

**Charakterisierung von Interaktionspartnern des  
Kernrezeptors CAR („Constitutive Androstane  
Receptor“) mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften  
Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für  
Klinische Pharmakologie

vorgelegt von  
Clint Melgar

aus Landau in der Pfalz

2010

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer  
1. berichtende Person: Prof. Dr. Lutz Graeve  
2. berichtende Person: Prof. Dr. Matthias Schwab

Eingereicht am: 03.11.2010  
Mündliche Prüfung: 27.01.2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 03.11.2010 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Stuttgart, 28.10.2010

---

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis.....  | VI        |
| Abbildungsverzeichnis.....  | IX        |
| Tabellenverzeichnis.....  | X         |
| Zusammenfassung.....  | 1         |
| Abstract.....   | 3         |
| <b>1. Einleitung.....</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1. Detoxifikation durch Biotransformation: Phase I-III.....                 | 5         |
| 1.2 Kernrezeptor CAR (konstitutive Androstanrezeptor).....                    | 8         |
| 1.2.1. Struktur und Regulation.....   | 9         |
| 1.2.2. CAR-Aktivierung.....   | 13        |
| 1.2.3. Ko-Faktoren von CAR.....   | 15        |
| 1.2.4. Rolle von CAR im Bilirubinmetabolismus und in der Häm biosynthese..... | 18        |
| 1.2.5. Rolle von CAR in der Gallensäurehomöostas.....                         | 19        |
| 1.2.6. Rolle von CAR in Glukoneogenese und Lipidmetabolismus.....             | 19        |
| 1.3. MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MS).....                                  | 20        |
| <b>2. Zielsetzung.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>3. Material und Methoden.....</b>  | <b>25</b> |
| 3.1. Material.....  | 25        |
| 3.1.1. Laborgeräte.....   | 25        |
| 3.1.2. Chemikalien.....   | 27        |
| 3.1.3. Plasmide.....  | 29        |
| 3.1.4. Zellkulturmaterialien.....   | 29        |
| 3.1.5. Arbeitsmaterialien.....  | 30        |
| 3.1.6. Protein- / DNA-Marker .....  | 31        |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.7. Verwendete Antikörper.....   | 31 |
| 3.1.8. Bakterienstämme.....   | 32 |
| 3.1.9. Zellkulturlinien.....  | 33 |
| 3.2. Methoden.....  | 34 |
| 3.2.1. Zellkultur.....  | 34 |
| 3.2.1.1. Zellkulturbedingungen.....   | 34 |
| 3.2.1.2. Langzeitlagerung von Zellen.....   | 35 |
| 3.2.1.3. Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitationstechnik.....         | 35 |
| 3.2.1.4. Transfektion mit FuGENE HD (Roche).....                                  | 37 |
| 3.2.1.5. Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten.....                         | 38 |
| 3.2.2. Bakterienkultur.....   | 38 |
| 3.2.2.1. Vermehrung und Lagerung von Bakterienkulturen.....                       | 38 |
| 3.2.3. DNA (Deoxyribonukleinsäuren).....  | 39 |
| 3.2.3.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR , Polymerase Chain Reaction).....         | 39 |
| 3.2.3.2. Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen und Ligation.....               | 41 |
| 3.2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese.....   | 41 |
| 3.2.3.4. DNA-Isolation aus dem Agarosegel.....                                    | 42 |
| 3.2.3.5. Transformation in kompetente Bakterien.....                              | 42 |
| 3.2.3.6. Mini-Plasmid DNA-Präparation mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid).... | 43 |
| 3.2.3.7. Midi-Plasmid DNA-Präparation mit Vakuum-Elution (Promega).....           | 44 |
| 3.2.3.8. Cyclesequencing / DNA-Sequenzierung.....                                 | 45 |
| 3.2.4. RNA (Ribonukleinsäuren).....   | 46 |
| 3.2.4.1. RNA-Isolation.....   | 46 |
| 3.2.4.2. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von RNA.....           | 47 |
| 3.2.4.3. Reverse Transkription der RNA.....                                       | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.4.4. Quantitative PCR mit dem TaqMan System .....                                       | 49 |
| 3.2.5. Proteinbiochemische Methoden .....   | 51 |
| 3.2.5.1. Präparation von Gesamtzellen-Proteinextrakten. ....                                | 51 |
| 3.2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli .....                  | 51 |
| 3.2.5.3. Western Blot Analyse.....  | 54 |
| 3.2.5.4. Entfernen gebundener Antikörper von der Membran („Stripping“) .....                | 56 |
| 3.2.5.5. Färbemethoden .....  | 57 |
| 3.2.5.5.1. Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) .....   | 57 |
| 3.2.5.5.2. Silberfärbung .....  | 57 |
| 3.2.5.6. Expression von GST-Fusionsproteinen.....   | 59 |
| 3.2.5.7. Affinitätsreinigung der GST-Fusionsproteine über Glutathion-Sepharose.....         | 61 |
| 3.2.5.8. Pulldown-Assay Methode .....   | 62 |
| 3.2.5.9. Immunpräzipitation (IP).....   | 63 |
| 3.2.5.10. [35S]-Methionin-Markierung in vitro Transkription/Translation (Promega) .....     | 64 |
| 3.2.5.11. <i>In vitro</i> GST-Pulldown Assay mit [35S]-Methionin markierten Proteinen ..... | 65 |
| 3.2.6. Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung (MALDI) .....                        | 66 |
| 3.2.6.1. Vorbereitung der ausgeschnittenen Proteinbanden .....                              | 67 |
| 3.2.6.2. Verdau mit Trypsin .....   | 68 |
| 3.2.6.3. Applikation auf dem Probenträger (Target) .....                                    | 68 |
| 3.2.6.4. Messung mit MALDI- MS .....  | 69 |
| 3.2.6.5. Analyse massenspektrometrischer MALDI-Daten mittels PMF .....                      | 70 |
| 3.2.7. RNA-Interferenz (RNAi) .....   | 71 |
| 3.2.7.1. Herstellung von Einzelstrang-DNA-Oligonukleotiden.....                             | 71 |
| 3.2.7.2. LR-Rekombinationsreaktion .....  | 73 |
| 3.2.7.3. Herstellung lentiviraler Expressionsvektoren in HEK 293FT-Zellen.....              | 74 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4. Ergebnisse .....</b>  | <b>77</b>  |
| 4.1. Expression, Affinitätsreinigung und Quantifizierung exprimierter Proteine .....              | 77         |
| 4.1.1. GST-Expression als Negativkontrolle.....   | 77         |
| 4.1.2. Expression des GST-CAR-LBD-Fusionsproteins.....  | 78         |
| 4.2. Pulldown-Assays zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen .....                     | 80         |
| 4.2.1. Western Blot Analysen zur Validierung der Pulldown-Assays.....                             | 81         |
| 4.2.2. Pulldown-Assays mit GST-CAR-LBD-Fusionsprotein und GST .....                               | 83         |
| 4.2.3. Vergleich von Pulldownproben von Rattenleber und humaner Leber .....                       | 88         |
| 4.2.4. Proteinverteilung nach funktionellen Eigenschaften.....                                    | 90         |
| 4.3. BAF 155 (SMARCC1) als neuer Interaktionspartner des Kernrezeptors CAR.....                   | 91         |
| 4.3.1. Interaktion von BAF 155 und CAR <i>in vitro</i> .....                                      | 93         |
| 4.3.1.1. [35S]-Methionin Markierung von BAF 155 .....   | 93         |
| 4.3.1.2. Interaktion von BAF 155 und CAR im Bindungsassay <i>in vitro</i> .....                   | 95         |
| 4.3.2. In vivo Interaktion von BAF 155 und CAR und Identifizierung der<br>Interaktionsdomäne..... | 96         |
| 4.3.3. Untersuchung der BAF 155 Funktion in der CAR-abhängigen Genregulation .....                | 99         |
| <b>5. Diskussion.....</b>   | <b>104</b> |
| 5.1. Pulldown-Assay zur Untersuchung von CAR-interagierenden Proteinen .....                      | 104        |
| 5.2. CAR-Interaktionspartner BAF 155 als Mitglied des SWI / SNF Komplexes.....                    | 106        |
| 5.2.1. Aufbau des SWI / SNF Komplexen .....   | 108        |
| 5.2.2. Aktivierungsmechanismus des SWI / SNF Komplexes.....                                       | 109        |
| 5.2.3. Funktion von BAF 155.....  | 110        |
| 5.3. Weitere Interaktionspartner von CAR.....   | 115        |
| 5.3.1. Pyruvatcarboxylase (PC).....   | 115        |
| 5.3.2. Argininosuccinatesynthetase 1 (ASS1).....  | 116        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.3.3. Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH).....   | 117        |
| 5.3.4. Carbonylreduktase 1 (CBR1).....                      | 118        |
| 5.3.5. Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK).....         | 119        |
| 5.3.6. Struktur- und Transportproteine.....                 | 120        |
| 5.3.6.1. Lamin A.....                                       | 121        |
| 5.3.6.2. Fibrinogen .....                                   | 122        |
| 5.3.6.3. Dysferlin.....                                     | 123        |
| 5.3.6.4. Phosphatidylinositol-Transferprotein 1 (PITP)..... | 123        |
| 5.3.6.5. Hitzeschockprotein 70 (HSP70).....                 | 124        |
| <b>6. Literaturverzeichnis.....</b>                         | <b>126</b> |
| <b>7. Anhang .....</b>                                      | <b>142</b> |
| <b>8. Danksagung.....</b>                                   | <b>144</b> |
| Curriculum vitae.....                                       | 145        |



## Abkürzungsverzeichnis

|       |   |
|-------|---|
| 1D    | Eindimensional  |
| 2D    | Zweidimensional   |
| ACN   | Acetonitril   |
| AF    | Aktivierungsfunktion  |
| AHR   | Arylhydrogenrezeptor  |
| APS   | Ammoniumpersulfat   |
| AMP   | Ampicillin  |
| AP    | Aktivatorprotein  |
| AR    | Androgenrezeptor  |
| ASS   | Argininsuccinatsynthetase   |
| ATP   | Adenosintriphosphat   |
| BAF   | Brg1-assoziierter Faktor  |
| BCA   | Bicinchoninic acid, Bicinchoninsäure  |
| BPB   | Bromphenolblau  |
| Bis   | N, N' - Methylenbisacrylamid  |
| BSA   | Bovine serum albumine, Rinderserumalbumin   |
| CAP   | Chromatin-assozierte Proteine   |
| CAR   | constitutive androstane receptor, konstitutiver Androstanrezeptor                   |
| CBR   | Carbonylreduktase   |
| CCRP  | Cytolisches CAR Retentionsprotein   |
| CITCO | 6-(4-Chlorophenyl)Imidazo[2,1-b][1,3]Thiazole-5-CarbaldehydO-(dichlorobenzyl)-Oxime |
| CPZ   | Chlorpromazin   |
| CXR   | Chicken X Receptor  |
| Da    | Dalton  |
| DBD   | DNA- Bindungdomäne  |
| DDT   | Dichlordiphenyltrichloroethan   |
| DHEA  | Dehydroepiandrosteron   |
| DMF   | Dimethylformamid  |
| DMP   | Dimethylpimelimidat   |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid  |
| DNA   | Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure                                       |
| DTT   | Dithiothreitol  |
| EDTA  | Ethylendiamintetraacetat  |
| EGF   | epidermale Wachstumsfaktor  |
| EKLF  | erythroider Krüppel-like Faktor   |
| ERK   | extrazelluläre signalregulierte Kinase  |
| ERR   | Östrogenverwandter (related-) Rezeptor  |
| ESC   | embryonalen Stammzellen (cells)   |
| EtOH  | Ethanol   |
| g     | Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )   |

---

|        |   |
|--------|---|
| G6Pase | Glukose-6-Phosphatase   |
| GAPDH  | Glyzeraldehyd-3-phosphatdehydrogenase   |
| GDP    | Guanindiphosphat  |
| GFP    | Grünfluoreszenzprotein  |
| GR     | Glukokortikoidrezeptor  |
| GRIP   | Glutamatrezeptor interagierendes Protein  |
| GSH    | Glutathion  |
| GST    | Glutathion S-Transferase  |
| HAc    | Essigsäure  |
| HGF    | Hepatozytenwachstums(growth-)faktor   |
| HNF    | Hepatozytennuklearfaktor  |
| HSD    | Hydroxysteroiddehydrogenase   |
| HSP    | Heat shock protein HSP  |
| IAA    | Iodacetamid   |
| IPTG   | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid  |
| kDa    | Kilodalton  |
| LBD    | Ligandenbindungsdomäne  |
| LXR    | Leber X Rezeptor  |
| m/z    | Masse/Ladungs- Verhältnis   |
| MALDI  | Matrix- assisted laser desorption ionisation, Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisierung |
| MeOH   | Methanol  |
| MW     | Molekulargewicht, molecular weight  |
| MS     | Massenspektrometrie   |
| MS     | multiple Sklerose   |
| NaCl   | Natriumchlorid  |
| NCBI   | National Center for Biotechnology Information   |
| NLS    | Nukleares Lokalisationssignal   |
| NR     | Nuklearrezeptor   |
| Ns     | Nanosekunden  |
| OPZ    | Oltipraz  |
| PAGE   | Polyacrylamid- Gelelektrophorese  |
| PB     | Phenobarbital   |
| PBAF   | Polybromo-assoziierter Faktor   |
| PC     | Pyruvatcarboxylase  |
| PCR    | Polymerase Ketten(chain-)reaction   |
| PEPCK  | Phosphoenolpyruvatcarboxykinase   |
| PEP    | Phosphoenolpyruvat  |
| PEPCK  | Phosphoenolpyruvatcarboxykinase   |
| PGC    | Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor $\gamma$ Co-Aktivator 1                             |
| PIP3   | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat   |
| PITP   | Phosphatidylinositol (PtdIns) Transferprotein   |
| PLC    | Phospholipase C   |

|         |   |
|---------|---|
| PMF     | peptide mass fingerprint, Peptidmassenfingdruck         |
| PMSF    | Phenylmethylsulfonylfluorid                             |
| PP2A    | Proteinphosphatase 2A                                   |
| PPAR    | Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor             |
| PXR     | Pregnaner X Rezeptor                                    |
| RAR     | Retinoidsäurerezeptor                                   |
| RB      | Retinoblastoma  |
| RID     | receptor interaction domain, Rezeptorinteraktionsdomäne |
| RNA     | Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure                      |
| RXR     | Retinoid X-Rezeptor                                     |
| SDS     | Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat            |
| SNP     | Single Nucleotide Polymorphism                          |
| SRC-1   | Steroidrezeptor Co-Aktivator 1                          |
| SRG3    | SWI3-related gene product                               |
| SWI     | Switching   |
| TCPOBOP | 3,3', 5,5' - Tetrachlorid-bispyridyloxybenzen           |
| TEMED   | N,N,N',N' - Tetramethylendiamin                         |
| TFA     | Trifluoroacetic acid, Trifluoressigsäure                |
| TIF     | transkriptioneller intermediärer Faktor                 |
| TOF     | Time of Flight, Flugzeitrohr                            |
| TRIS    | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                          |
| UV      | Ultraviolett  |
| Y2H     | Yeast Two Hybrid  |

## Abbildungsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des xenobiotisch-endobiotisch metabolisierenden Systems der Biotransformations-Phasen I-III..... | 6   |
| Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des humanen CAR: Gen, mRNA und Protein.....  | 11  |
| Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der beiden Zinkfinger motive der CAR-DBD.....  | 12  |
| Abbildung 1.4: Hypothetische Darstellung der CAR Aktivierung.....  | 14  |
| Abbildung 1.5: Prinzip der MALDI-Ionisierung.....  | 21  |
| Abbildung 1.6: Prinzip des TOF-Analysators.....  | 22  |
| Abbildung 1.7: Proteinidentifizierung durch PMF- Methode.....  | 23  |
| Abbildung 4.1: Kontrolle der Expression und Affinitätsreinigung von GST.....   | 77  |
| Abbildung 4.2: GST-CAR-LBD –Fusionsprotein.....  | 79  |
| Abbildung 4.3: Optimierung der Waschbedingungen von Pulldown-Assay-Proteinproben. ....   | 81  |
| Abbildung 4.4: Western Blot mit RXR alpha (A) und SRC-1 (B) Antikörpern.....   | 82  |
| Abbildung 4.5: Proteinproben aus Rattenleberhomogenat.....   | 83  |
| Abbildung 4.6: MALDI-TOF-Massenspektrum von BAF 155.....   | 84  |
| Abbildung 4.7: Vergleich von aufgetrennten Proteinen aus Ratten- und Menschenleberhomogenat..  | 88  |
| Abbildung 4.8: Prozentuale Verteilung identifizierter Proteine nach funktionellen Eigenschaften....                                      | 90  |
| Abbildung 4.9: Detektion von BAF 155 in Pulldown-Assays .....  | 92  |
| Abbildung 4.10: Synthese der [35S]-Methionin markierten TNT-Proteine .....   | 94  |
| Abbildung 4.11: Interaktion zwischen BAF 155 und CAR im GST-Bindungsassay in vitro .....   | 95  |
| Abbildung 4.12: Schematische Darstellung unterschiedlicher BAF 155 Konstrukte .....  | 97  |
| Abbildung 4.13: Interaktion zwischen BAF 155 und CAR in vivo .....   | 98  |
| Abbildung 4.14: Effekt der shRNA BAF 155 Konstrukte in HEK Zellen.....   | 100 |
| Abbildung 4.15: Infektion von LS-CAR-Zellen mit BAF 155 CM1-Viren.....   | 101 |
| Abbildung 4.16: Effekt der Genregulation durch BAF 155.....  | 102 |
| Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des humanen SWI /SNF Komplexes mit Chromatin.....  | 107 |
| Abbildung 5.2: Nukleosommobilität des SWI / SNF chromatin-umbildenden Komplex.....   | 110 |

## Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 1.1: Auswahl einiger CAR-Zielgene, involviert in den Phase I-III Metabolismus.....                              | 7   |
| Tabelle 1.2: Isoformen des humanen Kernrezeptors CAR.....   | 9   |
| Tabelle 1.3: Einige Ko-Faktoren von CAR.....  | 16  |
| Tabelle 3.1: Verwendete Laborgeräte .....   | 25  |
| Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien .....   | 27  |
| Tabelle 3.3: Verwendete Plasmide .....  | 29  |
| Tabelle 3.4: Verwendete Zellkulturmaterialien .....   | 29  |
| Tabelle 3.5: Verwendete Arbeitsmaterialien .....  | 30  |
| Tabelle 3.6: Primäre Antikörper .....   | 31  |
| Tabelle 3.7: Sekundäre Antikörper .....   | 32  |
| Tabelle 3.8: Primer für CAR-LBD .....   | 39  |
| Tabelle 3.9: Verwendete Primer für Sequenzierung .....  | 45  |
| Tabelle 3.10: Oligonukleotide für qRT-PCR .....   | 50  |
| Tabelle 3.11: Sammelgelzusammensetzung .....  | 52  |
| Tabelle 3.12: Trenngelzusammensetzung .....   | 52  |
| Tabelle 3.13: siRNA Kontrukte .....   | 72  |
| Tabelle 4.1: Interaktionspartner von GST-CAR-LBD aus Rattenleberhomogenat identifiziert<br>mittels MALDI-TOF-MS .....   | 85  |
| Tabelle 4.2: Interaktionspartner von GST-CAR-LBD aus humanem Leberhomogenat identifiziert<br>mittels MALDI-TOF-MS ..... | 89  |
| Tabelle 7.1: Identifizierte Proteine aus Pulldown-Assays mit Rattenleberhomogenat.....                                  | 142 |
| Tabelle 7.2: Identifizierte Proteine aus Pulldown-Assays mit humanem Leberhomogenat .....                               | 143 |

## Zusammenfassung

Der konstitutive Androstanrezeptor (constitutive androstane receptor; CAR; NR1I3), ein Kernrezeptor, spielt eine entscheidende Rolle in der Induktion des Arzneimittelmetabolismus und -transports durch Aktivatoren vom Phenobarbital-Typ. Die hepatische Expression zahlreicher arzneimittelmetabolisierender Enzyme der Phase I und Phase II sowie von Transportproteinen wird durch CAR als Antwort auf diverse Chemikalien induziert. Neben seiner Funktion in der Entgiftung von Fremdstoffen ist CAR auch involviert in andere hepatische Funktionen wie Fettsäureoxidation, Glukoneogenese und die Sekretion von Steroidhormonen und Bilirubin. In primären Hepatozyten ist CAR vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert und mit anderen Proteinen in einem großen Multimerkomplex assoziiert, dessen Komponenten noch nicht vollständig identifiziert wurden. Durch Aktivatoren wie Phenobarbital dissoziiert CAR von bekannten Proteinen des Multimerkomplexes, dem cytosolischen CAR-Retentionsprotein (CCRP) und dem Chaperon HSP90. Dies führt nach Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) zur Translokation in den Nukleus, wo CAR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) heterodimerisiert. CAR-RXR bindet an die entsprechenden DNA-Bindungsstellen in der regulatorischen Region der Zielgene und rekrutiert Ko-Aktivatoren wie SRC-1 (Steroidrezeptor Ko-Aktivator), GRIP1 (Glutamatrezeptor interagierendes Protein) und PGC-1 (Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor  $\gamma$  Ko-Aktivator 1), um die Gentranskription zu induzieren.

Ziel dieser Arbeit war es, den in der Leber exprimierten Kernrezeptor CAR auf putative Interaktionspartner zu untersuchen, um eventuell Hinweise auf Aufbau und Regulation des nativen Proteinmultimerkomplexes zu erhalten und um die Funktion von CAR besser verstehen zu können.

Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro* Pulldown-Assay mit Leberhomogenat zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen von CAR etabliert. Als ersten Schritt wurden GST und GST-CAR-LBD-Fusionsproteine generiert, die in *E. coli* Bakterienzellen exprimiert und anschließend affinitätsgereinigt wurden. Die Fusionsproteine wurden mit Leberhomogenat inkubiert und gebundene Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Visualisierung mit Silbernitrat wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und für die Massenspektrometrie präpariert. Neue Interaktionspartner von CAR wurden über die massenspektrometrische MALDI (Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation)-Methode identifiziert.

Nach Optimierung der Pulldown-Methode wurden diverse Strukturproteine, Transportproteine und Enzyme signifikant als putative neue Interaktionspartner von CAR identifiziert, u.a. das Hitzeschockprotein 70, die Pyruvatcarboxylase, GAPDH, Carbonylreduktase, Lamin A, Phosphatidylinositol Transferprotein 1 und BAF 155 (BRG1-assoziiierter Faktor).

Als besonders interessanter potenzieller Interaktionspartner von CAR wurde das Protein BAF 155 im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Dieses Protein ist Bestandteil eines Säuger-SWI / SNF Chromatin-„remodeling“ Komplexes, der in fundamentalen zellulären Prozessen wie Transkription, Replikation und Reparatur von Chromatin eine wichtige Rolle spielt. Die Interaktion des GST-CAR Fusionsproteins mit BAF 155 wurde mit verschiedenen Methoden wie *in vitro* GST-Pulldown-Assay und *in vivo* Immunpräzipitation bestätigt. Im Western Blot wurde BAF 155 in den Pulldown-Proben mit Leberhomogenat ebenfalls nachgewiesen. Eine funktionelle Analyse der Interaktion mittels RNA-Interferenz war leider nicht erfolgreich, da die Methode aus Zeitgründen nicht mehr erfolgreich optimiert und validiert werden konnte. Zusammenfassend konnte der Pulldown-Assay, kombiniert mit massenspektrometrischen MALDI-TOF Analysen, als eine reproduzierbare Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen etabliert werden und lieferte diverse neue putative Interaktionspartner von CAR. Das in dieser Arbeit identifizierte Protein BAF 155 bzw. der ganze SWI / SNF Komplex könnten eine wichtige Rolle in der CAR-induzierten transkriptionalen Aktivierung spielen.

## Abstract

The human nuclear receptor “constitutive androstane receptor” (CAR; NR1I3) plays a pivotal role in the induction of drug metabolism and transport by phenobarbital-type inducers. The hepatic expression of phase I and phase II drug metabolizing enzymes and of transporters is activated by CAR in response to structurally diverse chemicals. In addition to xenobiotic detoxification, activation of CAR is also involved in other hepatic functions like fatty acid oxidation, gluconeogenesis, clearance of steroid hormones and bilirubin. In primary hepatocytes, CAR resides predominantly in the cytoplasm associated with other proteins in a multimeric complex of which some components still remain to be identified. Upon exposure to inducers CAR dissociates from the already identified proteins of the complex, the cytosolic CAR retention protein (CCRP) and HSP 90 resulting in its translocation into the nucleus, where it heterodimerizes with the retinoid X receptor (RXR). The CAR-RXR heterodimer binds to its respective response elements in the regulatory region of target genes and recruits coactivators like SRC-1 (steroid receptor co-activator), GRIP1 (glutamate receptor interacting protein) and PGC-1 (peroxysom-proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1) to induce gene transcription. To better understand the function of CAR, this study was focused on the identification of proteins which associate with CAR.

The aim of this work was to identify putative interaction partners of the nuclear receptor CAR which are expressed in liver to get additional information on structure and regulation of the native protein multimer complex and to obtain a better understanding of the functionality of CAR.

Hence, we have established an *in vitro* pulldown assay with liver homogenate to analyze protein-protein interactions of CAR. As a first step we generated GST and GST-CAR fusion proteins which were expressed in *E. coli* followed by affinity purification. Then we incubated the fusion proteins with total liver homogenate and separated bound proteins with SDS-PAGE. After visualization with silver staining, the protein bands were excised and prepared for mass spectrometry. For identification of new interaction partners of CAR in liver, the Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF) was used.

After optimization of the pulldown assay we could identify several proteins like cytoskeletal proteins (e.g. lamin A), enzymes (e.g. pyruvate carboxylase, GAPDH) and chaperones (e.g. HSP 70) as binding to CAR.



As an especially interesting interaction partner of CAR we decided to further investigate the interaction of CAR with BRG1-associated factor (BAF) 155. This protein is a component of the mammalian SWI / SNF chromatin remodeling complex that plays an important role in fundamental cellular processes such as transcription, replication, and the repair of chromatin. Interaction of GST-CAR-LBD fusion protein was confirmed by additional methods like pulldown assay of GST-CAR with (<sup>35</sup>S)-methionine labeled BAF 155 *in vitro* and co-immunoprecipitation of the two proteins. Additionally, we could confirm BAF 155 interaction with CAR by Western blotting of the original pulldown samples. Analyzing the interaction of CAR and BAF 155 with RNA interference was not successful, since the method could not be optimized and validated appropriately, due to time constraints.

In conclusion, we were able to establish a highly reliable and reproducible assay to investigate protein interactions resulting in the significant identification of new interaction partners of CAR. Regarding the identified CAR interaction partner BAF 155, this protein or the complete SWI / SNF complex could play a functional role in CAR-mediated transcriptional activation, however further research is needed to establish the role of BAF 155 in CAR function.

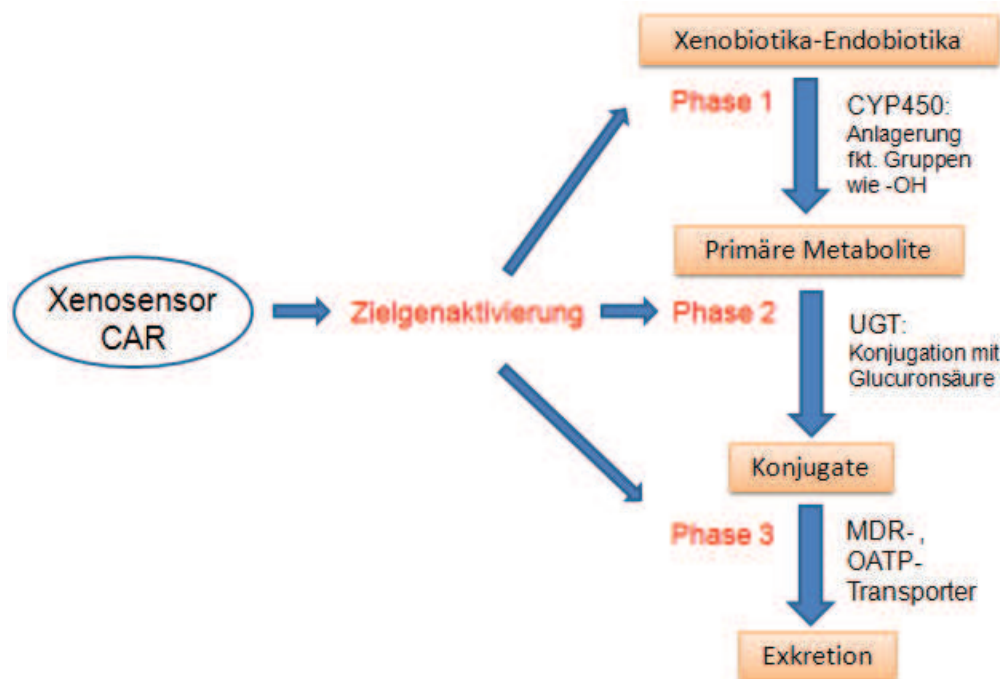
# **1. Einleitung**

Der Metabolismus von Xenobiotika (Fremdstoffen) in der Leber ist im Körper die wichtigste Verteidigung gegen Bildung von toxischen lipophilen Komponenten. Relevant für den Fremdstoffmetabolismus sind metabolisierende Enzyme der Phasen I und II, Transporter der Phase III und Xenosensoren, welche durch die Fremdstoffe aktiviert werden und daraufhin die Expression der metabolisierenden Enzyme und Transporter induzieren. Der erste Schritt des Detoxifikationsmechanismus ist die Aktivierung von Kernrezeptoren, zu denen beispielsweise der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und der in dieser Arbeit näher betrachtete konstitutive Androstanrezeptor (constitutive androstane receptor, CAR) zählen (Fuhr, 2000; Dixit et al., 2005; Chang and Waxman, 2006). CAR und PXR fungieren dabei als Sensoren von toxischen Nebenprodukten aus endogenen Metaboliten und exogenen Chemikalien. Die evolutionäre Entwicklung dieser Rezeptoren zeigt die Komplexität des Metabolismus in höheren Organismen. Diese Komplexität erforderte neue Mechanismen für den Umgang und die Eliminierung dieser Nebenprodukte sowie fremder Komponenten aus dem Körper. Deswegen ist das Verständnis der physiologischen Aspekte der CAR-Lokalisation und Aktivierung, der nuklearen Translokation sowie der transkriptionalen Aktivität seiner Zielgene äußerst wichtig. Eine massenspektrometrische Analyse der bisher noch unidentifizierten Proteine, die mit CAR interagieren, könnte somit zu einem besseren Verständnis der Rolle von CAR im Körper führen.

