

# Untersuchungen zur Bedeutung der sterol regulatory element-binding proteins in der Regulation des Natrium-Iodid-Symporters in Milchdrüsenzellen

---

**Leila Isabel Pachner**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für  
Tierernährung und Ernährungsphysiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Klaus Eder

Untersuchungen zur Bedeutung der *sterol regulatory  
element-binding proteins* in der Regulation des  
Natrium-Iodid-Symporters in Milchdrüsenzellen

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Leila Isabel Pachner**  
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Eder

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Schuler

Prüfer: Prof. Dr. R. Gerstberger

Tag der Disputation: 16.10.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>15</b>
1.1 Die <i>sterol regulatory element-binding proteins</i> (SREBPs) als Masterregulatoren des Cholesterin- und Lipidstoffwechsels .....	15
1.1.1 Isoformen .....	16
1.1.2 Aufbau der SREBPs .....	16
1.1.3 Reifung der SREBPs .....	17
1.1.4 Regulation der SREBP-Prozessierung .....	18
1.1.5 Einfluss der SREBPs auf Gene des Cholesterin- und Lipid- stoffwechsels.....	19
1.2 Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) .....	20
1.2.1 Iodmangel – ein kurzer Überblick .....	22
1.2.2 Iod in der Ernährung der Haussäugetiere.....	23
1.2.3 Der NIS in der laktierenden Milchdrüse .....	24
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	26
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.2 Chemikalien.....	30
2.1.3 Substanzen und Lösungen für die Zellkultur .....	32
2.1.4 Zelllinie .....	32
2.1.5 Versuchstiere.....	33
2.1.6 Bakterien .....	33
2.1.7 Substanzen für die Mikrobiologie.....	33
2.1.8 Antikörper .....	33
2.1.9 Enzyme .....	34
2.1.10 Protein-Größenmarker.....	34

2.1.11 <i>Small interfering</i> RNA (siRNA) .....	34
2.1.12 Vektoren .....	35
2.1.13 Oligonukleotide .....	36
2.1.14 DNA-Größenmarker .....	44
2.1.15 Lösungen, Medien und Puffer .....	44
2.1.16 Reaktionssysteme .....	47
2.2 Methoden .....	48
2.2.1 Zellkultivierung.....	48
2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zelllinie .....	49
2.2.3 Mykoplasmentest.....	50
2.2.4 Herstellung von Agar-Platten.....	50
2.2.5 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryoten Zellen.....	50
2.2.6 RNA-Isolierung aus Milchdrüsengewebe.....	51
2.2.7 Photometrische Konzentrationsmessung von Nucleinsäuren.....	51
2.2.8 cDNA-Synthese .....	51
2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	52
2.2.10 Analytische Agarose-Gelelektrophorese .....	55
2.2.11 Gewinnung genomischer DNA aus MCF-7-Zellen.....	55
2.2.12 Gewinnung der cytosolischen sowie der nuklearen Proteinfraction.....	56
2.2.13 Proteinkonzentrationsbestimmung .....	57
2.2.14 SDS-PAGE .....	58
2.2.15 Western Blot.....	60
2.2.16 Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> .....	62
2.2.17 Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> .....	62
2.2.18 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation .....	63
2.2.19 Präparation von DNA aus einer Agarosematrix .....	63
2.2.20 Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....	64
2.2.21 PCR-Aufreinigung.....	65
2.2.22 DNA-Ligation .....	65
2.2.23 DNA-Sequenzierung.....	65
2.2.24 Miniplasmidpräparation .....	66
2.2.25 Midiplasmidpräparation .....	66
2.2.26 Vorversuch zur Ermittlung einer geeigneten Kontrollgruppe .....	66

2.3	In <i>vitro</i> -Versuche .....	67
2.3.1	Inkubationsversuch mit 25-Hydroxycholesterin .....	67
2.3.2	RNA-Interferenz.....	67
2.3.3	Überexpression .....	68
2.3.4	Iodid- <i>Uptake</i> .....	69
2.3.5	Reportergen Assay.....	70
2.4	In <i>vivo</i> -Versuche.....	71
2.4.1	Behandlung von <i>Rattus norvegicus</i> mit konjugierten Linolsäuren (CLAs) .....	71
2.5	Statistische Analyse .....	75
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>76</b>
3.1	Einfluss der Sterol-induzierten SREBP-Ausreifungshemmung auf die NIS-Expression in MCF-7-Zellen.....	76
3.2	Einfluss des SREBP- <i>knockdowns</i> auf die Expression des NIS in MCF-7- Zellen.....	81
3.3	Nachweis der Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 in MCF-7-Zellen und deren Auswirkung auf das NIS-Gen .....	86
3.4	Auswirkungen der Sterol-induzierten SREBP-Hemmung auf die NIS- spezifische Iodid-Aufnahme in MCF-7-Zellen.....	91
3.5	Untersuchungen des Einflusses der SREBPs auf die transkriptionelle Regulation des humanen NIS-Gens .....	92
3.5.1	Computergestützte Analyse der 5´-flankierenden Region des humanen NIS-Gens.....	92
3.5.2	Klonierung der NIS-Reportergenvektoren .....	94
3.5.3	Reportergenanalyse der 5´-flankierenden Region des hNIS-Gens in MCF-7-Zellen.....	95
3.5.4	Sequenzanalyse.....	98
3.6	Auswirkungen der Fütterung von konjugierten Linolsäuren auf die Leistungsdaten und die Expression von SREBPs und NIS .....	100

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>102</b>
4.1	Regulation des Natrium-Iodid-Symporters in der Milchdrüse durch die SREBPs in <i>vitro</i> .....	102
4.2	Bestätigung der SREBP-abhängigen Regulation des NIS in <i>vivo</i> .....	108
4.3	Einordnung der Relevanz .....	110
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>116</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulation des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels durch <i>sterol regulatory element-binding proteins</i> (SREBPs). Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, Insig = <i>insulin-induced gene</i> , SCAP = SREBP <i>cleavage-activating protein</i> , SRE = <i>sterol regulatory element</i> (modifiziert nach Karasinska und Hayden, 2011).....	19
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Natrium-Iodid-Symporters (NIS). Der Transporter besteht aus 13 Transmembrandomänen (1-13) und 3 N-glykosylierten Sequenzen an den Positionen 225, 485 und 497 (rote Pfeile) (modifiziert nach Micali et al., 2014). .....	22
Abbildung 3: Einteilung der Länder nach dem Ausmaß der Iodversorgung aufgrund des medianen Iodgehalts im Urin ( <i>World Health Organization</i> , 2004). .....	23
Abbildung 4: MCF-7-Zellen in Kultur (ATCC) .....	49
Abbildung 5: Relative mRNA-Konzentration von SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC über 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten. * kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ).....	77
Abbildung 6: Immunologischer Nachweis von nSREBP-1 (A) und nSREBP-2 (B) im Nuklearextrakt nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von nSREBP-1, nSREBP-2 und der Ladekontrolle beta-Aktin. ....	78
Abbildung 7: Relative Proteinkonzentration von SREBP-1 und SREBP-2 nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten für nSREBP-1 und 4 unabhängigen Experimenten für nSREBP-2. * kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ). .....	78
Abbildung 8: Relative mRNA-Konzentrationen der SREBP-Zielgene GPAM, FASN, HMGCR und LDLR in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC über 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten. * kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ), # kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit DMSO ( $p < 0,05$ ).....	80

- Abbildung 9: Relative mRNA-Konzentration des NIS in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC über 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ), # kennzeichnet den signifikanten Unterschied im Vergleich zur Behandlung mit DMSO ( $p < 0,05$ ).....81
- Abbildung 10: Relative mRNA-Konzentration von SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen nach RNAi-induziertem *knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ). .....82
- Abbildung 11: Immunologischer Nachweis von nSREBP-1 (A) und nSREBP-2 (B) im Nuklearextrakt nach RNAi-induziertem *knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von nSREBP-1, n-SREBP-2 und dem Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. ....83
- Abbildung 12: Relative Proteinkonzentration von nSREBP-1 und nSREBP-2 nach RNAi-induziertem *knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden in MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Replikaten eines unabhängigen Experiments. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt und ergab ähnliche Ergebnisse. ....83
- Abbildung 13: Relative mRNA-Konzentration der SREBP-Zielgene GPAM, FASN; HMGCR und LDLR nach RNAi-induziertem *knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden in MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ).....85
- Abbildung 14: Relative mRNA-Konzentration des NIS nach RNAi-induziertem *knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden in MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ). .....85
- Abbildung 15: Relative mRNA-Konzentration des NIS nach RNAi-induziertem *knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 über 24 Stunden in MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils drei Replikaten eines Experiments. ....86

- Abbildung 16: Relative mRNA-Konzentration von SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 über 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zum pcDNA3.1-Vektor ( $p < 0,05$ ). .....88
- Abbildung 17: Immunologischer Nachweis von nSREBP-1 (A) und nSREBP-2 (B) im Nuklearextrakt nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 in MCF-7-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von nSREBP-1, nSREBP-2 und dem Referenzprotein  $\beta$ -Aktin.....88
- Abbildung 18: Relative Proteinkonzentration von nSREBP-1 und nSREBP-2 nach Überexpression von SREBP-1c und SREBP-2 über 24 Stunden in MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Replikaten eines unabhängigen Experiments. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt und ergab ähnliche Ergebnisse. ....89
- Abbildung 19: Relative mRNA-Konzentration der SREBP-Zielgene GPAM, FASN, HMGCR und LDLR in MCF-7-Zellen nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 über 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zum pcDNA3.1-Vektor ( $p < 0,05$ ). .....90
- Abbildung 20: Relative mRNA-Konzentration des NIS in MCF-7-Zellen nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 über 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zum pcDNA3.1-Vektor ( $p < 0,05$ ). .....91
- Abbildung 21: Einfluss der Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC auf die NIS-spezifische Iodid-Aufnahme in MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von vier unabhängigen Versuchen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ). .....92
- Abbildung 22: Übersicht über die verwendeten Reportergerkonstrukte. Dargestellt ist der untersuchte Promotorbereich des humanen Natrium-Iodid-Symporter (hNIS). Dieser wurde, um ein detektiertes *sterol regulatory element* (SRE) genauer lokalisieren zu können, in Teilabschnitte unterteilt.  $\Delta$  kennzeichnet putative SRE-Elemente,  $\blacklozenge$  kennzeichnet putative E-Box-Elemente. ....96

- Abbildung 23: Transaktivierung der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden transient mit den Reporter-genkonstrukten und den Expressionsvektoren transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. Die normierte Luciferase-Aktivität entspricht dem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, der als Kontrolle diente und dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. ....97
- Abbildung 24: Darstellung der transienten Transfektion von MCF-7-Zellen mit 2xhSRE, der als Positivkontrolle diente. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. Die normierte Luciferase-Aktivität entspricht dem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, der als Kontrolle diente und dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde. ....97
- Abbildung 25: Sequenzvergleich der putativen SREs zwischen *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens*. Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen SRE +242 (+), SRE+207 (+), E-Box-30 (+), SRE-170 (+) und E-Box-242 (-) des DNA-Fragments +259/-280, sowie SRE+950 (+), SRE-1141 (+), SRE-1217 (+) und E-Box-1225 (-) des DNA-Fragments -930/-1250 von *Rattus norvegicus* (rNIS, NM\_052983), *Mus musculus* (mNIS, NM\_053248) und *Homo sapiens* (hNIS, NM\_000453). Die Angabe der Nukleotidpositionen ist relativ zum Transkriptionsstart. \* kennzeichnen konservierte Nukleotide. ....99

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stealth RNAi™ siRNA (Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt).....	35
Tabelle 2: Verwendete Vektoren .....	35
Tabelle 3: Oligonukleotide für die qPCR .....	37
Tabelle 4: Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionsvektoren.....	41
Tabelle 5: Oligonukleotide für die Herstellung von Reporter-genvektoren.....	42
Tabelle 6: Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	43
Tabelle 7: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix pro Reaktionsansatz .....	52
Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Mastermix für eine Probe.....	55
Tabelle 9: Trenngel für ein Gel.....	59
Tabelle 10: Sammelgel für ein Gel .....	59
Tabelle 11: Probenvorbereitung für die SDS-PAGE.....	60
Tabelle 12: Antikörper und deren Verdünnungen für den Immunoblot.....	61
Tabelle 13: Behandlungsmedien für den Iodid- <i>Uptake</i> .....	70
Tabelle 14: Zusammensetzung der Versuchsdieten (g/kg) .....	72
Tabelle 15: Fettsäure-Zusammensetzung der Gesamtlipide der Diät und der Öle (Gewichtsprozente der Gesamt-Fettsäuren).....	74
Tabelle 16: Nukleotidpositionen und -sequenzen der in <i>silico</i> ermittelten putativen SRE-Elemente.....	93
Tabelle 17: Nukleotidpositionen und -sequenzen der in <i>silico</i> ermittelten putativen E-Box-Elemente. ....	94
Tabelle 18: Berechnete Homologien der putativen SREs zwischen <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Mus musculus</i> und <i>Homo sapiens</i> (in %) .....	100
Tabelle 19: Einfluss der CLA-Fütterung auf die relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, GPAM, FASN, SREBP-2, HMGCR, LDLR und NIS in der Milchdrüse von Ratten.....	101

## Abkürzungsverzeichnis

25-HC	25-Hydroxycholesterin
ADD1	<i>adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1</i>
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ALLN	N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal (Calpain Inhibitor I)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5B	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>
atRA	all-trans Retinsäure
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BC-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Motiv
bHLH/bLZip	Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bZip	basisches Leucin-Zipper-Motiv
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CLS	<i>Cell line service</i>
CANX	Calnexin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLA	<i>conjugated linoleic acid</i>
CPF	cytosolische Proteinfraction
CPM	<i>counts per minute</i>
C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i>
CYC1	Cytochrom C1

## Abkürzungsverzeichnis

---

ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-bis-(β-aminoethoxyethan)-N,N,N',N',- tetraessigsäure
EIF4A2	<i>eukaryotic translation initiation factor 4A2</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERα	<i>estrogen receptor-α</i>
FASN	<i>fatty acid synthase</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FRTL	<i>Fischer rat thyroid cell line</i>
GPAM	<i>glycerol-3-phosphate-acyltransferase mitochondrial</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
hLDLR	humaner LDL-Rezeptor
HMGCR	HMG-CoA-Reduktase
hNIS	humaner NIS
hNISpro	humaner NIS-Promotor
hRluc	<i>Renilla reniformis</i> Luciferase-Reportergen
HSV-TK	<i>herpes simplex virus thymidine kinase</i>
ID	Identifikator
IgG	Immunglobulin G

## Abkürzungsverzeichnis

---

Insig	<i>insulin induced gene</i>
Kb	Kilobasen
KClO <sub>4</sub>	Kaliumperchlorat
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Luc	Luciferase
MCF-7	Brustadenokarzinomzellen
MDH1	Malat-Dehydrogenase 1
min	Minute/n
minP	Minimalpromotor
mNISpro	NIS-Promotor der Maus
mgNIS	<i>mammary gland</i> NIS
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
nm	Nanometer
NPF	nukleäre Proteinfraction
nSREBP-1/-2	nukleäre Form von SREBP-1/-2
NUE	NIS <i>upstream enhancer</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
pSREBP	Vorläuferform von SREBP-1/-2
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
qPCR	quantitative PCR
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RARE	<i>retinoic acid response element</i>
RIP	<i>regulated intramembrane proteolysis</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rNIS	NIS der Ratte
rNISpro	NIS-Promotor der Ratte
RPL13	ribosomales Protein L13
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RXR	<i>Retinoid-X Rezeptor</i>
S1P	<i>site-1 protease</i>
S2P	<i>site-2 protease</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCAP	<i>SREBP-cleavage activating protein</i>
SD	Standardabweichung
SDHA	Succinat Dehydrogenase Komplex <i>subunit A</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC5A	<i>solute carrier family 5A</i>

SOC-Medium	<i>super optimal broth with catabolite repression</i> Medium
Sp-1	<i>specificity protein-1</i>
SRE	<i>sterol regulatory element</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
T <sub>A</sub>	<i>a</i> nn <sub>e</sub> aling temperature
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered-saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered-saline + Tween 20</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TOP1	Topoisomerase (DNA) I
TPO	Thyreoperoxidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
Ubc	Ubiquitin
UTR	untranslatierte Region
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta</i>

# 1 Einleitung

Die Versorgung der Weltbevölkerung mit Iod über die Nahrung ist in einigen Teilen der Erde ungenügend und der dadurch entstehende Iodmangel ein weltweites Gesundheitsproblem. Um dieses Problem zu kontrollieren, wird seit den 1990er Jahren iodiertes Speisesalz in der Ernährung von Menschen und Tieren eingesetzt.

Um die Versorgung der Menschen mit Iod weiterhin zu verbessern, ist es wichtig, die Regulationsmechanismen der Iodaufnahme genau zu verstehen. Gerade bei Ungeborenen, Säuglingen und Kleinkindern kann eine Mangelversorgung mit Iod gravierende Auswirkungen haben. Säuglinge sind darauf angewiesen, dass ihre Mütter genügend Iod aufnehmen, um es an sie weitergeben zu können. Die Iodaufnahme in die Milchdrüse über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) und die Abgabe über die Milch ist aus diesem Grund von besonderer Bedeutung.

In vorangegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der NIS in der Schilddrüse über *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) reguliert wird. Ob dieser Regulationsmechanismus auch in der Milchdrüse vorliegt, war bislang aber noch nicht bekannt.

## 1.1 Die *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) als Masterregulatoren des Cholesterin- und Lipidstoffwechsels

Bei den SREBPs handelt es sich um membrangebundene Transkriptionsfaktoren aus der Familie der *basic-helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-Zip) (Yokoyama *et al.*, 1993). Sie aktivieren direkt die Expression von über 30 Genen, die für Proteine codieren, welche in der Synthese und Aufnahme von Cholesterin, Fettsäuren, Triglyceriden und Phospholipiden eine wichtige Rolle spielen (Horton *et al.*, 2002). Das Säugeriergenom enthält zwei verschiedene SREBP-Gene.

### 1.1.1 Isoformen

Das Gen für SREBP-1 befindet sich im menschlichen Genom auf dem proximalen, kurzen Arm des Chromosoms 17p11.2, das Gen für SREBP-2 wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 22q13 lokalisiert (Hua *et al.*, 1995b).

Das Gen für SREBP-1 codiert für zwei verschiedene Transkriptvarianten, die als SREBP-1a und SREBP-1c bezeichnet werden und sich im ersten Exon unterscheiden. Die zwei Isoformen entstehen durch den Mechanismus des alternativen Spleißens, wodurch verschiedene Transkriptionsstartpunkte erzeugt werden (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995a). Das SREBP-1c der Ratte wurde unabhängig von dem des Menschen 1993 entdeckt und zunächst als *adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1* (ADD1) bezeichnet, da es vorwiegend im braunen Fettgewebe gefunden und als endogener Transkriptionsfaktor mit wichtiger Rolle bei der Adipozytendifferenzierung identifiziert wurde (Tontonoz *et al.*, 1993).

### 1.1.2 Aufbau der SREBPs

SREBP-1 und -2 haben eine Ähnlichkeit von 47% und stellen die einzigen Vertreter einer Subfamilie der bHLH-Zip-Proteine dar (Hua *et al.*, 1993). Sie unterscheiden sich von allen anderen Vertretern der bHLH-Zip-Familie dadurch, dass sie als inaktive Vorstufen synthetisiert werden, die an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden sind, sowie durch ihre Größe (1147 Aminosäuren) und Zielsequenz (Horton *et al.*, 2002).

Die SREBP-Vorstufen bestehen aus 1147 Aminosäuren und sind aus drei Domänen aufgebaut:

- (a) ein NH<sub>2</sub>-terminales Ende mit ca. 480 Aminosäuren, das die bHLH-Zip-Region für die *deoxyribonucleic acid* –(DNA-) Bindung beinhaltet (Transaktivierungsdomäne),
- (b) zwei hydrophobe membranüberspannende Segmente, die durch eine kurze, ins Lumen des ER zeigende Schleife von ca. 30 Aminosäuren unterbrochen werden und
- (c) ein COOH-terminales Ende von ca. 590 Aminosäuren mit essentiellen regulatorischen Funktionen (Horton *et al.*, 2002).

Das COOH- und das NH<sub>2</sub>-terminale Ende der SREBPs befinden sich im Cytoplasma und werden über die beiden hydrophoben, die Membran durchspannenden Segmente miteinander verbunden. Die Verankerung in der Membran erfolgt über den mittleren hydrophoben Bereich. Die so entstehende Struktur der SREBPs wird auch als Haarnadelstruktur bezeichnet (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995a).

### 1.1.3 Reifung der SREBPs

Um in den Nukleus zu gelangen und als Transkriptionsfaktor wirken zu können, muss das NH<sub>2</sub>-terminale Ende proteolytisch abgespalten werden (Wang *et al.*, 1994; Horton *et al.*, 2002). Der Vorgang der Spaltung wird auch als Reifung bezeichnet.

An der nötigen Umwandlung der inaktiven, membrangebundenen Vorstufen der SREBPs zu aktiven Transkriptionsfaktoren sind drei Proteine beteiligt: (1) das SREBP *cleavage-activating protein* (SCAP), (2) die *site-1-protease* (S1P) und (3) die *site-2-protease* (S2P) (Horton *et al.*, 2002). Die Spaltungen durch S1P und S2P, die zur Freisetzung der aktiven Form des Transkriptionsfaktors führen, werden als *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) bezeichnet (Brown *et al.*, 2000).

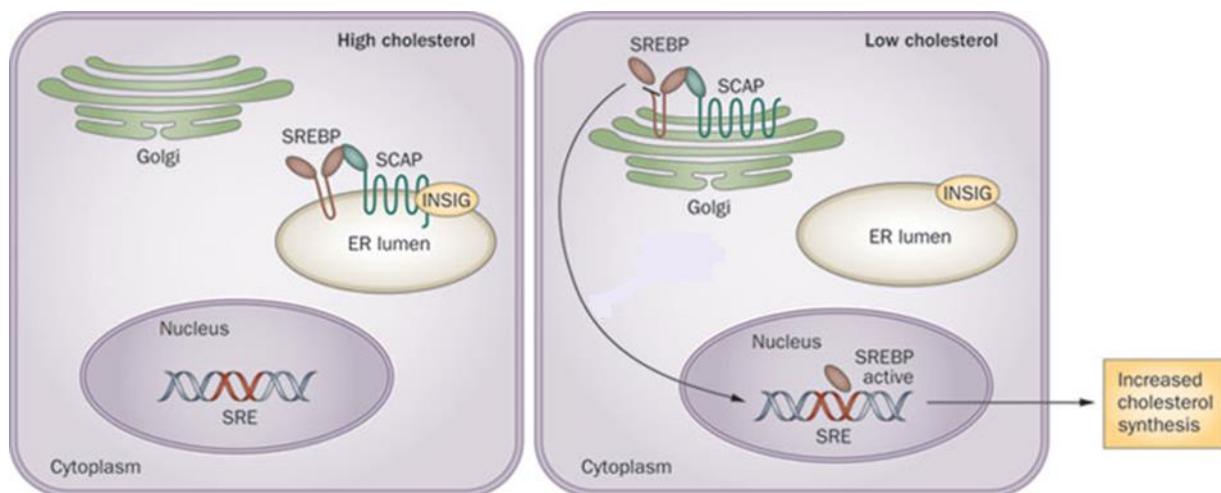
Direkt nach der Translation an der Membran des ERs bindet die COOH-terminale regulatorische Domäne des SREBPs an das COOH-terminale Ende des SCAP (Yang *et al.*, 2002). SCAP ist ein polytopisches Membranprotein des ERs und dient als Sensor- und Eskortprotein (Horton *et al.*, 2002). Es besteht aus zwei unterschiedlichen Domänen: einer NH<sub>2</sub>-terminalen, polytopischen, membranständigen Domäne mit ca. 730 Aminosäuren und einer COOH-terminalen, wasserlöslichen Domäne, bestehend aus ca. 540 Aminosäuren, die ins Cytosol hineinreicht. Die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne besteht aus acht transmembranalen Helices, von denen insbesondere die Helices 2 bis 6 die Sterol-Sensitivität vermitteln und deshalb als Sterol-sensitive Domäne bezeichnet wird. Die COOH-terminale Domäne ist für die Eskortfunktion des SCAP verantwortlich. Sie enthält den sog. *WD-repeat*, der für Protein-Protein-Interaktionen nötig ist und mit den SREBPs einen Komplex bildet (Nohturfft *et al.*, 1998).

### 1.1.4 Regulation der SREBP-Prozessierung

Prozessierung beschreibt sowohl die posttranskriptionelle als auch posttranslationale Modifikation von RNA bzw. von Proteinen. In diesem Fall steht es für die posttranslationale Veränderung der SREBPs durch proteolytische Spaltungen. Fällt der intrazelluläre Spiegel an Cholesterin, so eskortiert SCAP das SREBP vom ER zum Golgi Apparat (Abbildung 1). Dort befinden sich die beiden Proteasen, S1P und S2P. S1P ist eine membrangebundene Serin-Protease und spaltet SREBP im luminalen *loop* zwischen den beiden membrandurchspannenden Segmenten. S2P ist eine membrangebundene Zink-Metalloproteinase. Sie spaltet das NH<sub>2</sub>-terminale bHLH-Zip-Element ab, sodass dieses in den Nukleus gelangen kann. Dieses NH<sub>2</sub>-terminale Ende wird auch als nukleäres SREBP (nSREBP) bezeichnet. Nachdem das nSREBP in den Nukleus gelangt ist, aktiviert es die Transkription diverser Zielgene durch Bindung an das *sterol regulatory element* (SRE) (Horton *et al.*, 2002). Für die Transaktivierung ist insbesondere der saure Bereich des N-terminalen Endes verantwortlich (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1994). SREBP-1c unterscheidet sich in einem stark verkürzten sauren Bereich von SREBP-1a und stellt aufgrund dessen einen deutlich schwächeren Aktivator dar (Shimano *et al.*, 1997). Das SRE befindet sich im Promotorbereich der SREBP-responsiven Gene.

Das klassische Bindungselement der bHLH-ZIP-Familie ist die sogenannte E-Box mit dem *inverted repeat* 5'-CANNTG-3', wobei das N für eine beliebige Base steht (Yokoyama *et al.*, 1993). Die SREBPs können diese E-Box *in vitro* zwar identifizieren, binden im Kern aber an Sequenzen, die einen *direct repeat* des 5'-PyCAPy-3' (Py = Pyrimidinbase) enthalten, das sogenannte SRE. Die erste dieser Sterol-responsiven Sequenzen wurde im humanen *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptorgen entdeckt und als SRE-1 bezeichnet. Das SRE-1 enthält eine direkte Wiederholung der CAC-Sequenz, die durch zwei C's getrennt werden, sodass die Sequenz des SRE-1 als 5'-ATCACCCAC-3' beschrieben wird (Yokoyama *et al.*, 1993; Brown und Goldstein, 1997; Osborne und Espenshade, 2009). Ursache für diese unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten ist ein Tyrosinrest in der basischen Region des bHLH-Zip-Proteins der SREBPs, an dessen Stelle alle anderen Mitglieder der helix-loop-helix-leucin-zipper- (bHLH/bZip-) Familie einen Argininrest aufweisen (Kim *et al.*, 1995).

Steigt die intrazelluläre Cholesterinkonzentration, so wird dies durch die Sterol-messende Domäne des SCAP wahrgenommen und SCAP verändert seine Konformation. Durch diese Konformationsänderung kann der SCAP/SREBP-Komplex nicht mehr in die Transportvesikel des ER's gelangen und die SREBPs können nicht in ihre aktive Form umgewandelt werden (Horton *et al.*, 2002). Yang *et al.* identifizierten 2002 das *insulin induced gene 1* (Insig-1), ein ER-Membranprotein, das SCAP Sterol-abhängig bindet und so zum Verbleib des SCAP/SREBP-Komplexes in der Membran des ERs führt (Abbildung 1) (Yang *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2002; Yabe *et al.*, 2002).



**Abbildung 1: Regulation des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels durch sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs).** Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, Insig = insulin-induced gene, SCAP = SREBP cleavage-activating protein, SRE = sterol regulatory element (modifiziert nach Karasinska und Hayden, 2011).

### 1.1.5 Einfluss der SREBPs auf Gene des Cholesterin- und Lipidstoffwechsels

In *in vivo* beeinflusst SREBP-1c vor allem die Fettsäuresynthese und wird dominierend in der Leber und im Fettgewebe exprimiert (Shimomura *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu wird SREBP-2 zwar ebenfalls vor allem in fettstoffwechselaktiven Geweben exprimiert, reguliert aber bevorzugt die Cholesterinsynthese (Hua *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995b; Brown und Goldstein, 1997). Zielgene von SREBP-1c sind unter anderem die ATP-Citrat-Lyase, die Acetyl-CoA-Carboxylase, die Fettsäure-Synthase (FASN), ein *rate-limiting* Enzym des Fettsäure-Synthase-Komplexes, die Stearoyl-CoA-Desaturase und die Glycerol-3-Phosphat-Acetyltransferase (GPAM). Zielgene von SREBP-2 sind die HMG-CoA-Synthetase, die HMG-CoA-Reduktase (HMGCR), der

LDL-Rezeptor (LDLR), die Farnesyl-Diphosphat-Synthase und die Squalen-Synthase. Beide genannten Isoformen der SREBPs aktivieren zusätzlich drei Gene, die an der Bereitstellung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) beteiligt sind (Horton *et al.*, 2002). NADPH ist an vielen Redoxreaktionen im Stoffwechsel beteiligt und stellt die protonierte Form des Coenzym NADP dar.

SREBP-1a wird vornehmlich in kultivierten Zellen exprimiert, stellt den potentesten Aktivator dieser Subfamilie dar und aktiviert alle SREBP-responsiven Gene (Horton *et al.*, 2002).

Amemiya-Kudo *et al.* zeigten in ihrer 2002 veröffentlichten Studie, dass sich die Gene der Lipo- und Cholesteringenese in ihren Bindungsmotiven unterscheiden (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002). Die Bindungssequenzen der lipogenen Gene enthalten Variationen des klassischen SREs und werden aus diesem Grund *SRE-like sequences* genannt. Cholesterogene Gene enthalten die klassische SRE-Sequenz in ihrem Promotorbereich und weisen darüber hinaus meistens Bindungssequenzen für Kofaktoren, wie z. B. *specificity protein-1* (Sp-1) und *nuclear transcription factor Y* (NF-Y) auf (Sanchez *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1998; Ericsson *et al.*, 1996).

## 1.2 Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS)

Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) trägt auch den offiziellen Namen *solute carrier family 5 A (sodium/iodide cotransporter), member 5* (SLC5A5).

Es handelt sich um ein intrinsisches Membranprotein, dessen Gen bei der Spezies *Homo sapiens* auf Chromosom 19p12-13.2 liegt. Das Molekulargewicht des NIS-Precursors beträgt ca. 56,2 kDa. Durch posttranslationale Modifikationen, wie der Glykosylierung, beträgt das Molekulargewicht der aktiven Form ca. 87 kDa (Levy *et al.*, 1997).

