung der mitgelieferten BSA-Stammlösung (2 mg/ml) und sterilem ddH₂O, quantifiziert. Im Rahmen der Reporteranalyse (Kap. 2.2.2.4) wurden die Proben 1:10 (HepG2) bzw. 1:2 (FRTL-5) verdünnt und die Proteinkonzentrationen mithilfe einer modifizierten BSA-Standardreihe, bestehend aus der BSA-Stammlösung und dem verwendeten Passive Lysis Buffer (1:10 bzw. 1:2, v/v), ermittelt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970) dient der elektrophoretischen Trennung von Proteinen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel, wobei die Konzentration an eingesetztem monomeren Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid den Vernetzungsgrad der Gelmatrix bestimmt. Aufgrund des Siebeffektes der Gelmatrix wird eine Auftrennung der denaturierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht erreicht. Dies wiederum wird durch Einsatz des anionischen *sodium dodecyl sulfate* (SDS) ermöglicht, welches die Proteineigenladung überdeckt und zusammen mit dem Erhitzen die Denaturierung des Proteins begünstigt. Durch das Mitführen von Proteinmarkern kann auf diese Weise das aufgefaltete Protein allein anhand seines Molekulargewichtes bestimmt werden. Kennzeichnend für das diskontinuierliche Polyacrylamidgel ist dessen Aufbau aus einem Sammel- und einem Trenngel, welche sich hinsichtlich pH-Wert und Vernetzungsgrad unterscheiden. In Abhängigkeit des Zielproteins wurden Trenngel mit Acrylamidkonzentrationen von 7,5%, 9% und 12,5% (v/v) verwendet. Zur Fokussierung der Proteine wurde nach dem Auspolymerisieren des Trenngels ein 4%iges (v/v) Sammelgel hergestellt. Das Trenn- bzw. Sammelgel setzte sich aus dem Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer, einer 40%igen Acrylamidlösung, 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und ddH₂O zusammen. Die Taschen wurden anschließend mit 10 µg bzw. 20 µg denaturierten Protein (Tab. 12) sowie den Protein-Größenmarkern beladen und in einem vertikalen Mini-Elektrophoresesystem (Hoefer) in SDS-Laufpuffer bei 12 mA (Sammelgel) bzw. 36 mA (Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 12: Probenaufbereitung für die SDS-PAGE

Nachweis von NIS	10 µg Protein in einem Endvolumen von 10 µl <i>Hypotonic Buffer</i> , versetzt mit 10 µl Roti [®] -Load, Inkubation für 30 min bei 37°C im ThermoShaker
Nachweis von SREBP-1/-2	20 µg Protein in einem Endvolumen von 15 µl <i>Hypotonic Buffer</i> (ZPF) bzw. <i>Lysis Buffer</i> (NPF), versetzt mit 5 µl Roti [®] -Load, Inkubation für 5 min bei 95°C im ThermoShaker

2.2.4.4 Luziferase-Assay

2.2.4.4.1 Firefly-Luziferase-Assay

Zur Untersuchung der Transkriptionsregulation von Genen bedient man sich den Reporter genen, deren Expressionsprodukt ein Signal erzeugt, welches leicht zu detektieren ist. Reguliert wird die Transkription des Reporter gens durch den regulatorischen Bereich des zu untersuchenden Gens, welche dem Reporter gen vorgeschaltet ist. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reporter gen kodiert für die *Firefly*-Luziferase des amerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) und katalysiert die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin unter Freisetzung von Licht. Nach Transfektion in das jeweilige Testsystem und nachfolgender Stimulation kann bei vorhandener transkriptioneller Aktivität des Luziferase gens das emittierte Licht der Biolumineszenzreaktionen detektiert werden.

Für die Untersuchungen zur Transaktivierbarkeit des NIS- und TPO-Gens wurde der *Firefly*-Luziferase-Reporter genvektor pGL4.10[*luc2*] (Promega) verwendet. Die Detektion der Luziferaseaktivitäten erfolgte mit dem Beetle-Juice-Kit (PJK) nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Luziferaseaktivitäten in 96-Well Platten wurden die Zellen nach Ende der Inkubation mit PBS gewaschen und bei RT auf einem Horizontalschüttler für 20 Minuten in 1x PLB (Promega) lysiert. In Abhängigkeit des zu untersuchenden Gens wurden 20 µl (TPO) bzw. 25 µl (NIS) 1x PLB eingesetzt. Im Falle des NIS-Gens wurde vor Beginn der Luziferasemessung das entsprechende Volumen für die Proteinbestimmung (Kap. 2.2.4.2) abgenommen.

Bei Verwendung von 24-Well Platten wurden die Zellen ebenfalls mit PBS gewaschen und bei RT auf einem Horizontalschüttler für 30 Minuten in 100 µl 1x PLB lysiert. Das Zelllysat wurde anschließend in Reaktionsgefäße überführt und für 30 Sekunden bei 16.400 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden die entsprechenden Volumina für die Luziferasemessung und für die Proteinbestimmung (Kap. 2.2.4.2) abgenommen.

Die Aktivitätsmessung der *Firefly*-Luziferase erfolgte im Multimode Reader (Berthold Technologies).

2.2.4.4.2 Renilla-Luziferase-Assay

Einflussfaktoren wie die Transfektionseffizienz oder die Zelllyse können zwischen den transfizierten Replikaten zu Aktivitätsschwankungen der exprimierten Luziferase führen. Als interne Kontrolle wird daher häufig die konstitutiv exprimierte *Renilla*-Luziferase kotransfiziert, die eine Normalisierung der ermittelten Luziferaseaktivitäten ermöglicht. Für die Reporterstudien des TPO-Gens wurde zusätzlich der *Renilla*-Luziferase-Reportervektor pGL4.74[*hRluc*/TK] (Promega) eingesetzt. Die Luziferaseaktivitäten wurden mit dem Renilla-Juice-Kit (PJK) nach Angaben des Herstellers unmittelbar nach Messung der *Firefly*-Luziferaseaktivität im Multimode Reader (Berthold Technologies) quantifiziert.

2.2.4.5 Electrophoretic mobility shift assay

Eine *in vitro*-Methode zum Nachweis von Protein-DNA-Wechselwirkungen ist der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA), mit dem man interagierende *cis*- und *trans*-regulierende Elemente identifizieren und charakterisieren kann. Hierzu wird ein Gemisch aus Proteinen und fluoreszenzmarkierter DNA in einem nicht-denaturierenden (nativen) Polyacrylamidgel (PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt. Bedingt durch das höhere Molekulargewicht von Protein-DNA-Komplexen migrieren diese gegenüber nicht-komplexierter DNA langsamer. Daraus resultiert eine Bandenverschiebung (*shift*), die mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden kann.

Für die Durchführung des EMSA wurde das DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche) verwendet.

2.2.4.5.1 Gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation von Proteinen

Die eukaryote *in vitro*-Translation der SREBPs erfolgte mithilfe des TnT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega). In einem TnT[®]-Ansatz (50 µl) wurden 40 µl TNT[®] T7 Quick Master Mix, 2 µl Methionin (1nM) und 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt und mit nukleasefreiem H₂O aufgefüllt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte anschließend bei 30°C für 90 Minuten im Thermomixer (Eppendorf).

2.2.4.5.2 DIG-Markierung der Oligonukleotide

Für die 3'-Endmarkierung mit Digoxigenin-11-ddUTP wurden 24 bis 35 bp lange doppelsträngige (ds) Oligonukleotide mit 5'-Überhang generiert (Tab. 9; Kap. 2.2.2.5). In Abhängigkeit des zu untersuchenden Gens wurden 1000 ng ds Oligonukleotide der NIS-Sequenz bzw. 200 ng ds Oligonukleotide der zu untersuchenden TPO-Sequenz eingesetzt und nach dem Protokoll von Roche aufbereitet.

2.2.4.5.3 Gel Shift-Reaktion

In einem *Gel Shift*-Ansatz (20 µl) wurden zunächst 2 µl *in vitro*-translatiertes Protein mit 4 µl 5x Binding Buffer, 1 µl poly [d(I-C)], 1 µl poly L-lysine und steriles ddH₂O, das dem Volumen an DIG-markierter Oligonukleotide angepasst wurde, versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 8 ng DIG-markierter NIS-Oligonukleotidsequenz bzw. 2,4 ng DIG-markierter TPO-Oligonukleotidsequenz wurde der *Gel Shift*-Ansatz für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe des unspezifischen Kompetitors poly d(I-C) können unspezifische Bindungen unterdrückt werden. Zusätzlich wurde poly L-lysine zur Optimierung der *Gel Shift*-Reaktion eingesetzt. Zur elektrophoretischen Auftrennung in der nativen PAGE wurden den *Gel Shift*-Ansätzen nach Ende der Inkubationszeit 5 µl Ladepuffer zugesetzt.

2.2.4.5.4 Kompetitionsanalyse

Um die Bindungsspezifität zwischen den interagierenden Transkriptionsfaktoren und *cis*-regulierenden Elementen der DNA bestimmen zu können, werden Konkurrenzexperimente mit nicht-markierter, sequenzspezifischer DNA (Kompetitor) durchgeführt. Durch Zugabe eines Überschusses an Kompetitor wird die fluoreszenzmarkierte DNA verdrängt. Die daraus resultierende Abnahme der Fluoreszenzsignalintensität ist ein Nachweis für die Spezifität der Bindung.

Im Zuge der *Gel Shift*-Reaktion (Kap. 2.2.4.5.3) wurde dem Konkurrenzansatz bei konstanter Menge an *in vitro*-translatiertem Protein und DIG-markierter DNA steigende Mengen an nicht-markierter Kompetitor-DNA zugesetzt.

2.2.4.5.5 native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Durchführung der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde am Vortag ein 6%iges Polyacrylamidgel aus 0,5x TBE, 40%iger Acrylamidlösung sowie APS und TEMED, jeweils in einer finalen Konzentration von 0,1% (v/v) eingesetzt, hergestellt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Vor Beginn der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in einem Doppelsystem (Peqlab), in Gegenwart von 0,5x TBE, einem Vorlauf (70 V, 20 min) unterzogen. Die *Gel Shift*-Ansätze wurden anschließend in die Taschen geladen und bei 85 V aufgetrennt.

2.2.4.5.6 Transfer und Fixierung der DNA-Sonden

Zur Übertragung der DNA- bzw. Protein-DNA-Sonden wurde das Polyacrylamidgel sandwichartig zwischen jeweils drei Lagen *Blotting*-Papier und den Pads gelegt und die Sonden im *semi-dry*-Verfahren auf eine Nylonmembran geblottet. Das *Blotting*-Papier sowie die Nylonmembran wurden kurz vor deren Gebrauch in 0,5x TBE-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte im vorgekühlten 0,5x TBE-Puffer bei 300 mA für eine Stunde. Zum Fixieren der DNA-Sonden wurde die Nylonmembran für 3 Minuten im HybriLinker™ (Ultra-Violet Products) mit UV-Licht exponiert und zusätzlich für 2 Stunden bei 80°C gebacken.

2.2.4.5.7 Detektion mittels Chemilumineszenz

Zur Detektion sequenzspezifischer DNA-Bindungsproteine wurde unter Verwendung des Anti-Digoxigenin-Antikörpers und des CSPD-Substrats aus dem DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die verwendeten Wasch-, Blockier- und Detektionslösungen wurden dem DIG Wash and Block Buffer Set (Roche) entnommen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Visualisierung der Protein-DNA-Sonden erfolgte mit dem G:BOX Chemi Imaging System (Syngene).

2.2.5 Immunologische Methoden

2.2.5.1 Immunoblot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen mithilfe von Antikörpern muss das zuvor aufgetrennte Proteingemisch (SDS-PAGE; Kap. 2.2.4.5) auf eine Trägermembran übertragen

werden. Der als *Immunoblot* bezeichnete Proteintransfer erfolgte im *semi-dry*-Verfahren, wobei das Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und sandwichartig zwischen jeweils drei Lagen *Blotting*-Papier und den *Fiber Pads* in das Western Trans-Blot System (Bio-Rad) eingespannt wurde. Die verwendeten Nitrozellulosemembranen, *Blotting*-Papiere und *Fiber Pads* wurden zuvor für circa 5 Minuten im vorgekühlten Transferpuffer äquilibriert. Der Elektrotransfer erfolgte im geeigneten Transferpuffer bei 100 V für 90 Minuten, wobei für die Analyse der SREBP-Proteine der Transferpuffer nach Towbin *et al.* (1979), für die Analyse des NIS-Proteins der Transferpuffer nach Kaminsky *et al.* (1994) eingesetzt wurde. Zur Überprüfung eines erfolgreichen Transfers wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S angefärbt und zum Blockieren freier Bindungsstellen anschließend in 5% Milchpulver/TBS-T (w/v) auf einem Wippschüttler für drei bis vier Stunden bei RT inkubiert.

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden in den jeweiligen Verdünnungen (Tab. 13) in 1% Milchpulver/TBS-T (w/v) gelöst. Der polyklonale *rabbit high-affinity* anti-NIS wurde freundlicherweise von Prof. Nancy Carrasco (Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut) zur Verfügung gestellt. Die Inkubation der Membranen mit den Primärantikörpern erfolgte auf einem Wippschüttler bei 4°C über Nacht. Die entsprechenden Sekundärantikörper wurden nach dreimaligem Waschen in TBS-T (jeweils 10 Minuten) auf die Membranen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei RT wurde der Sekundärantikörper ebenfalls durch dreimaliges Waschen in TBS-T (jeweils 10 Minuten) entfernt. Unmittelbar daran wurden die Proteine mit dem ECL Plus Kit (GE Healthcare) und unter Verwendung des G:BOX Chemi Imaging Systems (Syngene) visualisiert. Die Auswertung erfolgte mit der von Syngene mitgelieferten Software Gene-Tools.

Tabelle 13: Eingesetzte Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung
<i>mouse</i> anti-SREBP-1 (monoklonal)	1:100
<i>rabbit</i> anti-SREBP-2 (polyklonal)	1:200
<i>rabbit high-affinity</i> anti-NIS (polyklonal)	1:2000
<i>mouse</i> anti- β -Aktin (monoklonal)	1:5000
anti- <i>mouse</i> , HRP-gekoppelt	1:10000
anti- <i>rabbit</i> , HRP-gekoppelt	1:10000

2.2.5.2 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist ein Verfahren, womit die spezifische Wechselwirkung zwischen einem Transkriptionsfaktor und einem *cis*-regulierenden DNA-Element in lebenden Zellen nachgewiesen werden kann. Durch Einsatz von Formaldehyd kommt es zu einer reversiblen Quervernetzung (*crosslink*) des transaktivierenden Proteins mit dem assoziierten DNA-Element, wodurch der gegenwärtige Zustand der Transkriptionsregulation *in vivo* konserviert wird. Nach Extraktion und Fragmentierung der chromosomalen DNA erfolgt die selektive Immunpräzipitation mithilfe eines gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpers. Die vom Protein gebundenen DNA-Elemente können auf diese Weise angereichert und nach Auflösen der Quervernetzung mittels PCR nachgewiesen werden.

Für die ChIP wurden 3×10^6 Zellen in 145 mm Zellkulturschalen subkultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70% bis 80% erfolgte die Umstellung auf 5H-Medium für fünf Tage. Am fünften Tag wurden die FRTL-5-Zellen mit den entsprechenden Behandlungsmedien A, C und D (Tab. 11) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert (Vgl. Kap. 2.2.3.5). Nach Ende der Inkubationszeit wurde die chromosomale DNA aus FRTL-5-Zellen mit dem Magna ChIP™ G Kit (Millipore) gewonnen. Für die Immunpräzipitation wurden 2 µg anti-SREBP-1 und anti-SREBP-2 sowie 2 µg *normal rabbit* IgG (Kap. 2.1.6.2) eingesetzt. Vor Durchführung der PCR-Reaktion wurde die eluierte DNA mit dem QIAquick® PCR Purification Kit gereinigt. Unter Verwendung der ChIP-Primer (Tab. 4) wurden die SREBP-responsiven Regionen des NIS- und TPO-Gens sowie die unspezifische Kontrollregion mittels konventioneller PCR (Kap. 2.2.2.3) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.2.2.6). Zusätzlich erfolgte, unter Verwendung der gleichen ChIP-Primer und DNA-Proben, die Amplifizierung der SREBP-responsiven Regionen und der Kontrollregion mittels qPCR (Kap. 2.2.2.15), wobei 5 µl DNA eingesetzt wurde. Die ChIP-Analyse wurde freundlicherweise von Frau Dr. Gaiping Wen durchgeführt.

2.2.6 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Auswertung der *knockdown*-Experimente erfolgte mittels *Student's* t-Test. Die Daten zur NIS-spezifischen Iodidaufnahme wurden mittels *one-way* ANOVA und anschließendem *fisher's pairwise post-hoc* Test ausgewertet. Dabei wurde ein *p*-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung der rekombinanten SREBPs

Im Organismus werden die SREBPs, wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, als inaktive membrangebundene Vorläuferproteine synthetisiert und posttranslational zu den transkriptionell aktiven nukleären Proteinen modifiziert (Abb. 4). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Expressionsvektoren verwendet, deren inserierte Sequenzen für das nukleäre SREBP-1c bzw. SREBP-2 der Ratte (nSREBP-1c /-2) kodieren.

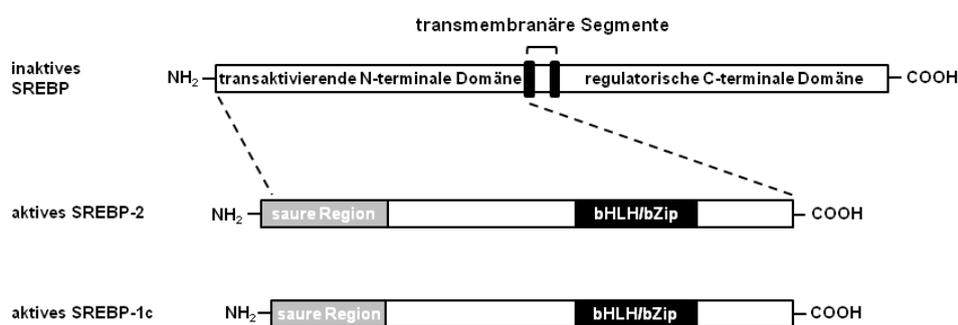


Abbildung 4: Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikation von SREBP-1c und SREBP-2 (modifiziert nach Bengoechea-Alonso und Ericsson, 2007).

3.1.1 Klonierung der nukleären SREBPs

Die Herstellung des nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 dieser Arbeit erfolgte in Anlehnung an Stoeckman *et al.* (2002), die bereits das nSREBP-1c der Ratte erfolgreich klonierten. Das 1344 Basenpaar (bp) lange cDNA-Fragment des aktiven nSREBP-1c kodiert für die Aminosäuren 1 bis 448 und entspricht einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa. Das aktive nSREBP-2, repräsentiert durch die Aminosäuren 1 bis 460, wird durch ein 1380 bp langes cDNA-Fragment kodiert und weist ein Molekulargewicht von etwa 51 kDa auf. Um ausschließlich die nukleären Formen der SREBPs zu erhalten, wurden die *Antisense-Primer* mit einem künstlichen Stopcodon (TGA) versehen. Darüber hinaus wurden in die verwendeten *Sense-* und *Antisense-Primer* (Tab. 5) Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI* integriert, um die Insertion des cDNA-Fragmentes in die *multiple cloning site* (MCS) des Expressionsvektors pcDNA3.1 (Invitrogen) zu gewährleisten. In Abbildung 5 ist ein Ausschnitt der kodierenden cDNA-Sequenz von nSREBP-1c und nSREBP-2 mit den korrespondierenden Aminosäuren dargestellt.

A

```

1      ...ATGGATTGCACATTTGAAGACATGCTTCAGCTCATCAACAACCAAGACAGTGACTTC
1      ...-M--D--C--T--F--E--D--M--L--Q--L--I--N--N--Q--D--S--D--F--

58     CCTGGCCTATTTGATGCCCCCTATGCTGGGGGTGAGACAGGAGACACAGGCCCCAGCAGC
20     -P--G--L--F--D--A--P--Y--A--G--G--E--T--G--D--T--G--P--S--S--

.....
.....

1255   AGTGGTGGCAGTGACTCTGAGCCCCGACAGCCAGCCTTTGAGGATAACCAGGTGAAAGCC
419   -S--G--G--S--D--S--E--P--D--S--P--A--F--E--D--N--Q--V--K--A--

1315   CAGCGGCTGCCTTCACATAGCCGAGGCATGTGA.....
439   -Q--R--L--P--S--H--S--R--G--M-----.....

```

B

```

1      ...ATGGATGAGAACACGCGAGCTGGGCGGTCTGGAGACCATGGAGACCCCTCACGGAGCTG
1      ...-M--D--E--N--S--E--L--G--G--L--E--T--M--E--T--L--T--E--L--

58     GGCGATGAGCTGACTCTCGGGGACATCGACGAGATGCTACAGTTTGTTCAGCAATCAAGTG
20     -G--D--E--L--T--L--G--D--I--D--E--M--L--Q--F--V--S--N--Q--V--

.....
.....

1302   GCTGGCTTCTCCCCCTATTCCATTGACTCTGAGCCGGGCAGCCCTCTGCTGGATGATGCA
434   -A--G--F--S--P--Y--S--I--D--S--E--P--G--S--P--L--L--D--D--A--

1362   AAGGTCAAGGATGAACCGGACTTGA.....
454   -K--V--K--D--E--P--D-----.....

```

Abbildung 5: Ausschnitt der kodierenden cDNA-Sequenz sowie der korrespondierenden Aminosäuresequenz des nSREBP-1c (A) und nSREBP-2 (B) von *Rattus norvegicus*. Die Zahlen geben die Anzahl der Basen sowie der Aminosäuren wider. Das Startcodon (ATG - Methionin) und das Stopcodon (TGA) sind fett hervorgehoben.

Für die Amplifizierung der nSREBP-kodierenden Fragmente diente FRTL-5-cDNA als *Template* (Kap. 2.2.2.3). Nachdem die amplifizierte cDNA gelelektrophoretisch überprüft (Kap. 2.2.2.6), mit den Restriktionsenzymen gespalten (Kap. 2.2.2.8) und mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) gereinigt wurde, erfolgte die Insertion (Kap. 2.2.2.10) der Amplifikate in die *HindIII*- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen des dephosphorylierten (Kap. 2.2.2.9) pcDNA3.1-Expressionsvektors (Invitrogen). Zur Vermehrung der Plasmide wurde die ligierte Vektor-DNA durch Elektroporation in kompetente *E. coli* transformiert (Kap. 2.2.1.4) und die DNA selektierter Klone mittels Miniplasmidpräparation (Kap. 2.2.2.1.1) isoliert. Zur Überprüfung der inserierten DNA-Fragmente wurde zunächst ein analytischer Restriktionsverdau (Kap. 2.2.2.8) durchgeführt und die Produktgröße gelelektrophoretisch bestimmt (Kap. 2.2.2.6). Klone mit korrekt inseriertem DNA-Fragment wurden von der Firma LGC Genomics GmbH sequenziert (*Primer* in Tab. 10; Kap. 2.2.2.11). Bei Vorliegen einer fehlerfreien Sequenz wurde vom entsprechenden Einzelklon eine Übernachtskultur angefertigt (Kap. 2.2.1.2) und die DNA mittels Midiplasmidpräparation isoliert (Kap. 2.2.2.1.2).

3.1.2 Nachweis einer Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen

Zum Nachweis des rekombinanten nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 wurden die entsprechenden Überexpressionsvektoren in HepG2-Zellen transfiziert (Kap. 2.2.3.4.1) und mittels *Immunoblot* (Kap. 2.2.5.1) analysiert.

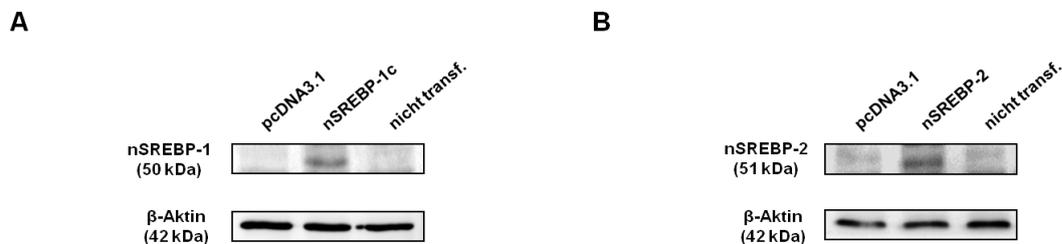


Abbildung 6: Immunologischer Nachweis von nSREBP-1c (A) und nSREBP-2 (B) nach Überexpression in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden in 6-Well Platten subkultiviert und bei einer Konfluenz von 80% mit den entsprechenden Expressionsvektoren (500 ng/Well) für 12 h transfiziert. Nicht transfizierte Zellen wurden als Transfektionskontrolle mitgeführt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen aufgeschlossen und die Nuklearfraktion gewonnen. 15 µg Protein wurden mittels SDS-PAGE (7,5%) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von nSREBP-1, nSREBP-2 und β-Aktin, das als Ladekontrolle diente.

Die in Abbildung 6 dargestellte Überexpression der nSREBPs zeigt für beide überexprimierte Isoformen in Höhe des vorausgesagten Molekulargewichtes eine deutliche Bande im Vergleich zur Kontrolle bzw. zu den nicht transfizierten Zellen. Der immunologische Nachweis der rekombinanten Proteine bestätigt das Vorhandensein der nukleären Formen von SREBP-1c und SREBP-2.

3.2 Klonierung des Kontrollvektors 2xSRE-1-Luc

Synthetisch hergestellte Nukleotidsequenzen, bei denen ein bekanntes *cis*-Element in einfacher oder mehrfacher Wiederholung vorliegt, haben sich als Modell zur Demonstration einer funktionellen *cis/trans*-Interaktion etabliert (Cho *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2012). Um die SREBP-induzierte Transaktivierung der untersuchten Reportergene dieser Arbeit belegen zu können, wurde der Kontrollvektor 2xSRE-1-Luc mit einer zweifachen Wiederholung des vom humanen LDL-Rezeptor (hLDLR) abgeleiteten klassischen SRE-1 (Smith *et al.*, 1990; Briggs *et al.*, 1993) konstruiert. Hierfür wurden die komplementären Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *XhoI* hybridisiert (Tab. 8; Kap. 2.2.2.5) und in die korrespondierenden Restriktionsschnittstellen des pGL4.23[*luc2/minP*]-Vektors (Promega) inseriert. Der pGL4.23[*luc2/minP*]-Vektor enthält unmittelbar stromaufwärts

des *Firefly*-Luziferasegens *luc2* (*Photinus pyralis*) sowie unmittelbar stromabwärts der MCS ein TATA-Box-Element (Minimalpromotor, minP). Hierdurch wird die Transkription des Luziferasegens auch bei promotorlosen Sequenzelementen gewährleistet. Die erfolgreiche Insertion wurde anschließend durch Restriktions- (Kap. 2.2.2.8) und Sequenzanalyse (Kap. 2.2.2.11) bestätigt.

3.3 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der SREBPs bei der transkriptionellen Regulation des NIS-Gens von *Rattus norvegicus*

3.3.1 Einfluss einer sterol-induzierten Inhibierung der SREBPs auf die NIS-spezifische Iodidaufnahme in FRTL-5-Zellen

Die Auswirkungen einer sterol-induzierten Inhibierung der SREBPs auf die NIS-spezifische Iodidaufnahme sollte durch Bestimmung des von den FRTL-5-Zellen aufgenommenen radioaktiv markierten Iodid (Na^{125}I) (Kap. 2.2.3.5) untersucht werden. Nach vorangegangener fünftägiger TSH-Restriktion wurden die FRTL-5-Zellen für 24 Stunden mit 5 μM 25-HC, einem potenten Inhibitor der SREBP-Ausreifung (Adams *et al.*, 2004), in An- und Abwesenheit von 10 mU/ml TSH inkubiert. Die Bestimmung der NIS-spezifischen Iodidaufnahme erfolgte anschließend in An- und Abwesenheit von 1 mM Kaliumperchlorat, das den aktiven Iodidtransport über kompetitive Hemmung des NIS blockiert (Tonacchera *et al.*, 2004).

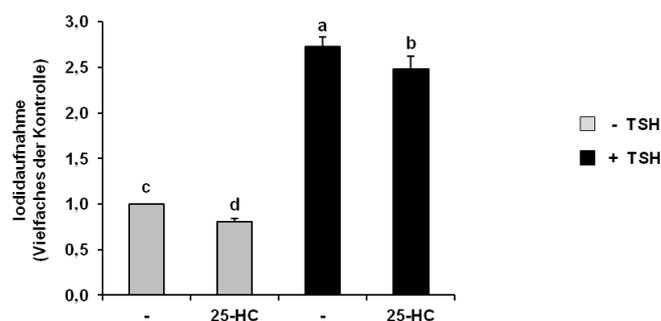


Abbildung 7: Einfluss einer sterol-induzierten Inhibierung der SREBPs auf die NIS-spezifische Iodidaufnahme in FRTL-5-Zellen. Die NIS-spezifische Iodidaufnahme wurde nach fünftägiger TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 5 μM 25-HC in An- und Abwesenheit von 10 mU/ml TSH gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Triplikats aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Unterschiedliche Buchstaben (a, b, c, d) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Fischer-Test, $p < 0,05$).