## **1.1. Detoxifikation durch Biotransformation: Phase I-III**

Von den Protozoen bis zu den Säugetieren wurden innerhalb des Körpers viele Mechanismen zur Detoxifikation von Xenobiotika entwickelt, um sie für den Körper nutzbar zu machen. Metabolisierende Enzyme und Efflux-Transporter spielen in diesen Mechanismen eine wichtige Rolle. Nach dem Eindringen von Giftstoffen in den Körper von Säugetieren werden diese durch die metabolisierenden Enzyme in chemischen Reaktionen (= Biotransformationen) umgewandelt. Obwohl diese Reaktionen hauptsächlich in der Leber stattfinden, werden die Enzyme auch im gastrointestinalen Trakt, sowie in Lunge, Niere, Gehirn und Plazenta exprimiert (Lamba et al, 2004a,b; Syme et al, 2004; Ganapathy und

Prasad, 2005; Myllynen et al, 2005; Behravan und Piquette-Miller, 2007; Pavek und Dvorak, 2008; Weier et al, 2008; Huls et al, 2009). Detoxifizierende Biotransformationen sind in der Abwehr toxischer Effekte von Endobiotika (endogene Substanzen wie Steroidhormone) und Xenobiotika wichtig (Yu, 2001). Die Prozesse der Biotransformation werden in die Phasen I, II und III (Abb.1.1) unterteilt.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des xenobiotisch-endobiotisch metabolisierenden Systems der Biotransformations-Phasen I-III.** Modifiziert nach di Masi et al (2009).

Die Hauptreaktionen in Phase I beinhalten Oxidationen (z.B. Hydroxylierung und Deaminierung), Reduktionen (z.B. Addition von Stickstoffatomen) und Hydrolysen (z.B. Aufspaltung von Ester- und Amidbindungen). Eines der wichtigsten Charakteristika der Phase I Reaktionen ist die enzymatische Anlagerung einer funktionellen Gruppe an einen Giftstoff (z.B. -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH oder -SH-Gruppen) wodurch ein sog. primärer Metabolit gebildet wird. Die Phase II Reaktionen sind konjugative Reaktionen, die Giftstoffe oder primäre Metabolite direkt mit endogenen Substanzen (z.B. Glycin, Cystein, Glutathion, Sulfat und Glucuronsäure) verbindet (Yu, 2001). Die Phase III Transporter spielen eine wichtige Rolle in der Medikamentenabsorption, der Verteilung und Exkretion (Brinkmann und Eichelbaum, 2001; Kerb et al, 2001; Dean et al, 2002; Kim 2003, Mizuno et al, 2003; Staudinger et al, 2003; Matic et al, 2007; Plant 2007; Zhou et al, 2009). Hierzu zählen unter anderem die ATP-abhängigen Effluxtransporter wie MDR1 (Multiple Drug Resistenz) / P-Glykoprotein und MRPs (Multidrug-resistenzassoziiertes Protein), sowie die Aufnahmetransporter u.a. aus der

Gruppe der OATPs (Organo-Anion-Transportprotein). Die Regulation der Genexpression der Phase I und II Arzneimittel-metabolisierenden Enzyme und der Phase III Transporter werden durch Kernrezeptoren, zu denen auch der in dieser Arbeit untersuchte konstitutive Androstanrezeptor (constitutive androstane receptor, CAR) zählt, induziert (Yu, 2001).

Die Cytochrom P450 Enzyme (CYP450) der Phase I sind das wichtigste Enzymsystem, dessen Expression von CAR induziert wird. Das CYP450 Enzym ist Mitglied der CYP-Superfamilie (Häm-abhängige Monooxygenasen) und wird in Leber, Darm und Niere exprimiert. Diese Organe sind für die Aufnahme, Umwandlung und Ausscheidung der Xenobiotika (Michalets, 1998; Yu, 2001; Kliewer et al, 2002) essenziell. In Säugetieren wurden bis jetzt 18 CYP-Familien identifiziert (Dickins et al, 2004). 57 CYP-Gene sind im Menschen präsent. Besonders die Isoformen der Familien CYP1, CYP2, CYP3 und CYP4 spielen wichtige Rollen im Metabolismus von Fremdstoffen (Nakata et al, 2006; Matic et al, 2007; Plant, 2007). In den letzten Jahren wurden diese Enzyme und Transporter verstärkt in Metabolismus, Eliminierung, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Toxikokinetik, Toxikodynamik und Medikamenteninteraktionen analysiert (Xu et al, 2005; Plant 2007; Timsit und Negishi, 2007; Zhou et al, 2009). CAR reguliert eine Vielzahl von hepatischen Genen (Tabelle 1.1), deren Genprodukte in allen drei Phasen der Biotransformation beteiligt sind. (Swales und Negishi, 2004).

**Tabelle 1.1: Auswahl einiger CAR-Zielgene, involviert in den Phase I-III Metabolismus**

|           | Zielgene   |
|-----------|--|
| Phase I   | Cytochrome P450:   |
|           | <i>Human:</i> CYP 2A6, CYP 2B6, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 3A4         |
|           | <i>Maus:</i> Cyp 1a1, Cyp 2a4, Cyp 2b10, Por, Cyp 3a11             |
|           | <i>Ratte:</i> CYP 2B1, CYP 2B2, CYP 2C6, CYP 2C7, CYP 3A1, CYP 3A2 |
| Phase II  | Konjugative Enzyme:  |
|           | <i>Human:</i> UGT 1A1  |
|           | <i>Maus:</i> Gst A1, A2, A3, Gst m1                                |
|           | <i>Ratte:</i> Ugt 2b1, 1a, 1b                                      |
| Phase III | Transportproteine:   |
|           | <i>Human:</i> MDR1A; MRP2 + 3, SLCO1B1                             |
|           | <i>Maus:</i> Mrp1, Mrp4, Slco1b1                                   |
|           | <i>Ratte:</i> MRP2, Slco1b1  |

CYP: Cytochrom; UGT: Uridin Diphosphatglucuronoyltransferase; Gst: Glutathion S-Transferase, MDR: Multiple Drug Resistenz; MRP: Multidrug-resistenzassoziiertes Protein; OATP: Organo-Anion-Transportprotein

## 1.2. Kernrezeptor CAR (constitutive androstane receptor; konstitutive Androstanrezeptor)

CAR gehört zu einer Familie intrazellulärer Rezeptoren, auch Kernrezeptoren (nuclear receptors, NR) genannt, die ausschließlich bei Metazoen vorkommen. Es handelt sich dabei um meist ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, die in der Regel nach Bindung eines Liganden in den Zellkern translozieren, um dort an die DNA zu binden und somit die Transkription ihrer Zielgene zu initiieren (Waxman, 1999). Diese ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren sind essenziell für das Wachstum, die Differenzierung, Reproduktion, Morphogenese sowie den Metabolismus. Beim Menschen sind 48 Kernrezeptoren bekannt, die evolutionär alle von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen (Robinson-Rechavi et al, 2003; Germain et al, 2006). Phylogenetische Analysen unterteilen die Kernrezeptoren, basierend auf ihrer Sequenzhomologie, in sechs Unterfamilien (NR1-NR6), welche wiederum in Gruppen (z.B. NR1A-NR1K) unterteilt werden (Laudet, 1997; Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999). Die phylogenetische Abstammung spiegelt sich sowohl in der Aminosäuresequenz als auch im Wirkmechanismus wieder. Beim Wirkmechanismus wird unterschieden, ob sich der NR beim Zeitpunkt der Ligandenbindung im Cytosol oder bereits gebunden an die DNA im Nukleus befindet und ob die DNA-Bindung als Monomer oder Dimer erfolgt (Ganten und Ruckpaul, 2001). Demnach lassen sich die NR nochmals in drei evolutionär funktionelle Hauptgruppen (Typ I-III) unterteilen: Typ I (Steroidrezeptoren) beinhaltet Rezeptoren wie den Progesteronrezeptor (PR), Androgenrezeptor (AR), Östrogenrezeptor (estrogen receptor, ER), Mineralkortikoidrezeptor (MR) und Glukokortikoidrezeptor (GR). Dies sind die klassischen Steroidhormonrezeptoren, die durch Steroidliganden aktiviert werden und als Homodimer an die DNA binden. Zum Typ II (Nicht-Steroidrezeptoren) gehören die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR), der Retinoid-X-Rezeptor (RXR), der Retinsäurerezeptor (RAR), der Vitamin-D<sub>3</sub>-Rezeptor (VDR) und der Pregnan X Rezeptor (PXR) sowie der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor CAR. Die PXR- und CAR- Rezeptoren werden durch nichtsteroidale Liganden aktiviert und induzieren die Gentranskription nach Heterodimerisierung mit RXR. Die Typ III Gruppe wird von sog. Waisenrezeptoren (*Orphan*-Rezeptoren) gebildet (Mangelsdorf et al, 1995), für die bisher noch keine Liganden gefunden werden konnten (McKenna et al, 1999). In der vereinheitlichten Nomenklatur für Kernrezeptoren wird CAR aufgrund seiner Sequenzhomologie zu VDR und PXR in die Gruppe I der Subfamilie 1 eingliedert und als NR1I3 bezeichnet (Giguere 1999).

CAR, ursprünglich beschrieben als MB 67, ist primär in der Leber exprimiert (Baes et al, 1994; Savkur et al, 2003; Wei et al, 2002), wurde aber auch in extrahepatischen Geweben detektiert, einschließlich der Niere sowie in gastrointestinalem Gewebe (Lamba et al, 2004; Wei et al, 2002). In geringer Konzentration wird CAR bei Mensch und Maus auch in Herz, Skelettmuskel und Gehirn sowie in der menschlichen Lunge exprimiert (Choi et al, 1997, Doherty und Charman, 2002; Swales und Negishi, 2004). Die physiologische Rolle von CAR wurde jedoch noch nicht in allen Geweben untersucht.

### 1.2.1. Struktur und Regulation

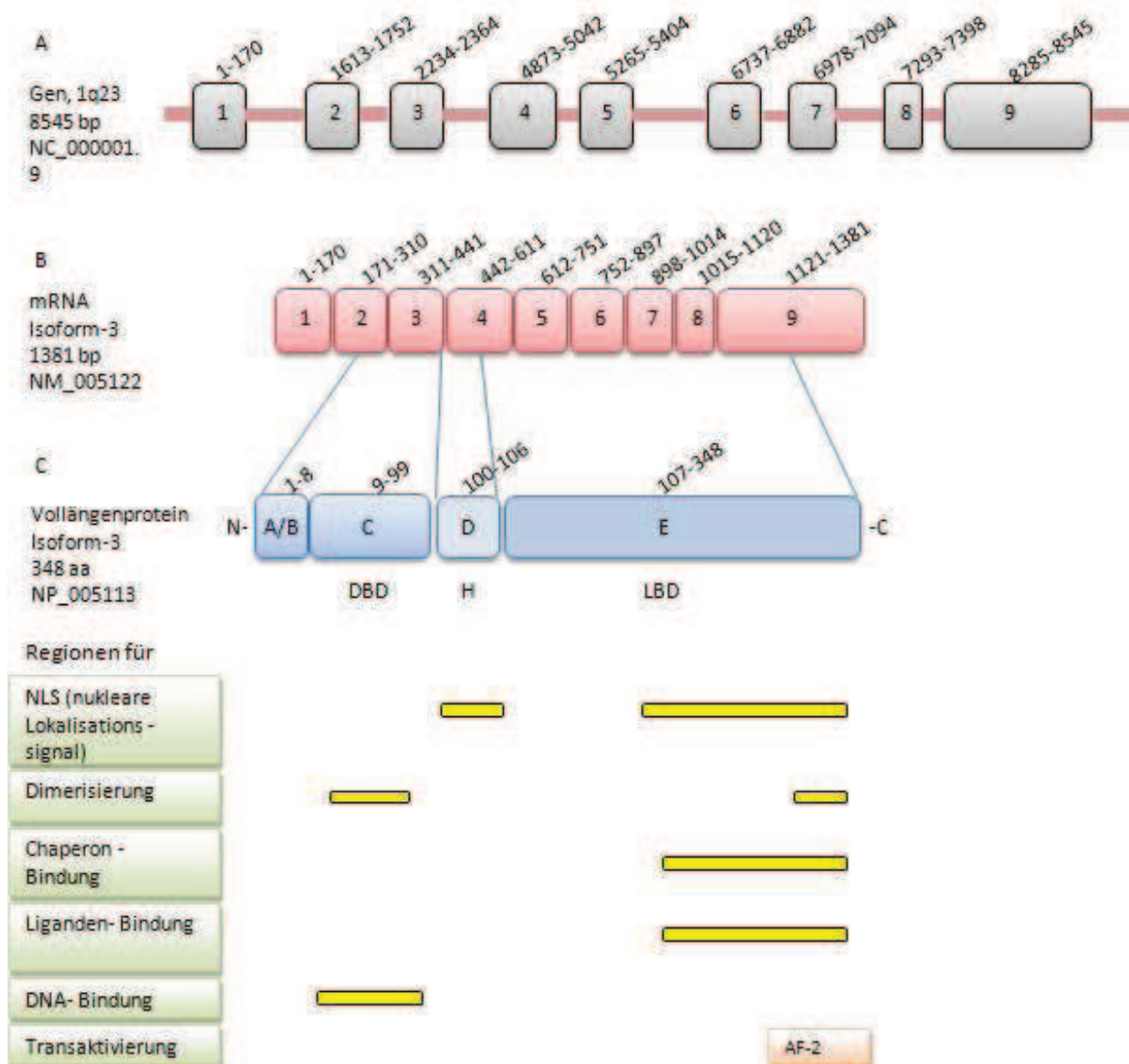
Der humane CAR-Rezeptor ist das Produkt des *NR1I3* Gens, das auf Chromosom 1, Lokus 1q23 lokalisiert ist. Es ist ungefähr 8.5 Kilobasen (kb) groß (Thipgen, 2004) und beinhaltet 9 Exons und 8 Introns (Abb. 1.2 A; Auerbach et al, 2003; Savkur et al, 2003). Verschiedene Spleißvarianten von humanem CAR sind bekannt, die durch die Kombination alternativer Spleißereignisse entstehen. Nachgewiesen wurden unter anderem Deletionen der Exons 2, 4, 5 und 7, partielle Deletion von Exon 9 und Insertionen von 12-15 Basenpaaren unter Verwendung alternativer Spleißakzeptorsites in den Introns 6 oder 7, die zur 5'-Verlängerung der nachfolgenden Exons führen und damit zur *in frame* Insertion (Auerbach et al, 2003; Savkur et al, 2003; Lamba et al, 2004a; Arnold et al, 2004). Die Mehrheit der CAR Transkript-Isoformen entsteht durch verschiedene Kombinationen mehrerer alternativer Spleißvorgänge (Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2: Isoformen des humanen Kernrezeptors CAR**

| <b>Isoform</b>   | <b>Veränderungen</b>      | <b>mRNA Größe<br/>(in bp)</b> | <b>Proteingröße (aa): NCBI<br/>Code</b> |
|------------------|---------------------------|-------------------------------|---|
| <b>Isoform-1</b> | Ins 27bp in Ex9           | 1408                          | 357: NP_001070950                       |
| <b>Isoform-2</b> | Ins 8bp in Ex9            | 1393                          | 352: NP_001070948                       |
| <b>Isoform-3</b> | <b>Volllänge, Wildtyp</b> | <b>1381</b>                   | <b>348: NP_005113</b>                   |
| <b>Isoform-4</b> | Partiell Del Ex9          | 1279                          | 314: NP_001070949                       |
| <b>Isoform-5</b> | Del Ex7                   | 1264                          | 309: NP_001070939                       |

|                   |  |      |                         |
|-------------------|--|------|-------------------------|
| <b>Isoform-6</b>  | Ins 15bp,partiell Del Ex9                                | 1242 | 340: NP_001070937       |
| <b>Isoform-7</b>  | Ins 12bp,partiell Del Ex9                                | 1239 | 339: NP_001070946       |
| <b>Isoform-8</b>  | Del Ex7, partiell Del Ex9                                | 1110 | 296: NP_001070942       |
| <b>Isoform-9</b>  | Del Ex2, Ins 15bp  | 1256 | 324: NP_001070940       |
| <b>Isoform-10</b> | Del Ex2  | 1241 | 319: NP_001070947       |
| <b>Isoform-11</b> | Del Ex2, Del Ex7   | 1124 | 280: NP_001070938       |
| <b>Isoform-12</b> | Del Ex2, Ins 15bp, 12bp,<br>partiell Del Ex9             | 1114 | 315: NP_001070941       |
| <b>Isoform-13</b> | Del Ex2, Ins 15bp, partiell<br>Del Ex9                   | 1102 | 311: NP_001070944       |
| <b>Isoform-14</b> | Del Ex2, partiell Del Ex9                                | 1087 | 306: NP_001070945       |
| <b>Isoform-15</b> | Del Ex2, Del Ex7, partiell<br>Del Ex9                    | 970  | 267: NP_001070943       |
| <b>Isoform-16</b> | Partiell Del Ex4, Ins 15bp,<br>Del Ex7                   | 836  | 360: kein Code          |
| <b>Isoform-17</b> | Partiell Del Ex2-Ex9                                     | 47   | Kein Protein produziert |
| <b>Isoform-18</b> | Del Ex4, Del Ex 5, Del Ex7                               | 726  | Kein Protein produziert |
| <b>Isoform-19</b> | Del Ex4, Del Ex5, Del Ex7 ,<br>partiell Del Ex9          | 620  | Kein Protein produziert |
| <b>Isoform-20</b> | Del Ex 2, Del Ex4, Del Ex5,<br>Del Ex7, partiell Del Ex9 | 480  | Kein Protein produziert |
| <b>Isoform-21</b> | Del Ex2, Del Ex4, Del Ex5,<br>Del Ex7                    | 586  | Kein Protein produziert |
| <b>Isoform-22</b> | Del Ex4, Del Ex7   | 866  | Kein Protein produziert |

Aufgeführt sind die Spleißvarianten, mRNA Größe (in Basenpaaren) und Protein (mit NP-Identifikationsnummer) und die Proteingröße (in Aminosäuren). Tabelle modifiziert nach di Masi et al (2009).  
Ex: Exon; Ins: Insertion; Del: Deletion; bp: Basenpaare; aa: Aminosäure

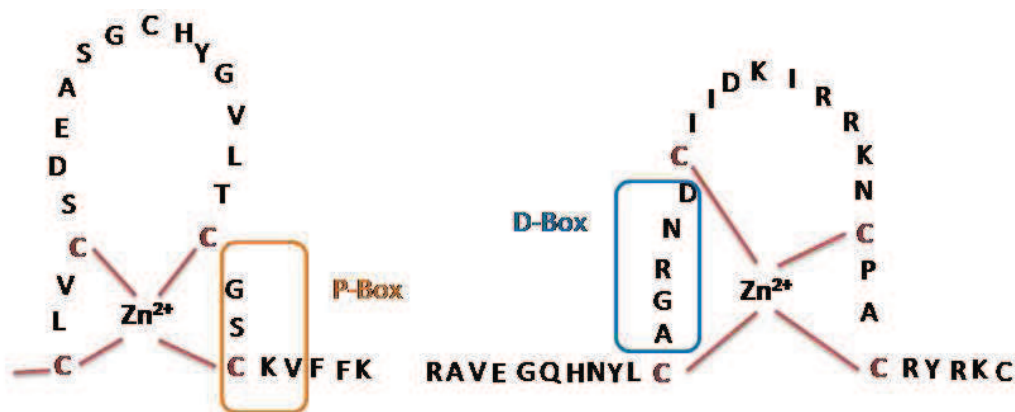


**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des humanen CAR: Gen, mRNA und Protein**

(A) Das humane CAR-Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert und besteht aus 9 Exons (1-9, grau) und 8 Introns. (B) Die Isoform-3 auf mRNA-Ebene stellt das Volllänge-CAR dar. (C) Diese Isoform-3 kodiert das 348 Aminosäuren lange CAR-Protein. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD, C Region) mit A/B Region, deren Funktion unbekannt ist, besteht aus den Exons 2 und 3. Die Scharnierdomäne H (D Region) besteht partiell aus Exon 4 und die Ligandenbindungsdomäne (LBD, E Region) aus den Exons 4-9. Die funktionalen Regionen der verschiedenen Domänen sind mit gelben Querbalen gekennzeichnet. Modifiziert nach di Masi et al (2009).



Viele CAR-Spleißvarianten (z.B. Isoformen 17 bis 22) können kein funktionelles Protein ausbilden, da die alternativen Spleißereignisse zu Verschiebungen des Leserasters und somit zu vorzeitigen Terminationscodons führen und daher sehr schnell degradiert werden (Lamba et al, 2004a). Die anderen Spleißvarianten kodieren für alternative CAR-Proteine (Auerbach et al, 2003; Lamba et al, 2004a). Die Abbildung 1.2 zeigt die mRNA-Referenzvariante (Isoform 3) des humanen CAR (B) und das korrespondierende Protein (C). Das 348 Aminosäuren lange humane CAR Volllängenprotein besitzt wie die übrigen Kernrezeptoren vier funktionale und strukturelle Domänen (Abb. 1.2 C). Es besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD; C Region), kodiert durch Exon 2 und 3, und einer 8 Aminosäuren kurzen A/B Region, deren Funktion noch unklar ist. Es folgt die Scharnierregion (hinge, H; D Region) aus Exon 4 und schließlich die Ligandenbindungsdomäne (LBD, E Region) aus den Exons 4-9 einschließlich dem C-Terminus (Auerbach et al, 2003; Savkur et al, 2003; Lamba et al, 2004a).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der beiden Zinkfinger motive der CAR-DBD**

Die DNA-Erkennungsdomäne des humanen CAR Rezeptors, dargestellt aus Aminosäuren im Einbuchstaben-Code, mit den 2 Zinkfinger motiven und ihren funktionellen Bereichen, der P- und D-Box. Modifiziert nach di Masi et al (2009)

Die CAR-DBD besitzt eine sequenzspezifische DNA-Erkennungsdomäne, die strukturell aus zwei Zinkfinger motiven (Abb. 1.3) besteht, bei denen jeweils ein Zinkatom von vier Cysteinresten umgeben ist (Gronemeyer und Moras, 1995). Dadurch entsteht eine Struktur aus zwei  $\alpha$ -Helices, bei der die N-terminale Helix basenspezifisch mit dem Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA in Wechselwirkung tritt. Innerhalb der zwei Helices gibt es zwei Hauptsequenzelemente: die P- und D-Box. Die an der N-terminalen Seite des zweiten, C-terminalen Zinkfingers gelegene D-Box ist zuständig für die Dimerisierung zweier Rezeptoren und bindet einen weiteren Zinkfinger antiparallel über Wasserstoffbrücken- und

Ionenbindungen (Glass et al, 1994). Die P-Box am C-terminalen Ende des ersten, N-terminalen Zinkfingers ist für die spezifische Erkennung der verschiedenen DNA-„Response Elements“ erforderlich (Umesono und Evans, 1989).

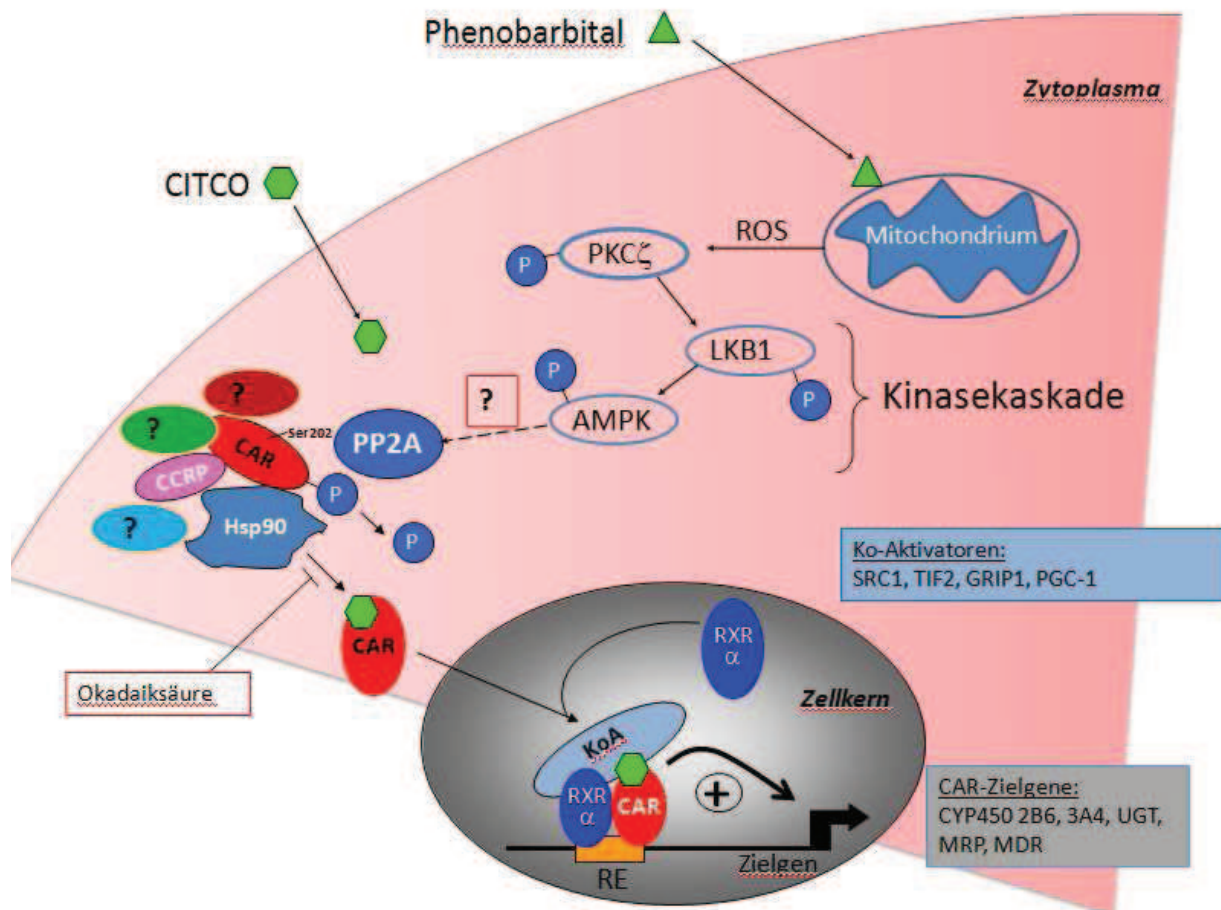
Die variable Scharnierregion (H) verbindet die DBD mit der LBD und besitzt ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal, NLS), welches für die xenobiotisch-induzierte nukleare Translokation des Rezeptors zuständig ist (Kaffman and O’Shea, 1999). Ein NLS wurde auch in der LBD des Rezeptors identifiziert (Kanno et al, 2005).

In der LBD sind verschiedene Regionen mit folgenden Funktionen lokalisiert (siehe Abb 1.2 C): Dimerisierung, ligandenabhängige Aktivierung (AF-2) und Bindestellen für Liganden (Ligandenbindungstasche), Chaperone und Ko-Regulatoren (Ko-Faktoren; Bain et al, 2007). Die Aktivierungsfunktion AF-2 (Green und Chambon, 1988; Gronemeyer, 1991), welche sich in Helix 12 befindet, ist für die ligandenabhängige Interaktion von Ko-Faktoren wie Aktivatoren / Repressoren mit der LBD verantwortlich (Danielian et al, 1992). Diese Ko-Faktoren sind zuständig für die Aktivierung der Transkription der Zielgene von CAR. Die LBD ist flexibel und verändert ihre Konformation abhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit der Liganden. Die Bindung der Ko-Aktivatoren an die LBD erfolgt über das typische NR-Aminosäuremotiv LXXLL (X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure). Eine ligandenaktivierte Region, die die Ko-Aktivatoren spezifisch in ihrer Länge umschließt, stabilisiert die Bindung und inhibiert gleichzeitig die Interaktion der Ko-Repressoren (Nagy et al, 2004).