Eine herausragende Rolle spielt NIS im Iodmetabolismus und wird neben der Schilddrüse auch in der Speicheldrüse, der Magenschleimhaut, dem Dünndarm, der laktierenden Milchdrüse, dem *Plexus choroideus* und dem Ciliarkörper des Auges funktionell exprimiert (Carrasco 1993; Jhiang *et al.*, 1998; Tazebay *et al.*, 2000; Wapnir *et al.*, 2003; Nicola *et al.*, 2009; La Perle, Krista *et al.*, 2013; Paroder *et al.*, 2013;

Portulano *et al.*, 2014). Folglich ist die Expression in den extrathyreoidalen Geweben deutlich geringer. In der Mehrzahl der Gewebe wird der NIS basolateral exprimiert und vermittelt die aktive Iodaufnahme aus dem Blut in die Zelle. Eine Ausnahme hiervon stellt der Dünndarm dar. In diesem Gewebe ist der NIS apikal zu finden und für die Absorption des Nahrungsiodids und die Reabsorption des Iods aus dem Speichel und dem Magensaft verantwortlich (Portulano *et al.*, 2014).

Interessanterweise wird NIS in den meisten Fällen (70 - 80%) auch in Brustkrebszellen exprimiert (Tazebay *et al.*, 2000; Wapnir *et al.*, 2003) und stellt somit einen potentiellen Angriffspunkt für die Krebstherapie dar. Allerdings korreliert die NIS-Expression nicht zwangsweise mit einer nachweisbaren Iodidaufnahme. Die NIS-Expression und deren mögliche Beeinflussung in Milchdrüsenzellen ist daher ein äußerst interessantes Forschungsgebiet, um die Behandlung von Brustkrebs mittels Radioiodtherapie zukünftig verbessern zu können.

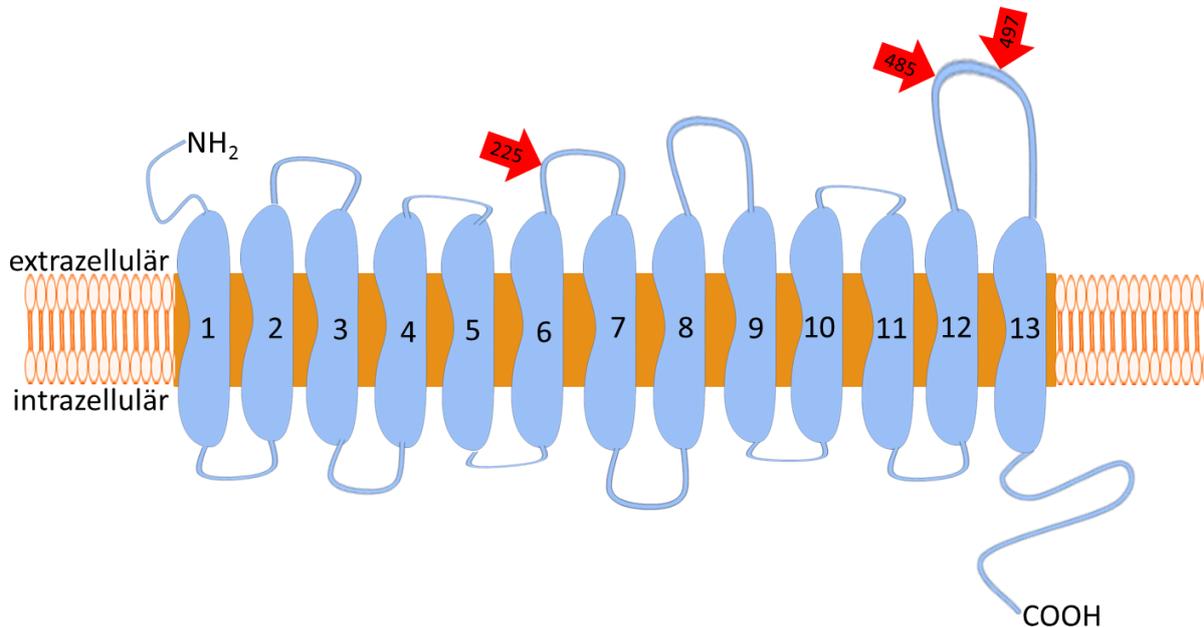
Obwohl schon über ein Jahrhundert bekannt ist, dass die Schilddrüse zur Iod-Aufnahme befähigt ist, wurde die molekulare Struktur erst vor kurzem entdeckt. Das SLC5A5-Gen der Ratte wurde erstmals 1996 sequenziert, danach wurde das humane NIS-Gen der Schilddrüse entschlüsselt (Dai *et al.*, 1996; Smanik *et al.*, 1996). Das NIS-Gen der Maus und des Schweins wurden anschließend identifiziert (Perron *et al.*, 2001; Selmi-Ruby *et al.*, 2003). Die Aminosäuresequenz des humanen NIS (hNIS) zeigt eine 84%-ige Übereinstimmung mit dem NIS der Ratte (rNIS) (Smanik *et al.*, 1996).

Der humane NIS besteht aus 643 Aminosäuren, ebenso der porcine, der NIS der Maus besteht aus 618 Aminosäuren (Smanik *et al.*, 1996; Selmi-Ruby *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 1996; Perron *et al.*, 2001).

Der NIS katalysiert den sekundär aktiven Transport von Natriumionen entlang des Konzentrationsgefälles und parallel den Transport von Iodid entgegen seines elektrochemischen Gradienten. Der benötigte Natriumgradient wird über die Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten.

Das aktuell gültige Modell der Sekundärstruktur beschreibt den NIS als Membranprotein, bestehend aus 13 Transmembrandomänen (Abbildung 2) (Dohán *et al.*, 2003). Das NH<sub>2</sub>-terminale Ende befindet sich extrazellulär, das COOH-terminale Ende dagegen intrazellulär (Levy *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 1998). Nach der Studie von Smanik

*et al.*, besteht das für NIS kodierende Gen aus 15 Exons, die durch 14 Introns unterbrochen werden (Smanik *et al.*, 1997).

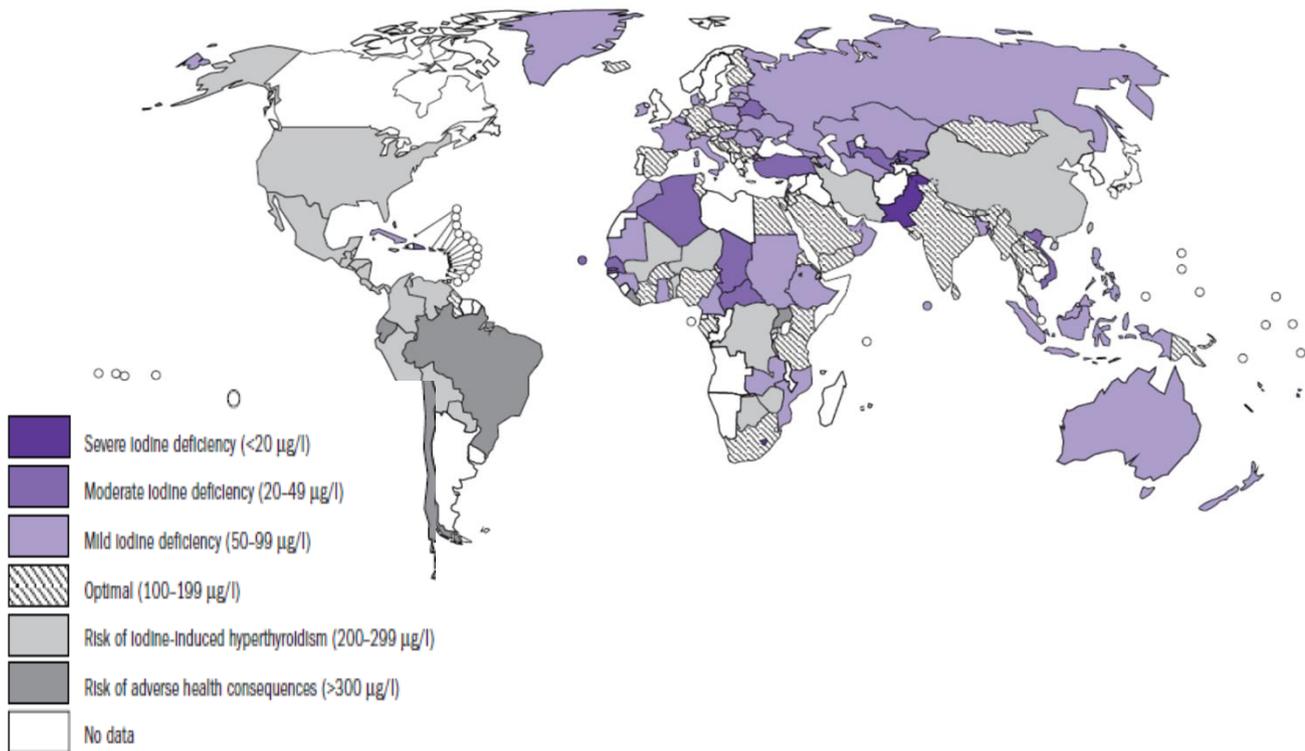


**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Natrium-Iodid-Symporters (NIS). Der Transporter besteht aus 13 Transmembrandomänen (1-13) und 3 N-glykosylierten Sequenzen an den Positionen 225, 485 und 497 (rote Pfeile) (modifiziert nach Micali *et al.*, 2014).

### 1.2.1 Iodmangel – ein kurzer Überblick

Iodmangel ist global ein bedeutendes Problem, insbesondere für Schwangere und Kinder und stellt weltweit die größte Einzelursache für vermeidbare Gehirnschädigungen und mentale Retardierung dar (World Health Organization, 2004; Delange, 2001). Aus Abbildung 3 wird ersichtlich, dass der Iodmangel ein globales Problem ist. Ein Mangel an Iod führt aufgrund der beeinträchtigten Schilddrüsenhormonsynthese zu verschiedenen funktionellen Abnormitäten und Entwicklungsstörungen. Je nach Alter der Betroffenen sind unterschiedliche Symptome zu beobachten. Vor allem bei Feten kommt es häufig zu verheerenden Auswirkungen. Häufig werden Aborte, Fehlgeburten, eine erhöhte perinatale Mortalität, Taubstummheit und Kretinismus (World Health Organization, 2004) beobachtet. Kretinismus stellt die Vollaussprägung einer schweren, angeborenen Hypothyreose dar. Bei älteren Individuen können Kropfbildung, Unterentwicklung, verzögerte psychomotorische und mentale Entwicklung beobachtet werden. Die Iodidabgabe über die Milchdrüse in die Milch ist für das

Neugeborene extrem wichtig, weil es die einzige Iodidquelle darstellt (Portulano *et al.*, 2014). Das so aufgenommene Iodid ist unverzichtbar, um Schilddrüsenhormone zu synthetisieren. T3 (Trijodthyronin) und T4 (Thyroxin) sind essentiell für die Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Skelettmuskulatur und der Lunge (Dohán *et al.*, 2003). Iodid muss über die Nahrung zugeführt werden.



**Abbildung 3:** Einteilung der Länder nach dem Ausmaß der Iodversorgung aufgrund des medianen Iodgehalts im Urin (World Health Organization, 2004).

Die empfohlene Strategie zur Bekämpfung des Iodmangels und seiner Folgen ist die Korrektur des Defizits über eine gesteigerte Aufnahme. Die Weltgesundheitsorganisation empfahl in den 1990er Jahren dazu die Iodierung des Speisesalzes für Menschen und Nutztiere (World Health Organization, 2004).

### 1.2.2 Iod in der Ernährung der Haussäugetiere

Bei den Haussäugetieren, vor allem bei Hunden und Katzen, sind Pathologien der Schilddrüse häufige Endokrinopathien. Während Katzen in der Regel an einer Hyperthyreose erkranken, werden bei Hunden häufiger Unterfunktionen der Schilddrüse diagnostiziert. Die Hypothyreose beim Hund kann durch verschiedene Ätiologien verursacht werden. Beim adulten und beim wachsenden Hund kann sowohl ein Iod-

überschuss, als auch ein Ioddefizit zu einer Hypothyreose führen (Günzel-Apel, 2009). Vor allem eine reine Fleischfütterung von Hunden, aber auch von Katzen, während der Aufzucht führen zu einem Ioddefizit. Als Folge kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH) durch den Hypophysenvorderlappen und nachfolgend zu einer Hyperplasie der Thyreoidea. Da für die Synthese der Schilddrüsenhormone ausreichend Iodid über die Nahrung aufgenommen werden muss, führt ein fütterungsbedingtes Ioddefizit trotz der kompensatorischen, TSH-induzierten Schilddrüsenhyperplasie zu einer Hypothyreose. Ein ungenügender Iodgehalt in der Nahrung einer trächtigen Hündin kann ebenfalls zu einer Schilddrüsenhyperplasie der Welpen führen (Günzel-Apel, 2009).

Ein Überschuss an Iodid in der Nahrung führt durch Hemmung der Peroxidase zu einer verminderten Thyroxinbiosynthese und somit zu einer Hypothyreose. Dieses Phänomen wird auch als Wolff-Chaikoff-Effekt bezeichnet.

### 1.2.3 Der NIS in der laktierenden Milchdrüse

Eine NIS-Expression kann in der Milchdrüse nur während der späten Trächtigkeit und Laktation beobachtet werden, wenn Zellproliferation stattfindet (Portulano *et al.*, 2014). Eine Gemeinsamkeit des NIS in Schilddrüse, Milchdrüse und den anderen extrathyreoidalen Geweben ist, dass ein Iodidgradient von gleichem Ausmaß geschaffen wird, nämlich eine Aufkonzentrierung um das 20- bis 40-fache (De La Vieja *et al.*, 2000). Die Regulation des NIS in den verschiedenen Organen unterscheidet sich jedoch erheblich (De La Vieja *et al.*, 2000). Im Unterschied zur Schilddrüse besitzt das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) in der laktierenden Milchdrüse keinerlei regulatorischen Einfluss und es findet auch keine Organifizierung des Iods statt (Carrasco, 1993).

Die NIS-Regulation in der Schilddrüse ist bereits detailliert erforscht, während die Regulationsmechanismen in der Milchdrüse noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Ryan *et al.*, 2011).

Während der Laktation wird die NIS-Expression in der Milchdrüse durch Säugen erhöht und nach Beendigung der Säugeperiode zügig wieder reduziert. Diese Reduktion der Genexpression ist demnach reversibel (De La Vieja, A *et al.*, 2000). Die hormonelle Regulation des NIS wurde von Tazebay *et al.* (2000) bereits untersucht. Da-

bei konnte gezeigt werden, dass Oxytocin isoliert, jedoch nicht in Kombination mit Prolaktin, die NIS-Expression in gesunden, unkastrierten Mäusen induziert. In ovariectomierten Mäusen hingegen konnte durch die alleinige Gabe von Oxytocin keine NIS-Expression induziert werden. Nur durch die Gabe von 17- $\beta$ -Estradiol konnte eine messbare NIS-Expression hervorgerufen werden. Die Kombination von 17- $\beta$ -Estradiol mit Oxytocin führte zu einem deutlicheren Anstieg der NIS-Expression, die durch die zusätzliche Gabe von Prolaktin noch weiter gesteigert werden konnte. Demnach ist davon auszugehen, dass eine bestimmte Menge an zirkulierenden Östrogenen für die NIS-Expression und deren Steigerung durch Oxytocin nötig ist. Weiterhin wird angenommen, dass Oxytocin den Hauptstimulus für die NIS-Expression in der lactierenden Milchdrüse darstellt und Prolaktin ebenso wie Östrogen die Oxytocin-Wirkung verstärkt (Tazebay *et al.*, 2000). In einer Studie von Cho *et al.* konnte ebenfalls Oxytocin als Hauptstimulus der NIS-Expression identifiziert werden (Cho *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den beiden genannten Untersuchungen konnten Rillema *et al.* (2000) an kultivierten Mausmilchdrüsenzellen eindeutig einen Einfluss von physiologischen Prolaktin-Konzentrationen auf die Iodakkumulation durch den NIS in der Milch beobachten. In malignen MCF-7-Zellen konnten zudem Kogai *et al.* (2012) all-trans Retinsäure (atRA) als potentesten *NISinducer* identifizieren. Diese Substanz spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und dem Zellwachstum (Kogai *et al.* 2000). Hierbei wird die Induktion über ein Heterodimer aus Retinsäure-Rezeptor (RAR) und Retinoid-X-Rezeptor (RXR) herbeigeführt (Kogai *et al.*, 2008). Beides sind nukleäre Rezeptoren, die nach Bindung ihres Liganden atRA ein Zielgen über ein *retinoic acid response element* (RARE) aktivieren (Kogai *et al.*, 2008). Die Studie von Alotaibi *et al.* (2006) zeigte, dass die atRA-responsive NIS-Expression zwingend an die Existenz eines funktionalen Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) gebunden ist. Hierbei stellte sich weiterhin heraus, dass ausschließlich in Zellen mit Expression von ER $\alpha$  und RAR $\alpha$  eine Induktion der NIS-Expression mittels atRA möglich ist. Darüber hinaus identifizierten sie ein bislang unbekanntes Östrogen-responsives Element in der Promotorregion des NIS, das den ER $\alpha$  spezifisch bindet und so zur Aktivierung der NIS-Expression beiträgt (Alotaibi *et al.*, 2006). Da MCF-7-Zellen am stärksten auf die Behandlung mit atRA ansprechen, werden sie am häufigsten für Untersuchungen der endogenen NIS-Induktion verwendet (Kogai *et al.*, 2006). Die durch atRA gesteigerte NIS-Expression in MCF-7-Zellen kann durch zu-

sätzliche Behandlung der Zellen mit Hydrocortison oder ATP noch weiter gesteigert werden (Dohán *et al.*, 2006). Da der NIS in MCF-7-Zellen basal nur sehr schwach exprimiert wird, musste er für einige Untersuchungen zunächst mit atRA induziert werden.

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass der NIS in der Milchdrüse über die SREBPs reguliert wird. Die in *vitro*-Studien von Rothe (Dissertation 2011) und Rauer (Dissertation 2014) beschäftigten sich mit der Regulation des NIS Gens durch SREBPs in der Schilddrüse. Beide Dissertationen untersuchten die Einflüsse der SREBPs in FRTL-5-Zellen, einer Schilddrüsenzelllinie, die aus Ratten (*Rattus norvegicus*) gewonnen wurde. Ringseis *et al.* (2013) und Rauer *et al.* (2014) zeigten in ihren Arbeiten, dass sowohl das Gen für NIS, als auch das Gen für Thyreoperoxidase (TPO) direkte Zielgene der sterolsensitiven SREBPs sind. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, ob der NIS in Milchdrüsenzellen ebenso wie in den Schilddrüsenzellen über die sterolsensitiven SREBPs reguliert wird. Da die SREBPs als wichtige Regulatoren der Fett- und Cholesterinhomöostase bekannt geworden sind, wurden sie zunächst auch vor allem in Gewebe mit hohem Fett- und Cholesterinmetabolismus nachgewiesen. Zu diesen Geweben zählen insbesondere Leber, Darm und Fettgewebe, aber auch die Milchdrüse.

Zur Durchführung der Versuche wurden MCF-7-Zellen verwendet, in denen die NIS-Expression durch atRA induziert werden konnte. Der Einfluss der SREBPs auf die Regulation des NIS wurde anhand dieses Zellmodells auf verschiedenen Ebenen untersucht.

Des Weiteren wurde ein in *vivo* Versuch durchgeführt, in dem der Einfluss einer Fütterungsintervention auf die Expression der SREBPs und des NIS untersucht wurde. Dazu erfolgte die Verfütterung von konjugierten Linolsäuren (CLA) an Versuchsratten. In einer Studie von Peterson *et al.* (2004) wurde nachgewiesen, dass die Behandlung von bovinen Milchdrüsenzellen mit CLA zu einer deutlich verringerten Lipidsynthese durch eine signifikante Reduktion des aktiven nSREBP-1 und somit einer reduzierten mRNA-Konzentration lipogener Gene führt. Somit eignete sich dieses Versuchsmodell, um den Einfluss der SREBPs auf den NIS in *vivo* zu untersuchen.

Die Experimente untersuchten die Regulation des NIS auf verschiedenen Ebenen sowohl im Zell-, als auch im Tiermodell, um die Grundlage für ein gezieltes Eingreifen in den Iodhaushalt zu legen und somit zu einer verbesserten Iodversorgung der Bevölkerung weltweit beizutragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier Rotilabo®	Roth, Karlsruhe
CELLSTAR® Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 50 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	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
CELLSTAR® Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CO <sub>2</sub> -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
GeneFlash Geldokumentationssystem	Syngene, Cambridge, UK
Gene Pulser® Cuvette, 0,2 cm	Bio-Rad, München

Gene Pulser Xcell™ Electroporation System	Bio-Rad, München
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
HL-2000 HybriLinker™ Hybridization Oven	Ultra-Violet Products, Cambridge, UK
Inkubationsschüttler IKA® KS 4000i control	IKA®-Werke, Staufen
Inversionsmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Laborpressanlage Typ 14-175	Kahl, Reinbek
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 (Hoefer SE 250 Mighty Small II)	Hoefer Inc., Holliston, USA
Multimode Reader Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
NanoQuant Plate™	Tecan, Crailsheim
Nitrozellulosemembran BioTrace™ NT	Pall, Dreieich
Pasteurpipetten (ohne Wattestopfen)	Roth, Karlsruhe
PCR-Tubes (0,1 ml)	LTF Labortechnik, Wasserburg
Petrischalen	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rotorgene 2000	Corbett Research, Mortlake, Australia
Rotor-Gene Q	Qiagen, Hilden
Schüttelwasserbad	JULABO Labortechnik, Seelbach
Spritzenfilter, Filtropur S 0,2 µm	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
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.2 Chemikalien

25-Hydroxycholesterin (25-HC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Propanol ROTISOLV® HPLC (Isopropanol)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	Roth, Karlsruhe
all-trans retinoic acid (atRA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	GeneCraft, Lüdinghausen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenophosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) (4,5 g/l Glucose)	GIBCO, Invitrogen GmbH
Essigsäure ROTIPURAN® (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol ROTIPURAN®	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatri- umsalz (Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
FuGENE®6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Gel Red™ NucleicAcid Gel Stain, 10.000x	Biotium Hayward, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin, analytical grade	Serva, Heidelberg
Green Go Taq® Flexi Buffer, 5x	Promega, Mannheim
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumperchlorat (KClO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine® 2000	Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt
Lithiumdodecylsulfat (LDS)	Roth, Karlsruhe
Lutalin®	BASF, Ludwigshafen
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	VWR, Darmstadt
Na <sup>125</sup> I	Perkin Elmer, Rodgau

N-Acetyl-Leucinal-Leucinal-Norleucinal (ALLN)	Enzo Life Sciences, Lörrach
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
passive lysis buffer (PLB), 5x	Promega, Mannheim
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab, Erlangen
Ponceau S	Roth, Erlangen
Roti®-Load	Roth, Karlsruhe
Tris, research grade	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
TRizol® Reagent	Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt
Tween® 20	Serva, Heidelberg

### 2.1.3 Substanzen und Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco´s modified eagle´s medium	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
fetales Kälberserum (FKS)	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
Gentamicin (10 mg/ml)	Gibco / Life Technologies, Darmstadt
Hank´s balanced salt solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05%)	Gibco / Life Technologies Darmstadt

### 2.1.4 Zelllinie

MCF-7-Zellen (human, Brustadenokarzinomzellen)	CLS, Eppelheim
---	----------------

### 2.1.5 Versuchstiere

Sprague-Dawley Ratten

Harlan Laboratories, AN Venray,  
Niederlande

### 2.1.6 Bakterien

*Escherichia coli* (E. coli) Top 10

Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt

Genotyp: F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)

φ80 lacZ ΔM15 ΔlacX74 nupG recA1

araD 139 Δ (ara-leu) 7697 galE15

galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1λ<sup>-</sup>

### 2.1.7 Substanzen für die Mikrobiologie

Ampicillin Natriumsalz (≥ 99%)

Roth, Karlsruhe

Bacto-Trypton

Roth, Karlsruhe

Chloramphenicol (≥ 98%)

Roth, Karlsruhe

Hefeextrakt

Roth, Karlsruhe

LB-Medium (Lennox)

Roth, Karlsruhe

LB-Agar (Lennox)

Roth, Karlsruhe

### 2.1.8 Antikörper

#### Antikörper für den Immunoblot

anti-SREBP-1 IgG (rabbit, polyklonal)

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

anti-SREBP-2 IgG (rabbit, polyklonal)

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

anti-mouse IgG (goat, polyklonal, HRP)

Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

anti-rabbit IgG (goat, polyklonal, HRP)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

anti-beta Aktin IgG (mouse, monoklonal)

Abcam, Cambridge, UK

### 2.1.9 Enzyme

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

### 2.1.10 Protein-Größenmarker

Broad range protein molecular weight markers	Promega, Mannheim
PageRuler™ prestained protein ladder	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

### 2.1.11 *Small interfering RNA (siRNA)*

Für die Experimente mit RNA-Interferenz wurde eine Kontrolle verwendet, die in ihrer Länge und Konfiguration einer Standard-siRNA entspricht, deren Sequenz aber zu keinem bekannten Gen homolog ist.

Bei dieser siRNA handelte es sich um BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control (Kat. # 14750-100; Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt).

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

	Oligonukleotidsequenz (5´-3´)	siRNA ID / Kat. #
si-SREBP-1	AGGCCAUCGACUACAUCCGCUUCUU	Srebf1 MSS209482 / # 1320001
	AAGAAGCGGAUGUAGUCGAUGGCCU	
si-SREBP-2	GGCUUCUUGGCUAGCUACUUCUUAA	Srebf2 RSS312552 / # 1330001
	UUAAGAAGUAGCUAGCCAAGAAGCC	

### 2.1.12 Vektoren

**Tabelle 2: Verwendete Vektoren**

Vektor	Beschreibung	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	Dissertation Christine Rauer
pcDNA3.1(+)-nSREBP-2	SREBP-2 der Ratte (Aminosäuren 1 - 460), in HindIII/BamHI kloniert	Dissertation Christine Rauer
pGL4.10[luc2]	Firefly-Luziferase-Reporter gen ohne Promotor, Ampicillin-Resistenz, 4242 bp	Promega, Mannheim
pGL4.23[luc2/minP]	Firefly-Luziferase-Reporter gen mit Minimalpromotor, Ampicillin-Resistenz, 4283 bp	Promega, Mannheim
pGL4.74[hRluc/TK]	Renilla-Luziferase-Reporter gen, HSV-TK-Promotor, Ampicillin-Resistenz, 4237 bp	Promega, Mannheim

### **2.1.13 Oligonukleotide**

Die benötigten Oligonukleotide (*primer*) wurden von der Firma Eurofins Genomics mit Sitz in Ebersberg bezogen. Die Oligonukleotide wurden entsalzt geliefert und die Orientierung mit F (*forward*) und R (*reverse*) gekennzeichnet.

#### Oligonukleotide für die PCR

Die Oligonukleotide für die qPCR wurden zunächst mit DEPC-Wasser gelöst und anschließend 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt. Für die Herstellung von Reporter-genvektoren mittels konventioneller PCR wurden die Oligonukleotide in sterilem Wasser gelöst und danach ebenfalls 1:10 verdünnt.

Die Oligonukleotide mit 116 Basenpaaren (bp) für die Herstellung der Reporter-genvektoren wurden in Tris-EDTA-NaCl- (TEN-) Puffer gelöst und anschließend 1:10 verdünnt, sodass sie in einer Konzentration von 100 ng/µl vorlagen.

#### Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionsvektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Eder am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen hergestellt.