Die 24-stündige Stimulation mit TSH führte zu einer Erhöhung der NIS-spezifischen Aufnahme von Iodid in den FRTL-5-Zellen. Das akkumulierte radioaktive Iodid in den FRTL-5-Zellen war

gegenüber der Kontrolle um das 2,8-fache ($p < 0,05$) erhöht (Abb. 7). Die Zugabe von 25-HC führte sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von TSH zu Verminderungen um 19% ($p < 0,05$) bzw. 9% ($p < 0,05$) im Vergleich zur jeweiligen gruppeninternen Kontrolle (Abb. 7).

3.3.2 Einfluss eines SREBP-*knockdowns* auf die Expression des NIS in FRTL-5-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob die sterol-induzierte Inhibierung des NIS direkt sowie isoformspezifisch über die SREBPs reguliert wird, wurde ein *knockdown* von SREBP-1 und SREBP-2 mittels RNA-Interferenz (RNAi) induziert. Hierzu wurden die FRTL-5-Zellen mit sequenzspezifischen, gegen SREBP-1 und SREBP-2 gerichteten, siRNA-Duplexen (Tab. 1; Invitrogen) transfiziert (Kap. 2.2.3.4.2) und die Expression von SREBP-1/-2 und vom NIS mittels *Immunoblot* (Kap. 2.2.5.1) analysiert. Als Kontrolle diente eine siRNA-Oligonukleotidsequenz, die nicht homolog zu irgendeinem bekannten Gen ist sowie in ihrer Länge und Konfiguration einer Standard-siRNA entspricht (Invitrogen).

Zunächst wurde der siRNA-induzierte *knockdown* der SREBPs in FRTL-5-Zellen dokumentiert, wobei die Proteinexpression der Vorläuferform (p) und der nukleären Form (n) von SREBP-1 und SREBP-2 24 Stunden nach Transfektion der korrespondierenden siRNAs bestimmt wurde.

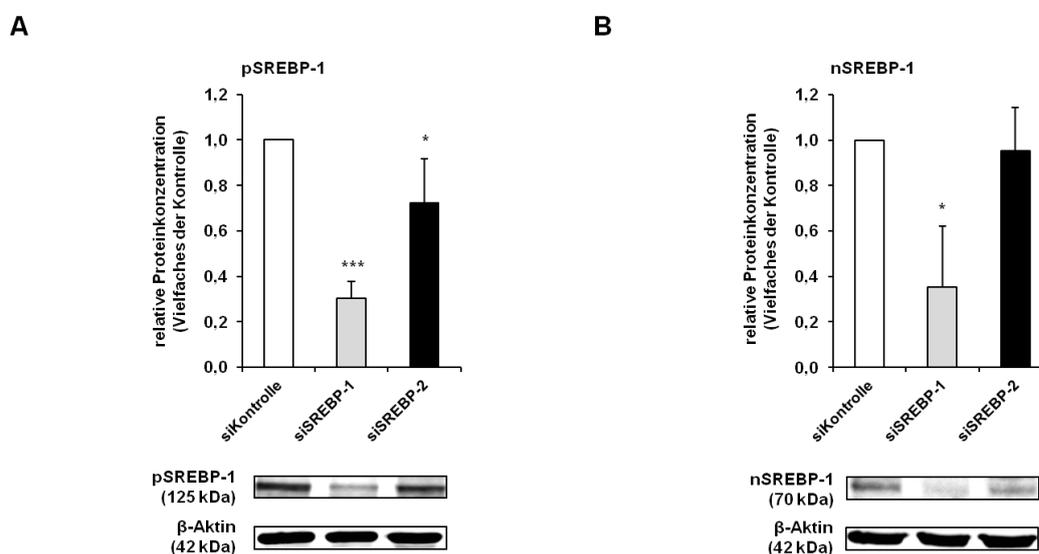


Abbildung 8: Einfluss eines RNAi-induzierten *knockdowns* von SREBP-1 und SREBP-2 auf die Expression des SREBP-1 in FRTL-5-Zellen. Die Proteinexpression von pSREBP-1 (A) und nSREBP-1 (B) wurde 24 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplexe in FRTL-5-Zellen quantifiziert und mit der von β -Aktin normalisiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot mit entsprechender densitometrischer Analyse aus den Mittelwerten \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontroll-siRNA (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Wie in Abbildung 8A dargestellt, führte der spezifische *knockdown* von SREBP-1 und SREBP-2 zu einer Abnahme der Proteinkonzentration des pSREBP-1 auf das 0,30-fache ($p < 0,001$) und 0,72-fache ($p < 0,05$) der Kontrolle. Auch konnte das nSREBP-1 durch den Einsatz der SREBP-1-siRNA auf das 0,35-fache ($p < 0,05$) der Kontrolle supprimiert werden, wohingegen das nSREBP-1 durch den SREBP-2-*knockdown* unbeeinflusst blieb (Abb. 8B).

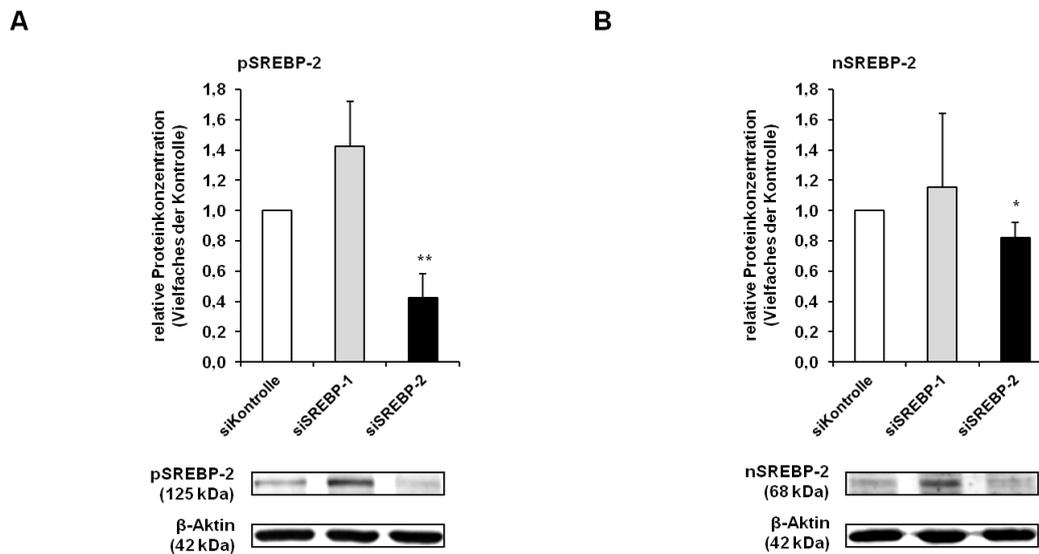


Abbildung 9: Einfluss eines RNAi-induzierten *knockdowns* von SREBP-1 und SREBP-2 auf die Expression des SREBP-2 in FRTL-5-Zellen. Die Proteinexpression von pSREBP-2 (A) und nSREBP-2 (B) wurde 24 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplexe in FRTL-5-Zellen quantifiziert und mit der von β -Aktin normalisiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot mit entsprechender densitometrischer Analyse aus den Mittelwerten \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontroll-siRNA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Nach siRNA-induzierten *knockdown* von SREBP-2 wurde die Proteinexpression des pSREBP-2 auf das 0,47-fache der Kontrolle vermindert (Abb. 9A; $p < 0,01$). Das supprimierte SREBP-1 übte hingegen keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration des pSREBP-2 aus (Abb. 9A). Vergleichbares konnte für das nSREBP-2 festgestellt werden, dessen Proteinkonzentration nach Suppression des SREBP-2 auf das 0,82-fache ($p < 0,05$) der Kontrolle vermindert wurde, jedoch nach dem SREBP-1-*knockdown* unverändert war (Abb. 9B).

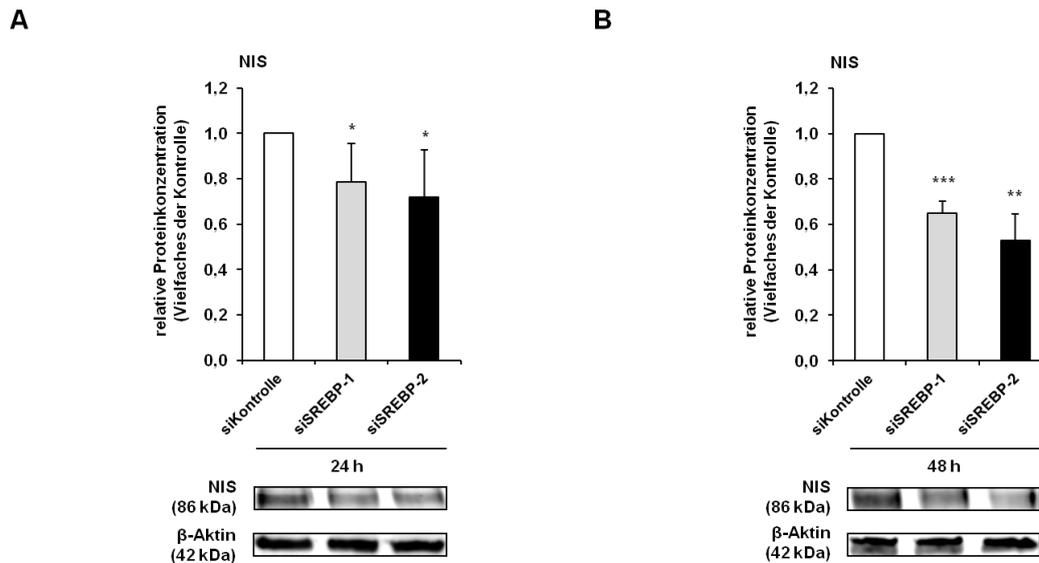


Abbildung 10: Einfluss eines RNAi-induzierten knockdowns von SREBP-1 und SREBP-2 auf die Expression des NIS in FRTL-5-Zellen. Die Proteinexpression des NIS wurde 24 Stunden (A) und 48 Stunden (B) nach Transfektion der siRNA-Duplexe in FRTL-5-Zellen quantifiziert und mit der von β -Aktin normalisiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot mit entsprechender densitometrischer Analyse aus den Mittelwerten \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontroll-siRNA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Wie die Abbildung 10 zeigt, konnte die Proteinexpression des NIS durch den erfolgreichen *knockdown* von SREBP-1 und SREBP-2 in den FRTL-5-Zellen deutlich beeinflusst werden. Bereits nach 24 Stunden führte die gezielte Suppression von SREBP-1 und SREBP-2 zu einer verringerten Proteinkonzentration des NIS auf das 0,79-fache ($p < 0,05$) bzw. 0,72-fache ($p < 0,05$) der Kontrolle (Abb. 10A). Die Auswirkungen des SREBP-*knockdowns* auf die Expression des NIS-Proteins konnten nach 48 Stunden noch zusätzlich verstärkt werden. Zu diesem Zeitpunkt war die Proteinkonzentration des NIS in den SREBP-1-*knockdown*-Zellen auf das 0,68-fache ($p < 0,001$) und in den SREBP-2-*knockdown*-Zellen auf das 0,59-fache ($p < 0,01$) der Kontrolle abgesunken (Abb. 10B).

3.3.3 Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des NIS-Gens von *Rattus norvegicus* durch die SREBPs

3.3.3.1 *In silico*-Analyse der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von *Rattus norvegicus*

Zur Identifizierung der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von *Rattus norvegicus* wurde die kodierende Sequenz (NM_052983, GenBank) mit einem Teilbereich des Rattengenoms (AABR06086855, GenBank), unter Zuhilfenahme des *basic local alignment search tool*

(BLAST)-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), verglichen. Darauf basierend wurde ein 3089 bp umfassender Abschnitt der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von Nukleotid (nt) -3002 bis +87 relativ zum Transkriptionsstart mit dem Programm MatInspector von Genomatix (www.genomatix.de) auf putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Innerhalb des analysierten Sequenzabschnitts wurden mehrere putative E-Box-Elemente (*core similarity* > 0,9; *matrix similarity* = 1,0) identifiziert, die im Zusammenhang mit einer SREBP-assoziierten Transkriptionsregulation stehen (Kim *et al.*, 1995). Das SRE, welches das *cis*-Element der SREBPs darstellt, konnte jedoch im analysierten Bereich des NIS-Gens nicht identifiziert werden. In Anlehnung an Ikeda *et al.* (2001) wurde durch visuellen Abgleich des klassischen SRE-1 (5'-ATCACCCCAC-3') mit der 3089 bp umfassenden 5'-flankierenden Region des NIS-Gens zusätzlich zehn putative SREs identifiziert. Die putativen *cis*-Elemente der SREBPs sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Nukleotidsequenzen der visuell ermittelten putativen SRE-Elemente¹ und der von MatInspector annotierten E-Box-Elemente²

Putatives SRE	Nukleotidsequenz [5'→3']	Nukleotidposition	Putative E-Box	Nukleotidsequenz [5'→3']	Nukleotidposition
hLDLR SRE-1	<u>ATCACCCCAC</u>	-	E-Box Konsensus	CANNTG	-
SRE+59	CTCTCTCAC	+59 bis +68	InvE-Box-154	AACACTCGTGTCT	-154 bis -166
SRE+37	AGTCCCCGAC	+37 bis +46	InvE-Box-849	AAGGCACGCGCCC	-849 bis -861
SRE+19	ACTCTCCCAC	+19 bis +28	InvE-Box-1937	CTGCCACCCTTCG	-1937 bis -1949
InvSRE-7	GTCGATCCAC	-7 bis -16	InvE-Box-2345	CACTCAGTGGAA	-2345 bis -2357
SRE-211	ATCTCTCCAC	-211 bis -220	E-Box-2346	GTTCACGTGAGT	-2346 bis -2358
InvSRE-481	GACTCCCCAC	-481 bis -490	InvE-Box-2724	GTGCCACTTCGGG	-2724 bis -2736
SRE-670	CTCACTTCTC	-670 bis -679			
SRE-1644	GTCACTGCTC	-1644 bis -1653			
InvSRE-1764	CTCACCTAAA	-1764 bis -1773			
InvSRE-2660	CTCACAGCAC	-2660 bis -2669			

¹ Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen der putativen SRE-Elemente des NIS-Gens und die Nukleotidsequenz vom SRE-1 des hLDLR. Übereinstimmende Nukleotide sind fett hervorgehoben. Die Pfeile markieren das *direct repeat* 5'-PyCAPy-3' (Py - Pyrimidinbase) (Ikeda *et al.*, 2001). Bei den Nukleotidsequenzen der invers orientierten SREs (InvSRE) ist jeweils der *Antisense*-Strang angegeben.

² Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen der annotierten E-Box-Elemente und die E-Box-Konsensussequenz. Die von MatInspector angegebene *core*-Sequenz ist unterstrichen. Bei den Nukleotidsequenzen der invers orientierten E-Box-Elemente (InvE-Box) ist jeweils der *Antisense*-Strang angegeben.

3.3.3.2 Klonierung der NIS-Reportergenvektoren

Der von BACPAC Resources (Oakland, USA) bezogene BAC-Klon CH230-277G13, der die vollständige genomische Sequenz des NIS enthält, diente als *Template* für die Amplifizierung der 3089 bp umfassenden 5'-flankierenden Region des NIS-Gens. Nach Identifizierung eines mit Chloramphenicol selektierten positiven BAC-Klons wurde die genomische DNA mit dem Midi Prep Plasmid Kit (Qiagen) isoliert (Kap. 2.2.2.1.2) und gelelektrophoretisch kontrolliert (Kap. 2.2.2.6). Unter Verwendung der *Primer* NIS-*BglIII*_S und NIS-3002/+87-*XhoI*_A (Tab. 6) wurde das Ausgangskonstrukt NIS-3002/+87 amplifiziert (Kap. 2.2.2.3) und diente im Folgenden als parentales Konstrukt bei der Herstellung der 5'-verkürzten NIS-Reportergenkonstrukte (Tab. 6). Sowohl die amplifizierten DNA-Fragmente als auch der promotorlose pGL4.10[*luc2*]-Vektor (Promega), der das *Firefly*-Luziferasegen *luc2* (*Photinus pyralis*) enthält, wurden mit den Restriktionsenzymen *BglIII* und *XhoI* geschnitten (Kap. 2.2.2.8) und anschließend miteinander ligiert (Kap. 2.2.2.10). Zusätzlich wurden Reportergenkonstrukte generiert, die jeweils einen definierten Abschnitt der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens repräsentieren. Hierzu wurden die komplementären Oligonukleotide mit *BglIII*- und *XhoI*-Überhang amplifiziert (Tab. 6) und, aufgrund des Fehlens von Kernpromotorelementen, in die korrespondierenden Restriktionsschnittstellen des Minimalpromotor enthaltenden pGL4.23[*luc2*/minP]-Vektors inseriert.

Nach Transformation in *E. coli* (Kap. 2.2.1.4) wurden für alle hergestellten Reportergenkonstrukte mehrere Klone über Ampicillin selektiert und die DNA mittels Miniplasmidpräparation isoliert (Kap. 2.2.2.1.1). Die Korrektheit der inserierten DNA-Fragmente wurde durch Restriktions- (Kap. 2.2.2.8) und Sequenzanalyse (Kap. 2.2.2.11) überprüft. Zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA wurde von einem positiv sequenzierten Einzelklon eine Übernachtskultur angelegt (Kap. 2.2.1.2) und die DNA mittels Midiplasmidpräparation isoliert (Kap. 2.2.2.1.2).

3.3.3.3 Reportergenanalyse der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens in HepG2-Zellen

Zur *in vitro*-Analyse des regulatorischen Bereiches von NIS wurde zunächst die Hepatokarzinom-Zelllinie HepG2 verwendet, da diese ein gut etabliertes Zellmodell darstellt (Wen *et al.*, 2011). Nach zwölfstündiger Transfektion und 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivitäten der Reportergenkonstrukte gemessen (Kap. 2.2.4.4.1). Durch Murphy *et al.* (2006) und eigenen Vorversuchen war bekannt, dass die SREBPs Einfluss auf den pGL4.74[*hRluc*/TK]-Vektor, der das *Renilla hRluc*-Gen (*Renilla reniformis*) enthält, ausüben. Aus diesem Grund wurden die ermittelten relativen Lichteinheiten

(RLU) der *Firefly*-Luziferase um die entsprechenden Proteinkonzentrationen der Zelllysate (Murphy *et al.*, 2006) (Kap. 2.2.4.2) und den korrespondierenden leeren Reporter-genvektoren (pGL4.10 bzw. pGL4.23) normiert (Inoue *et al.*, 2011). Die dargestellten Aktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1 (Leervektor), dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde.

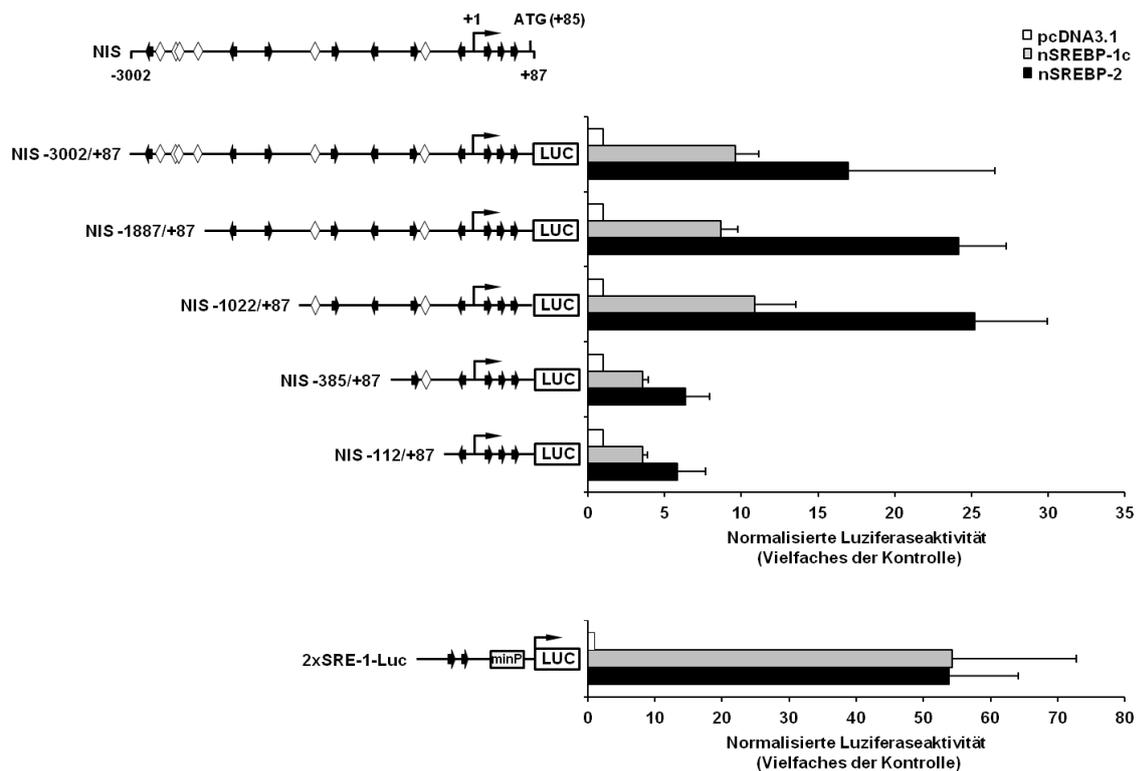


Abbildung 11: Transaktivierung der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden transient mit den Reporter-genkonstrukten NIS-3002/+87, NIS-1887/+87, NIS-1022/+87, NIS-385/+87, NIS-112/+87 bzw. 2xSRE-1-Luc (Kontrollvektor) und den Expressionsvektoren nSREBP-1c, nSREBP-2 bzw. pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Triplikats aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die normierten Luziferaseaktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. Oberhalb ist die 5'-flankierende Region des NIS-Gens von nt -3002 bis +87, einschließlich der regulatorischen Elemente (SRE \blacktriangleright , E-Box \diamond) veranschaulicht. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart, der mit +1 gekennzeichnet ist, dargestellt.

Die Deletionsanalyse der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens in Abbildung 11 zeigt, dass das Ausgangskonstrukt NIS-3002/+87 nach Kotransfektion mit den Expressionsvektoren deutlich aktiviert werden konnte. Die Überexpression des nSREBP-1c führte hierbei zu einer 9,6-fachen Erhöhung der Luziferaseaktivität im Vergleich zum Leervektor (Abb. 11). Auch war das überexprimierte nSREBP-2 in der Lage das Luziferasegen vom Ausgangskonstrukt NIS-3002/+87 (17-fache des Leervektors) zu stimulieren (Abb. 11). Der mitgeführte Kontrollvektor 2xSRE-1-Luc konnte nach Kotransfektion des nSREBP-1c/-2 ebenfalls stark induziert werden

und wies Luziferaseaktivitäten von jeweils dem 54-fachen des Leervektors auf (Abb. 11). Folglich kann anhand der nachweisbaren Transaktivierung des 2xSRE-1-Luc die Funktionalität des Systems belegt werden (Abb. 11). Die Deletionskonstrukte NIS-1887/+87 und NIS-1022/+87 wiesen nach Überexpression des nSREBP-1c Aktivitätszunahmen auf das 8,7-fache bzw. 10,9-fache des Leervektors auf (Abb. 11), wohingegen das nSREBP-2 die Konstrukte NIS-1887/+87 und NIS-1022/+87 im Vergleich zum Leervektor auf das 24,2-fache und 25,2-fache induzierte (Abb. 11). Die im Bereich von nt -3002 bis -1023 lokalisierten Elemente übten somit keinen Einfluss auf die Transaktivierung der Reporterengenkonstrukte aus. Nachdem die Ausgangslänge um weitere 637 bp (NIS-385/+87) verkürzt wurde, nahm die SREBP-induzierte Luziferaseaktivität überraschend ab, erreichte aber dennoch nicht das Ausgangsniveau des Leervektors. So waren die Luziferaseaktivitäten der Reporterengenkonstrukte NIS-385/+87 und NIS-112/+87 nach Überexpression von nSREBP-1c in beiden Fällen auf das 3,6-fache, die nach Überexpression von nSREBP-2 auf das 6,4-fache bzw. 5,9-fache des Leervektors erhöht (Abb. 11).

3.3.3.4 Analyse der proximalen SREBP-responsiven Region des NIS-Gens

Die Ergebnisse der Deletionsanalyse zeigen zwei SREBP-responsive Regionen von nt -1022 bis -386 und von nt -112 bis +87 relativ zum Transkriptionsstart, die auf darin lokalisierte regulatorisch wirksame *cis*-Elemente der SREBPs schließen lassen. Zur Identifizierung der für die Transaktivierung der NIS-Reporterengenkonstrukte kritischen *cis*-Elemente lag der Fokus in den nachfolgenden Untersuchungen auf der proximalen SREBP-responsiven Region von nt -112 bis +87. Wie bereits in Kapitel 3.3.3.1 erwähnt, konnte mit dem Programm MatInspector kein SRE ermittelt werden. Auch ist keines der von MatInspector annotierten E-Box-Elemente in der Region von nt -112 bis +87 lokalisiert. Allein visuell konnten vier SREs in der proximalen SREBP-responsiven Region ermittelt werden. Zur gezielten Eingrenzung der putativen SREs wurden Reporterengenkonstrukte hergestellt (Kap. 3.3.3.2), die jeweils einen definierten Abschnitt der verkürzten 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von nt -112 bis +83 repräsentieren.

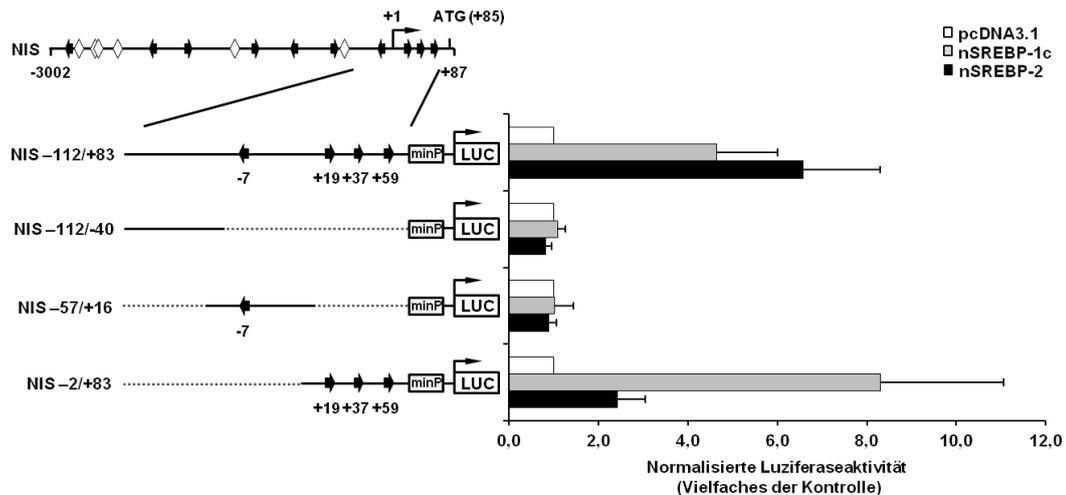


Abbildung 12: Transaktivierung der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von nt -112 bis +83 nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten NIS-112/+83, NIS-112/-40, NIS-57/+16 bzw. NIS-2/+83 und den Expressionsvektoren nSREBP-1c, nSREBP-2 bzw. pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Quadruplikats aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die normierten Luciferaseaktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. Oberhalb ist die 5'-flankierende Region des NIS-Gens von nt -3002 bis +87, einschließlich der regulatorischen Elemente (SRE \blacklozenge , E-Box \diamond) veranschaulicht. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart, der mit +1 gekennzeichnet ist, dargestellt.

Das Konstrukt NIS-112/+83, welches die vollständige proximale SREBP-responsive Region bis nt +83 repräsentiert, konnte durch nSREBP-1c auf das 4,7-fache und durch nSREBP-2 auf das 6,6-fache des Leervektors stimuliert werden (Abb. 12). Dagegen war bei der Analyse der definierten Sequenzabschnitte der proximalen SREBP-responsiven Region nur das Konstrukt NIS-2/+83 durch nSREBP-1c (8,3-fach) bzw. nSREBP-2 (2,4-fach) transaktivierbar, wohingegen die Konstrukte NIS-112/-40 und NIS-57/+16 durch die überexprimierten nSREBPs nicht stimuliert wurden (Abb. 12).