### 1.2.2. CAR-Aktivierung

CAR ist in der Leber im Cytoplasma lokalisiert und Bestandteil eines ca. 500 kDa großen Multimerkomplexes, von dem bis jetzt die Proteine CCRP (CAR-cytosolisches Retentionsprotein; Dnajc7 in der NCBI Datenbank) und das Hitzeschockprotein HSP90 identifiziert wurden (Kobayashi et al, 2003; Timsit und Negishi, 2007). Jedoch geht man davon aus, dass noch weitere unbekannte Proteine mit dem großen Multiheteromerkomplex assoziiert sind. Die folgende Abbildung 1.4 stellt ein hypothetisches Modell dar, bei dem CAR nach Aktivierung durch den Liganden CITCO (6-(4-Chlorophenyl)imidazol[2,1-b][1,3]Thiazol 5-Carbaldehyd (dichlorobenzyl)-Oxim) in den Nukleus transloziert, um dort die Transkription der Zielgene zu initiieren. Phenobarbital (PB), der klassische CAR-

Aktivator, aktiviert CAR indirekt, vermutlich über eine Phosphorylierungskaskade (Blättler, 2007). Dabei resultiert das Eindringen von PB in den Mitochondrien in einer Kinasekaskade, die von der Proteinkinase C (PKC) über die Serin-Threonin-Kinase 11 (LKB1) bis zur AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) führt, die schließlich die Proteinphosphatase 2A (PP2A) aktiviert. PP2A dephosphoryliert daraufhin CAR und ermöglicht dadurch die CAR-Translokation in den Nukleus.



**Abb. 1.4: Hypothetische Darstellung der CAR Aktivierung**

CAR dissoziiert im Cytoplasma nach Aktivierung durch den Liganden CITCO von den Multiheteromerkomplexproteinen HSP90 und CCRP und transloziert, nach Dephosphorylierung eines Serins an der Aminosäureposition 202 durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A), in den Nukleus. Im Gegensatz dazu inhibiert der Proteinphosphataseinhibitor Okadaisäure die nukleare Translokation von CAR. Im Nukleus assoziiert CAR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) zu einem Heterodimer und bindet an das „Response Element (RE)“ der DNA in der Promotorregion der Zielgene wie CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, UGT, MDR1 oder MRP2. Die Bindung der Ko-Aktivatoren (KoA), zu denen SRC1, TIF2, GRIP1, PGC-1, SMC-1 und NCOA6 gehören, ermöglicht erst die Transkription. Der klassische CAR-Aktivator Phenobarbital löst nach Eindringen in die Leberzelle in den Mitochondrien eine Kinasekaskade aus, die von der Proteinkinase C (PKC) über die Serin-Threonin-Kinase 11 (LKB1) bis zur AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) führt und daraufhin die Proteinphosphatase 2A (PP2A) phosphoryliert wird. PP2A dephosphoryliert CAR für die nukleare Translokation. Modifiziert nach Blättler (2007).

Nach Bindung des CAR-Liganden und Aktivators CITCO dissoziiert CAR von den Multimerkomplexproteinpartnern HSP90 und CCRP. Die Überexpression des CCRP-Proteins in humanen Hepatomazellen unterstützt die CAR-Anreicherung im Cytoplasma (Timsit und Negishi, 2007). Zusätzlich wird PP2A zu dem CCRP-HSP90-CAR-Komplex rekrutiert, welches CAR an der Serin-Aminosäureposition 202 dephosphoryliert (Yoshinari et al, 2003). Studien haben gezeigt, dass eine Serin-202-Asparaginsäure-Mutante die PB-induzierte nukleare Anreicherung von CAR aufhebt, im Gegensatz dazu erhöht die Serin-202-Alanin-Mutante die CAR-Konzentration im Nukleus (Hosseinpour et al, 2006). Nur eine Dephosphorylierung von CAR ermöglicht die Translokation in den Nukleus. Die Okadaiksäure, ein Proteinphosphataseinhibitor, verhindert die Anreicherung von CAR im Nukleus und blockiert die CAR-induzierte Zielgenexpression in Säugetieren (Sidhu und Omiecinski, 1997; Honkakoski und Negishi, 1998). Die Dephosphorylierung von CAR stellt ein entscheidendes Signal zur Freisetzung aus dem cytosolischen Komplex nach Aktivatorbehandlung dar, jedoch ist noch nicht geklärt, welche Kinase(n) das CAR-Protein phosphoryliert (Timsit und Negishi, 2007). Die CAR-Translokation benötigt kein starkes nukleares Lokalisationssequenzsignal (Kawana, 2003) und ist AF-2 unabhängig (Zelko et al, 2001), dennoch ist die innerhalb der  $\alpha$ 12-Helix lokalisierte leuzinreiche Sequenz für die Translokation wichtig (Zelko et al, 2001; Squires et al, 2004; Swales and Negishi, 2004). Im Nukleus assoziiert CAR mit dem Retinoid-X-Rezeptor und bindet als Heterodimer an das zugehörige „Response Element (RE)“ der DNA-Promotorregion der Zielgene. Die typischen CAR-Zielgene sind u.a. CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, UGT, MDR1 oder MRP2. Die Bindung der Ko-Aktivatoren an die CAR-LBD ermöglicht erst die Transkription dieser Zielgene. Zu den Ko-Aktivatoren gehören u.a. SRC1 (Steroidrezeptor Ko-Aktivator), TIF2 (transkriptioneller intermediärer Faktor), GRIP1 (Glutamatrezeptor interagierendes Protein), PGC-1 (Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor  $\gamma$  Ko-Aktivator 1), SMC-1 und NCOA6.

### **1.2.3. Ko-Faktoren von CAR**

Die Aktivierung der Zielgentranskription wird erst durch die Bindung von Ko-Aktivatoren ermöglicht, die Repression erfolgt durch die Bindung von Ko-Repressoren. In den letzten Jahren wurden viele Aktivatoren und Repressoren von Kernrezeptoren wie CAR in zellbasierten Assays identifiziert, bei denen ein Expressionsplasmid, das für den Zielrezeptor kodiert, zusammen mit einem Reporterplasmid in Zellen ko-transfiziert (Kliwer et al,

2002). Diese Assays ermöglichten die Identifizierung einer Vielzahl von Komponenten. Als Beispiel bindet der klassische CAR-Aktivator (PB) nicht direkt an CAR, aktiviert aber die nukleare Translokation und damit die transkriptionale Aktivität von CAR (Moore et al, 2000a). Die nachfolgende Tabelle 1.3 zeigt eine Auswahl an Ko-Faktoren von CAR.

**Tabelle 1.3: Einige Ko-Faktoren von CAR**

| Substanzen/Xenobiotika                         | Rezeptor | Funktion          | Referenzen  |
|--|----------|-------------------|---|
| <b>Phenobarbital-Typ:</b>                      |          |                   |   |
| <b>Phenobarbital</b>                           | hCAR     | Aktivator         | Sueyoshi et al (1999)   |
| <b>Clotrimazol</b>                             | hCAR     | Inhibitor         | Maglich et al (2003)<br>Huang et al (2003)<br>Moore et al (2000a) |
| <b>CPZ (Chlorpromazin)</b>                     | hCAR     | Aktivator         | Wei et al (2002)  |
| <b>CITCO (Imidazolderivat)</b>                 | hCAR     | Agonist           | Maglich et al (2003)<br>Huang et al (2003)                        |
| <b>Artemisinin</b>                             | hCAR     | Agonist           | Burk et al (2005)   |
| <b>Di(2-ethylhexyl) phthalat</b>               | hCAR     | Agonist           | DeKeyser et al (2009)   |
| <b>Retinoidsäure</b>                           | hCAR     | Inverser Agonist  | Baes et al (1994)   |
| <b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>          | mCAR     | Inhibitor         | Kawamoto et al (2000)   |
| <b>Oltipraz (OPZ)</b>                          | hCAR     | Aktivator         | Merrell et al (2008)  |
| <b>Estrone</b>                                 | mCAR     | Aktivator         | Kawamoto et al (2000)   |
| <b>Meklizin</b>                                | hCAR     | Inverser Agonist  | Huang et al (2003)  |
|  | mCAR     | Agonist           | Huang et al (2003)  |
| <b>(5<math>\beta</math>)-Pregnan-3,20-Dion</b> | hCAR     | Agonist           | Moore et al (2000a)<br>Maglich et al (2003)                       |
|  | mCAR     | Schwacher Agonist | Kawamoto et al (2000)   |
| <b>Progesteron</b>                             | mCAR     | Inhibitor         | Kawamoto et al (2000)   |
| <b>TCPOBOP</b>                                 | mCAR     | Agonist           | Suino et al (2004)  |

|   |      |                  |                        |
|---|------|------------------|------------------------|
|   |      |                  | Moore et al (2000a)    |
|   |      |                  | Tzamelis et al (2000)  |
| <b>Testosteron</b>  | mCAR | Inhibitor        | Kawamoto et al (2000)  |
| <b>Nonylphenol</b>  | hCAR | Aktivator        | Hernandez et al (2007) |
| <b>DHEA (Dehydroepiandrosteron)</b>                                       | hCAR | Aktivator        | Köhalmy et al (2007)   |
| <b>O,p-DDT (Dichlordiphenyltrichloroethan)</b>                            | hCAR | Aktivator        | Kiyosawa et al (2008)  |
| <b>Methoxychlor</b>   | hCAR | Aktivator        | Sueyoshi et al (1999)  |
| <b>Dexamethason</b>   | hCAR | Agonist          | Pascussi et al (2000)  |
| <b>PK 11195 (1-(2-Chlorphenyl-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamid)</b> | hCAR | Inverser Agonist | Li et al (2008)        |
| <b>KN-83</b>  | hCAR | Inhibitor        | Kakizaki et al (2002)  |
| <b>KN-62</b>  | mCAR | Inhibitor        | Kawamoto et al (2000)  |
| <b>Protein PPP1R16A</b>   | hCAR | Inhibitor        | Sueyoshi et al (2008)  |
| <b>Flavonoide</b>   | hCAR | Aktivator        | Yao et al (2010)       |
| <b>Androstanmetabolite:</b>   |      |                  |                        |
| <b>5<math>\alpha</math>-Androstanol-3<math>\alpha</math></b>              | hCAR | Inverser Agonist | Moore et al (2000a)    |
|   |      |                  | Tzamelis et al (2000)  |
| <b>5<math>\alpha</math>-Androst-16-en-3<math>\alpha</math>-ol</b>         | mCAR | Inverser Agonist | Forman et al (1998)    |

In der Tabelle sind Substanzen/Xenobiotika sowie deren Funktion aufgeführt. Zudem sind die CAR-Rezeptoren unterschiedlicher Spezies und die Referenzen vermerkt.

Der NR CAR ist wegen seiner konstitutiven Aktivität von Natur aus in der Lage, in Abwesenheit von Liganden die Expression von Zielgenen zu induzieren. Zu den hemmenden Liganden (inverse Agonisten) von CAR gehören zwei androstane Metabolite, 5 $\alpha$ -Androstanol-3 $\alpha$  und 5 $\alpha$ -Androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, die als endogene Liganden die konstitutive Aktivität dieses NR reprimieren (Swales und Negishi, 2004). Auch exogene Substanzen wie Clotrimazol, Retinoidsäure oder das Protein PK 11195 inhibieren die konstitutive CAR-Aktivität und stellen somit inverse Agonisten dar (Moore et al, 2000a; Baes et al, 1994; Li et al, 2008). Xenobiotika, die als Liganden an CAR binden, wie CITCO und Artemisinin, aktivieren CAR, über das Maß der konstitutiven Aktivität hinaus, TCPOBOP allerdings nur

an Maus CAR (Maglich et al, 2003; Burk et al, 2005; Tzamelis et al, 2000, Kawamoto et al, 1999). Zudem gibt es noch weitere xenobiotische Aktivatoren und Inhibitoren, die nicht als Liganden an CAR binden, jedoch die Funktionalität dieses NR beeinflussen, u.a. Nonylphenol, Methoxychlor, Chlorpromazin, o,p-DDT (Dichlordiphenyltrichloroethan), DHEA (Dehydroepiandrosteron), Flavonoide und das Protein PPP1R16A (Merrell et al, 2008; Hernandez et al, 2007; Sueyoshi et al, 1999; Kiyosawa et al, 2008; Köhalmly et al, 2007; Yao et al, 2010; Sueyoshi et al, 2008). Meklizin wurde als inverser Agonist von humanem CAR identifiziert, aktiviert jedoch mCAR (Huang et al, 2003). Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren, die nur durch direkte Bindung aktiviert werden, ist die nukleare Translokation von CAR nicht abhängig von der direkten Ligandenbindung. Das zeigen beispielhaft Phenobarbital oder Oltipraz, die als CAR-Aktivatoren nicht direkt mit der CAR-LBD interagieren (Moore et al, 2000a; Swales and Negishi, 2004). CAR rekrutiert Ko-Aktivatoren auch ohne Liganden. Bei Ligandenbindung kommt es zur Histondeacetylierung und Dekondensierung des Chromatins über mehrere hundert Basenpaare (Wong et al, 1995). Die Bindung von Liganden führt zu einer Konformationsänderung von CAR. Die  $\alpha$ -Helix 12 weist daraufhin zum Rezeptor hin, was wiederum zur Dissoziation eines gebundenen Ko-repressors vom Rezeptor und somit zur Assoziation eines Ko-Aktivators wie z.B. SRC-1, oder GRIP1 (Takeshita et al, 1996; Voegel et al, 1996; Cavailles et al, 1995) führt, das die Transkription der Zielgene initiiert. Dabei kommt es zu einer Interaktion der AF-2 Domäne des NR mit dem sogenannten LXXLL-Motiv des Ko-Aktivators (Freedman et al, 1999).

#### **1.2.4. Rolle von CAR im Bilirubinmetabolismus und in der Hämbiosynthese**

Bilirubin, ein oxidatives Endprodukt des Häm-metabolismus, ist ein sehr toxisches natürliches Produkt, das den Körper schädigen kann. Die Ablagerung von Bilirubin führt zur Gelbsucht, die chronisch zu Neurotoxizität führt und eventuell schwerwiegende Enzephalopathie hervorrufen kann (Swales und Negishi, 2004). Die Glucuronidierung durch die Uridindiphosphat-glucuronyl-Transferase (UGT) 1A1 ist der Hauptdetoxifikationsweg von Bilirubin. Das entstandene Konjugat wird über die kanikuläre Membran der Hepatozyten durch den Transporter MRP2 in die Galle sekretiert (Swales und Negishi, 2004). Es wurde auch gezeigt, dass der CAR-Aktivator Phenobarbital die erhöhte Bilirubinmenge senken kann. Publikationen zeigten, dass CAR die Bilirubinexkretion durch Induktion der Expression der

Transportproteine OATP2, MRP2 und sowie der konjugativen Enzyme GST A1 und UGT1A1 der Phase II unterstützt (Sugatani et al, 2001; Huang et al, 2003). Ein weiterer Gallensäuretransporter, MRP3, der eine überlappende Substratspezifität zu MRP2 zeigt, ist auch PB-induzierbar. Dabei scheint die PB-Induktion von MRP3 CAR-abhängig zu sein (Xiong et al, 2002).

### **1.2.5. Rolle von CAR in der Gallensäurehomöostase**

Gallensäuren werden in der Leber produziert und sind sowohl essenziell für die Eliminierung von überschüssigem Cholesterin aus dem Körper sowie auch für Solubilisierung, Absorption und Transport von Lipiden in den Darm. Die Gallensäurehomöostase wird streng reguliert, da die Gallensäure als Detergenz extrem giftig sein kann, sobald eine gewisse Menge überschritten wird. Die Gallensäuresekretion ist wichtig für die Eliminierung von großen hydrophobischen, endobiotischen und xenobiotischen Metaboliten, einschließlich vielen hochmolekulargewichtigen Konjugaten. Die Hauptkomponenten der Galle sind Cholesterin, Lezithin, Gallenpigmente, Gallensäuren und Bikarbonationen (Nguyen und Bouscarel, 2008). In der Maus induziert CAR die Genexpression von Enzymen wie CYP3A11 und dem Transporter MRP3, die am Abbau von Gallensäure beteiligt sind (Zhang et al, 2004b). CAR unterstützt durch Regulation der Gallensäurehomeostase indirekt die Aufrechterhaltung des Cholesterinspiegels (Kliwer et al, 1998; Makishima et al, 1999).

### **1.2.6. Rolle von CAR in Glukoneogenese**

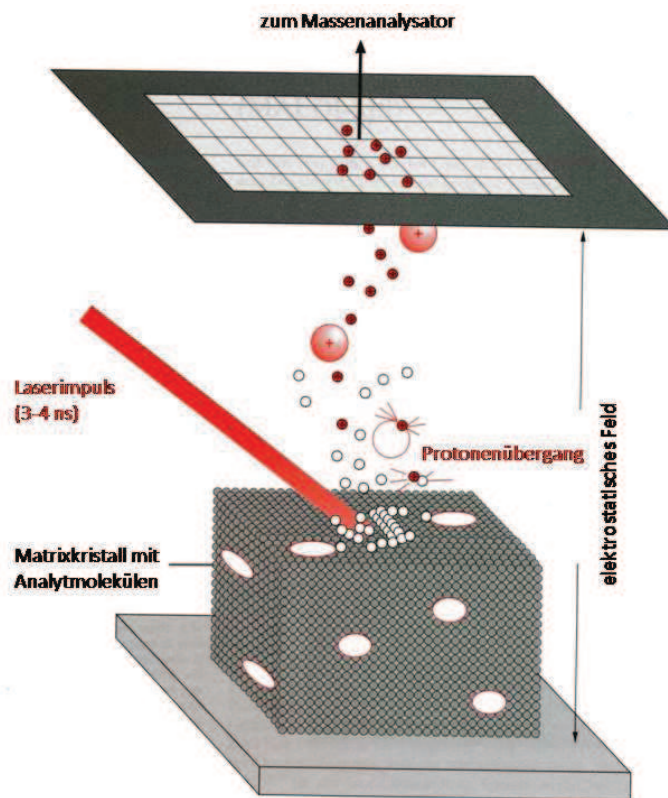
Die hepatische Glukoneogenese wird durch Insulin und Glukagon kontrolliert und spielt eine lebenswichtige Rolle während des Fastens oder Hungerns. Zu den in die Glukoneogenese involvierten Enzyme zählen Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK). Das Enzym G6Pase kontrolliert den Glukoseserumspiegel durch katalysierte Dephosphorylierung von Glukose-6-Phosphat, generiert bei der Glukoneogenese und Glykolyse. PEPCK katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid und Guanosindiphosphat (GDP) (Konno et al, 2008). Es ist bekannt, dass die Behandlung mit CAR-aktivierenden Medikamenten die Enzyme und Gene der hepatischen Glukoneogenese



reprimiert. Der CAR-Aktivator PB senkt die Glukosekonzentration im Plasma bei Diabetespatienten (Argaud, 1991; Ueda et al, 2002, Kodama et al, 2004; Lahtela et al, 1985). Publikationen zeigten, dass die CAR-Aktivierung die Glukoneogenese durch Cross-Talk mit den Transkriptionsfaktoren inhibiert, die in der transkriptionalen Regulation involviert sind. Die Regulation der Glukoneogenese durch FoxO1 (fork-head insulin-responsive Transkriptionsfaktor 1) kann auch durch CAR beeinflusst werden. CAR inhibiert die Glukoneogenese durch die Interaktion mit FoxO1. Dadurch wird die Fähigkeit von FoxO1, die an der Glukoneogenese beteiligten Gene (z.B. PEPCK) zu stimulieren, gehemmt (Kodama et al, 2004). Auf diese Weise könnte eine PB-Behandlung die Insulinsensitivität in Diabetes vom Typ II verbessern (Lathela et al, 1985). Xenobiotika reprimieren die Genexpression von G6Pase und PEPCK durch direkte Interaktion von CAR mit FoxO1. Obwohl sich der molekulare Mechanismus von dem Insulinmechanismus unterscheidet, führt die Interaktion von CAR mit FoxO1 zu einer Inhibition der Glukoneogenese (Timsit und Negishi, 2007).

### **1.3. MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MS)**

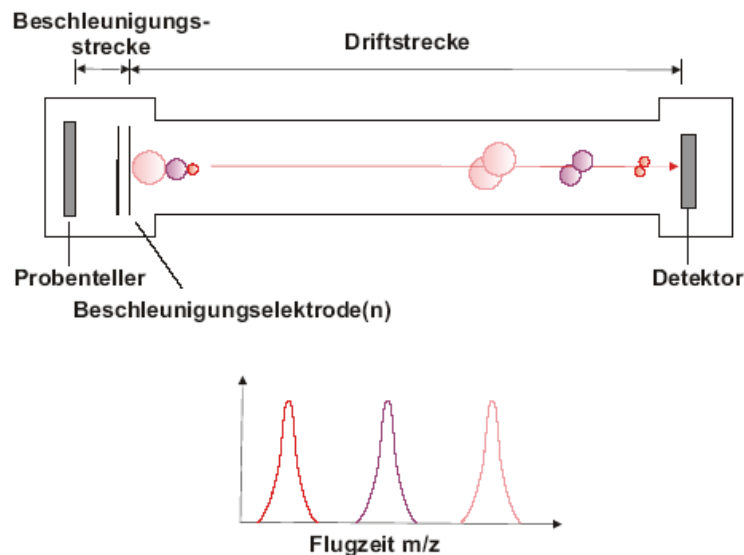
Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von CAR wurde die massenspektrometrische Methode MALDI (Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisierung) mit dem Flugzeitrohr TOF („time-of-flight“) verwendet. Die 1987 von Michael Karas und Franz Hillenkamp entwickelte Methode (Karas et al, 1987) wird in der Massenspektrometrie (MS) für die Analyse von Biomolekülen wie Peptiden und Proteinen eingesetzt (Caprioli et al., 1996; Chapman 1996). Mit herkömmlichen Massenspektrometern konnten große Moleküle nicht untersucht werden, da diese im Vakuum durch hochenergetischen Laserbeschuss zerstört wurden. Bei der MALDI-MS absorbieren Matrixmoleküle die Laserenergie und übertragen sie partiell auf die Peptide und Proteine, wodurch eine Ionisierung der Peptide ermöglicht wird (Karas and Hillenkamp, 1988; Chapman 1996). Eine Ko-Kristallisation von Matrixmolekülen und Peptidprobe ist Voraussetzung für die nachfolgende Laserdesorption/Ionisierung. Hierbei wird die kristalline Oberfläche der Proben im Hochvakuum der MALDI-Ionenquelle durch ultravioletten Laserimpuls für wenige Nanosekunden (3-4 ns) beschossen, wobei neben Matrixmolekülen auch Peptidmoleküle aus dem Kristallgitter freigesetzt werden. Die Matrixmoleküle übertragen dabei Protonen auf die Peptide, wodurch diese positiv geladen werden (Karas et al, 1987; Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Prinzip der MALDI-Ionisierung**

In Matrix eingebettete Analytproben werden an der Quelle des MALDI Gerätes durch einen Laserimpuls von 3-4 ns beschossen. Entstandene Ionen werden im elektrostatischen Feld beschleunigt und wandern zum Massenanalysator, an dessen Ende am Detektor das Masse/Ladungsverhältnis bestimmt wird (aus: Lottspeich und Zorbas, 1998).

Die Peptidionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und fliegen durch einen feldfreien Flugzeitanalysator (auch ToF -Analysator genannt). In der feldfreien Driftstrecke des TOF-Analysators haben die meist einfach positiv geladenen Peptidionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen verschiedene Geschwindigkeiten bei konstanter Beschleunigung und gleich bleibender Flugstrecke (Abb. 1.6). Der ToF-Analysator erfasst dabei die Flugzeit der Ionen, die zwischen dem Start an der Quelle durch Laserbeschuss bis zum Eintreffen an dem Detektor am Ende des Flugrohrs vergeht. Dort wird das Masse/Ladungs ( $m/z$ )-Verhältnis der Peptidionen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten ankommen, bestimmt.



### 1.6: Prinzip des TOF-Analysators

Die Ionen werden im elektrischen Feld der Beschleunigungsstrecke konstant beschleunigt, im Vakuum der Driftstrecke bei gleicher Flugstrecke nach dem  $m/z$ -Wert aufgetrennt und als Spektrum aufgenommen. Bei gleicher Ladung fliegen kleine Ionen schneller als große und treffen früher auf den Detektor auf (verändert nach Lottspeich und Zorbas, 1998).

Die Korrelation von Masse ( $m$ ), Ladung ( $z$ ) und Flugzeit ( $t$ ) eines Ions im ToF-Analysator wird durch folgende Formel beschrieben:

$$m / z = t^2 (2eU / L^2)$$

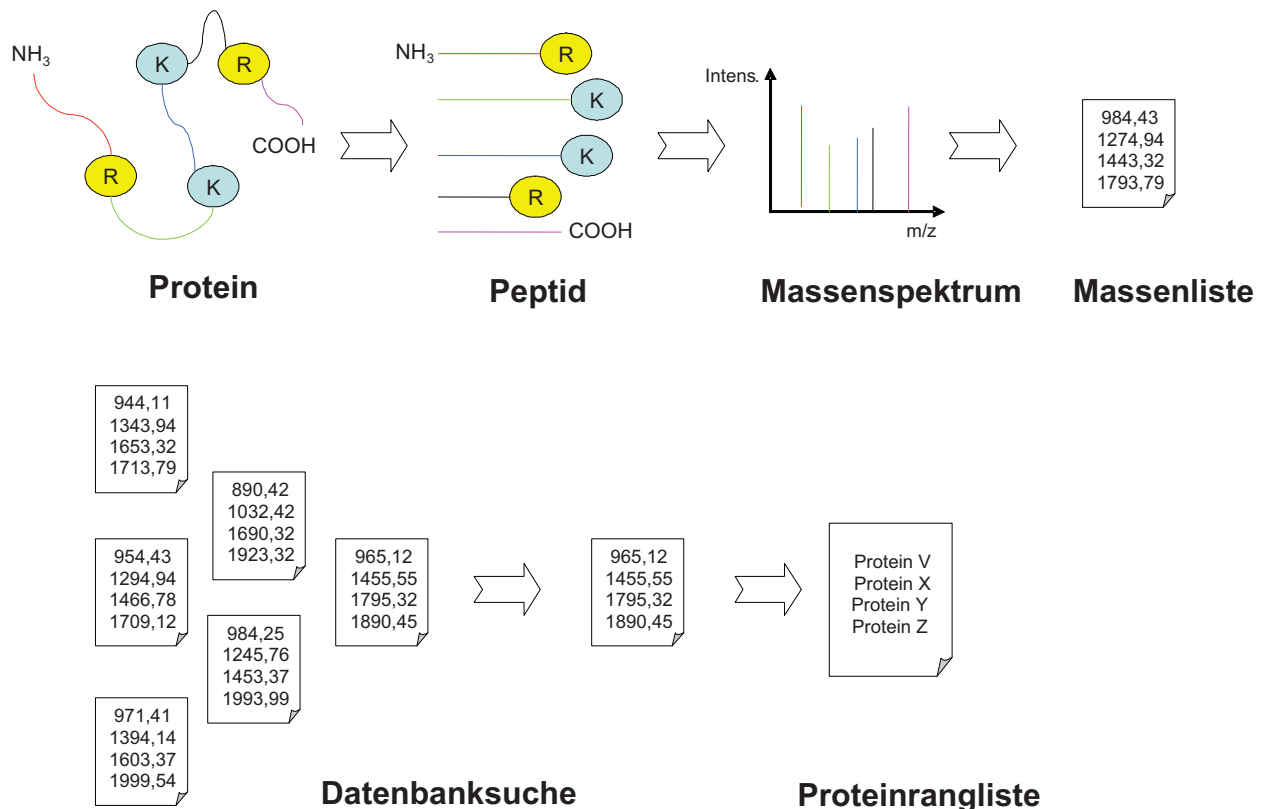
wobei  $U$  für die Beschleunigungsspannung,  $e$  für die Elementarladung und  $L$  für die Länge der feldfreien Driftstrecke steht (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Die Formel zeigt, dass in einem ToF-Analysator das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung des Ions proportional dem Quadrat der Flugzeit ist. Damit lässt sich die Masse jedes einzelnen Peptids aus der gemessenen Flugzeit ermitteln.

Die  $m/z$ -Verhältnisse der Peptidionen werden aufsummiert und als Spektrum dargestellt. Das Summenspektrum zeigt dabei Signale mit unterschiedlichen Intensitäten, die die relative Häufigkeit der einzelnen Peptidionen repräsentieren. Die Spektren der MALDI-MS bestehen hauptsächlich aus intakten einfach geladenen Molekülionen.

Unter Verwendung geeigneter Algorithmen (z.B. MASCOT) lassen sich aus diesem Spektrum Peptidlisten erstellen, die mit Internet-Datenbanken, wie NCBI oder SwissProt verglichen werden. Dabei wird mit der PMF (peptide mass fingerprint)-Methode (Thiede et al., 2005) der „Fingerabdruck“, eines Proteins unter Datenbankabgleich gesucht. Die Datenbanken enthalten

Peptidlisten, die durch „theoretischen“ Verdau sämtlicher Proteine mit dem entsprechenden Enzym entstehen. Aus den Daten wird dann eine Rangliste der in Frage kommenden Proteine erstellt, bei denen es möglichst viele Übereinstimmungen zwischen theoretisch errechneten und tatsächlich nachgewiesenen Peptidmassen gibt. (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7: Proteinidentifizierung durch PMF-Methode**

Das Protein wird durch tryptischen Verdau in mehrere Peptide zerlegt und das  $m/z$ -Verhältnis mittels MALDI-MS als Spektrum dargestellt. Die daraus resultierende Massenliste wird mit theoretischen Listen in den Internet-Datenbanken verglichen und bei einer Übereinstimmung eine Rangliste der möglichen zugehörigen Proteine erstellt. Modifiziert nach Becker (2005).

Die resultierenden Peptide stellen somit den PMF des jeweiligen Proteins dar, und können mit den tatsächlich im Massenspektrometer detektierten Peptiden verglichen werden. Neben der Ermittlung der Primärsequenz von Proteinen und der Analyse von Modifikationen stellt die Identifizierung von Proteinen eine wichtige Anwendung bei MALDI-TOF-MS dar.