Material und Methoden

**Tabelle 3: Oligonukleotide für die qPCR**

Spezies	Gen	Oligonukleotidsequenz	Produkt- größe (bp)	T <sub>A</sub>	NCBI Gene Bank
Mensch	ATP5B	TCGCGTGCCATTGCTGAGCT CGTGACACGGGACACGGTCAA	218	60°C	NM_001686.3
Mensch	CYC1	TTCGCTTCGCGGGGTAGTGTGG GACAAGGCCACTGCCCTGAGGT	126	64°C	NM_991916.3
Mensch	EIF4A2	GCGCAAGGTGGACTGGCTGA GCACATCAATCCCCGGAGCC	170	64°C	NM_001967.3
Mensch	FASN	GGCCGTGGTCTTGAGAGATG TAGTTGCTCTGTCCCGCATTG	189	60°C	NM_004104.4
Mensch	GPAM	AATGGTGAACAACCTGGGCAAAC ATCCACTCGGACACAAACCATAG	105	60°C	NM_001244949.1
Mensch	HMGCR	GACAGGATGCAGCACAGAATG TTGAACACCTAGCATCTGCAAAC	179	60°C	NM_000859.2

## Material und Methoden

---

Mensch	LDLR	GTCAGCTCCACAGCCGTAAG CCCAGAGCTTGGTGAGACATTG	128	60°C	NM_000527.4
Mensch	NIS	TGCGGGACTTTGCAGTACATT TGCAGATAATTCCGGTGGACA	133	60°C	NM_000453.2
Mensch	SDHA	CCAAGCCCATCCAGGGGCAAC TCCAGAGTGACCTTCCCAGTGCCAA	100	66°C	NM_004168.2
Mensch	SREBP-1a	CTGCTGACCCGACATCGAAGAC GATGCTCAGTGGCACTGACTCTTC	321	60°C	NM_004176.4
Mensch	SREBP-1c	CGGAGCCATGGATTGCACCTTC GATGCTCAGTGGCACTGACTCTTC	328	60°C	NM_001005291.2
Mensch	SREBP-2	TAGGCAGTCTGGTGGACAATG GTCTGGCTCATCTTTGACCTTTG	179	60°C	NM_004599.3
Mensch	Ubc	AGCGCTGCCACGTCAGACGAA CGGCTGCGACGGAAGTAGCTG	297	64°C	NM_021009
Mensch	YWHAZ	TGGGGACTACGACGTCCTCAA CATATCGCTCAGCCTGCTCGG	115	64°C	NM_003406.3

## Material und Methoden

---

Ratte	$\beta$ -Aktin	GACCTCTATGCCAACACAGT CACCAATCCACACAGAGTAC	154	60°C	NM_031144.2
Ratte	CANX	CCAGATGCAGATCTGAAGAC CTGGTCTCAATTTACAGT	175	60°	NM_172008.2
Ratte	FAS	AGGTGCTAGAGGCCCTGCTA GTGCACAGACACCTTCCCAT	281	60°C	NM_017332.1
Ratte	GPAM	CAGCGTGATTGCTACCTGAA CTCTCCGTCCTGGTGAGAAG	194	60°C	NM_017274.1
Ratte	HMGCR	CGAGCAAAGTGATTACCCTGA GTC TTGGTTCAGTCCTGGAT	223	60°C	NM_013134.2
Ratte	LDLR	ACAGTGTCTCTCCCAAGTCCAA GCAAATGTGGATCTCGTCCTC	222	60C	NM_175762.2
Ratte	MDH1	CAGACAAAAGAAGAGGTTGCC CGTCAGGCAGTTTGTATTGG	206	60°C	NM_033235.1
Ratte	NIS	GATGTGTTCCAGGTTGTGGTAATG CAGGGTCAAAGTCCACTAGGTT	139	60°C	NM_052983.2

## Material und Methoden

---

Ratte	RPL13	CTTAAATTGGCCACGCAGCT CTTCTCAACGCTCTTGCTCTG	198	60°C	NM_031101.1
Ratte	SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA	191	60°C	NM_001276708.1
Ratte	SREBP-2	CTGACCACAAATGCCGGTAAT CTTGTGCATCTTGGCATCTG	204	60°C	NM_001033694.1
Ratte	TOP1	GAAGAACGCTATCCAGAAGG GCTTTGGACTCAGCTTCAT	137	60°C	NM_022615.1
Ratte	YWHAZ	GACGGAAGGTGCTGAGAAA GCAGCAACCTCAGCCAAGT	198	60°C	NM_013011.3

---

**Tabelle 4: Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionsvektoren\***

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Produktgröße (bp)	T <sub>A</sub>
nSREBP-1c-Hind III_F	TATAAGCTTATGGATTGCACATTTGAAGACA	1344	60°C
nSREBP-1c-BamH I_R	TAAGGATCCTCACATGCCCTCGGCTATGTGAA		
nSREBP-2-Hind III_F	TATAAGCTTATGGATGAGAACAGCGAGCT	1380	60°C
nSREBP-2-BamH I_R	TATGGATCCTCAGTCCGGTTCATCCTTGACC		

\* Die integrierten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

**Tabelle 5: Oligonukleotide für die Herstellung von Reportergenvektoren\***

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Produktgröße (bp)
hNISpro116-Hind III	<u>AGCTATGAGGGCGGGTGGGAGGCCCCAGCGGTCCTCG-</u> GACGCCCTCGGTGCTCAAGCGGGGAAGCTGGCAGGGGCCGAGGAGGCAG- GACGGGAGGGCGGGTGGGAGGATGCTCGGCA	116
hNISpro116-Xho I	<u>ICGATGCCGAGCATCCTCCCAC-</u> CCGCCCTCCCCGTCTCCCTCCCTCGGCCCTGCCAGCTTCCCCCGCTT- GAGCACGCAGGGCGTCCGAGGACGGCTGGCCCTCCGCACCCGCCCTCAT	116
hNISpro539-HindIII	<u>AGGAAGCTTGAGGGCGGGTGGGAGGATG</u>	539
hNISpro539-XhoI	<u>AAACTCGAGCCTGTC</u> <u>AACAGCAGACAGTG</u>	
hNISpro690-Hind III	<u>AGGAAGCTTCACTGTCTGCTGTTGACAGG</u>	690
hNISpro690-Xho I	<u>AAACTCGAGCCAGTAGACTT</u> <u>CTCCCACAC</u>	
hNISpro321-Hind III	<u>AGGAAGCTTGTGGGAGAAAGTCTACTGG</u>	321
hNISpro321-Xho I	<u>AAACTCGAGTCTCGAATTCTGGGACTCAA</u>	
hNISpro481-Hind III	<u>AGGAAGCTTGTGGGAGAAAGTCTCGAGAC</u>	481
hNISpro-Xho I	<u>AAACTCGAGCAGGAGGTACGCTCCAGCC</u>	

\* Die integrierten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

**Tabelle 6: Oligonukleotide für die Sequenzierung**

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz
pGL4 seq_1	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
pGL4 seq_2	GCATCTTCCATGGTGGCTTT

---



### Medien und Lösungen für die Mikrobiologie

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml, steril filtriert
Chloramphenicol-Stammlösung	34 mg/ml, in absolutem Ethanol, steril filtriert
LB-Medium	20 g/l, autoklaviert
LB-Agar	35 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 Glucose

### Puffer

DEPC-H <sub>2</sub> O	0,01% (v/v) DEPC Inkubation bei 37°C für 24 Stunden, autoklavieren
Lysis Buffer	100 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl
PBS (pH 7,4)	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Ponceau S-Lösung	0,5% (w/v)	Ponceau S
	1% (v/v)	Eisessig
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
RIPA	50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM	NaCl
	10%	Glycerin
	0,1%	SDS
	1%	Triton-X-100
	1 mM	EDTA
	0,5%	Desoxycholat
		ddH <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 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
TAE-Puffer (pH 8,5)	10x 2 M	Tris
	1 M	Eisessig
	50 mM	EDTA

## Material und Methoden

---

TBS-T (pH 7,5), 5x	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% (v/v) Tween 20
TEN (pH 8,0)	10 mM Tris 1 mM EDTA 0,1 M NaCl
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)
Transferpuffer nach Towbin <i>et al.</i> (1979) (pH ~8,3)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH nur kontrollieren
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris pH mit HCl einstellen

### 2.1.16 Reaktionssysteme

BC Assay protein quantitation Kit	Uptima-Interchim, Montlucon, Frankreich
beetle-juice	PJK, Kleinblittersdorf
DIG gel shift Kit, 2 <sup>nd</sup> generation	Roche, Mannheim
DIG wash and block buffer set	Roche, Mannheim
ECL Plus Kit	GE Healthcare, München
Illustra <sup>TM</sup> PuRetaq ready-To-Go <sup>TM</sup> PCR beads	GE Healthcare, München
KAPA <sup>TM</sup> SYBR® FAST Universal	Peqlab, Erlangen
MykoplasmentestVenor®GeM	Minerva Biolabs, Berlin

Nuclear extract Kit	Activ Motif, La Hulpe, Belgien
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extractation Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Renilla-Juice	PJK, Kleinblittersdorf
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

MCF-7 ist die Abkürzung für Michigan Cancer Foundation-7 und beschreibt eine Krebszelllinie der Mamma. Sie wurde 1970 aus metastasierten Zellen in einem Pleuraerguss einer 69-jährigen, weißen, kaukasischen Frau isoliert. Die Patientin litt an einem Adenokarzinom.

Es handelt sich um epitheliale Zellen, die in einem Monolayer wachsen (Abbildung 4). Die Zelllinie wurde 1973 von Herbert Soule *et al.* (1973) etabliert und stellt die am häufigsten verwendete Brustkrebszelllinie der Welt dar. MCF-7-Zellen exprimieren sowohl den Östrogen- als auch den Progesteron-Rezeptor exprimieren.

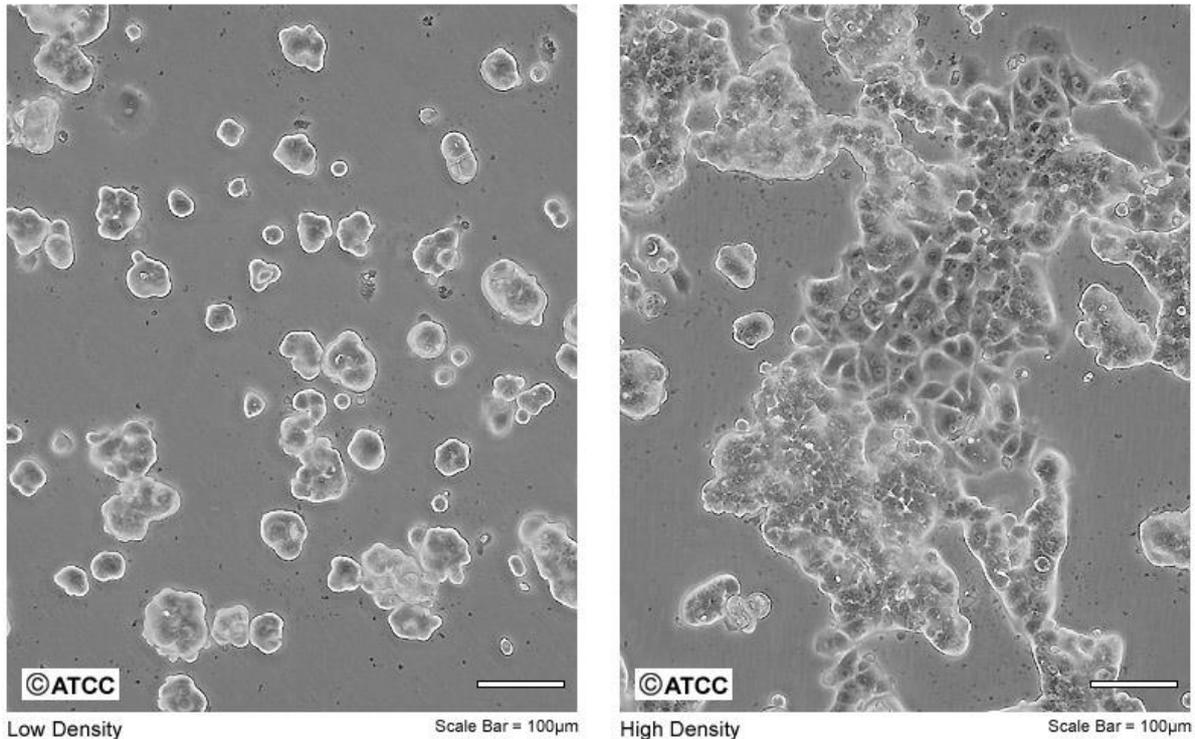
Die Zellen wurden in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Dabei wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Regelmäßig fand eine makroskopische sowie mikroskopische Untersuchung auf Verunreinigungen oder Mikroorganismen statt.

Danach wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml *Hank's balanced salt solution* (HBSS) gespült. Im Anschluss wurden 5 ml eines 0,05%-igen Trypsin-EDTA-Gemisches zugegeben und die Zellen für fünf Minuten im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurden 10 ml Medium zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Danach wurde das Gemisch bei 700 rpm für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert. Um die Zel-

len zu vereinzeln, wurde die Zellsuspension mehrfach auf- und abpipettiert. Hiernach wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Aus den Zellzahlen von vier ausgezählten Großquadraten wurde der Mittelwert berechnet, der der Zellzahl in 0,1  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entsprach. Abschließend wurden  $1,3 \times 10^5$  Zellen in einer neuen 75  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche subkultiviert.

ATCC Number: **HTB-22**  
Designation: **MCF-7**



**Abbildung 4: MCF-7-Zellen in Kultur (ATCC)**

### 2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zelllinie

Für die Kryokonservierung wurden die MCF-7-Zellen wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben trypsinisiert und die Zellzahl ermittelt.

Anschließend wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in Kryoröhrchen pipettiert, das Volumen mit Kulturmedium auf 1,5 ml aufgefüllt und 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Kryokonservierung zugegeben.

Danach wurden die Zellen für 24 Stunden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und erst darauffolgend bei  $-196^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zur Revitalisierung wurden die Kryoröhrchen mit den MCF-7-Zellen in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad aufgetaut und anschließend direkt in eine mit erwärmtem Zellkulturmedium befüllte Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

### **2.2.3 Mykoplasmentest**

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

Dazu wurde der Venor®GeM Mykoplasmentest (Minerva Biolabs) nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.2.4 Herstellung von Agar-Platten**

Zur Herstellung der Agar-Platten wurde LB-Agar in ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C und Zugabe eines Antibiotikums wurde der Nährboden unter der Sterilbank in Petri-Schalen gegossen und zum Aushärten stehen gelassen. Zum Abschluss folgte ein Trocknungsschritt unter der Sterilbank. Die Aufbewahrung erfolgte bei + 4°C bis zur weiteren Verwendung.

### **2.2.5 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryoten Zellen**

Nach der Behandlung wurde das Behandlungsmedium aus den Wells entfernt und die Platte bei -80°C tiefgefroren, oder die RNA wurde direkt im Anschluss gewonnen.

Für die RNA-Isolierung wurde TRIzol® Reagent (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden 150 µl Trizol je Well in die Kavitäten der 24-Well-Platte gegeben und für fünf Minuten unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Kavitäten in Eppendorf-*Tubes* überführt, wobei immer zwei Proben gepoolt wurden.

Danach wurden 60 µl Chloroform je Kavität zugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur für drei Minuten inkubiert. Hiernach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm.

Anschließend wurde die RNA-haltige, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-tube überführt und mit 150 µl Isopropanol präzipitiert. Nach erneutem Mischen und Inkubieren für 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte der nächste Zentrifugationsschritt. Die Proben wurden bei 4°C und 13.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

Die über dem RNA-Pellet befindliche Flüssigkeit wurde entfernt und die RNA durch Zugabe von 300 µl 75%-igem Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 4°C und 13.000 rpm, bevor das Ethanol entfernt wurde. Anschließend wurde das RNA-Pellet getrocknet.

Danach wurden das RNA-Pellet mit 15 µl DEPC-Wasser gelöst und für 10 Minuten bei 60°C und 900 rpm im Thermomixer comfort inkubiert.

Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **2.2.6 RNA-Isolierung aus Milchdrüsengewebe**

Für die Isolierung von RNA aus Milchdrüsengewebe der Ratte wurde das RNAeasy Lipid Tissue Mini Kit von Qiagen verwendet. Es wurden 35 - 40 mg je Probe eingewogen. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte nach den Herstellerangaben.

### **2.2.7 Photometrische Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde in ng/µl mittels NanoQuant plate™ am TECAN infinite M200 bei einer optischen Dichte von 260 nm und 280 nm gemessen. Darüber hinaus wurde der Quotient aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dies diente als Hinweis auf den Reinheitsgrad der gewonnenen DNA bzw. RNA.

### **2.2.8 cDNA-Synthese**

Die Synthese der *complementary* DNA (cDNA) diente der Umschreibung der isolierten einsträngigen RNA in doppelsträngige cDNA. Diese Umschreibung wird als *reverse* Transkription bezeichnet.

Um die gewonnene Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben, wurden 2,4 µg der isolierten RNA in DEPC-Wasser gegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 10 µl

ergab. Der so verdünnten RNA wurden 40 µl eines cDNA-Synthese-Mastermix zugegeben. Dieser Mix enthielt die zur Umschreibung benötigten Oligo-dT-*Primer* und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), sowie das Enzym Reverse Transkriptase.

Die exakte Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

Für die Synthese der cDNA wurde der Thermocycler (Biometra) verwendet.

Der Prozess dauerte eine Stunde bei 42°C; danach wurde die Reaktion bei 72°C über 10 Minuten abgestoppt.

Im Anschluss an die Synthese wurde die cDNA 1:2 mit DEPC-Wasser verdünnt.

Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix pro Reaktionsansatz**

Reagenzien	Volumen in µl
Oligo-dT-18 <i>Primer</i> , 100 mM	1
5-fach Puffer	5
dNTP, 10 mM	1,25
DEPC-Wasser	12,45
RevertAid <sup>TM</sup> reverse transkriptase 200 U/µl	0,3

### 2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine enzymatische Methode, mit der DNA *in vitro* vervielfältigt werden kann.

Um gezielt bestimmte DNA-Abschnitte (Zielgene) zu vervielfältigen, werden spezifische *Primer* eingesetzt. Die Amplifizierung wird in drei sich zyklisch wiederholende Schritte unterteilt.

Zunächst wird die doppelsträngige DNA thermisch bei 90 - 95°C denaturiert und die Polymerase somit aktiviert. Danach folgt das Annealing. Darunter versteht man die Hybridisierung der *Primer* an komplementäre DNA-Einzelstränge bei 50 - 70°C. Als

dritter Schritt schließt sich die Elongation der *Primer* an. Dabei werden die *Primer* durch die thermostabile DNA-Polymerase unter Verwendung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's) verlängert. Dieser Schritt läuft bei 72°C ab.

Durch die Wiederholung der einzelnen Schritte kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

### **2.2.9.1 konventionelle PCR**

Die konventionelle PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler (Biometra) unter Verwendung der Illustra™ PuReTaq Ready-To-Go™ PCR *beads*. Ein *bead* entspricht 10 mM Tris-HCL (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM eines jeden dNTP und 2,5 units puReTaq-DNA-Polymerase und wurde in einem Endvolumen von 25 µl gelöst.

Ein PCR-Ansatz enthielt 3 µl Template-DNA, ein *bead* und je 2 µl des Vorwärts- bzw. Rückwärts-*Primer* und wurde mit DEPC-Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Zur Vervielfachung der DNA wurden die Proben im Thermocycler folgenden Schritten unterzogen: als erstes erfolgte die Denaturierung über 5 Minuten bei 95°C. Dieser schloss sich ein 3-phasiger Zyklus mit 35 Wiederholungen an, der sich aus einer 30 Sekunden andauernden Denaturierungsphase bei 95°C, einer 30 Sekunden langen Annealingphase bei 60°C und einer 30 - 90 Sekunden andauernden Extensionsphase bei 72°C zusammensetzte. Final fand nochmals eine Elongationsphase über 5 Minuten bei 72°C statt. Nach Abschluss der Amplifikation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.10) zur Analyse der PCR-Produkte durchgeführt.

### **2.2.9.2 Real-time quantitative PCR**

Die Durchführung der qPCR erfolgte im Rotor-Gene Q (Qiagen) unter Verwendung des KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix for Bio-Rad iCycler™ nach Herstellerangaben. Die Messungen erfolgten in einem Einfach-Ansatz.

Für die RT-qPCR wurde die SYBR®Green-Methode verwendet. SYBR®Green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der eine sehr hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA aufweist. Durch Zugabe von SYBR®Green zu dem PCR-Ansatz wird es möglich, die Zunahme des doppelsträngigen PCR-Produkts in Echtzeit durch eine steigende Fluoreszenz zu detektieren.

Der Master-Mix für die qPCR setzte sich aus DEPC-Wasser, KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix, Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* zusammen. Die genaue Zusammensetzung ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Von diesem Master-Mix wurden 9 µl in die PCR-*tubes* pipettiert und anschließend 2 µl cDNA dazu gegeben.

Als Referenzgene fungierten bei den MCF-7-Zellen die Gene *ATP synthase subunit beta, mitochondrial* (ATP5B), *Cytochrom C1* (CYC1), *eukaryotic translation initiation factor 4A2* (EIF4A2), *Succinat Dehydrogenase Komplex subunit A* (SDHA), *Ubiquitin* (Ubc) und *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta* (YWHAZ). Für die Untersuchungen der Gewebeproben wurden die Referenzgene beta-Aktin, Calnexin (CANX), Malat-Dehydrogenase 1 (MDH1), ribosomales Protein L13 (RPL13), Topoisomerase (DNA) I (TOP1) und YWHAZ gemessen. Aus diesen wurden mittels der Software GeNorm jeweils die drei stabilsten ermittelt und anhand dieser die Normalisierungsfaktoren generiert.

Die relativen Genexpressionen wurden aus den gemessenen  $C_T$ -Werten berechnet. Die  $C_T$ -Werte sind eine theoretische Größe. Sie definieren den PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. In dieser Arbeit wurden die  $C_T$ -Werte bei einem Schwellenwert von 0,06 ermittelt und für die Berechnung der relativen Genexpressionen verwendet. Die ermittelten  $C_T$ -Werte wurden durch die Formel  $2^{-C_T}$  in relative Mengen umgewandelt und mittels der generierten Normalisierungsfaktoren korrigiert.

Die Effizienz der verwendeten Primer wurde in Vorexperimenten ermittelt und bei einer Effizienz von mindestens 0,75 als geeignet erachtet. Zur Berechnung der Primereffizienz wurde die Formel  $10^{(-1/\text{Slope})}-1$  verwendet.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.10) auf ihre Größe und Qualität überprüft.

**Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Mastermix für eine Probe**

Reagenzien	Menge (in $\mu\text{l}$ )
DEPC-Wasser	3,6
KAPA <sup>TM</sup> SYBR®FAST qPCR MasterMix	5
Vorwärts-Primer	0,2
Rückwärts-Primer	0,2

### 2.2.10 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um negativ geladene Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Sie dient der Überprüfung von gebildeten PCR-Produkten und wurde aus diesem Grund nachfolgend an eine PCR durchgeführt. Je nach erwarteter Produktgröße wurde die Konzentration des Agarose-Gels gewählt, denn je nach Anteil der Agarose unterscheidet sich der Vernetzungsgrad des Gels und somit auch dessen Siebeffekt.

Für die qualitative Beurteilung der mittels PCR gebildeten Produkte wurden Agarose-Gele von 1 - 2 % eingesetzt. Das Gel bestand aus Agarose und 1x TAE-Puffer.

Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst und anschließend beides aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf 70°C wurden 3  $\mu\text{l}$  GelRed Nucleic Acid Gel Stain zugegeben und das Gel in den Gelelektrophoreseschlitten gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in TAE-Puffer equilibriert und die Proben aufgetragen. Zu jeder Probe wurde 5x Gelladepuffer (5x Green GoTaq® Flexi Buffer) hinzugefügt. Außerdem wurde zusätzlich ein Größenmarker aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt durchgeführt. Zur anschließenden Analyse wurde das Gel unter UV-Licht (GeneFlash) ausgewertet.

### 2.2.11 Gewinnung genomischer DNA aus MCF-7-Zellen

Um genomische DNA aus humanen MCF-7-Zellen zu gewinnen wurden die Zellen in einer 75  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen für sechs Minuten bei

37°C inkubiert. Anschließend wurde Medium zur Inaktivierung des Trypsins zugegeben und die Zellsuspension für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Als nächstes wurde das gewonnene Zellpellet mit 1x *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in einem Gemisch aus 2,5 µl Protease K und 500 µl Lysis Buffer über Nacht im HybriLinker™ inkubiert. Am nächsten Tag schloss sich ein Zentrifugationsschritt von fünf Minuten bei 6.000 rpm an. Der Überstand wurde abgenommen, die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt und das Gemisch für 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die gewonnene DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen; anschließend erfolgte die Trocknung des DNA-Pellets und schließlich die Zugabe von 70 µl Elution Buffer (Qiagen) zum Lösen der genomischen DNA. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.12 Gewinnung der cytosolischen sowie der nuklearen Proteinfraction**

Nach den Inkubationsversuchen wurde die cytosolische Proteinfraction (CPF) und die nukleare Proteinfraction (NPF) aus den Zellen gewonnen.

Drei Stunden vor der Proteingewinnung wurden die Zellen mit 25 µg/ml des Calpain-Inhibitors N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (ALLN) behandelt. Dies wirkt einem gesteigerten Abbau der SREBPs entgegen (Wang *et al.*, 1994; Hua *et al.*, 1996).

Die Proteinfractionen wurden aus 6-Well-Platten gewonnen, wobei immer zwei Wells gepoolt wurden.

Dazu wurde das Nuklear Extract Kit von Active Motif nach Herstellerangaben verwendet und an die Zelllinie angepasst.

Zunächst wurden die Zellen mit eiskaltem PBS/Phosphatase Inhibitor gewaschen. Hiernach wurden nochmals 0,5 ml PBS/Phosphatase Inhibitor auf den Zellrasen gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 4°C und 500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde mit 50 µl Hypotonic Buffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden 5 µl Detergens zugegeben und die Suspension sorgfältig durchmischt. Danach erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden bei 4°C und 14.000 rpm. Der Überstand enthielt die cytosolische Frak-

tion und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gewonnene cytosolische Proteinfraction wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Das entstandene Pellet wurde zur Gewinnung der nuklearen Proteinfraction verwendet.

Dazu wurde dieses mit  $15\ \mu\text{l}$  Complete Lysis Buffer resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis auf dem Horizontalschüttler bei 150 rpm inkubiert.

Hiernach wurde die Suspension gründlich durchmischt und anschließend für 10 min bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der entstandene Überstand entsprach der nuklearen Proteinfraction, er wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Für die Gewinnung der beiden Proteinfractionen aus Rattenmilchdrüsen wurde ebenfalls das Nuklear Extract von Active Motif verwendet und die Mengen der benötigten Puffer entsprechend der Herstellerangaben angepasst.

### 2.2.13 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Zellysate und der Gewebelysate wurde mit dem Bicinchoninsäure assay (BC Assay) protein quantitation kit (Uptima-Interchim) nach Herstellerangaben bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Messung.

Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  in alkalischem Milieu durch Proteine. Je zwei Moleküle Bicinchoninsäure assay Reagent A (BCA) reagieren mit einem  $\text{Cu}^{+}$ -Ion und bilden einen wasserlöslichen, violetten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. Diese Reaktion ist temperatur- und zeitabhängig. Die Absorption ist direkt proportional zu der Proteinkonzentration.

Für deren Berechnung wurden *bovine serum albumin*- (BSA-) Standards von  $0\ \mu\text{g/ml}$  bis  $1000\ \mu\text{g/ml}$  in Dreifachbestimmung mitgeführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in einer Doppelbestimmung.

Die Reaktionslösung A bestand aus  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und Bicinchoninsäure, die Reaktionslösung B aus Kupfersulfat; beides wurde in einem Verhältnis von A:B = 50:1 gemischt.

Je 25 µl der Proben bzw. der Standards wurden in eine Kavität einer 96-Well-Platte pipettiert und anschließend je 200 µl des Reaktionslösungsgemisches zugegeben. Danach erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei 37°C.

Die Absorption bei 562 nm wurde mittels TECAN infinite M200 gemessen und die Proteinkonzentration in µg/ml mit Hilfe einer Eichgeraden berechnet.

Für die SDS-PAGE wurden die Proben aus dem Zellversuch in einem Verhältnis von 1:25 verdünnt, die Proben aus dem Tierversuch 1:300 (CPF) bzw. 1:70 (NPF).

### **2.2.14 SDS-PAGE**

SDS-PAGE steht für *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* oder auf Deutsch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Es handelt sich um eine Methode zur Proteinanalyse, mit der Proteingemische im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Als Matrix dient ein diskontinuierliches Gel auf Basis von Polyacrylamid.

Dieses diskontinuierliche Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich in ihrem pH-Wert und ihrem Vernetzungsgrad, der abhängig von der Menge des eingesetzten Acrylamids ist.

Abhängig von der Größe des Zielproteins werden Trenngele mit verschiedenen Prozentsätzen an Acrylamid verwendet. Bei den durchgeführten Versuchen wurden 8% und 12,5% Trenngele verwendet. Die Zusammensetzung von Trenn- bzw. Sammelgel ist Tabelle 9 bzw. 10 zu entnehmen.

Der Vorteil des SDS-PAGE gegenüber der nativen Gelelektrophorese besteht darin, dass sich das SDS, ein anionisches Tensid, an die Proteine anlagert und diesen somit eine konstant negative Ladung verleiht. Durch diese negative Ladung kommt es zu einer Abstoßung und folglich zu einer Linearisierung der Proteine.

Die verwendete Proteinkonzentration, das Probenvolumen und die Menge an Ladebuffer sind in der Tabelle 11 ersichtlich.

Hiernach wurden die Proben für den Nachweis der SREBP-1 und SREBP-2 für fünf min bei 95°C, die Proben für den NIS-Nachweis für 30 min bei 37°C im Thermo-Shaker inkubiert um eine Proteindenaturierung zu erreichen.

Neben den Proben wurde ein Protein-Größenmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) aufgetragen, anhand dessen die Proteine durch ihr Molekulargewicht identifiziert werden können.

Nach dem Auftragen von Proben und Protein-Größenmarkern, sowie dem Befüllen der Elektrophorese-Kammer mit SDS-Laufpuffer, erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 100 V und 12 mA im Sammelgel bzw. bei 200 V und 20 mA im Trenngel.

**Tabelle 9: Trenngel für ein Gel**

	12,5 %	8 %
Acrylamid	1,562 ml	1 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml	1,25 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,138 ml	2,7 ml
SDS (10 %)	50 µl	50 µl
APS	50 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 µl

**Tabelle 10: Sammelgel für ein Gel**

Acrylamid	150 µl
Sammelgelpuffer	375 µl
ddH <sub>2</sub> O	0,95 ml
SDS (10 %)	15 µl
APS	15 µl
TEMED	4 µl

**Tabelle 11: Probenvorbereitung für die SDS-PAGE**

Nachweis SREBP-1	10 - 15 µg NPF aufgefüllt mit Lysis Buffer auf ein Endvolumen von 15 µl; versetzt mit 5 µl Roti®-Load; Inkubation im Thermoshaker für 5 Minuten bei 95°C
Nachweis SREBP-2	10 - 15 µg NPF aufgefüllt mit Lysis Buffer auf ein Endvolumen von 15 µl; versetzt mit 5 µl Roti®-Load; Inkubation im Thermoshaker für 5 Minuten bei 95°C
Nachweis NIS	15 µg Protein (CPF) aufgefüllt mit Hypotonic Buffer auf ein Endvolumen von 10 µl; versetzt mit 10 µl Roti®-Load; Inkubation im Thermoshaker für 30 Minuten bei 37°C

---

### 2.2.15 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, um gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf Nitrocellulosemembranen zu übertragen, qualitativ und quantitativ zu bestimmen und zu identifizieren.

Für den Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran wurde das *semi-dry* Verfahren genutzt.

Dabei wurde das Polyacrylgel auf eine Nitrocellulosemembran gelegt und beides sandwichartig zwischen *fiber pads* und *blotting* Papier geschichtet.

Die Membran, die *fiber pads* und das *blotting* Papier wurden vor ihrer Verwendung in vorgekühltem Transferpuffer äquilibriert.

Der Proteintransfer erfolgte über 90 Minuten bei 100 V und 350 mA.

Bei dem Transferpuffer handelte es sich bei den SREBP-Blots um den Transferpuffer nach Laemmli (1970) und bei dem NIS-Blot um den Transferpuffer nach Kaminski *et al.* (1994).

Nach dem Proteintransfer wurde der Erfolg durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft. Nach dem Entfärben der Nitrocellulosemembran mit 1x *Tris-buffered saline* + Tween 20 (TBST) wurde diese mit einem Gemisch aus 1x TBST

und 5% Milchpulver überschichtet und für eine Stunde auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Ziel dieses Inkubationsschrittes war es, die freien Bindungsstellen zu blockieren.

Danach wurde der spezielle Primärantikörper in den jeweiligen Konzentrationen (Tabelle 12) zugegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert.

**Tabelle 12: Antikörper und deren Verdünnungen für den Immunoblot**

---

anti- $\beta$ -Aktin IgG (Maus, monoklonal)	1:100
anti-SREBP-1 IgG (Maus, monoklonal)	1:200
anti-SREBP-2 IgG (Kaninchen, polyklonal)	1:5.000
anti- <i>mouse</i> IgG (Ziege, polyklonal, HRP)	1:10.000
anti- <i>rabbit</i> IgG (Ziege, polyklonal, HRP)	1:10.000

---

Die Zugabe des Sekundärantikörpers erfolgte am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST. Nach 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde nicht gebundener Sekundärantikörper ebenfalls durch dreimaliges Waschen mit 1x TBST entfernt.

Direkt danach erfolgte die Sichtbarmachung der Proteinbanden mit dem ECL Plus Kit (GE HealthCare).

Zur Auswertung wurde die Software Gene-Tools von Syngene verwendet.

Ich habe auch versucht, das NIS-Protein mit einem polyklonalen human *high-affinity* anti-NIS Antikörper, sowie mit einem monoklonalen NIS-AK von Thermo Scientific nachzuweisen. Diese Untersuchungen erbrachten aber aus technischen Gründen keine auswertbaren Resultate.

Für die Bereitstellung des polyklonalen *high-affinity* anti-hNIS bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Nancy Carrasco (Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut).

### **2.2.16 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli***

Die plasmidtragenden *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden in antibiotikahaltigem *lysogeny broth* (LB-) Medium vermehrt. Je nach Selektionsmarker des Plasmids oder des *bacterial artificial chromosome* (BAC-) Klons wurde entweder Ampicillin (50 µg/ml) oder Chloramphenicol (34 µg/ml) eingesetzt. Die Vermehrung der Bakterien war die Voraussetzung zur Plasmidisolierung. Für die Miniplasmidisolierung (Kapitel 2.2.24) wurden die Bakterienkolonien zunächst auf Agarplatten angezüchtet. Davon wurde eine Kolonie selektiert, diese in 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium angeimpft und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 µl der Bakteriensuspension für die Miniplasmidpräparation entnommen. Die Lagerung der Suspension bei 4°C kann für maximal 4 Wochen erfolgen.

Ein mittels Miniplasmidpräparation gewonnener und positiv sequenzierter Bakterienklon diente als Grundlage für eine Midiplasmidpräparation (Kapitel 2.2.25). Dabei wurden 3 µl Bakterienkultur aus der Miniplasmidpräparation in 100 ml antibiotikahaltigem LB-Medium angeimpft und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Um die so gewonnenen *E. coli* dauerhaft verwenden und lagern zu können, wurde die Bakteriensuspension vorsichtig mit dem gleichen Volumen an 50% Glycerol (v/v) vermischt und bei -80°C eingefroren.