3.3.3.5 Mutationsanalyse der 5'-untranslatierten Region des NIS-Gens

Der von Konstrukt NIS-2/+83 repräsentierte Sequenzabschnitt enthält drei putative SREs von nt +19 bis +28 (5'-ACTCTCCCAC-3'), nt +37 bis +46 (5'-AGTCCCCGAC-3') und nt +59 bis +68 (5'-CTCTCCTCAC-3') relativ zum Transkriptionsstart, die nach visuellem Abgleich mit dem SRE-1 (5'-ATCACCCCAC-3') Sequenzhomologien von 60% bis 70% aufwiesen (Tab. 14). Um zu überprüfen, ob die drei putativen SREBP-Bindungsmotive, bezeichnet als SRE+19, SRE+37 und SRE+59, in der 5'-untranslatierten Region (UTR) des NIS-Gens verantwortlich für die beobachtete SREBP-induzierte Aktivierung des NIS-2/+83-Konstruktes sind, wurden die Bindungsmotive durch zielgerichtete Mutagenese modifiziert (Tab. 7; Kap. 2.2.2.4).

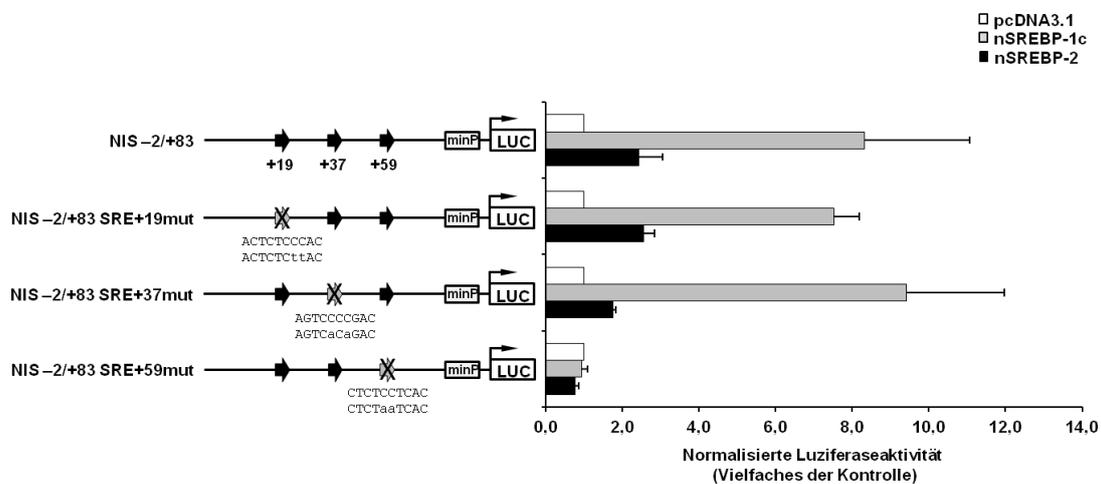


Abbildung 13: Mutationsanalyse der 5'-UTR des NIS-Gens in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten NIS-2/+83, NIS-2/+83 SRE+19mut, NIS-2/+83 SRE+37mut bzw. NIS-2/+83 SRE+59mut und den Expressionsvektoren nSREBP-1c, nSREBP-2 bzw. pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Quadruplikats aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die normierten Luciferaseaktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. Die putativen *cis*-Elemente von SREBP-1c/-2 sind als Wildtyp (oben) mit korrespondierender Mutante (unten) abgebildet und relativ zum Transkriptionsstart angegeben. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die substituierten Basen.

Die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse zur Mutationsanalyse der 5'-UTR des NIS-Gens zeigten nach Mutation des SRE+19 und SRE+37 im Vergleich zur Wildtypsequenz (Konstrukt NIS-2/+83) kaum Unterschiede nach Überexpression von nSREBP-1c/-2. Während nach Kotransfektion von nSREBP-1c die Mutanten NIS-2/+83 SRE+19mut und NIS-2/+83 SRE+37mut auf das 7,5-fache bzw. 9,4-fache des Leervektors aktiviert wurden, resultierte die Überexpression von nSREBP-2 in einer 2,6-fachen bzw. 1,8-fachen Aktivitätssteigerung der Mutanten gegenüber dem Leervektor (Abb. 13). Allein die Mutation des SRE+59 führte zum vollständigen Verlust der SREBP-induzierten Luciferaseaktivität der Mutante und glich damit der vom Leervektor (Abb. 13).

3.3.3.6 Transaktivierung des Konstruktes NIS 2xSRE+59 nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen

Zur Bestätigung, dass das SRE+59 für die transkriptionelle Aktivität des NIS-Gens essenziell ist, wurde ein zusätzliches Reportergenkonstrukt mit einer zweifachen Wiederholung des identifizierten Bindungsmotives von SRE+59 hergestellt und mit der zweifachen Wiederholung des SRE-481 als Negativkontrolle verglichen (Tab. 8; Vgl. Kap. 3.2).

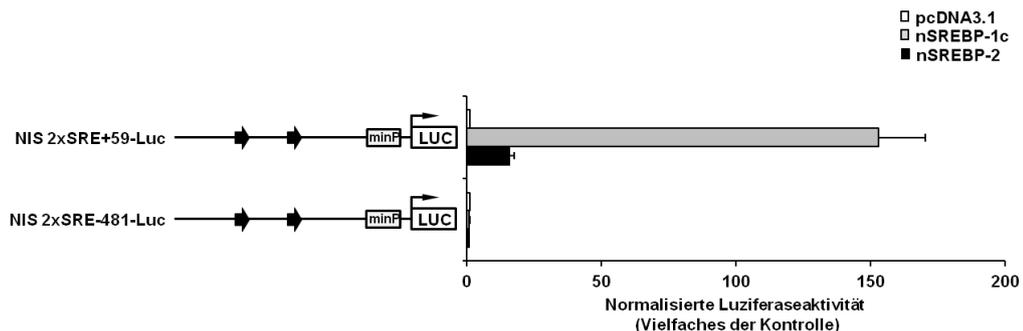


Abbildung 14: Transaktivierung des NIS 2xSRE+59-Luc nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten NIS 2xSRE+59-Luc bzw. NIS 2xSRE-481-Luc und den Expressionsvektoren nSREBP-1c, nSREBP-2 bzw. pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Quadruplikats aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die normierten Luciferaseaktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde.

Die in Abbildung 14 gezeigte Kotransfektion der Überexpressionsvektoren mit dem Konstrukt NIS 2xSRE+59-Luc weist eine deutliche Aktivierung des Luciferasegens auf. Infolge des überexprimierten nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 konnte durch die zweifache Wiederholung des SRE+59 die Luciferase auf das 153-fache bzw. 16-fache des Leervektors stimuliert werden. Demgegenüber blieb das Konstrukt NIS 2xSRE-481-Luc nach Stimulation mit den Überexpressionsvektoren unbeeinflusst (Abb. 14).

3.3.3.7 Reportergenanalyse der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens in FRTL-5-Zellen

Die in HepG2-Zellen durchgeführte Analyse des regulatorischen Bereiches des NIS-Gens ergab ein kritisches *cis*-Element der SREBPs von nt +59 bis +68 relativ zum Transkriptionsstart. Um zu überprüfen, ob das SRE+59 ebenso in den thyroidalen FRTL-5-Zellen funktionell ist, wurden die FRTL-5-Zellen mit ausgewählten NIS-Reportergenen transfiziert und deren Transaktivierbarkeit untersucht.

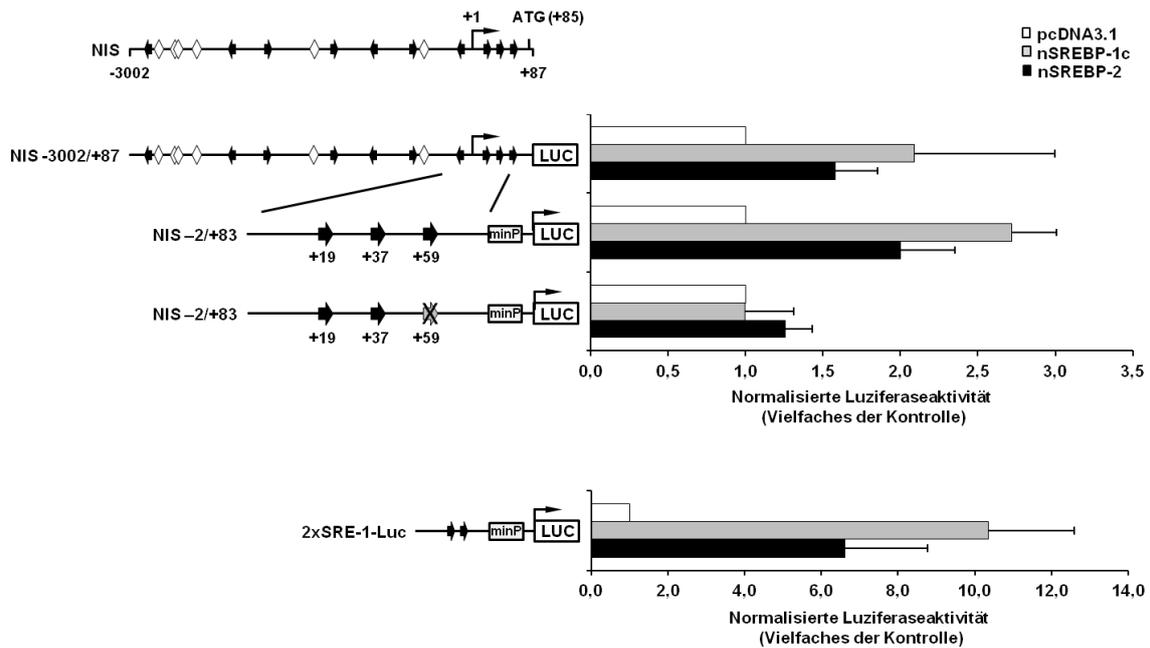


Abbildung 15: Transaktivierung der 5'-UTR des NIS-Gens nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in FRTL-5-Zellen. Die FRTL-5-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten NIS-3002/+87, NIS-2/+83, NIS-2/+83 SRE+59mut bzw. 2xSRE-1-Luc (Kontrollvektor) und den Expressionsvektoren nSREBP-1c, nSREBP-2 bzw. pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Duplikats aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Die normierten Luziferaseaktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. Oberhalb ist die 5'-flankierende Region des NIS-Gens von nt -3002 bis +87, einschließlich der regulatorischen Elemente (SRE \blacklozenge , E-Box \blacklozenge) veranschaulicht. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart, der mit +1 gekennzeichnet ist, dargestellt.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, führte die Kotransfektion des Ausgangskonstruktes NIS-3002/+87 mit dem nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 zu einer Induktion auf das 2-fache bzw. 1,5-fache des Leervektors. Das Konstrukt NIS-2/+83, das die 5'-UTR des NIS-Gens repräsentiert, konnte ebenfalls nach Überexpression von nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 auf das 2,7- bzw. 2-fache des Leervektors stimuliert werden (Abb. 15). Demgegenüber konnte das Konstrukt NIS-2/+83 SRE+59mut mit dem mutierten SRE+59 nicht induziert werden (Abb. 15). Zusätzlich wurde der Kontrollvektor 2xSRE-1-Luc mit den Überexpressionsvektoren kotransfiziert und auch hier zeigte sich eine Aktivierung des Luziferasegens auf das 10-fache (nSREBP-1c) bzw. 6-fache (nSREBP-2) des Leervektors (Abb. 15).

3.3.3.8 Sequenzvergleich der 5'-UTR des NIS zwischen *Rattus norvegicus* und *Mus musculus*

Der Vergleich von nicht-kodierenden Sequenzen zwischen evolutionär verwandten Spezies ist eine Möglichkeit, um regulatorische Mechanismen vorherzusagen, da funktionell relevante Sequenzen häufig konserviert vorliegen (Nitsch *et al.*, 2010). In Bezug auf die Position und

Sequenz des SRE+59, das zu 70% mit dem SRE-1 homolog ist, konnte im Speziesvergleich zwischen Ratte und Maus (*Mus musculus*) ein relativ hoher Konservierungsgrad festgestellt werden (Abb. 16). Die hohe Homologie der 5'-UTR ist ein Hinweis für die Bedeutung dieser Region bei der transkriptionellen Regulation des NIS-Gens.

```

rNIS      -32  GCAGCGCGAAAAGCGAGTGGATCGACGGCCCAGCGGTGACTCGCGCTGCGAC-TCTCCCA  +27
mNIS      -19  GCCGCGCGAAAAGCTTGTGGGTCTGACGGCCCAGCAGGAACTCGCGCTGCGACGACGCTCG  +41
          ** *****          **** *****          * *****          * * *
          * * * * *

hLDLR SRE-1
rNIS      +28  CTGACCGAGAGTCCCCGACGTCTCCGCATCCTCTCCTCACCAGTACCTGTCTCCATG  +87
mNIS      +42  CT--CTGAGAGTCCCCGACGTCTCCGCATCCTCTCCTCAGTACCTGTCTCCATG  +99
          ** * *****          *****          *****          * * *

```

Abbildung 16: Sequenzvergleich der 5'-UTR des NIS zwischen *Rattus norvegicus* und *Mus musculus*. Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der 5'-UTR des NIS von *Rattus norvegicus* (rNIS, NM_052983) und *Mus musculus* (mNIS, NM_053248) sowie das SRE-1 aus dem humanen LDLR. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart angegeben. Die konservierten Nukleotide sind durch Sterne markiert.

3.3.3.9 Nachweis einer spezifischen *in vitro*-Bindung der nukleären SREBPs in der 5'-UTR des NIS-Gens

Um die spezifische Interaktion zwischen dem nukleären SREBP-1c/-2 und dem identifizierten SRE der 5'-UTR des NIS-Gens (Nukleotidposition +59 relativ zum Transkriptionsstart) nachweisen zu können, wurden nachfolgend *in vitro*-Bindungsstudien (EMSA) durchgeführt. Anhand einer Bandenverschiebung (*shift*), die auf einem unterschiedlichen Migrationsverhalten von Protein-DNA-Komplexen gegenüber nicht-komplexierter DNA beruht, kann die Bindung des nSREBP-1c/-2 an das *cis*-Element sichtbar gemacht werden. Die eingesetzten kurzen DNA-Sonden, mit einer Länge von 34 bp, wurden aus einzelsträngigen komplementären Oligonukleotiden hybridisiert (Tab. 9; Kap. 2.2.2.5) und zur Detektion am 3'-Ende mit Digoxigenin (DIG) markiert (Kap. 2.2.4.5.2). Neben der NIS-SRE+59wt-Sonde, die das *cis*-Element SRE+59 enthält, wurde zusätzlich das SRE-1 aus dem hLDLR-Promotor als Positivkontrolle mitgeführt (SRE-1wt) (Yamamoto *et al.*, 2004; Damiel *et al.*, 2012). Ferner wurden in den Bindungsstudien die jeweiligen Mutanten des SRE+59 (NIS-SRE+59mut) und SRE-1 (SRE-1mut) als Negativkontrollen eingesetzt. Die DIG-markierten DNA-Sonden wurden anschließend mit den *in vitro*-translatierten nukleären SREBPs (Kap. 2.2.4.5.1) inkubiert und in einem nativen Polyacrylamidgel analysiert (Kap. 2.2.4.5.5).

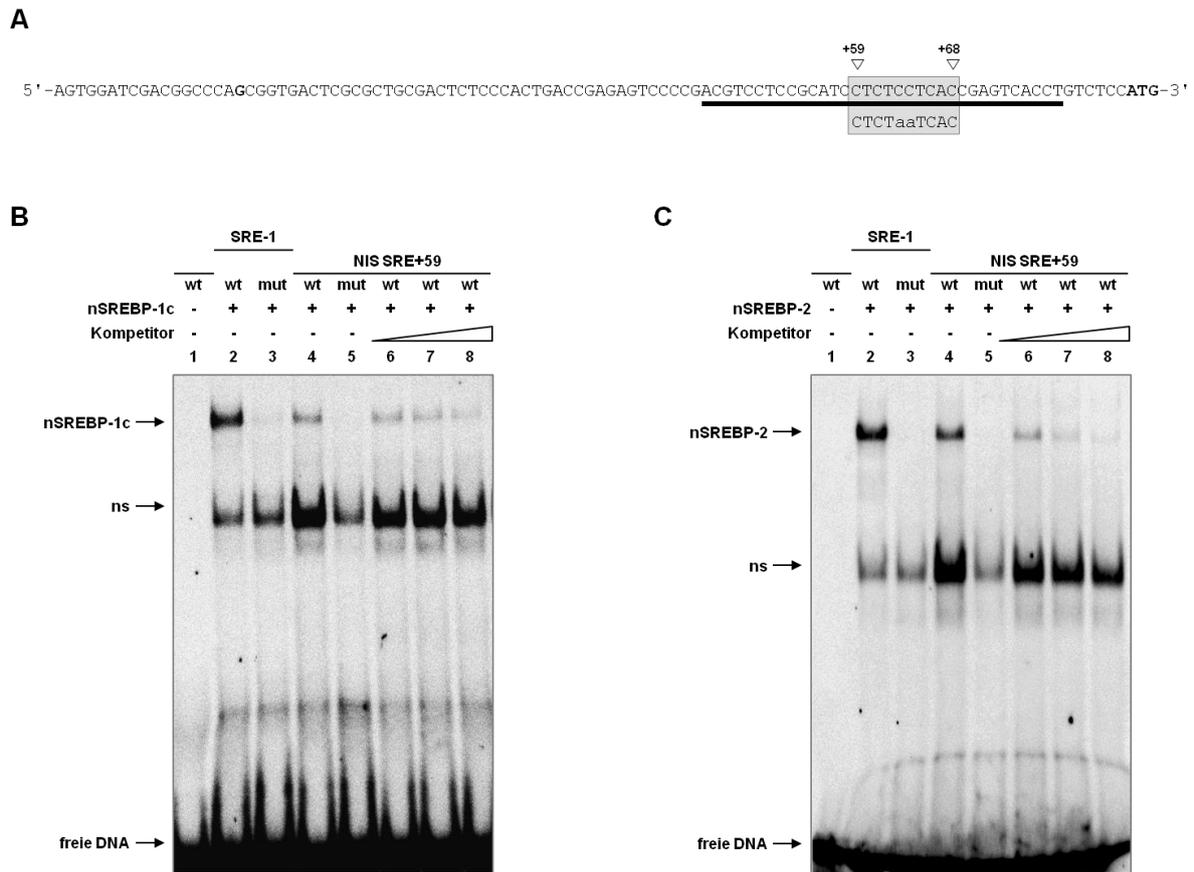


Abbildung 17: *In vitro*-Bindung von nSREBP-1c und nSREBP-2 in der 5'-UTR des NIS-Gens. (A) Nukleotidsequenz der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von nt -17 bis + 87 relativ zum Transkriptionsstart. Die DNA-Sonde mit dem SRE+59 ist unterstrichen und die Bindungssequenz des SRE+59, einschließlich der Mutante, ist umrahmt. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die substituierten Basen. Der Transkriptions- (G) und Translationsstart (ATG) sind fett hervorgehoben. (B,C) Nachweis einer *in vitro*-Bindung von nSREBP-1c (B) und nSREBP-2 (C) an das SRE+59 in der 5'-UTR des NIS-Gens. Das *in vitro*-translatierte nSREBP-1c/-2 wurde mit dem Wildtyp bzw. der Mutante der DIG-markierten NIS SRE+59-Sonde sowie mit dem Wildtyp bzw. der Mutante der DIG-markierten spezifischen SRE-1-Sonde inkubiert und mittels PAGE analysiert. Die Konkurrenz mit einem Überschuss an unmarkierter spezifischer SRE-1-Sonde (6,25-, 12,5- und 25-fach für nSREBP-1c sowie 3,13-, 6,25- und 12,5-fach für nSREBP-2) ist angegeben. ns - nicht spezifisch.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsstudien dargestellt. Die Inkubation der spezifischen SRE-1wt-Sonde mit dem nukleären SREBP-1c bzw. SREBP-2 führte zur Ausbildung eines *shifts* (Spur 2, Abb. 17B und C). Gleiches konnte nach Inkubation der NIS SRE+59wt-Sonde mit den nukleären SREBPs beobachtet werden (Spur 4, Abb. 17B und C). Der Vergleich mit der spezifischen SRE-1wt-Sonde bestätigt demzufolge eine erfolgreiche Protein-DNA-Interaktion des nSREBP-1c/-2 mit dem SRE+59. Demgegenüber konnte weder bei der SRE-1mut-Sonde (Spur 3, Abb. 17B und C) noch bei der NIS SRE+59mut-Sonde (Spur 5, Abb. 17B und C) ein *shift* detektiert werden. Infolge der Basensubstitution innerhalb der Bindungssequenz des SRE-1 und des SRE+59 wurde die Fähigkeit des nSREBP-1c/-2 mit den *cis*-Elementen zu interagieren aufgehoben.

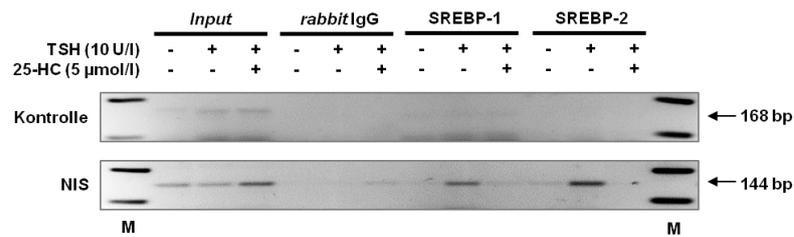
Zuletzt sollte im Rahmen von Konkurrenzexperimenten, in denen unterschiedliche Konzentrationen an unmarkierter spezifischer Kompetitor-DNA (SRE-1wt) eingesetzt wurden, die Bindungsspezifität zwischen dem nSREBP-1c/-2 und dem putativen SRE+59 überprüft werden. Die Zugabe eines Überschusses an unmarkierter Kompetitor-DNA führte sowohl bei der mit nSREBP-1c inkubierten NIS SRE+59wt-Sonde als auch bei der mit nSREBP-2 inkubierten NIS SRE+59wt-Sonde zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Komplexintensität (Spur 6 bis 8, Abb. 17B und C). Anhand der kompetitibaren Komplexformation kann von einer spezifischen Bindung zwischen dem nukleären SREBP-1c/-2 und dem SRE+59 ausgegangen werden.

3.3.3.10 Nachweis einer spezifischen *in vivo*-Bindung der nukleären SREBPs in der 5'-UTR des NIS-Gens

Im Gegensatz zur Reporteranalyse und EMSA, die die Protein-DNA-Interaktion *in vitro* beschreiben, ist es mit der ChIP möglich, den gegenwärtigen transkriptionellen Zustand in der lebenden Zelle zu konservieren. Zum Nachweis einer *in vivo*-Bindung des SREBP-1/-2 an das identifizierte funktionelle SRE+59 in der 5'-UTR des NIS-Gens wurden die FRTL-5-Zellen, nach vorangegangener fünftägiger TSH-Restriktion, für 24 Stunden mit 25-HC (5 $\mu\text{mol/l}$) in An- und Abwesenheit von TSH (10 U/l) inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die zuvor fixierte chromosomale DNA aus den FRTL-5-Zellen isoliert und nach dem ChIP-Protokoll aufbereitet (Kap. 2.2.5.2). Die fragmentierte und aufgereinigte chromosomale DNA wurde anschließend mit dem spezifischen anti-SREBP-1 bzw. anti-SREBP-2 sowie mit dem unspezifischen *rabbit* IgG (Kap. 2.1.6.2) inkubiert. Die immunpräzipitierte bzw. die nicht immunpräzipitierte (*Input*) chromosomale DNA diente anschließend als *Template* für die Amplifikation eines 144 bp umfassenden Abschnitts (von nt -57 bis +87 relativ zum Transkriptionsstart), der die 5'-UTR des NIS-Gens, einschließlich des SRE+59, überspannt (ChIP-Primer in Tab. 4). Darüber hinaus wurde eine unspezifische Region von 168 bp Länge, die weitab von der untersuchten 5'-UTR im Intron 14 des NIS-Gens lokalisiert ist, als Negativkontrolle amplifiziert.

Die Ergebnisse der ChIP-Analyse zum NIS-Gen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Gaiping Wen zur Verfügung gestellt.

A



B

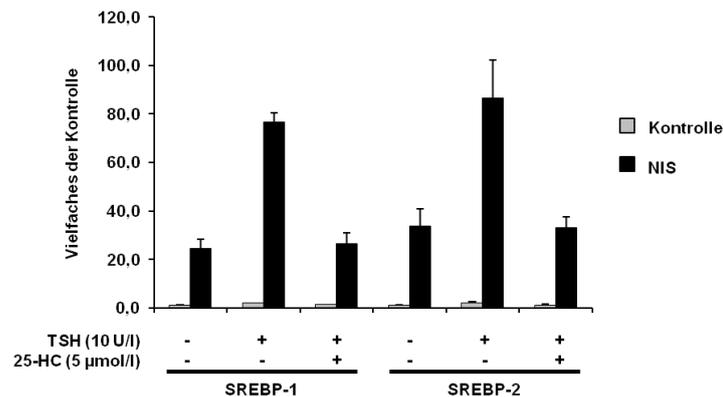


Abbildung 18: *In vivo*-Bindung von SREBP-1 und SREBP-2 in der 5'-UTR des NIS-Gens. Die chromosomale DNA aus FRTL-5-Zellen wurde in einem ChIP-Assay mit anti-SREBP-1, anti-SREBP-2 bzw. *rabbit*-IgG präzipitiert und mittels konventioneller PCR (A) und qPCR (B) analysiert. Dargestellt sind die Amplifikate aus präzipitierter (anti-SREBP-1, anti-SREBP-2 bzw. *rabbit*-IgG) und nicht präzipitierter (*Input*)-DNA, die die 5'-UTR des NIS-Gens (144 bp) und die *random*-Kontrollsequenz (168 bp) repräsentieren. Das Bild der Agarose-Gelelektrophorese steht repräsentativ für 3 unabhängige ChIP-Experimente. Die Ergebnisse der qPCR sind als Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. M, DNA-Größenmarker.

Die ChIP-Ergebnisse in Abbildung 18A zeigen nach Inkubation der FRTL-5-Zellen mit TSH eine Bindung des SREBP-1/-2 an die 5'-UTR des NIS-Gens, erkennbar an der deutlichen Bande des amplifizierten DNA-Fragmentes. Demgegenüber konnte in den TSH-unbehandelten FRTL-5-Zellen nur eine schwache Bande und damit eine weniger stark ausgeprägte Bindung des SREBP-1/-2 in der 5'-UTR detektiert werden (Abb. 18A). Ähnlich verhielt es sich nach Inkubation der FRTL-5-Zellen mit 25-HC bei Anwesenheit von TSH (Abb. 18A). Folglich resultierte die Gabe von 25-HC in einer supprimierten Bindung des SREBP-1/-2 an das SRE+59 in der 5'-UTR des NIS-Gens. Dagegen konnten mit der *rabbit* IgG immunpräzipitierten DNA unter den entsprechenden Inkubationsbedingungen keine Amplifikate detektiert werden, was auf die Spezifität der *in vivo*-Bindung hindeutet (Abb. 18A). Darüber hinaus konnte nach Amplifikation der *random*-Kontrollsequenz von 168 bp Länge, die weitab von der untersuchten 5'-UTR des NIS-Gens lokalisiert ist, ebenfalls keine Bindung des SREBP-1/-2 nachgewiesen werden (Abb. 18A). Die Quantifizierung mittels qPCR konnte diese Beobachtungen bestätigen (Abb. 18B).

3.4 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der SREBPs bei der transkriptionellen Regulation des TPO-Gens von *Rattus norvegicus*

3.4.1 Einfluss eines SREBP-*knockdowns* auf die Expression der TPO in FRTL-5-Zellen

Analog der Analyse des NIS-Gens wurde der Einfluss eines in FRTL-5-Zellen durchgeführten SREBP-*knockdowns* auf die Expression der TPO untersucht. Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe (Rothe, Dissertation 2011) zeigten, dass die kommerziell verfügbaren Antikörper gegen die TPO unzureichende Ergebnisse lieferten. Trotz intensiver, weiterführender Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es nicht gelungen, verwendbare Proteinnachweise mit den verfügbaren TPO-Antikörpern zu generieren. Um die Bedeutung der SREBPs bei der transkriptionellen Regulation der TPO aufzeigen zu können, wurde zu diesem Zweck die relative mRNA-Konzentration der TPO 24 Stunden und 48 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplexe mittels qPCR (Kap. 2.2.2.15) quantifiziert. Zur Demonstration einer erfolgreichen SREBP-Suppression wurde die Transkriptmenge der SREBPs und von bekannten SREBP-Zielgenen bestimmt.