## **2. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es, neue potenzielle Interaktionspartner des in der Leber hochexprimierten Kernrezeptors CAR zu identifizieren, um auf diese Weise Informationen über Aufbau und Regulation des nativen Heteromerkomplexes zu erhalten, mit dem CAR im Cytoplasma assoziiert ist, und eventuell weitere Rückschlüsse auf die Funktion von CAR ziehen zu können.

Zunächst sollte ein GST-CAR-LBD Fusionsprotein des Kernrezeptors in *E. coli*-Bakterien exprimiert und affinitätsgereinigt werden. Des Weiteren sollten daraufhin Pulldown-Assays etabliert werden, um die CAR-LBD auf eine Wechselwirkung mit Proteinen aus Lebergewebe zu untersuchen. Die mit dieser Methode isolierten Proteine sollten anschließend mittels MALDI (*matrix assisted laser desorption ionisation*)-MS und NCBI-Datenbankrecherche identifiziert werden, um eine Liste der möglichen Interaktionspartner von CAR zu erstellen. Ergänzend sollten die massenspektrometrisch ermittelten putativen Interaktionspartner über Western Blots mit spezifisch gegen diese Interaktionspartner gerichteten Antikörpern oder Ko-Immunpräzipitationen validiert werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Material**

#### **3.1.1. Laborgeräte**

**Tabelle 3.1: Die verwendeten Laborgeräte sind alphabetisch aufgelistet.**

| <b>Name</b>   | <b>Hersteller</b>                          |
|---|--|
| ABI PRISM <sup>a</sup> 7500 Sequence Detection System | Applied Biosystems (Darmstadt)             |
| BAS Reader 1800 II Röntgenfilm                        | Fujifilm (Düsseldorf)                      |
| Brutschrank Galaxy 170S                               | New Brunswick (NJ, USA)                    |
| Brutschrank   | Heraeus (Hanau)                            |
| Bunsenbrenner Fireboy plus                            | IBS Integra Biosciences (Fernwald)         |
| DNA Analyzer 4300                                     | LICOR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) |
| Easypet Pipetboy elektr.                              | Eppendorf (Köln)                           |
| Electrophoresis Power Supply EPS 3500                 | Pharmacia Biotech (Düßeldorf)              |
| Electrophoresis Power Supply EV 231                   | CONSORT NV (Belgien)                       |
| EPI-Fluoreszenz-Mikroskop CKX 41                      | Olympus (Hamburg)                          |
| Eraser  | Raytest (Straubenhardt)                    |
| Feinwaage   | Mettler Toledo AC (Giessen)                |
| Gel Dryer Model 583                                   | BioRad (München)                           |
| Heizblock Techne DB 2A                                | Thermo-Dux (Wertheim)                      |
| Intelligent Dark Box                                  | Fujifilm (Düsseldorf)                      |
| Luminometer Autolumat Plus                            | Berthold (Bad Wildbad)                     |
| Magnetrührer BELL-STIR                                | Bellco Glass (Vineland, New Jersey, USA)   |
| Magnetwärmerührer RET basic                           | IKA (Staufen)                              |
| Mikroskop Diavert                                     | Leitz/Leica (Solms)                        |
| Mini- Protean 3 Cell (Gelgießsystem)                  | BioRad (München)                           |

|   |  |
|---|--|
| Micro Tischzentrifuge                               | CARL ROTH (Karlsruhe)                                    |
| Odyssey Imaging System                              | LICOR Biosciences<br>(Lincoln, Nebraska, USA)            |
| Pasteurpipetten                                     | Hirschmann (Herrenberg)                                  |
| PCR Gerät PTC 200 Thermal Cyclers                   | BioRad (München)   |
| pH-Meter CG 840                                     | Schott (Mainz)   |
| Pipettensatz (2,5µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) | Eppendorf (Köln)   |
| Schüttler KS 10                                     | Bühler Labortechnik<br>(Hechingen)                       |
| Schüttler (The Belly Dancer)                        | Stovall (Asbach)   |
| Semi-Dry Blotkammer                                 | Biometra (Göttingen)                                     |
| Spektralphotometer Novaspec II Nano-Drop            | Amersham pharmacia<br>biotech (Freiburg)                 |
| Sterilbank H-130                                    | Berner (Elmshorn)  |
| Ultraschall Homogenisator                           | Bandelin (Berlin)  |
| Ultraflex I Massenspektrometer                      | Bruker Daltonics (Bremen)                                |
| Ultraviolett Visualizer                             | LFT Labortechnik<br>(Wasserburg, Bodensee)               |
| Ultrazentrifuge Optima Max-E                        | Beckman (München)  |
| Vakuumpumpe   | KNF Laborport Neuberger<br>(Trenton, New Jersey,<br>USA) |
| Vortexer Reax top                                   | Heidolph Instruments<br>(Schwabach)                      |
| Waage   | Kern & Sohn (Balingen-<br>Frommern)                      |
| Wasserbad   | Julabo (Seelbach)  |
| Wasserbadschüttler                                  | HT Infors AG<br>(Bottmingen-<br>Basel, Schweiz)          |
| Wasserbadschüttler                                  | Peqlab Biotechnology<br>(Erlangen)                       |
| Zentrifuge Biofuge 22 R                             | Heraeus (Hanau)  |
| Zentrifuge Biofuge 13                               | Heraeus (Hanau)  |
| Zentrifuge Universal 320 R                          | Hettich Lab Technology<br>(Tuttlingen)                   |
| Zentrifuge Universal 30 RF                          | Hettich Lab Technology<br>(Tuttlingen)                   |
| Zentrifuge 5417 C                                   | Eppendorf (Köln)   |

### 3.1.2. Chemikalien

**Tabelle 3.2: Die verwendeten Chemikalien sind alphabetisch aufgelistet.**

| <b>Name</b>  | <b>Hersteller</b>          |
|--|----------------------------|
| Agarose  | Serva (Heidelberg)         |
| Albumin Standard   | Pierce (Illinois, USA)     |
| Acetonitril  | Merck (Darmstadt)          |
| Acrylamid/Bis Solution 37,5:1  | Biorad (München)           |
| Ammoniumhydrogencarbonat   | Roth (Karlsruhe)           |
| Ammoniumsulfat   | Roth (Karlsruhe)           |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)   | Roth (Karlsruhe)           |
| Ampicillin Natriumsalz   | Roth (Karlsruhe)           |
| Block-iT U6 RNAi Entry Vector Kit <sup>™</sup>                       | Invitrogen (Karlsruhe)     |
| Bromphenolblau (3', 3'', 5', 5'' Tetra-Bromphenolsulfonphtalein) BPB | Amersham (München)         |
| Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>                                     | Applichem (Darmstadt)      |
| Coomassie Brilliant Blau G-250                                       | Applichem (Darmstadt)      |
| Coomassie Protein Assay Reagent                                      | Pierce (Illinois, USA)     |
| $\alpha$ - Cyano-4-hydroxymizimsäure                                 | Bruker Daltonics (Leipzig) |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)   | Applichem (Darmstadt)      |
| D-(+)-Glucose- Monohydrat  | Applichem (Darmstadt)      |
| Dimethyl Sulphoxide (DMSO)   | Sigma (München)            |
| (1,4)-Dithiothreitol (DTT)   | Roth (Karlsruhe)           |
| Effectene Transfection Reagent                                       | Qiagen (Hilden)            |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA)                                      | Applichem (Darmstadt)      |
| Ethanol  | Merck (Darmstadt)          |
| Ethanolamin  | Applichem (Darmstadt)      |
| Ethidiumbromid   | Roth (Karlsruhe)           |
| Essigsäure   | Merck (Darmstadt)          |
| Formaldehyd  | Sigma (München)            |
| G 418 Sulfat   | Merck (Darmstadt)          |
| GeneClean Turbo Kit  | MP Biomedicals ( Illkirch) |
| Glutathion Sepharose <sup>™</sup> 4Fast Flow                         | Amersham (München)         |
| Glycerin   | Roth (Karlsruhe)           |
| Glycin   | Applichem (Darmstadt)      |
| Harnstoff  | Merck (Darmstadt)          |



|  |                            |
|--|----------------------------|
| 4-2-Hydroxyethylpiperazine-1-ethansulfonsäure (HEPES)      | Sigma (München)            |
| Hot Star Taq DNA Polymerase                                | Qiagen (Hilden)            |
| Iodacetamid (IAA)  | Applichem (Darmstadt)      |
| Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)          | Applichem (Darmstadt)      |
| Isopropanol (2-Propanol)                                   | Merck (Darmstadt)          |
| Kaliumacetat   | Merck (Darmstadt)          |
| Kaliumchlorid  | Applichem (Darmstadt)      |
| Kaliumhydrogenphosphat                                     | Merck (Darmstadt)          |
| L- Glutathion  | Applichem (Darmstadt)      |
| Leupeptin- Hemisulfat                                      | Applichem (Darmstadt)      |
| Lysozym  | Boehringer (Ingelheim)     |
| Magnesiumchlorid   | Merck (Darmstadt)          |
| Magnesiumsulfat  | Applichem (Darmstadt)      |
| $\beta$ - Mercaptoethanol                                  | Sigma (München)            |
| Methanol   | Roth (Karlsruhe)           |
| Natriumacetat  | Applichem (Darmstadt)      |
| Natriumazid  | Applichem (Darmstadt)      |
| Natriumcitrat  | Applichem (Darmstadt)      |
| Natriumchlorid (NaCl)                                      | Merck (Darmstadt)          |
| Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate, SDS)          | Roth (Karlsruhe)           |
| Natriumhydroxid (NaOH)                                     | Merck (Darmstadt)          |
| Natriumsalicylat   | Fluka (München)            |
| Nonidet P-40   | Applichem (Darmstadt)      |
| Passive Lysis Buffer                                       | Promega (Mannheim)         |
| Pepstatin A  | Applichem (Darmstadt)      |
| Peptide Calibration Standard II                            | Bruker Daltonics (Leipzig) |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)                         | Roth (Karlsruhe)           |
| Phosphatpuffer Saline (PBS)                                | Lonza (Köln)               |
| Polyoxyethylensorbitan monolaurat (Tween 20)               | Applichem (Darmstadt)      |
| Protein A/G Plus Sepharose 4 Fast Flow                     | Santa Cruz (Heidelberg)    |
| Protease Inhibitor Cocktail                                | Pierce (Illinois, USA)     |
| Powerscript DNA polymerase                                 | Pan Biotech (Aidenbach)    |
| QIA Quick PCR Purification Kit (50)                        | Qiagen (Hilden)            |
| Salzsäure  | Roth (Karlsruhe)           |
| Schwefel [ $^{35}\text{S}$ ], $10\mu\text{Cu}/\mu\text{l}$ | Amersham (München)         |
| Silbernitrat   | Merck (Darmstadt)          |
| Magermilchpulver   | Sigma (München)            |

|  |                    |
|--|--------------------|
| Sucrose 99%                            | Sigma (München)    |
| N,N,N',N' Tetra-Methylendiamin (TEMED) | Roth (Karlsruhe)   |
| Thermosequenase Kit                    | Amersham (München) |
| Trifluoressigsäure (TFA)               | Merck (Darmstadt)  |
| Triton X 100                           | Amersham (München) |
| TRIS(hydroxymethyl)aminomethan         | Roth (Karlsruhe)   |
| Trypsin (Schwein)                      | Promega (Mannheim) |
| Tween 20                               | Merck (Darmstadt)  |

### 3.1.3. Plasmide

**Tabelle 3.3: Verwendete Plasmide**

| Name                 | Referenz                                 | Beschreibung  |
|----------------------|--|---|
| pLenti/CMV-EGFP-WPRE | IKP (Stuttgart)                          | Plasmid für Virenproduktion                         |
| pLP1                 | Invitrogen (Karlsruhe)                   | Lentiviraler Verpackungsplasmid                     |
| pLP2                 | Invitrogen (Karlsruhe)                   | Lentiviraler Verpackungsplasmid                     |
| pLP/VSVG             | Invitrogen (Karlsruhe)                   | Lentiviraler Verpackungsplasmid                     |
| pUC18                | Invitrogen (Karlsruhe)                   | Plasmid für Transfektionen                          |
| pCMV $\beta$         | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France) | $\beta$ -Galactosidase Expressionsplasmid           |
| pGEX 6P1             | Amersham (München)                       | Proteinexpressionsplasmid                           |
| pcDNA3               | Invitrogen                               | Expressionsplasmid                                  |
| pCR3.1-SRC-1         | Arnold et al, 2004                       | Expressionsplasmid des Fusionsprotein VP16-AD/SRC-1 |
| pcDhuBAF155          | Archer et al, 2006                       | Expressionsplasmid                                  |

### 3.1.4. Zellkulturmaterialien

**Tabelle 3.4: Die verwendeten Zellkulturmaterialien sind alphabetisch aufgelistet.**

| Name        | Hersteller   |
|-------------|--------------|
| DMEM Medium | Lonza (Köln) |

|  |                        |
|--|------------------------|
| Fötales Kälberserum (FKS; fetal calf serum, FCS) | Invitrogen (Karlsruhe) |
| MEM Medium                                       | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Non essential Amino Acids (NEAA) 10 mM           | Invitrogen (Karlsruhe) |
| L- Glutamin 200 mM                               | Cambrex (Italy)        |
| Natriumpyruvat 100 mM                            | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Penicillin-Streptomycin 100 mM                   | Cambrex (Italy)        |
| PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)              | Lonza (Köln)           |
| 0,25% Trypsin in 1mM EDTA                        | Invitrogen (Karlsruhe) |

### 3.1.5. Arbeitsmaterialien

**Tabelle 3.5: Die verwendeten Arbeitsmaterialien sind alphabetisch aufgelistet.**

| Name  | Hersteller                 |
|---|----------------------------|
| COSTAR Cell Lifter steril   | VWR (Darmstadt)            |
| Combitips plus 0,1 ml   | Eppendorf (Köln)           |
| Combitips plus 5 ml   | Eppendorf (Köln)           |
| Combitips plus 10 ml  | Eppendorf (Köln)           |
| Einmalimpfösen steril   | Roth (Karlsruhe)           |
| Filter für Spritze 0,45 µm  | Sartorius (Göttingen)      |
| Hämatocytometer Deckgläser 20*26mm                                | Roth (Karlsruhe)           |
| Nitrocellulosemembran: Hybond-C extra 0,45 µm                     | Amersham (München)         |
| Petrischalen  | Greiner Bio-One (Solingen) |
| Pure Yield Plasmid Midi Prep System                               | Promega (Mannheim)         |
| QIA Quick Gel Extraction Kit (50)                                 | Qiagen (Hilden)            |
| RNeasy Mini   | Qiagen (Hilden)            |
| Röntgenfilme: Hyperfilm MP  | Amersham (München)         |
| T 175 CELLSTAR Kulturflaschen                                     | Greiner Bio-One (Solingen) |
| T4 DNA Ligase   | Roche (Mannheim)           |
| Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit | Amersham (München)         |
| TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System             | Promega (Mannheim)         |
| Zellkulturplatten 10cm ø  | Greiner Bio-One (Solingen) |
| Zellkulturplatten 6-Well-Platten                                  | Greiner Bio-One (Solingen) |

### 3.1.6. Protein- / DNA-Marker

|  |                        |
|--|------------------------|
| PeqGold Protein - Marker II<br>Größen: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40,<br>30, 25, 20, 15, 10 kDa | PeqLab (Erlangen)      |
| PeqGold Protein - Marker V (Prestained)<br>Größen: 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11 kDa              | PeqLab (Erlangen)      |
| 1 kb DNA Leiter<br>Größen: 100 bp bis 12000 bp   | Invitrogen (Karlsruhe) |
| 100 bp DNA Leiter<br>Größen: 100 bp bis 1500 bp, 2000 bp   | Invitrogen (Karlsruhe) |

### 3.1.7. Verwendete Antikörper

#### Primäre Antikörper:

Tabelle 3.6: Auflistung der primären Antikörper

| Name                        | Wirt      | Verdünnung                                  | Hersteller                                  |
|-----------------------------|-----------|---|---|
| anti-Flag M2                | Maus      | <b>1:1000</b><br>in<br>1 % Magermilch/TBST  | Invitrogen<br>(Karlsruhe)                   |
| anti-Myc                    | Maus      | <b>1:1000</b><br>in<br>1 % Magermilch/TBST  | Promega<br>(Mannheim)                       |
| anti-BAF 155<br>(H76)       | Kaninchen | <b>1:500</b><br>in<br>1 % Magermilch/TBST   | Santa Cruz<br>Biotechnology<br>(Heidelberg) |
| anti-RXR<br>alpha<br>(D-20) | Kaninchen | <b>1: 500</b><br>in<br>1 % Magermilch/TBST  | Santa Cruz<br>Biotechnology<br>(Heidelberg) |
| anti-β-Actin                | Maus      | <b>1: 2000</b><br>in<br>1 % Magermilch/TBST | Sigma<br>(München)                          |
| anti-SRC-1<br>(C-20)        | Kaninchen | <b>1: 200</b><br>in<br>1 % Magermilch/TBST  | Santa Cruz<br>Biotechnology<br>(Heidelberg) |

**Sekundäre Antikörper:**

Sekundäre Antikörper waren entweder mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) oder mit Fluorophor konjugiert und richteten sich gegen die konstante Region (Fc-Domäne) der primären Antikörper.

**Tabelle 3.7: Auflistung der sekundären Antikörper**

| <b>Name</b>  | <b>Wirt</b> | <b>Verdünnung</b>                           | <b>Hersteller</b>                                |
|--|-------------|---|--|
| anti-Maus Antikörper IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert        | Ziege       | <b>1: 2000</b><br>in<br>1% Magermilch/TBST  | DAKO<br>(Hamburg)                                |
| anti-Maus Antikörper IgG (H+L), IRDye 800 CW konjugiert      | Ziege       | <b>1: 10000</b><br>in<br>1% Magermilch/TBST | LICOR Biosciences<br>(Lincoln, Nebraska,<br>USA) |
| anti-Kaninchen Antikörper IgG, Peroxidase-konjugiert         | Schwein     | <b>1: 1000</b><br>in<br>1% Magermilch/TBST  | DAKO<br>(Hamburg)                                |
| anti-Kaninchen Antikörper IgG (H+L), IRDye 680 CW konjugiert | Ziege       | <b>1: 10000</b><br>in<br>1% Magermilch/TBST | LICOR Biosciences<br>(Lincoln, Nebraska,<br>USA) |

**3.1.8. Bakterienstämme****BL21 (DE3) pLysS *Escherichia coli* (*E.coli*)- Zellen One Shot (Invitrogen)**

Der Stamm BL21 (DE3) pLysS ist proteasedefizient und eignet sich daher für die heterologe Proteinexpression. Das konstitutiv transkribierte Gen für T7-Lysozym auf dem pLysS-Plasmid reduziert die Hintergrundexpression. Das Gen für die T7-Polymerase ist in das Genom insertiert und lässt sich durch einen IPTG-sensitiven lac-Promotor selektiv induzieren.

Genotyp:

F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (CamR)

**Stbl 3 chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)- Zellen One Shot (Invitrogen)**

Der Stbl3 *E.coli* Stamm stammt von HB101 *E.coli* Stamm ab und wird für die Transformation von Klonen verwendet, die instabile Inserts wie lentivirale DNA mit gleichgerichteten Sequenzwiederholungen („direct repeats“) beinhalten.

Genotyp:

F<sup>-</sup> mcrB mrr hsdS20(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl-5 λ<sup>-</sup> leu mtl-1

**TOP 10 *E. coli*- Zellen One Shot (Invitrogen)**

Dieser Stamm wurde für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA auf der Grundlage der Vektoren pcDNA3.1, pGEX-2T benutzt.

Genotyp:

F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

**TOP 10 F' *E. coli*- Zellen One Shot (Invitrogen)**

Genotyp: F'<sup>+</sup>{lacIq Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL end A1 nupG.

**3.1.9. Zellkulturlinien**

**COS-1 Zellen:** Affennieren-Fibroblasten-Zelllinie (Gluzman, 1981)

**HeLa Zellen:** Humane Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie (Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs; Scherer et al, 1953)

**LS 174T Zellen:** Humane Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie (Tom et al, 1976)

**HEK 293/FT Zellen:** Humane embryonale Nieren-Zelllinie (human embryonal kidney; Graham, 1987)

**HT 1080 Zellen:** Humane Fibrosarkom-Zelllinie (Rasheed et al, 1974)

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Zellkultur**

#### **3.2.1.1. Zellkulturbedingungen**

Die adhärennten Zelllinien COS-1, HeLa, LS174T und HEK 293/FT und HT1080 wurden in beschichteten Zellkulturgefäßen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM, versetzt mit 10 % FKS, 1,5 % nicht essenzielle Aminosäuren, 1,5 % einer 200 mM L-Glutaminlösung und jeweils 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Für alle routinemäßigen Zellkulturarbeiten wurden die verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Zum Passagieren wurden die zu 80-90 % konfluent gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen und durch Trypsinbehandlung von der beschichteten Fläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Schließlich wurden die abgelösten Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1 : 5 bis 1 : 10 in neue Zellkulturgefäße überführt.

#### **Zellkulturmedium für die Zelllinien COS-1, HeLa**

DMEM-Medium mit

10 % FKS

2 mM L-Glutamin

1 % Penicillin/Streptomycin

#### **Zellkulturmedium für die Zelllinie LS174T, HEK 293/FT, HT1080**

DMEM-Medium mit

10 % FKS

2 mM L-Glutamin

1 mM Natrium-Pyruvat

1 % NEAA

1 % Penicillin/Streptomycin

### 3.2.1.2. Langzeitlagerung von Zellen

Zur Lagerung von Zell-Gefrierstocks wurden die Zellen wie unter 3.2.1.1 beschrieben behandelt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend abzentrifugiert (500xg, 3 min, Raumtemperatur) und das Zellpellet mit gewünschtem Volumen mit Kulturmedium aufgenommen. Danach wurde tropfenweise 2-fach Einfriermedium hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Zum kontrollierten Einfrieren wurden die Zellsuspensionen ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) mit Isopropanol bei  $-80^\circ\text{C}$  schonend eingefroren und nach 24 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **Einfriermedium:**

DMEM-Medium mit

20 % FKS

20 % DMSO

### 3.2.1.3. Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitationstechnik

Die Calcium-Phosphat Transfektion wird verwendet, um fremde Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid, DNA) in eukaryotische Zellen zu integrieren. Hierbei wird die fremde DNA in Zellkulturen durch ein Präzipitat transfiziert, das an der Zelloberfläche anhaftet.

Die verwendeten COS-1 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion bei einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen in 10-cm Gewebekulturplatten mit 10 ml Kulturmedium ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen 1 bis 2 Stunden kurz vor Transfektion mit 9 ml frischem Kulturmedium versorgt. Zu jeweils 10 µg DNA, wurde das gleiche Volumen an 0,5 M NaCl hinzugefügt (Endkonzentration 0,25 M) und dann mit  $> 2$  Volumen Ethanol für mindestens 15 min oder über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  präzipitiert. Anschließend wurde die DNA für 15 min bei 20000xg zentrifugiert, der Überstand unter der Sterilbank vollständig abpipettiert und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Danach wurde das Pellet in 450 µl sterilem Wasser gelöst und 50 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  -Lösung hinzugegeben. Währenddessen wurden in ein steriles 15 ml Röhrchen 500 µl der 2x HBS-Lösung vorgelegt. Während die HBS-Lösung im Röhrchen auf einem Vortexer bei ca. 2000 -2500 rpm in Bewegung blieb, wurden 500 µl DNA/ $\text{CaCl}_2$ -Lösung langsam zugetropft. Danach wurde die Lösung zur Bildung des Präzipitats 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat auf die Zellen in der



10 cm- Gewebeschale getropft und vorsichtig mit dem Kulturmedium vermischt. Nach 1 Stunde konnten die gebildeten Präzipitate unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Es erfolgt eine 4-5-stündige Inkubation im 5 %-CO<sub>2</sub> Brutschrank bei 37°C. Nachdem das Kulturmedium erneut abgesaugt wurde, wurden die COS-1-Zellen mit 3 ml 15 %iger Glycerinschocklösung behandelt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Transfektionseffizienz in den Zellen wird durch das „Schocken“ der Zellen mit Glycerin erheblich erhöht. Nach Absaugen der Glycerinschocklösung wurden schließlich die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml frischem DMEM Medium versorgt. Die transfizierten COS-1-Zellen inkubierten bis zur Zellernte bei 37°C für 48 Stunden im Brutschrank.

#### **Zellkulturmedium für COS-1-Zellen**

DMEM Medium

10 % FKS

2 mM L-Glutamin

1 % Penicillin/Streptomycin

#### **2 x HBS-Lösung**

280 mM NaCl

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

50 mM HEPES pH 7,1

#### **Glycerinschocklösung**

15 % Glycerin in PBS

Bei der Zellernte wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in Reaktionsgefäße überführt und für 30 s bei 20000xg pellettiert. Das Pellet wurde dann mit 1 ml PBS resuspendiert. 9/10 der Zellen wurden zur Isolation von Gesamtproteinextrakt verwendet, während 1/10 der Zellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz abgezweigt wurden. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die Aktivität der ko-transfizierten  $\beta$ -Galaktosidase gemessen. Hierzu wurden das entsprechende Aliquot (1/10 Zellen) mit 150  $\mu$ l Lysepuffer lysiert und für 20 min bei RT auf einem Schüttler bei 2000 rpm inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 20000xg und 4°C wurde das Zelllysate im Überstand abgenommen.

Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität basiert auf der Methode von Jain und Magrath

(1991). Dabei wird das Substrat Galakton durch  $\beta$ -Galaktosidase enzymatisch geschnitten, was eine Lichtemission bei  $\text{pH} > 9.5$  zu Folge hat.

Zur Präparation wurden bei Doppelwertbestimmung je 10  $\mu\text{l}$  Extrakt in 4 ml Röhren (Sarstedt) pipettiert und mit 100  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Gal-Assaypuffer für 30 min inkubiert. Nach Injektion von 300  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Gal-Stop-Mix wurde die Lumineszenz mit dem Luminometer Autolumat Plus (Berthold) gemessen.

Als Negativkontrollen wurden nicht-transfizierte Zellen verwendet. Die Expression der in den Zellen gebildeten Proteine wurden mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers bestimmt.

**$\beta$ -Gal-Assay-Puffer:**

100 mM Na-Phosphat pH 8,0

1 mM  $\text{MgCl}_2$

1,25  $\mu\text{g/ml}$  Galakton

**$\beta$ -Gal-Stop-Mix:**

0,2 M NaOH

2,5 % Emerald enhancer

**3.2.1.4. Transfektion mit FuGENE HD (Roche)**

Das FuGENE® HD Transfektionsreagenz von Roche wurde verwendet, um Plasmide mit GFP-Gen in LS174T Zellen, welche CAR stabil exprimieren, zu transfizieren und somit eine hohe Expression des GFP-Proteins zu bekommen. Dabei formt das multikomponente Reagenz mit der DNA Komplexe, die schließlich von den Zellen aufgenommen werden. Am Tag vor der Transfektion wurden in 24-Well Platten 150000 Zellen pro Well ausgesät. Am Transfektionstag wurde 0,2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in Polystyrolröhren pipettiert und mit Basalmedium ohne jegliche Komponenten auf ein Endvolumen von 25  $\mu\text{l}$  verdünnt. Danach wurden 0,5  $\mu\text{l}$  des FuGENE HD Reagenz hinzugefügt, kurz gevortext und 30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese mit 500  $\mu\text{l}$  frischem Medium pro Well versorgt. Anschließend wurde 25,5  $\mu\text{l}$  Transfektionsansatz unter die Oberfläche des Kulturmediums gegeben und vorsichtig bewegt,

um eine gleichmäßige Verteilung der Reagenz-DNA-Komplexe zu gewährleisten. Danach erfolgte bis zur Zellernte eine Inkubation von 24 h im 37°C-Brutschrank.

### **3.2.1.5. Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten**

Zur Herstellung von Protein-Gesamtzellextrakten aus Kulturzellen wurden konfluent gewachsene Zellen mit 1 ml 4°C kaltem PBS gewaschen und mittels eines Gummischabers von der Zellplatte gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 500xg bei 4°C für 3 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspension im Lysepuffer. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 13000 rpm bei 4°C für 5 min zentrifugiert und der klare Überstand (Proteinlysate) abgenommen. Zur Proteinquantifizierung wurden Western Blots durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.5.3). Um zwischen verschiedenen Ansätzen zu vergleichen, wurde die Transfektionseffizienz mittels  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität gemessen (siehe Kapitel 3.2.1.3). Dabei wurde die Menge der im Western Blot zu untersuchenden Proteinextrakte normalisiert.

#### **Lysepuffer**

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

400 mM NaCl

1 mM EDTA

0,5 % Nonidet P-40

+ Proteaseinhibitoren 1:100

### **3.2.2. Bakterienkultur**

#### **3.2.2.1. Vermehrung und Lagerung von Bakterienkulturen**

Mit Plasmid-DNA transformierte *E. coli* Bakterien wurden über Nacht als Suspensionskultur in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert und gemäß den Antibiotika-Resistenzen der jeweiligen Plasmide wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Ampicillinresistente Klone wurden mit 200  $\mu$ g/ml Ampicillin und kanamycinresistente Klone

mit 30 µg/ml Kanamycin selektioniert. Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden die über Nacht gewachsenen Vorkulturen mit 15 % Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

### LB-Medium

1% Trypton  
0,5% Hefeextrakt  
0,5% NaCl (w/v)

### LB-Agar-Platten

15 g Bacto-Agar  
ad 1 l LB-Medium

## 3.2.3. DNA (Deoxyribonukleinsäuren)

### 3.2.3.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR , Polymerase Chain Reaction)

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird ein DNA-Fragment mit einer thermostabilen Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, amplifiziert (Saiki et al., 1988). Hierzu wurde für die spätere Expression als Fusionsprotein ein carboxyterminales DNA-Fragment von CAR mittels PCR generiert.