Der BAC-Klon RP11-343E23 (BACPAC Resources, Oakland, USA) wurde in einer Flüssigkultur vermehrt und anschließend auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht wurden einzelne Kolonien gewonnen und erneut in einer Flüssigkultur mit LB-Medium vermehrt. Der BAC-Klon wurde auf das Vorliegen eines Missklons untersucht (Kapitel 2.2.20) und nachdem dies ausgeschlossen wurde, 1:1 mit Glycerin (50%) vermischt und bei -80°C für die Stammhaltung gelagert.

### **2.2.17 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli***

Um dauerhaft elektrokompetente *E. coli* zur Verfügung zu haben, wurden 10 µl eines *E. coli* Top 10-Glycerolstocks in 5 ml antibiotikafreies LB-Medium angeimpft und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert. Danach wurde diese vorinkubierte Bakteriensuspension in 100 ml antibiotikafreies LB-Medium angeimpft, im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 erreicht war und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach schlossen sich zwei Zentrifugati-

onsschritte für jeweils 15 Minuten bei 4°C und 3.000 rpm an, nachdem jeweils der Überstand verworfen und das Zellpellet mit eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert wurde. Nach einem weiteren Mal Zentrifugieren erfolgte die Resuspension mit 5 ml eiskaltem Glycerin (10%). Nach einem letzten Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 4°C und 3.000 rpm wurde die Bakteriensuspension final in 1 ml eiskaltem Glycerin (10%) gelöst und zu je 100 µl aliquotiert. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte nach Schockgefrierung bei -80°C.

### **2.2.18 Transformation von *Escherichia coli* mittels Elektroporation**

Die Transformation mittels Elektroporation ist eine physikalische Möglichkeit, um Fremd-DNA in Prokaryoten zu schleusen. Durch die kurzzeitige Erzeugung eines elektrischen Feldes wird die Zellmembran permeabel und lässt die rekombinante DNA in die Zelle eindringen.

Es wurden 50 µl elektrokompetente *E. coli* langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer dreiminütigen Inkubation auf Eis wurde das *E. coli*-Ligationsansatz-Gemisch in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 3 kV. Direkt danach wurden dem Gemisch 500 µl *super optimal broth with catabolite repression* (SOC-) Medium zugesetzt und es wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Hiernach erfolgte eine Inkubation über eine Stunde bei 37°C und 225 rpm im Inkubationsschüttler. Nach dem Ausstreichen des Transfektionsansatzes auf antibiotikahaltigen Agarplatten und einer Inkubation bei 37°C über Nacht konnten plasmidtragende *E. coli* selektiert werden.

### **2.2.19 Präparation von DNA aus einer Agarosematrix**

Um ein bestimmtes DNA-Fragment aus einem DNA-Gemisch isolieren zu können, bedient man sich einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese. Diese erfolgt nach der Spaltung mittels Restriktionsenzymen (Kapitel 2.2.20) und läuft analog zu der analytischen Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.10) ab, wobei alle verwendeten Materialien und Puffer dazu gereinigt bzw. neu angesetzt wurden. Nachdem die Elektrophorese beendet ist, wird die benötigte DNA-Bande unter einem horizontalen UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einem sterilen Skalpell

herausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarosematrix erfolgt mit dem QIAquick® GelExtraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

### 2.2.20 Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an spezifischen Basensequenzen schneiden und werden daher häufig auch als molekulare Scheren bezeichnet. Die in der Forschung am häufigsten verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden die DNA an einer ganz spezifischen Erkennungssequenz, die in der Regel eine palindromische Sequenz von vier, sechs oder acht Basenpaaren aufweist. Der enzymatische Schnitt durch die DNA kann entweder gerade oder versetzt sein. Bei der Nomenklatur der Restriktionsendonukleasen steht der erste Buchstabe für die Gattung, der zweite und dritte Buchstabe für die Art und daran schließen sich Namenszusätze oder die chronologische Abfolge der Entdeckung an. Die Restriktionsendonukleasen werden häufig in der Klonierung verwendet, um DNA-Fragmente zu identifizieren. Anhand von Restriktionskarten, die für Genome und Plasmide existieren, können die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen erkannt und somit die Länge von DNA-Fragmenten bestimmt werden (Mülhardt, 2009).

Für den Restriktionsverdau des BAC-Klons wurde beispielsweise die Restriktionsendonuklease EcoRI verwendet. Hierbei handelt es sich um das erste Restriktionsenzym, das in dem Stamm *E. coli* R (rough) entdeckt wurde. Es schneidet DNA an der palindromischen Sequenz 5'-GAATTC-3' und verursacht aufgrund eines versetzten Schnittes sogenannte *sticky ends*.

Die Spaltung durch verschiedene Restriktionsendonukleasen erfolgte entweder zu analytischen oder präparativen Zwecken.

Der Ansatz für eine Analyse mittels Restriktionsendonukleasen enthielt 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl), 3 µl 10x Restriktionspuffer, 1 µl DNA und wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Der Ansatz für eine präparative Analyse bestand aus 1,5 µl Restriktionsenzym, 5 µl 10x Restriktionspuffer, 3 µl DNA und wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 40 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde jeweils für 2-4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei der Verwendung von zwei Restriktionsendonukleasen mit kompatiblen Puffersystemen konnte die DNA mit beiden Enzymen zeitgleich inkubiert werden. Benötigten die Restriktionsendonukleasen zwei

verschiedene Puffersysteme, so wurde zunächst mit einem Enzym über ein bis zwei Stunden gespalten und der Ansatz im Anschluss für 10 Minuten auf 60°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das zweite Enzym mit dem entsprechenden Puffer zugegeben und dieser Ansatz für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die hydrolysierte DNA mittels analytischer (Kapitel 2.2.10) oder präparativer Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.19) aufgetrennt.

### **2.2.21 PCR-Aufreinigung**

Die PCR-Aufreinigung oder *purification* dient der Befreiung der DNA von PCR-Rückständen, wie Enzymen, *primern*, dNTPs und Salzen. Sie wird im Anschluss an die PCR oder nach der DNA-Isolierung aus einer Agarosematrix durchgeführt. Für die Durchführung wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### **2.2.22 DNA-Ligation**

Die Ligation der DNA dient dem Verknüpfen der Insert-DNA mit der Vektor-DNA unter Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende der zu ligierenden DNA-Stränge. Vorbereitend auf die Ligation wurden beide DNA-Stränge mittels identischer Restriktionsenzyme hydrolysiert (Kapitel 2.2.20). Für die Ligation wurde ein Ansatz bestehend aus 100 ng/µl Vektor-DNA, 100 ng/µl Insert-DNA, 1 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl) mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **2.2.23 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die Nukleotidabfolge der generierten Plasmid-DNA zu überprüfen. Die generierte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe sequenzspezifischer *primer* (Tabelle 6) der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) sequenziert und mit dem Programm SNAStar/EditSeq (DNASTAR, Inc., Madison, USA) analysiert.

### **2.2.24 Miniplasmidpräparation**

Das Prinzip der Miniplasmidpräparation beruht auf einer alkalischen Lyse und dient der Gewinnung kleiner Mengen an DNA, die dann qualitativ analysiert werden kann. Voraussetzung für die Miniplasmidpräparation ist die vorherige Anzucht von *E. coli*, wie in Kapitel 2.2.16 beschrieben.

Im ersten Schritt wurden die Bakterien mittels Zentrifugation über 10 min bei 5.000 rpm pelletiert und anschließend in 250 µl Puffer 1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 wurden die Zellen unter Schwenken bis zum Erhalt einer klaren, viskösen Flüssigkeit lysiert. Danach wurde die Reaktion mit Puffer 3 abgestoppt und die Lösung für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Fällern der DNA in 850 µl absoluten Ethanol überführt und gut durchmischt. Durch erneutes Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 30 min wurde die DNA pelletiert. Daraufhin erfolgte ein Waschschriff mit 70% Ethanol und die Trocknung in einer Vakuumzentrifuge für 5 min bei 45°C. Als letztes wurde das Pellet mit 50 µl *elution* Puffer resuspendiert. Zur Überprüfung der gewonnenen DNA schloss sich daraufhin ein analytischer Verdau mittels Restriktionsendonukleasen (Kapitel 2.2.20) an.

### **2.2.25 Midiplasmidpräparation**

Um größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde die Midiplasmidpräparation angewendet. Die gewonnene DNA diente der Generierung von Reportergenvektoren und Plasmid-DNA für die Transfektion. Hierfür wurde das Anionen-Austauscher enthaltene Midi Plasmid Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde abschließend in 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.26 Vorversuch zur Ermittlung einer geeigneten Kontrollgruppe**

Es wurde ein Vorversuch zur Ermittlung einer geeigneten Kontrollgruppe durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen Lösungsmitteln (Ethanol und DMSO) einzeln und in Kombination behandelt. Anschließend wurde RNA gewonnen und die Proben mittels PCR analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass kein systematischer Einfluss durch die Lösungsmittel besteht.

## 2.3 In vitro-Versuche

### 2.3.1 Inkubationsversuch mit 25-Hydroxycholesterin

Bei diesem Inkubationsversuch wurden die MCF-7-Zellen in 24- bzw. 6-Well-Platten bei einer Konfluenz von 70 % mit dem Behandlungsmedium versetzt.

Das Behandlungsmedium bestand aus *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) und fetalem Kälberserum (FKS). Die Zellen jedes Wells wurden mit 5  $\mu\text{M}$  25-Hydroxycholesterin (25-HC) behandelt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgten ein Mediumwechsel und eine zweite Behandlung mit 25-HC, worauf sich eine erneute Inkubation von 24 Stunden bei 37°C anschloss.

Nach der Studie von Kogai *et al* (Kogai *et al.*, 2000) wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  atRA behandelt, um eine ausreichende NIS-Expression zu erzielen. Die Retinsäure bewirkt über ein Heterodimer aus RAR und RXR eine direkte Stimulation der NIS-mRNA-Expression (Kogai und Brent, 2012).

Unter Berücksichtigung der Studie von Hua *et al.* wurden die Zellen der 6-Well-Platten, die der Proteingewinnung dienten, drei Stunden vor Zellaufschluss mit 25  $\mu\text{g/ml}$  ALLN behandelt (Hua *et al.*, 1996). Dabei handelt es sich um einen Calpain-Inhibitor, der einer gesteigerten Degradation der SREBPs entgegenwirkt (Wang *et al.*, 1994).

### 2.3.2 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen natürlichen Mechanismus der Genregulation, der insbesondere bei der Abwehr von Viren beobachtet werden kann. In der Forschung wird die RNAi vor allem zur Aufklärung von unbekannt Funktionen bekannter Gene angewendet. Der Mechanismus beruht auf einer genspezifischen, reversiblen, posttranskriptionalen Gen-Stilllegung. Die Beeinflussung des Gens und somit seine Stilllegung wird durch Doppelstrang-RNA, die eine bestimmte Länge nicht unterschreiten darf, herbeigeführt. Das Kennzeichen der RNAi ist ihre Spezifität (Tuschl *et al.*, 1999).

Die RNAi stellt eine Methode zum *gene-silencing* dar, es kommt also zur *downregulation* eines bestimmten Gens. Dazu wird eine siRNA, also ein Stück doppelsträngige

RNA, in die Zielzelle eingebracht (Transfektion). Dort wird die siRNA enzymatisch in kleine Stücke zerlegt. Diese binden an komplementäre Sequenzen der mRNA und führen so zu deren Abbau.

Dieser Mechanismus greift erst nach der Transkription in die Genregulation ein und wird deshalb auch als posttranskriptionelles *gene-silencing* bezeichnet.

Bei dieser Art der Transfektion handelt es sich um eine transiente Form, da das eingebrachte Genmaterial nicht in das Genom eingebaut wird.

Für diesen Versuch wurden 24 Stunden vor der Transfektion  $0,2 \times 10^6$  Zellen je Well in einer 6-Well-Platte bzw.  $6 \times 10^4$  Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 60 - 70 % erfolgte die Transfektion mittels Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen). Es wurden sequenzspezifische siRNA-Duplexe in einer finalen Konzentration von 50 nM verwendet.

Während des gesamten Versuches wurde antibiotikafreies Medium verwendet.

Vor der Transfektion wurde das verbrauchte Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Danach wurde der Transfektionsansatz zugegeben. Bei den 6-Well-Platten betrug das Volumen des Transfektionsansatzes 500 µl je Well, bei den 24-Well-Platten 100 µl.

Nach einer Inkubation bei 37°C über 24 Stunden endete die Transfektionszeit, das Medium mit dem Transfektionsansatz wurde entfernt und frisches Medium zugegeben.

Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C über 24 bzw. 48 Stunden, bevor die Proteinfractionen, bzw. die Gesamt-RNA, gewonnen wurden.

### **2.3.3 Überexpression**

Um eine Genüberexpression zu erreichen, wurden die MCF-7-Zellen mit einem Expressionsvektor transfiziert. Dazu wurde FuGene® 6 Transfection Reagent (Promega) verwendet. Es wurden für die RNA-Isolierung  $6 \times 10^4$  Zellen in einer 24-Well-Platte und für die Proteingewinnung  $2 \times 10^5$  Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und diese in ihrer exponentiellen Wachstumsphase bei ca. 70 - 80% Konfluenz behandelt. Der Transfektionsansatz bestand aus FuGene® 6 Transfection Reagent (Promega) und 500 ng Plasmid-DNA der jeweiligen Expressionsvektoren in einem ange-

passten Volumen an DMEM-Medium. Der Transfektionsansatz wurde nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 480 µl antibiotikafreies Medium je Well zugegeben und mit 20 µl Transfektionsansatz versetzt. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, in deren Anschluss das Medium abgesaugt und durch 500 µl antibiotikafreies Medium ersetzt wurde. Nach einer weiteren Inkubationsphase über 24 Stunden schloss sich die RNA-Isolierung bzw. die Gewinnung der Proteinfractionen an.

### 2.3.4 Iodid-Uptake

Neben dem aktiven Transport von Iodid durch den NIS kommt es auch zu einer passiven Diffusion des Ions in die Zelle. Deshalb ging es bei diesem Versuch darum, den aktiv durch den NIS aufgenommenen Anteil an Iod in die Zelle zu messen. Die Versuchsdurchführung richtete sich nach Studien von Luci *et al.* (2006) und Dohán *et al.* (2006) und wurde nur geringfügig geändert. Es wurde das radioaktive Isotop Na<sup>125</sup>I eingesetzt. Durch dieses radioaktiv markierte Iodid kann der selektive Transport von Iodid durch den NIS gemessen und quantifiziert werden. Als Negativkontrolle wurde Kaliumperchlorat eingesetzt, ein selektiver und kompetitiver NIS-Inhibitor (Tonacchera *et al.*, 2004). Werden die Zellen mit Kaliumperchlorat behandelt, kann kein Iodid mehr über den NIS aufgenommen werden. Somit bleibt nur der Iodid-Einstrom durch Diffusion bestehen. Ist dieser Wert bekannt, kann daraus die NIS-spezifische Iod-Aufnahme errechnet werden.

Für den Versuch wurde eine 24-Well-Platte mit  $6 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 60 - 70% wurden den Zellen verschiedene Behandlungsmedien zugegeben (Tabelle 13) und die Zellen für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Hiernach wurden das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Na<sup>125</sup>I-Lösung (0.3 µCi Na<sup>125</sup>I/ml HBSS), bzw. von 0,5 ml mit Kaliumperchlorat (KClO<sub>4</sub>) versetzter Na<sup>125</sup>I-Lösung bei den Kontrollwells. Die KClO<sub>4</sub>-Endkonzentration lag bei 1 mM. Als nächstes folgte eine 60-minütige Inkubation in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal kurz mit eiskalter HBSS gespült. Die nächsten Schritte bestanden aus der Lyse der Zellen durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Natriumhydroxid (NaOH) (0,5 M) und einer

Inkubation über 30 Minuten auf dem Horizontalschüttler. Danach erfolgte die Überführung des radioaktiven Zelllysats in *counter vials* und die Messung der Gamma-Strahlung mit dem *gamma counter* (Perkin Elmer).

**Tabelle 13: Behandlungsmedien für den Iodid-Uptake**

Kontrolle	DMEM + 10% FKS + 0,5 µl DMSO
NIS-Stimulation	DMEM + 10% FKS + 1 µM atRA
Hemmung der SREBP-Ausreifung	DMEM + 10% FKS + 5 µM 25-HC
NIS-Stimulation + Hemmung der SREBP-Ausreifung	DMEM + 10% FKS + 1 µM atRA + 5 µM 25-HC

### 2.3.5 Reportergen Assay

Reportergen-Assays werden besonders häufig zur Untersuchung von Promotoren eingesetzt. Ein Reportergen ist ein Protein, dessen Expressionsprodukt einfach und mit einer hohen Sensitivität nachgewiesen werden kann. Indem das Reportergen hinter den regulatorischen Bereich, also die Promotorregion, kloniert wird, erreicht man die Regulation des Reportergens durch den zu untersuchenden Promotor. In dieser Arbeit wurde als Reportergen die Dual-Luciferase<sup>TM</sup> von Promega verwendet. Die Besonderheit der Dual-Luciferase<sup>TM</sup> besteht darin, dass zwei verschiedene Luciferasen gleichzeitig transfiziert werden. Die erste codiert für die Firefly-Luciferase eines amerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) und dient dem Nachweis des zu untersuchenden Promotors. Die zweite codiert für die Quallen-Luciferase (*Renilla reniformis*), steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors und dient der Standardisierung. Firefly-Luciferasen katalysieren in zwei Schritten die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin unter Freisetzung von Licht und Verwendung von Adenosintri-phosphat (ATP). Im Unterschied dazu benötigen Renilla-Luciferasen kein ATP für die Reaktion. Das bei der Biolumineszenzreaktion emittierte Licht kann gemessen werden. Dazu wird zunächst die Firefly-Luciferaseaktivität gemessen. Danach erfolgt

die Zugabe von Renilla-Puffer, die die Firefly-Reaktion abstoppt und gleichzeitig die Renilla-Reaktion aktiviert, die dann gemessen werden kann.

Wie aus dem Versuchsdesign in Abbildung 22 hervorgeht, wurde der zu untersuchende Bereich des hNIS-Promotors in verschiedene Abschnitte unterteilt, die jeweils in den Luciferase-Reporter-genvektor pGL4.10 bzw. pGL4.23 (Promega) kloniert wurden. Um die Luciferaseaktivitäten anhand der Biolumineszenz zu erfassen wurde das Beetle-Juice-Kit (PJK) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Reporter-genstudien wurden die MCF-7-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70% transfiziert. Der Transfektionsansatz bestand aus je 50 ng Plasmid-DNA der generierten Reporter-genkonstrukte, 50 ng der Expressionsvektoren für SREBP-1c, bzw. SREBP-2 und 5 ng Renilla-Luciferase und hatte ein Endvolumen von 5 µl je Well. Die Mengen an Behandlungsmedium und FuGENE®6 wurden an die Konzentrationen der Plasmid-DNA angepasst. Die Herstellung des Transfektionsansatzes erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Unmittelbar vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurden 95 µl frisches Behandlungsmedium auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 37°C wurde das alte Medium abgesaugt und durch 200 µl frisches Behandlungsmedium ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation über 24 Stunden bei 37°C, an die sich der Luziferase-Assay anschloss. Nach Ende dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 25 µl 1x *passive lysis buffer* (PLB) (Promega) für 20 Minuten auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde die Aktivität mittels Multimode Reader (Berthold Technologies) gemessen.

## 2.4 In vivo-Versuche

### 2.4.1 Behandlung von *Rattus norvegicus* mit konjugierten Linolsäuren (CLA)

Das Probenmaterial stammt aus dem Versuch JLU No. 480\_M, der am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU durchgeführt wurde.

28 weibliche Sprague-Dawley Ratten wurden an ihrem ersten Trächtigkeitstag zufällig in zwei Gruppen aufgeteilt und bis zwei Tage vor dem erwarteten Geburtstermin zu je zwei Tieren pro Käfig (Macrolon Käfig Typ 4) untergebracht. Während der Laktation wurden die Ratten inkl. Wurf einzeln gehalten. Zwei Tiere der Kontrollgrup-

pe schieden im Verlauf des Experiments aus. Während des gesamten Versuchs herrschte eine Temperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , eine relative Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 10\%$ , eine Ventilation von 20/h und ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden. Wasser und Futter standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Maximal drei Tage *post partum* wurde die Wurfgröße auf 8 Rattenjunge pro Muttertier standardisiert.

Die Versuchsdiet wurde nach den Empfehlungen des *American Institute of Nutrition* (AIN) (AIN-93G; Reeves et al. 1993) zusammengestellt und über die gesamte Dauer der Trächtigkeit und während der zwei ersten Laktationswochen gefüttert, insgesamt über fünf Wochen. Die Bestandteile der basalen Diät sind in Tabelle 14 ersichtlich.

In der Diät für die CLA-supplementierte Gruppe (CLA-Gruppe) wurde das Sonnenblumenöl durch das CLA-Supplement Lutalin® (BASF, Ludwigshafen) ersetzt. In der Kontrollgruppe ersetzte Linolsäure die beiden CLA-Isomere, welche in der CLA-Diät supplementiert wurden. Die Fettsäure-Zusammensetzung der Diät und der verfütterten Öle ist in der Tabelle 15 zu sehen.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Versuchsdieten (g/kg)**

Futterkomponenten	Kontrolle	CLA
Maisstärke	532	532
Casein	200	200
Saccharose	100	100
Sojaöl	55	55
Sonnenblumenöl	15	-
Lutalin®	-	15
Cellulose	50	50
Mineralienvormischung	35	35
Vitaminvormischung	10	10
L-Cystein	3	3

---

Die Futterbestandteile wurden gemischt und anschließend zu Pellets verarbeitet (Kahl Laborpressanlage Typ 14-175, Reinbek). Die Futterraufnahme wurde wöchentlich erfasst.

Am 14. Tag der Laktation wurden die Muttertiere unter Anästhesie mit Kohlendioxid dekapitiert. Die rechte Milchdrüse wurde aus dem umliegenden Gewebe freipräpariert und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Alle experimentellen Vorgehensweisen richteten sich nach den Richtlinien für die Haltung und Verwendung von Labortieren und wurden von Kontrollbehörden vor Ort überwacht.

**Tabelle 15: Fettsäure-Zusammensetzung der Gesamtlipide der Diät und der Öle (Gewichtsprozent der Gesamt-Fettsäuren)**

	Kontroll-Diät	CLA-Diät	Lutalin	Sonnenblumenöl	Sojaöl
C 16:0	10,04 ± 0,02	10,04 ± 0,06	7,13 ± 0,02	7,16 ± 0,09	10,93 ± 0,01
C 18:0	3,22 ± 0,04	3,37 ± 0,07	3,85 ± 0,00	2,97 ± 0,19	2,88 ± 0,03
C 18:1 n9	22,51 ± 0,21	22,85 ± 0,09	25,97 ± 0,01	25,41 ± 0,66	21,64 ± 0,11
C 18:1 n7	1,37 ± 0,01	1,38 ± 0,01	#	#	#
C 18:2 n6	56,24 ± 0,18	43,90 ± 0,31	2,00 ± 0,01	64,46 ± 0,75	57,79 ± 0,12
C 18:3 n3	4,43 ± 0,11	4,45 ± 0,09	#	#	6,50 ± 0,02
C 18:2 c9, t11 CLA	0,67 ± 0,04	6,53 ± 0,21	29,25 ± 0,03	#	#
C 18:2 t10, c12 CLA	0,65 ± 0,06	6,31 ± 0,21	29,12 ± 0,04	#	#
C 20:0	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,74 ± 0,06	#	0,26 ± 0,01
C 20:1	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,74 ± 0,06	#	#
C 20:5 n3	0,42 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,72 ± 0,00	#	#
C 22:5	#	#	0,20 ± 0,00	#	#

\* Mittelwert aus 5 Analysen der Fütterproben (Stichproben aus den Wochen 1-5) und 2 Analysen der Öle.

# Unter der Nachweisgrenze (< 0,01% der Gesamt-Fettsäuren).

## 2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der durchgeführten Experimente erfolgte mittels MiniTab (Version 13.0, Minitab Inc., State College PA, USA).

Alle Daten wurden mit Hilfe des Anderson-Darling-Tests auf Normalverteilung getestet. Alle Daten der Zellversuche waren normalverteilt. In dem Tierexperiment waren die Daten des NIS und der GPAM normalverteilt, nicht jedoch die der übrigen gemessenen Gene. Die nicht normalverteilten Daten wurden logarithmisch transformiert und erneut auf Normalverteilung getestet. Einzig die Daten des LDLR waren auch nach logarithmischer Transformation nicht normalverteilt. Deshalb wurde in diesem Fall der Mann-Whitney-U-Test zur Auswertung verwendet.

Die normalverteilten Werte wurden paarweise (Behandlung gegen Kontrolle) mittels *student's T-Test* ausgewertet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (0,05) angenommen.

Für die Auswertung mittels *student's t-test* wurden üblicherweise die linearen Werte verwendet. War eine logarithmische Transformation nötig, wurde der statistische Test mit den logarithmierten Daten durchgeführt.

Dargestellt werden die erhobenen Daten als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD).

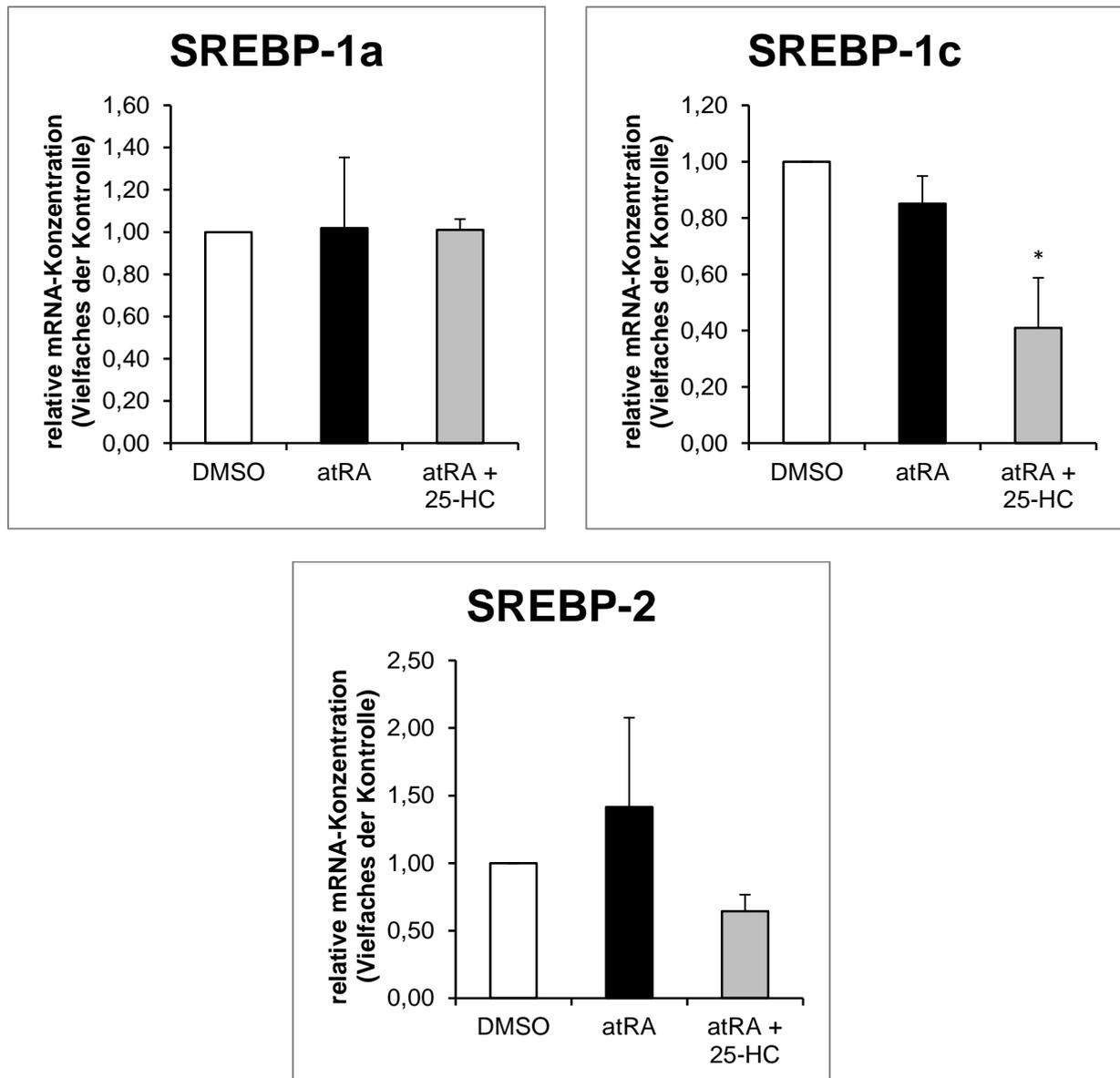
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss der Sterol-induzierten SREBP-Ausreifungshemmung auf die NIS-Expression in MCF-7-Zellen

Das Sterol 25-HC ist ein potenter Inhibitor der Ausreifung der SREBPs (Adams *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Tatsache diente es dazu, die SREBPs zu inhibieren und die Auswirkung auf die NIS-Expression zu untersuchen. Die Untersuchungen mittels PCR und Western Blot erfolgten nach 48-stündiger Inkubation der MCF-7-Zellen mit DMSO, atRA bzw. atRA + 25-HC (Kapitel 2.3.1).

Da die basale NIS-Expression in den MCF-7-Zellen sehr niedrig war, wurde sie mittels atRA gesteigert. Zur Auswertung dieser Experimente wurde die Behandlung mit 25-HC + atRA mit der atRA-Gruppe, die als eigentliche Kontrolle diente, verglichen. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit atRA auch einen Einfluss auf die SREBP-Isoformen und SREBP-Zielgene hat, wurde eine Gruppe mit DMSO mitgeführt, die als Negativkontrolle diente.

Zunächst wurde der Effekt von 25-HC auf die mRNA-Konzentration der SREBPs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Konzentration von SREBP-1c durch Inkubation mit 25-HC + atRA im Vergleich mit der atRA-Kontrollgruppe signifikant um ca. 50% reduziert wurde. Durch die Behandlung mit 25-HC + atRA wurde die mRNA-Konzentration von SREBP-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Diese Reduktion war aber aufgrund der großen Standardabweichung der atRA-Gruppe nicht signifikant. Für SREBP-1a hingegen konnte keine Veränderung der mRNA-Konzentration nachgewiesen werden (Abbildung 5).



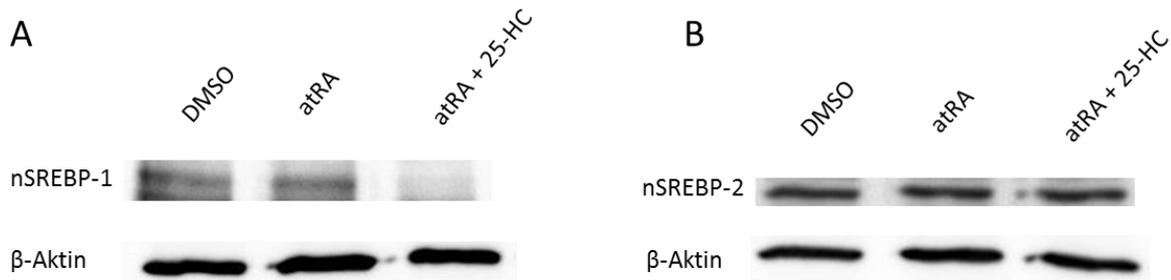
**Abbildung 5:** Relative mRNA-Konzentration von SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC über 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ).

Mittels Immunoblot wurden die relativen Proteinkonzentrationen der transkriptionell aktiven Formen der SREBPs untersucht. Diese entstehen durch den Vorgang der Prozessierung und werden als nSREBPs bezeichnet.