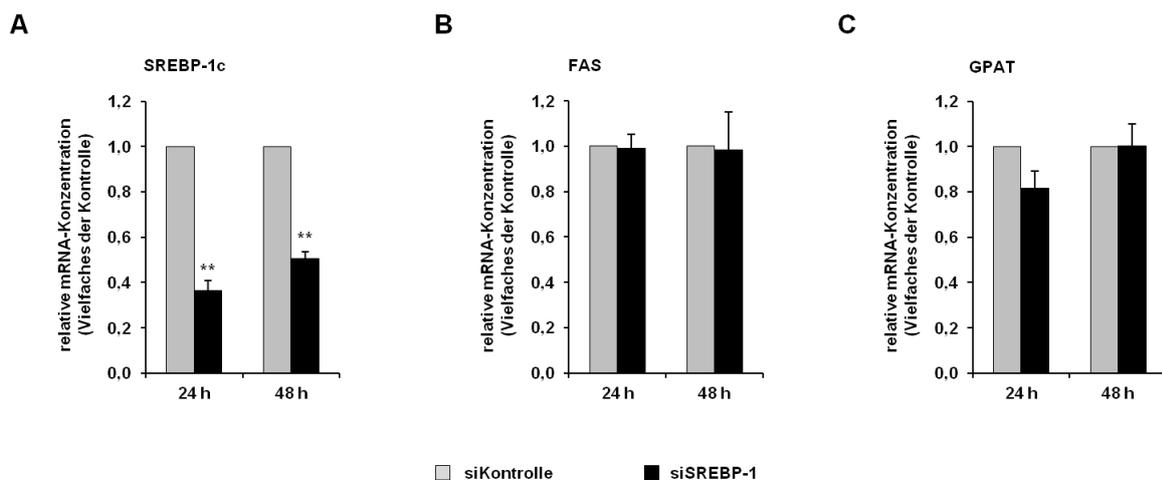


Abbildung 19: Nachweis eines RNAi-induzierten *knockdowns* von SREBP-1 in FRTL-5-Zellen. Die Genexpression von SREBP-1c (A) und von dessen Zielgenen FAS (B) und GPAT (C) wurde 24 und 48 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplexe in FRTL-5-Zellen quantifiziert und mit der von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Duplikats aus 2 unabhängigen Experimenten. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontroll-siRNA (** $p < 0,01$).

Die Genexpressionsanalyse beider SREBP-Isoformen bestätigte den erfolgreichen *knockdown* in den FRTL-5-Zellen. Der Einsatz von SREBP-1-siRNA-Duplexen führte nach 24 und 48 Stunden zu einer deutlichen Verringerung der SREBP-1c-mRNA-Konzentration auf das 0,37-fache bzw. 0,51-fache der Kontrolle ($p < 0,01$; Abb. 19A). Überraschenderweise war die Expression der SREBP-1c-Zielgene FAS und GPAT, trotz des gezielten *knockdowns* von SREBP-1, kaum

verändert. Allein die GPAT war 24 Stunden nach Transfektion durch den SREBP-1-*knockdown* tendenziell (0,82-fache der Kontrolle; $p < 0,10$) vermindert, erreichte jedoch bereits nach 48 Stunden wieder das Ausgangsniveau (Abb. 19C). Im Falle der FAS konnten weder nach 24 Stunden noch nach 48 Stunden signifikant veränderte mRNA-Konzentrationen detektiert werden (Abb. 19B).

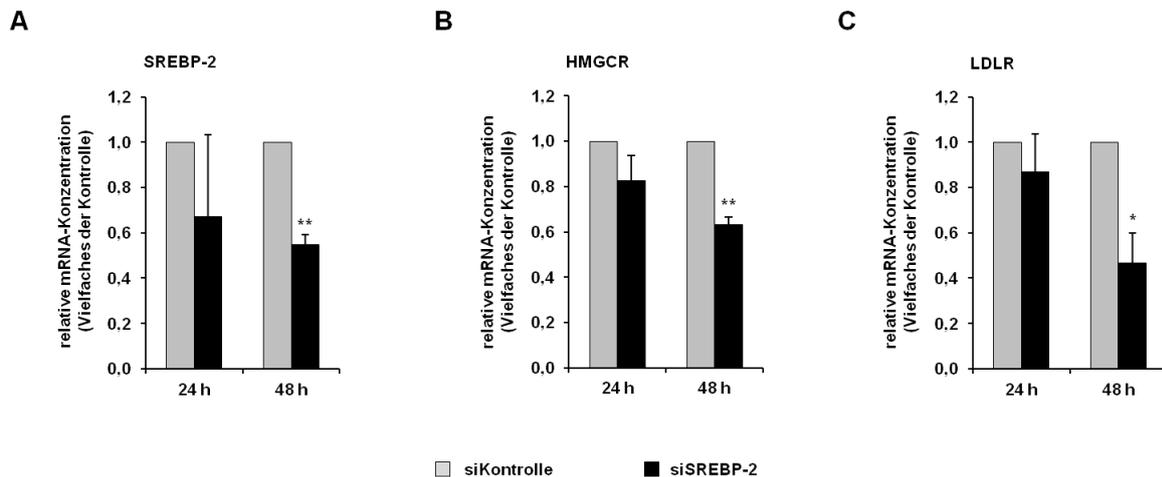


Abbildung 20: Nachweis eines RNAi-induzierten *knockdowns* von SREBP-2 in FRTL-5-Zellen. Die Genexpression von SREBP-2 (A) und von dessen Zielgenen HMGCRC (B) und LDLR (C) wurde 24 und 48 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplexe in FRTL-5-Zellen quantifiziert und mit der von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Duplikats aus 2 unabhängigen Experimenten. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontroll-siRNA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse des SREBP-2-*knockdowns* zusammengefasst. Über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach Transfektion der SREBP-2-siRNA-Duplexe nahm die Transkriptmenge des SREBP-2 ab, konnte jedoch erst nach 48 Stunden statistisch abgesichert werden (0,55-fache der Kontrolle; $p < 0,01$) (Abb. 20A). Vergleichbares konnte für die SREBP-2-Zielgene HMGCRC und LDLR beobachtet werden. Infolge des SREBP-2-*knockdowns* nahm die Transkriptmenge der HMGCRC und des LDLR erst nach 48 Stunden signifikant auf das 0,63-fache ($p < 0,01$; Abb. 20B) und 0,47-fache ($p < 0,05$; Abb. 20C) der Kontrolle ab.

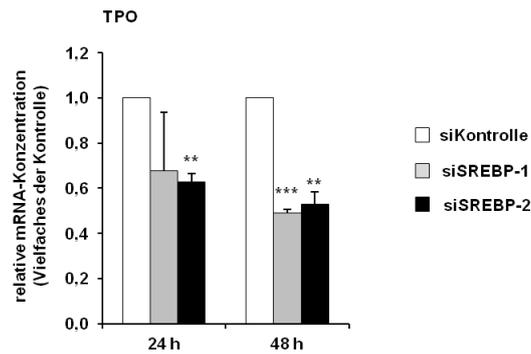


Abbildung 21: Einfluss eines RNAi-induzierten *knockdowns* von SREBP-1 und SREBP-2 auf die Expression der TPO in FRTL-5-Zellen. Die Genexpression der TPO wurde 24 und 48 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplexe in FRTL-5-Zellen quantifiziert und mit der von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Duplikats aus 2 unabhängigen Experimenten. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontroll-siRNA (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Wie in Abbildung 21 dargestellt, führte der spezifische *knockdown* von SREBP-1 und SREBP-2 zu einer verminderten Expression der TPO. Während der Einsatz der SREBP-1-siRNA-Duplexe 24 Stunden nach Transfektion der FRTL-5-Zellen zunächst keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der TPO ausübte, war die Transkriptmenge der TPO nach 48 Stunden deutlich auf das 0,49-fache ($p < 0,001$) der Kontrolle vermindert (Abb. 21). Der *knockdown* von SREBP-2 führte hingegen zu beiden gemessenen Zeitpunkten zu einer starken Abnahme der TPO-mRNA-Konzentration, wobei die Transkriptmenge nach 24 Stunden auf das 0,63-fache ($p < 0,01$) und nach 48 Stunden zusätzlich auf das 0,53-fache ($p < 0,01$) der Kontrolle abnahm (Abb. 21).

3.4.2 Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des TPO-Gens von *Rattus norvegicus* durch die SREBPs

3.4.2.1 *In silico*-Analyse der 5'-flankierenden Region des TPO-Gens von *Rattus norvegicus*

Die 5'-flankierende Region des TPO-Gens von *Rattus norvegicus* (TPO) wurde durch Vergleich der kodierenden Sequenz (NM_019353, GenBank) mit der genomischen Sequenz (AABR06043226, GenBank) identifiziert. Innerhalb des analysierten Bereiches von nt -1310 bis +697 relativ zum Transkriptionsstart konnte mittels MatInspector ein SRE (5'-CTCACCTCAC-3', *core similarity* = 0,9; *matrix similarity* = 1,0) von nt -1170 bis -1161 lokalisiert werden.

3.4.2.2 Klonierung der TPO-Reportergenvektoren

Das im Rattengenom auf Chromosom 6 lokalisierte TPO-Gen ist vollständig im BAC-Klon CH230-23A19 (BACPAC Resources, Oakland, USA) enthalten. Zunächst wurde ein positiver BAC-Klon mittels Chloramphenicol identifiziert und hieraus die genomische DNA mit dem Midi Prep Plasmid Kit (Qiagen) isoliert (Kap. 2.2.2.1.2). Die Amplifikation des Ausgangskonstruktes TPO-1310/+697 erfolgte mit dem *Primer* TPO-*BglIII_S* und TPO-1310/+697-*XhoI_A* (Tab. 6) unter Verwendung der genomischen DNA als *Template* (Kap. 2.2.2.3). Die 5'-verkürzten Reportergenkonstrukte des TPO-Gens leiteten sich, mit Ausnahme des TPO+676/+697-Konstruktes, vom Ausgangskonstrukt TPO-1310/+697 ab und wurden unter Verwendung der entsprechenden *Primer* (Tab. 6) generiert. Das Reportergenkonstrukt TPO+676/+697 wurde durch Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide (Tab. 8; Kap. 2.2.2.5) hergestellt. Die folgende Insertion in den promotorlosen pGL4.10[*luc2*]-Vektor erfolgte über die integrierten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *BglIII* und *XhoI* (Kap. 2.2.2.10).

3.4.2.3 Reportergenanalyse der 5'-flankierenden Region des TPO-Gens in HepG2-Zellen

Die Reportergenuntersuchungen zur Identifizierung und Eingrenzung einer putativen SREBP-responsiven Region im regulatorischen Bereich des TPO-Gens wurden, analog zur NIS-Analyse, in HepG2-Zellen durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.3.3.3 erwähnt, wurde durch Murphy *et al.* (2006) und durch eigene Untersuchungen ein Einfluss der SREBPs auf die *Renilla*-Luziferase festgestellt. In diesem Versuchskomplex wurde dennoch eine Kotransfektion mit dem pGL4.74[*hRluc*/TK]-Vektor, der für die *Renilla*-Luziferase kodiert, durchgeführt, um die Transfektionseffizienz innerhalb der Gruppen berücksichtigen zu können. Die relativen Lichteinheiten (RLU) der *Firefly*-Luziferase wurden daher mit denen der *Renilla*-Luziferase verrechnet. Anschließend erfolgte die Normierung der ermittelten Luziferaseaktivitäten der TPO-Reportergenvektoren mit denen der korrespondierenden leeren Reportergenvektoren (pGL4.10 bzw. pGL4.23), wie bei Inoue *et al.* (2011) durchgeführt. Die dargestellten Aktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1 (Leervektor), dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde.

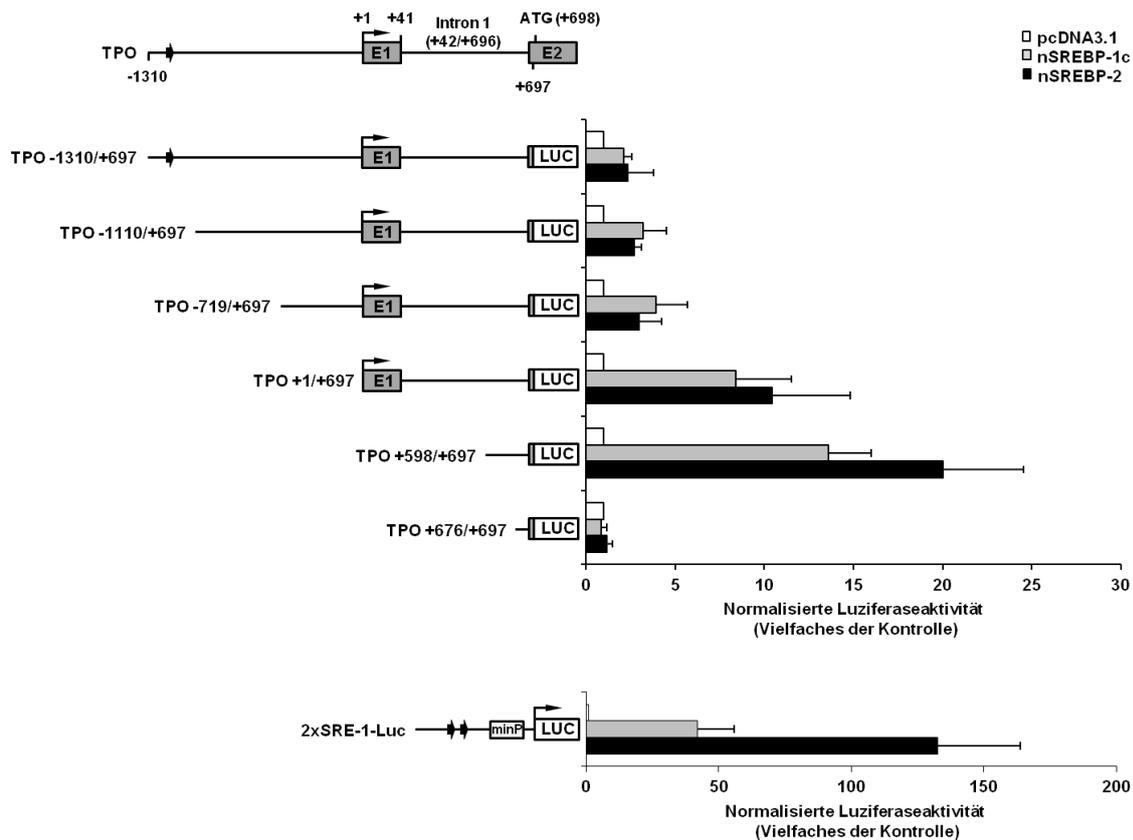


Abbildung 22: Transaktivierung der 5'-flankierenden Region des TPO-Gens nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden transient mit den Reporterergenkonstrukten TPO-1310/+697, TPO-1110/+697, TPO-719/+697, TPO+1/+697, TPO+598/+697, TPO+676/+697 bzw. 2xSRE-1-Luc (Kontrollvektor) und den Expressionsvektoren nSREBP-1c, nSREBP-2 bzw. pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Quadruplikats aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die normierten Luziferaseaktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. Oberhalb ist die 5'-flankierende Region des TPO-Gens, einschließlich Exon 1 (E1), Exon 2 (E2), Intron 1 und das von MatInspector annotierte SRE (♣, nt -1170/-1161), veranschaulicht. Analysiert wurde der Bereich von Nukleotid -1310 bis +697 des TPO-Gens. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart, der mit +1 gekennzeichnet ist, dargestellt.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Deletionsanalyse der 5'-flankierenden Region des TPO-Gens dargestellt. Das Ausgangskonstrukt TPO-1310/+697 mit einer Länge von 2007 bp wies zunächst ein schwaches Aktivierungspotential auf. In diesem Fall war die gemessene Luziferaseaktivität nach Überexpression von nSREBP-1c auf das 2,1-fache bzw. nach Überexpression von nSREBP-2 auf das 2,3-fache des Leervektors erhöht (Abb. 22). Im Vergleich dazu konnte der Kontrollvektor 2xSRE-1-Luc auf das 42-fache (nSREBP-1c) und 132-fache (nSREBP-2) des Leervektors stimuliert werden (Abb. 22). Um zu überprüfen, ob das annotierte SRE (nt -1170/-1161) für die Transaktivierung der TPO-1310/+697 verantwortlich ist, wurde die Ausgangslänge um 200 bp verkürzt. Trotz Entfernung des SREs waren die Luziferaseaktivitäten kaum verändert und so resultierte die Überexpression von nSREBP-1c

bzw. nSREBP-2 in einer 3,2-fach bzw. 2,7-fach erhöhten Induktion des TPO-1110/+697-Konstruktes (Abb. 22). Vergleichbares konnte nach Stimulation der TPO-719/+697 mit den nukleären SREBPs beobachtet werden, sodass auch hier, trotz Verkürzung um 391 bp, eine Aktivierung des Luziferasegens durch das überexprimierte nSREBP-1c (3,9-fach) bzw. nSREBP-2 (3,0-fach) feststellbar war (Abb. 22). Überraschenderweise führte die Kotransfektion von nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 nach Entfernung von weiteren 719 bp (Konstrukt TPO+1/+697) sogar zu einem Anstieg der Luziferaseaktivität und erreichte beim Konstrukt TPO+598/+697 ein Aktivitätsmaximum von Faktor 13,6 (nSREBP-1c) und 20,0 (nSREBP-2) im Vergleich zum Leervektor (Abb. 22). Erst nach Verkürzung auf 22 bp der Ausgangslänge (Konstrukt TPO+676/+697) fiel die SREBP-induzierte Luziferaseaktivität auf das Niveau des Leervektors ab (Abb. 22). Demzufolge deuten die Ergebnisse der Deletionsanalyse auf ein putatives SREBP-responsives *cis*-Element innerhalb der Region von nt +598 bis +675 hin.

3.4.2.4 Untersuchungen zur *in vitro*-Bindung der nukleären SREBPs im ersten Intron des TPO-Gens

Die Reportergermanalyse der TPO führte zur Identifizierung einer 78 bp umfassenden SREBP-responsiven Region im ersten Intron des TPO-Gens. Die Sequenzanalyse mit dem Programm MatInspector zeigte hingegen für diesen Bereich keine Übereinstimmung mit dem *cis*-Element der SREBPs. Um zu überprüfen, ob tatsächlich eine Interaktion des nSREBP-1c/-2 mit einem oder mehreren bisher unbekanntem SREBP-responsiven *cis*-Elementen im ersten Intron des TPO-Gens erfolgt, wurden EMSA-Experimente durchgeführt.

3.4.2.4.1 Analyse der intronischen SREBP-responsiven Region des TPO-Gens

Zur systematischen Analyse der SREBP-responsiven Region wurden sechs DNA-Sonden für die Verifizierung einer Protein-DNA-Interaktion hergestellt. Hierzu wurden die 24 bp bis 35 bp langen komplementären Oligonukleotide (Tab. 9), die den vollständigen 100 bp langen intronischen Sequenzabschnitt des TPO-Gens bis zum Translationsstart (ATG) überspannen (Abb. 23A), hybridisiert (Kap. 2.2.2.5) und am 3'-Ende mit Digoxigenin markiert (Kap. 2.2.4.5.2). Die Analyse der DNA-Sonden erfolgte nach Inkubation mit dem *in vitro*-translatierten nSREBP-1c/-2 (Kap. 2.2.4.5.1) in einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel (Kap. 2.2.4.5.5).

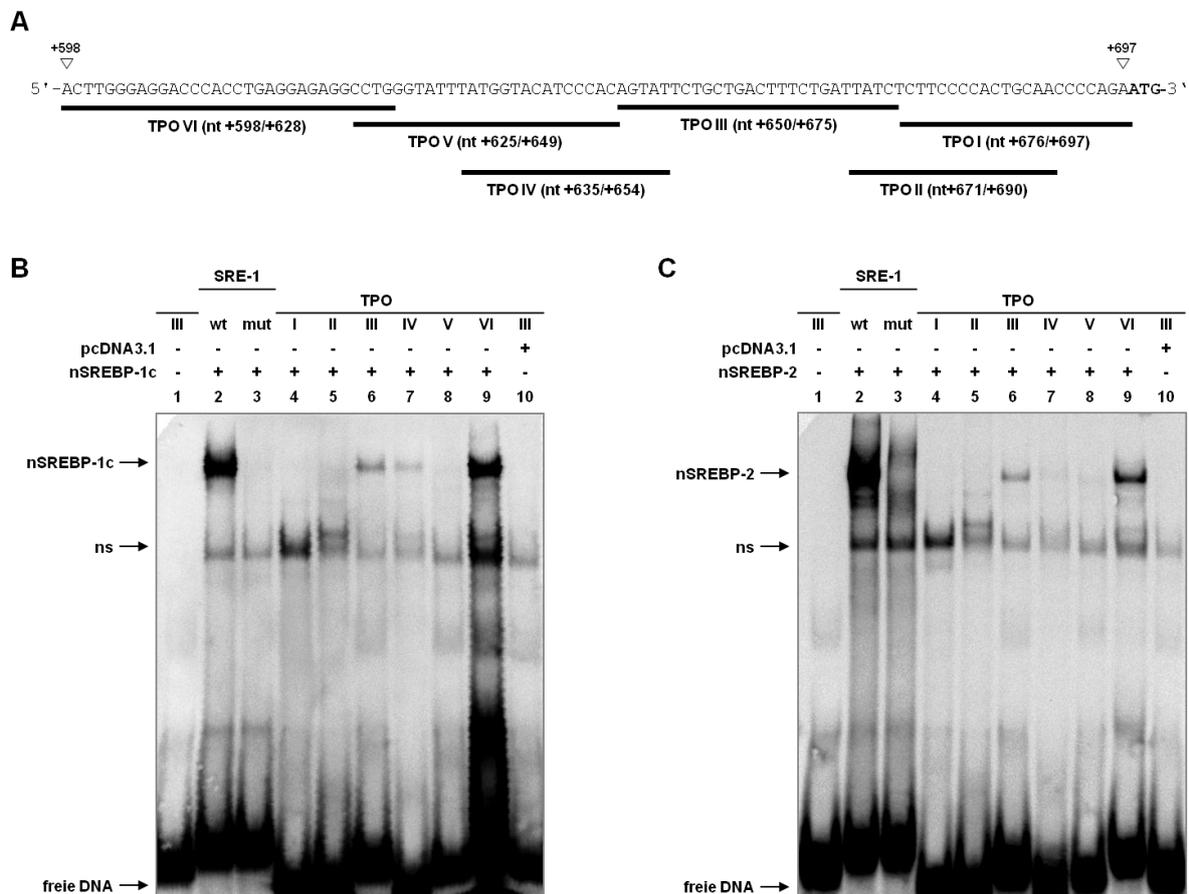


Abbildung 23: *In vitro*-Bindung von nSREBP-1c und nSREBP-2 im ersten Intron des TPO-Gens. (A) Ausschnitt der intronischen Nukleotidsequenz des TPO-Gens von nt +598 bis +700 relativ zum Transkriptionsstart (+1). Die Nukleotidsequenzen der analysierten DNA-Sonden, die den Intronbereich überspannen, sind unterstrichen und die Nukleotidpositionen in Klammern angegeben. Der Translationsstart (ATG) ist fett hervorgehoben. (B,C) Nachweis einer *in vitro*-Bindung von nSREBP-1c (B) und nSREBP-2 (C) im ersten Intron des TPO-Gens. Das *in vitro*-translatierte nSREBP-1c/-2 wurde mit den DIG-markierten TPO-Sonden (I-VI) sowie mit dem Wildtyp bzw. der Mutante der DIG-markierten spezifischen SRE-1-Sonde inkubiert und mittels PAGE analysiert. Der pcDNA3.1/TNT[®] Quick Master Mix wurde repräsentativ mit der TPO III-Sonde inkubiert und führte zur Ausbildung einer nicht-spezifischen Bande (ns).

Die Ergebnisse aus den Bindungsstudien sind in Abbildung 23 dargestellt. In der Spur 1 (Abb. 23B und C) ist die nicht-komplexierte freie DNA der DIG-markierten TPO III-Sonde, die repräsentativ eingesetzt und nicht mit dem nSREBP-1c/-2 inkubiert wurde, aufgetragen. Die Inkubation der TPO III-Sonde mit dem nSREBP-1c/-2 führte ebenso wie bei der TPO VI-Sonde zur Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes, erkennbar an dem unterschiedlichen Migrationsverhalten der TPO-Sonden gegenüber der freien DNA (Spur 6 und 9, Abb. 23B und C). Darüber hinaus konnte nach Inkubation des nSREBP-1c mit der TPO IV-Sonde ein weiterer *shift* beobachtet werden (Spur 7, Abb. 23B). Diese Protein-DNA-Interaktion konnte jedoch nicht zwischen dem nSREBP-2 und der TPO IV-Sonde nachgewiesen werden (Spur 7, Abb. 23C). Ein vergleichbares Migrationsverhalten zeigte sich in den Spuren 4, 5 und 8 (Abb. 23B und C), was auf die ausgebliebene Protein-DNA-Interaktion zwischen dem nSREBP-1c/-2

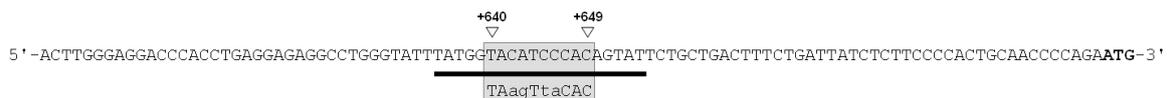
und den DNA-Sonden TPO I, II und V zurückgeführt werden kann. Zusätzlich wurde die TPO III-Sonde repräsentativ mit dem pcDNA3.1/*TNT*[®] Quick Master Mix inkubiert, deren Interaktion zur Ausbildung einer nicht-spezifischen Bande führte (Spur 10, Abb. 23B und C).

Die erfolgreiche Komplexbildung zwischen den hier eingesetzten *in vitro*-translatierten nSREBP-1c und nSREBP-2 sowie den DIG-markierten Oligonukleotiden konnte anhand des *shifts*, der eine Protein-DNA-Interaktion zwischen dem nSREBP-1c/-2 und dem Wildtyp der DIG-markierten spezifischen SRE-1-Sonde (SRE-1wt, Positivkontrolle) anzeigt, belegt werden (Spur 2, Abb. 23B und C). Demgegenüber konnte mit der Mutante des SRE-1 (SRE-1mut, Negativkontrolle) keine Komplexbildung beobachtet werden (Spur 3, Abb. 23B und C). Die Analyse der SREBP-responsiven Region ergab für das nukleäre SREBP-1c drei *shifts* durch Interaktion mit den Sonden TPO III, IV und VI. Hingegen komplexierte das nukleäre SREBP-2 nur mit zwei (III und VI) der drei TPO-Sonden. Folglich kann, anhand der hier gezeigten SREBP-DNA-Komplexe, von mehreren putativen Bindungsstellen im ersten Intron des TPO-Gens ausgegangen werden.

3.4.2.4.2 Nachweis einer spezifischen *in vitro*-Bindung des nukleären SREBP-1c im ersten Intron (nt +635 bis +654) des TPO-Gens

Innerhalb der Nukleotidsequenz von TPO IV (nt +635/+654) ist ein putatives *cis*-Element (5'-TACATCCCAC-3', nt +640/+649) lokalisiert (Abb. 24A), das zu 70% mit dem SRE-1 (5'-ATCACCCCAC-3') homolog ist. Die Spezifität der Protein-DNA-Interaktion zwischen dem nSREBP-1c und dem putativen *cis*-Element, bezeichnet als SRE+640, wurde nachfolgend durch Mutations- und Kompetitionsanalyse überprüft (Oligonukleotide in Tab. 9).

A



B

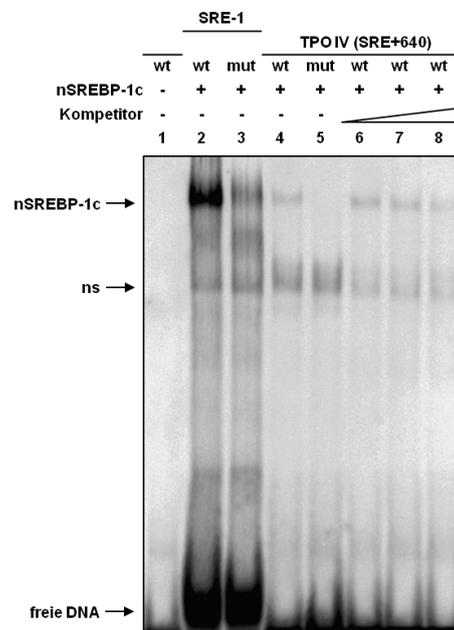


Abbildung 24: *In vitro*-Bindung von nSREBP-1c an das SRE+640 im ersten Intron des TPO-Gens.

(A) Die DNA-Sonde mit dem SRE+640 ist unterstrichen und die Bindungssequenz des SRE+640, einschließlich der Mutante, ist umrahmt. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die substituierten Basen. Der Translationsstart (ATG) ist fett hervorgehoben und die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart (+1) angegeben. (B) Nachweis einer *in vitro*-Bindung von nSREBP-1c an das SRE+640 im ersten Intron des TPO-Gens. Das *in vitro*-translatierte nSREBP-1c wurde mit dem Wildtyp bzw. der Mutante der DIG-markierten TPO IV-Sonde (SRE+640) sowie mit dem Wildtyp bzw. der Mutante der DIG-markierten spezifischen SRE-1-Sonde inkubiert und mittels PAGE analysiert. Die Konkurrenz mit einem Überschuss an unmarkierter spezifischer SRE-1-Sonde (10-, 20- und 50-fach) ist angegeben. ns - nicht spezifisch.