**Tabelle 3.8: Primer für CAR-LBD**

| Name                          | Sequenz (von 5' nach 3')          |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| Vorwärtsprimer CAR-LBD-CM-01  | TTAGGATCCCAACTGAGTAAGGAGCAAGAAGAG |
| Rückwärtsprimer CAR-LBD-CM-02 | TTAGAATTCGCTGCAGATCTCCTGGAGCAGCGG |

Als DNA-Matrize für die PCR diente ein Vektor, der die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des C-Terminus von CAR beinhaltete. Zur Amplifikation wurden die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Tabelle 3.8) sowie Power Script Polymerase verwendet.

**PCR- Ansatz:**

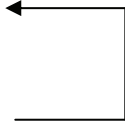
- 50 ng DNA Matrize
- 5 µl 10 x OPTI-Performance Puffer
- 5 µl 2 mM dNTP Mix
- 10 µl 5 x Enhancer Opti Zyme
- 1,5µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µl 100 µM Vorwärtsprimer
- 0,5 µl 100 µM Rückwärtsprimer
- 0,25 µl Powerscript Polymerase (1U/µl)

---

Ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR begann mit einem 2-minütigem Denaturierungsschritt bei 95°C. Anschließend erfolgten 35 Standardzyklen. Dabei wurde die DNA bei 95°C für 30 s denaturiert, spezifische Oligonukleotide wurden bei 55°C für 30 s hybridisiert und die Strangsynthese fand bei dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase statt (72°C / 90 s). Zum Schluß erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 72°C.

**PCR-Zyklus:**

- |        |       |   |
|--------|-------|---|
| ▪ 95°C | 2 min |   |
| ▪ 95°C | 30 s  |  |
| ▪ 55°C | 30 s  |   |
| ▪ 72°C | 90 s  |   |
| ▪ 72°C | 5 min |   |
- x 35 Zyklen

Nach dem PCR-Lauf wurden 5 µl PCR-Ansatz auf ein 1,5 %iges Agarosegel zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA aufgetragen. Die separierte DNA konnte mittels Ethidiumbromid visualisiert werden. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, wodurch diese durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 366 nm detektiert werden kann. Durch Vergleich mit einem parallel separierten DNA-Marker (Invitrogen) mit definierten Fragmentgrößen ist eine Bestimmung der Bandengröße möglich. Anschließend wurden die DNA aus den mit einem sterilen Skalpell ausgeschnittenen PCR Fragmente mittels „QIAquick PCR Extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben eluiert.

### 3.2.3.2. Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen und Ligation

Die nach 3.2.3.1 hergestellten PCR-Produkte und der Expressionvektor pGEX-2T wurden mit BamHI- und EcoRI-Restriktionsenzymen (New England BioLabs, Frankfurt/M) geschnitten, bei 37 °C für 1 h inkubiert und die DNA wiederum mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) eluiert. Zur Verknüpfung von DNA und Vektor-DNA über die Schnittstellen BamHI und EcoRI wurde das Enzym T4-Ligase eingesetzt. Die T4-Ligase katalysiert dabei Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten freien 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxylgruppen von linearer, doppelsträngiger DNA.

In einem 20 µl Ligationsansatz wurden 300 ng PCR-Produkt mit 100 ng geschnittenem, aufgereinigtem Vektor, 2 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase zusammen mit aqua bidest. vermischt. Als Kontrolle diente ein Ligationsansatz mit Vektor ohne PCR-Produkt, um eine Religation des Vektors ausschließen zu können, bzw. den Vektorhintergrund zu verdeutlichen. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Ligationsansätze in Bakterien transformiert (siehe 3.2.3.5), die DNA mittels Mini-Präparation (siehe 3.2.3.6) aus den Bakterien isoliert und in einem Kontroll-Restriktionsverdau mit den oben erwähnten Restriktionsenzymen geschnitten, um zu überprüfen, dass die Vektoren die korrekten PCR-Produkte in der richtigen Orientierung tragen.

### 3.2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA nach den entsprechenden Größen wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Agarose ist ein lineares Polysaccharid, das durch Erhitzen in Pufferlösung eine homogene Gelmatrix bildet. Im elektrischen Feld wandern die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Durch die unterschiedlichen Größen der DNA-Fragmente wurden verschiedene Agarosekonzentrationen zwischen 0,7-1 % verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde dazu in 1 x TAE-Puffer (angesetzt aus einer 50 x TAE-Puffer-Stammlösung) gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Zu 20 µl Probe wurde jeweils 4 µl 6-fach Auftragsladepuffer hinzugefügt. Als Größenmarker diente eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter. Die Gelelektrophorese wurde anschließend in horizontalen Elektrophoresekammern in TAE-Laufpuffer bei 100 V für 60 min durchgeführt.

### **50 x TAE-Puffer-Stocklösung**

2 M Tris-Base

100 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt

### **6x Auftragsladepuffer**

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

12,5% Ficoll Typ 400

### **3.2.3.4. DNA Isolation aus dem Agarosegel**

Um nach einem Restriktionsverdau das gewünschte DNA-Fragment aufzureinigen, wurde der gesamte Restriktionsansatz auf einem, je nach Bedarf, 0,7-1,5 %igem Agarosegel aufgetragen und bei einer niedrigen Spannung von 100 V 1-1,5 Stunden aufgetrennt. Die Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### **3.2.3.5. Transformation in kompetente Bakterien**

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen. Dazu wurden 5 µl der jeweiligen Ligationsansätze in 50 µl kompetente *E. coli* (u.a. die Stämme BL21, TOP 10, NEB Turbo) pipettiert und 30 min lang auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 42 s bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurde für 2 min auf Eis abgekühlt und 250 µl SOC-Medium zugegeben. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 200 rpm 1 h lang bei 37°C im Brutschrank angereichert. Danach wurden 100-250 µl des Transformationsansatz auf eine LB-Agar-Platte ausplattiert. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden den LB-Agarplatten Ampicillin (200 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Nach 16 h Inkubationszeit wurden die gewachsenen Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Kulturmedium mit entsprechendem Antibiotika bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Die Plasmid-

DNA wurde daraufhin aus den Bakterienkulturen isoliert (siehe 3.2.3.6 / 3.2.3.7).

### **3.2.3.6. Mini-Plasmid DNA Präparation mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde im kleinen Maßstab zur Gewinnung geringerer Mengen DNA die CTAB-Miniplasmidpräparation verwendet. Dabei wurden 2 ml LB-Kulturmedium mit Antibiotikum mit einer Einzelkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad bei 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien im Reaktionsgefäß 30 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Danach wurden 10 µl einer 20 mg/ml Lysozym-Lösung hinzugefügt, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden schließlich für 45 s bei 95°C aufgeköcht und für 10 min bei 20000xg abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Pellets mit einem sterilen Zahnstocher, wurden 10 µl CTAB-Lösung hinzugegeben, gevortext und für 5 min abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, wurde das Pellet in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung aufgenommen, kurz auf 60-70°C erwärmt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 750 µl 100 % Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das luftgetrocknete Pellet in 25 µl TE-Puffer gelöst.

Zur Überprüfung der isolierten Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsverdau mit spezifischen Enzymen durchgeführt und auf einem Agarosegel visualisiert.

#### **STET-Puffer**

8% Sucrose

0,1% Triton-X-100

50 mM EDTA

50 mM Tris-Cl pH 8,0

#### **CTAB-Lösung**

5% CTAB in 0,5 mM NaCl



### 3.2.3.7. Midi-Plasmid DNA-Präparation mit Vakuum-Elution

Nach einem Kontrollrestriktionsverdau (siehe Kapitel 3.2.3.2) wurden die positiv befundenen Klone angereichert. Die Midi-Plasmid-Präparation erfolgte dazu nach dem Herstellerprotokoll des „PureYield Midi Kits“ von Promega (Mannheim). Entweder wurden entsprechende Klone gepickt und in antibiotikahaltigem LB-Medium überführt oder 50 µl Transformationsansatz direkt in 50 ml Kulturmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 10 min bei 2000xg zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Zell-Resuspensionslösung resuspendiert. Nach weiterer Zugabe von 3 ml Lyselösung wurde nach Invertierung des Röhrchens und 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Lösung viskos und aufgeklart. Die Zugabe von 5 ml Neutralisationslösung ergab durch Mischen ein weißes flockiges Präzipitat, das 15 min bei 10000xg zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in blaue „Clearing“ Säulen gefüllt, die zuvor auf weiße „Binding“ Säulen (beide „PureYield Midi Kit“) und zusammen auf eine Vakuumstation gesteckt wurden. Durch das angelegte Vakuum wurde das Lysat vollständig durch beide verbundene Säulen gesaugt. Anschließend wurde nach vorsichtigem Ablassen des Vakuums die blaue „Clearing“ Säule abgezogen und verworfen. Nach Zugabe von 5 ml Endotoxin Removal Wash Lösung in die weißen „Binding“ Säulen wurde erneut Vakuum angelegt. Danach wurde zweimal mit 20 ml Column Wash Solution gewaschen. Nachdem die Lösungen durch den Filter hindurchgesaugt wurden, wurde die Membran unter angelegtem Vakuum 1 min getrocknet. Zum Eluieren der Plasmid-DNA wurde 600 µl nuklease-freies Wasser auf die Membran pipettiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und solange Vakuum angelegt, bis die gesamte Flüssigkeitsmenge abgesaugt wurde.

#### **Resuspensionslösung**

100 µg/ml RNase A

50 mM Tris-Cl, pH 7,5

10 mM EDTA

#### **Lyselösung**

0,2 M NaOH

1 % SDS

**Neutralisationslösung**

4,09 M Guanidine-hydrochloride, pH 4,8

759 mM Kaliumacetat

2,112 M Essigsäure

**Column Wash Solution**

60 mM Kaliumacetat

8,3 mM Tris-HCl, pH 7,5

0,04 mM EDTA

60 % Ethanol

**3.2.3.8. Cyclesequencing / DNA-Sequenzierung**

Zur Bestimmung der richtigen Sequenz für die durch Minipräparationen isolierte DNA wurde im Vorfeld das sogenannte „Cyclesequencing“ mittels Thermosequenase-Kit durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA diente dabei als Matrize für die Polymerisation eines fluoreszenzmarkierten komplementären Stranges.

Die Sequenzierung aller verwendeter Konstrukte erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977). Alle verwendeten Sequenzier-Primer sind mit Infrarotfluoreszenzfarbstoff (IRD800) markiert und sind im Folgenden aufgelistet:

**Tabelle 3.9: Zur Sequenzierung verwendete Primer**

|          |  |                      |
|----------|--|----------------------|
| IR-CAR F | Forward sequencing primer<br>human CAR         | GCACAGCAAACACCTGTGCA |
| IR-CAR R | Reverse sequencing primer<br>human CAR         | AAGAGGCCCGCAGAGGAAGT |
| IR-M13 F | Forward sequencing primer<br>pGEM, pbluescript | GTTGTAAAACGACGGCCAGT |
| IR-M13 R | Reverse sequencing primer<br>pGEM, pbluescript | AGGAAACAGCTATGACCATG |

Die darauffolgenden Arbeiten wurden alle auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden zusammenpipettiert:

150 pmol DNA (100 ng/kb)

3,8 % DMSO

2 pmol IRD-labeled Primer

Ad 26 µl PCR-H<sub>2</sub>O

In eine 96-Well-Platte wurden je Base 2 µl Terminationsmixturen (A C G T) pipettiert und mit jeweils 6 µl DNA-Primer-Mix vermischt. Die Mischung wurde abschließend mit je 2 Tropfen Rotwachs bedeckt.

Das Protokoll setzte sich folgendermaßen zusammen:

- |         |       |                  |
|---------|-------|------------------|
| • 95 °C | 2 min |                  |
| • 95 °C | 15 s  | ←<br>x 30 Zyklen |
| • 61 °C | 15 s  |                  |
| • 70 °C | 15 s  |                  |
| • 25 °C | 5 min |                  |

Nach Beendigung des Laufes wurden 8 µl Stopplösung (Thermosequenzase-Kit) hinzugegeben. Bis zur DNA-Sequenzierung wurde der Ansatz bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **DNA-Sequenzierung:**

Die Reaktionsprodukte wurden in einem speziellen Sequenziergel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem DNA Analyzer gemäß den Herstellerangaben.

## **3.2.4. RNA (Ribonukleinsäuren)**

### **3.2.4.1. RNA-Isolation**

Zur Isolation der RNA aus transfizierten Zellen wurde das „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen verwendet. Nach der Zelllyse wurde das Lysat gemäß den Herstellerangaben auf eine QIAshredder-säule pipettiert und 2 min bei 10000xg zentrifugiert. Danach wurden 600 µl von

70 %igem Ethanol zugegeben und mit der Pipette vermischt. Anschließend wurde die Probe auf eine RNeasy mini Spin-Säule aufgetragen und 1 min bei 10000xg zentrifugiert. Danach wurde 350 µl RW1-Puffer auf die Spin-Säule pipettiert und mittels Zentrifugation bei 10000xg durch die Säule eluiert. Nun wurden pro Ansatz 10 µl DNase I Stocklösung zusammen mit 70 µl RDD-Puffer (beides aus „RNase Free DNase Set“, Qiagen) vorsichtig gemischt und direkt auf die Spin-Säulenmembran pipettiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säulen aufgetragen und 1 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Danach wurden zweimal 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und jeweils 1 min bei 10000xg zentrifugiert. Anschließend wurde 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran der Spin-Säule pipettiert, 10 min inkubiert und nach 1 min Zentrifugation eluiert. Der letzte Schritt wurde nochmals wiederholt mit 5 min Inkubation. Danach wurde die RNA-Konzentration mit dem Nano-Drop Spektrometer bestimmt und die Qualität der RNA durch ein Agarosegel (siehe Kapitel 3.2.4.2) ermittelt.

#### **3.2.4.2. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von RNA**

Um eine Kontamination mit RNasen zu verhindern, wurden zuvor Gelträger und Elektrophoresekammer mit einer 20 %igen SDS-Lösung gewaschen und danach mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser abgespült. Alle Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und nur Chemikalien verwendet, die ausschließlich für die Arbeit mit RNA bereitstehen.

Zum Gießen des Geles wurden dabei 1 % Agarose in 1x MOPS-Puffer, pH 7,0 aufgekocht, nach Abkühlen auf 60°C im Wasserbad anschließend Formaldehyd zu 0,365 M Endkonzentration zugegeben und je nach Größe des Geles mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Währenddessen wurden 0,1-0,2 µg RNA mit RNA-sample-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 16 µl aufgefüllt und 0,8 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/µl) zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 60°C wurden die Probe mit 4 µl RNA-Farbmarker vermennt und danach auf das Agarosegel geladen. Die RNA wurde in 1 x MOPS-Puffer für 45 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert.

**1 x MOPS-Puffer pH 7,0/DEPC**

20 mM MOPS pH 7,0  
1 mM EDTA  
5 mM Natrium-Acetat

**RNA-sample-Puffer**

50 % deionisiertes Formamid  
1 x MOPS-Puffer pH 7,0/DT  
2,2 M Formaldehyd

**Ethidiumbromid**

0,5 µg/µl in H<sub>2</sub>O/DT

**RNA-Farbmarker**

10 % Ficoll  
0,1 % Bromphenolblau

**3.2.4.3. Reverse Transkription der RNA**

Das Umschreiben der RNA in cDNA (complementary; oder komplementären DNA) erfolgte mit dem „Multiscribe Reverse Transkriptase Kit“ (Applied Biosystems). MultiScribe™ Reverse Transkriptase (aus murinem Leukämievirus) ist eine rekombinante RNA-abhängige DNA-Polymerase, die, in Anwesenheit eines Primers, einzelsträngige RNA als Template verwendet, um einen (cDNA) Strang zu synthetisieren. Nach Angaben des Herstellers wurde pro RNA-Ansatz folgender RT-Reaktionsmix zusammengemischt:

5 µl 10x Taqman RT-Puffer  
11 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 µl 2,5 mM dNTP Mix  
2,5 µl 50 µM Random Hexamere  
1 µl RNase Inhibitor  
1,25 µl Multi Scribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)

Von der RNA wurden 1 µg (in einem Volumen von 19,25 µl) für die cDNA-Synthese verwendet und 30,75 µl des RT-Reaktionsmixes zugegeben. Danach erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 48 °C im Wasserbad für 1 h inkubiert. Die Inaktivierung der Synthese erfolgte 5 min im Heizblock bei 95 °C. Schließlich wurde für eine 1:4-Verdünnung 150 µl einer 10 mM Tris-HCl Lösung hinzugegeben, um eine finale Konzentration der cDNA von 5 ng/µl zu erhalten.

#### **3.2.4.4. Quantitative PCR mit dem TaqMan System**

Die quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die qRT-PCR stellt eine anerkannte und zuverlässige Methode dar, um gering abundante Genexpression zu quantifizieren (Pfaffl, 2001). Die Vorteile liegen in der hohen Sensitivität sowie ihrem großen dynamischen Bereich (Wilhelm und Pingoud, 2003). Die qRT-PCR wurde 1993 entwickelt und beruht auf Messung der DNA-Amplifikation über einen Fluoreszenzanstieg, welcher proportional zur PCR-Produktmenge ist (Heid et al., 1996; Higuchi et al., 1993). Diese Methode basiert auf der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase, die eine doppelt markierte Sonde spaltet. Diese Sonde ist mit einem Fluorophor am 5'-Ende und einem nicht-fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende markiert. Nach Sondenspaltung durch die Taq-Polymerase, verschiebt sich der Quencher von dem Fluorophor und es kommt nach Anregung durch die Lichtquelle des Cyclers zur Fluoreszenz. Das resultierende Signal erlaubt die quantitative Messung des angereicherten Amplifikationsprodukts während der exponentiellen Phase der PCR. Über eine Kalibrierkurve war eine absolute Quantifizierung möglich. Diese Kalibrierkurve wurde durch serielle Verdünnungen des linearisierten Plasmids mit der cDNA des untersuchten Gens erstellt. Mit einem spezifischen TaqMan-Gen-Expressionsassay für BAF 155 und Cytochrom CYP2B6 wurde die Regulation der Zielgene untersucht. Das Expressionslevel des untersuchten Gens wird danach auf die Expression eines sog. Haushaltsgens normiert. Haushaltsgene sind Gene, die idealerweise im untersuchten Gewebe oder in Zelllinien konstant exprimiert werden. Häufig verwendete Gene sind z.B. β-Actin, Cyclophilin, PBGD (Porphobilinogendeaminase) oder 18S-rRNA. In dieser Arbeit wurde 18S-rRNA verwendet. Eine Normierung hat den Vorteil, dass z.B. verschiedene reverse Transkriptions-Ansätze mit

möglicherweise unterschiedlichen Effizienzen direkt miteinander verglichen werden und Pipettierfehler bei der Dosierung der DNA ausgeglichen werden können. Die verwendeten Oligonukleotide für die qRT-PCR sind in Tabelle 3.10 aufgelistet.

**Tabelle 3.10: Oligonukleotide für die quantitative real-time (qRT)-PCR.**

Die verwendeten Vorwärts (For)- und Rückwärts (Rev)- Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert und in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (in TE-Puffer) gelöst.

| Gen                             | Oligonukleotide  | Sequenz 5' - 3'                  | Farbstoff-<br>markierung<br>Probe | Konzentrationen<br>im Assay |
|---------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 18S                             | For Primer   | ACCGCAGCTAGGAATAA<br>TGGA        |                                   | 400 nM                      |
|                                 | Rev Primer   | GCCTCAGTTCGGAAAAC<br>CA          |                                   | 400 nM                      |
|                                 | Sonde  | ACCGCGGTTCTATTT                  | 5'VIC/3'<br>MGB/NF<br>Q           | 200 nM                      |
| CYP2B6<br>(Burk et<br>al, 2005) | For Primer   | GCTGAACTTGTTCTACC<br>AGACTTTTTC  |                                   | 400 nM                      |
|                                 | Rev Primer   | GAAAGTATTTCAAGAAG<br>CCAGAGAAGAG |                                   | 400 nM                      |
|                                 | Sonde  | TGTATTCGGCCAGCTGT                | 5'FAM/<br>3'MGB/<br>NFQ           | 200 nM                      |
| BAF 155                         | PDAR<br>(Pre-Developed<br>Assay Reagents)<br>System (20 x) | nicht angegeben                  |                                   | 1x                          |

Das Reaktionsgemisch für einen 25  $\mu\text{l}$  Ansatz zur Bestimmung der mRNA-Konzentrationen mittels Taqman-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

5  $\mu\text{l}$  cDNA-Probe (25 pg für 18S rRNA, sonst 25 ng)

12,5  $\mu\text{l}$  Mastermix

0,1  $\mu\text{l}$  Vorwärtsprimer (bei Konzentration des Primersstocks von 100  $\mu\text{M}$ )

0,1  $\mu\text{l}$  Rückwärtsprimer (bei Konzentration des Primersstocks von 100  $\mu\text{M}$ )

0,5  $\mu\text{l}$  Probe (finale Konzentration 10  $\mu\text{M}$ )

6,8  $\mu\text{l}$  Aqua dest.

Die Reaktion für jede cDNA-Probe wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt, um eine höhere Genauigkeit der Ergebnisse zu erreichen, Pipettierfehler zu erkennen und die Fehlerrate zu minimieren.

### **3.2.5. Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.5.1. Präparation von Gesamtzellen-Proteinextrakten**

Zur Herstellung von Gesamtzellen-Proteinextrakten aus Kulturzellen wurden konfluent gewachsene Zellen mit 1 ml 4°C kaltem PBS gewaschen und mittels eines Gummischabers von der Zellplatte gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2000xg bei 4°C für 3 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspension im Lysepuffer. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 40000xg bei 4°C für 5 min zentrifugiert und der klare Überstand (Proteinlysate) abgenommen.

##### **Lysepuffer**

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

400 mM NaCl

1 mM EDTA

0,5 % Nonidet P-40

+ Proteaseinhibitoren 1:100

#### **3.2.5.2 . SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli**

Eine Variante der Gelelektrophorese ist die SDS (*sodium dodecylsulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970). Diese Methode wird verwendet, um Proteine und Proteinkomplexe zu trennen, um ihr Molekulargewicht zu bestimmen, oder deren Reinheit zu überprüfen. Ein auf Acrylamid/ BIS-Acrylamid basierendes Gel diente hierzu als Trennmedium. Die Gelmatrix wirkt dabei aufgrund ihrer Porenstruktur wie ein Molekularsieb, d.h. kleinere Moleküle wandern schneller durch die Gelporen als größere Moleküle.



**Tabelle 3.11: Zusammensetzung des Sammelgels.**

| <b>Sammelgel 4%</b>                                      | Für 5 ml Volumen |
|--|------------------|
| Acrylamid Stammlösung:<br>40% (w/v) Acrylamid : BIS 29:1 | 0,675 ml         |
| H <sub>2</sub> O dest.                                   | 3,05 ml          |
| 4x Sammelgelpuffer :<br>0,5 M Tris, pH 6,8 (mit HCl)     | 1,25 ml          |
| 10% APS  | 50 µl            |
| 10 % SDS   | 50 µl            |
| TEMED  | 5 µl             |

Die verwendeten Ansätze sind für zwei Biorad Mini-Protean Gele ausgelegt.

**Tabelle 3.12: Zusammensetzung des Trenngels.**

| <b>Trenngel (10 ml)</b>                                  | 7,5 %  | 10 %    | 12 %    | 14 %    |
|--|--------|---------|---------|---------|
| Acrylamid Stammlösung:<br>40% (w/v) Acrylamid : BIS 29:1 | 2,5 ml | 3,32 ml | 3,98 ml | 4,68 ml |
| H <sub>2</sub> O dest.                                   | 4,8 ml | 3,98 ml | 3,32 ml | 2,44 ml |
| 4x Trenngelpuffer :<br>1,5 M Tris, pH 8,8 (mit HCl),     | 2,5 ml | 2,5 ml  | 2,5 ml  | 2,5 ml  |
| 10% APS  | 100 µl | 100 µl  | 100 µl  | 100 µl  |
| 10 % SDS   | 100 µl | 100 µl  | 100 µl  | 100 µl  |
| TEMED  | 10 µl  | 10 µl   | 10 µl   | 10 µl   |

Die verwendeten Ansätze sind für zwei Biorad Mini-Protean Gel ausgelegt.

Zum Gießen der Gele wurden 8 cm x 10 cm große Glasplatten der Firma BioRad verwendet und je nach Probenvolumen wurden Gele von 0,75 mm, 1 mm oder 1,5 mm Dicke angefertigt. Zunächst wurde die Trenngel-Lösung hergestellt und in eine vertikale Gießvorrichtung (Biorad, München) gegossen. Der Acrylamidgehalt des Trenngels (Tabelle 3.12) und damit die Porengröße richtete sich nach dem Molekulargewicht des zu erwartenden Proteins. Das Trenngel wurde mit 70 % Isopropanol überschichtet, welches nach Polymerisierung des Gels wieder entfernt wurde. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel (Tabelle 3.11) gegossen, das durch Einsetzen von Gelkämmen (BioRad) vertiefte Taschen enthielt, die zum Auftragen der Proteinproben dienten. Nach der Polymerisierung wurden die fertigen Gele mittels

Kunststoffkassette nach Herstellerangaben in eine 1x SDS-Elektrophoresepuffer enthaltende Elektrophoresekammer eingebaut. Das anionische Detergenz SDS liegt im Elektrophoresepuffer im Überschuss vor, um mit seiner negativen Ladung die Eigenladung der Proteine zu überdecken. Dabei werden die Proteine in ihrem denaturiertem Zustand fixiert, indem SDS mit ihnen Komplexe mit konstantem Masse- zu Ladungsverhältnis (1,4 g SDS/g Protein) bildet (Rehm, 2002). Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit  $\beta$ -Mercaptoethanol enthaltendem 2 x Laemmli- Puffer versetzt, der die Disulfidbrücken der Proteine reduziert und für 5 min bei 95°C denaturiert, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und das Molekül zu linearisieren. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V bis die Bromphenolblau-Bande das Gel verlassen hatte. Als Referenz zu den Proteinproben wurde ein standardisiertes Markerproteinmischung (PeqGold) ebenfalls im Gel getrennt.

Für die Pulldown-Assays wurden Gradientengele eingesetzt, bei denen im Trenngel die Acrylamidkonzentration kontinuierlich von oben nach unten ansteigt. Gradientengele werden verwendet, um einen weiteren Bereich an Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichte im Gel zu trennen als mittels uniformer Gele möglich ist. Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde das Trenngel zu gleichen Teilen aus einer 7,5 %igen und einer 15 %igen Acrylamidlösung gegossen und mit 70 % Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels und Entfernen des Isopropanols wurde ein 4 %iges Sammelgel gegossen. Der Einbau in die Elektrophoreseapparatur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Gelelektrophorese wurde bei 10 °C durchgeführt und lief 35 min bei 100 V und anschließend drei h bei 400 V.

Die Proteine wurden nach der elektrophoretischen Trennung entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau (CBB)-Lösung bzw. Silberfärbelösung gefärbt (Kapitel 3.2.5.5) oder durch Western Blots (Kapitel 3.2.5.3) analysiert. Für die Silberfärbung wurde der PeqGold MW II Proteinmarker, für den Western Blot der PeqGold-Proteinmarker V prestained verwendet.

#### **Sammelgelpuffer pH 6,8 mit HCl**

0,5 M      Tris  
0,4 %      SDS (w/v)

#### **Trenngelpuffer pH 8,8 mit HCl**

1,5 M      Tris  
0,4 %      SDS (w/v)

**Acrylamid Stammlösung**

40 % Acrylamid: N, N'- Bisacrylamid 29:1 (w/v)

**2x Laemmlipuffer**

8 % SDS (w/v)

120 mM Tris pH6,8

0,01 % Bromphenolblau (w/v)

20 % Glycerin (v/v)

**SDS-PAGE Proteinauftragspuffer, pH 6,8**

8 % SDS (w/v)

120 mM Tris pH6,8

0,01 % Bromphenolblau (w/v)

20 % Glycerin (v/v)

10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)**10x SDS Elektrophoresepuffer**

250 mM Tris

2 M Glycin

0,1 % SDS (w/v)

**3.2.5.3. Western Blot Analyse**

Die Methode nach Towbin *et al.* (1979) wird angewendet, um Proteine aus einem Proteingemisch mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen. Zur Immundetektion wurden die Proteine durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch Elektroblothing (Semi-Dry-Blot-Apparatur, Biomethra) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham) transferiert. Das Gel wurde nach der SDS-PAGE für 10 min zusammen mit der Nitrozellulosemembran, Whatman-Filterpapieren und Fiberpads in Transfer-Blotting-Puffer äquilibriert und nach Angaben des Herstellers als „Blotting-Sandwich“ auf die Semi-Dry-Apparatur gelegt. Der Puffer hat die gleichen Eigenschaften wie der Elektrophoresepuffer und bewirkt, dass die Proteine negativ geladen vorliegen. Das in dem Puffer enthaltene Methanol erleichtert während des Blottens die Diffusion der Proteine aus dem Gel sowie deren

Fixierung auf die Nitrozellulosemembran, welche eine hohe Proteinaffinität besitzt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei großen Gelen für viereinhalb Stunden bei 400 mA, bei kleinen Gelen für eine Viertelstunde bei 200 mA (5 mA/cm<sup>2</sup>). Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran 10 min in Ponceau S-Lösung gefärbt, anschließend mit deionisiertem Wasser entfärbt und die gefärbten Markerbanden gekennzeichnet.