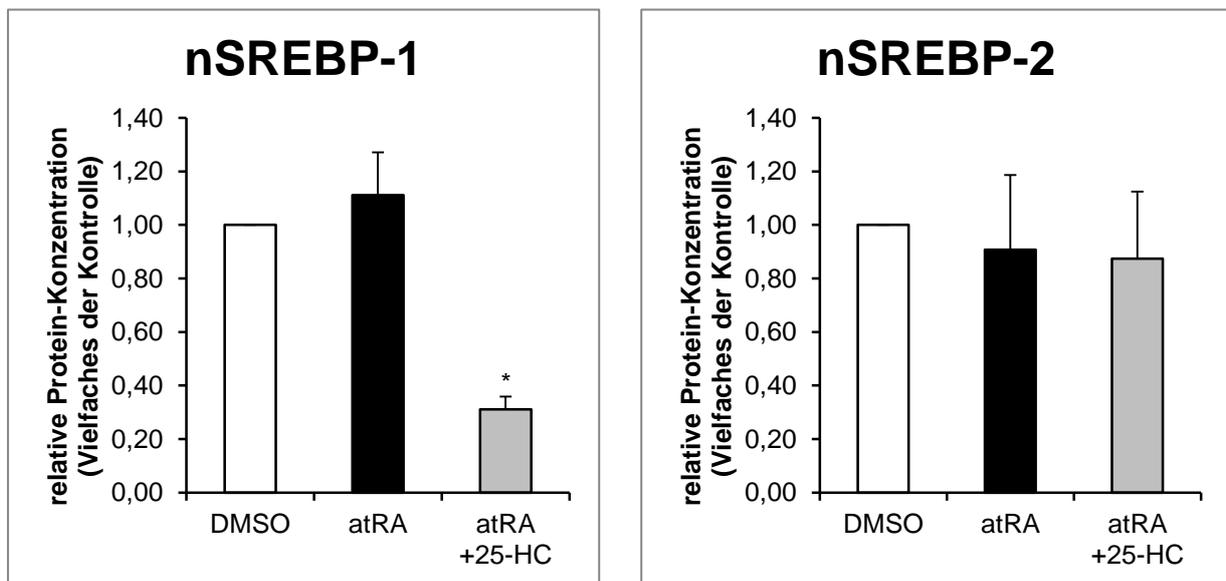
Die Analyse mittels Western Blot ergab eine signifikante, um ca. 70% verminderte relative Proteinkonzentration von nSREBP-1 nach Behandlung mit 25-HC + atRA im Vergleich zu der atRA-Kontrolle. Für die nSREBP-2-Proteinkonzentration konnte mit

Hilfe dieser Analysen keine Beeinflussung durch die Behandlung mit 25-HC + atRA im Vergleich zur atRA-Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildungen 6 und 7).

Ein Einfluss von atRA auf eine der Isoformen im Vergleich zur Behandlung mit DMSO war weder mittels PCR noch mittels Immunoblot nachweisbar.



**Abbildung 6:** Immunologischer Nachweis von nSREBP-1 (A) und nSREBP-2 (B) im Nuklearextrakt nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von nSREBP-1, nSREBP-2 und der Ladekontrolle beta-Aktin.

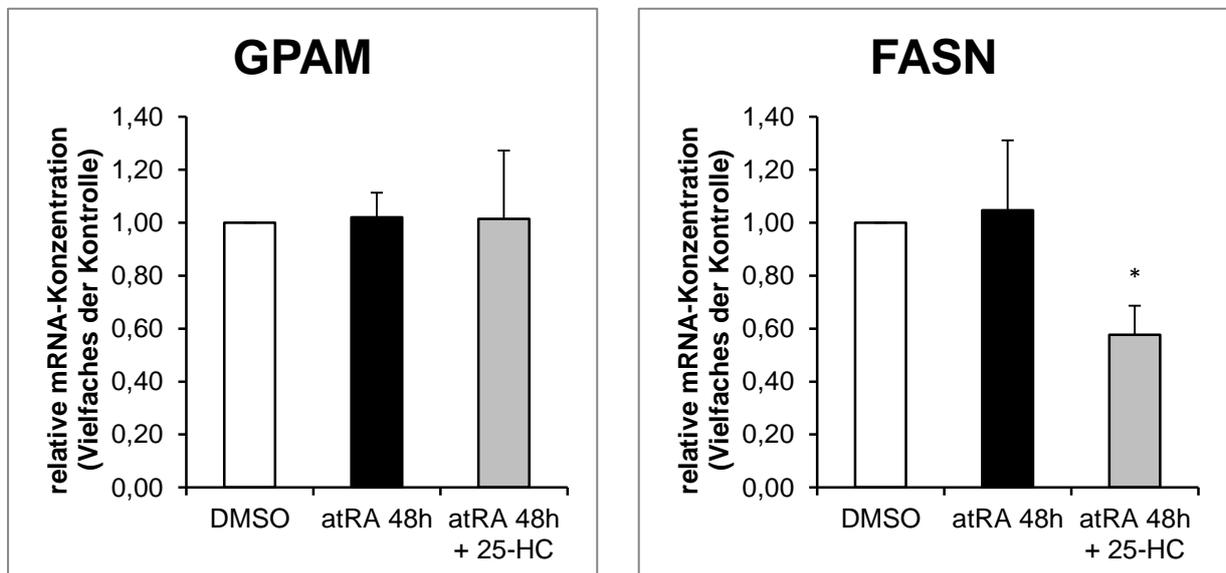


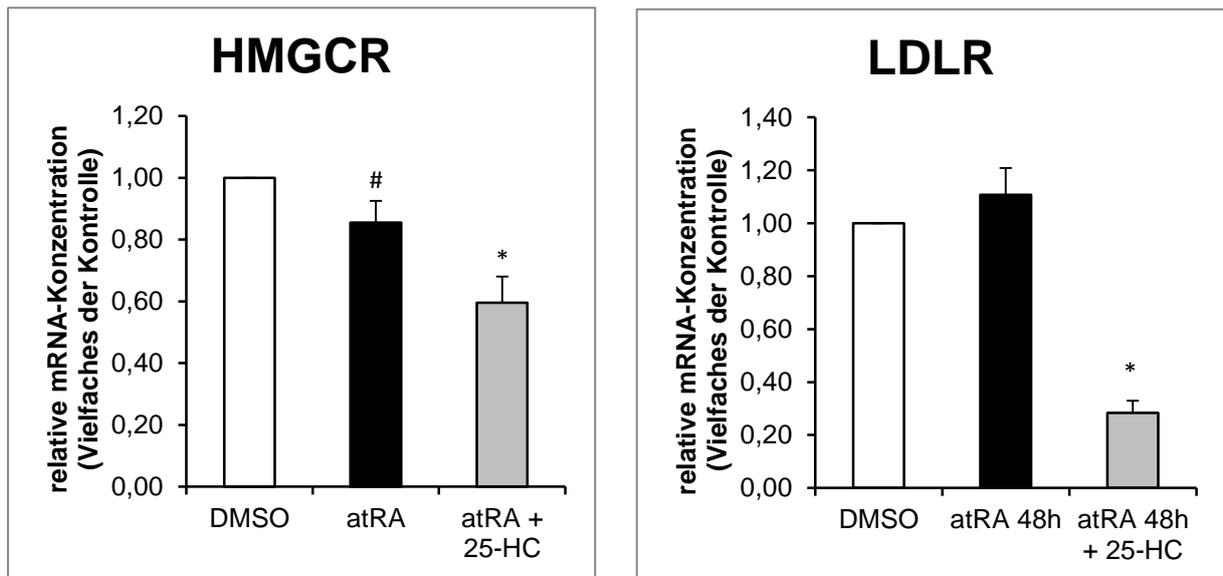
**Abbildung 7:** Relative Proteinkonzentration von SREBP-1 und SREBP-2 nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten für nSREBP-1 und 4 unabhängigen Experimenten für nSREBP-2. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ).

Des Weiteren wurden die mRNA-Konzentrationen von verschiedenen SREBP-Zielgenen untersucht. Die lipogenen Zielgene GPAM und FASN sind vornehmlich

durch SREBP-1c reguliert, während die cholesterogenen Zielgene HMGCR und LDLR hauptsächlich durch SREBP-2 reguliert werden.

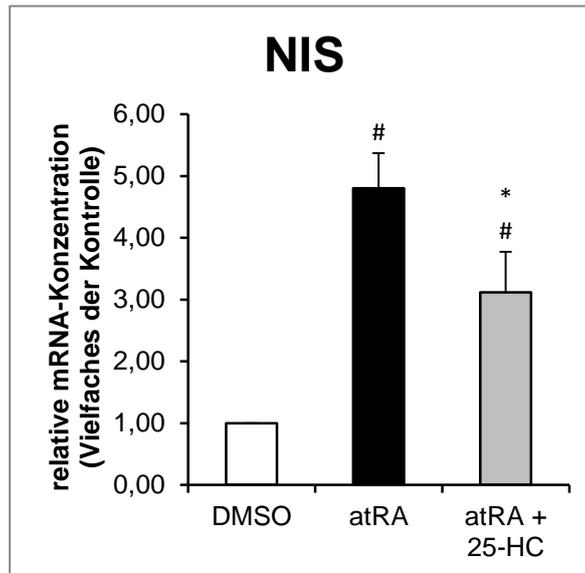
In den Versuchen konnte durch Inkubation mit 25-HC + atRA eine signifikante Reduktion der mRNA-Konzentrationen von HMGCR um ca. 30%, LDLR um ca. 75% und FASN um ca. 45% im Vergleich zur atRA-Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 8). Die mRNA-Konzentration von GPAM blieb durch die Behandlung mit 25-HC + atRA unbeeinflusst. Die Behandlung mit atRA bewirkte bei den SREBP-Zielgenen keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Konzentrationen. Einzige Ausnahme stellte die HMGCR dar, deren mRNA-Konzentration nach Behandlung mit atRA erniedrigt war.





**Abbildung 8:** Relative mRNA-Konzentrationen der SREBP-Zielgene *GPAM*, *FASN*, *HMGCR* und *LDLR* in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC über 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ), # kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit DMSO ( $p < 0,05$ ).

Abschließend wurde der Einfluss der Sterol-induzierten Ausreifungshemmung der SREBPs auf die NIS-mRNA-Konzentration untersucht. Die PCR-Analyse zeigte, dass die Behandlung der MCF-7-Zellen mit 1  $\mu$ M atRA (Kogai *et al.*, 2000) zu einer Steigerung der mRNA-Expression des NIS um das 4,8-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führte. Eine Zellbehandlung mit atRA in Anwesenheit von 25-HC führte zu einer Reduktion der NIS-mRNA-Konzentration um ca. 35 % im Vergleich zur atRA-Kontrolle (Abbildung 9).



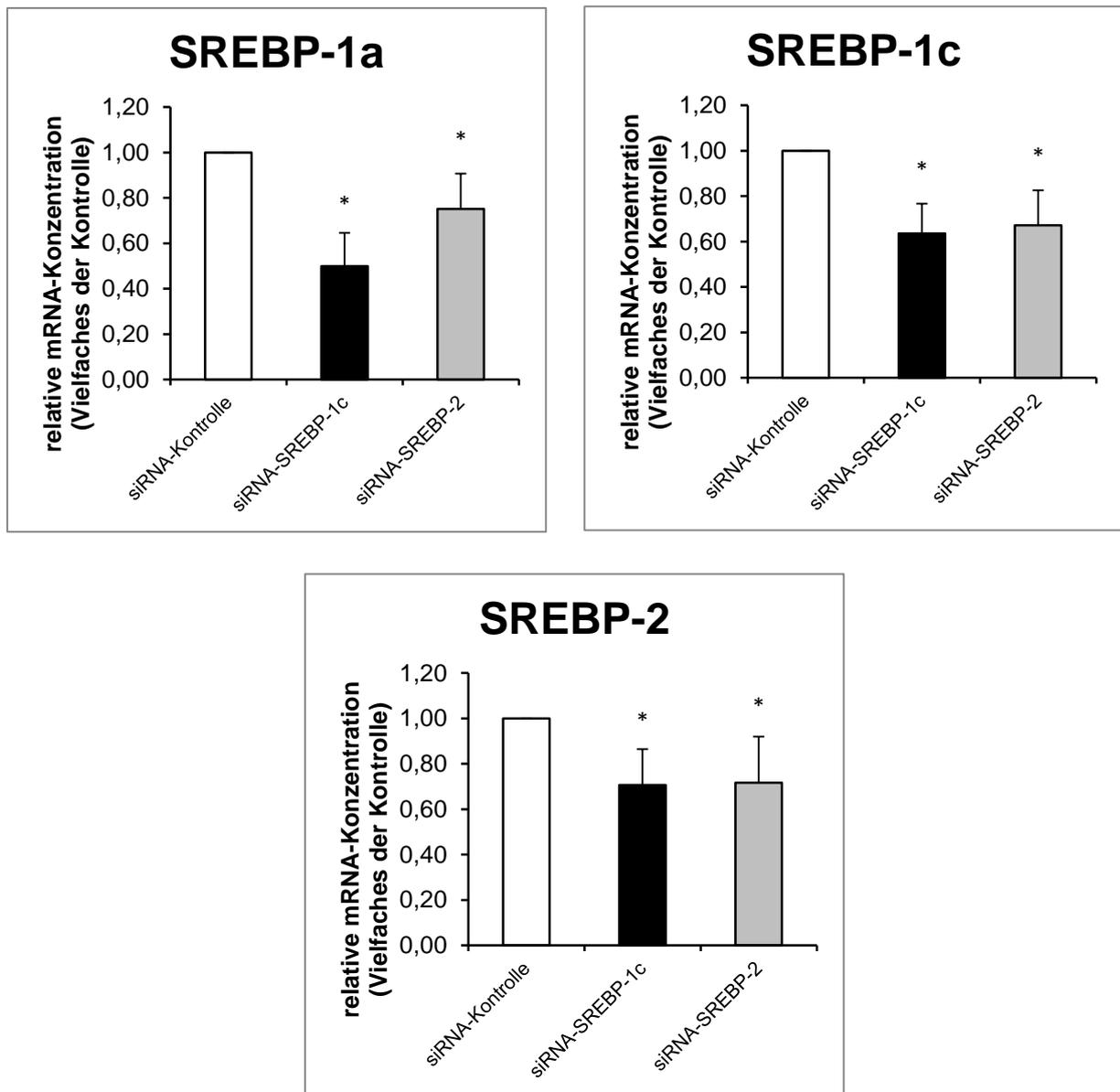
**Abbildung 9:** Relative mRNA-Konzentration des NIS in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC über 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ), # kennzeichnet den signifikanten Unterschied im Vergleich zur Behandlung mit DMSO ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Einfluss des SREBP-*knockdowns* auf die Expression des NIS in MCF-7-Zellen

Mittels RNAi vermittelter Hemmung der SREBPs sollte die Frage geklärt werden, ob der Sterol-induzierten Inhibierung des NIS eine direkte Regulation durch die SREBPs zugrunde liegt. Es wurde ein *knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 durch Transfektion mit sequenzspezifischen siRNA-Duplexen (Tabelle 1) herbeigeführt und anschließend die mRNA-Konzentrationen von SREBP-1, SREBP-2, SREBP-Targetgenen und NIS mittels PCR (Kapitel 2.2.9) bzw. die Proteinkonzentrationen von SREBP-1 und SREBP-2 mittels Immunoblot (Kapitel 2.2.15) analysiert. Als Kontrolle für diese Experimente diente eine siRNA, deren Länge einer Standard-siRNA entspricht, deren Sequenz aber zu keinem bekannten Gen homolog ist (Invitrogen).

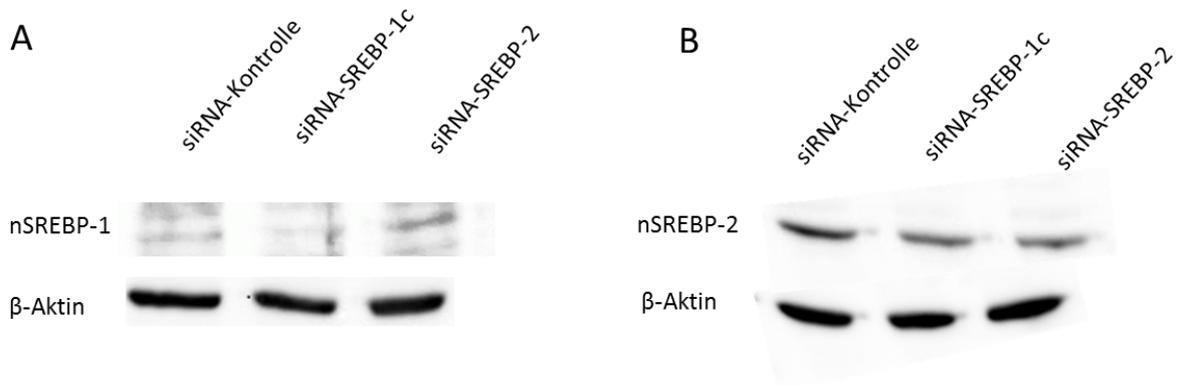
Die Analyse mittels PCR ergab eine signifikant erniedrigte mRNA-Konzentration von SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 sowohl nach Behandlung mit siRNA-SREBP-1c, als auch mit der SREBP-2-spezifischen siRNA (Abbildung 10). Für SREBP-1a konnte eine um ca. 50% verminderte mRNA-Konzentration nach Behandlung mit SREBP-1c-spezifischer siRNA und eine um ca. 25% verminderte Expression nach Behandlung mit SREBP-2-spezifischer siRNA nachgewiesen werden. Die mRNA-

Konzentration von SREBP-1c wurde sowohl nach Behandlung mit SREBP-1c-, als auch nach Behandlung mit SREBP-2-spezifischer siRNA um ca. 35% reduziert. Die Messung der SREBP-2-mRNA-Konzentration ergab nach Behandlung mit beiden siRNAs eine Reduktion um knapp 30%.

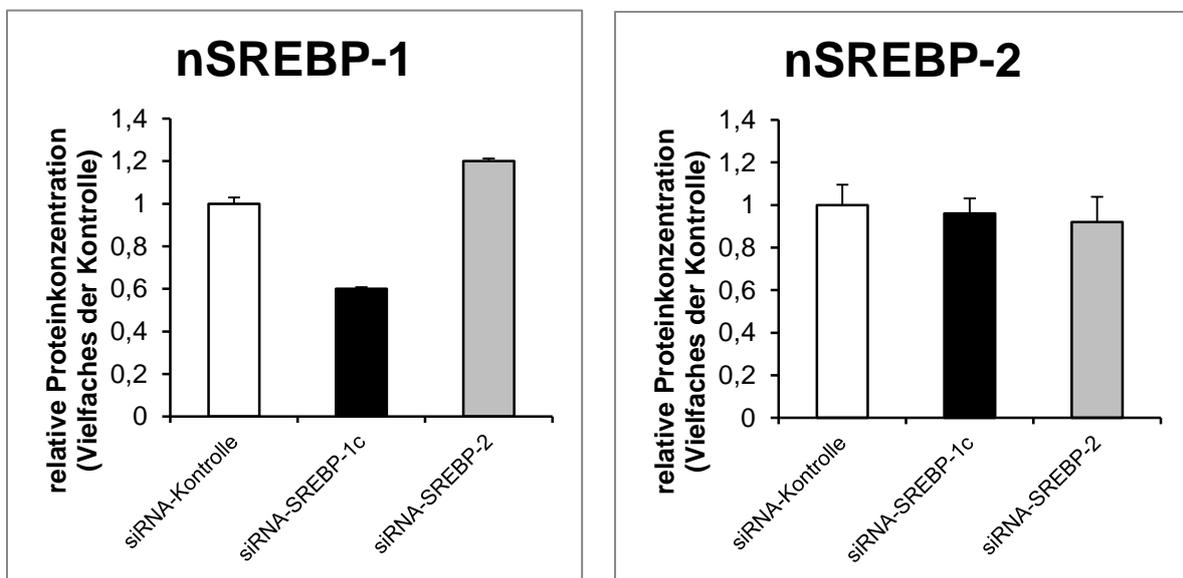


**Abbildung 10: Relative mRNA-Konzentration von SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen nach RNAi-induziertem knockdown von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Anhand des Immunoblots konnte durch die sequenzspezifische Interferenz eine signifikante Reduktion der relativen Proteinkonzentration von nSREBP-1 gezeigt werden. (Abbildungen 11 und 12).

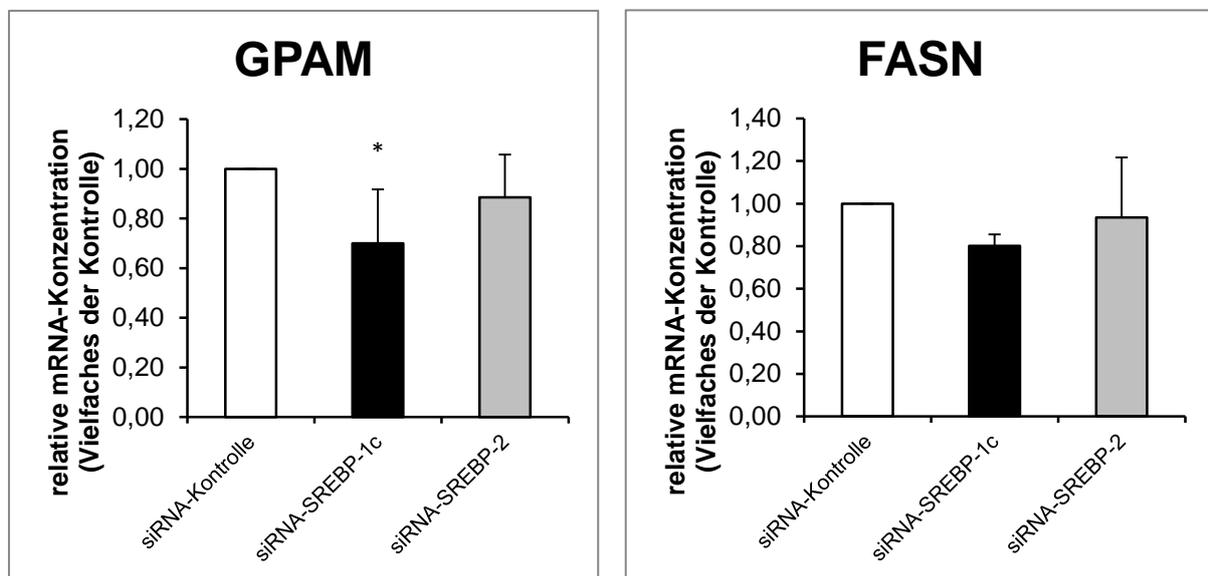


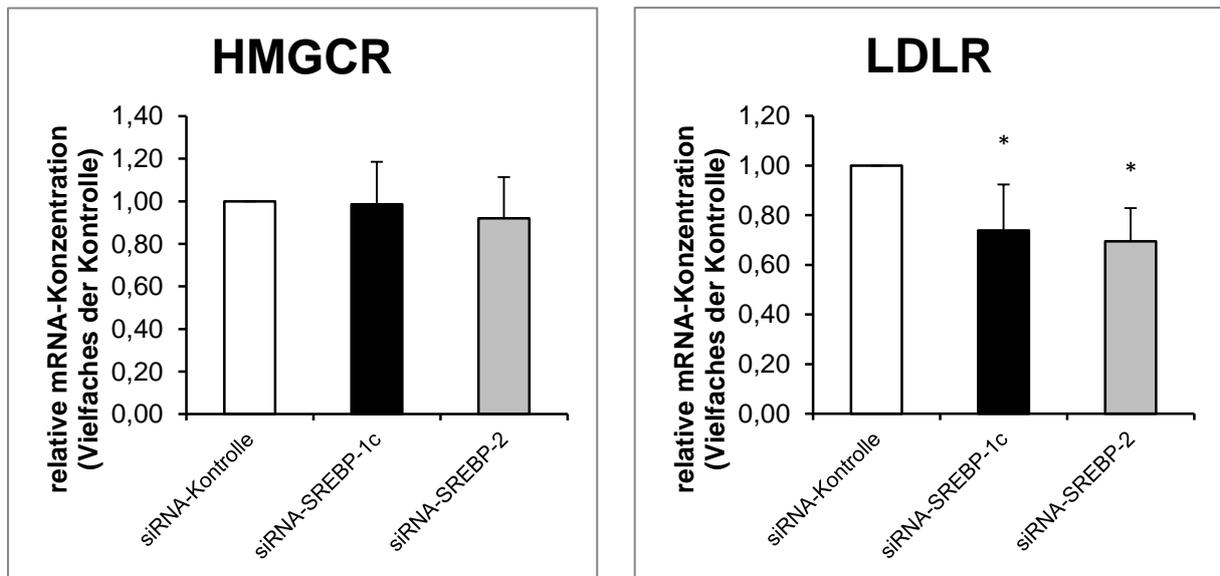
**Abbildung 11: Immunologischer Nachweis von nSREBP-1 (A) und nSREBP-2 (B) im Nuklearextrakt nach RNAi-induziertem knockdown von SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen.** Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von nSREBP-1, n-SREBP-2 und dem Referenzprotein β-Aktin.



**Abbildung 12: Relative Proteinkonzentration von nSREBP-1 und nSREBP-2 nach RNAi-induziertem knockdown von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden in MCF-7-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Replikaten eines unabhängigen Experiments. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt und ergab ähnliche Ergebnisse.

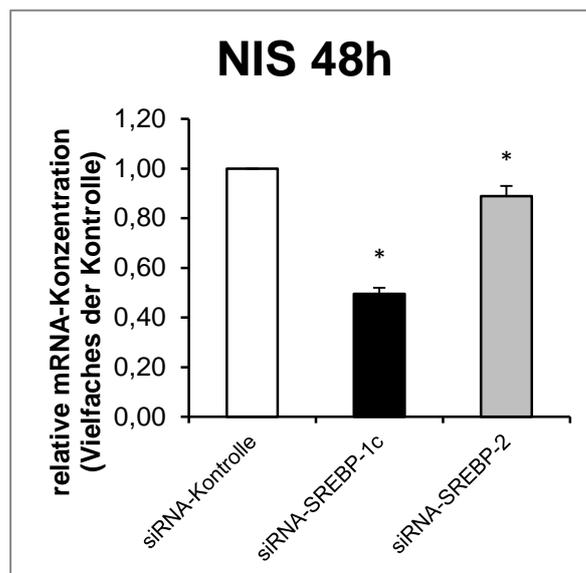
Anschließend wurde die Auswirkung der RNA-Interferenz auf die mRNA-Konzentrationen von SREBP-Zielgenen untersucht (Abbildung 13). Die mRNA-Konzentration von GPAM wurde durch RNAi mit SREBP-1c spezifischer siRNA um 30% im Vergleich zur Behandlung Kontroll-siRNA vermindert. Für FASN konnte eine leicht verminderte mRNA-Konzentration nach Behandlung mit SREBP-1c-spezifischer siRNA beobachtet werden, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Die Analyse der mRNA-Konzentration von HMGCR ergab keine Unterschiede zwischen den Behandlungen mit den beiden siRNAs und der Kontrolle. Die mRNA-Konzentration des LDLR war nach Behandlung mit SREBP-1c-spezifischer siRNA um ca. 25% und nach Behandlung mit SREBP-2-spezifischer siRNA um ca. 30% im Vergleich zur Behandlung mit Kontroll-siRNA vermindert.



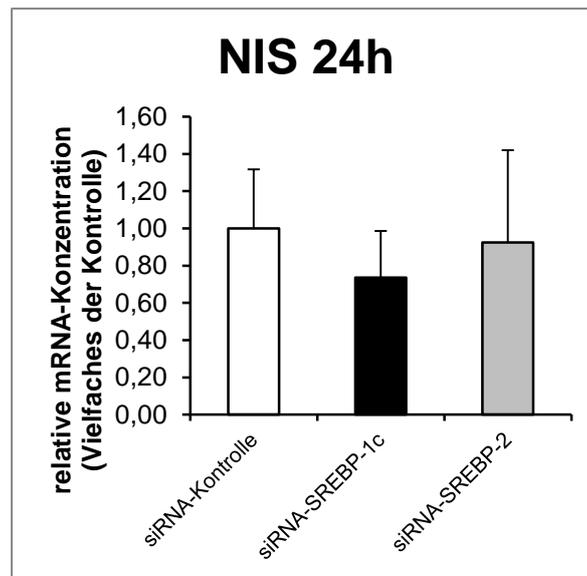


**Abbildung 13: Relative mRNA-Konzentration der SREBP-Zielgene GPAM, FASN; HMGCR und LDLR nach RNAi-induziertem knockdown von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden in MCF-7-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Die Auswirkung des SREBP-Knockdowns auf die NIS-mRNA-Konzentration wurde ebenfalls mittels PCR analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit siRNA-SREBP-1c zu einer um ca. 50% reduzierten mRNA-Konzentration des NIS führt. Die Behandlung mit SREBP-2-spezifischer siRNA führte zu einer signifikanten, aber nur um 11% verminderten mRNA-Konzentration des NIS (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Relative mRNA-Konzentration des NIS nach RNAi-induziertem knockdown von SREBP-1c und SREBP-2 über 48 Stunden in MCF-7-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 15:** Relative mRNA-Konzentration des NIS nach RNAi-induziertem knockdown von SREBP-1c und SREBP-2 über 24 Stunden in MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils drei Replikaten eines Experiments.

Um zu untersuchen, ob der Effekt der RNAi bereits zu einem früheren Zeitpunkt nach der Transfektion nachweisbar ist, wurde in einem Experiment RNA 24 Stunden nach Transfektion gewonnen und mittels PCR (Kapitel 2.2.9) analysiert.

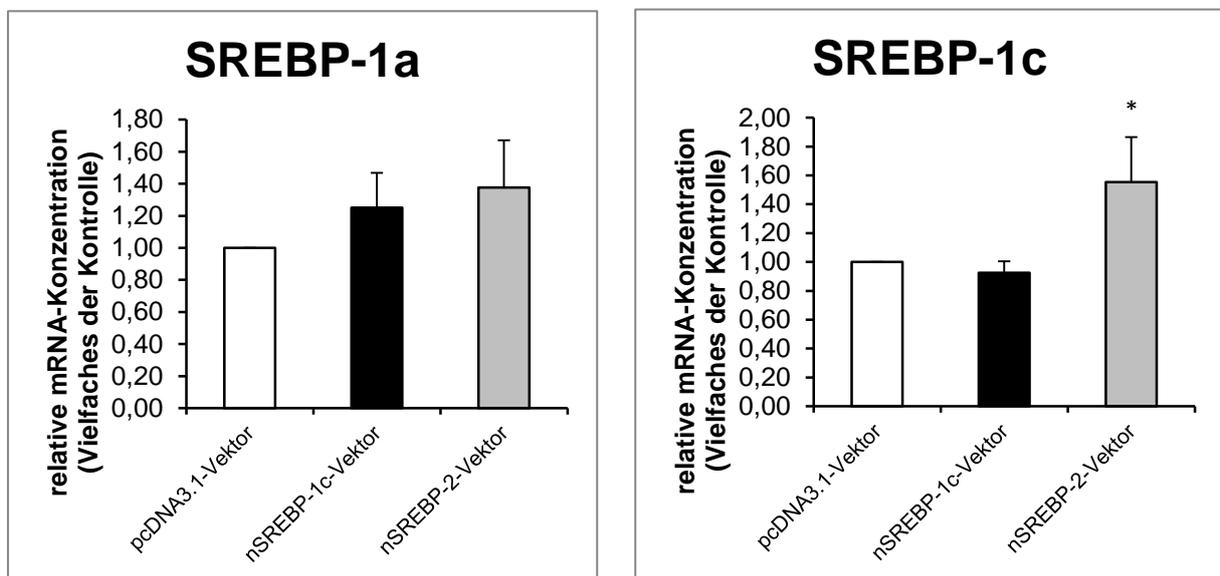
Zu diesem Zeitpunkt war noch keine Hemmung der NIS-mRNA-Konzentration durch RNAi nachweisbar (Abbildung 15).