Aus Abbildung 24 kann entnommen werden, dass die Inkubation des zuvor identifizierten SREBP-responsiven Elementes SRE+640 mit dem *in vitro*-translatierten nSREBP-1c erneut zu einem *shift* führte (Spur 4, Abb. 24B). Die Komplexbildung aus Protein und DNA konnte jedoch nach Basensubstitution innerhalb der Bindungssequenz aufgehoben werden, was am

Migrationsverhalten der TPO IVmut-Sonde (SRE+640mut) im Vergleich zur nicht-komplexierten freien DNA deutlich wurde (Spur 1 und 5, Abb. 24B). Ähnliches konnte nach Inkubation der spezifischen SRE-1wt- bzw. der unspezifischen SRE-1mut-Sonde mit dem nSREBP-1c beobachtet werden, da auch hier die Wildtypsequenz des SRE-1 eine Bindung ermöglichte (Spur 2, Abb. 24B), dies jedoch bei der Mutante nicht der Fall war (Spur 3, Abb. 24B). Die Kompetitionsanalyse, die in den Spuren 6 bis 8 zu sehen ist, deutet auf eine spezifische Interaktion zwischen dem nSREBP-1c und dem SRE+640 hin. Dies konnte anhand der Konkurrenz mit unmarkierter spezifischer Kompetitor-DNA (SRE-1wt), die im Überschuss vorlag und die markierte TPO IV-Sonde (SRE+640) konzentrationsabhängig verdrängte, belegt werden (Spur 6 bis 8, Abb. 24B).

3.4.2.4.3 Identifizierung weiterer SREBP-responsiver *cis*-Elemente im ersten Intron des TPO-Gens

Neben dem bereits identifizierten SRE+640 konnten innerhalb der Nukleotidsequenz von nt +650 bis +675 (TPO III) sowie von nt +598 bis +628 (TPO VI) weitere Komplexbildungen beobachtet werden, die auf zwei zusätzliche SREBP-responsive *cis*-Elemente schließen lassen. Zur Lokalisierung der Bindungssequenzen wurden nachfolgend Mutationsanalysen durchgeführt, wobei jeweils fünf bis sechs Basen mutiert wurden (Abb. 25A und Abb. 26A) (Oligonukleotide in Tab. 9). Darüber hinaus wurde die Spezifität der jeweiligen Protein-DNA-Interaktion durch Kompetitionsanalyse überprüft.

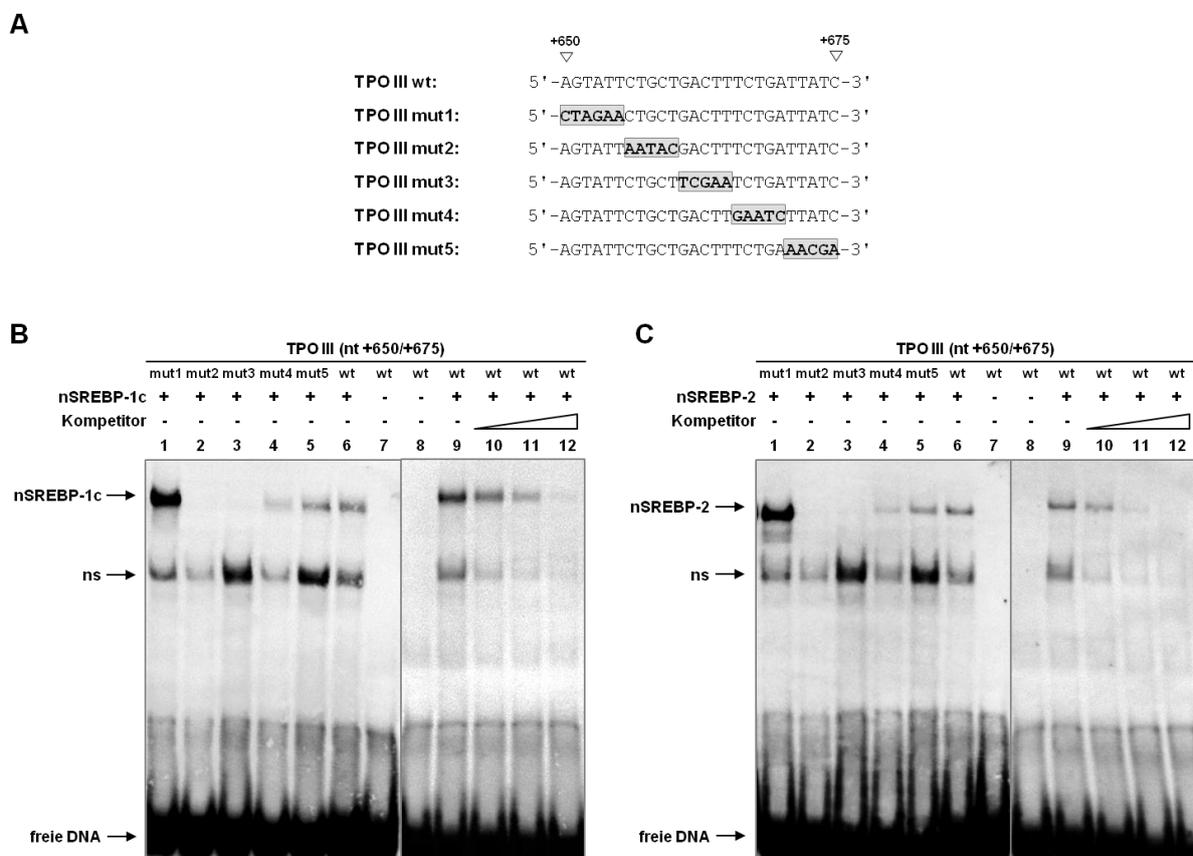


Abbildung 25: Systematische Mutations- und Kompetitionsanalyse der TPO III-Sonde. (A) Nukleotidsequenz der TPO III-Sonde von nt +650 bis +675 relativ zum Transkriptionsstart (+1) und den davon abgeleiteten Mutanten. Die substituierten Basen sind fett und grau hervorgehoben. (B,C) Mutations- und Kompetitionsanalyse der TPO III-Sonde mit nSREBP-1c (B) und nSREBP-2 (C). Das *in vitro*-translatierte nSREBP-1c/-2 wurde mit dem Wildtyp bzw. den Mutanten der DIG-markierten TPO III-Sonde inkubiert und mittels PAGE analysiert. Die Konkurrenz mit einem Überschuss an unmarkierter spezifischer SRE-1wt-Sonde (50-, 100- und 250-fach für nSREBP-1c sowie 25-, 50- und 100-fach für nSREBP-2) ist angegeben. ns - nicht spezifisch.

Die vergleichende Mutationsanalyse der Nukleotidsequenz von TPO III zeigt in den Spuren 1, 4, 5 und 6 eine deutliche Komplexbildung aus Protein und DNA (Abb. 25B und C). Folglich

interagierte das nSREBP-1c/-2 nicht nur mit der Wildtypsequenz von TPO III, sondern ebenso mit den DNA-Sonden TPO III mut1, TPO III mut4 und TPO III mut5, wobei der Komplex zwischen dem nSREBP-1c/-2 und der TPO III mut4-Sonde im Vergleich zum Wildtyp schwächer ausgeprägt war (Spur 4 und 6, Abb. 25B und C). Keine Veränderungen im Migrationsverhalten konnten hingegen in den Spuren 2 und 3 beobachtet werden, da diese dem der nicht-komplexierten freien DNA in Spur 7 glich (Abb. 25B und C). Demnach resultierte der Austausch von fünf Basen innerhalb der TPO III mut2- und TPO III mut3-Sonde in einem Bindungsverlust von nSREBP-1c/-2. Das Kernmotiv des putativen *cis*-Elementes scheint demzufolge zwischen nt +656 und +665 lokalisiert und für beide SREBP-Isoformen relevant zu sein. Aufgrund der schwächeren Bindungsaffinität zwischen dem nSREBP-1c/-2 und der TPO III mut4-Sonde, scheint eine Beteiligung der unmittelbar an das nt +665 flankierenden Basen ebenso von Bedeutung zu sein.

Zur Analyse der Bindungsspezifität wurde dem Versuchsansatz ein Überschuss an unmarkierter spezifischer Kompetitor-DNA (SRE-1wt) zugesetzt. In Abbildung 25 ist ebenfalls zu sehen, dass der zuvor ausgebildete Protein-DNA-Komplex zwischen dem nSREBP-1c/-2 und der TPO III-Sonde durch die Zugabe an Kompetitor-DNA abgeschwächt werden konnte (Spur 10 und 11, Abb. 25B und C). Bei der höchsten Konzentration an zugesetzter Kompetitor-DNA konnte die Protein-DNA-Interaktion vollständig aufgehoben werden (Spur 12, Abb. 25B und C), sodass von einer sequenzspezifischen Bindung zwischen dem nSREBP-1c/-2 und dem *cis*-Element der TPO III-Sonde ausgegangen werden kann.

Damit konnte innerhalb der Nukleotidsequenz von nt +650 bis +675 (TPO III) ein SREBP-responsives *cis*-Element zwischen nt +656 und +665 lokalisiert werden, das spezifisch mit dem nSREBP-1c/-2 interagierte. Zur Identifizierung des zweiten SREBP-responsiven *cis*-Elementes innerhalb der Nukleotidsequenz von nt +598 bis +628 (TPO VI) wurde analog dem Vorgehen der TPO III-Sonde fortgeföhren.

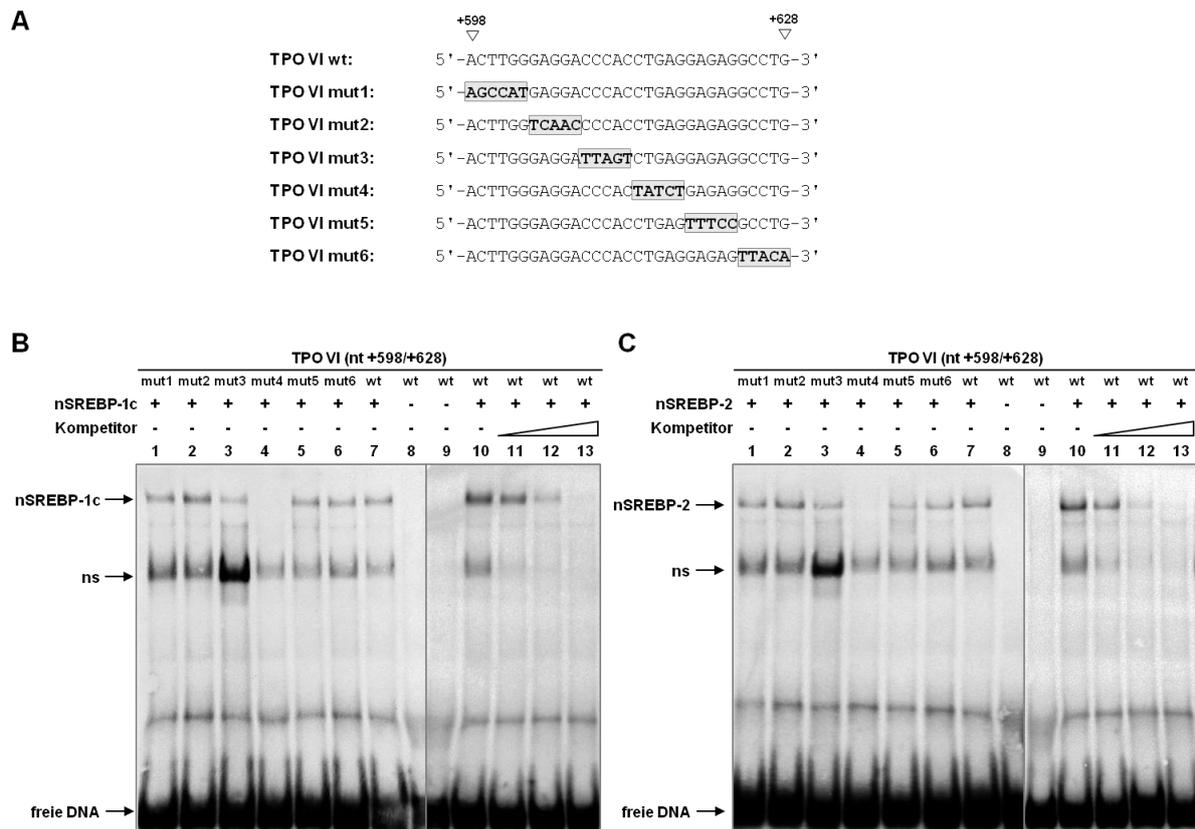


Abbildung 26: Systematische Mutations- und Kompetitionsanalyse der TPO VI-Sonde. (A) Nukleotidsequenz der TPO VI-Sonde von nt +598 bis +628 relativ zum Transkriptionsstart (+1) und den davon abgeleiteten Mutanten. Die substituierten Basen sind fett und grau hervorgehoben. (B,C) Mutations- und Kompetitionsanalyse der TPO VI-Sonde mit nSREBP-1c (B) und nSREBP-2 (C). Das *in vitro*-translatierte nSREBP-1c/-2 wurde mit dem Wildtyp bzw. den Mutanten der DIG-markierten TPO VI-Sonde inkubiert und mittels PAGE analysiert. Die Konkurrenz mit einem Überschuss an unmarkierter spezifischer SRE-1wt-Sonde (50-, 100- und 250-fach für nSREBP-1c sowie 10-, 50- und 100-fach für nSREBP-2) ist angegeben. ns - nicht spezifisch.

In den Spuren 1, 2, 3, 5, 6, und 7 migrierten die TPO VI-Sonden nach Inkubation mit dem nSREBP-1c/-2, im Vergleich zur nicht-komplexierten freien DNA in Spur 8, langsamer (Abb. 26B und C), was anhand der *shifts* deutlich zu erkennen ist. Demzufolge wurde die Protein-DNA-Interaktion durch den Austausch von fünf Basen in den jeweiligen Mutanten nicht aufgehoben. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der TPO VI mut4-Sonde mit dem nSREBP-1c/-2 zu keiner Komplexformation, wie der Vergleich mit der nicht-komplexierten freien DNA zeigt (Spur 4 und 8, Abb. 26B und C). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Nukleotide von +614 bis +618 für die Protein-DNA-Interaktion von Bedeutung sind. Die Bindungsspezifität wurde auch hier durch Zugabe eines Überschusses an unmarkierter spezifischer Kompetitor-DNA (SRE-1wt) überprüft. Während nach Inkubation des nSREBP-1c/-2 mit der TPO VI-Sonde und ohne Kompetitor noch ein deutliches Signal erkennbar war (Spur 10, Abb. 26B und C), führte die Zugabe von Kompetitor-DNA mit zunehmender

Konzentration zur Abschwächung des Protein-DNA-Komplexes und letztlich zur völligen Unterdrückung des Signals (Spur 11 bis 13, Abb. 26B und C). Folglich interagiert das nSREBP-1c/-2 mit dem *cis*-Element der TPO VI-Sonde ebenso sequenzspezifisch.

Die Mutations- und Kompetitionsanalyse führte auch im Falle der TPO VI-Sonde zur Identifizierung eines SREBP-responsiven *cis*-Elementes, dessen Kernmotiv zwischen nt +614 und +618 lokalisiert ist und spezifisch mit dem nSREBP-1c/-2 interagiert.

3.4.2.5 Sequenzanalyse

Der Sequenzvergleich des *Sense*- und *Antisense*-Stranges des SREBP-responsiven Bereiches von nt +656 bis +665 der TPO III-Sonde (Abb. 27A) mit bereits aus der Literatur bekannten SREBP-responsiven *cis*-Elementen ergab in inverser Orientierung von nt +654 bis +663 eine 50%ige Übereinstimmung mit dem SRE-1. Allerdings konnte in gleicher Orientierung eine hohe Homologie (80%) mit dem E-Box-like SRE (SRE-2) aus dem Promotorbereich der humanen Δ -6-Desaturase (Δ 6D) (Nara *et al.*, 2002; Abb. 27B) festgestellt werden. Zur Vereinfachung wird das putative SREBP-responsive Element nachfolgend als InvSRE-like+654 bezeichnet.

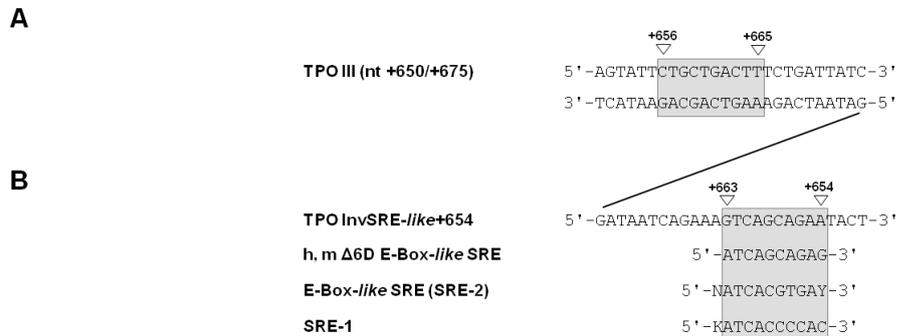


Abbildung 27: Analyse des SREBP-responsiven Bereiches von nt +656 bis +665 der TPO III-Sonde. (A) Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der TPO III-Sonde (nt +650/+675) in *Sense*- und *Antisense*-Orientierung. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart (+1) angegeben. (B) Dargestellt ist der *Antisense*-Strang der TPO III-Sonde (nt +650/+675) in 5'→3'-Orientierung sowie der Vergleich des InvSRE-like+654 mit dem bekannten Bindungsmotiv der h, m Δ 6D sowie der E-Box-like SRE (SRE-2)- und SRE-1-Sequenz (Nara *et al.*, 2002).

Durch die Analyse des *Sense*- und *Antisense*-Stranges des SREBP-responsiven Bereiches von nt +614 bis +618 der TPO VI-Sonde sowie der unmittelbar flankierenden Basen konnten bei näherer Betrachtung zwei überlappende putative Bindungsmotive lokalisiert werden, die in unterschiedlichen Orientierungen vorliegen (Abb. 28A). Das in inverser Orientierung vorliegende Bindungsmotiv von nt +614 bis +623 weist eine 60%ige Übereinstimmung mit dem klassischen SRE-1 auf, ist aber dagegen zu 80% mit der SRE-Sequenz der humanen Lanosterol-14 α -Demethylase (CYP51) homolog (Rozman *et al.*, 1999; Abb. 28B). Im *Sense*-Strang konnte ein Bindungsmotiv von nt +609 bis +618 identifiziert werden, das nur zu 50% mit dem klassischen SRE-1, aber zu 80% mit dem beschriebenen SRE-3 aus dem murinen Promotorbereich des SREBP-1c homolog ist (Amemiya-Kudo *et al.*, 2000; Abb. 28C). Aus diesem Grund werden die putativen Bindungsmotive nachfolgend als InvSRE+614 und SRE+609 bezeichnet.



Abbildung 28: Analyse des SREBP-responsiven Bereiches von nt +614 bis +618 der TPO VI-Sonde. (A) Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der TPO VI-Sonde (nt +598/+628) in *Sense*- und *Antisense*-Orientierung und die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart (+1) angegeben. (B) Dargestellt ist der *Antisense*-Strang der TPO VI-Sonde (nt +598/+628) in 5'→3'-Orientierung sowie der Vergleich des InvSRE+614 mit dem bekannten Bindungsmotiv der h, r, mCYP51 sowie der SRE-1-Konsensussequenz. (C) Dargestellt ist der *Sense*-Strang der TPO VI-Sonde (nt +598/+628) in 5'→3'-Orientierung sowie der Vergleich des SRE+609 mit dem bekannten Bindungsmotiv des mSREBP-1c sowie der SRE-1-Sequenz.

Darüber hinaus zeigte der Speziesvergleich zwischen Ratte und Maus einen hohen Konservierungsgrad in Bezug auf die Positionen und Nukleotidsequenzen der identifizierten SREBP-responsiven Elemente. Wie in Abbildung 29 dargestellt, weist sowohl das Bindungsmotiv des SRE+609 als auch das Bindungsmotiv des SRE+640 der Ratte eine 100%ige Homologie zu denen der Maus auf. Demgegenüber ist das Bindungsmotiv des InvSRE+614 zu 70% und das Bindungsmotiv des InvSRE-like+654 zu 90% mit denen der Maus homolog. Insgesamt deutet der Sequenzvergleich des 100 bp umfassenden intronischen Bereiches auf eine wichtige Funktion dieser bei der transkriptionellen Regulation des TPO-Gens hin.

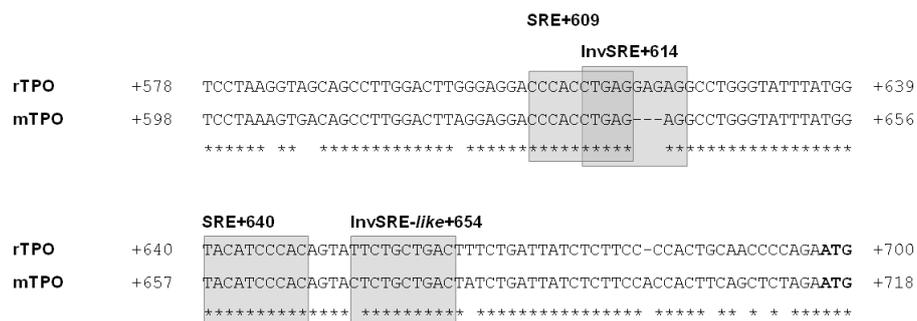


Abbildung 29: Sequenzvergleich des SREBP-responsiven Intronbereiches des TPO-Gens zwischen *Rattus norvegicus* und *Mus musculus*. Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des SREBP-responsiven Intronbereiches des TPO-Gens von *Rattus norvegicus* (rTPO, NM_019353) und *Mus musculus* (mTPO, NM_009417), einschließlich der identifizierten SREBP-responsiven Elemente. Die Nukleotidpositionen sind relativ zum Transkriptionsstart (+1) angegeben und die konservierten Nukleotide durch Sterne markiert.

3.4.2.6 Überprüfung des Transaktivierungspotenzials der identifizierten SREBP-responsiven Elemente des TPO-Gens in HepG2-Zellen

Zur Überprüfung, ob die identifizierten SREBP-responsiven Elemente SRE+640, InvSRE-like+654 sowie das SRE/InvSRE-Element (überlappendes SRE+609 und InvSRE+614) eine Transaktivierung des TPO-Gens vermitteln, wurden die Bindungsmotive in zweifacher Wiederholung in den promotorlosen Reporter-genvektor pGL4.23[*luc2*/minP] kloniert (Vgl. Kap. 3.2). Die putativen Bindungsmotive wurden jeweils als Wildtyp und Mutante hergestellt (Abb. 30) (Oligonukleotide in Tab. 8).

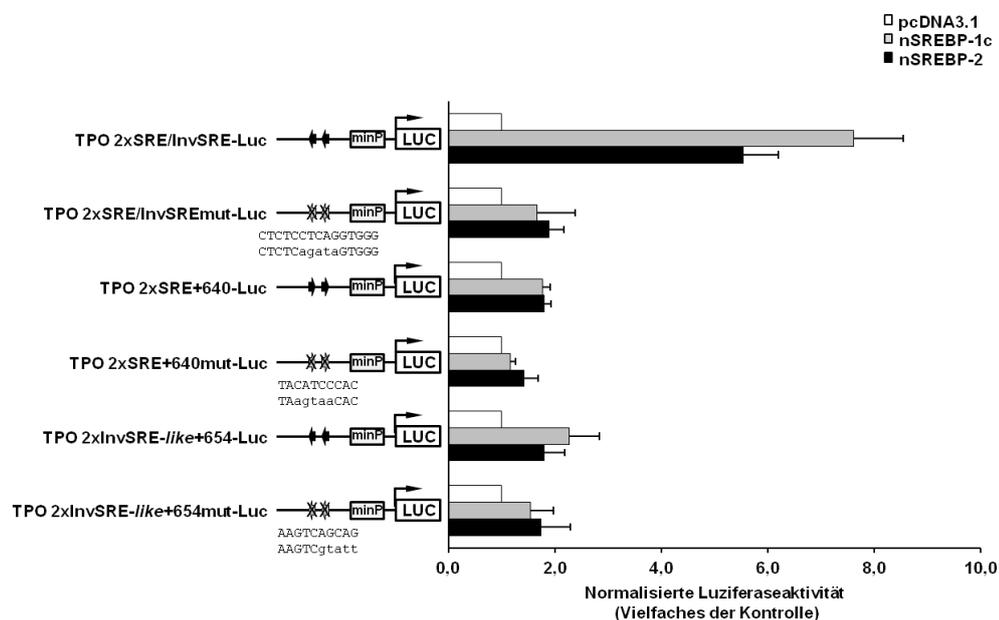


Abbildung 30: Überprüfung des Transaktivierungspotenzials der identifizierten SREBP-responsiven Elemente des TPO-Gens in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden transient mit den Reporter-genkonstrukten TPO 2xSRE/InvSRE-Luc, TPO 2xSRE/InvSREmut-Luc, TPO 2xSRE+640-Luc, TPO 2xSRE+640mut-Luc, TPO 2xInvSRE-like+654-Luc bzw. TPO 2xInvSRE-like+654mut-Luc und den Expressionsvektoren nSREBP-1c, nSREBP-2 bzw. pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Quadruplikats aus 3 unabhängigen Experimenten. Die normierten Luziferaseaktivitäten entsprechen einem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. Die putativen *cis*-Elemente von SREBP-1c/-2 sind als Wildtyp (oben) mit korrespondierender Mutante (unten) abgebildet. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die substituierten Basen.

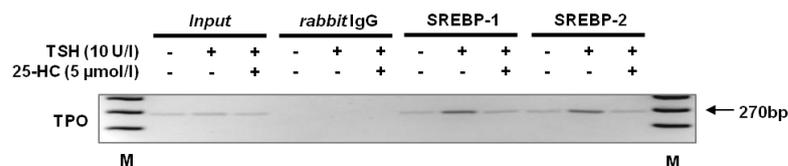
Das Konstrukt TPO 2xSRE/InvSRE-Luc konnte nach Kotransfektion mit dem nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 auf das 7,6- bzw. 5,5-fache des Leervektor aktiviert werden, wohingegen das mutierte Konstrukt TPO 2xSRE/InvSREmut-Luc kaum stimuliert wurde (Abb. 30). Die Konstrukte TPO 2xSRE+640-Luc und TPO 2xInvSRE-like+654 sowie die korrespondierenden Mutanten wiesen ebenfalls keine nennenswerten Aktivitätszunahmen auf (Abb. 30). In Anbetracht der Tatsache, dass die Bindungsmotive in zweifacher Wiederholung vorliegen und die Mutanten

vergleichbar stark induziert wurden, kann die verbliebene Restaktivität von Konstrukt TPO 2xSRE+640-Luc und TPO 2xInvSRE-*like*+654 als Hintergrund angesehen werden.

3.4.2.7 Nachweis einer spezifischen *in vivo*-Bindung der nukleären SREBPs im Intron des TPO-Gens

Die Vorbehandlung der FRTL-5-Zellen sowie die Aufbereitung der ChIP-Proben sind im Kapitel 2.2.5.2 beschrieben. Die verwendeten ChIP-*Primer* (Tab. 4) amplifizieren ein 270 bp umfassendes Fragment (von nt +428 bis +697 relativ zum Transkriptionsstart), das den Intronbereich des TPO-Gens mit den identifizierten SREBP-responsiven *cis*-Elementen überspannt. Die Ergebnisse der ChIP-Analyse zum TPO-Gen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Gaiping Wen zur Verfügung gestellt.

A



B

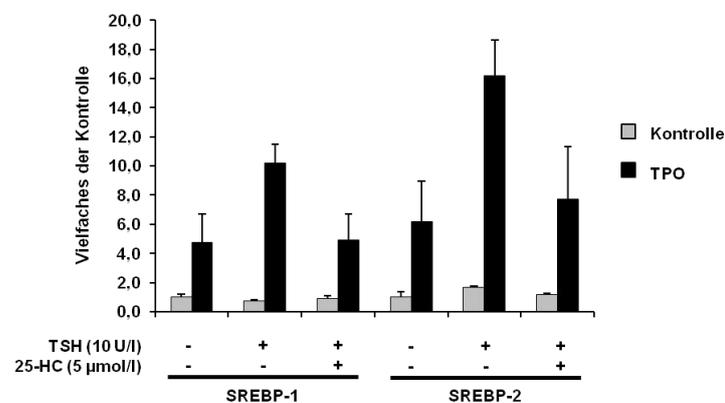


Abbildung 31: *In vivo*-Bindung von SREBP-1 und SREBP-2 im ersten Intron des TPO-Gens. Die chromosomale DNA aus FRTL-5-Zellen wurde in einem ChIP-Assay mit anti-SREBP-1, anti-SREBP-2 bzw. *rabbit*-IgG präzipitiert und mittels konventioneller PCR (A) und qPCR (B) analysiert. Dargestellt sind die Amplifikate aus präzipitierter (anti-SREBP-1, anti-SREBP-2 bzw. *rabbit*-IgG) und nicht präzipitierter (*Input*)-DNA, die den Intronbereich des TPO-Gens (270 bp) repräsentieren. Das Bild der Agarose-Gelelektrophorese steht repräsentativ für 3 unabhängige ChIP-Experimente. Die Ergebnisse der qPCR sind als Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. M, DNA-Größenmarker.