Zur Detektion der transferierten Proteine erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran mit 5 % Magermilch in TBST (Tris-buffered saline mit Tween-20)-Blockingpuffer, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Antikörperverdünnungen in 1 % Magermilch/TBST (Tabelle 3.6) angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran drei Mal für 10 min mit TBS gewaschen, um die restlichen nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Der sekundäre Antikörper wurde in TBS-Blockingpuffer gelöst (Konzentrationen siehe Tabelle 3.7) und 1 Stunde mit der Membran bei RT unter Schütteln inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden so gewählt, so dass sie sich gegen Immunglobuline der Tierspezies, aus welcher der primäre Antikörper stammt, richten. Nach Inkubation wurde der Blot dreimal für 10 min mit TBS gewaschen, um die überschüssigen sekundären Antikörper zu entfernen. Zur Visualisierung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper wurde das Odyssey Imaging System (Licor) verwendet.

#### **Transferblottingpuffer**

20 %      Methanol (v/v)  
25 mM     Tris  
192 mM    Glycin  
20 %      SDS      (w/v)

#### **TBS („Tris-buffered Saline“)**

20 mM     Tris-HCl  
150 mM    NaCl, pH 7,5

#### **TBST**

TBS mit 0,1 % Tween 20

**Ponceaulösung**

|       |                  |
|-------|------------------|
| 0,5 % | Ponceau (w/v)    |
| 1 %   | Essigsäure (v/v) |

**Blockingpuffer**

|        |            |
|--------|------------|
| 20 mM  | Tris-HCl   |
| 150 mM | NaCl       |
| 10 %   | Tween 20   |
| 5 %    | Magermilch |

**3.2.5.4. Entfernen gebundener Antikörper von der Membran („Stripping“)**

Mit Hilfe dieser Methode können bereits mit Primär- und Sekundärantikörpern markierte Proteine auf Membranen wieder von den Antikörpern gereinigt werden. Das „Strippen“ der Membran konnte nur etwa zwei- bis dreimal wiederholt werden, da bei jedem Waschschrift auch ein Teil der transferierten Proteine von der Membran abgewaschen werden und verloren gehen.

Die Membran des Western Blots wurde für viermal 15 min in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 50°C in Strippingpuffer, der die bindenden Antikörper von der Membran entfernte. Die Membran wurde danach sechsmal für je 5 min mit TBST gewaschen. Eine erneute Inkubation mit Antikörpern erfolgte wie unter 3.2.5.3 beschrieben.

**Strippingpuffer**

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| 62,5 mM | Tris pH 6,8             |
| 2 %     | SDS (v/v)               |
| 0,7 %   | β-Mercaptoethanol (v/v) |

**TBST**

|        |                        |
|--------|------------------------|
| 20 mM  | Tris-HCl               |
| 150 mM | NaCl                   |
| 0,1 %  | Tween 20 (v/v), pH 7,5 |

### 3.2.5.5. Färbemethoden

Um die im Gel enthaltenen Proteine nach der elektrophoretischen Trennung nachweisen und quantifizieren zu können, mussten diese sichtbar gemacht werden. Dazu wurden zwei Färbemethoden verwendet.

#### 3.2.5.5.1. Coomassie-Brilliant-Blau (CBB)

Diese Färbemethode nach Meyer und Lamberts (1965) wurde angewendet, um im 0,2 bis 0,4 µg Grenzbereich Proteine in der 0,5 cm breiten Proteinbande (Rehm, 2002) nachzuweisen. Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese zunächst für ca. 30 min in einer Coomassie-Färbelösung bei RT auf dem Schüttler gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit Entfärbelösung entfärbt, um den überschüssigen Farbstoff, der nicht an die Proteine gebunden hat, zu entfernen. Die Proteinfärbung ist reversibel.

##### **Coomassie-Färbelösung**

45 %      Methanol (v/v)  
10 %      Essigsäure (v/v)  
0,125 %    Coomassie Brilliant Blau R-250 (w/v)

##### **Entfärbelösung**

9 %      Ethanol (v/v)  
6 %      Essigsäure (v/v)

##### **Fixierlösung**

45 %      Methanol (v/v)  
1 %      Essigsäure (v/v)

#### 3.2.5.5.2. Silberfärbung

Die Proteinnachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 0,1 ng bis 1 ng bei einer 0,5 cm breiten Proteinbande. Die Silberfärbung ist neben der Coomassie-Färbung das in der Molekularbiologie vorwiegend verwendete Verfahren (Rabilloud, T. et al. 1988) zur Visualisierung von Proteinbanden nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung im

Polyacrylamid-Gel. Diese Färbemethode ist etwa um das 10- bis 100-fache sensitiver als die Coomassie-Färbung, kann aber nur eingeschränkt zur Quantifizierung von Proteinen eingesetzt werden. Silber (Ag) färbt bestimmte Proteine besonders stark an, während andere Proteine wie z.B. Troponin C, Calmodulin oder einige Histone gar nicht gefärbt werden. Die chemische Reaktion, auf der diese Färbemethode basiert, ähnelt der in der Fotografie verwendeten Reaktion.

Nach Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und das Polyacrylamid-Trenngel für mindestens 1 Stunde in Essigsäure/Ethanol-Fixierlösung inkubiert. Danach wurde das Gel mit 50 % Ethanol für 3 x 20 min gewaschen für exakt 1 min mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung behandelt. Anschließend wurde das Gel 3 x 20 s mit destilliertem Millipore-Wasser gewaschen und für weitere 20 min mit Silbernitratlösung inkubiert. Dann wurde das Gel nochmals 2 x 20 s mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Entwicklerlösung geschwenkt, bis Proteinbanden zu erkennen waren. Dabei binden die  $\text{Ag}^+$ -Ionen (nichtstöchiometrisch) an Proteine und werden dann mit alkalischem Formaldehyd zu elementarem Ag reduziert. Die Silberionen fallen aus, was die Proteine im Gel braun färbt. Zum Stoppen dieser Reaktion wurde das Gel mit Stopplösung benetzt und zur weiteren Lagerung in 50 %igem Methanol aufbewahrt.

#### **Fixierlösung**

100 ml Methanol

24 ml Essigsäure

100  $\mu\text{l}$  37 %iges Formaldehyd

#### **Silbernitratlösung**

400 mg  $\text{AgNO}_3$

150  $\mu\text{l}$  Formaldehyd 37 %

#### **Entwicklerlösung**

12 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

100  $\mu\text{l}$  Formaldehyd 37 %

0,8 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

#### **$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung**

200 mg/l in  $\text{H}_2\text{O}$

**Stopplösung**

100 ml Methanol 50 %

24 ml Essigsäure 12 %

**3.2.5.6. Expression von GST-Fusionsproteinen**

Zur Untersuchung von Proteininteraktionen wurden Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine eingesetzt (Smith and Johnson, 1988). Dabei wurde die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des humanen „constitutive androstane receptor“ (CAR) derart in einen bakteriellen GST-Expressionsvektor ligiert, das ein GST-CAR-LBD-Fusionsprotein exprimiert wird. Als Expressionssystem dienten kompetente proteasedefiziente *E. coli* Bakterien vom Stamm BL21(DE3) pLys.

Für die Expression wurden 5 ml LB (Luria-Bertani)-Ampicillin-Flüssigmedium (100 µg/ml Ampicillin) mit Bakterien, welche mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden (bei -80°C gelagerte Glycerinkultur) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml SOC-Medium (Hanahan, 1983) mit 1,5 ml der Vorkultur versetzt und die Bakterien bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,7 bis 0,8 bei 600 nm angezogen. Nicht beimpftes SOC-Ampicillin-Medium diente dabei als Referenz. Nach Erreichen der genannten OD wurde die Expression durch Zugabe einer 1 M IPTG-Lösung induziert. Die Expression des Proteins erfolgte über Nacht bei 16°C. Zur Präparation des bakteriellen Proteinlysats wurde anschließend die Kultur 15 min bei 4°C und 2000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5 ml Lysispuffer zusammen mit den Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Mix, 1:100) vorsichtig resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch einmaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei Raumtemperatur. Zur Herabsetzung der Viskosität wurde für 5 x 20 s mit einer Intensität von 50 % (Ultraschall-Homogenisator, Bandelin) sonifiziert. Dabei wurde die Probe während der Ultraschallbehandlung auf Eis gehalten. Zur Abtrennung der löslichen Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen, wurde die Suspension in Polycarbonat-Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und für 30 min bei 4°C und 40000xg zentrifugiert. Die sedimentierten unlöslichen Proteinbestandteile wurden verworfen, der Überstand mit einem 0,2 µm Filter (FP 30/0,2 CA-S) sterilfiltriert und bis zur Affinitätsreinigung bei -20°C aufbewahrt. Um zu überprüfen, ob die Proteine exprimiert wurden, wurde 30 µl Probe vor Induktion der Proteinexpression und je 10 µl nach der Expression und Zellaufschluss auf



einem Kontroll-SDS-PAGE aufgetragen und mit CBB visualisiert (siehe Kapitel 3.2.5.5.1)

Zur längeren Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 200  $\mu\text{l}$  steriles Glycerin zu 800  $\mu\text{l}$  Bakterienkultur in Kryo-Röhrchen hinzugegeben wurden.

#### **LB (Luria-Bertani)-Ampicillin-Medium**

1 % Bacto Trypton (w/v)

1 % NaCl (w/v)

0,5 % Hefe (w/v)

100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin

#### **SOB (Super Optimal Broth)-Medium**

2% Trypton (w/v)

0,5% Hefeextrakt (w/v)

10 mM NaCl

#### **SOC /Amp (Expressions-Medium), pH 7,5**

Nach Autoklavieren des SOB- Mediums wurden folgende Komponenten steril hinzugegeben:

10 mM  $\text{MgCl}_2$

10 mM  $\text{MgSO}_4$

20 % Glucose (v/v)

100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin

#### **Lysispuffer**

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

100 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

0,5 % Nonidet P-40

1:100 Halt Protease Inhibitor Cocktail

### 3.2.5.7. Affinitätsreinigung der GST-Fusionsproteine über Glutathion-Sepharose

Das sterilfiltrierte Bakterienlysat, welches die löslichen GST-Fusionsproteine enthielt, wurde über die Glutathion (GSH)-Sepharose-Säule affinitätsgereinigt. Glutathion stellt ein Substrat für GST dar und wird von GST gebunden. Somit können GST-Fusionsproteine über eine Sepharose-Matrix, an die GSH gekoppelt ist, isoliert werden.

Zunächst wurde das Lysat auf die vorbereiteten GSH-Sepharose-Säulen gegeben und für 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Säule 3 min bei 4°C und 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die GSH-Sepharose mit gebundenem Protein mindestens fünfmal mit Extraktionspuffer gewaschen. Hierzu wurde mit 10 ml Extraktionspuffer resuspendiert, 3 min bei 4°C und 500xg zentrifugiert und anschließend die Überstände abgenommen. Mittels Coomassie-Schnelltest wurden die Überstände auf ihren Proteingehalt überprüft. Dazu wurden der Überstand mit gleichem Volumen Coomassie Protein-Assay-Reagenz (Pierce) versetzt. Der Waschvorgang der GSH-Sepharose wurde solange wiederholt, bis der Extraktionspuffer proteinfrei war. Die gewaschene GSH-Sepharose mit gebundenem Fusionsprotein wurde in TBS mit 0,05 % Natriumazid für weitere Analysen bei 4°C gelagert.

Die Reinheit und Proteinmenge des gewonnenen Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Dabei wurden zur Analyse dieser Reinigung Proben des Bakteriensediments nach der Zellyse, des Bakterienlysats vor und nach der Inkubation mit GSH-Sepharose-Säule sowie das Säulenmaterial mit gebundenem affinitätsgereinigtem Fusionsprotein auf einem SDS-Gel getrennt und anschließend die Proteinbanden mit CBB-Färbelösung (siehe Kapitel 3.2.5.5.1) visualisiert.

#### Extraktionspuffer

50mM Tris, pH 7,5

150mM NaCl

dazu Proteaseinhibitoren:

10 µM Leupeptin- Hemisulfat

5 µM Pepstatin A

0,5 mM PMSF

### 3.2.5.8. Pulldown-Assay Methode

Mittels GST-Pulldown-Assay sollten in dieser Arbeit neue mögliche Interaktionspartner von CAR identifiziert werden. Hierbei wurden GST-Fusionsproteine, die nicht-kovalent an die GSH-Sepharosematrix gebunden waren, mit Proteingesamtextrakt inkubiert. Die potenziellen gebundenen Interaktionspartner wurden mittels SDS-PAGE (3.2.5.2) elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden konnten nach anschließender Präparation mittels MALDI („*matrix assisted laser desorption ionisation*“)-Massenspektrometrie (3.2.6) identifiziert werden. Das für den Pulldown-Assay verwendete Gewebe stammte aus Rattenleber bzw. humaner Leber. Dabei wurde das gewonnene Proteingemisch aus gefrorenem Gewebe extrahiert.

Für den Pulldown- Versuch wurden pro GSH-Sepharose-Säule (gekoppelt mit ca. 4 µg GST-Fusionsprotein) jeweils 0,2 g Gewebe in 1 ml Extraktionspuffer 1 zerkleinert und homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 30 min bei 4°C auf dem Kopf-über-Kopf-Schüttler inkubiert. Danach wurde der Proteinextrakt 45 min in der Ultrazentrifuge bei 100.000xg (Festwinkelrotor, TI 70) und 4°C sedimentiert und anschließend auf die GSH-Sepharose-Säulen gleichermaßen verteilt. Die Inkubation erfolgte für 2-3 Stunden bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Säulen 3 min bei 500 x g (Biofuge 22R, Heraeus, Hanau) und 4°C zentrifugiert. Nicht gebundene Proteine wurden mit dem Überstand verworfen. Mit je 10 ml Extraktionspuffer 1 und 2 wurden die Säulen zweimal gewaschen und für 4 min bei 500xg und 4°C zentrifugiert. Danach wurde zweimal 6 ml 1 M Urea auf die Säulen gegeben, um die Proteine, die locker und nicht spezifisch an die GST-Fusionsproteine und die Matrix binden, zu eluieren. Zum Schluß wurden die Säulen 4 min bei 500xg und 4°C zentrifugiert, um die an die GSH-Sepharosematrix gebundenen GST-Fusionsproteine bzw. GST mit den interagierenden Proteinen zu sedimentieren. Zur Lagerung wurde diese in TBS Puffer aufgenommen.

#### Extraktionspuffer 1

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

100 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

0,5 % Nonidet P-40

1:100 Halt Protease Inhibitor Cocktail

**Extraktionsspuffer 2**

20 mM Tris-HCl  
500 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM DTT  
0,5 % Nonidet P-40  
1: 100 Halt Protease Inhibitor Cocktail

**TBS Puffer**

20 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl

Die Proteinproben wurden mit je 45 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

**3.2.5.9. Immunpräzipitation (IP)**

Die Immunpräzipitation (IP) wird dazu verwendet, um mittels eines spezifischen Antikörpers, gebunden an ein festes Substrat, in diesem Fall Agarosekügelchen, ein Antigen z.B. aus Gewebelysat anzureichern. Ein bestimmtes Protein wird hierbei aus einem Proteingemisch präzipitiert.

Für die Immunpräzipitation wurden Gesamtzellen-Proteinextrakte wie unter Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben hergestellt und eingesetzt. Hierfür wurden COS-1-Zellen mit Calciumphosphat transient transfiziert (3.2.1.3) und 48 h nach der Transfektion lysiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C.

Die für die Präzipitation verwendete Protein-A-Sepharose wurde zunächst 3 x mit je 1 ml Proteinlyse-Puffer gewaschen. Dann wurde 200 µl Gesamtzellysat in einem Gesamtvolumen von 500 bis 600 µl verdünnt mit Dilutionspuffer zusammen mit 3 bis 5 µg eines spezifischen Antikörpers unter Schütteln über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 25-50 µl äquilibrierter Protein A/G-plus Agarose zugegeben und für mindestens 2 h auf dem Überkopf-Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Agarosekügelchen bei 4°C und 500xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die an den Proteinanteil der Agarose

gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend fünfmal mit jeweils 1 ml IP-Puffer gewaschen.

Die Agarose mit den Proteinkomplexen wurde anschließend in 40 µl 1 x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C gekocht. Die gebundenen Protein-Immunkomplexe wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Gellauf auf Nitrozellulosemembranen transferiert und durch das Western-Blot Verfahren nachgewiesen.

Zu den Puffern wurden stets Proteaseinhibitoren zugesetzt:

#### **Proteinlysepuffer**

20 mM Tris-HCl, pH 7,5  
400 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0,5 % Nonidet P-40

#### **Dilutionspuffer**

20 mM Tris-HCl, pH 7,5  
1 mM EDTA  
0,5 % Nonidet P-40

#### **IP-Puffer**

20 mM Tris-HCl, pH 7,5  
200 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0,5 % Nonidet P-40

### **3.2.5.10. [35S]-Methionin-Markierung *in vitro* Transkription/Translation (Promega)**

Für die Untersuchung von *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen wurde das „TNT Quick Coupled Transcription/ Translation System“ von Promega verwendet. Der *in vitro* „SP6/T7-Transcription/Translation Kit“ transkribiert DNA-Sequenzen, die vom SP6 oder T7 Promotor stromabwärts kloniert sind, in gecappte RNA. Hierbei wird als Template linearisierte oder

supercoiled Plasmid-DNA verwendet. Transkribierte RNA wird in einer gekoppelten Reaktion im Retikulozyten-Lysat (TNT Quick Master Mix) in mit [35S]-Methionin markierte Proteine translatiert, um Interaktionen mit bestimmten Proteinpartnern zu detektieren, die zuvor als GST-markierte Fusionsproteine exprimiert und affinitätsgereinigt wurden. Die [35S]-Methionin markierten Proteine können mittels gekoppelten *in vitro* Reaktionen entweder als Vollängen cDNA oder Deletionsmutanten synthetisiert werden.

Um ein funktionelles und detektierbares Protein zu erhalten, wurde die entsprechende Plasmid-DNA, wie nachfolgend angegeben, mit [35S]-Methionin, dem TNT Master Mix und nuklease-freiem Wasser versetzt:

- 40 µl TNT Quick Master Mix (Kaninchen-Reticulocytenlysat)
- 4 µl [35S]-Methionin (> 1000 Ci/ mmol zu 10 µCi/ µl)
- 2 µl Plasmid-DNA template (0,5 µg/ µl)
- 4 µl Nuklease-freies Wasser

Anschließend wurde der Reaktionsansatz im Wasserbad bei 30°C für 90 min inkubiert. Danach wurden 2 µl vom Ansatz entnommen, mit 98 µl 1x Lämmli-puffer versehen und 5 min bei 95°C denaturiert. 10 µl der denaturierten Proteine wurden in einem 10 % Polyacrylamid-Gel mittels Elektrophorese (120 V in Laufpuffer) aufgetrennt. Nach 2-stündigem Trocknen des Gels unter Vakuum bei 80°C (BioRad Gel Trockner) wurden die Banden schließlich mittels Autoradiografie auf einem Röntgenfilm abgebildet.

### **3.2.5.11. *In vitro* GST-Pulldown-Assay mit [35S]-Methionin markierten Proteinen**

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* wurden GST-Pulldown-Assays mit [35S]-markiertem Protein und affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteinen durchgeführt.

Dabei wurden 150 µl an Glutathion-Sepharose gebundene GST-Fusionsproteine mit 10 µl [35S]-Methionin markierten TNT-Proteinen in 500 µl NETN-Puffer + 0,5 % Magermilchpulver vermischt und für 4 h im Schüttler inkubiert. Danach wurde die Sepharosematrix für 2 min bei 500xg und 4°C abzentrifugiert und mit je 1 ml NETN-Puffer dreimal gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Sepharosematrix mit 35 µl 1x

Lämmli-puffer aufgenommen und bis zur Elektrophorese bei – 80 °C gelagert.

Zur Separation der interagierenden Proteine wurden für die Elektrophorese anschließend 30 µl der bei 95°C aufgekochten Proben auf einem 10 %igem SDS-PAGE Gel aufgetragen. Als Input-Kontrolle wurden 10 µl der entsprechenden 1:50-verdünnten [35S]-Methionin Markierungsreaktionen auf dem gleichen Gel aufgetrennt. Zur Detektion der [35S]-markierten Proteine wurde die Autoradiographie eingesetzt. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Proteingel 15 min mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt, 45 min mittels Entfärbelösung entfärbt und danach 5 min gewässert. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 0,5 M Natrium-Salicylatlösung. Das Gel wurde daraufhin auf Whatmanpapier überführt, bei 80°C ca. 2 h auf dem Vakuumtrockner (BioRad) getrocknet und über Nacht mit einer Image Plate exponiert. Mit dem BAS Reader konnte die Intensität der Strahlung der [35S]-markierten Proteine auf der Platte visualisiert werden.

#### **NETN-Puffer**

|        |                 |
|--------|-----------------|
| 20 mM  | Tris-HCl pH 8,0 |
| 100 mM | NaCl            |
| 1 mM   | EDTA            |
| 1 mM   | DTT             |
| 0,5 %  | Nonidet P-40    |

### **3.2.6. Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung (MALDI)**

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Methode zur Untersuchung des Masse-/ Ladungsverhältnisses von Ionen in der Gasphase. Zur Ionisierung der Analyt-Moleküle stehen dabei mehrere Verfahren zur Verfügung. Besonders die Untersuchung thermisch labiler Moleküle erfordert schonende Ionisierungsverfahren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die in den 80er Jahren (Karas et al., 1985; Karas und Hillenkamp, 1988) entwickelte Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung (Matrix Assisted Laserdesorption/Ionisation, MALDI) zur Protein-Identifikation verwendet.

### 3.2.6.1. Vorbereitung der ausgeschnittenen Proteinbanden

Zunächst wurden die aus dem Pulldown-Assay gewonnenen und mittels SDS-PAGE aufgetrennten, Silber-gefärbten Proteinproben mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Bandenteilstücke wurden im Reaktionsgefäß für 10 min in 15 µl Lösung A gewaschen. Danach wurde die Lösung abgenommen und 10 min mit 15 µl Lösung B dehydriert. Dieser Waschriff wurde zweimal wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes inkubierten die Gelstücke mit 50 µl Reduktionspuffer für 30 min bei 56°C im Heizblock. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Reduktionspuffer wieder abgenommen und die Gelstücke mit 50 µl Alkylierungspuffer für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, um Thiolgruppen zu alkylieren. Nach dem Abzentrifugieren wurde auch dieser Puffer entfernt. Die Gelstücke wurden nun alternierend jeweils mit 15 µl Lösung A und Lösung B für 10 min gewaschen. Der Waschkvorgang wurde dabei zweimal wiederholt, anschließend die Lösung abgenommen und enthaltene Restlösung schließlich in der Evaporationszentrifuge unter Vakuum bis zur völligen Trockenheit eingedampft. Die Gelstücke wurden bis zum Trypsinverdau bei - 80°C gelagert.

Alle Lösungen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt:

#### **Lösung A**

50mM Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )

#### **Lösung B**

50% 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (v/v)

50% Acetonitril (v/v)

#### **Reduktionspuffer**

10 mM Dithiothreitol

50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

#### **Alkylierungspuffer**

55 mM Iodacetamid

50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$



### 3.2.6.2. Verdau mit Trypsin

Vor der Analyse mittels MALDI-MS wurden die Proteine in den getrockneten Gelstücken mit der Endoprotease Trypsin zu Peptiden verdaut. Das zu den Serinproteasen gehörende Enzym katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen carboxyterminal vor Arginin (R) und Lysin (K). Dazu wurde das Trypsin (Promega, V5111) mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  versetzt und je nach Größe des Gelstückes bis zu 5  $\mu\text{l}$  auf die getrockneten Gelstücke gegeben. Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht.

#### Trypsinlösung

1600  $\mu\text{l}$  50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$   
0,6% Trypsin Porcine (w/v; Promega, Mannheim)

### 3.2.6.3. Applikation auf dem Probenträger (Target)

Die Proben wurden nach dem Trypsin-Verdau kurz anzentrifugiert, um kondensierte Trypsinlösung an der Reaktionsgefäßwand zu konzentrieren und abzunehmen. Nach Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  0,1 % TFA inkubierten die Gelstücke für 45 min bei RT. Dabei wurden die Peptide aus dem Gel extrahiert. Mit Hilfe von ZipTip-Pipettenspitzen (Perfect Pure C-18, Eppendorf, Hamburg) wurden die Proben von Salzen gereinigt und konzentriert. Das C18-Chromatographiematerial wurde zunächst mit 10  $\mu\text{l}$  Acetonitril reaktiviert und zweimal mit 0,1 % TFA gewaschen. Schließlich wurden die mit TFA extrahierten Peptide durch zwanzigfaches Auf- und Abpipettieren an die Chromatographiesäule gebunden. Verunreinigungen wurden mit 10  $\mu\text{l}$  0,1 % TFA von den Säulen gewaschen. Anschließend wurde die Matrixlösung bis kurz über die Säule aufgezogen. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure in 50 % Acetonitril und 0,05 % TFA. Durch Acetonitril wurden die Peptide von der Säule eluiert. In der Matrixlösung gelöst wurden sie direkt auf den als Probenträger dienenden Stahlträger (MTP 384 target ground steel, Bruker Daltonics, Bremen) appliziert. Zur Kalibrierung wurden in die Mitte von vier umliegenden Proben auf dem Stahlträger Standardpunkte gesetzt. Dazu wurde 0,2  $\mu\text{l}$  Matrixlösung auf das Target vorgelegt und 0,2  $\mu\text{l}$  von der Standardlösung (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics, Bremen) zugegeben. Nach dem Trocknen der Proben und des Standards auf dem

Stahlträger bei RT konnten die Proben mittels MALDI-MS analysiert werden.

#### **3.2.6.4. Messung mit MALDI-MS**

Um die Peptide massenspektrometrisch analysieren zu können, wurden die verdauten Proben an einem Ultraflex Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) mit linearem Flugrohr (time of flight (TOF)-Analysator) und einem Sekundärelektronenvervielfacher als Detektor gemessen. Das Gerät verfügt über einen Stickstoff-Laser, der mit einer Frequenz von 50 Hz bei einer Wellenlänge von 337 nm betrieben wurde (Tanaka et al., 1988).

Der Stahlträger mit den in Matrix kristallisierten Peptiden wurde in die Quellregion des Geräts eingelegt. Über die MALDI-TOF-Steuerungssoftware FlexControl (Version 2.4, Bruker Daltonics, Bremen) konnten die einzelnen Peptid-Matrix-Proben unter dem Laser mit einer Kamera richtig positioniert werden, um den Kristallisationszustand der einzelnen Proben und die genaue Laserposition über dem Probenträger überwachen zu können.

Vor der Messung der Proben wurde das Gerät auf den Peptide Calibration Standard II kalibriert. Dieser Standard enthält ein Gemisch verschiedener Peptide bekannter Massen, nach deren Messung die erhaltenen Summenspektren von der Steuerungssoftware gegen die bekannten Peptidmassen abgeglichen und das Gerät auf diese Weise kalibriert wurde. Solch eine Kalibrierung erfolgte alle vier Messungen, bei denen jeweils ein Standard mittig zwischen jeweils vier zu messenden Proben verwendet wurde, um geringfügige Änderungen in der Beschleunigungsspannung über dem Target auszuschließen.

Die einzelnen Peptid-Matrix-Proben wurden wie der Standard mit einem Laserstrahl bei einer Frequenz von 50 Hz und einer Reflektorspannung von 25 kV beschossen. Dabei wurden von jeder Probe zehn Serien aus je 100 Einzelpulsen aufsummiert. Zur Darstellung der resultierenden Summenspektren wurde die Intensität der einzelnen Peptide auf der Ordinate gegen die Masse pro Ladung auf der Abszisse in einem Diagramm angezeigt (siehe Abb. 4.6). Die ionisierten Peptide besaßen aufgrund ihrer Protonierung alle eine Ladung von +1, so dass sich aus dem  $m/z$ -Verhältnis direkt die Masse der Peptide ergab. Als Messbereich wurden 400 bis 3200 Da gewählt.

### 3.2.6.5. Analyse massenspektrometrischer MALDI-Daten mittels PMF

Die für die Proben erhaltenen Summenspektren wurden mit der FlexAnalysis Software (Version 2.4, Bruker Daltonics) analysiert. Zuerst wurden die Spektren geglättet („baseline subtraction“) und das Hintergrundrauschen abgezogen. Anschließend wurde von der Software mit Hilfe der Peptidpeaks des Spektrums unter Auswahl der verwendeten Endonuklease, hier das Trypsin, eine Massenliste erstellt. Anhand der detektierten Massen erfolgte eine zweite, interne Kalibrierung. Aufgrund der Hypothese, dass das zum Proteinverdau verwendete Trypsin sich teilweise auch selbst verdaut, sollten im Summenmassenspektrum auch charakteristische Peptidpeaks des Trypsins vertreten sein. Da die Masse von Trypsin bekannt ist, konnten diese Peaks herausgerechnet werden.

Die anschließende Proteinidentifikation nach einer MALDI-Messung beruht auf der Methode des Peptidmassen-Fingerabdruckes (Peptide Mass Fingerprint, PMF; Henzel et al., 1989). Wird ein beliebiges Protein mit einem bestimmten Enzym an spezifischen Stellen proteolytisch gespalten bekommt man für dieses verdaute Protein ein charakteristisches Peptidmuster. Aufgrund dieses spezifischen Peptidmusters erhält man einen charakteristischen „Fingerabdruck“ des Proteins. Zur Identifikation des Proteins vergleicht man die Massenliste der Probe in einer Datenbank mit den theoretisch berechneten Massenlisten bekannter Proteine unter Berücksichtigung gleicher enzymatischer Spaltungsbedingungen.