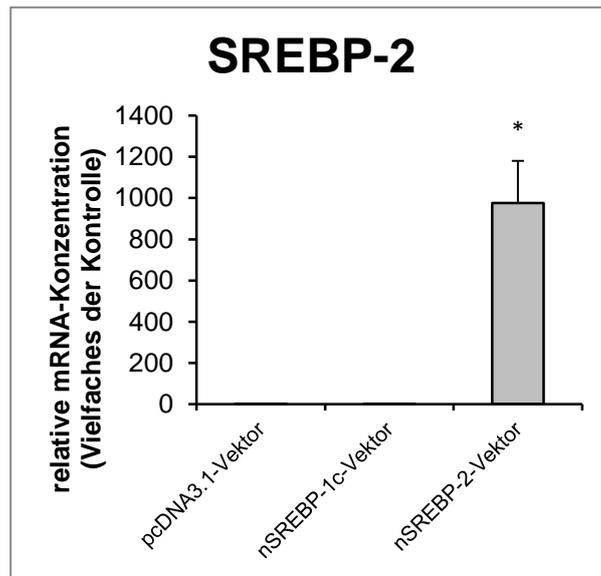
### 3.3 Nachweis der Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 in MCF-7-Zellen und deren Auswirkung auf das NIS-Gen

Um eine Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 zu erreichen, wurden die entsprechenden Überexpressionsvektoren (Tabelle 2) in MCF-7-Zellen transfiziert. Das Experiment wurde anschließend mit Hilfe von PCR- (Kapitel 2.2.9) und Immunoblot-Analysen (Kapitel 2.2.15) ausgewertet.

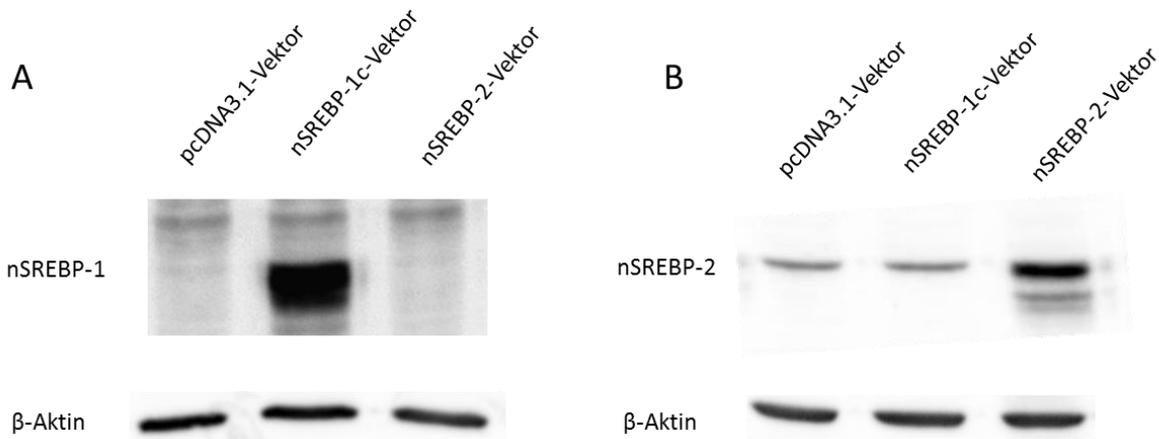
Bei der Analyse mittels PCR konnte eine gesteigerte mRNA-Konzentration von SREBP-1a nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 gezeigt werden, die aber in beiden Fällen nicht signifikant war (Abbildung 16). Die Überexpression von nSREBP-1c hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentration von SREBP-1c. Die Behandlung mit dem Überexpressionsvektor von nSREBP-2 hingegen führte zu einer signifikant gesteigerten mRNA-Konzentration des SREBP-2 (Abbildung 16).

Auf Proteinebene konnte aber nach nSREBP-1c-Überexpression eine um das 150-fach gesteigerte Proteinkonzentration von nSREBP-1 nachgewiesen werden (Abbildungen 17 und 18). Ein Einfluss dieser Behandlung auf nSREBP-2 war im Western Blot nicht erkennbar. Für SREBP-2 konnte durch PCR-Analysen eine um mehr als 970-fach gesteigerte mRNA-Konzentration nach Behandlung mit dem nSREBP-2-Überexpressionsvektor gemessen werden (Abbildung 16). Die Überexpression von nSREBP-1c hingegen hatte keinerlei Einfluss auf die mRNA-Konzentration von nSREBP-2. Mittels Immunoblot konnte eine auf das Vierfache gestiegene Proteinkonzentration von nSREBP-2 nach Überexpression von nSREBP-2 gemessen werden (Abbildungen 17 und 18). Die Proteinkonzentration von nSREBP-1 wurde durch die nSREBP-2-Überexpression nicht beeinflusst.

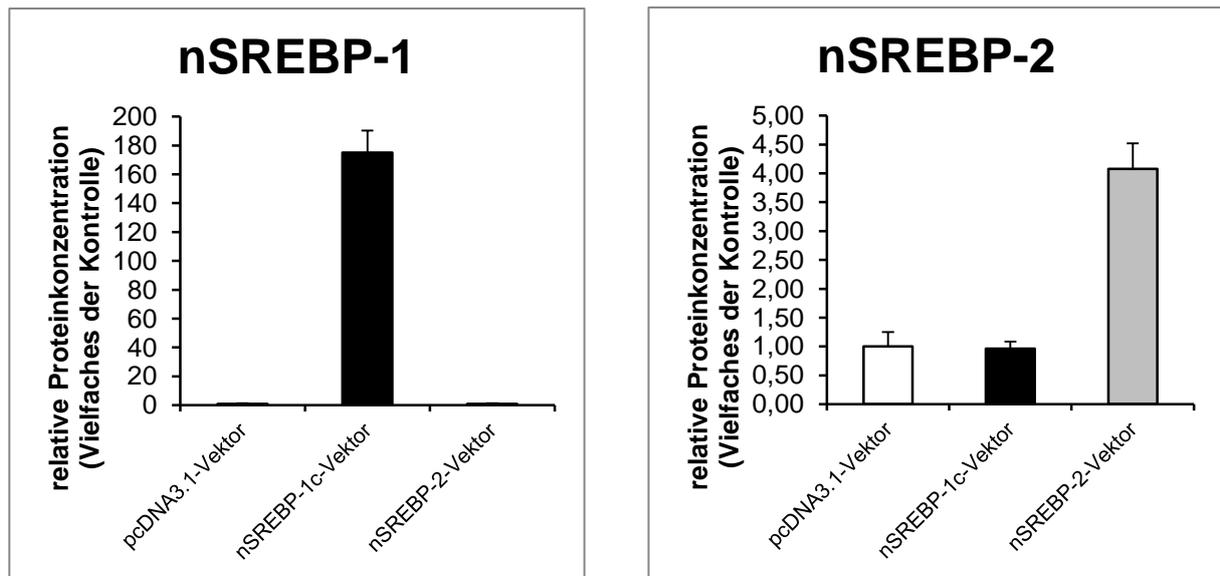




**Abbildung 16: Relative mRNA-Konzentration vom SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 in MCF-7-Zellen nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 über 24 Stunden.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zum pcDNA3.1-Vektor ( $p < 0,05$ ).

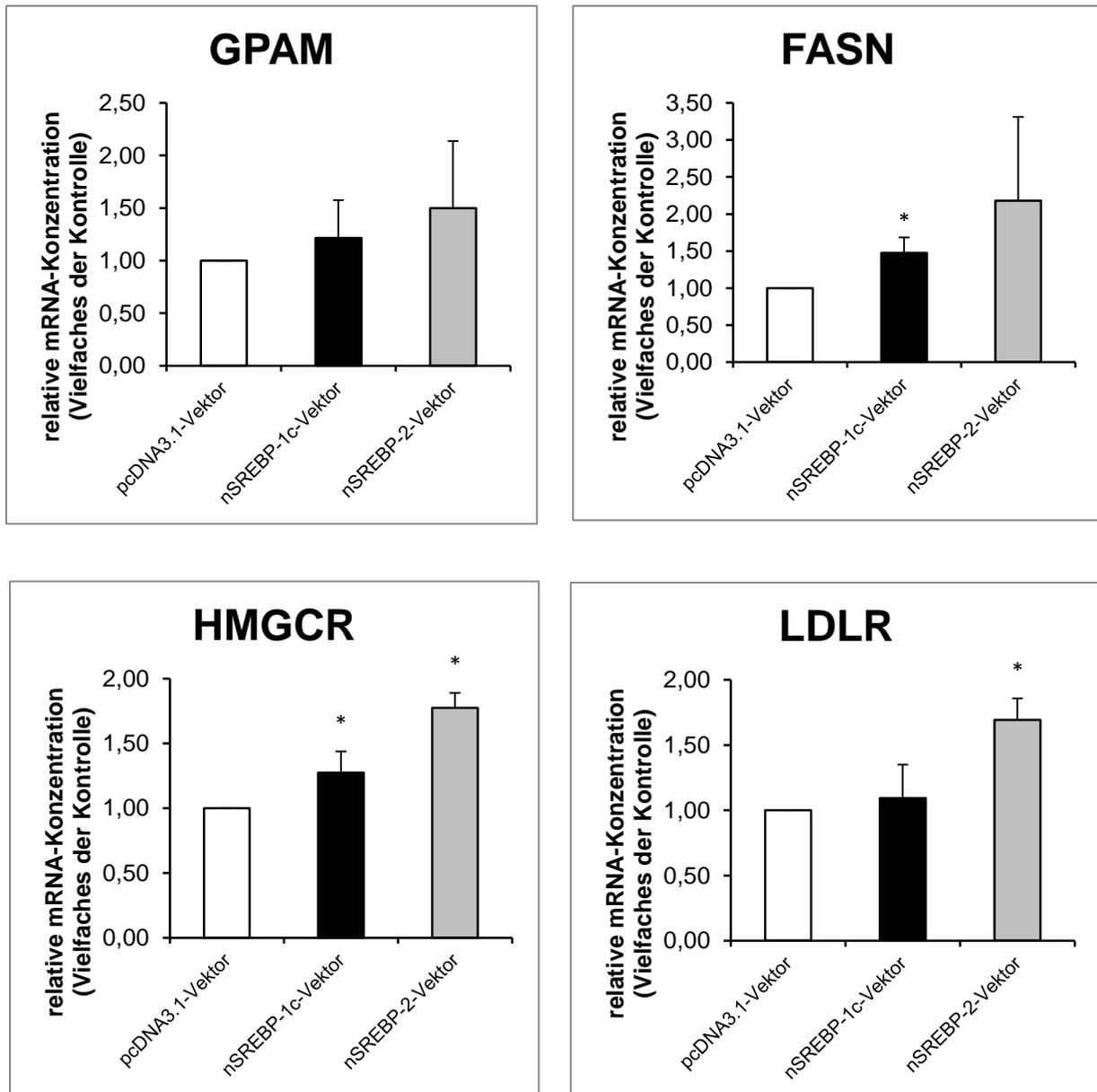


**Abbildung 17: Immunologischer Nachweis von nSREBP-1 (A) und nSREBP-2 (B) im Nuklearextrakt nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 in MCF-7-Zellen.** Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von nSREBP-1, nSREBP-2 und dem Referenzprotein  $\beta$ -Aktin.



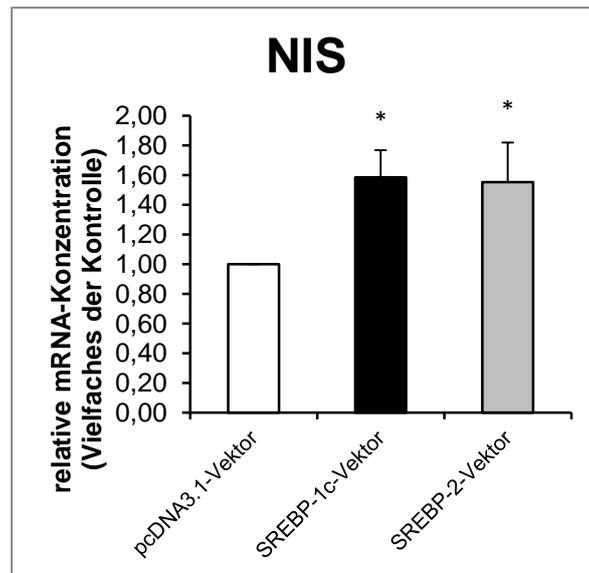
**Abbildung 18: Relative Proteinkonzentration von nSREBP-1 und nSREBP-2 nach Überexpression von SREBP-1c und SREBP-2 über 24 Stunden in MCF-7-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Replikaten eines unabhängigen Experiments. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt und ergab ähnliche Ergebnisse.

Für alle SREBP-Zielgene konnte durch die Überexpression der nSREBPs eine gesteigerte mRNA-Konzentration festgestellt werden, die aber nicht immer signifikant war (Abbildung 19). Die Behandlung mit beiden Überexpressionsvektoren führte bei der GPAM zu einer erhöhten mRNA-Konzentration, die aber im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant war. Für die FASN konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA-Konzentration nach Behandlung mit dem Überexpressionsvektor für nSREBP-1c festgestellt werden. Die Behandlung mit dem nSREBP-2-Überexpressionsvektor führte zwar zu einer höheren mRNA-Konzentration des FASN-Gens, diese war aber aufgrund der hohen Standardabweichung im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Bei der HMGCR führte die Behandlung mit beiden Überexpressionsvektoren zu einer signifikant erhöhten mRNA-Konzentration. Die durch nSREBP-2-Überexpression hervorgerufene Steigerung der mRNA-Konzentration war dabei deutlich stärker ausgeprägt, als die durch die Überexpression von nSREBP-1c. Bei dem LDLR konnte eine signifikant gesteigerte mRNA-Konzentration durch nSREBP-2-Überexpression gezeigt werden.



**Abbildung 19: Relative mRNA-Konzentration der SREBP-Zielgene GPAM, FASN, HMGCR und LDLR in MCF-7-Zellen nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 über 24 Stunden.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zum pcDNA3.1-Vektor ( $p < 0,05$ ).

Die Analyse mittels PCR ergab eine signifikante Steigerung der mRNA-Konzentration des NIS-Gens nach Transfektion mit den Überexpressionsvektoren beider nSREBP-Isoformen (Abbildung 20). Es konnte sowohl nach der Überexpression von nSREBP-1c als auch von nSREBP-2 ein Anstieg der NIS-mRNA-Konzentration um mehr als das 1,5-fache beobachtet werden.



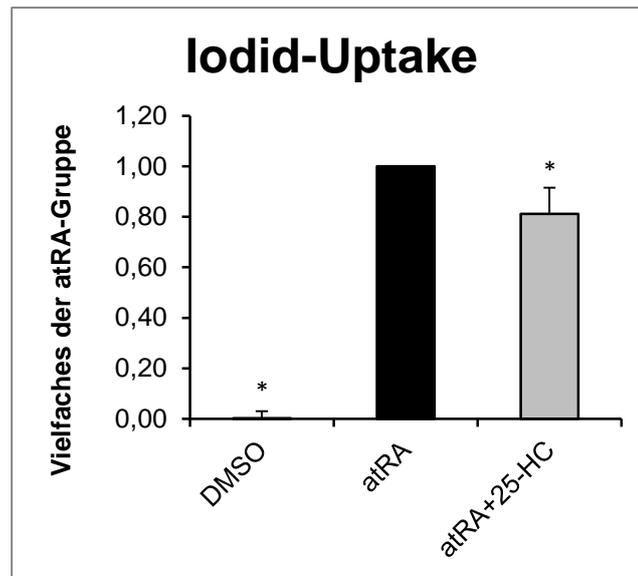
**Abbildung 20: Relative mRNA-Konzentration des NIS in MCF-7-Zellen nach Überexpression von nSREBP-1c und nSREBP-2 über 24 Stunden.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zum pcDNA3.1-Vektor ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Auswirkungen der Sterol-induzierten SREBP-Hemmung auf die NIS-spezifische Iodid-Aufnahme in MCF-7-Zellen

Um die NIS-spezifische Iodid-Aufnahme zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem potenten Inhibitor der SREBP-Ausreifung 25-HC für 48 Stunden behandelt und dann in An- und Abwesenheit von Kaliumperchlorat inkubiert (Kapitel 2.3.4) (Adams *et al.*, 2004).

Diese Untersuchungen zeigten, dass es basal zu keiner messbaren Iodid-Aufnahme durch NIS kommt. Erst nach der Stimulation durch atRA konnte ein NIS-spezifischer Iodid-*Uptake* gemessen werden (Abbildung 21).

Werden die Zellen zeitgleich mit atRA und 25-HC behandelt, ist eine signifikante Reduktion der NIS-spezifischen Iodid-Aufnahme zu erkennen. Die Zugabe von 25-HC führte zu einer Reduktion um knapp 20 % im Vergleich zur ausschließlichen Behandlung der Zellen mit atRA (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Einfluss der Behandlung mit DMSO, atRA und atRA + 25-HC auf die NIS-spezifische Iodid-Aufnahme in MCF-7-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von vier unabhängigen Versuchen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung mit atRA ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Untersuchungen des Einflusses der SREBPs auf die transkriptionelle Regulation des humanen NIS-Gens

#### 3.5.1 Computergestützte Analyse der 5'-flankierenden Region des humanen NIS-Gens

Mittels in *silico*-Analysen wurde die 5'-flankierende Region des humanen NIS-Gens auf putative SRE- und E-Box-Elemente untersucht. So konnten mit Hilfe der japanischen Computersoftware TFBIND (<http://tfbind.hgc.jp/>) elf putative SRE- und fünf putative E-Box-Elemente in einem 1600 bp umfassenden Bereich der 5'-flankierenden Region des humanen NIS-Gens von Nukleotid -1250 bis +350 relativ zum Transkriptionsstart identifiziert werden. Diese putativen Elemente sind in den Tabellen 16 und 17 aufgeführt.

## Ergebnisse

**Tabelle 16:** Nukleotidpositionen und -sequenzen der *in silico* ermittelten putativen SRE-Elemente.

SRE ID	Nukleotidsequenz (5'→3')	Strang
<b>Consensus-Sequenz</b>	<b>ATCACCCCAC</b>	<b>+</b>
	<b>TAGTGGGGTG</b>	<b>-</b>
+350 bis +235		
SRE+242	ATC <u>C</u> TCCCAC	+
+259 bis -280		
SRE+242	ATC <u>C</u> TCCCAC	+
SRE+207	<u>C</u> CCACCCCAG	+
SRE-170	A <u>C</u> CACCCC <u>C</u> T	+
-261 bis -949		
SRE-280	AT <u>T</u> TCCCCAC	+
SRE-377	AG <u>C</u> TCCCCA <u>I</u>	+
SRE-457	<u>T</u> GGGGGTG <u>G</u> T	-
SRE-505	<u>C</u> CCACCCC <u>C</u> T	+
SRE-576	AT <u>G</u> TACCCAC	+
-930 bis -1250		
SRE-950	<u>G</u> T <u>G</u> ACCCCC <u>C</u>	+
SRE-1141	<u>I</u> TCA <u>A</u> CCCC <u>C</u>	+
SRE-1217	ATC <u>C</u> TCCCAC	+

Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen der putativen SRE-Elemente im Vergleich zur Consensus-Sequenz des SRE-1 des hLDLR und putative E-Box-Elemente im Vergleich zu der E-Box-Consensus-Sequenz. Sich unterscheidende Nukleotide sind unterstrichen.

**Tabelle 17: Nukleotidpositionen und -sequenzen der *in silico* ermittelten putativen E-Box-Elemente.**

E-box ID	Nukleotidsequenz (5'→3')	Strang
<b>Consensus-Sequenz</b>	<b>ATCACGTGA</b>	<b>+</b>
	<b>TAGTGCACT</b>	<b>-</b>
+259 bis -280		
E-box-30	ATCACG <u>AGC</u>	+
E-box-242	TCAG <u>GGG</u> GAT	-
-261 bis -949		
E-box-276	<u>CCCACCTGT</u>	+
E-box-423	<u>GTCCCTGA</u>	+
-930 bis -1250		
E-box-1225	TCA <u>AAT</u> GAT	-

Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen der putativen SRE-Elemente im Vergleich zur Consensus-Sequenz des SRE-1 des hLDLR und putative E-Box-Elemente im Vergleich zu der E-Box-Consensus-Sequenz. Sich unterscheidende Nukleotide sind unterstrichen.

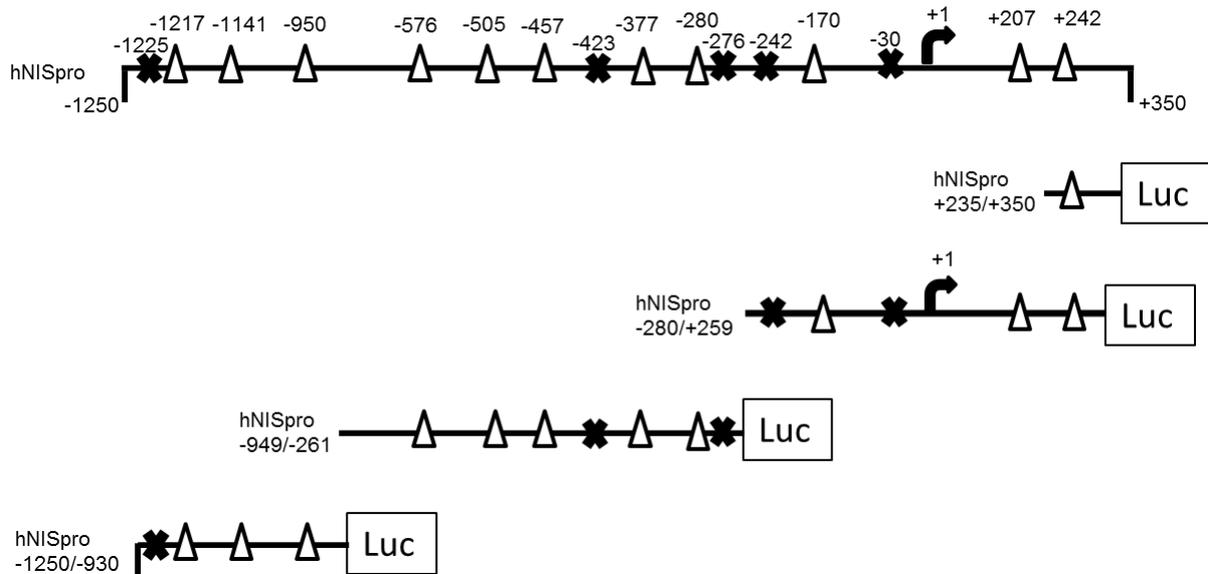
### 3.5.2 Klonierung der NIS-Reportergenvektoren

Als *Template* für die Klonierung des humanen NIS-Gens diente zum einen die aus MCF-7-Zellen gewonnene genomische DNA und zum anderen der BAC-Klon RP11-343E23 (BACPAC Resources, Oakland, USA). Der BAC-Klon enthält die vollständige genomische Sequenz des humanen NIS und wurde als Vorlage für die Synthetisierung eines Teils der 5'-flankierenden Region des hNIS-Gens verwendet. Mit den in Tabelle 5 aufgeführten *Primern* mit Xho I- und Hind III-Überhang wurden die einzelnen DNA-Fragmente mittels konventioneller PCR (Kapitel 2.2.9) synthetisiert und anschließend über die in Tabelle 5 ersichtlichen Schnittstellen miteinander ligiert. Die Synthese der Volllänge von bp -1250 bis +350 relativ zum Transkriptionsstart gelang aufgrund des extrem hohen GC-Gehaltes nicht. Besonders in dem Bereich nahe am Transkriptionsstart liegt der GC-Gehalt bei über 75%. Deshalb wurde dieser 116 bp umfassende Bereich durch die Firma Eurofins Genomics synthetisiert. Nach Erhalt

dieses DNA-Fragmentes erfolgte das weitere Vorgehen analog zu den restlichen DNA-Fragmenten. Die einzige Besonderheit bestand darin, dass dieses Teilstück eigene Kernpromotorelemente aufwies und aus diesem Grund in den promotorlosen pGL4.10[*luc2*]-Vektor inseriert wurde. Die eigens synthetisierten DNA-Abschnitte wurden in den pGL4.23[*luc2/minP*]-Vektor inseriert, der das Fehlen eigener Kernpromotorelemente durch einen Minimalpromotor ausgleicht. Um diese Insertion vornehmen zu können, wurden die DNA-Fragmente und die verwendeten Vektoren zuvor mit den Restriktionsenzymen Xho I und Hind III verdaut (Kapitel 2.2.20) und darauf folgend miteinander ligiert (Kapitel 2.2.22). Anschließend erfolgten die Transformation mittels Elektroporation in *E. coli*, die Selektion mehrerer Klone der Reporter-genkonstrukte über Ampicillin und die DNA-Isolation mittels Miniplasmidpräparation (Kapitel 2.2.24). Der Nachweis, dass die generierte und im weiteren Verlauf des Versuchs verwendete Plasmid-DNA die richtige Nukleotidabfolge besitzt, wurde durch Restriktionsanalyse (Kapitel 2.2.20) und Sequenzierung erbracht (Kapitel 2.2.23). Aus je einem positiv sequenzierten Klon wurde eine Übernachtskultur angelegt und anschließend hochreine Plasmid-DNA mittels Midiplasmidpräparation gewonnen (Kapitel 2.2.25).

### **3.5.3 Reporter-genanalyse der 5´-flankierenden Region des hNIS-Gens in MCF-7-Zellen**

Ziel dieses Versuches war es, Bindungsmotive der SREBPs in der 5´-flankierenden Region des hNIS zu identifizieren. Dazu sollte, wie in Abbildung 22 ersichtlich, die 5´-flankierende Region des NIS-Gens von bp -1250 bis +350 relativ zum Transkriptionsstart untersucht werden. Aufgrund des extrem hohen GC-Gehalts im Anfangsteil des untersuchten Bereichs von über 75% war die Klonierung dieses Abschnittes sehr schwierig. Aus diesem Grund wurden einzelne Fragmente der untersuchten DNA-Region kloniert und analysiert.

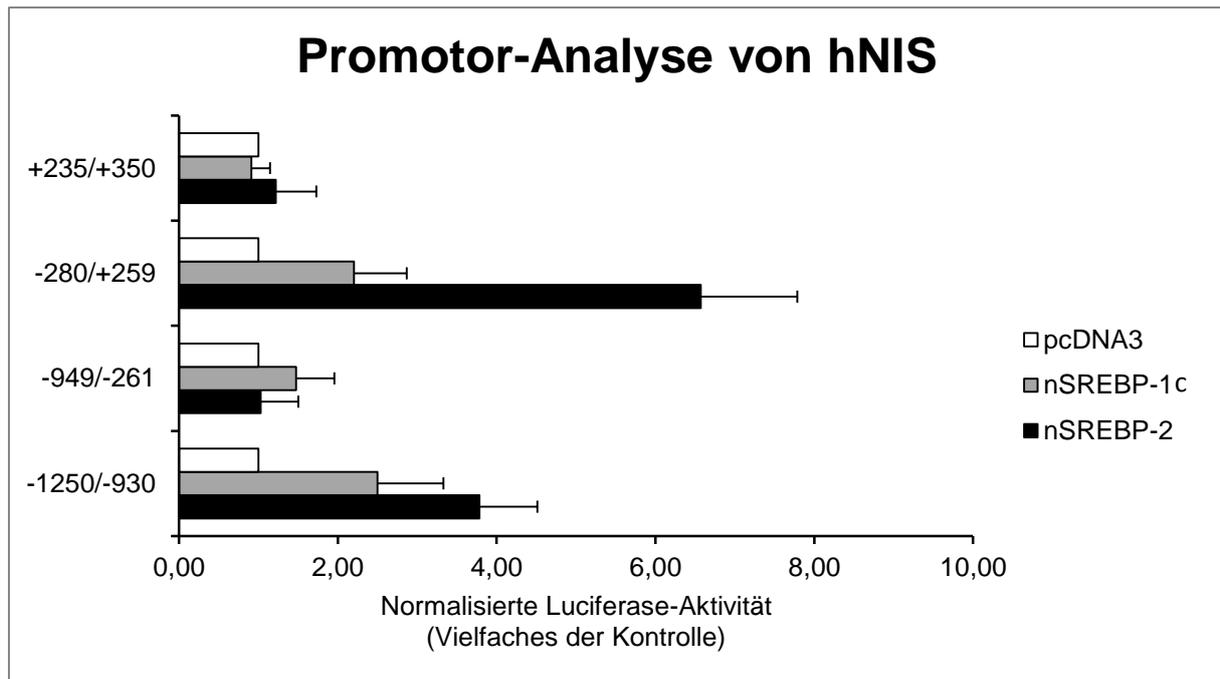


**Abbildung 22: Übersicht über die verwendeten Reporterengenkonstrukte.** Dargestellt ist der untersuchte Promotorbereich des humanen Natrium-Iodid-Symporter (hNIS). Dieser wurde, um ein detektiertes sterol regulatory element (SRE) genauer lokalisieren zu können, in Teilabschnitte unterteilt.  $\Delta$  kennzeichnet putative SRE-Elemente,  $\star$  kennzeichnet putative E-Box-Elemente.

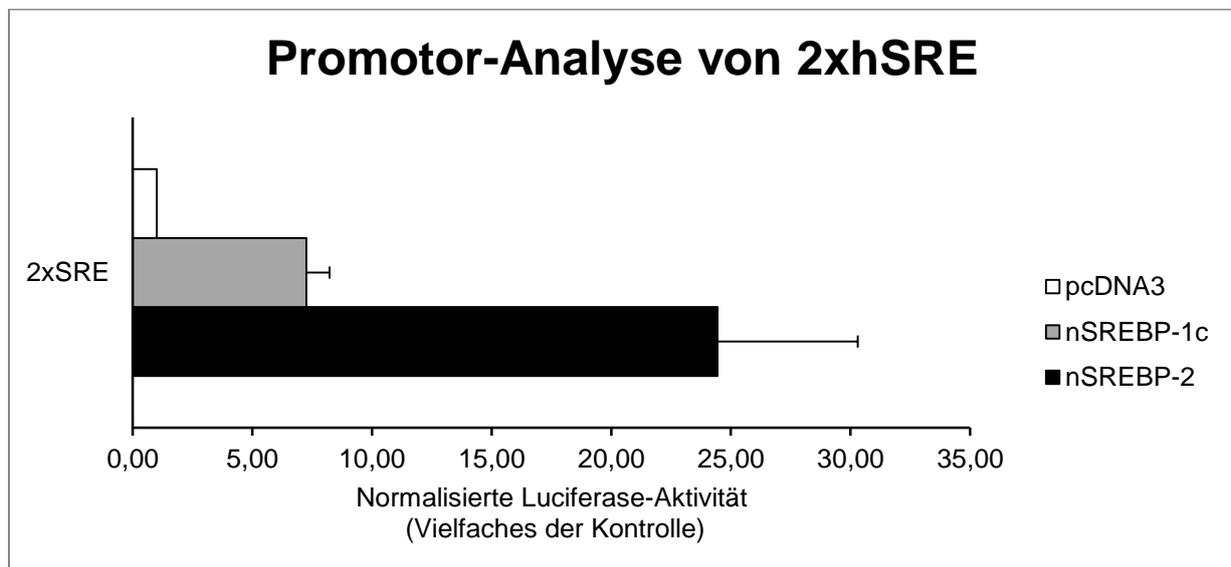
Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, konnte mittels Reporterengen-Analyse für SREBP-2 die stärkste Luciferase-Aktivität in Fragment +259/-280 gemessen werden. Diese war im Vergleich zur Kontrolle um das 6,6-fache erhöht. Aber auch in dem Fragment -930/-1250 konnte eine signifikant, um das 3,8-fache, erhöhte Aktivität nachgewiesen werden. Für SREBP-1c konnte in -930/-1250 die stärkste Luciferase-Aktivität lokalisiert werden. Im Vergleich zur Kontrolle war sie um das 2,5-fache erhöht. Aber auch in +259/-280 konnte eine signifikant, um das 2,2-fache, erhöhte Aktivität gezeigt werden. Die beiden anderen untersuchten DNA-Fragmente wurden nicht durch die Luciferase aktiviert (Abbildung 22). Die erfolgreiche Versuchsdurchführung kann man anhand der deutlich aktivierten Positivkontrolle nachweisen (Abbildung 24). Als Positivkontrolle diente eine zweifache Wiederholung des SRE-1, die vor die Luciferase kloniert wurde.