Wie in Abbildung 31A dargestellt, konnte bei Anwesenheit von TSH eine verstärkte Bindung des SREBP-1/-2 im untersuchten Intronbereich des TPO-Gens beobachtet werden, da hier mehr Amplifikat in Form einer deutlichen Bande detektiert wurde. Demgegenüber war bei

Abwesenheit von TSH eine schwächere Bande und demzufolge geringere Mengen der amplifizierten 270 bp Region nachweisbar (Abb. 31A). Vergleichbares konnte in den TSH-behandelten FRTL-5-Zellen bei gleichzeitiger Anwesenheit von 25-HC nachgewiesen werden, da auch in diesem Fall die Bandenintensität schwächer ausgeprägt war und somit weniger SREBP-1/-2 im Intronbereich des TPO-Gens gebunden hat (Abb. 31A). Die Spezifität der *in vivo*-Bindung wurde durch die Amplifikation des 270 bp Fragmentes mit der *rabbit* IgG immunpräzipitierten DNA als *Template* deutlich, da keine Banden unter den entsprechenden Inkubationsbedingungen beobachtet werden konnten (Abb. 31A). Darüber hinaus erfolgte keine Immunpräzipitation des SREBP-1/-2 mit der *random*-Kontrollsequenz von 168 bp Länge, wie bereits unter Kapitel 3.3.3.10 beschrieben und abgebildet (Abb. 18A). Folglich konnte das SREBP-1/-2 nicht in diesem Bereich binden. Die qPCR der *random*-Kontrollsequenz und der Intronsequenz der TPO bestätigen die Ergebnisse der konventionellen PCR (Abb. 31B).

4. Diskussion

TSH ist das zentrale Hormon der Schilddrüsenfunktion und reguliert neben Wachstum und Differenzierung der Schilddrüse ebenso den intrathyroidalen Iodmetabolismus (Dunn und Dunn, 2001). Bei der Metabolisierung des Iods, der essenziellen Komponente der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 , sind die schilddrüsenassoziierten Proteine NIS und TPO beteiligt, deren komplexe TSH-abhängige Regulation primär durch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren PAX-8, TTF-1 und FOXE1 vermittelt wird (De La Vieja *et al.*, 2000). Neuere Studien zeigen, dass die Gene des NIS und der TPO nicht nur durch den autoregulierten, endogenen Stimulus TSH, sondern ebenso durch exogene Stimuli reguliert werden können. In diesem Zusammenhang konnte der stressresponsive NF- κ B als transkriptioneller Mediator einer LPS-Intoxikation identifiziert werden, der sowohl über den NIS als auch über die TPO Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese nehmen kann (Nicola *et al.*, 2010; Nazar *et al.*, 2012). Auf einen vergleichbaren Mechanismus beruhend, kann mit der Entdeckung funktioneller SREBPs in den Thyreozyten verschiedener Spezies durch unsere Arbeitsgruppe (Rothe, Dissertation 2011), eine zuvor beschriebene sterol-induzierte Hypothyreose erklärt werden (Jatwa und Kar, 2006; Parmar und Kar, 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, die beobachtete sterol-induzierte Inhibierung des NIS und der TPO näher zu untersuchen. Zum einen sollte die Beteiligung der jeweiligen SREBP-Isoform charakterisiert und zum anderen der NIS und die TPO als neue Zielgene der SREBPs identifiziert werden.

4.1 Regulation des Natrium-Iodid-Symporters durch die SREBPs

Der NIS, ein integrales Plasmamembranprotein an der äußeren basolateralen Membran der Thyreozyten, vermittelt den initialen Schritt der Schilddrüsenhormonsynthese durch aktive Aufnahme des Iodids im Kotransport mit Natrium (Dohán und Carrasco, 2003). Störungen des Transportsystems, hervorgerufen durch Mutationen im NIS-Gen oder durch kompetitive Hemmung der aktiven Iodidaufnahme, können unbehandelt zu einer Hypothyreose mit unterschiedlichem Schweregrad führen (Delange, 1994; Ahad und Ganie, 2010; Spitzweg und Morris, 2010). Vor allem während des Wachstums sind die Schilddrüsenhormone essenziell, da zahlreiche Prozesse, wie die neuronale und körperliche Entwicklung, über das biologisch aktive T_3 reguliert werden. Vor diesem Hintergrund ist auch die Exposition mit Umweltkontaminanten und nutritiven Faktoren, wie Perchloraten, Thiocyanaten und Nitraten, kritisch zu sehen, da diese in der Lage sind den Iodidtransport kompetitiv zu hemmen (Tonacchera *et al.*, 2004; De Groef *et*

al., 2006). Insbesondere die Kombination aus einer hohen Aufnahme von Perchlorat sowie Thiocyanat und einer geringen Aufnahme von Iodid wird mit einer verminderten Schilddrüsenhormonsynthese in Verbindung gebracht (Steinmaus *et al.*, 2013).

Neben der beschriebenen kompetitiven Hemmung durch monovalente Anionen, konnten in den *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeit erstmals Sterole als potenzielle Inhibitoren der NIS-spezifischen Iodidaufnahme identifiziert werden. Sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von TSH konnte nach Supplementierung von 25-HC eine moderat verminderte Akkumulierung des eingesetzten radioaktiv-markiertem Iodid nachgewiesen werden (Abb. 7), was auf eine inhibierte aktive Iodidaufnahme hindeutet. Rothe (Dissertation 2011) konnte im Rahmen ihrer Untersuchungen bereits zeigen, dass die Supplementierung mit 25-HC zu einer Suppression des NIS führt. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde die transkriptionelle Regulation durch die SREBPs vermutet, da Cholesterol bzw. seine oxidierten Derivate, wie beispielsweise das 25-HC, die essenziellen Stimuli der SREBPs sind und deren Aktivität bestimmen. Durch einen Anstieg des zellulären Sterolgehalts wird die Prozessierung der membrangebundenen inaktiven SREBPs zu den aktiven Transkriptionsfaktoren blockiert, in deren Folge die Transkription SREBP-responsiver Gene abnimmt (Shimano, 2001; Horton *et al.*, 2002). Um die Funktion des SREBP-Systems zu untersuchen, wird vor allem 25-HC, aufgrund seines Wirkpotenzials von mehr als dem 100-fachen des Cholesterols (Tang *et al.*, 2011), häufig allein oder in Kombination mit Cholesterol eingesetzt (Bennett *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1998; Amemiya-Kudo *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2005; Bennati *et al.*, 2006; Ecker *et al.*, 2010; Schiavoni *et al.*, 2010).

Da nun sowohl das SREBP-1 als auch das SREBP-2 der gleichen posttranslationalen Modifikation unterliegt, ist eine Differenzierung allein auf Grundlage ihrer sterol-abhängigen Aktivierung nicht möglich. Um die Beteiligung beider SREBP-Isoformen charakterisieren zu können, erfolgte im *in vitro*-Modell ein RNAi-induziertes *gene silencing*, hervorgerufen durch den posttranskriptionalen Abbau der zur siRNA komplementären mRNA (Fire *et al.*, 1998; Elbashir *et al.*, 2001). Für die *knockdown*-Analyse wurden FRTL-5-Zellen verwendet, die sich von Schilddrüsenzellen der Ratte ableiten und häufig für Untersuchungen der Schilddrüsenfunktion genutzt werden (Kimura *et al.*, 2001) und darüber hinaus die SREBPs funktionell exprimieren (Rothe, Dissertation 2011).

Die in den *knockdown*-Experimenten eingesetzten sequenzspezifischen siRNA-Duplexe führten in den FRTL-5-Zellen zu einer deutlichen Suppression des NIS. Dabei waren die Proteinkonzentrationen des NIS nicht nur nach einem *knockdown* von SREBP-1, sondern ebenso nach einem *knockdown* von SREBP-2 signifikant vermindert (Abb. 10). Die Spezifität der beobachteten *knockdown*-Effekte konnte anhand der Expression der SREBPs, die

erwartungsgemäß vermindert war, belegt werden. Sowohl die Proteinlevel der membrangebundenen Vorläuferformen als auch die der transkriptionell aktiven nukleären Formen von SREBP-1 und SREBP-2 waren nach Einsatz der spezifischen siRNA signifikant erniedrigt (Abb. 8 und Abb. 9). Dass das pSREBP-1 durch den *knockdown* von SREBP-2 ebenfalls signifikant vermindert wurde (Abb. 8A), lässt sich durch ein vorhandenes SRE im Promotorbereich des SREBP-1c erklären, weshalb es selbst zu den Zielgenen der SREBPs zählt (Amemiya-Kudo *et al.*, 2000). Längst konnten mit der RNAi-Technik bis dato unbekannte SREBP-responsive Gene identifiziert werden, sodass in Übereinstimmung mit der Literatur auch im Falle des NIS-Gens von einer SREBP-abhängigen Regulation ausgegangen werden kann (Logette *et al.*, 2005; Gibot *et al.*, 2009; Ishimoto *et al.*, 2009; Wang *et al.*; 2009).

Zur Identifizierung des NIS als direktes Zielgen der SREBPs wurden Reporterstudien durchgeführt, um potenzielle SREBP-responsive *cis*-Elemente in der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens lokalisieren zu können. Aufgrund der schlechten Transfizierbarkeit der thyroidalen FRTL-5-Zellen (Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008) wurden zunächst die nicht-thyroidalen HepG2-Zellen als gut etabliertes Zellmodell verwendet (Wen *et al.*, 2011 und 2012). Die wichtigsten Erkenntnisse aus den in HepG2-Zellen durchgeführten Reporterstudien sollten anschließend in FRTL-5-Zellen validiert werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Expressionsvektoren verwendet, die das transkriptionell aktive nukleäre SREBP-1c und SREBP-2 exprimieren. Deren Funktionsfähigkeit konnte anhand der deutlich nachweisbaren rekombinanten Proteine belegt werden (Abb. 6).

Zunächst wurde mit dem Programm MatInspector von Genomatix (Quant *et al.*, 1995; Cartharius *et al.*, 2005) die 5'-flankierende Region des NIS-Gens von Position -3002 bis +87 relativ zum Transkriptionsstart auf potenzielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. MatInspector identifizierte mehrere E-Box-Elemente (Tab. 14), die von den SREBPs, aufgrund ihrer dualen Bindungsspezifität, erkannt werden können (Kim *et al.*, 1995). Hingegen ergab die computergestützte bioinformatische Analyse keine positive Übereinstimmung mit dem eigentlichen *cis*-Element der SREBPs, dem SRE. Obwohl MatInspector häufig zur Identifizierung von putativen SREBP-responsiven *cis*-Elementen im Rahmen einer *in silico*-Analyse genutzt wird (Nara *et al.*, 2002; Dubuc *et al.*, 2004; Oberkofler *et al.*, 2006; Gévry *et al.*, 2008; Gibot *et al.*, 2009), ist die Vorhersage von SREs relativ schwierig. Dies begründet sich vor allem darin, dass die bisher identifizierten funktionellen SREs teilweise stark abweichende Erkennungssequenzen aufweisen, sodass es schwer ist, eine allgemeingültige Konsensussequenz, welche für die Vorhersage genutzt werden kann, zu definieren (Brown und Goldstein, 1999; Edwards *et al.*, 2000). Ergänzend zu MatInspector wurde eine *in silico*-Analyse mit dem

Programm TFSEARCH (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) durchgeführt. Abermals konnte kein positives Ergebnis erzielt werden, womit sich die Problematik der Vorhersage von putativen SREBP-responsiven *cis*-Elementen nochmals bestätigte. Lediglich durch visuellen Abgleich mit dem klassischen SRE-1 aus dem hLDLR-Promotor (5'-ATCACCCCAC-3'; Briggs *et al.*, 1993) konnten im Verlauf der Untersuchungen zehn putative SREs (Tab. 14) identifiziert werden.

Um den regulativen Einfluss von SREBP-1 und/oder SREBP-2 auf potenzielle Zielgene aufzuzeigen bzw. neuartige Regulationsmechanismen oder synergistische Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren aufgedeckt zu können, haben sich in zahlreichen Untersuchungen Reportergenvektoren etabliert, die unter der Kontrolle eines oder mehrerer SREs stehen (Inoue *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2008; Van Deursen *et al.*, 2009; Kamisuki *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2012). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde ein künstliches Reporter gen mit einer zweifachen Wiederholung des SRE-1 konstruiert (Kap. 3.2), um die Funktionalität des SREBP-Systems zu bestätigen. Hierauf basierend kann von einer direkten Interaktion der SREBPs mit dem NIS-Gen ausgegangen werden, da nach Stimulation mit dem nSREBP-1c/-2 das Reporter genkonstrukt NIS13002/+87 parallel zum Kontrollvektor 2xSRE-1-Luc induziert wurde (Abb. 11). Im Zuge der nachfolgenden Deletionsanalyse konnte durch sukzessive Entfernung der putativen *cis*-Elemente zwei SREBP-responsive Regionen identifiziert werden, die die transkriptionelle Aktivität des NIS vermitteln (Abb. 11). Die Existenz von zwei oder mehr SREBP-responsiven Elementen in den regulatorischen Regionen von SREBP-Zielgenen, deren Zusammenspiel zu einer effizienten Transaktivierung beitragen, konnte mehrfach gezeigt werden (Magaña und Osborne, 1996; Ericsson *et al.*, 1997; Guan *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2001; Kumadaki *et al.*, 2008; Zerenturk *et al.*, 2012). Dabei ist die Funktionalität bzw. Effizienz eines jeden Elementes individuell verschieden. Im Falle der *fatty acid elongase* (Elovl)-6 der Maus wurden zwei SREs in der Promotorregion identifiziert, die die volle transkriptionelle Aktivität vermitteln (Kumadaki *et al.*, 2008). Die Deletion des distalen SREs im Elovl-6-Promoter führte gegenüber dem Ausgangskonstrukt zur Halbierung der Luziferaseaktivität, eine Beobachtung, die sich mit den hier gezeigten Ergebnissen am NIS-Gen deckt. Ungeachtet dieser scheinbar bedeutsamen Mitwirkung des distalen SREs im Elovl-6-Promoter konnte im Vergleich zum proximalen SRE keine *in vivo*-Bindung detektiert werden (Kumadaki *et al.*, 2008). Aufgrund dessen schlussfolgerten Kumadaki *et al.*, dass vielmehr das proximal gelegene SRE als das primäre SREBP-responsive *cis*-Element im Elovl-6-Promoter fungiert. Die beobachtete reduzierte Luziferaseaktivität des NIS-Gens nach Deletion der distalen SREBP-responsiven Region von nt -1022 bis -386 deutet demzufolge darauf hin, dass die darin

lokalisierten SREBP-responsiven *cis*-Elemente für die vollständige transkriptionelle Aktivität notwendig, jedoch nicht essenziell sind und die Transaktivierung ebenso primär vom proximalen Bereich des NIS-Gens auszugehen scheint (Abb. 11). Aus diesem Grund wurde sich in den nachfolgenden Untersuchungen auf den proximalen Sequenzabschnitt der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens fokussiert. Innerhalb dieses Bereiches von nt -112 bis +87 (NIS-112/+87) wurden vier putative SREBP-responsive Elemente visuell ermittelt, deren Sequenzen zu 60% bzw. 70% mit dem SRE-1 aus dem hLDLR-Promotor übereinstimmen (Tab. 14). Das Konstrukt NIS-2/+83, welches die 5'-UTR des NIS-Gens repräsentiert und die Elemente SRE+19, SRE+37 und SRE+59 enthält, konnte sowohl durch nSREBP-1c als auch durch nSREBP-2 stimuliert werden (Abb. 12). Durch gezielten Basenaustausch innerhalb der Bindungssequenz des SRE+59 konnte die beobachtete Induzierbarkeit aufgehoben werden (Abb. 13), was darauf hindeutet, dass dieses SRE funktionell ist. Dieser Befund wird unterstützt durch ein künstliches Reportergenkonstrukt, welches das SRE+59 in zweifacher Wiederholung enthält und deutlich durch nSREBP-1c/-2 aktiviert wurde (Abb. 14). Bestätigung findet die SREBP-abhängige transkriptionelle Regulation des NIS ebenso in den thyroidalen FRTL-5-Zellen, da der Basenaustausch innerhalb des SRE+59 zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivität des NIS führte (Abb. 15).

Ferner wird die Bedeutung des SRE+59 durch die nachgewiesene Bindung des nSREBP-1c/-2 verdeutlicht. Dabei konnte die *in vitro*-Bindung durch den Basenaustausch innerhalb des SRE+59, wie zuvor in den Reporterstudien gezeigt, aufgehoben werden (Abb. 17). Dass das zugrundeliegende SRE-Motiv 5'-CTCTCCTCAC-3', mit einer 70%igen Homologie zum klassischen SRE-1, auch tatsächlich spezifisch mit dem nSREBP-1c/-2 interagiert, konnte zudem durch erfolgreiche Konkurrenz mit dem häufig verwendeten SRE-1-Motiv aus dem hLDLR-Promotor belegt werden (Abb. 17) (Yamamoto *et al.*, 2004; Daimiel *et al.*, 2012; Inoue *et al.*, 2005). Da das transkriptionelle Geschehen in der Zelle noch zusätzlichen Mechanismen unterliegt, die beispielsweise den Chromatinstatus regulieren und *in vitro* nicht erfasst werden (Jiang *et al.*, 2009; Dey *et al.*, 2012), wurde für den Nachweis einer spezifischen *in vivo*-Bindung die thyroidalen FRTL-5-Zellen verwendet. Nach Stimulation der FRTL-5-Zellen mit TSH konnte in der 5'-UTR des NIS-Gens mehr gebundenes SREBP-1/-2 detektiert werden (Abb. 18). Dies erklärt sich durch den stimulierenden Einfluss von TSH auf die Expression des SREBP-1c/-2, was in vorangegangenen Untersuchungen von Rothe (Dissertation 2011) beobachtet werden konnte. Nach Supplementierung von 25-HC, das die Translokation des SREBP-1/-2 in den Zellkern inhibiert (Adams *et al.*, 2004), wurde hingegen die Bindung des SREBP-1/-2 in der 5'-UTR des NIS-Gens supprimiert (Abb. 18). Diese Beobachtung ist auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kidani *et al.*, die im Rahmen ihrer CHIP-Analyse ebenfalls nach

25-HC-Supplementierung weniger gebundenes SREBP-1/-2 in den Promotorregionen klassischer SREBP-Zielgene nachweisen konnten (Kidani *et al.*, 2013).

Im Rahmen der phylogenetischen Analyse, bei der ein Sequenzvergleich der 5'-UTR des NIS-Gens von Ratte und Maus durchgeführt wurde, war neben einem relativ hohen Konservierungsgrad des SRE+59 insgesamt eine hohe Übereinstimmung der 5'-UTR des NIS-Gens zwischen beiden Spezies feststellbar (Abb. 16). Da funktionell relevante Sequenzen zwischen evolutionär eng verwandten Spezies häufig konserviert vorliegen, kann die hohe Übereinstimmung der 5'-UTR zwischen Ratte und Maus als Hinweis für die Existenz gemeinsamer transkriptioneller Mechanismen gedeutet werden (Ishimoto *et al.*, 2009; Alotaibi *et al.*, 2010; Nicola *et al.*, 2010; Nitsch *et al.*, 2010; Nazar *et al.*, 2012). Zusammen mit den hier präsentierten experimentellen Daten kann folglich eine funktionelle Relevanz des SRE+59 bei der transkriptionellen Regulation des NIS-Gens angenommen werden.

Die Zelle verfügt über ein komplexes Netzwerk an Transkriptionsfaktoren, das für die zellspezifische Expression essenziell ist. Die zellspezifische Expression wird hierbei über die individuelle, für jeden Zelltyp charakteristische Kombination an interagierenden Transkriptionsfaktoren erreicht. Der NIS gehört, wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, zu einer Subklasse von Genen, die nicht schilddrüsenspezifisch sind (Christophe, 2004). So konnte der NIS ebenso in extrathyroidalen Geweben, wie beispielsweise der laktierenden Milchdrüse (Tazebay *et al.*, 2000; Perron *et al.*, 2001), identifiziert werden, wo er hauptsächlich auf basalem Niveau exprimiert wird. Erst durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren, die selbst nicht schilddrüsenspezifisch sind, jedoch in einer für die Schilddrüse typischen Kombination vorliegen, wird die Expression des NIS maximiert (Damante *et al.*, 2001; Christophe, 2004). Die transkriptionelle Regulation des NIS durch die SREBPs scheint ebenso zelltypspezifischen Unterschieden zu unterliegen, wie der Vergleich zwischen den nicht-thyroidalen HepG2-Zellen und den thyroidalen FRTL-5-Zellen zeigt (Abb. 11 und Abb. 15). In den FRTL-5-Zellen wurde NIS-3002/+87 durch nSREBP-1c/-2 ähnlich stark aktiviert wie NIS-2/+83 (Abb. 15), wohingegen die Aktivität von NIS-3002/+87 in den HepG2-Zellen um ein Vielfaches höher war als die Aktivität von NIS-2/+83, vor allem nach Kotransfektion mit nSREBP-2 (Abb. 11). Hinsichtlich der Interaktionspartner konnten Schiavoni *et al.* ebenfalls zelltypspezifische Unterschiede bei der SREBP-abhängigen Regulation der 3 β -Hydroxysterol Δ^{14} -Reduktase (TM7SF2) feststellen. In ihren Untersuchungen mit HEK293-Zellen und HepG2-Zellen konnte nur bei Letzteren eine Interaktion der SREBPs mit dem Sp-1 im TM7SF2-Promotor nachgewiesen werden, was mit einem unterschiedlichen Netzwerk an Transkriptionsfaktoren in beiden Zelltypen begründet wurde (Schiavoni *et al.*, 2010). Sp-1 gehört, wie NF-Y, zu den prominenten Kofaktoren der SREBP-Familie, deren *cis*-Elemente sich meist in unmittelbarer

Umgebung zu den SREs befinden (Shimano, 2001; Osborne und Espenshade, 2009; Sharpe *et al.*, 2013). Da die SREBPs allein schwache Aktivatoren darstellen, ist die synergistische Interaktion zwischen diesen und den genannten Kofaktoren für die volle transkriptionelle Aktivität einiger SREBP-responsiver Gene notwendig (Magaña und Osborne, 1996; Ericsson *et al.*, 1996; Dooley *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Amemiya-Kudo *et al.*, 2002; Schiavoni *et al.*, 2010). Ob jedoch Kofaktoren, wie Sp-1 bzw. NF-Y, bei der zellspezifischen Regulation des NIS-Gens involviert sind, scheint aufgrund der räumlichen Entfernung der distalen SREBP-responsiven Region zum identifizierten SRE+59 eher unwahrscheinlich. Es konnte jedoch die Beobachtung gemacht werden, dass nicht nur Kofaktoren, sondern auch die SREs selbst bei der zellspezifischen Expression eine Rolle spielen (Sekiya *et al.*, 2007). Im Falle der FAS konnte anhand eines ChIP-Assays gezeigt werden, dass die Rekrutierung des aktiven SREBP-1 an das primär funktionelle SRE im FAS-Promotor nur in den Hepatozyten, jedoch nicht in den Adipozyten stattfand, weshalb eine nennenswerte Transaktivierung der FAS in den Adipozyten ausblieb (Sekiya *et al.*, 2007). Damit verbunden entdeckten Sekiya *et al.* eine SREBP-1-unabhängige Regulation der FAS in den Adipozyten. Es kann daher vermutet werden, dass das SRE+59 im NIS-Gen das primäre, funktionelle *cis*-Element der SREBPs darstellt, da es sowohl in den nicht-thyroidalen HepG2-Zellen als auch in den thyroidalen FRTL-5-Zellen transaktivierbar ist, wohingegen die distale SREBP-responsive Region mit den darin lokalisierten SREBP-responsiven *cis*-Elementen die zellspezifische Regulation des NIS vermittelt. Generell ist die Transaktivierbarkeit der Reporter-genkonstrukte in den FRTL-5-Zellen schwächer als in den HepG2-Zellen, was vor allem am Kontrollvektor 2xSRE-1-Luc sichtbar wurde. Während die Luziferase in den FRTL-5-Zellen nach Überexpression von nSREBP-1c/-2 auf etwa das 6- bzw. 10-fache des Leervektors stimuliert wurde (Abb. 15), war die Aktivität in den HepG2-Zellen sogar auf das 50-fache angestiegen (Abb. 11). Möglicherweise resultierte die schwächere Transaktivierung der Reporter-genkonstrukte nach Stimulation mit dem nSREBP-1c/-2 aus einer schlechteren Transfizierbarkeit der FRTL-5-Zellen, sodass die Expression des rekombinanten nSREBP-1c/-2 und die der Luziferase in ihrer Effizienz beeinträchtigt wurde (Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Vuchak *et al.*, 2009).

In Bezug auf weitere relevante SREBP-responsive *cis*-Elemente bzw. interagierende Kofaktoren kann abschließend keine vollständige Aufklärung geliefert werden, dennoch belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das NIS-Gen über ein funktionelles SRE in der 5'-UTR verfügt, welches die SREBP-induzierte Transaktivierung des NIS sowohl in nicht-thyroidalen als auch in thyroidalen Zellen vermittelt. Ferner belegen die *in vitro*- und *in vivo*-Bindungsstudien, dass das SREBP-1c/-2 spezifisch mit dem identifizierten SRE+59 interagiert. Ungeachtet der schwächeren Transaktivierung des NIS-Gens in den thyroidalen FRTL-5-Zellen kann eine

bedeutende Rolle der SREBPs bei der Genregulation des NIS im Thyreozyt angenommen werden, da nach Supplementierung von 25-HC der aktive NIS-spezifische Iodidtransport moderat supprimiert werden konnte. Insgesamt weisen die hier vorgestellten Daten stark daraufhin, dass der NIS zu den Zielgenen der sterolsensitiven SREBPs gehört und sowohl durch SREBP-1c als auch durch SREBP-2 reguliert wird.

4.2 Regulation der Thyreoperoxidase durch die SREBPs

Die schilddrüsen-spezifische TPO katalysiert über mehrere Zwischenreaktionen die Organifizierung des aufgenommenen Iodids, an deren Ende die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 entstehen. Während die Verknüpfung der iodinierten Tyrosylreste des Tg auch nicht-enzymatisch und damit TPO-unabhängig erfolgen kann, ist die Organifizierung des Iodids von der enzymatischen Aktivität der TPO abhängig (Ris-Stalpers und Bikker, 2010). Die Auswirkungen einer beeinträchtigten Organifizierung sind daher ebenso schwerwiegend wie die gestörte Aufnahme des Iodids in die Thyreozyten.

Erste Hinweise, dass die TPO ebenfalls sterol-abhängig über die SREBPs reguliert wird, lieferten die Untersuchungen von Rothe (Dissertation 2011). In Anbetracht der Erkenntnisse dieser Arbeit, in der der NIS als SREBP-responsives Gen identifiziert werden konnte, erscheint es als sehr wahrscheinlich, dass die TPO ebenfalls durch die SREBPs reguliert wird. Unterstützt wird diese Vermutung durch den SREBP-1/-2-*knockdown*, der eine starke Suppression der TPO zur Folge hatte. Auch hierbei scheinen beide SREBP-Isoformen involviert zu sein, da die Transkriptmenge der TPO, 48 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplexe, in den SREBP-1- und SREBP-2-*knockdown*-Zellen jeweils um etwa 50% vermindert war (Abb. 21). Der siRNA-vermittelte posttranskriptionale Abbau der SREBP-mRNA kann in den FRTL-5-Zellen anhand der deutlich erniedrigten Transkriptmenge von SREBP-1c und SREBP-2 bestätigt werden (Abb. 19 und Abb. 20). Interessanterweise wirkte sich der SREBP-1/-2-*knockdown* unterschiedlich auf die jeweiligen SREBP-Zielgene aus. Während in den SREBP-2-*knockdown*-Zellen die Transkription der cholesterogenen SREBP-2-Zielgene LDLR und HMGCR nach 48 Stunden erwartungsgemäß supprimiert wurde (Abb. 20), blieben die lipogenen SREBP-1-Zielgene FAS und GPAT in den SREBP-1-*knockdown*-Zellen nahezu unbeeinflusst (Abb. 19). Die Suppression der Zielgene ist ein wichtiges Indiz dafür, ob das posttranskriptionale *gene silencing* auch tatsächlich das Zielprotein erreicht. Angesichts der RNAi-Experimente im Rahmen der Untersuchungen zur Regulation des NIS, welche unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden, kann ein *knockdown* des transkriptionell aktiven SREBP-1/-2 angenommen werden (Kap. 3.3.2). Die unveränderte Expression der lipogenen Enzyme FAS und

GPAT in den SREBP-1-*knockdown*-Zellen könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Gene SREBP-1-unabhängig reguliert werden. Die Existenz eines SREBP-1-unabhängigen Mechanismus wurde bereits, wie zuvor in Kapitel 4.1 angesprochen, in murinen Adipozyten nachgewiesen (Sekiya *et al.*, 2007). In den Untersuchungen von Sekiya *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des *liver X receptor* (LXR), einem bekannten transkriptionellen Aktivator der SREBP-1c-Expression (Repa *et al.*, 2000; Yoshikawa *et al.*, 2001), keinen Einfluss auf die Expression klassischer SREBP-1c-Zielgene, wie beispielsweise FAS und ACC, hatte, obwohl eine Zunahme des aktiven SREBP-1c in den Adipozyten nachgewiesen wurde (Sekiya *et al.*, 2007). Demzufolge erscheint eine zellspezifische Regulation der SREBP-1-Zielgene auch in der Schilddrüse als wahrscheinlich.