Die Peaks der kalibrierten Massenliste wurden anschließend mit einer weiteren Auswertesoftware von Flex Analysis, der BioTools (Version 3.0, Bruker Daltonics, Bremen) bearbeitet. Die resultierenden Massen, die die Zuordnung der Peptide zu Proteinen mit einem softwareunterstütztem Suchalgorithmus (MASCOT, Matrix Science, London, UK) ermöglichen, wurden unter Datenabgleich der NCBI-Datenbank nach signifikanten Einträgen untersucht. Als Parameter für die PMF-Suchmaske wurde Trypsin als proteolytisches Enzym angegeben, zudem wurde gestattet, dass die Abweichung des Molekulargewichtes von dem Peptid in den Datenbankeinträgen, verglichen mit der analysierten Massenliste der Probe, eine Fehlertoleranz von  $\pm 0,15$  Da aufweisen darf. Des Weiteren wurde festgelegt, dass die Suchmaske Proteinsequenzen mit maximal einer übersehenen Schnittstelle („missed cleavage“) des Trypsinverdaus findet. Als feste Modifikation des tryptischen Verdauprotokolls wurden Carbamidmethylierungen der Cysteinreste („Cystein-Carbamidmethylation“) angegeben, als variable Modifikation die Oxidation der

Methioninreste („Methionin-Oxidation“). Die Suche wurde auf die humane Spezies beschränkt.

Der wichtigste Parameter eines Suchergebnisses ist die MOWSE-Punktzahl. Sie wird als ein Maß dafür verwendet, ob der Treffer für eine Suchabfrage eine vorgegebene Signifikanzgrenze überschreitet. Unter Verwendung der *Homo sapiens*-Datenbank von NCBI bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p = 0,05$  werden Treffer mit einer Punktzahl („Score“)  $> 66$  als signifikant angesehen und nur diese in der Auswertung berücksichtigt. Zur Ergebnisabdeckung wurden weitere Parameter berücksichtigt, welche die Treffer-Qualität widerspiegeln. Zusätzlich wurde noch die Masse aufgenommen, um die Position der Proteinbande auf den SDS-PAGE-Gelen vergleichen zu können. Sind jedoch mehrere unterschiedliche Proteine in der Gelbande lokalisiert, kann es passieren, dass aufgrund eines herausragenden signifikanten Treffers alle anderen Proteine nicht mehr erkannt werden.

### **3.2.7. RNA-Interferenz (RNAi)**

Um zu untersuchen, ob BAF 155 für die Funktion von CAR von essenzieller Bedeutung ist, wurde versucht die Expression von BAF 155 durch RNA-Interferenz (Fire und Mello, 1998) zu reduzieren. In der Folge sollte dann in derart veränderten Zellen die transkriptionelle Aktivität von CAR untersucht werden. Unter RNA-Interferenz (RNAi, auch RNA-Silencing) versteht man die Nutzbarmachung eines natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der die Genexpression post-transkriptionell beeinflusst. Hierbei sind circa 21-23 Nukleotide lange, einzelsträngige RNA-Moleküle (siRNA) beteiligt, die nach sequenzspezifischer Bindung an ihre Ziel-mRNA zu deren Degradation und somit zur Reduktion der Genexpression („knockdown“) führen.

#### **3.2.7.1. Herstellung von Einzelstrang-DNA-Oligonukleotiden**

Der „Block-iT U6 RNAi Entry Vector Kit“ (Invitrogen) erleichtert die Generierung eines Vektors zur Expression einer short hairpin (sh) RNA zur Verwendung in RNAi-Analysen eines Zielgens in Säugerzellen. Dem Vektor (pENTR) wird eine effiziente transiente oder

stabile Expression der integrierten shRNA (short hairpin) in Säugerzellen unter der Kontrolle des humanen U6-Promotors ermöglicht, gefolgt von einer Rekombination mit einem geeigneten Zielvektor.

Nach Synthese der individuellen Einzelstrang-Oligonukleotide lagerten sich diese komplementär an, um doppelsträngige Oligonukleotide (ds oligo) zu generieren.

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA Zielsequenzen der Plasmide sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

**Tabelle 3.13: siRNA Konstrukte**

| Plasmid<br>pENTR-          | Plasmidsequenz<br>ab Basenpaar | Sequenz  |
|----------------------------|--------------------------------|--|
| -CM1                       | 1012 bp                        | GCGGATTTCAACCAAGAATGA                                    |
| -CM2                       | 1336 bp                        | GGATCTAGATGAGCAGGATGA                                    |
| -CM3                       | 1714 bp                        | GGACTCGTTAATTACCAAGT                                     |
| -CM4                       | 2311 bp                        | GGAATTGGTTGAAGCTCATGT                                    |
| Negativkontrolle<br>EH-CTR |                                | CACCGCAACAAGATGAAGAGC<br>ACCAACGAATTGGTGCTCTTCATCTTGTTG  |
| Negativkontrolle<br>DF9    |                                | CACCGATGTATTGGCCTGTATTAGTT<br>CGAAAATAATACAGGCCAATACA    |
| Negativkontrolle<br>DF10   |                                | CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTT<br>AACGAAACGTGACACGTTCCGGAGAA |

Für die Anlagerungsreaktion („annealing“) wurden folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

|                                 |                  |
|---------------------------------|------------------|
| 200 $\mu$ M top strand oligo    | 5 $\mu$ l        |
| 200 $\mu$ M bottom strand oligo | 5 $\mu$ l        |
| 10 x Oligo Annealing Puffer     | 2 $\mu$ l        |
| DNase / RNase-freies Wasser     | 8 $\mu$ l        |
| <hr/> Gesamtvolumen             | <hr/> 20 $\mu$ l |

Der Reaktionsmix wurde für 4 min auf 95°C aufgeheizt und danach bei RT für 5-10 min abgekühlt. In einer Mikrozentrifuge wurden die Proben für 5 s herunterzentrifugiert. Anschließend wurde die ds Oligo-Mixtur bis zur finalen Konzentration von 5 nM mit DNase/RNase-freiem Wasser verdünnt. Die ds Oligonukleotide wurden schließlich in die pENTR/U6 Vektoren kloniert.

Die Ligationsreaktion wurde wie folgt angesetzt:

|                                   |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| 5 x Ligationspuffer               | 4 $\mu$ l        |
| pENTR/U6 (0.5 ng / $\mu$ l)       | 2 $\mu$ l        |
| ds oligo (5 nM; 10000 Verdünnung) | 1 $\mu$ l        |
| DNase / Rnase-freies Wasser       | 12 $\mu$ l       |
| T4 DNA Ligase (1 U / $\mu$ l)     | 1 $\mu$ l        |
| <hr/> Gesamtvolumen               | <hr/> 20 $\mu$ l |

Nach Vermengen des Reaktionsmixes wurde dieser bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Transformation in chemisch kompetente One Shot TOP10 *E. coli* Zellen. Dabei wurden 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes und 50  $\mu$ l TOP10 kompetente Zellen vorsichtig vermengt. Die Probe wurde auf Eis für 30 min inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock der Zellen für 30 s bei 42°C, bei dem die DNA von den Zellen aufgenommen wird. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße sofort wieder auf Eis gestellt. Zu den Proben wurden nun 250  $\mu$ l auf Raumtemperatur gehaltenes SOC-Medium hinzugegeben und bei 37°C für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Zum Schluß wurden 50  $\mu$ l der Bakterienkultur auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden dann für Minipräparationen (siehe Kapitel 3.2.3.6) in LB-Medium amgeimpft. Die Inserts der Oligonukleotide wurden schließlich zur Kontrolle sequenziert.

### 3.2.7.2. LR-Rekombinationsreaktion

Unter Verwendung des Block-iT lentiviralen RNAi Expressionssystems wurde die U6 RNAi-Kassette aus dem pENTR/U6-Vektor in den pLenti6-Vektor (=pDEST-Vektor) kloniert, um ein lentivirales Konstrukt für die Expression der shRNA zu generieren. Dabei erfolgt eine Rekombination zwischen den spezifischen att-Stellen (attL-Stellen des pENTRVektors sowie attR-Stellen des pDEST-Vektors), welche als Bindungsstellen für Enzyme dienen, die zur Rekombination nötig sind. Diese Enzyme sind im sog. „LR-Clonase II Enzym-Mix“ (Invitrogen) enthalten.

Zur Selektion der Klone, die das gewünschte DNA-Fragment enthalten, ist zwischen den att-Stellen bei pDEST-Vektoren eine Kassette integriert, die das ccdB-Gen enthält. Das

entsprechende CcdB-Protein interferiert mit der DNA-Gyrase von *E. coli* und unterbindet damit das Wachstum der Zellen (Bernard and Coutourier, 1992). In rekombinierten pDEST-Plasmiden ist das *ccdB*-Gen durch das inserierte DNA-Fragment ersetzt. Daher können Zellen, die rekombinierte pDEST-Plasmide aufgenommen haben, wachsen. Zudem besitzen die verwendeten Vektoren ein Resistenzgen gegen Ampicillin.

Zunächst wurde für die Umklonierung aus dem pENTR/U6-Vektor in den pLenti6-Vektor eine Rekombinationsreaktion durchgeführt, bei der als erstes folgende Komponenten in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur vermengt wurden:

100 ng pENTR/U6 Konstrukt

150 ng pLenti6/ BLOCK-iT-DEST Vektor

---

add 8 µl TE Puffer, pH 8,0

Zu dem jeweiligen Ansatz wurden dann 2 µl von dem auf Eis aufgetauten „LR-Clonase II Enzym-Mix“ dazugegeben und gut mittels Pipette vermischt. Die Reaktion inkubierte bei 25 °C für 1 h. Danach wurde 1 µl Proteinase K Lösung zu jeder Reaktion gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich erfolgte eine Transformation (siehe Kapitel 3.2.3.5) von 2-3 µl des Reaktionsansatzes in 50 µl One Shot Stbl3 chemisch kompetente *E. coli* Zellen. Nach Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Ampicillin-Platten und Kolonienbildung über Nacht wurde die Plasmid-DNA schließlich mittels Mini-Präparation (3.2.3.6) aus den Bakterien isoliert und auf korrekte Rekombination mittels Restriktionsverdau der Plasmide mit BamHI und XbaI überprüft.

### **3.2.7.3. Herstellung lentiviraler Expressionsvektoren in HEK 293FT-Zellen**

Die Produktion von Lentiviren in HEK 293FT-Zellen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von Invitrogen. Hierfür wurde das „ViraPower Lentiviral Expression“ System für hohe Expressionsraten in teilenden und nicht-teilenden Säugetierzellen verwendet. Zwei Tage vor der Transfektion der shRNA-pLenti-Konstrukte wurden HEK 293FT-Zellen im Verhältnis  $10^7$  Zellen pro T175 Kulturflasche (Greiner Bio one) ausgesät. Für eine robuste lentivirale Produktion wurden die shRNA-Konstrukte in VSVG-pseudovirale Partikel effizient verpackt

und zusammen mit den Verpackungsplasmiden pLP1 und pLP2 in HEK 293FT-Zellen kointransfiziert. Dabei wurden 250 µl des ViraPower Mixes pro T175-Flasche wie folgt zusammengesetzt:

100 ng / µl pLP1

100 ng / µl pLP2

100 ng / µl VSVG

18 µg lentivirale Plasmid-DNA CM1 / CM4

Der ViraPower Mix wurde anschließend in 4,5 ml serum-freiem DMEM-Medium vermennt. In einem neuen Röhrchen wurden 108 µl Lipofektamin und 4,392 µl serum-freies DMEM zusammenpipettiert. Beide Ansätze inkubierten 5 min bei Raumtemperatur, wurden schließlich vereint und erneut 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die HEK 293-Zellen trypsinisiert und in einer neuen T175 Zellkulturflasche zusammen mit 15 ml DMEM-Komplettmedium 5 ml Zellsuspension mit  $4 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Zu jedem Ansatz wurden dann 9 ml des Transfektionskomplexes gegeben.

An den Tagen 2 und 3 nach der Transfektion wurden jeweils die Zellüberstände in 50 ml Röhrchen gesammelt und bei 2000xg 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einem 0,45 µm Filter (Sartorius) gefiltert und bei -80°C eingefroren.

Währenddessen wurden die HEK 293FT-Zellen mit ca. 27 ml frischem DMEM-Komplettmedium versorgt und mikroskopisch überprüft, ob die HEK Zellen aufgrund des exprimierten GFP-Proteins (Tsien, 1998) bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm grün fluoreszieren. Die dabei verwendeten pLenti-Vektoren sind mit einem GFP-Gen modifiziert und wurden von Dr Maria Thomas (IKP, Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Am 6. Tag nach der Transfektion wurden die Viren-enthaltenden gefilterten Überstände von Tag 2/3 und Tag 6 in Polycarbonatröhrchen überführt und bei 200000xg und 4°C ca 1,5 Stunden mittels Ultrazentrifuge (Ti70-Rotor) sedimentiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Pellets in 50 µl kalter 1 %iger BSA/PBS-Lösung resuspendiert, alle vereinigt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Zur Bestimmung des Virentiters wurden HT1080-Zellen mit  $3 \times 10^4$  Zellen pro Well in einer 12-Well-Platte mit 500 µl Medium ausplattiert, 5 µl Polybren einer 1:10 Verdünnung (Stammlösung 6 mg/ml) pro Well dazupipettiert und anschließend 1 µl bzw. 2,5 µl des Virus hinzugegeben. 3-4 Tage nach dieser Infektion konnte der Titer entweder mittels Fluoreszenz-Mikroskopie oder FACS durch Zählen der grün fluoreszierenden Zellen bestimmt werden



Zur Infektion wurden 150000 LS174T-Zellen in 24-Well-Platten ausplattiert. Anschließend erfolgte am nächsten Tag die Vireninfection mit einem MOI (multiplicity of infection, Vielfachheit der Infektion) von 3. Die MOI beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Agenzien (Viruspartikeln) zu deren Zielzellen. Werden Zellen in einer Zellkultur mit Viruspartikeln infiziert, dann lässt sich der MOI dieser Kultur berechnen, indem die Zahl der Viren durch die Zahl der Zellen geteilt wird. Bei einer MOI von 1 werden genau so viele Viruspartikel eingesetzt wie sich Zellen in der Kultur befinden. Die Virenlösung wurde zusammen mit einer finalen Konzentration von 6 µg/ml Polybren in den Mediumüberstand der Zellen pipettiert.

5 Tage nach der Infektion erfolgte die RNA-Isolation (3.2.4.1) aus den Zellen. Nach Umschreiben der RNA in cDNA (3.2.4.3) wurde die Expression von BAF 155 und des CAR-Zielgens CYP2B6 mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 3.2.4.4) analysiert.

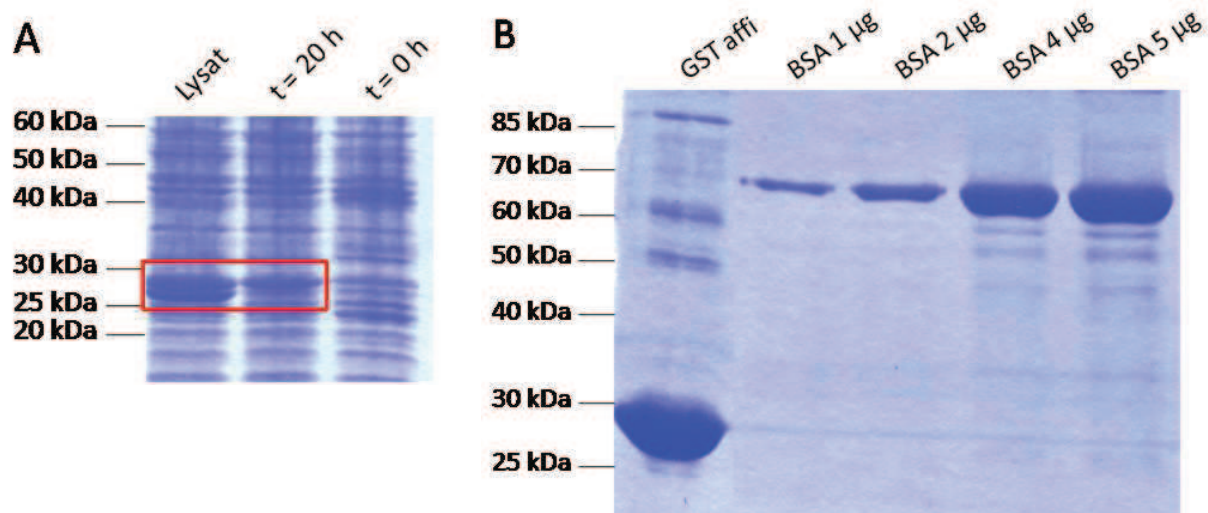
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Expression, Affinitätsreinigung und Quantifizierung exprimierter Proteine

Ziel der Arbeit war es, nach neuen Interaktionspartnern des Kernrezeptors CAR zu suchen. Zu diesem Zweck wurden zunächst ein Fusionsprotein, bestehend aus der LBD von CAR und GST (Kapitel 3.2.5.6) sowie das GST-Protein alleine als Negativkontrolle in *E. coli* Bakterien exprimiert und affinitätsgereinigt, bevor diese für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Pulldown-Assays eingesetzt wurden.

#### 4.1.1. GST-Expression als Negativkontrolle

GST wurde als Negativkontrolle für die Pulldown-Assays in *E. coli*-Bakterien vom Stamm BL21 DE3pLysS exprimiert und mit Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt. Zur Quantifizierung des affinitätsgereinigten GST-Proteins wurde zusätzlich BSA in vier unterschiedlichen Mengen auf das 10 %ige SDS-Gel aufgetragen.



**Abb 4.1: Kontrolle der Expression und Affinitätsreinigung von GST**

A) Expression von GST: BL21 *E. coli*-Bakterien wurden mit pGEX6P1-Expressionsvektor transformiert und die Expression von GST induziert (roter Kasten). Es wurden je 10 µl Probe von dem mit Ultraschall aufgeschlossenen Bakterienlysat, unaufgeschlossene Bakterien 20 h nach Induktion und zu dem Zeitpunkt 0 vor Induktion mit IPTG auf ein 10 %iges SDS- Gels aufgetragen und die Proteinbanden mit dem Farbstoff Coomassie-Blau gefärbt. B) Affinitätsgereinigtes GST und BSA-Standards mit verschiedenen Konzentrationen von 1 µg, 2 µg, 4 µg und 5 µg zur Bestimmung der affinitätsgereinigten GST-Menge.

Das Coomassie-gefärbte Proteingel (Abb. 4.1 A) zeigte 20 h nach Zugabe von IPTG ( $t = 20$  h) die Induktion der GST-Expression in Form einer im Vergleich zu  $t = 0$  stärkeren Bande bei einer Größe von ca. 27 kDa. Eine noch höhere Intensität dieses 27 kDa-Proteins war in der Spur des Bakterienzellysats nach Aufschluß der Zellen mittels Ultraschall zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass es sich um ein lösliches Protein handelt. Durch Vergleich mit den parallel aufgetragenen BSA-Proben (1  $\mu\text{g}$ ; 2  $\mu\text{g}$ ; 4  $\mu\text{g}$ ; 5  $\mu\text{g}$ ) konnte gezeigt werden, dass an 10  $\mu\text{l}$  Glutathion-Sepharose mehr als 5  $\mu\text{g}$  des 27 kDa-Proteins gebunden werden konnten (Abb. 4.1 B). BSA hat eine ungefähre Größe von 66 kDa.

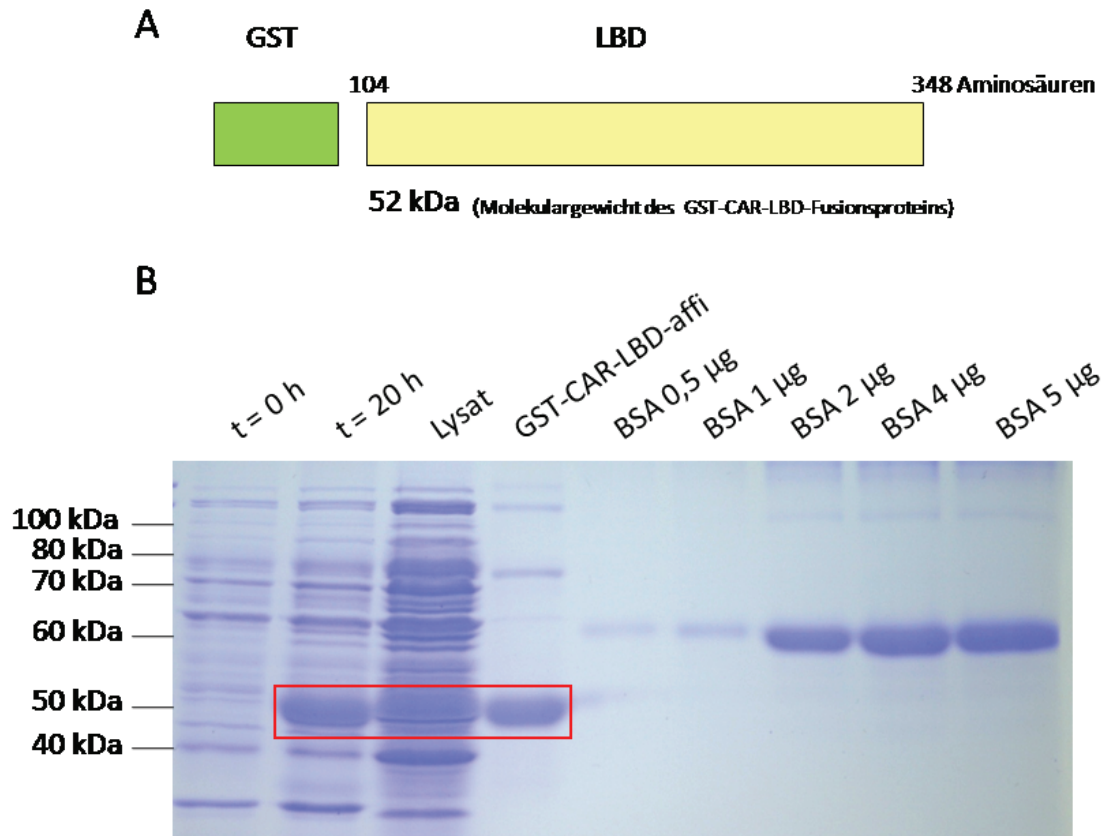
#### 4.1.2. Expression des GST-CAR-LBD-Fusionsproteins

Um Wechselwirkungen von CAR mit anderen Proteinen zu untersuchen, wurde die Ligandenbindungsdomäne von CAR (Aminosäure 104-348) als GST-CAR-LBD-Fusionsprotein exprimiert. Das bakterielle Expressionsplasmid für das GST-CAR-LBD-Fusionsprotein wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.

Zur Expression des GST-CAR-LBD-Fusionsproteins wurde die mittels PCR amplifizierte cDNA der Ligandenbindungsdomäne von CAR (Aminosäure 104-348) an das GST-Gen im pGEX6P1-Vektor kloniert. Das Schema zeigt in Abbildung 4.2 A die 24,8 kDa große CAR-LBD (gelb), die C-terminal an das GST-Gen (grün) im pGEX6P1-Vektor ligiert wurde.

Das 52 kDa große GST-CAR-LBD-Fusionsprotein wurde in einer BL21pLys *E. coli* Bakterienkultur exprimiert und über Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt. Zur Quantifizierung der Menge an gebundenem Fusionsprotein wurde auf ein 10 %iges SDS-Gel zusätzlich BSA in unterschiedlichen Stoffmengen aufgetragen. Die Abbildung 4.2 B zeigt auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel in der Spur mit  $t = 0$  h nach Induktion eine verstärkte Expression des GST-Fusionsproteins bei der Größe von 52 kDa als vor Induktion mit IPTG. 20 h nach Induktion mit IPTG ( $t = 20$  h) war auf dem Gel ein stark exprimiertes Protein bei ca. 52 kDa zu erkennen (roter Kasten), was der Größe des Fusionsproteins entspricht. Diese Bande war auch nach dem Zellaufschluß mittels Ultraschall im Lysat in gleicher Intensität zu sehen, das exprimierte Protein ist demnach löslich. Die Affinitätschromatografie zeigte neben dem GST-CAR-LBD-Fusionsprotein auch andere bakterielle Proteine, die an der Glutathion-Sepharose gebunden hatten und nicht vollständig durch Waschen eluiert wurden. Die Quantifizierung über die ebenfalls aufgetragenen BSA-Standards ergab, dass ca. 4  $\mu\text{g}$

Fusionsprotein an 10 µl Glutathion-Sepharose gebunden wurden. Diese Menge wurde in den Pulldown-Assays zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit Leberhomogenat eingesetzt.



**Abb. 4.2: GST-CAR-LBD-Fusionsprotein**

A) Das Schema zeigt die Ligandenbindungsdomäne von CAR (gelb), deren cDNA an das GST-Gen (grün) in dem pGEX2T Vektor ligiert wurde, damit in Bakterienkultur das ca. 52 kDa große GST-CAR-LBD-Fusionsprotein exprimiert werden konnte. B) BL21 *E. coli*-Bakterien wurden mit dem Expressionsvektor für GST-CAR-LBD transformiert und die Expression mit IPTG induziert (roter Kasten). Es wurden je 10 µl Probe von dem mit Ultraschall aufgeschlossenem Bakterienlysat sowie von den unaufgeschlossenen Bakterien 20 h nach Induktion und zu dem Zeitpunkt 0 vor Induktion mit IPTG auf ein 10 %iges SDS- Gel aufgetragen und die Proteinbanden mit Coomassie-Blau gefärbt. Zur Proteinquantifizierung wurde BSA mit verschiedenen Konzentrationen von 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg und 5 µg aufgetragen.

## 4.2. Pulldown-Assays zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen des zuvor affinitätsgereinigten Fusionsproteins GST-CAR-LBD und von GST als Negativkontrolle mit anderen Proteinen, wurde ein sogenannter Pulldown-Assay (Kapitel 3.2.5.8) durchgeführt. Dabei wurden Proteine, die aus den Leberhomogenaten an das GST-CAR-LBD-Fusionsprotein bzw. GST gebunden hatten auf einem Gradientengel mit 7,5 – 14 %igem Polyacrylamidgehalt im Trenngel aufgetrennt und die Proteinbanden Silbernitrat-gefärbt (Kapitel 3.2.5.5.2). Zur Identifizierung dieser Proteine wurde die MALDI-Massenspektrometrie angewendet (Kapitel 3.2.6).

Zunächst jedoch musste der Pulldown-Assay optimiert werden. Das Waschen der Pulldown-Proteinproben mit 500 mM Natriumchlorid (Abb. 4.3 A) zeigte keine stringente Wirkung, da unspezifische Bindungen an GST nicht verhindert wurden, wie die GST-Spur zeigt. Der nächste Optimierungsschritt in den Waschbedingungen der Pulldown-Assays bestand aus Waschschritten mit 2 M Harnstoff zusätzlich zu der NaCl Waschlösung. Das Gelbild (Abb. 4.3 B) zeigt eine deutlich stringenteren Waschwirkung, da verglichen mit Abb. 4.3 A weniger Proteine gebunden haben. Die verwendete Harnstoffkonzentration bewirkt ein verstärktes Ablösen der interagierender Proteine an der CAR-LBD sowie an GST. Um starkes Ablösen zu verhindern, wurde in folgenden Experimenten die Harnstoffkonzentration kontinuierlich reduziert. Als optimal wurden schließlich 0,5 M Harnstoff ermittelt, um die an der Glutathion-Sepharose unspezifisch gebundenen Proteine stringent abzulösen. Somit konnte der Anteil unspezifisch gebundener Proteine deutlich reduziert werden (Abb. 4.3 C).