In dem Fragment +259/-280 befinden sich die drei putativen SRE-Elemente +242 (+), +207 (+) und -170 (+) und die beiden E-Box-Elemente -30 (+) und -242 (-).

Für das untersuchte Fragment -930/-1250 konnten durch die in *silico*-Analysen ebenfalls drei putative SRE-Elemente -950 (+), -1141 (+) und -1217 (+) und ein putatives E-Box-Element -1225 (+) ermittelt werden.



**Abbildung 23:** *Transaktivierung der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens nach Kotransfektion von nSREBP-1c und nSREBP-2 in MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten und den Expressionsvektoren transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. Die normierte Luciferase-Aktivität entspricht dem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, der als Kontrolle diente und dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde.*



**Abbildung 24:** *Darstellung der transienten Transfektion von MCF-7-Zellen mit 2xhSRE, der als Positivkontrolle diente. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. Die normierte Luciferase-Aktivität entspricht dem Vielfachen der Aktivität von pcDNA3.1, der als Kontrolle diente und dessen Aktivität auf 1 gesetzt wurde.*

### 3.5.4 Sequenzanalyse

Da bekannt ist, dass für regulatorische Elemente eines Gens ein hoher Grad der Konservierung und somit eine hohe Sequenzhomologie vorliegt, erfolgte der Sequenzvergleich dieses DNA-Abschnittes zwischen den Spezies *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens*. Von besonderem Interesse waren die Nukleotidsequenzen der neun putativen SRE-Elemente, die in den beiden aktivierten DNA-Fragmenten zu finden waren. Aus Abbildung 25 wird deutlich, dass ein hoher Grad der Homologie zwischen den Nukleotidsequenzen von *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* vorliegt, während die humane Nukleotidsequenz deutliche Unterschiede zu den anderen beiden Spezies aufweist. Für die einzelnen SREs wurde die Homologie zwischen *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* berechnet und in Tabelle 18 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die größte Homologie zwischen allen drei Spezies in SRE -242 (-) vorliegt, aber nur 55,6% beträgt.

## Ergebnisse

-280 bis +259

```
rNISpro    ACTCTCGGTCAGTGGGAGA-GTCGCAGCGCGAGTCA--CCGCTGGGCCGTCGATCCACTC
mNISpro    ACTCTCAG--AGCGAGCGTCGTCGCAGCGCGAGTTC--CTGCTGGGCCGTCGACCCACAA
hNISpro    AAGCT--GGCAGGGGCCGAGGAGGCAGGACGGGGAGGGCGGGTGGGAGGATGCTCGGCAG
*  **  *  **  *  *  *  ****  **  *  *  *  ****  *  *  *  *
SRE+242 (+)
```

```
rNISpro    GCTTTTCGCGCTGCGGATTTATTGAACTCCGGGGTCAGCGCAGCTCCG--CCCCAGCCT
mNISpro    GCTTTTCGCGCGCGCGGATTTATTGGGCTCCGGGGTCAGCGCGGCCCG--CCCCAGCCT
hNISpro    CCTGTCCCCGCTCCGTCTGGGGTGGGAAGCGGCG--AGAGGGGCCGGGGCTCCCTGGGTT
*  *  *  *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
SRE+207 (+)
```

```
rNISpro    ATGAGGAACCCCGACTAGGGTTCACCTTTTCGGGACTT-CCGGGCTCCATAAGGAAAAAG
mNISpro    ACGAGGAACCCAGGACTGGGGTTCACCTTTTCGGGACTT-CCGGGCCCCATAAGGAAAAA-
hNISpro    --GAGCAGCTCGTGATTGTGGGTTGC-----AGATTTATTGGGCTCC-----
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
SRE-30 (+)
```

```
rNISpro    AATTTCTTTCTTCTGCTTTAGGACTC-----CCACCTGTACAAGGGCACTCTGGACCT
mNISpro    AATTTCTTCTTCTG-TTTAGGACTCAGTTTCCCTACCTGCACA-GGGCAGTCTGGACCT
hNISpro    AGGCTATCTGGGTGGCTGCAGGG-----GGTGGTATCGGGGAGGGCT---CCC
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
SRE-170 (+)
```

```
rNISpro    GCGTTTGAGGCTAAGTCTCATGCAGCTCAGGCTGGCATGTTGTCTGACC-----
mNISpro    GCGTTTGAGGCTGAGTCTCATGTAGCTCAGGCTGGTATGGAGTCTGACCAAGGCCACC
hNISpro    GCACCCA---CCCATCCCCATGCA-----CTG---TGATCCCCTGATCA-----
**  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
SRE-242 (-)
```

-1250 bis -930

```
rNISpro    ATGACTTTAAAGTAGCAGCCACTGGCCCCACAATGCACAGGGAACACTGCATAGTCAGA
mNISpro    AAGGTTCCAAAGCAGCAGCCACTGGTTCTACTCTGCACAGGGAAGCAATGCA--GTCTGA
hNISpro    AAG--TCTACTGGGGGGTGCAC-GCTTCCATGAGGACCAACGA---GCTGTC--ATCTCA
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
SRE-950 (+)
```

```
rNISpro    AAATTACCCCTGGGCTATGTGCATACACGTATGAAAATATCTGCAAGGGGCTAGAAGCAAG
mNISpro    AAAGTACTCTGGGCCATGTGTAGACA----TGAAAATGTCTACAAGGGGCCAGAGGCAAG
hNISpro    --GGTTCCCTTCTCCATAAGCTGGTGGAAATCTGAAAT-CCT---GGGGGTTGAAAGAAAC
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
SRE-1141 (+)
```

```
rNISpro    -CAAGACAGCCAC-GGAGGCTTCAGGC-TATACTCCTTCAAAACCAGGCACCGTGATG--
mNISpro    -CAGAACAGTCCCAGGAAGCTTCAGGCCTGTGCCCTTCAAGATTGGGCACCATGATGAT
hNISpro    TCCAGCA-CTTTGGGAGGCTGAAGTGGGAGGATCATTGAGTCCAGAAATT-CGA----
*  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
SRE-1217 (+), SRE-1225 (-)
```

**Abbildung 25: Sequenzvergleich der putativen SREs zwischen *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens*.** Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen SRE +242 (+), SRE+207 (+), E-Box-30 (+), SRE-170 (+) und E-Box-242 (-) des DNA-Fragments +259/-280, sowie SRE+950 (+), SRE-1141 (+), SRE-1217 (+) und E-Box-1225 (-) des DNA-Fragments -930/-1250 von *Rattus norvegicus* (rNIS, NM\_052983), *Mus musculus* (mNIS, NM\_053248) und *Homo sapiens* (hNIS, NM\_000453). Die Angabe der Nukleotidpositionen ist relativ zum Transkriptionsstart. \* kennzeichnen konservierte Nukleotide.

**Tabelle 18: Berechnete Homologien der putativen SREs zwischen *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* (in %).**

	Ratte/Maus	Maus/Mensch	Ratte/Mensch	gesamt
+242 (+)	100	50	50	50
+207 (+)	80	50	30	30
-30 (+)	88,9	44,4	44,4	44,4
-170 (+)	90	40	50	40
-242 (-)	77,8	55,6	66,7	55,6
-950 (+)	90	50	50	50
-1141 (+)	81,8	45,5	63,6	45,5
-1217 (+)/-1225 (-)	70,6	35,3	41,2	29,4

### 3.6 Auswirkungen der Fütterung von konjugierten Linolsäuren auf die Leistungsdaten und die Expression von SREBPs und NIS

Aus diversen Studien ist bekannt, dass die Verfütterung von CLAs zu einer Reduktion der SREBP-1-Expression führt. In diesem Versuch sollte deshalb untersucht werden, ob die CLA-induzierte SREBP-Absenkung eine verminderte NIS-Expression bewirkt.

Anhand der Leistungsdaten konnte gezeigt werden, dass es weder in der Futteraufnahme, noch in der Gewichtsentwicklung der Mutterratten während der gesamten Trächtigkeit und den ersten beiden Wochen der Laktation signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der CLA-Gruppe gab. Der Mittelwert der täglichen Futteraufnahme lag bei den Tieren der Kontrollgruppe während der Trächtigkeit bei  $21,5 \text{ g} \pm 1,7 \text{ g}$  (Mittelwert  $\pm$  SD) und während der Laktation bei  $34,2 \text{ g} \pm 9,7 \text{ g}$ . Die Tiere der CLA-Gruppe nahmen im Mittel täglich  $20,8 \text{ g} \pm 1,5 \text{ g}$  Futter während der Trächtigkeit und  $35,1 \text{ g} \pm 9,2 \text{ g}$  während der Laktation auf. Während der Trächtigkeit betrug das Gewicht der Mutterratten  $292,6 \text{ g} \pm 38 \text{ g}$  in der Kontrollgruppe bzw.  $294,0 \text{ g} \pm 39,3 \text{ g}$  in der CLA-Gruppe. Der Mittelwert des Gewichts der Mutterratten betrug während der Laktation  $291,4 \text{ g} \pm 21,6 \text{ g}$  in der Kontrollgruppe und  $287,1 \text{ g} \pm 20,3 \text{ g}$  in

der CLA-Gruppe. Auch die Gewichte der Jungtiere unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant. Für die Jungtiere der Kontrollgruppe betrug der Mittelwert  $28,0 \text{ g} \pm 10,8 \text{ g}$  und für die CLA-Gruppe  $28,9 \text{ g} \pm 10,8 \text{ g}$ .

Die Auswirkungen der Fütterung von konjugierten Linolsäuren auf die SREBP- und NIS-Expression wurden mittels qPCR (Kapitel 2.2.9) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die relative mRNA-Konzentration von SREBP-1c und dessen Zielgen GPAM signifikant vermindert war (Tabelle 19). Die gemessene mRNA-Konzentration von SREBP-1c war bei der CLA-Gruppe um knapp 70% vermindert. Für GPAM konnte eine um ca. 45% verringerte mRNA-Konzentration nach Verfütterung von CLA im Vergleich zu der Kontrollgruppe gemessen werden. Für FASN konnte zwar eine deutlich erniedrigte mRNA-Konzentration gemessen werden, diese war aber aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu konnten für SREBP-2 und dessen Zielgene HMGCR und LDLR keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Tabelle 19).

Für das NIS-Gen konnte nach der CLA-Fütterung eine signifikante, um ca. 50% verminderte mRNA-Konzentration im Vergleich zur Fütterung mit der Kontrolldiät gemessen werden (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Einfluss der CLA-Fütterung auf die relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, GPAM, FASN, SREBP-2, HMGCR, LDLR und NIS in der Milchdrüse von Ratten.**

Gen	Kontrolle	CLA	Signifikanz
SREBP-1c	$1 \pm 0,87$	$0,33 \pm 0,28$	*
GPAM	$1 \pm 0,68$	$0,55 \pm 0,28$	*
FASN	$1 \pm 1,01$	$0,34 \pm 0,29$	
SREBP-2	$1 \pm 0,7$	$0,79 \pm 0,48$	
HMGCR	$1 \pm 0,78$	$0,76 \pm 0,59$	
LDLR	$1 \pm 0,89$	$1,25 \pm 0,92$	
NIS	$1 \pm 0,65$	$0,41 \pm 0,21$	*

Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von 14 Ratten der CLA-Gruppe und 12 Ratten der Kontrollgruppe.

\* kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

## 4 Diskussion

Der NIS ist ein bedeutendes Protein in der Entwicklung von Mensch und Tier. Er ist essentiell, um verschiedene Organe mit Iod zu versorgen. Eine adäquate Versorgung der Schilddrüse mit Iod ist Voraussetzung für eine normale körperliche und neuronale Entwicklung, sowie für den physiologischen Ablauf von diversen Stoffwechsellvorgängen im Körper. In der Milchdrüse spielt der NIS eine besondere Rolle, da er hier während der Laktation die Versorgung des Neugeborenen mit Iod garantiert.

Mit der Beschreibung des NIS als Zielgen der SREBPs in FRTL-5-Zellen stellte sich die Frage, ob der NIS auch in anderen Organen auf diese Weise reguliert wird. Diese Arbeit untersuchte die Hypothese, dass die NIS-Regulation in der Milchdrüse ebenfalls SREBP-abhängig ist. Aufgrund der Ergebnisse der Studie von Ringseis *et al.* (2013) sollte die Hypothese bestätigt werden, dass der NIS in der Milchdrüse auf gleiche Weise über die SREBPs reguliert wird, wie in der Schilddrüse.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass SREBPs in der Milchdrüse als Regulatoren des NIS fungieren. Es konnte erstmals für dieses Gewebe gezeigt werden, dass der NIS und somit die aktive Aufnahme von Iodid über die SREBPs beeinflusst werden kann.

### 4.1 Regulation des Natrium-Iodid-Symporters in der Milchdrüse durch die SREBPs *in vitro*

Die bisherigen Erkenntnisse über die Regulation des NIS und somit der Iodid-Aufnahme in die Milchdrüse beschränken sich auf die hormonellen Einflüsse von Oxytocin, 17- $\beta$ -Estradiol und Prolaktin (Tazebay *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2000; Rillema *et al.*, 2000). Des Weiteren ist die NIS-Induktion durch atRA über den RAR und RXR beschrieben (Kogai *et al.*, 2008).

Der *mammary gland* NIS (mgNIS) wird nur während der späten Trächtigkeit und der Laktation, sowie in der überwiegenden Mehrzahl von Brustkrebszellen exprimiert (Portulano *et al.*, 2014; Tazebay *et al.*, 2000; Wapnir *et al.*, 2004). MCF-7-Zellen werden sehr häufig in der Brustkrebsforschung eingesetzt und es ist bekannt, dass aufgrund einer funktionalen Expression des Östrogen-Rezeptors eine Steigerung der

NIS-Expression mittels atRA induziert werden kann (Kogai *et al.*, 2000; Alotaibi *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden MCF-7-Zellen als Modell einer Milchdrüsenzelle für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet.

In den durchgeführten Zellexperimenten musste die NIS-Expression zum Teil mittels atRA stimuliert werden, um den Einfluss der SREBPs auf den NIS untersuchen zu können. Die NIS-Induktion durch atRA wird über ein Heterodimer aus den beiden Nuklearrezeptoren RAR und RXR, vor allem RAR $\beta$ /RXR $\alpha$ , vermittelt und auf zwei verschiedene Wege bewirkt. Zum einen bewirkt die atRA nicht-genomische Effekte über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und zum anderen genomische Effekte über das RARE. PI3K spielt vor allem in der Zellproliferation und im Zellstoffwechsel eine wichtige Rolle. Die über das RARE vermittelten genomischen Effekte beruhen auf Sequenzen, die sich häufig im Intron-Bereich des NIS-Gens befinden (Kogai und Brent, 2012). Diese NIS-Induktion über die atRA hat keinen Einfluss auf die Expression der SREBPs und deren Zielgene. Diese Tatsache konnte in den durchgeführten Experimenten mit einer Ausnahme bestätigt werden. Die mRNA-Konzentration der HMGCR wurde erstaunlicherweise in einem Zellexperiment signifikant verändert.

Die Untersuchungen und Ergebnisse der SREBP-abhängigen Regulation des NIS in der Milchdrüse stellen einen völlig neuen Ansatz im Verständnis der NIS-Regulation in diesem Gewebe dar.

Um die von uns aufgestellte Hypothese zu überprüfen und in Anlehnung an vorangegangene Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe, wurden in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Sterolen auf die NIS-Expression, die Folgen eines SREBP-*Knockdowns* bzw. einer nSREBP-Überexpression sowie die Sterolabhängigkeit des Iodid-*Uptake* untersucht (Ringseis *et al.*, 2013). Abschließend wurde die Existenz mindestens einer putativen Bindungssequenz der SREBPs im Promotorbereich des humanen NIS nachgewiesen.

Zunächst wurde die SREBP-Ausreifung durch Inkubation mit 25-HC gehemmt. 25-HC ist einer der potentesten Inhibitoren der SREBP-Prozessierung und hat diesbezüglich eine um mehr als 100-fach stärkere Wirkung als Cholesterol (Tang *et al.*, 2011). Nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit 5  $\mu$ M 25-HC konnte eine Verminderung der relativen mRNA-Konzentration von SREBP-1c auf ca. 50% der Ausgangskonzentration beobachtet werden. Die Analyse mittels Western Blot ergab eine signi-

fikant reduzierte Proteinkonzentration von nSREBP-1 nach Behandlung mit 25-HC. Die mRNA-Konzentration von SREBP-2 wurde durch Behandlung mit 25-HC um ca. 45% im Vergleich zur Behandlung mit atRA reduziert, diese Reduktion war aber aufgrund der großen Standardabweichung nicht signifikant. Die Proteinkonzentration von nSREBP-2 blieb durch die Behandlung unbeeinflusst. Dieses Ergebnis ist in Anbetracht der Tatsache, dass die beiden gemessenen Zielgene von SREBP-2, HMGCR und LDLR, auf mRNA-Ebene signifikant reduziert wurden, überraschend. Möglicherweise erfolgte die Messung von SREBP-2 auf Proteinebene zu einem zu späten Zeitpunkt, sodass die Proteinkonzentration zum Zeitpunkt der Messung schon wieder angestiegen war. Die mRNA-Konzentration des SREBP-1-Zielgens FASN wurde ebenfalls signifikant reduziert, während die mRNA-Konzentration des zweiten gemessenen Zielgens, GPAM, erstaunlicherweise durch die Behandlung nicht beeinflusst wurde. Die Messung der NIS-mRNA-Konzentration ergab nach vorangegangener Induktion durch atRA, eine signifikante Reduktion der mRNA-Konzentration. Es konnte also durch diese Behandlung eine signifikante Reduktion der NIS-mRNA-Konzentration gezeigt und somit bereits auf eine SREBP-abhängige Regulation des NIS in der Milchdrüse geschlossen werden. Diese Untersuchung lässt aber keinerlei Rückschlüsse darauf zu, ob eine der beiden SREBP-Isoformen einen stärkeren Einfluss auf die Regulation des NIS hat, da beide auf die gleiche Weise durch das oxidierte Cholesterolderivat in ihrer Ausreifung gehemmt werden.

Um die Beteiligung beider SREBP-Isoformen näher zu untersuchen, wurden anschließend die SREBPs mittels RNAi runterreguliert. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der mRNA-Konzentration des NIS nach *knockdown* sowohl von SREBP-1 als auch von SREBP-2 beobachtet werden. Die Verminderung der NIS-mRNA-Konzentration war jedoch nach dem *knockdown* von SREBP-1 mit ca. 50% deutlich stärker, sodass die Vermutung nahe lag, dass diese Isoform einen stärkeren Einfluss auf die Regulation des NIS hat. Die Spezifität der Effekte konnte anhand der mRNA-Konzentrationen der SREBPs nachvollzogen werden. Nach Behandlung mit SREBP-1-spezifischer siRNA fiel die Verminderung dieser Isoform stärker aus, als nach Behandlung mit SREBP-2-spezifischer siRNA. Nach *knockdown* mit SREBP-2-spezifischer siRNA zeigte sich allerdings unerwartet eine stärkere Verminderung der mRNA-Konzentration von SREBP-1. Dieser Effekt zeigt, dass die Isoformspezifität nicht so stark ausgeprägt war wie angenommen. Um diesen Effekt zu überprüfen,

könnte der Versuch mit einer anderen siRNA wiederholt werden. Bei den ebenfalls untersuchten Zielgenen GPAM und LDLR konnte eine signifikant reduzierte mRNA-Konzentration festgestellt werden, was eine erfolgreiche Transfektion bestätigt. Da die Sequenzspezifität nicht so deutlich ausgeprägt war, können durch dieses Experiment keine Rückschlüsse auf einen stärkeren Einfluss der einen oder anderen SREBP-Isoform gezogen werden. Ein Einfluss der SREBPs auf den NIS konnte aber nachgewiesen werden.

Um den Einfluss der Isoformen weiter zu untersuchen, wurde eine Überexpression der nSREBPs mittels Expressionsvektoren durchgeführt. Diese Expressionsvektoren exprimieren das transkriptionell aktive nSREBP-1c bzw. nSREBP-2. Hierbei sollte die Expression von nSREBP-1c und -2 isoformspezifisch gesteigert und die Auswirkungen analysiert werden. Auf Proteinebene konnte für beide SREBP-Isoformen ein starker Anstieg der nukleär-aktiven Form nach Transfektion mit dem jeweiligen Expressionsvektor nachgewiesen werden, was als Beweis für die Funktionsfähigkeit der Expressionsvektoren herangezogen werden kann. Auch auf Transkriptionsebene konnte für SREBP-2 und dessen Zielgene HMGCR und LDLR ein isoformspezifischer Anstieg der mRNA-Konzentration gezeigt werden. Für SREBP-1c konnte nach Behandlung mit dem nSREBP-2-Expressionsvektor ein signifikanter Anstieg der mRNA-Konzentration gezeigt werden, nicht aber nach Behandlung mit dem nSREBP-1c-Expressionsvektor. Für GPAM und FASN, die Zielgene von SREBP-1c, konnte eine leichte Steigerung der mRNA-Konzentration sowohl nach Transfektion mit dem nSREBP-1c-, als auch mit dem nSREBP-2-Expressionsvektor gezeigt werden, die aber nicht signifikant waren. Für den NIS konnte eine deutlich gesteigerte mRNA-Konzentration nach der Behandlung sowohl mit dem nSREBP-1c-, als auch mit dem nSREBP-2-Expressionsvektor gezeigt werden.

Die Ergebnisse der Ausreifungshemmung der SREBPs durch Behandlung mit 25-HC lieferten zunächst einen indirekten Hinweis auf eine SREBP-abhängige Regulation des NIS. Dieser indirekte Hinweis konnte anschließend mittels zwei verschiedenen Transfektionsversuchen weiter verstärkt werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen den Einfluss der SREBPs auf den NIS auf Transkriptionsebene. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die auf mRNA-Ebene beobachteten Effekte in FRTL-5-Zellen auch auf Proteinebene auftreten (Ringseis *et al.*, 2013). Der für diese Studien erfolgreich eingesetzte Antikörper

ist jedoch nicht für humane Zelllinien anwendbar. Aus diesem Grund verwendeten wir andere Anti-NIS-Antikörper, die für den Nachweis in humanen Zellen beschrieben wurden. Dennoch war es uns aus technischen Gründen nicht möglich die auf mRNA-Ebene festgestellten Effekte auch auf Protein-Ebene für den NIS darzustellen.

Im Rahmen der Untersuchungen des Iodid-*Uptakes* konnte eine um ca. 20% reduzierte Iodaufnahme nach Behandlung mit 25-HC nachgewiesen werden. Basal konnte in den MCF-7-Zellen keinerlei Aktivität des NIS gezeigt werden. Erst nach Stimulation der NIS-Expression mit atRA konnte die Aufnahme von radioaktivem Iodid in die Zellen gemessen werden. Diese gesteigerte Expression wurde nach Behandlung mit 25-HC und der damit verbundenen Hemmung der Ausreifung der SREBPs wieder signifikant reduziert. Der noch verbleibende Einstrom des radioaktiv markierten Iodids ist auf einen passiven Einstrom durch Diffusion zurückzuführen. Dieses Ergebnis impliziert eine Inhibierung der aktiven Iod-Aufnahme über den NIS.

Um nachzuweisen, dass das hNIS-Gen durch SREBPs transkriptionell reguliert wird, sollte eine Bindungssequenz im Promotorbereich oder im 5'-untranslatierten Bereich detektiert werden. Dazu wurde die 5'-flankierende Region des humanen NIS-Gens von Position -1250 bis +350 relativ zum Transkriptionsstart näher analysiert. Unter Verwendung der japanischen Software TFBIND wurde dieser Bereich auf putative Bindungsstellen der SREBPs untersucht. Diese Analyse identifizierte einige SRE- und E-Box-Elemente. Die genaue Vorhersage von SREs ist schwierig, da in den Promotor-Bereichen der verschiedenen SREBP-Zielgene keine eindeutige Übereinstimmung der Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Brown und Goldstein, 1999; Magaña und Osborne, 1996).

Erst kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe ein funktionales SRE im NIS-Gen der Ratte an Position +59 der 5'-UTR lokalisiert werden (Ringseis *et al.*, 2013). Die 5'-flankierende Region des NIS-Gens der Maus zeigt eine 68%-ige Übereinstimmung mit dem der Ratte, währendem nur eine geringe Ähnlichkeit zum hNIS besteht (Lin *et al.*, 2004). In Thyreozyten wurde in der 5'-flankierenden Region ein Stimulator der NIS-Transkription, der sogenannte NIS *upstream enhancer* (NUE) identifiziert (Ohno *et al.*, 1999). Dieser zeigt eine 94,4%-ige Übereinstimmung zwischen Maus und Ratte, aber nur eine Ähnlichkeit von 67,8% zwischen Maus und Mensch (Lin *et al.*, 2004). Der NUE stimuliert die NIS-Transkription in einer Schilddrüsen-spezifischen und von dem sekundären Botenstoff des cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)

abhängigen Art und Weise (Ohno *et al.*, 1999). Auch der Vergleich des NUE zwischen den verschiedenen Spezies macht also die Unterschiede in der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens von Maus, Ratte und Mensch deutlich. Auch verdeutlicht es, dass die Zelltyp-spezifische Gentranskription oft von einer Reihe an Transkriptionsfaktoren abhängig ist, deren Kombination einzigartig für den jeweiligen Zelltyp ist (Ohno *et al.*, 1999). Der Sequenzvergleich wurde durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass wichtige regulatorische Sequenzen im Genom konserviert sind und deshalb einen hohen Grad der Homologie zwischen verschiedenen Spezies aufweisen.

Mittels Reporterstudien kann der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Regulation eines bestimmten Gens untersucht werden. Üblicherweise wird für diese Untersuchungen ein ca. 2000 bp umfassender Bereich der 5'-flankierenden Region kloniert und analysiert. Aufgrund eines sehr hohen GC-Gehaltes gelang es uns nicht, die Region von Position -1250 bis +350 relativ zum Transkriptionsstart des hNIS-Gens in einem Stück zu synthetisieren. Aus diesem Grund wurde der zu untersuchende Bereich in vier Fragmente unterteilt und jeweils einzeln untersucht. Die einzelnen Fragmente wurden vor das Luciferase-Reporter gen kloniert und durch die Expressionsvektoren nSREBP-1c bzw. nSREBP-2 stimuliert. Bei diesen Untersuchungen konnten wir für die Fragmente -280/+259 und -1250/-930 eine SREBP-Sensitivität durch eine gesteigerte Luciferase-Aktivität zeigen. In den beiden anderen untersuchten DNA-Abschnitten war im Vergleich zur Negativkontrolle keine erhöhte Luciferase-Aktivität detektierbar. Somit konnte der Bereich, in dem sich putative SREs befinden auf zwei DNA-Fragmente eingegrenzt werden. Anhand dieser Untersuchungen kann gezeigt werden, dass das hNIS-Gen einer transkriptionellen Regulation durch SREBPs unterliegt. In den beiden aktivierbaren Fragmenten konnten mittels *in silico*-Analysen neun putative SREs ermittelt werden. Acht dieser putativen SREs kommen als funktionale SREs in Betracht. Das neunte *in silico* ermittelte putative SRE +242 (+) kann als funktionales SRE ausgeschlossen werden, da es außer dem aktivierten Fragment -280/+259 auch noch in dem Fragment +235/+350 zu finden ist, welches keine gesteigerte Luciferase-Aktivität aufweist.

Für die Beurteilung, ob eines oder welches der SREs für die Regulation die wichtigste Rolle spielt, bedarf es weiterer Untersuchungen. Dafür bietet sich der Einsatz von Reporter genmutanten an. Um die Aussage der Reporter gen-Studien wissenschaftlich

besser einordnen zu können, wurden Sequenzanalysen und –vergleiche zwischen den drei Spezies *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* durchgeführt. Diese ergaben einen hohen Grad der Übereinstimmung zwischen Maus und Ratte. Die Sequenzhomologie lag bei diesen beiden Spezies für alle putativen SREs zwischen 70,6% und 100%. Der Vergleich aller drei Spezies zeigte hingegen nur eine maximale Übereinstimmung von 55,6% für das SRE -242 (-). Diese relativ geringe Übereinstimmung der Nukleotid-Sequenzen zwischen den Spezies zeigt, dass die ermittelten putativen SREs keinen hohen Konservierungsgrad aufweisen. Dieses Ergebnis kann ein Hinweis darauf sein, dass der SREBP-abhängigen Regulation des NIS keine Schlüsselfunktion zukommt.

Des Weiteren könnte der Nachweis einer spezifischen *in vivo*-Bindung des nSREBPs an das SRE des mgNIS mittels *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) erbracht werden. Auch die Chromatin-Immunoprecipitation, die Protein-DNA-Interaktionen *in vivo* nachweist, wäre eine sinnvolle Ergänzung der erhobenen Daten.

### **4.2 Bestätigung der SREBP-abhängigen Regulation des NIS *in vivo***

Die Ergebnisse der *in vitro*-Studien bezüglich der Regulation des hNIS in Milchdrüsenzellen lieferten deutliche Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss der SREBPs. Deshalb stellte sich die Frage, ob diese Ergebnisse auch auf die Situation *in vivo* übertragen werden können. Um diese Frage klären zu können, wurde ein Rattenversuch durchgeführt, in dem die Tiere mit CLAs gefüttert wurden. Bei den CLAs handelt es sich um eine Gruppe konjugierter Linolsäuren. Sie enthalten, wie Linolsäure, 18 Kohlenstoffatome und 2 konjugierte Doppelbindungen. Es gibt viele verschiedene Isomere. Sie können in *trans-trans*-, *cis-cis*-, *trans-cis*- oder *cis-trans*-Konfiguration vorliegen. Natürlich kommen die CLAs hauptsächlich in Milch und Fleisch von Wiederkäuern vor, da sie von Mikroorganismen im Pansen gebildet werden. Von besonderer Bedeutung sind das *cis*-9, *trans*-11- und das *trans*-10, *cis*-12-Isomer. Das erstgenannte macht mit über 90% den Hauptbestandteil der mikrobiell synthetisierten CLAs aus. Bei dem *trans*-10, *cis*-12-Isomer handelt es sich dagegen um ein technisches Isomer, welches in der Natur nur eine untergeordnete Rolle spielt. In zahlreichen Tiermodell-Studien konnten positive Effekte von CLA gezeigt werden. Sie wirken protektiv gegen chemisch induzierte Tumore, immunmodulierend, hypolipidämisch, anti-atherogen, anti-diabetogen und anti-thrombotisch (Pariza und

Hargraves, 1985; Lee *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Houseknecht *et al.*, 1998; Truitt *et al.*, 1999).