Die Reporteranalyse in Abbildung 22 konnte auch hier erstmals eine Induzierbarkeit des TPO-Gens nach Stimulation mit dem nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 aufzeigen, auch wenn diese zunächst relativ schwach ausgeprägt war. Darüber hinaus ergab die Deletionsanalyse, dass das annotierte SRE an Position -1170/-1161 (*core similarity* = 0,9; *matrix similarity* = 1,0) bei der transkriptionellen Regulation des TPO-Gens nicht involviert zu sein scheint, da trotz dessen Entfernung vergleichbar hohe Luziferaseaktivitäten gegenüber dem Ausgangskonstrukt festgestellt werden konnten (Abb. 22). Vielmehr führte die Deletion des Bereiches stromaufwärts des Transkriptionsstarts (nt -719/-1) zu einer Zunahme der gemessenen Luziferaseaktivität nach Stimulation mit dem nSREBP-1c/-2, was auf repressorisch wirksame Elemente in diesem Bereich schließen lässt (Abb. 22). Erst die folgende Deletion bis zum Nukleotid +676 relativ zum Transkriptionsstart führte zum vollständigen Verlust der SREBP-induzierten Transaktivierung des TPO-Gens, was auf eine wichtige Funktion dieser Region (nt +598/+675) hindeutet. Die computergestützte bioinformatische Analyse mit MatInspector ergab innerhalb dieses Bereiches kein *cis*-Element der SREBPs. Dennoch konnten durch die nachfolgenden *in vitro*-Bindungsstudien insgesamt vier putative Bindungselemente identifiziert werden, die spezifisch mit dem SREBP-1c/-2 interagierten (Abb. 24, Abb. 25 und Abb. 26) und demnach das Potenzial zur Transaktivierung des TPO-Gens besitzen. Basierend auf einer Sequenzanalyse der SREBP-responsiven Elemente und dem Vergleich mit bereits bekannten SRE-Elementen konnten drei der vier identifizierten Bindungselemente (SRE+609, InvSRE+614 und SRE+640) dem klassischen SRE-1 bzw. dem davon abgeleiteten SRE-3 zugeordnet werden (Kap. 3.4.2.4.2 und Abb. 28), die charakteristisch für cholesterogene Gene sind (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002). Dagegen konnten beim vierten Bindungselement, dem InvSRE-like+654, mittels vergleichender Sequenzanalyse sowohl Merkmale eines SREs als auch einer E-Box festgestellt werden (Abb. 27). Diese *cis*-Elemente, in denen das SRE und die E-Box kombiniert vorliegen, werden als SRE-2 bzw. SRE-like bezeichnet und sind häufig in den Promotorregionen von lipogenen

Genen zu finden (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002; Nara *et al.*, 2002). Betrachtet man die im TPO-Gen identifizierten SRE (-like)-Motive, so lässt sich eine starke Variabilität ihrer Erkennungssequenzen feststellen. Damit wird das Problem, eine allgemeingültige Konsensussequenz zu definieren, nochmals verdeutlicht.

Die im Intron des TPO-Gens nachgewiesenen spezifischen Komplexformationen zwischen dem nSREBP-1c/-2 und den SRE (-like)-Elementen geben dennoch keine Auskunft darüber, ob jede dieser Interaktionen auch zu einer Transaktivierung des TPO-Gens beitragen. So wurden bei einigen SREBP-responsiven Genen mehrere spezifische Bindungen detektiert, von denen jedoch in Reporterstudien nicht alle als funktionell bzw. bedeutsam verifiziert werden konnten (Ericsson *et al.*, 1997; Guan *et al.*, 1997; Tabor *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2001). Dieses Phänomen bestätigte sich auch bei den Reporterstudien dieser Arbeit, da weder das SRE+640 noch das InvSRE-like+654, trotz nachgewiesener spezifischer Interaktion mit dem nSREBP-1c/-2, transaktivierbar war (Abb. 30). Dagegen konnte die zweifache Wiederholung des überlappenden SRE+609/InvSRE+614 durch das nSREBP-1c/-2 stimuliert werden (Abb. 30). Die Funktionalität des SRE+609/InvSRE+614 konnte durch die Fünf-Basensubstitution, wie bereits in den *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt, verdeutlicht werden, da diese zu einem Verlust der Transaktivierbarkeit führte (Abb. 30). Das für die Transaktivierung verantwortliche Kernmotiv 5'-CTGAG-3' und dessen inverse Form 5'-CTCAG-3' ist zu jeweils 50% Bestandteil des SRE+609 bzw. InvSRE+614 (Abb. 28), daher ist eine Differenzierung zwischen beiden Bindungselementen allein aufgrund der Fünf-Basensubstitution nicht möglich. Berücksichtigt man den Konservierungsgrad der zugrundeliegenden Nukleotidsequenzen beider Bindungselemente zwischen Ratte und Maus, so weist das SRE+609 gegenüber dem InvSRE+614 eine Homologie von 100% zu 70% auf (Abb. 29). Demzufolge scheint, basierend auf dem Speziesvergleich, eher das SRE+609 als das InvSRE+614 bei der transkriptionellen Regulation des TPO-Gens von Bedeutung zu sein. Zusätzliche Untersuchungen sind erforderlich, um die Beteiligung des SRE+609 bzw. des InvSRE+614 detaillierter charakterisieren zu können, wobei eine systematische Ein-Basensubstitution des Bereiches von nt +609 bis +623 durchgeführt werden könnte. Obwohl nur das überlappende SRE+609/InvSRE+614 eine Transaktivierung vermittelte, kann eine Interaktion zwischen den drei identifizierten SREBP-responsiven Elementen (SRE+609/InvSRE+614, SRE+640, InvSRE-like+654) nicht vollkommen ausgeschlossen werden, was in Anbetracht der Vielzahl an Studien, in denen eine mehr oder minder relevante Interaktion zwischen mehreren SREs nachgewiesen wurde, wahrscheinlich ist (Ericsson *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2001; Zerenturk *et al.*, 2012). Dass die isolierten Bindungselemente SRE+640 und InvSRE-like+654, wie es in den hier dargestellten Reporterstudien der Fall ist, nicht transaktivierbar sind, jedoch möglicherweise für das volle Transaktivierungspotenzial der TPO benötigt werden, konnte in ähnlicher Weise von Zerenturk

et al. anhand der 3 β -Hydroxysterol Δ^{24} -Reduktase (DHCR24) demonstriert werden. In dieser Studie wurden, ähnlich zu den Reportergenkonstrukten dieser Arbeit, zwei kritische SRE-Elemente isoliert voneinander und jeweils in dreifacher Wiederholung in ein Reportergen kloniert und unter Steroleinfluss auf Transaktivierbarkeit getestet. Trotz dreifacher Wiederholung des jeweiligen SREs konnte das Luziferasekonstrukt kaum stimuliert werden, wohingegen das Promotorkonstrukt der DHCR24 mit beiden SRE-Elementen deutlich induziert wurde (Zerenturk *et al.*, 2012). Damit wäre die eingangs formulierte Vermutung einer potenziellen Interaktion der identifizierten SRE (-like)-Elemente im Falle des TPO-Gens überaus denkbar. Um die Frage nach der tatsächlichen Relevanz aller identifizierten SRE (-like)-Elemente bei der transkriptionellen Regulation der TPO beantworten zu können, könnten in weiterführenden Experimenten die einzelnen Bindungselemente systematisch mutiert werden. Insgesamt betrachtet deutet der Speziesvergleich auf eine Relevanz des Bereiches unmittelbar stromaufwärts vom ATG hin, da dieser einen relativ hohen Konservierungsgrad aufzeigt (Abb. 29) und folglich auf gemeinsame Transkriptionsmechanismen zwischen Ratte und Maus schließen lässt (Alotaibi *et al.*, 2010; Nitsch *et al.*, 2010; Nazar *et al.*, 2012). Unterstützt wird diese Vermutung durch die nachgewiesene spezifische *in vivo*-Bindung des SREBP-1/-2 innerhalb des untersuchten Bereiches, wenngleich keine Aussage zum jeweiligen gebundenen SRE (-like)-Element gegeben werden kann (Abb. 31). Aufgrund der räumlichen Nähe der identifizierten SREBP-responsiven Elemente zueinander, ist es mit der CHIP nicht möglich gewesen zwischen diesen zu differenzieren.

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse kann angenommen werden, dass die TPO zu den Zielgenen der SREBPs gehört. Vor allem die Reportergenuntersuchungen konnten eindeutig zeigen, dass das TPO-Gen über einen SREBP-responsiven Bereich transaktiviert wird, dem zwei überlappende putative Bindungselemente zugrundeliegen. Das für die Transaktivierung verantwortliche kritische Bindungselement konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig identifiziert werden, dennoch bestätigen die *knockdown*-Experimente und die *in vivo*-Bindungsstudien in den thyroidalen FRTL-5-Zellen, dass die SREBPs bei der transkriptionellen Regulation des TPO-Gens in der Schilddrüse involviert sind.

4.3 Schlussfolgerung

Erstmals konnten im Rahmen dieser Arbeit das SREBP-1c und SREBP-2 als transkriptionelle Regulatoren des NIS und der TPO, zwei essenzielle Proteine der Schilddrüsenhormonsynthese, identifiziert werden. Das Vorhandensein von funktionellen SREBP-responsiven Elementen in den regulatorischen Regionen des NIS- und TPO-Gens kann nunmehr mit den Beobachtungen aus den *in vivo*-Studien, in denen eine Hypothyreose nach Verabreichung einer cholesterolreichen Diät diagnostiziert wurde, in direktem Zusammenhang gesehen werden. Dieser neuartige transkriptionelle Regulationsweg, bei dem die sterolsensitiven SREBPs Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese nehmen können, kann für die Therapie von Schilddrüsendysfunktionen nutzbar gemacht werden.

5. Zusammenfassung

Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS), der den aktiven Transport von Iodid in die Thyreozyten vermittelt, und die Thyreoperoxidase (TPO), die die Oxidierung des Iodids zu Iod und dessen Organifizierung katalysiert, stellen essenzielle Proteine der Schilddrüsenhormonsynthese dar. Störungen innerhalb des Transportsystems oder des Organifizierungsprozesses führen zu einer beeinträchtigten Synthese der Schilddrüsenhormone, aus der das klinische Bild der Hypothyreose hervorgeht. Transkriptionell reguliert werden die Gene des NIS und der TPO primär über das Thyreotropin (TSH, Thyreoidea stimulierendes Hormon) durch Aktivierung der TSH/TSHR/cAMP-Kaskade, jedoch mehren sich die Hinweise, dass die Gene des NIS und der TPO auch einer TSH-unabhängigen Regulation unterliegen. Aktuelle Untersuchungen konnten erstmals einen Einfluss auf den NIS und die TPO durch die *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) aufzeigen, die als transkriptionelle Regulatoren der Lipidsynthese und -aufnahme bekannt sind. In den *in vitro*-Untersuchungen an thyroidalen FRTL-5-Zellen sowie an primären porcinen Thyreozyten konnte nach Inkubation mit Sterolen eine Abnahme der transkriptionell aktiven Isoformen SREBP-1c und SREBP-2 nachgewiesen werden, die mit einer verminderten Expression des NIS und der TPO assoziiert war. Das Ziel dieser Arbeit war, die SREBP-abhängige Regulation des NIS- und TPO-Gens zu charakterisieren. Dabei sollte zum einen herausgefunden werden, ob der NIS und die TPO SREBP-Isoform-spezifisch reguliert werden, und zum anderen die Existenz funktioneller SREBP-responsiver Elemente in den regulatorischen Regionen beider Gene nachgewiesen werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die SREBP-abhängige transkriptionelle Regulation des NIS-Gens untersucht. So zeigten RNA-Interferenz-Experimente in thyroidalen FRTL-5-Zellen, dass beide SREBP-Isoformen an der transkriptionellen Regulation des NIS beteiligt sind, da durch sequenzspezifischen *knockdown* von SREBP-1 und SREBP-2 die Expression des NIS supprimiert wurde. Zudem bestätigten die in HepG2-Zellen durchgeführten Reportergergenstudien die direkte SREBP-abhängige Regulation des NIS. Sowohl durch Überexpression des aktiven SREBP-1c als auch durch Überexpression des aktiven SREBP-2 konnte das generierte NIS-Reportergergen transaktiviert werden. In den folgenden Deletions- und Mutationsanalysen konnte im NIS-Gen ein kritisches SREBP-responsives Bindungselement in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR, Position +59 relativ zum Transkriptionsstart) lokalisiert werden, dessen transkriptionelle Aktivität nicht nur in den nicht-thyroidalen HepG2-Zellen, sondern ebenso in den thyroidalen FRTL-5-Zellen bestätigt werden konnte. Die funktionelle Bedeutung des SRE+59 konnte zusätzlich durch den Nachweis einer *in vitro*- und *in vivo*-Bindung von SREBP-1c/-2 erhärtet werden. Ferner erbrachte der Sequenzvergleich zwischen Ratte und Maus eine

hohe Homologie der 5'-UTR des NIS-Gens, einschließlich des SRE+59, was demnach auf eine wichtige regulierende Funktion dieser Region hindeutet. In Ergänzung zur beschriebenen transkriptionellen Regulation des NIS -Gens durch die SREBPs konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Sterole Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese nehmen können, da nach sterol-induzierter Inhibierung der aktiven SREBPs in den thyroidalen FRTL-5-Zellen die NIS-spezifische Iodidaufnahme moderat vermindert werden konnte.

Basierend auf den neuen Erkenntnissen zur SREBP-abhängigen Regulation des NIS-Gens, befasste sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Identifizierung der TPO als weiteres neues Zielgen dieser Transkriptionsfaktorfamilie. Nach sequenzspezifischen *knockdown* von SREBP-1 und SREBP-2 konnte die Expression der TPO durch beide SREBP-Isoformen erfolgreich supprimiert werden. Vermittelt wird die Suppression durch eine 80 bp umfassende SREBP-responsive Region im ersten Intron des TPO-Gens, die durch sukzessive Verkürzung der 5'-flankierenden Region im Rahmen der Reportergenanalyse in den nicht-thyroidalen HepG2-Zellen identifiziert werden konnte. Darüber hinaus konnte die Bindung der SREBPs innerhalb dieses Bereiches sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Durch weiterführende Mutationsanalysen im Rahmen des *electrophoretic mobility shift assays* konnten zwei isolierte sowie zwei überlappende SREBP-responsive Elemente lokalisiert werden, von denen sich jedoch nur das überlappende SRE+609/InvSRE+614 als transaktivierbar erwies.

Zusammenfassend ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen, die Gene des NIS und der TPO als direkte Zielgene der sterolsensitiven SREBPs zu identifizieren. Somit leistet die Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle der SREBPs bei der Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese. Basierend auf den hier erarbeiteten neuen Erkenntnissen stellen SREBPs potenzielle Zielstrukturen für zukünftige therapeutische Interventionen bei Schilddrüsendysfunktionen, wie etwa eine Hypothyreose, dar.

6. Summary

The sodium iodide symporter (NIS) which mediates the active transport of iodide into the thyrocytes, and the thyroperoxidase (TPO) which catalyses the oxidation of iodide to iodine and its organification, represent essential proteins of thyroid hormone synthesis. Dysfunctions within the transport system or the process of organification lead to an impairment of the synthesis of these hormones resulting in hypothyreodism. The genes encoding NIS and TPO are transcriptionally regulated primarily by thyrotropin (TSH, Thyroid-stimulating hormone) via activation of the TSH/TSHR/cAMP cascade. There is increasing evidence that these genes are also regulated by TSH-independent mechanisms. Recent studies could demonstrate an influence of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) on NIS and TPO. SREPBs are known as regulators of lipid synthesis and uptake. *In vitro* studies using FRTL-5 cells and primary porcine thyrocytes could show that the expression of the transcriptionally active isoforms of SREBP-1c and -2 decreased after incubation with sterols which was associated with declined expression of NIS and TPO.

In light of this fact, the overall aim of the present thesis was to characterise the SREBP-dependent regulation of the NIS and the TPO gene: One sub-aim was to explore, whether the NIS and TPO are regulated in a SREBP isoform-specific manner, and a further sub-aim was to identify one or more functional SREBP-responsive elements within the regulatory regions of both genes.

In the first part of this thesis, the SREBP-dependent transcriptional regulation of the NIS-Gen was investigated. RNA interference experiments in thyroidal FRTL-5 cells revealed an involvement of both SREBP isoforms in the transcriptional regulation of the NIS gene, based on the observation that sequence-specific knockdown of both SREBP-1 and -2 led to suppression of NIS. Furthermore, reporter gene studies in HepG2 cells confirmed direct regulation of the NIS gene by SREBPs. Overexpression of SREBP-1c and SREBP-2 caused a strong transactivation of the generated NIS reporter gene. Following deletion and mutation analysis, one critical SREBP-responsive binding element in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the NIS gene (position +59 relative to the transcription start site) was identified, which was proved to be functional in non-thyroidal HepG2 cells as well as in thyroidal FRTL-5 cells. Its functional relevance could be substantiated by demonstrating *in vitro*- and *in vivo*-binding of SREBP-1c- and -2. Moreover, sequence alignment of NIS 5'-UTR, including the SRE+59, between rat and mouse showed a high sequence homology being indicative for an important regulatory function. Besides providing evidence for the transcriptional regulation of the NIS gene by SREBPs, it was found that sterols influence thyroid hormone synthesis as evidenced by the observation that sterol-

induced SREBP inhibition resulted in a moderate decrease of NIS-specific iodide uptake in FRTL-5 cells.

Based on this finding that SREBPs are transcriptional regulators of the NIS gene, the second part of this thesis dealt with the identification of the TPO gene as a new target of this transcription factor family. Sequence specific knockdown of both SREBP-1 and SREBP-2 also led to effective suppression of TPO expression. This suppression was found to be mediated by a 80 bp SREBP-responsive region within the first intron of the TPO gene which was identified by successive truncation of the 5'-flanking region in reporter gene studies performed in HepG2 cells. The binding of the SREBPs could be validated *in vitro* and *in vivo*. Additional mutation analysis using electrophoretic mobility shift assay facilitated the localisation of two isolated and two overlapping SREBP-responsive elements in which only the overlapping element SRE+609/InvSRE+614 could be transactivated.

In conclusion, in the present thesis, NIS and TPO were identified as direct target genes of the sterol-sensitive SREBPs. Consequently, the present study contributes to a better understanding of the role of SREBPs for the regulation of thyroid hormone synthesis. Based on this novel regulatory pathway, SREBPs potentially represent targets for therapeutic interventions of thyroid dysfunctions such as hypothyroidism in future.

7. Literaturverzeichnis

- Adams C.M., Reitz J., De Brabander J.K., Feramisco J.D., Li L., Brown M.S., Goldstein J.L. (2004) Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem.* 279: 52772-52780.
- Ahad F., Ganie S.A. (2010) Iodine, Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited. *Indian J Endocrinol Metab.* 14: 13-17.
- Allgeier A., Offermanns S., Van Sande J., Spicher K., Schultz G., Dumont J. (1994) The human thyrotropin receptor activates G- proteins GS and Gq/11. *J. Biol. Chem.* 19: 13733-13735.
- Aloj S.M., Grieco D., Kohn A.D., Nikodem V.M., Kohn L.D. (1990) Thyrotropin regulation of malic enzyme in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol Endocrinol.* 4: 611-622.
- Alotaibi H., Yaman E., Salvatore D., Di Dato V., Telkoparan P., Di Lauro R., Tazebay U.H. (2010) Intronic elements in the Na⁺/I⁻ symporter gene (NIS) interact with retinoic acid receptors and mediate initiation of transcription. *Nucleic Acids Res.* 38: 3172-3185.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-410.
- Amemiya-Kudo M., Shimano H., Yoshikawa T., Yahagi N., Hasty A.H., Okazaki H., Tamura Y., Shionoiri F., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Sato R., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N. (2000) Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J Biol Chem.* 275: 31078-31085.
- Amemiya-Kudo M., Shimano H., Hasty A.H., Yahagi N., Yoshikawa T., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Sato R., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N. (2002) Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterogenic genes. *J Lipid Res.* 43: 1220-1235.
- Aza-Blanc P., Di Lauro R., Santisteban P. (1993) Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. *Mol Endocrinol.* 7: 1297-1306.
- Baniahmad A., Tsai S.Y., O'Malley B.W., Tsai M.J. (1992) Kindred S thyroid hormone receptor is an active and constitutive silencer and a repressor for thyroid hormone and retinoic acid responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 10633-10637.
- Baniahmad A., Leng X., Burris T.P., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1995) The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Mol Cell Biol.* 15: 76-86.
- Behr M., Schmitt T.L., Espinoza C.R., Loos U. (1998) Cloning of a functional promoter of the human sodium/iodide-symporter gene. *Biochem J.* 331: 359-363.

- Bengoechea-Alonso M.T., Ericsson J. (2007) SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* 19: 215-222.
- Bennati A.M., Castelli M., Della Fazia M.A., Beccari T., Caruso D., Servillo G., Roberti R. (2006) Sterol dependent regulation of human TM7SF2 gene expression: role of the encoded 3 β -hydroxysterol Δ^{14} -reductase in human cholesterol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 677-685.
- Bennett M.K., Lopez J.M., Sanchez H.B., Osborne T.F. (1995) Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *J Biol Chem.* 270: 25578-25583.
- Bifulco M., Santillo M., Tedesco I., Zarrilli R., Laezza C., Aloj S.M. (1990) Thyrotropin modulates low density lipoprotein binding activity in FRTL-5 thyroid cells. *J. Biol. Chem.* 265: 19336-19342.
- Bizhanova A., Kopp P. (2007) Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology.* 150: 1084-1090.
- Boelaert K., Franklyn J.A. (2005) Thyroid hormone in health and disease. *J Endocrinol.* 187: 1-15.
- Brent G.A. (2012) Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 122: 3035-3043.
- Briggs M.R., Yokoyama C., Wang X., Brown M.S., Goldstein J.L. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem.* 268: 14490-14496.
- Brown A.J., Sun L., Feramisco J.D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2002) Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell.* 10: 237-245.
- Brown M.S., Goldstein J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 89: 331-340.
- Brown M.S., Goldstein J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 11041-11048.
- Carrasco N. (1993) Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta.* 1154: 65-82.
- Cartharius K., Frech K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A., Frisch M., Bayerlein M., Werner T. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 21: 2933-2942.

- Chabaud O., Chambard M., Gaudry N., Mauchamp J. (1988) Thyrotrophin and cyclic AMP regulation of thyroglobulin gene expression in cultured porcine thyroid cells. *J Endocrinol.* 116: 25-33.
- Chen J.D., Evans R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 377: 454-457.
- Chen X.L, Dodd G., Thomas S., Zhang X., Wasserman M.A., Rovin B.H., Kunsch C. (2006) Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290: 1862-1870.
- Chiamolera M.I., Wondisford F.E. (2009) Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology.* 150: 1091-1096.
- Cho Y., Ramer J., Rivaller P., Quink C., Garber R.L., Beier D.R., Wang F. (2001) An Epstein-Barr-related herpesvirus from marmoset lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 1224-1229.
- Choi W.I., Jeon B.N., Park H., Yoo J.Y., Kim Y.S., Koh D.I., Kim M.H., Kim Y.R., Lee C.E., Kim K.S., Osborne T.F., Hur M.W. (2008) Proto-oncogene FBI-1 (Pokemon) and SREBP-1 synergistically activate transcription of fatty-acid synthase gene (FASN). *J Biol Chem.* 283: 29341-29354.
- Christophe D. (2004) The control of thyroid-specific gene expression: what exactly have we learned as yet? *Mol Cell Endocrinol.* 223: 1-4.
- Chun J.T., Di Lauro R. (2001) Characterization of the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 109: 23-26.
- Corvilain B., Laurent E., Lecomte M., Vansande J., Dumont J.E. (1994) Role of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the phosphatidylinositol-Ca²⁺ cascades in mediating the effects of thyrotropin and iodide on hormone synthesis and secretion in human thyroid slices. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 152-159.
- Coval M.L., Taurog A. (1967) Purification and iodinating activity of hog thyroid peroxidase. *J Biol Chem.* 242: 5510-5523.
- Dai G., Levy O., Carrasco N. (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379: 458-460.
- Daimiel L.A., Fernández-Suárez M.E., Rodríguez-Acebes S., Crespo L., Lasunción M.A., Gómez-Coronado D., Martínez-Botas J. (2012) Promoter analysis of the DHCR24 (3 β -hydroxysterol Δ (24)-reductase) gene: characterization of SREBP (sterol-regulatory-element-binding protein)-mediated activation. *Biosci Rep.* 33: 57-69.
- Damante G., Tell G., Di Lauro R. (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 66: 307-356.

- DeBose-Boyd R.A. (2008) Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* 18: 609-621.
- De Deken X., Wang D., Many M.C., Costagliola S., Libert F., Vassart G., Dumont J.E., Miot F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* 275: 23227-23233.
- De Deken X., Wang D., Dumont J.E., Miot F. (2002) Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res.* 273: 187-196.
- De Groef B., Decallonne B.R., Van der Geyten S., Darras V.M., Bouillon R. (2006) Perchlorate versus other environmental sodium/iodide symporter inhibitors: potential thyroid-related health effects. *Eur J Endocrinol.* 155: 17-25.
- Delange F. (1994) The disorders induced by iodine deficiency. *Thyroid.* 4: 107-128.
- De La Vieja A., Dohan O., Levy O., Carrasco N. (2000) Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* 80: 1083-1105.
- Dème D., Fimiani E., Pommier J., Nunez J. (1975) Free diiodotyrosine effects on protein iodination and thyroid hormone synthesis catalyzed by thyroid peroxidase. *Eur J Biochem.* 51: 329-336.
- Dème D., Pommier J., Nunez J. (1976) Kinetics of thyroglobulin iodination and of hormone synthesis catalysed by thyroid peroxidase. Role of iodide in the coupling reaction. *Eur J Biochem.* 70: 435-440.
- Dey B., Thukral S., Krishnan S., Chakrobarty M., Gupta S., Manghani C., Rani V. (2012) DNA-protein interactions: methods for detection and analysis. *Mol Cell Biochem.* 365: 279-299.
- Dohán O., Carrasco N. (2003) Advances in Na⁺/I⁻ symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol.* 213: 59-70.
- Dooley K.A., Millinder S., Osborne T.F. (1998) Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y. *J Biol Chem.* 273: 1349-1356.
- Dubuc G., Chamberland A., Wassef H., Davignon J., Seidah N.G., Bernier L., Prat A. (2004) Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 1454-1459.
- Duncan E.A., Brown M.S., Goldstein J.L., Sakai J. (1997) Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem.* 272: 12778-12785.

- Duncan E.A., Davé U.P., Sakai J., Goldstein J.L., Brown M.S. (1998) Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem.* 273: 17801-17809.
- Dunn J.T., Dunn A.D. (2001) Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid.* 11: 407-414.
- Ecker J., Liebisch G., Englmaier M., Grandl M., Robenek H., Schmitz G. (2010) Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 7817-7822.
- Edwards H.H., Morrison M. (1976) Localization of thyroid peroxidase and the site of iodination in rat thyroid gland. *Biochem J.* 158: 477-479.
- Edwards P.A., Tabor D., Kast H.R., Venkateswaran A. (2000) Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta.* 1529: 103-113.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494-498.
- Endo T., Kaneshige M., Nakazato M., Ohmori M., Harii N., Onaya T. (1997) Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na⁺/I symporter gene. *Mol Endocrinol.* 11: 1747-1755.
- Ericsson J., Jackson S.M., Edwards P.A. (1996) Synergistic binding of sterol regulatory element-binding protein and NF-Y to the farnesyl diphosphate synthase promoter is critical for sterol-regulated expression of the gene. *J Biol Chem.* 271: 24359-24364.
- Ericsson J., Jackson S.M., Kim J.B., Spiegelman B.M., Edwards P.A. (1997) Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem.* 272: 7298-7305.
- Eskandari S., Loo D.D., Dai G., Levy O., Wright E.M., Carrasco N. (1997) Thyroid Na⁺/I symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem.* 272: 27230-27238.
- Espenshade P.J., Li W.P., Yabe D. (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 11694-11699.
- Esposito C., Miccadei S., Saiardi A., Civitareale D. (1998) PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene. *Biochem J.* 331: 37-40.
- Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240: 889-895.
- Ferré-D'Amaré A.R., Prendergast G.C., Ziff E.B., Burley S.K. (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature.* 363: 38-45.

- Field J.B., Ealey P.A., Marshall N.J., Cockcroft S. (1987) Thyroid-stimulating hormone stimulates increases in inositol phosphates as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line. *Biochem J.* 247: 519-524.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811.
- Francis-Lang H., Price M., Polycarpou-Schwarz M., Di Lauro R.. (1992) Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol.* 12: 576-588.
- Gérard C.M., Lefort A., Christophe D., Libert F., Van Sande J., Dumont J.E., Vassart G. (1989) Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol.* 3: 2110-2118.
- Gévry N., Schoonjans K., Guay F., Murphy B.D. (2008) Cholesterol supply and SREBPs modulate transcription of the Niemann-Pick C-1 gene in steroidogenic tissues. *J Lipid Res.* 49: 1024-1033.
- Gibot L., Follet J., Metges J.P., Auvray P., Simon B., Corcos L., Le Jossic-Corcos C. (2009) Human caspase 7 is positively controlled by SREBP-1 and SREBP-2. *Biochem J.* 420: 473-483.
- Gillam M.P., Sidhaye A.R., Lee E.J., Rutishauser J., Stephan C.W., Kopp P. (2004) Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem.* 279: 13004-13010.
- Grieco D., Beg Z.H., Romano A., Bifulco M., Aloj S.M. (1990) Cell cycle progression and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase are regulated by thyrotropin in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Biol Chem.* 265: 19343-19350.
- Guan G., Dai P.H., Osborne T.F., Kim J.B., Shechter I. (1997) Multiple sequence elements are involved in the transcriptional regulation of the human squalene synthase gene. *J Biol Chem.* 272: 10295-10302.
- Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109: 1125-1131.
- Hörlein A.J., Näär A.M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Söderström M., Glass C.K. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature.* 377: 397-404.
- Hua X., Yokoyama C., Wu J., Briggs M.R., Brown M.S., Goldstein J.L., Wang X. (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 11603-11607.

- Hua X., Wu J., Goldstein J.L., Brown M.S., Hobbs H.H. (1995a) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*. 25: 667-673.
- Hua X., Sakai J., Ho Y.K., Goldstein J.L., Brown M.S. (1995b) Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem*. 270: 29422-29427.
- Hua X., Nohturfft A., Goldstein J.L., Brown M.S. (1996) Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*. 87: 415-426.
- Ikeda Y., Yamamoto J., Okamura M., Fujino T., Takahashi S., Takeuchi K., Osborne T.F., Yamamoto T.T., Ito S., Sakai J. (2001) Transcriptional regulation of the murine acetyl-CoA synthetase 1 gene through multiple clustered binding sites for sterol regulatory element-binding proteins and a single neighboring site for Sp1. *J Biol Chem*. 276: 34259-34269.
- Inoue J., Sato R., Maeda M. (1998) Multiple DNA elements for sterol regulatory element-binding protein and NF-Y are responsible for sterol-regulated transcription of the genes for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and squalene synthase. *J Biochem*. 123: 1191-1198.
- Inoue N., Shimano H., Nakakuki M., Matsuzaka T., Nakagawa Y., Yamamoto T., Sato R., Takahashi A., Sone H., Yahagi N., Suzuki H., Toyoshima H., Yamada N. (2005) Lipid synthetic transcription factor SREBP-1a activates p21^{WAF1/CIP1}, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cell Biol*. 25: 8938-8947.
- Inoue S., Yoshinari K., Sugawara M., Yamazoe Y. (2011) Activated sterol regulatory element-binding protein-2 suppresses hepatocyte nuclear factor-4-mediated Cyp3a11 expression in mouse liver. *Mol Pharmacol*. 79: 148-156.
- Ishimoto K., Nakamura H., Tachibana K., Yamasaki D., Ota A., Hirano K., Tanaka T., Hamakubo T., Sakai J., Kodama T., Doi T. (2009) Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells. *J Biol Chem*. 284: 22195-22205.
- Ishizuka T., Lazar M.A. (2003) The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol*. 23: 5122-5131.
- Jackson S.M., Ericsson J., Mantovani R., Edwards P.A. (1998) Synergistic activation of transcription by nuclear factor Y and sterol regulatory element binding protein. *J Lipid Res*. 39: 767-776.
- Jacobsen L.B., Calvin S.A., Colvin K.E., Wright M. (2004) FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods*. 33: 104-112.
- Jatwa R., Kar A. (2006) Cardio-protective role of terazosin is possibly mediated through alteration in thyroid function. *Eur J Pharmacol*. 551: 87-91.

- Jeon B.N., Kim Y.S., Choi W.I., Koh D.I., Kim M.K., Yoon J.H., Kim M.Y., Hur B., Paik P.D., Hur M.W. (2012) Kr-pok increases FASN expression by modulating the DNA binding of SREBP-1c and Sp1 at the proximal promoter. *J Lipid Res.* 53: 755-766.
- Jhiang S.M., Cho J.Y., Ryu K.Y., DeYoung B.R., Smanik P.A., McGaughy V.R., Fischer A.H., Mazzaferri E.L. (1998) An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology.* 139: 4416-4419.
- Jiang D., Jarrett H.W., Haskins W.E. (2009) Methods for proteomic analysis of transcription factors. *J Chromatogr A.* 1216: 6881-6889.
- Kaminsky S.M., Levy O., Salvador C., Dai G., Carrasco N. (1994) Na⁺-I⁻ symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻-transporting cultured thyroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 3789-3793.
- Kamisuki S., Mao Q., Abu-Elheiga L., Gu Z., Kugimiya A., Kwon Y., Shinohara T., Kawazoe Y., Sato S., Asakura K., Choo H.Y., Sakai J., Wakil S.J., Uesugi M. (2009) A small molecule that blocks fat synthesis by inhibiting the activation of SREBP. *Chem Biol.* 16: 882-892.
- Kero J., Ahmed K., Wettschureck N., Tunaru S., Wintermantel T., Greiner E., Schütz G., Offermanns S. (2007) Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest.* 117: 2399-2407.
- Kidani Y., Elsaesser H., Hock M.B., Vergnes L., Williams K.J., Argus J.P., Marbois B.N., Komisopoulou E., Wilson E.B., Osborne T.F., Graeber T.G., Reue K., Brooks D.G., Bensinger S.J. (2013) Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 14: 489-499.
- Kikkawa F., Gonzalez F.J., Kimura S. (1990) Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Mol Cell Biol.* 10: 6216-6224.
- Kim J.B., Spotts G.D., Halvorsen Y.D., Shih H.M., Ellenberger T., Towle H.C., Spiegelman B.M. (1995) Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol.* 15: 2582-2588.
- Kim K.S., Jung H.S., Chung Y.J., Jung T.S., Jang H.W., Lee M.S., Kim K.W., Chung J.H. (2008) Overexpression of USF increases TGF-beta1 protein levels, but G1 phase arrest was not induced in FRTL-5 cells. *J Korean Med Sci.* 23: 870-876.
- Kim W.B., Lewis C.J., McCall K.D., Malgor R., Kohn A.D., Moon R.T., Kohn L.D. (2007) Overexpression of Wnt-1 in thyrocytes enhances cellular growth but suppresses transcription of the thyroperoxidase gene via different signaling mechanisms. *J Endocrinol.* 193: 93-106.

- Kimura T., Van Keymeulen A., Golstein J., Fusco A., Dumont J.E., Roger P.P. (2001) Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev.* 22: 631-656.
- Kogai T., Endo T., Saito T., Miyazaki A., Kawaguchi A., Onaya T. (1997) Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology.* 138: 2227-2232.
- Kogai T., Hershman J.M., Motomura K., Endo T., Onaya T., Brent G.A. (2001) Differential regulation of the human sodium/iodide symporter gene promoter in papillary thyroid carcinoma cell lines and normal thyroid cells. *Endocrinology.* 142: 3369-3379.
- Kogai T., Brent G.A. (2012) The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 135: 355-370.
- Kumadaki S., Matsuzaka T., Kato T., Yahagi N., Yamamoto T., Okada S., Kobayashi K., Takahashi A., Yatoh S., Suzuki H., Yamada N., Shimano H. (2008) Mouse Elovl-6 promoter is an SREBP target. *Biochem Biophys Res Commun.* 368: 261-266.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lamas L., Dorris M.L., Taurog A. (1972) Evidence for a catalytic role for thyroid peroxidase in the conversion of diiodotyrosine to thyroxine. *Endocrinology.* 90: 1417-1426.
- Laugwitz K.L., Allgeier A., Offermanns S., Spicher K., Van Sande J., Dumont J.E., Schultz G. (1996) The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 116-120.
- Laurent E., Mockel J., Van Sande J., Graff I., Dumont J.E. (1987) Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol.* 52: 273-278.
- Levy O., De la Vieja A., Carrasco N. (1998) The Na⁺/I⁻ symporter (NIS): recent advances. *J Bioenerg Biomembr.* 30: 195-206.
- Lin X., Ryu K.Y., Jhiang S.M. (2004) Cloning of the 5'-flanking region of mouse sodium/iodide symporter and identification of a thyroid-specific and TSH-responsive enhancer. *Thyroid.* 14: 19-27.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-ΔΔC(T)) Method. *Methods.* 25: 402-408.
- Logette E., Le Jossic-Corcus C., Masson D., Solier S., Sequeira-Legrand A., Dugail I., Lemaire-Ewing S., Desoche L., Solary E., Corcus L. (2005) Caspase-2, a novel lipid sensor under the control of sterol regulatory element binding protein 2. *Mol Cell Biol.* 25: 9621-9631.

- Luci S., Bettzieche A., Brandsch C., Eder K. (2006) Research paper effects of 13-HPODE on expression of genes involved in thyroid hormone synthesis, iodide uptake and formation of hydrogen peroxide in porcine thyrocytes. *Int J Vitam Nutr Res.* 76: 398-406.
- Magaña M.M., Osborne T.F. (1996) Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem.* 271: 32689-32694.
- Mian C., Lacroix L., Alzieu L., Nocera M., Talbot M., Bidart J.M., Schlumberger M., Caillou B. (2001) Sodium iodide symporter and pendrin expression in human thyroid tissues. *Thyroid.* 11: 825-830.
- Miserez A.R., Cao G., Probst L.C., Hobbs H.H. (1997) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Genomics.* 40: 31-40.
- Mizuno K., Gonzalez F.J., Kimura S. (1991) Thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP): cDNA cloning, functional characterization, and structural identity with thyroid transcription factor TTF-1. *Mol Cell Biol.* 11: 4927-4933.
- Moreno J.C., Bikker H., Kempers M.J., van Trotsenburg A.S., Baas F., de Vijlder J.J., Vulsma T., Ris-Stalpers C. (2002) Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med.* 347: 95-102.
- Murphy C., Ledmyr H., Ehrenborg E., Gåfväls M. (2006) Promoter analysis of the murine squalene epoxidase gene. Identification of a 205 bp homing region regulated by both SREBP'S and NF-Y. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 1213-1227.
- Nagasaki S., Miki Y., Akahira J., Suzuki T., Sasano H. (2009) Transcriptional regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 by SREBP-1. *Mol Cell Endocrinol.* 307: 163-168.
- Nara T.Y., He W.S., Tang C., Clarke S.D., Nakamura M.T. (2002) The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human Delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 296: 111-117.
- Nazar M., Nicola J.P., Vélez M.L., Pellizas C.G., Masini-Repiso A.M. (2012) Thyroid peroxidase gene expression is induced by lipopolysaccharide involving nuclear factor (NF)- κ B p65 subunit phosphorylation. *Endocrinology.* 153: 6114-6125.
- Neves C., Alves M., Medina J.L., Delgado J.L. (2008) Thyroid diseases, dyslipidemia and cardiovascular pathology. *Rev Port Cardiol.* 27: 1211-1236.
- Nicola J.P., Basquin C., Portulano C., Reyna-Neyra A., Paroder M., Carrasco N. (2009) The Na⁺/I⁻ symporter mediates active iodide uptake in the intestine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296: C654-C662.

- Nicola J.P., Nazar M., Mascanfroni I.D., Pellizas C.G., Masini-Repiso A.M. (2010) NF-kappaB p65 subunit mediates lipopolysaccharide-induced Na⁺/I⁻ symporter gene expression by involving functional interaction with the paired domain transcription factor Pax-8. *Mol Endocrinol.* 24: 1846-1862.
- Nishimura T., Inoue T., Shibata N., Sekine A., Takabe W., Noguchi N., Arai H. (2005) Inhibition of cholesterol biosynthesis by 25-hydroxycholesterol is independent of OSBP. *Genes Cells.* 10: 793-801.
- Nitsch R., Di Dato V., di Gennaro A., de Cristofaro T., Abbondante S., De Felice M., Zannini M., Di Lauro R. (2010) Comparative genomics reveals a functional thyroid-specific element in the far upstream region of the PAX8 gene. *BMC Genomics.* 11:306.
- Nohturfft A., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998) Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem.* 273: 17243-17250.
- Nohturfft A., Yabe D., Goldstein J.L., Brown M.S., Espenshade P.J. (2000) Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell.* 102: 315-323.
- Oberkofler H., Klein K., Felder T.K., Krempler F., Patsch W. (2006) Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-lalpha in the transcriptional regulation of the human uncoupling protein 2 gene in INS-1E cells. *Endocrinology.* 147: 966-976.
- Oetting A., Yen P.M. (2007) New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 21: 193-208.
- Ohmori M., Endo T., Harii N., Onaya T. (1998) A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin-induced up-regulation of Na⁺/I⁻ symporter gene expression. *Mol Endocrinol.* 12: 727-736.
- Ohno M., Zannini M., Levy O., Carrasco N., di Lauro R. (1999) The paired-domain transcription factor Pax-8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 19: 2051-2060.
- Ortiz L., Zannini M., Di Lauro R., Santisteban P. (1997) Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem.* 272: 23334-23339.
- Ortiz L., Aza-Blanc P., Zannini M., Cato A.C., Santisteban P. (1999) The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription. *J Biol Chem.* 274:15213-15221.

- Osborne T.F., Espenshade P.J. (2009) Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes Dev.* 23: 2578-2591.
- Parmar H.S., Kar A. (2007) Atherogenic diet induced diabetes mellitus: involvement of thyroid hormones. *Eur J Pharmacol.* 570: 244-248.
- Párraga A., Bellosolell L., Ferré-D'Amaré A.R., Burley S.K. (1998) Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure.* 6: 661-672.
- Perron B., Rodriguez A.M., Leblanc G., Pourcher T. (2001) Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J Endocrinol.* 170: 185-196.
- Pommier J., Deme D., Nunez J. (1973) Effect of iodide concentration on thyroxine synthesis catalysed by thyroid peroxidase. *Eur J Biochem.* 37: 406-414.
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23: 4878-4884.
- Radhakrishnan A., Sun L.P., Kwon H.J., Brown M.S., Goldstein J.L. (2004) Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell.* 15: 259-268.
- Radhakrishnan A., Ikeda Y., Kwon H.J., Brown M.S., Goldstein J.L. (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 6511-6518.
- Raspé E., Laurent E., Andry G., Dumont J.E. (1991) ATP, bradykinin, TRH and TSH activate the Ca²⁺-phosphatidylinositol cascade of human thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol.* 81: 175-183.
- Repa J.J., Liang G., Ou J., Bashmakov Y., Lobaccaro J.M., Shimomura I., Shan B., Brown M.S., Goldstein J.L., Mangelsdorf D.J. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14: 2819-2830.
- Ribeiro R.C., Apriletti J.W., West B.L., Wagner R.L., Fletterick R.J., Schaufele F., Baxter J.D. (1995) The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann N Y Acad Sci.* 758: 366-389.
- Riedel C., Levy O., Carrasco N. (2001) Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem.* 276: 21458-21463.
- Ringseis R., Rauer C., Rothe S., Gessner D.K., Schütz L.M., Luci S., Wen G., Eder K. (2013) Sterol regulatory element-binding proteins are regulators of the NIS gene in thyroid cells. *Mol Endocrinol.* 27: 781-800.

- Ris-Stalpers C., Bikker H. (2010) Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 322: 38-43.
- Rodriguez A.M., Perron B., Lacroix L., Caillou B., Leblanc G., Schlumberger M., Bidart J.M., Pourcher T. (2002) Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 3500-3503.
- Rothe S. (Dissertation 2011) Untersuchungen zur Rolle der sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) in der Regulation von Genen der Schilddrüsenhormonsynthese. http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2012/8597/pdf/RotheSusanne_2011_12_16.pdf.
- Royaux I.E., Suzuki K., Mori A., Katoh R., Everett L.A., Kohn L.D., Green E.D. (2000) Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology.* 141 :839-845.
- Rozman D., Fink M., Fimia G.M., Sassone-Corsi P., Waterman M.R. (1999) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP)/cAMP-responsive element modulator (CREM)-dependent regulation of cholesterologenic lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51) in spermatids. *Mol Endocrinol.* 13: 1951-1962.
- Saito T., Endo T., Kawaguchi A., Ikeda M., Nakazato M., Kogai T., Onaya T. (1997) Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 3331-3336.
- Sakai J., Duncan E.A., Rawson R.B., Hua X., Brown M.S., Goldstein J.L. (1996) Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell.* 85: 1037-1046.
- Sakai J., Nohturfft A., Cheng D., Ho Y.K., Brown M.S., Goldstein J.L. (1997) Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem.* 272: 20213-20221.
- Sakai J., Nohturfft A., Goldstein J.L., Brown M.S. (1998) Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J Biol Chem.* 273: 5785-5793.
- Sanchez H.B., Yieh L., Osborne T.F. (1995) Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 270: 1161-1169.
- Sato R., Yang J., Wang X., Evans M.J., Ho Y.K., Goldstein J.L., Brown M.S. (1994) Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J Biol Chem.* 269: 17267-17273.
- Schiavoni G., Bennati A.M., Castelli M., Fazia M.A., Beccari T., Servillo G., Roberti R. (2010) Activation of TM7SF2 promoter by SREBP-2 depends on a new sterol regulatory element, a GC-box, and an inverted CCAAT-box. *Biochim Biophys Acta.* 1801: 587-592.

- Schmitt T.L., Espinoza C.R., Loos U. (2001) Transcriptional regulation of the human sodium/iodide symporter gene by Pax-8 and TTF-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 109: 27-31.
- Schmitt T.L., Espinoza C.R., Loos U. (2002) Characterization of a thyroid-specific and cyclic adenosine monophosphate-responsive enhancer far upstream from the human sodium iodide symporter gene. *Thyroid*. 12: 273-279.
- Sekiya M., Yahagi N., Matsuzaka T., Takeuchi Y., Nakagawa Y., Takahashi H., Okazaki H., Iizuka Y., Ohashi K., Gotoda T., Ishibashi S., Nagai R., Yamazaki T., Kadowaki T., Yamada N., Osuga J., Shimano H. (2007) SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res*. 48: 1581-1591.
- Sharpe L.J., Brown A.J. (2013) Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem*. 288: 18707-18715.
- Shimano H., Horton J.D., Shimomura I., Hammer R.E., Brown M.S., Goldstein J.L. (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest*. 99: 846-854.
- Shimano H. (2001) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*. 40: 439-452.
- Shimomura I., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (1997) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*. 99: 838-845.
- Shupnik M.A., Ridgway E.C., Chin W.W. (1989) Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev*. 10: 459-475.
- Smith J.R., Osborne T.F., Goldstein J.L., Brown M.S. (1990) Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*. 265: 2306-2310.
- Song Y., Ruf J., Lothaire P., Dequanter D., Andry G., Willemse E., Dumont J.E., Van Sande J., De Deken X. (2010a) Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 95: 375-382.
- Song Y., Massart C., Chico-Galdo V., Jin L., De Maertelaer V., Decoster C., Dumont J.E., Van Sande J. (2010b) Species specific thyroid signal transduction: conserved physiology, divergent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol*. 319: 56-62.
- Song Y., Yao X., Ying H. (2011) Thyroid hormone action in metabolic regulation. *Protein Cell*. 2: 358-368.

- Spitzweg C., Joba W., Eisenmenger W., Heufelder A.E. (1998) Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 1746-1751.
- Spitzweg C., Dutton C.M., Castro M.R., Bergert E.R., Goellner J.R., Heufelder A.E., Morris J.C. (2001) Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. *Kidney Int.* 59: 1013-1023.
- Spitzweg C., Morris J.C. (2010) Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 322: 56-63.
- Steinmaus C., Miller M.D., Cushing L., Blount B.C., Smith A.H. (2013) Combined effects of perchlorate, thiocyanate, and iodine on thyroid function in the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-08. *Environ Res.* 123: 17-24.
- Stoeckman A.K., Towle H.C. (2002) The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem.* 277: 27029-27035.
- Strum J.M., Karnovsky M.J. (1970) Cytochemical localization of endogenous peroxidase in thyroid follicular cells. *J Cell Biol.* 44: 655-666.
- Sugawara M. (1985) Coupling of iodotyrosine catalyzed by human thyroid peroxidase in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 60: 1069-1075.
- Sun L.P., Seemann J., Goldstein J.L., Brown M.S. (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 6519-6526.
- Suzuki K., Kohn L.D. (2006) Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J Endocrinol.* 189: 247-255.
- Tabor D.E., Kim J.B., Spiegelman B.M., Edwards P.A. (1999) Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem.* 274: 20603-20610.
- Taki K., Kogai T., Kanamoto Y., Hershman J.M., Brent G.A. (2002) A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol.* 16: 2266-2282.
- Tang J.J., Li J.G., Qi W., Qiu W.W., Li P.S., Li B.L., Song B.L. (2011) Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.* 13: 44-56.

- Tarım Ö. (2011) Thyroid hormones and growth in health and disease. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 3:51-55.
- Taurog A. (1970) Thyroid peroxidase-catalyzed iodination of thyroglobulin; inhibition by excess iodide. *Arch Biochem Biophys.* 139: 212-220.
- Taurog A., Dorris M.L., Doerge D.R. (1996) Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys.* 330: 24-32.
- Tazebay U.H., Wapnir I.L., Levy O., Dohan O., Zuckier L.S., Zhao Q.H., Deng H.F., Amenta P.S., Fineberg S., Pestell R.G., Carrasco N. (2000) The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med.* 6: 871-878.
- Tonacchera M., Pinchera A., Dimida A., Ferrarini E., Agretti P., Vitti P., Santini F., Crump K., Gibbs J. (2004) Relative potencies and additivity of perchlorate, thiocyanate, nitrate, and iodide on the inhibition of radioactive iodide uptake by the human sodium iodide symporter. *Thyroid.* 14: 1012-1019.
- Tong Q., Ryu K.Y., Jhiang S.M. (1997) Promoter characterization of the rat Na⁺/I⁻ symporter gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 239: 34-41.
- Tontonoz P., Kim J.B., Graves R.A., Spiegelman B.M. (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol.* 13: 4753-4759.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76: 4350-4354.
- Tran N., Valentín-Blasini L., Blount B.C., McCuiston C.G., Fenton M.S., Gin E., Salem A., Hershman J.M. (2008) Thyroid-stimulating hormone increases active transport of perchlorate into thyroid cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294: E802-E806.
- Van Deursen D., van Leeuwen M., Akdogan D., Adams H., Jansen H., Verhoeven A.J. (2009) Activation of hepatic lipase expression by oleic acid: possible involvement of USF1. *Nutrients.* 1: 133-147.
- Van Sande J., Raspé E., Perret J., Lejeune C., Maenhaut C., Vassart G., Dumont J.E. (1990) Thyrotropin activates both the cyclic AMP and the PIP₂ cascades in CHO cells expressing the human cDNA of TSH receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 74: R1-R6.
- Van Sande J., Dequanter D., Lothaire P., Massart C., Dumont J.E., Erneux C. (2006) Thyrotropin stimulates the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate in human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 91: 1099-1107.
- Vassart G., Dumont J.E. (1992) The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev.* 13: 596-611.

- Vuchak L.A., Tsygankova O.M., Prendergast G.V., Meinkoth J.L. (2009) Protein kinase A and B-Raf mediate extracellular signal-regulated kinase activation by thyrotropin. *Mol Pharmacol.* 76: 1123-1129.
- Wagner R.L., Apriletti J.W., McGrath M.E., West B.L., Baxter J.D., Fletterick R.J. (1995) A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature.* 378: 690-697.
- Wang P.H., Ko Y.H., Chin H.J., Hsu C., Ding S.T., Chen C.Y. (2009) The effect of feed restriction on expression of hepatic lipogenic genes in broiler chickens and the function of SREBP1. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 153: 327-331.
- Wang X., Sato R., Brown M.S., Hua X., Goldstein J.L. (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.* 77: 53-62.
- Weiss S.J., Philp N.J., Grollman E.F. (1984a) Effect of thyrotropin on iodide efflux in FRTL-5 cells mediated by Ca^{2+} . *Endocrinology.* 114: 1108-1113.
- Weiss S.J., Philp N.J., Ambesi-Impiombato F.S., Grollman E.F. (1984b) Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology.* 114: 1099-1107.
- Wen G., Kühne H., Rauer C., Ringseis R., Eder K. (2011) Mouse γ -butyrobetaine dioxygenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α through a PPRE located in the proximal promoter. *Biochem Pharmacol.* 82: 175-183.
- Wen G., Ringseis R., Rauer C., Eder K. (2012) The mouse gene encoding the carnitine biosynthetic enzyme 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochim Biophys Acta.* 1819: 357-365.
- Wright E.M., Turk E. (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447: 510-518.
- Xu J., Kogai T., Brent G.A., Hershman J.M. (2002) A GC box in the human sodium iodide symporter gene promoter is essential for full activity. *Thyroid.* 12: 107-114.
- Yabe D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 12753-12758.
- Yamamoto T., Shimano H., Nakagawa Y., Ide T., Yahagi N., Matsuzaka T., Nakakuki M., Takahashi A., Suzuki H., Sone H., Toyoshima H., Sato R., Yamada N. (2004) SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem.* 279: 12027-12035.
- Yang T., Espenshade P.J., Wright M.E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 110: 489-500.

- Ye J., Davé U.P., Grishin N.V., Goldstein J.L., Brown M.S. (2000) Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 5123-5128.
- Yen P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 81: 1097-1142.
- Yokoyama C., Wang X., Briggs M.R., Admon A., Wu J., Hua X., Goldstein J.L., Brown M.S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* 75: 187-197.
- Yoshida A., Hisatome I., Taniguchi S., Sasaki N., Yamamoto Y., Miake J., Fukui H., Shimizu H., Okamura T., Okura T., Igawa O., Shigemasa C., Green E.D., Kohn L.D., Suzuki K. (2004) Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. *Endocrinology.* 145: 4301-4308.
- Yoshikawa T., Shimano H., Amemiya-Kudo M., Yahagi N., Hasty A.H., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol.* 21: 2991-3000.
- Zarrilli R., Formisano S., Di Jeso B. (1990) Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. *Mol Endocrinol.* 4: 39-45.
- Zerenturk E.J., Sharpe L.J., Brown A.J. (2012) Sterols regulate 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase (DHCR24) via dual sterol regulatory elements: cooperative induction of key enzymes in lipid synthesis by Sterol Regulatory Element Binding Proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1821: 1350-1360.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen herzlich danken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Vergabe des sehr interessanten Themas und für die damit verbundene Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich für seine anhaltende sowie stets motivierende und freundliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Uwe Wenzel danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Gaiping Wen und Herrn Dr. habil. Robert Ringseis für die umfassende Betreuung und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit bedanken. Die stete Hilfsbereitschaft, die zahlreichen praktischen Tipps und die freundschaftliche Zusammenarbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts, die mich auf diesem Weg unterstützend und motivierend begleitet haben. Nicht zuletzt durch die freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre wurde mir dieser Weg erleichtert. Auch möchte ich an dieser Stelle den Mitarbeitern des Instituts für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die angenehme Zeit während der ersten Phase meiner Promotion danken.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rupert Schmidt und den Mitarbeitern der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Bereitstellung der radiologisch-technischen Anlagen bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden; für ihren uneingeschränkten Glauben an mich, für ihre Unterstützung jeglicher Art und vor allem für ihre grenzenlose Geduld, insbesondere in den schwierigen Phasen meiner Promotion.

Zuletzt möchte ich dem Land Sachsen-Anhalt für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums während meiner Zeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung (Projektnummer ED70/10-1) während meiner Zeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen danken.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Unterschrift