Aus vielen Studien ist bekannt, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) zu einer reduzierten Konzentration an SREBP-1 führen, während der Gehalt an SREBP-2 davon unberührt bleibt (Hannah *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1999; Yahagi *et al.*, 1999; Mater *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt der PUFAs mit steigender Kettenlänge und steigendem Gehalt an Doppelbindungen zunimmt (Hannah *et al.* 2001). Eine Fütterung von PUFAs resultiert in einer deutlich verringerten mRNA-Konzentration von SREBP-1 und dessen Zielgenen (Yahagi *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). Sowohl die *Precursor*-, als auch die *mature* Form von SREBP-1 wird verringert (Xu *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus der SREBP-1-Inhibierung durch PUFAs ist noch nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass es sich um eine posttranskriptionale Regulation handelt (Hannah *et al.*, 2001; Yahagi *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999).

Der inhibitorische Effekt von CLAs auf die Milchfett-Synthese wurde zuerst für das *trans*-10, *cis*-12-CLA-Isomer, welches auch hauptverantwortlich für die CLA-Effekte ist und später auch für das *trans*-9, *cis*-11- und das *cis*-10, *trans*-12-CLA-Isomer gezeigt (Baumgard *et al.*, 2000; Perfield *et al.*, 2007; Saebø *et al.*, 2005). Baumgard *et al.* (2002) zeigten nach Applikation von *trans*-10, *cis*-12-CLA erstmals in der Milchdrüse eine erniedrigte Lipogenese und eine reduzierte Expression von Genen, die in der Milchfett-Synthese eine Rolle spielen.

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten in Übereinstimmung mit Daten der Literatur nach Verfütterung von CLA an weibliche Ratten während der Trächtigkeit und Laktation stark reduzierte Milchfett-Konzentrationen festgestellt werden. Außerdem wurde beobachtet, dass die mit einer CLA-Diät gefütterten Ratten reduzierte mRNA-Konzentrationen und reduzierte FASN-Aktivitäten aufwiesen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass CLA die Rate der *de novo* Fettsäure-Synthese in der Milchdrüse reduziert. Fettsäuren für die Triacylglycerol-Synthese in der Milchdrüse stammen hauptsächlich aus zwei Quellen: der *de novo* Synthese oder der Aufnahme von zirkulierenden Lipoproteinen (Ringseis *et al.*, 2004). Durch viele Studien ist bereits bekannt, dass eine Fütterung von CLA in einer signifikant erniedrigten mRNA-Konzentration von SREBP-1 resultiert. Aus diesem Grund stellte die Verfütterung von CLA an Ratten ein geeignetes Modell dar, um die

Hypothese zu überprüfen, dass die CLA-induzierte Reduktion der SREBP-1-Expression zu einer erniedrigten mRNA-Konzentration des NIS *in vivo* führt.

Es konnte gezeigt werden, dass die mit CLA gefütterten Ratten eine signifikant erniedrigte Expression von SREBP-1c im Vergleich zu den Ratten aus der Kontrollgruppe aufwiesen. Ebenso war GPAM, ein untersuchtes Targetge von SREBP-1c signifikant in seiner Expression vermindert. Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass auch die mRNA-Konzentration des NIS nach der CLA-Behandlung signifikant um ca. 50% reduziert war. Im Zusammenhang mit den *in vitro* erhobenen Daten liefert dieser Versuch einen weiteren Hinweis darauf, dass SREBPs auch in der Milchdrüse als Regulatoren des NIS fungieren.

Die in dieser Arbeit erstmals präsentierten Ergebnisse zeigen daher gänzlich neue Wege in der Regulation des NIS auf.

### 4.3 Einordnung der Relevanz

Um eine genaue Aussage bezüglich der Relevanz der hier erstmals gezeigten SREBP-abhängigen Regulation des NIS im Vergleich zu anderen bereits bekannten Regulationsmechanismen treffen zu können, bedarf es vergleichender Studien.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann man nur die verschiedenen Regulationsmechanismen anhand von Literaturangaben vergleichen. Das Säugen ist eine extrem wichtige Regulation der NIS-Expression. Studien von De la Vieja *et al.* (2000) an laktierenden Ratten haben gezeigt, dass 24 Stunden nach dem Absetzen der Jungtiere eine signifikante Reduktion der NIS-Expression messbar und diese bereits nach weiteren 24 Stunden nur schwer überhaupt feststellbar war. Im Vergleich dazu führte die 48-stündige Behandlung der humanen Mammakarzinomzellen mit 25-HC, nach NIS-Stimulation mit atRA, lediglich zu einer Verminderung der NIS-Expression um gut 34%. Ähnliche Verhältnisse wie sie De la Vieja *et al.* (2000) 24 Stunden nach dem Absetzen der Rattenjungen festgestellt hat konnten in der vorliegenden Arbeit 24 Stunden nach einem Knockdown mittels RNAi beobachtet werden. Auch durch diese Regulation über die SREBPs kam es zu einer signifikant erniedrigten Expression des NIS. Ebenso führte der *Knockdown* der SREBPs über RNAi nach 48 Stunden zu einer signifikant erniedrigten NIS-Expressionsrate, die aber, im Unterschied zu den

Untersuchungen von De la Vieja *et al.* (2000) auch zu diesem Zeitpunkt noch sehr gut detektierbar war.

Der Vergleich von hormoneller und SREBP-abhängiger Regulation ist deutlich schwieriger. Anhand der vorliegenden Daten aus den Studien von Tazebay *et al.* (2000) und Cho *et al.* (2000) lässt sich keine Aussage bezüglich der Stärke des Einflusses auf die NIS-Expression treffen. Rillema *et al.* (2000) konnten in ihren Studien eine um das 20-fache gesteigerte Proteinkonzentration des NIS und einen verdoppelten bis verdreifachten Iodid-*Uptake* zeigen. Sie behandelten Milchdrüsenexplantate von Mäusen über 24 Stunden mit Prolaktin in verschiedenen Konzentrationen. Die Überexpressionstudien an humanen Mammakarzinomzellen, die ebenfalls über 24 Stunden liefen, zeigten eine Steigerung der NIS-mRNA-Expression um das 1,5-fache. Der Vergleich zwischen diesen Werten und ein Rückschluss auf die Stärke des jeweiligen Einflusses der Regulatoren ist aber nicht möglich.

Prolaktin, ein Hormon des Hypophysenvorderlappens, ist wichtig für die Milchbildung. Es stimuliert die Synthese von Milcheiweiß, Milchzucker und Milchfett und spielt eine wichtige Rolle in der Lipidsynthese der laktierenden Milchdrüse (Rudolph *et al.*, 2011). Weiterhin hat es Einfluss auf die Ausschüttung des Neuropeptids Oxytocin, welches im Hypophysenhinterlappen gebildet wird. Prolaktin und Oxytocin sind essentielle Hormone für die Laktation und den Saugakt. Bisher gibt es noch keine Studien, die einen eventuellen Einfluss von Prolaktin oder Oxytocin auf SREBPs untersuchen. Möglicherweise haben die beiden Hormone neben ihrer direkten Wirkung auf den NIS eine weitere, indirekte Wirkung über die SREBPs auf den Symporter.

Insgesamt kann man sagen, dass der NIS in der Milchdrüse, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, SREBP-abhängig reguliert wird. Der weitaus wichtigste Regulationsmechanismus ist aber der Saugakt in Verbindung mit den dabei ausgeschütteten Hormonen.

## 5 Zusammenfassung

Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) ist ein wichtiges Protein im Iod-Haushalt der Säugetiere. Er ist notwendig für die Aufnahme von Iodid über den Darm in die Blutbahn und somit für die Versorgung des Organismus mit diesem essentiellen Spurenelement. Da es sich bei Iodmangel um ein weltweites Problem handelt, ist es von großem Interesse, mehr über die Regulation des NIS zu erfahren. Besonders verheerend wirkt sich ein Iodmangel bei Ungeborenen, Säuglingen und Kleinkindern aus, bei denen hochgradige Entwicklungsstörungen beobachtet werden können. Um dies zu verhindern, ist eine ausreichende Iodversorgung der Mutter während der Schwangerschaft und Stillzeit wichtig und zeigt die wesentliche Bedeutung des NIS in der Milchdrüse. In kürzlich durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass der NIS in Schilddrüsenzellen neben der primären Regulation durch Thyreotropin (TSH, Thyreoidea stimulierendes Hormon) auch durch die *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) reguliert wird. Die SREBPs sind als Transkriptionsfaktoren aus dem Lipid- und Cholesterinstoffwechsel bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu untersuchen, dass SREBPs auch in der Milchdrüse als Regulatoren des NIS fungieren. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der *in vitro*-Regulation des NIS in MCF-7-Zellen, einer humanen Brustadenokarzinomzelllinie. Die basale NIS-Expression in dieser Zelllinie ist aber so gering, dass sie in einigen Versuchen durch all-trans Retinsäure (atRA) gesteigert werden musste. Es konnte gezeigt werden, dass eine Ausreifungshemmung der SREBPs mit dem potenten Inhibitor 25-Hydroxycholesterin (25-HC) zu einer signifikant erniedrigten NIS-Expression führt. Auch nach *Knockdown* von SREBP-1c und SREBP-2 mittels RNA-Interferenz (RNAi) wurden signifikant niedrigere mRNA-Konzentrationen des NIS gemessen. Eine Überexpression von SREBP-1c, bzw. SREBP-2 mit sequenzspezifischen Expressionsvektoren führte zu einer signifikant erhöhten NIS-Expression. Mit der Messung des Radioiodid-*Uptakes* konnten die gesammelten Daten untermauert werden. Es konnte eine signifikant niedrigere Iodid-Aufnahme nach Behandlung mit 25-HC gemessen werden. Um zu zeigen, dass das humane NIS-Gen in der Milchdrüse durch SREBPs transkriptionell reguliert wird, sollte anschließend eine Bindungssequenz für SREBPs im humanen NIS-Gen lokalisiert werden. Der Sequenzvergleich des humanen Promotorbereichs mit dem von Ratte und Maus zeigte keine

hohe Homologie. Für die Reporterstudien wurde ein 1600 bp umfassender Bereich der 5'-flankierenden Region des humanen NIS-Gens in 4 Fragmente unterteilt und einzeln untersucht. In zwei dieser Fragmente konnte eine gesteigerte Luziferase-Aktivität nachgewiesen und somit mindestens ein SRE detektiert werden. In den beiden DNA-Fragmenten -280/+259 und -1250/-930 konnten in *silico* insgesamt neun putative SREs identifiziert werden, von denen bereits eins als funktionales SRE ausgeschlossen werden konnte. Der Vergleich dieser putativen Bindungssequenzen zwischen den drei Spezies *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* zeigte keinen hohen Konservierungsgrad. Evolutionär bedeutsame Mechanismen sind auf DNA-Ebene hoch konserviert und zeigen dementsprechend eine hohe Homologie auch zwischen verschiedenen Spezies.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die SREBP-abhängige Regulation des NIS in der laktierenden Milchdrüse von Ratten untersucht. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt, eine Kontroll- und eine Versuchsgruppe. Die Tiere der Versuchsgruppe erhielten eine Diät mit *conjugated linoleic acids* (CLAs), von denen ein inhibitorischer Effekt auf die Milchfettsynthese bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Tiere der Versuchsgruppe signifikant erniedrigte mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, dessen Zielgenen und des NIS aufwiesen. Auch dieses Experiment unterstützt die Beobachtung, dass der NIS in der Milchdrüse durch SREBPs reguliert wird.

Bislang war bekannt, dass der Hauptstimulus des NIS der Saugakt ist. Die vorliegende Arbeit zeigt nun einen neuen Regulationsmechanismus auf und ergab klare Hinweise darauf, dass der NIS in der Milchdrüse, ebenso wie in der Schilddrüse, SREBP-abhängig reguliert wird. Diese Erkenntnis ist ein wichtiger Schritt für das vollständige Verständnis der Regulationsmechanismen des NIS und eröffnet neue Wege um den Transport von Iod in die Milchdrüse besser zu verstehen.

## 6 Summary

The sodium-iodide symporter (NIS) plays a key role in iodine balance of mammals. It is required for the iodide uptake from the intestine into the blood stream, hence for the adequate supply of the organism with this essential trace element. Because iodine deficiency is a global problem it is of great value to learn more about the regulation of NIS. Iodine deficiency is devastating particularly in unborn children, nurslings and infants where drastic developmental disabilities occur. To avoid this problem it is necessary to guarantee a sufficient iodide uptake during pregnancy and nursing. These facts show the essential role of NIS in the mammary gland. Recent studies showed that NIS is regulated by sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) beside the primary regulation by thyroidea stimulating hormone (TSH) in rat thyroidal cells. SREBPs are transcription factors which are known as regulators of the lipid and cholesterol metabolism. The present study was designed to test the hypothesis whether NIS is regulated by SREBPs in the mammary gland. The first part of this thesis dealt with the *in vitro* regulation of NIS in the human breast cancer cell-line, MCF-7. The basal expression of NIS in these cells is very low, so it had been increased by all-trans retinoic acid (atRA) in some experiments. It was possible to show a significantly decreased NIS-expression after treatment with 25-hydroxycholesterol (25-HC), a potent inhibitor of SREBPs. Transfection with knockdown siRNAs targeting SREBP-1c and SREBP-2 also caused a significantly reduced mRNA concentration of NIS. Overexpression of both SREBP isoforms with sequence-specific expression vectors resulted in a significantly increased NIS-expression. NIS-specific iodide uptake was significantly lower after treatment with 25-HC. This result corresponds to the previous findings. To examine the transcriptional regulation of the human NIS-gene in the mammary gland by SREBPs, a SREBP-binding site should be localized in the human NIS-gene. Sequence alignment of the human promotor region with rat and mouse promotor region showed no high homology. An approximately 1600 bp sequence of the 5'-untranslated region was segmented into four fragments and analyzed by reporter gene assay. Two of these fragments showed a significantly increase in luciferase activity, what indicates the existence of at least one sterol regulatory element (SRE). The *in silico* analysis showed nine putative SREs in the frag-

ments -280/+259 and -1250/-930. One of these putative SREs could be excluded as a functional SRE already. Sequence comparison of these eight putative SREs between *rattus norvegicus*, *mus musculus* and *homo sapiens* showed only a low degree of conservation. It is known that evolutionary important mechanisms are highly conserved and show a high degree of homology between different species.

The SREBP-dependent regulation of NIS in rat lacting mammary gland was examined in the second part of this thesis. The animals used for this experiment were divided into two groups. The animals of the test group were fed with a diet containing conjugated linoleic acids (CLAs). It is known that CLAs are potent inhibitors of milk fat synthesis. Animals fed with the CLA-diet showed a significantly decreased mRNA-concentration of SREBP-1c, its target genes and NIS. This experiment supports the observation of SREBP-dependent regulation of NIS in the mammary gland.

Suckling is the main stimulus of NIS. This thesis shows a new regulatory mechanism and gives clear indications for a SREBP-dependent regulation in mammary gland NIS. This knowledge is an important step in the complete understanding of NIS regulation and opens new opportunities for a better understanding of iodine transport into the mammary gland.

## 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 (50), S. 52772–52780. DOI: 10.1074/jbc.M410302200.

Alotaibi, H.; Yaman, E. C.; Demirpençe, E.; Tazebay, U. H. (2006): Unliganded estrogen receptor-alpha activates transcription of the mammary gland Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (4), S. 1487–1496. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.049.

Amemiya-Kudo, M.; Shimano, H.; Hasty, A. H.; Yahagi, N.; Yoshikawa, T.; Matsuzaka, T. et al. (2002): Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J. Lipid Res.* 43 (8), S. 1220–1235.

Baumgard, L. H.; Corl, B. A.; Dwyer, D. A.; Saebø, A.; Bauman, D. E. (2000): Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278 (1), S. R179-84.

Baumgard, L. H.; Matitashvili, E.; Corl, B. A.; Dwyer, D. A.; Bauman, D. E. (2002): trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85 (9), S. 2155–2163. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74294-X.

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 (2), S. 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 (3), S. 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 (20), S. 11041–11048.

Brown, M. S.; Ye, J.; Rawson, R. B.; Goldstein, J. L. (2000): Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100 (4), S. 391–398.

Carrasco, N. (1993): Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim. Biophys. Acta - Reviews on Biomembranes* 1154 (1), S. 65–82. DOI: 10.1016/0304-4157(93)90017-I.

Cho, J. Y.; Léveillé, R.; Kao, R.; Rousset, B.; Parlow, A. F.; Burak, W. E. et al. (2000): Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter expression in mammary glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (8), S. 2936–2943. DOI: 10.1210/jcem.85.8.6727.

Cook, M. E.; Miller, C. C.; Park, Y.; Pariza, M. (1993): Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 72 (7), S. 1301–1305.

Dai, G.; Levy, O.; Carrasco, N. (1996): Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379 (6564), S. 458–460. DOI: 10.1038/379458a0.

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 (3), S. 1083–1105.

Delange, F. (2001): Iodine deficiency as a cause of brain damage. *Postgrad. Med. J.* 77 (906), S. 217–220.

Dohán, O.; De la Vieja, A.; Carrasco, N. (2006): Hydrocortisone and purinergic signaling stimulate sodium/iodide symporter (NIS)-mediated iodide transport in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 20 (5), S. 1121–1137. DOI: 10.1210/me.2005-0376.

Dohán, O.; De la Vieja, A.; Paroder, V.; Riedel, C.; Artani, M.; Reed, M. et al. (2003): The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 24 (1), S. 48–77. DOI: 10.1210/er.2001-0029.

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 (40), S. 24359–24364.

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 (6424), S. 38–45. DOI: 10.1038/363038a0.

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 (15), S. 10295–10302.

Günzel-Apel, A.-R. (2009): Praxis der endokrinologischen Krankheitsbilder bei Hund und Katze. Von der Pathophysiologie zur Therapie ; 63 Tabellen. Hg. v. Renate Hämmerling. Stuttgart: Parey.

Hannah, V. C.; Ou, J.; Luong, A.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2001): Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.* 276 (6), S. 4365–4372. DOI: 10.1074/jbc.M007273200.

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 (9), S. 1125–1131. DOI: 10.1172/JCI15593.

Houseknecht, K. L.; Vanden Heuvel, J P; Moya-Camarena, S. Y.; Portocarrero, C. P.; Peck, L. W.; Nickel, K. P.; Belury, M. A. (1998): Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (3), S. 678–682.

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 (3), S. 415–426.

Hua, X.; Sakai, J.; Ho, Y. K.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (1995a): Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J. Biol. Chem.* 270 (49), S. 29422–29427.

Hua, X.; Wu, J.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Hobbs, H. H. (1995b): 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 (3), S. 667–673.

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 sti-

ulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (24), S. 11603–11607.

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 (6), S. 1191–1198.

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 (4), S. 767–776.

Jackson, S. M.; Ericsson, J.; Osborne, T. F.; Edwards, P. A. (1995): NF-Y has a novel role in sterol-dependent transcription of two cholesterologenic genes. *J. Biol. Chem.* 270 (37), S. 21445–21448.

Jhiang, S. M.; Cho, J. Y.; Ryu, K. Y.; DeYoung, B. R.; Smanik, P. A.; McGaughy, V. R. et al. (1998): An immunohistochemical study of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology* 139 (10), S. 4416–4419. DOI: 10.1210/endo.139.10.6329.

Kaminsky, S. M.; Levy, O.; Salvador, C.; Dai, G.; Carrasco, N. (1994): Na<sup>(+)</sup>-I<sup>-</sup> symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I<sup>(-)</sup>-transporting cultured thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (9), S. 3789–3793.

Karasinska, J. M.; Hayden, M. R. (2011): Cholesterol metabolism in Huntington disease. *Nat. Rev. Neurol.* 7 (10), S. 561–572. DOI: 10.1038/nrneurol.2011.132.

Kim, H. J.; Takahashi, M.; Ezaki, O. (1999): Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J. Biol. Chem.* 274 (36), S. 25892–25898.

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 (5), S. 2582–2588.

- Kogai, T.; Taki, K.; Brent, G. A. (2006): Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 13 (3), S. 797–826. DOI: 10.1677/erc.1.01143.
- Kogai, T.; Brent, G. A. (2012): The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 135 (3), S. 355–370. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.06.007.
- Kogai, T.; Liu, Y.-Y.; Mody, K.; Shamsian, D. V.; Brent, G. A. (2012): Regulation of sodium iodide symporter gene expression by Rac1/p38 $\beta$  mitogen-activated protein kinase signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 287 (5), S. 3292–3300. DOI: 10.1074/jbc.M111.315523.
- Kogai, T.; Ohashi, E.; Jacobs, M. S.; Sajid-Crockett, S.; Fisher, M. L.; Kanamoto, Y.; Brent, G. A. (2008): Retinoic acid stimulation of the sodium/iodide symporter in MCF-7 breast cancer cells is mediated by the insulin growth factor-I/phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (5), S. 1884–1892. DOI: 10.1210/jc.2007-1627.
- Kogai, T.; Schultz, J. J.; Johnson, L. S.; Huang, M.; Brent, G. A. (2000): Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (15), S. 8519–8524.
- La Perle, K. M. D.; Kim, D. C.; Hall, N. C.; Bobbey, A.; Shen, D. H.; Nagy, R. S. et al. (2013): Modulation of sodium/iodide symporter expression in the salivary gland. *Thyroid* 23 (8), S. 1029–1036. DOI: 10.1089/thy.2012.0571.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lee, K. N.; Kritchevsky, D.; Pariza, M. W. (1994): Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108 (1), S. 19–25.
- Lee, K. W.; Lee, H. J.; Cho, H. Y.; Kim, Y. J. (2005): Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 (2), S. 135–144. DOI: 10.1080/10408690490911800.
- Levy, O.; Dai, G.; Riedel, C.; Ginter, C. S.; Paul, E. M.; Lebowitz, A. N.; Carrasco, N. (1997): Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (11), S. 5568–5573.

- Levy, O.; De la Vieja, A.; Ginter, C. S.; Riedel, C.; Dai, G.; Carrasco, N. (1998): N-linked Glycosylation of the Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter (NIS): Implications for its secondary structure model. *J. Biol. Chem.* 273 (35), S. 22657–22663. DOI: 10.1074/jbc.273.35.22657.
- 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 (1), S. 19–27. DOI: 10.1089/105072504322783803.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Luci, S.; Bettzieche, A.; 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 (6), S. 398–406. DOI: 10.1024/0300-9831.76.6.398.
- 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 (51), S. 32689–32694.
- Mater, M. K.; Thelen, A. P.; Pan, D. A.; Jump, D. B. (1999): Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274 (46), S. 32725–32732.
- Micali, S.; Bulotta, S.; Puppini, C.; Territo, A.; Navarra, M.; Bianchi, G. et al. (2014): Sodium iodide symporter (NIS) in extrathyroidal malignancies: focus on breast and urological cancer. *BMC Cancer* 14, S. 303. DOI: 10.1186/1471-2407-14-303.
- Mülhardt, C. (2009): *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Experimentator).
- Nicola, J. P.; Basquin, C.; Portulano, C.; Reyna-Neyra, A.; Paroder, M.; Carrasco, N. (2009): The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter mediates active iodide uptake in the intestine. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 296 (4), S. C654-62. DOI: 10.1152/ajpcell.00509.2008.
- 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 (27), S. 17243–17250.

- Ohno, M.; Zannini, M.; Levy, O.; Carrasco, N.; Di Lauro, R. (1999): The paired-domain transcription factor Pax8 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 (3), S. 2051–2060.
- 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 (22), S. 2578–2591. DOI: 10.1101/gad.1854309.
- Pariza, M. W.; Hargraves, W. A. (1985): A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 6 (4), S. 591–593.
- Paroder, V.; Nicola, J. P.; Ginter, C. S.; Carrasco, N. (2013): The iodide-transport-defect-causing mutation R124H: a -amino group at position 124 is critical for maturation and trafficking of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *J. Cell Sci.* 126 (15), S. 3305–3313. DOI: 10.1242/jcs.120246.
- Perfield, J. W.; Lock, A. L.; Griinari, J. M.; Saebø, A.; Delmonte, P.; Dwyer, D. A.; Bauman, D. E. (2007): Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90 (5), S. 2211–2218. DOI: 10.3168/jds.2006-745.
- 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 (1), S. 185–196.
- Portulano, C.; Paroder-Belenitsky, M.; Carrasco, N. (2014): The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS): mechanism and medical impact. *Endocr. Rev.* 35 (1), S. 106–149. DOI: 10.1210/er.2012-1036.
- Rauer, C. (Dissertation 2014) Untersuchungen zur Regulation des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) und der Thyreoperoxidase (TPO) durch die sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs). <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/10903/>
- 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 (3), S. e91265. DOI: 10.1371/journal.pone.0091265.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123 (11), S. 1939–1951.

Rillema, J. A.; Yu, T. X.; Jhiang, S. M. (2000): Effect of prolactin on sodium iodide symporter expression in mouse mammary gland explants. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279 (4), S. E769-72.

Ringseis, R.; Rauer, C.; Rothe, S.; Gessner, D. K.; Schütz, L.-M.; Luci, S. et al. (2013): Sterol regulatory element-binding proteins are regulators of the NIS gene in thyroid cells. *Mol. Endocrinol.* 27 (5), S. 781–800. DOI: 10.1210/me.2012-1269.

Ringseis, R.; Saal, D.; Müller, A.; Steinhart, H.; Eder, K. (2004): Dietary conjugated linoleic acids lower the triacylglycerol concentration in the milk of lactating rats and impair the growth and increase the mortality of their suckling pups. *J. Nutr.* 134 (12), S. 3327–3334.

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](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2012/8597/pdf/RotheSusanne_2011_12_16.pdf)

Rudolph, M. C.; Russell, T. D.; Webb, P.; Neville, M. C.; Anderson, S. M. (2011): Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes in vivo in the lactating mammary epithelial cell. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300 (6), S. E1059-68. DOI: 10.1152/ajpendo.00083.2011.

Ryan, J.; Curran, C. E.; Hennessy, E.; Newell, J.; Morris, J. C.; Kerin, M. J.; Dwyer, R. M. (2011): The sodium iodide symporter (NIS) and potential regulators in normal, benign and malignant human breast tissue. *PLOS ONE* 6 (1), S. e16023. DOI: 10.1371/journal.pone.0016023.

Saebø, A.; Saebø, P.-C.; Griinari, J. M.; Shingfield, K. J. (2005): Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10,12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids* 40 (8), S. 823–832.

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 (3), S. 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). In: *J. Biol. Chem.* 269 (25), S. 17267–17273.
- 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 (5), S. 846–854. DOI: 10.1172/JCI119248.
- 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 (5), S. 838–845. DOI: 10.1172/JCI119247.
- Smanik, P. A.; Liu, Q.; Furminger, T. L.; Ryu, K.; Xing, S.; Mazzaferri, E. L.; Jhiang, S. M. (1996): Cloning of the Human Sodium Iodide Symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226 (2), S. 339–345. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1358.
- Smanik, P. A.; Ryu, K. Y.; Theil, K. S.; Mazzaferri, E. L.; Jhiang, S. M. (1997): Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 138 (8), S. 3555–3558. DOI: 10.1210/endo.138.8.5262.
- Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (5), S. 1409–1416.
- 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 (1), S. 44–56. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.12.004.
- Tazebay, U. H.; Wapnir, I. L.; Levy, O.; Dohan, O.; Zuckier, L. S.; Zhao, Q. H. et al. (2000): The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat. Med.* 6 (8), S. 871–878. DOI: 10.1038/78630.
- Tonacchera, M.; Pinchera, A.; Dimida, A.; Ferrarini, E.; Agretti, P.; Vitti, P. et al. (2004): Relative potencies and additivity of perchlorate, thiocyanate, nitrate, and iodide

de on the inhibition of radioactive iodide uptake by the human sodium iodide symporter. *Thyroid* 14 (12), S. 1012–1019. DOI: 10.1089/thy.2004.14.1012.

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 (8), S. 4753–4759.

Truitt, A.; McNeill, G.; Vanderhoek, J. Y. (1999): Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim. Biophys. Acta* 1438 (2), S. 239–246.

Tuschl, T.; Zamore, P. D.; Lehmann, R.; Bartel, D. P.; Sharp, P. A. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13 (24), S. 3191–3197.

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 (1), S. 53–62.

Wapnir, I. L.; Goris, M.; Yudd, A.; Dohan, O.; Adelman, D.; Nowels, K.; Carrasco, N. (2004): The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin. Cancer Res.* 10 (13), S. 4294–4302. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0074.

Wapnir, I. L.; van de Rijn, M.; Nowels, K.; Amenta, P. S.; Walton, K.; Montgomery, K. et al. (2003): Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (4), S. 1880–1888. DOI: 10.1210/jc.2002-021544.

Xu, J.; Nakamura, M. T.; Cho, H. P.; Clarke, S. D. (1999): Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J. Biol. Chem.* 274 (33), S. 23577–23583.

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 (20), S. 12753–12758. DOI: 10.1073/pnas.162488899.

Yahagi, N.; Shimano, H.; Hasty, A. H.; Amemiya-Kudo, M.; Okazaki, H.; Tamura, Y. et al. (1999): A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 274 (50), S. 35840–35844.

Yang, T.; Espenshade, P. J.; Wright, M. E.; Yabe, D.; Gong, Y.; Aebersold, R. et al. (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 (4), S. 489–500.

Yokoyama, C.; Wang, X.; Briggs, M. R.; Admon, A.; Wu, J.; Hua, X. et al. (1993): SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75 (1), S. 187–197.

# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz, ganz herzlich bei allen bedanken, die mir auf verschiedenste Weise geholfen haben, mein Projekt Doktorarbeit erfolgreich abzuschließen.

Mein erster und besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Klaus Eder.

Danke, dass Sie es mir ermöglicht haben, am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie zu promovieren und dieses hochinteressante Thema zu bearbeiten.

Ein extra Dankeschön geht auch an Herrn Dr. habil. Robert Ringseis für die stets kompetente und freundliche Betreuung, die vielen praktischen Ratschläge und die motivierenden Worte.

Vielen herzlichen Dank an Frau Dr. Gaiping Wen für die unersetzliche fachliche Hilfe bei den verschiedenen Arbeiten im Labor und die vielfältige Unterstützung.

Vielen lieben Dank Dr. Janine Keller und Dr. Aline Couturier für die vielen aufmunternden Worte gerade in der schwierigen Anfangszeit und die tolle Unterstützung!

Danke auch an alle meine netten Mitdoktorandinnen und an alle wissenschaftlichen Mitarbeiter des Instituts.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen TA's bedanken. Vor allem bei Frauke Frank für die lustigen Momente gerade in den frühen Morgen- und späten Abendstunden und bei Anja Marx für die fachkundige und nette Anleitung im Strahlencentrum und auch für die vielen Tipps.

Es war eine schöne Zeit mit Euch allen!

Nicht zu vergessen sind aber auch meine MCF-7-Zellen. Danke, dass ihr mich durch alle Experimente begleitet habt, ihr immer genügsam wart und mir keine unlösbaren Probleme beschert habt!

Aber ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mama und meinem Freund Holger bedanken. Ihr habt mir diese Erfahrung erst möglich gemacht, ohne Euch wäre es einfach unmöglich gewesen diese Doktorarbeit zu schreiben. Danke, dass ihr mich immer unterstützt, ich bin unendlich dankbar, dass ich Euch habe!

Danke auch an meinen Bruder Manuel, meine Schwägerin Katrin, all meine Freunde und natürlich meinen Hund Rocky.

Einen ganz besonders herzlichen Dank an meinen Papa im Himmel.

# Eidesstattliche Versicherung

"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 oder nicht 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



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6323-8



9 783835 196323 8