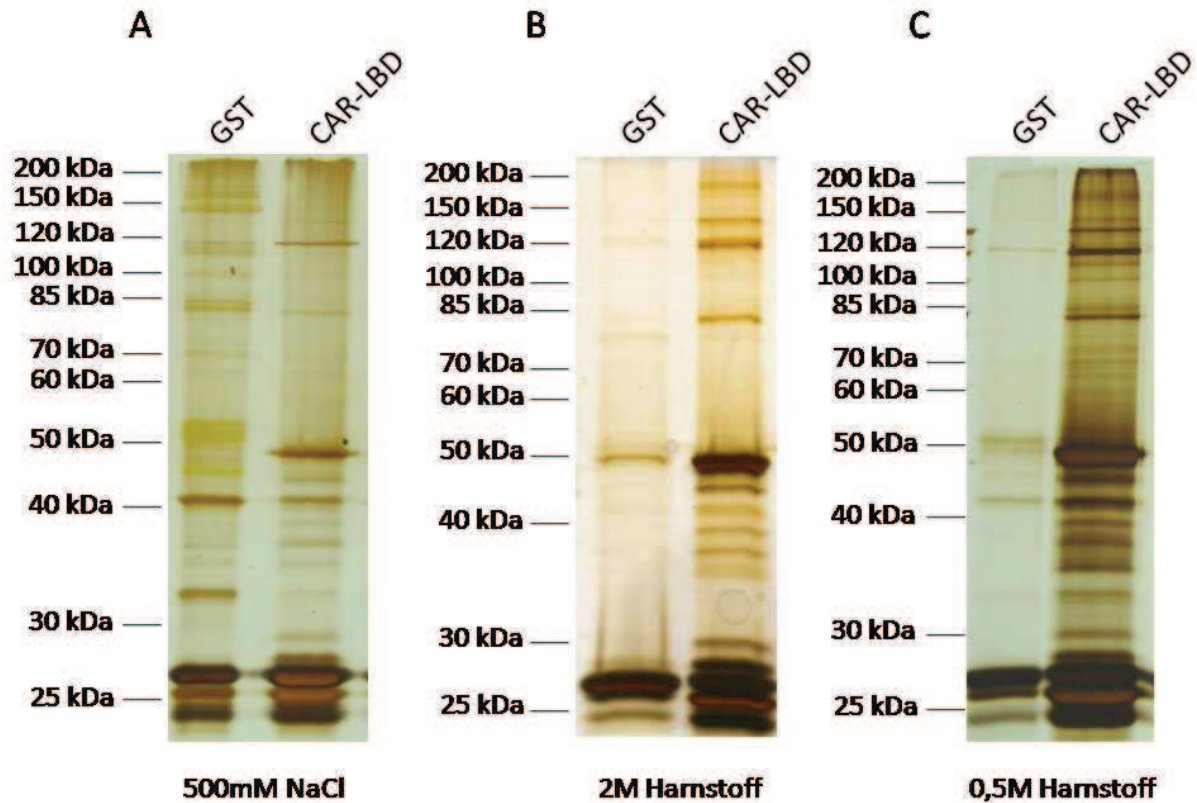


Abb. 4.3: Optimierung der Waschbedingungen von Pulldown-Assay-Proteinproben

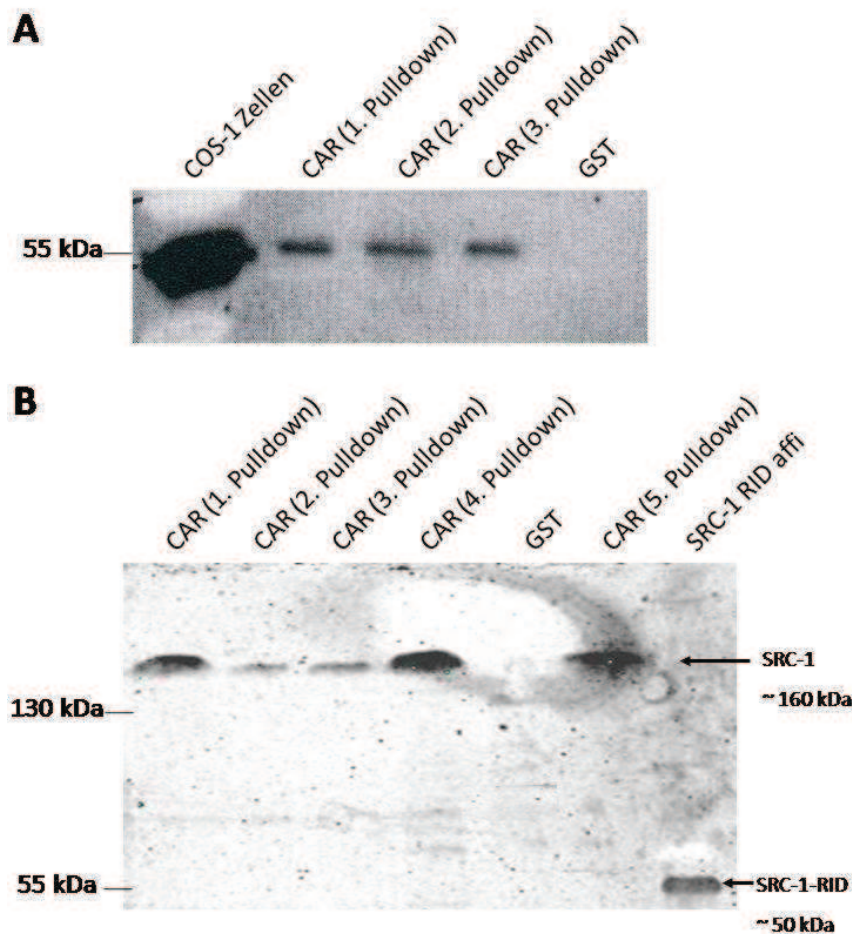
Die an CAR-LBD bzw. GST gebundenen Proteine aus den Pulldownassays mit Rattenleberhomogenat wurden auf 7-15 %igem Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend silbernitrat gefärbt. Proteinproben wurden mit 500 mM Natriumchlorid (A), 2 M Harnstoff (B) und 0,5 M Harnstoff (C) gewaschen.

Aufgrund vieler Replikate lässt sich auch begründen, dass eine direkte Korrelation der Färbintensität mit der enthaltenen Proteinmenge bei der Silbernitratfärbung schwierig ist. Die Silbernitratfärbung ist nicht quantitativ, so dass man aus der Intensität einer Bande nicht auf die Proteinmenge schließen kann.

#### 4.2.1. Western Blot Analysen zur Validierung der Pulldown-Assays

Zur Validierung der Pulldown-Assays als zuverlässige Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit Western Blots durchgeführt, um bekannte, mit CAR interagierende Proteine zu detektieren. Dabei wurden nach Inkubation des Leberhomogenates mit dem GST-CAR-LBD-Fusionsprotein sowie mit GST als Negativkontrolle die gebundenen Proteine elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, um RXR alpha, den

Heterodimerisierungspartner von CAR und SRC-1, Koaktivator von CAR, der ebenfalls konstitutiv mit CAR interagiert, mit entsprechenden Antikörpern detektieren zu können.



**Abb. 4.4: Western Blot mit RXR alpha (A) und SRC-1 (B) Antikörpern**

Aufgetragen wurden gleiche Mengen Proteinproben aus verschiedenen Pulldown-Assays.

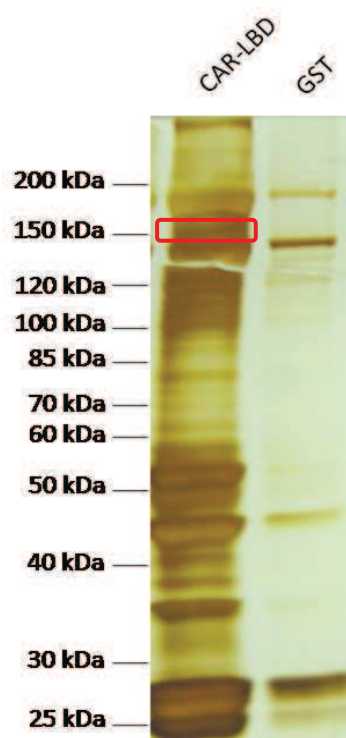
Die Analyse erfolgte nach Auftrennung über SDS-PAGE mittels Western Blot mit einem Antikörper gegen RXR alpha (A) bzw. SRC-1 (B). Als Positivkontrolle für RXR alpha wurde ein Proteinextrakt aus COS-1-Zellen, die mit RXR alpha Expressionsplasmid transfiziert wurden, verwendet. Bei SRC-1 diente als Positivkontrolle die affinitätsgereinigte SRC-1-RID. Als Negativkontrolle wurden bei beiden Western Blots die an GST gebundenen Proteine eingesetzt.

In Abbildung 4.4 A zeigte der gegen RXR (Retinoid-X-Rezeptor) alpha gerichtete Antikörper im Western Blot in den drei Spuren mit Pulldown-Proben des GST-CAR-LBD-Fusionsproteins starke Banden bei ca. 55 kDa, was dem erwarteten Molekulargewicht von RXR alpha entspricht. Die Positivkontrolle zeigte in der ersten Spur im Western Blot (A) ein starkes Bandensignal. Es wurde ein RXR alpha Expressionsplasmid in COS-1-Zellen transfiziert und nach Extraktion der Proteine mittels spezifischen Antikörper das Protein RXR alpha detektiert. Als Ko-Aktivator von CAR konnte in Abbildung 4.4 B das Protein SRC-1 (Steroid Coaktivator 1) in den verschiedenen Pulldownproben detektiert werden. In den

Pulldown-Proben mit GST-CAR-LBD-Fusionsprotein wurde SRC-1 bei ca. 160 kDa detektiert, was auch der erwarteten Größe entspricht (Pfeil oben). Als Positivkontrolle wurde das affinitätsgereinigte GST-SRC-1-RID Fusionsprotein aufgetragen und konnte im Western Blot bei den erwarteten 50 kDa detektiert werden (Pfeil unten). Die RID ist die Rezeptorinteraktionsdomäne von SRC-1. Diese Ergebnisse zeigen, dass zwei der in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner von CAR, RXR alpha und SRC-1 in den Pulldown-Experimenten immunologisch detektiert werden konnten und somit der Pulldown-Assay als zuverlässige Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen validiert werden konnte.

#### 4.2.2. Pulldown-Assays mit GST-CAR-LBD-Fusionsprotein und GST

Die Abbildung 4.5 zeigt ein Silbernitrat-gefärbtes Gel mit aufgetrennten Proteinproben aus einem Pulldown-Assay zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit der LBD des Kernrezeptors CAR. Mit diesem Experiment wurde das Protein BAF 155, welches in dem humanen Chromatin-umgestalteten SWI/SNF Komplex involviert ist, als neuer Interaktionspartner von CAR identifiziert (roter Kasten).

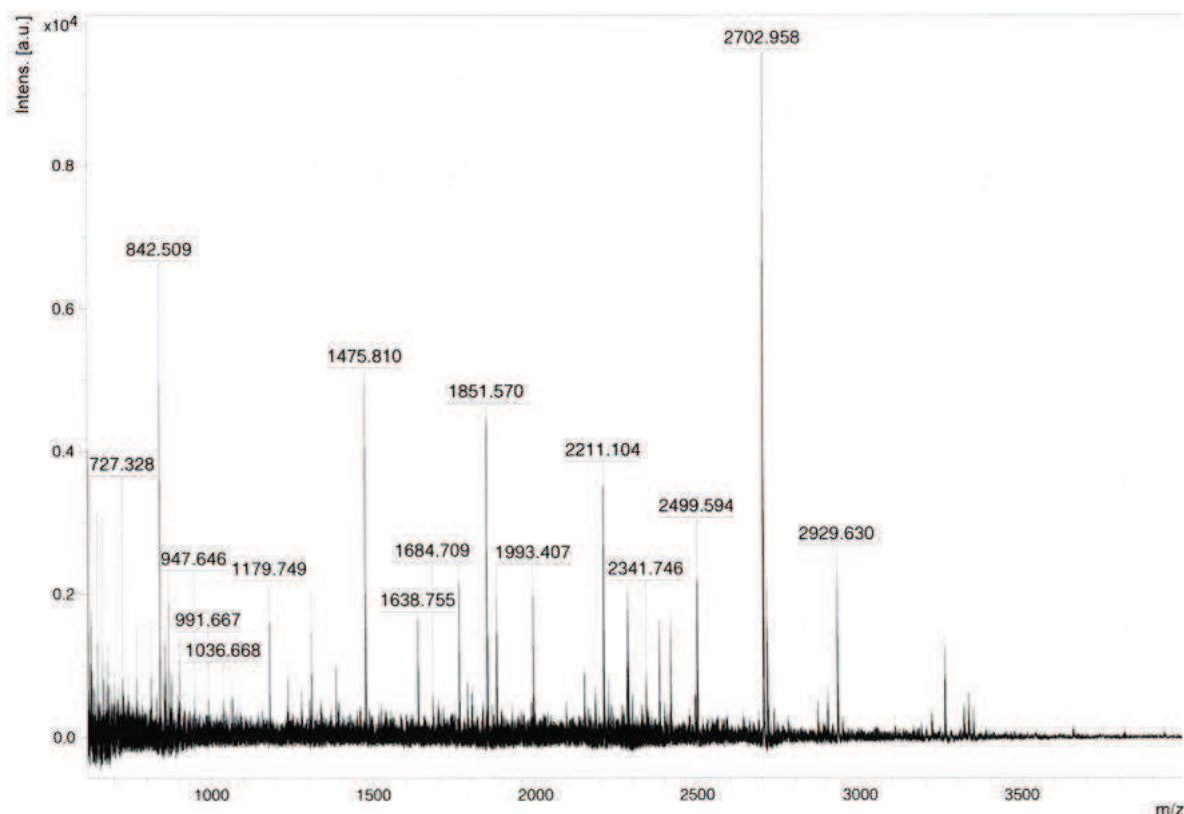




**Abb. 4.5: Proteinproben aus Rattenleberhomogenat**

Auf ein Silbernitrat-gefärbtes Gradientengel mit 7,5-15 % Polyacrylamidgehalt wurden Proteinproben aus einem Pulldown-Assay mit Rattenleberhomogenat zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen aufgetragen. Die erste Spur zeigt aufgetrennte Proteine, die an die LBD des GST-CAR Fusionsproteins gebunden haben. Dabei konnte das Protein BAF 155 mit MALDI-TOF massenspektrometrisch identifiziert werden. In der zweiten Spur sind die an GST gebundenen Proteine aufgetrennt.

In der Spur mit dem GST-CAR-LBD-Fusionsprotein sind viele Proteine zu erkennen, die auch nach den Waschschrritten noch an das Fusionsprotein gebunden waren (Abb. 4.5). Neben dem vermeintlichen 27 kDa großen GST-Protein war auch eine Proteinbande sichtbar, die mit ca. 52 kDa das GST-CAR-LBD-Fusionsprotein darstellt. Die im Gel befindlichen Proteinbanden, die Molekulargewichte zwischen 25 kDa und mehr als 200 kDa aufwiesen, wurden mittels einem Skalpell ausgeschnitten und wie unter 3.2.6.1 beschrieben für die Massenspektrometrie präpariert. Dabei konnte das Protein BAF 155 mit einem Molekulargewicht von ca. 155 kDa (Abb. 4.5, roter Kasten) daraufhin mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert werden.

**Abb. 4.6: MALDI-TOF-Massenspektrum von BAF 155**

Dargestellt ist das summierte Massenspektrum des identifizierten Proteins BAF 155 mit Intensität (a.u.) auf der Y-Achse und Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) auf der X-Achse. Das Spektrum zeigte dabei Intensitäten über  $4 \times 10^4$ . Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure verwendet.

Die Pulldown-Experimente wurden unter gleichen Bedingungen (Inkubationszeit, Waschschrirte, Probenaufrennung auf SDS-PAGE mit gleichem Polyacrylamidgehalt) durchgeföhrt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. In Abbildung 4.6 ist das Massenspektrum von BAF 155 (aus Abbildung 4.5, roter Kasten) dargestellt. Es zeigt den kompletten MS-Scan des Proteins basierend auf dem resultierenden Summenspektrum.

Mittels eines Suchalgorithmus (Mascot, Matrix Science, London, UK) konnte die Datenbank NCBI nach signifikanten Einträgen zu dem Massenspektrum durchsucht werden. Dabei wurde der „Fingerabdruck“ (PMF, peptide mass fingerprint) von BAF 155 aus dem Massenspektrum mit theoretischen „Fingerabdrücken“ in der Datenbank abgeglichen, um so die Identität dieses Proteins zu bestätigen. In dieser Arbeit wurden alle Proteine mit dieser Methode identifiziert.

Die nachfolgende Tabelle 4.1 zeigt eine Auswahl signifikanter identifizierter Proteine, die aus Rattenleberhomogenat an die CAR-LBD des GST-Fusionsproteins im Pulldown-Assay gebunden hatten. Diese Proteine konnten in mehreren Versuchen reproduzierbar mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer identifiziert werden. Die Proteine sind in der Tabelle mit Zugangsnummer der NCBI-Datenbank, ihrem Molekulargewicht und ihrer Funktion sowie dem jeweiligen Durchschnittsscore der mehrfach gefundenen Proteine angegeben. Weitere Proteine, die an CAR-LBD/GST gebunden haben, sind im Anhang (Tabelle 7.1) aufgeföhrt.

**Tabelle 4.1: Interaktionspartner von GST-CAR-LBD aus Rattenleberhomogenat identifiziert mittels MALDI-TOF-MS**

Die aufgelisteten Proteine wurden mittels MASCOT-Suchalgorithmus unter Verwendung der NCBI-Datenbank signifikant mit einem Score von mehr als 61 identifiziert.

| Proteinname                    | Zugangsnummer | Protein Molekulargewicht (in Dalton) | Funktion   | Score |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------------|--|-------|
| <b>Pyruvatcarboxylase (Pc)</b> | AAA60033      | 130.349                              | Ligase, involviert in Zitratsäurezyklus und in der Gluconeogenese                        | 100   |
| <b>Hitzeschockprotein 70</b>   | AAA02807      | 70.000                               | Stabilisiert Proteine gegen Aggregation und unterstützt die Faltung neuer translatierter | 91    |

|  |            |         | Peptide  |     |
|--|------------|---------|--|-----|
| <b>Argininosuccinat-synthetase (ASS) 1</b>                               | AAH21676   | 46.500  | Katalysiert den Penultimatschritt des Arginin-Biosyntheseweges   | 223 |
| <b>Fibrinogen beta (FGB)</b>   | AAA18024   | 50.247  | Glykoprotein; reguliert Zelladhäsion, wird zu Fibrin durch Thrombin geschnitten  | 365 |
| <b>Kristallstruktur der Ankyrinbindungsdomäne der Alpha-Na, K-Atpase</b> | 1BG5_A     | 29.697  | Untereinheit der Na-K-ATPase; interagiert mit Ankyrin; stabilisiert Na-K-ATPase an der Plasmamembran und unterstützt den Transport von der Plasmamembran zum Golgi Apparat | 136 |
| <b>Lamin A</b>   | AAA36160.1 | 74.487  | Komponente der Nuklearlamina; interagiert mit Chromatin; Mutationen verursachen Hutchinson-Gilford Progeriasyndrom (HGPS)  | 138 |
| <b>Dysferlin</b>   | AAC63519.1 | 233.106 | Involviert im Zellmembran-Repariermechanismus der Skelettmuskelzelle   | 66  |
| <b>Keratin 8</b>   | CAA52882   | 52.678  | Faserförmiges Strukturprotein, verbindet kontraktile Apparate an Dystrophin  | 192 |
| <b>Uricase (Uratoxidase, UO)</b>   | P09118     | 35.140  | Katalysiert die Oxidation von Harnsäure zu 5-Hydroxyisourate   | 97  |

|  |           |         |  |     |
|--|-----------|---------|--|-----|
|  |           |         | und dann zu Allantoin; involviert im Purinmetabolismus und Harnsäuredegradation  |     |
| <b>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1 (SMARCC1)</b> | NP_003065 | 155.000 | Untereinheit des Chromatin-remodeling complex; verantwortlich für Regulation transkriptionaler Prozesse wie Entwicklung, zelluläre Differenzierung und Proliferation | 66  |
| <b>Carbomoylphosphat synthetase 1 (CPS)</b>  | CAA75785  | 166.673 | Ligase; involviert in der Produktion von Harnstoff; CPS Defizit führt zu erhöhter Ammoniakkonzentration im Nervensystem  | 230 |
| <b>Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)</b>   | NP_002037 | 36.056  | Katalysiert Umwandlung von Glycerinaldehyd -3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (Glykolyse)   | 69  |

Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifikation der an GST-CAR-LBD gebundenen Proteine mit Proteinnamen, Zugangsnummer in der Datenbank, Molekulargewicht in Dalton, Funktionalität und Score der signifikanten Proteine.

Das in Tabelle 4.1 aufgelistete, massenspektrometrisch identifizierte Protein SMARCC1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin; SWI/SNF verwandter, matrixassoziierter, actinabhängiger Chromatinregulator, Unterfamilie C, Mitglied 1) wird auch als BAF 155 (BRG1-assoziierter Faktor) bezeichnet. Als interessanter potenzieller Interaktionspartner von CAR ist dieses Protein verantwortlich für die Regulation transkriptionaler Prozesse wie zelluläre Entwicklung, Differenzierung und Proliferation. Das dazugehörige Maushomolog SRG 3 (SWI3-related gene product) bildet mit dem Transkriptionsfaktor Androgenrezeptor, der ähnliche Eigenschaften zu CAR zeigt, sowie mit

dem CAR Ko-Faktor SRC-1 einen Heteromerkomplex und wird zu dem Androgenrezeptor-Zielpromotor rekrutiert (Hong et al., 2005). Aufgrund der Hintergrundinformation wurde SMARCC1 / BAF 155 ausgewählt, um eine mögliche Interaktion mit CAR mit verschiedenen Interaktionsmethoden (*in vivo* / *in vitro*) zu bestätigen (siehe Kapitel 4.3).

### 4.2.3. Vergleich von Pulldownproben von Rattenleber und humaner Leber

Die Ergebnisse der Pulldown-Assays mit Rattenleber wurden mit Pulldown-Assays mit humaner Leber verglichen. Unter gleichen Bedingungen wie mit Rattenleberhomogenat wurde das humane Leberhomogenat mit dem GST-CAR-LBD-Fusionsprotein bzw. mit der Negativkontrolle GST inkubiert. Durch Waschschriffe mit 0,5 M Harnstoff wurden unspezifisch gebundene Proteine abgelöst.

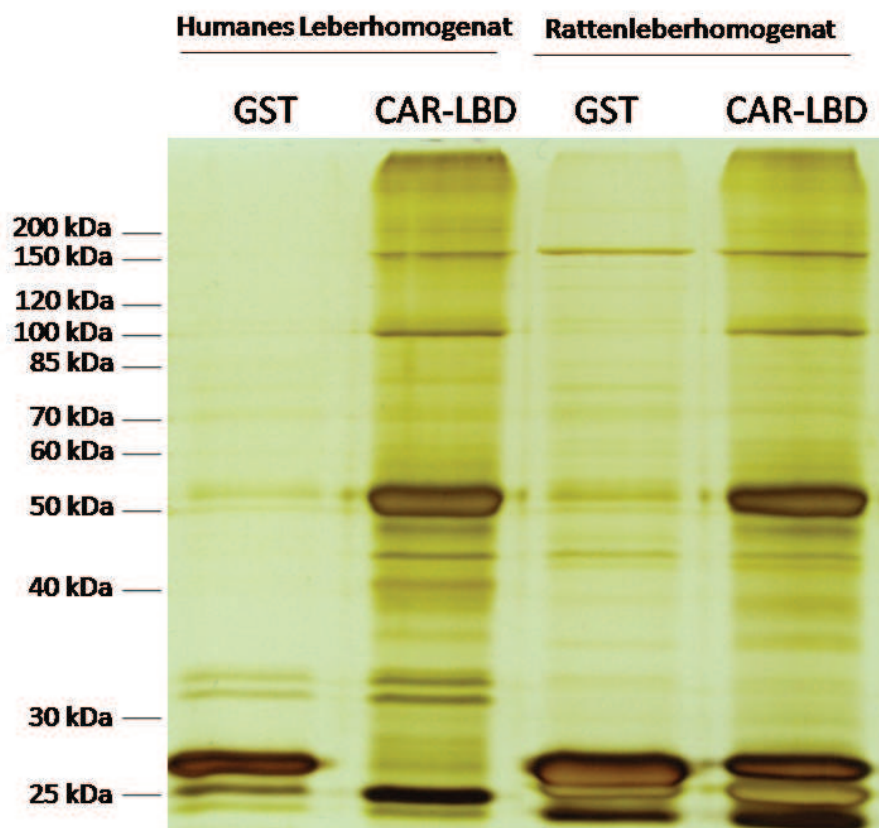


Abb. 4.7: Vergleich von aufgetrennten Proteinen aus Ratten- und Menschenleberhomogenat

Das Silbernitrat-gefärbte Gradientengel mit 7,5-15 % Polyacrylamidgehalt zeigt aufgetrennte Proteine aus einem Pulldown-Assay mit humanem Leberhomogenat bzw. Rattenleberhomogenat, die mit GST-CAR-LBD bzw. GST als Negativkontrolle assoziierten. Alle sichtbaren Proteinbanden wurden daraufhin ausgeschnitten und nach Präparation mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

In Abbildung 4.7 sind zum einen deutliche Unterschiede der Proteinmuster zwischen den Negativkontrollen und den GST-CAR-LBD-Fusionsproteinen zu erkennen. An die Negativkontrolle GST binden verhältnismäßig weniger Proteine als an GST-CAR-LBD. Zum anderen zeigten die an GST-CAR-LBD gebundenen Proteine aus humanem Leberhomogenat und Rattenleberhomogenat ähnliche Muster. Allerdings wurde bei dem Pulldown-Assay mit Rattenlebergewebe ein ca. 27 kDa großes Protein gefärbt, welches bei dem Assay mit humanem Lebergewebe bei den CAR-LBD-Proben nicht in dieser Intensität zu sehen war, aber auch in der GST-Negativkontrolle vorkommt. Bei diesem Protein könnte es sich um den GST-Anteil des degradierten Fusionsproteins handeln, welches bei den menschlichen Gewebeproben anscheinend nicht degradiert wurde. Insgesamt zeigten die Muster der Proteinbanden der Pulldowns mit GST-CAR-LBD große Ähnlichkeiten zwischen humanem und Rattenleberhomogenat. Massenspektrometrische Analysen der Banden zeigten jedoch bei den signifikant identifizierten Proteinen keine Übereinstimmungen der mit LBD-CAR assoziierten Proteine aus Rattenleber und humaner Leber. Die nachfolgende Tabelle 4.2 listet die reproduzierbar identifizierten Proteine aus humanem Leberhomogenat auf. Dabei wurden, wie schon zuvor bei Rattenleberhomogenat, Proteine berücksichtigt, die bei dem MASCOT-Suchalgorithmus und der NCBI-Datenbank einen Score von mehr als 61 aufwiesen und somit als signifikant eingestuft wurden.

**Tabelle 4.2: Interaktionspartner von GST-CAR-LBD aus humanem Leberhomogenat, identifiziert mittels MALDI-TOF-MS**

Die aufgelisteten Proteine wurden mittels MASCOT-Suchalgorithmus unter Verwendung der NCBI-Datenbank signifikant mit einem Score von mehr als 64 identifiziert. Dabei wurde der Durchschnitts-Score aller signifikanten Proteine ausgerechnet und in der Tabelle wiedergegeben.

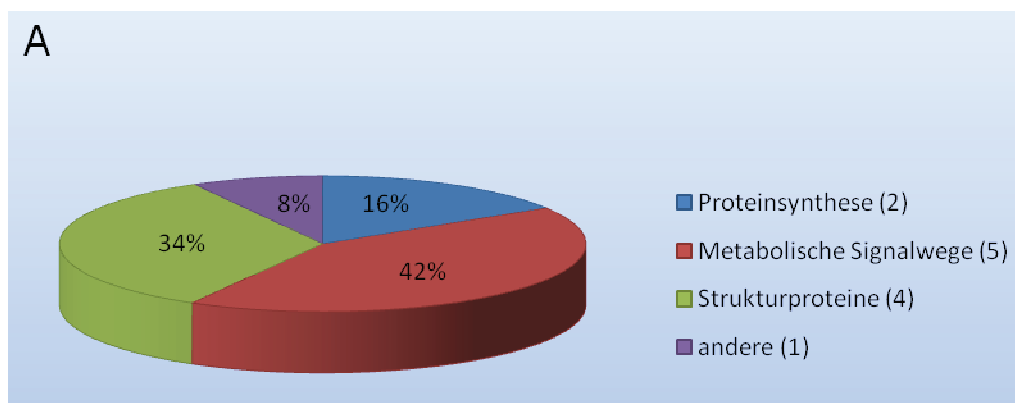
| Proteinname  | Zugangsnummer (NCBI) | Protein Molekulargewicht (in Dalton) | Funktion   | Score |
|--|----------------------|--------------------------------------|--|-------|
| <b>Leuzinzipper Transkriptionsregulator 2 (LZTR2/Sec16B)</b> | EAW91015             | 83.379                               | Verantwortlich für Sekretionstransport vom ER zum Golgi Apparat                                | 76    |
| <b>Carboxypeptidase X</b>                                    | EAX10575             | 86.443                               | Involviert in biologischen Prozessen wie Blutgerinnung, Wachstumsfaktorproduktion, Wundheilung | 70    |
| <b>Carbonylreduktase 1 (CBR1)</b>                            | BAA89424             | 30.641                               | NADPH-abhängige Oxidoreduktase mit Spezifität für  | 170   |

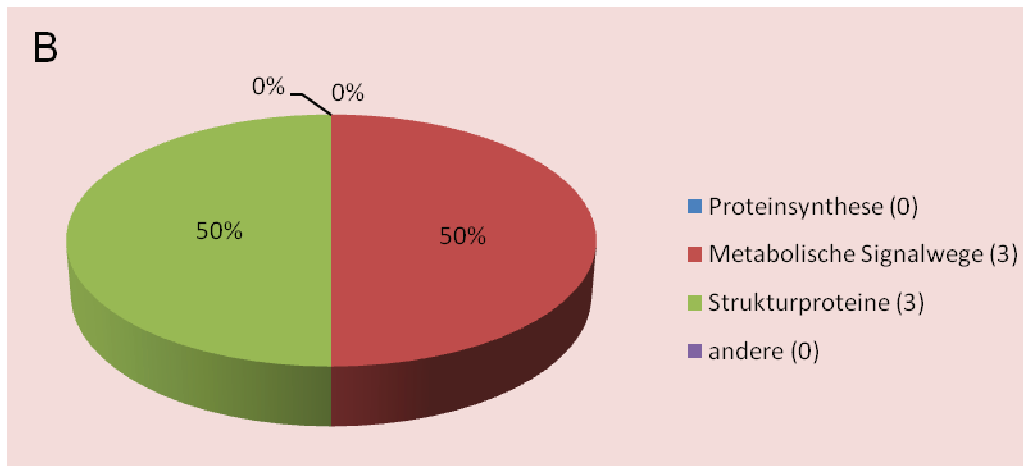
|   |           |        |  |    |
|---|-----------|--------|--|----|
|   |           |        | Carbonylkomponenten (z.B. Anthrazyklin Antibiotika); CBR1-SNPs reduzieren in vitro den Metabolismus von Antitumor Anthrazyklin-Antibiotika in Krebspatienten |    |
| <b>Phosphatidylinositol transferprotein 1, alpha isoform (PITPNA)</b> | NP_006215 | 22.056 | Involviert im Transport von Phospholipiden vom ER+ Golgi zu den Zellmembranen  | 78 |
| <b>Phosphoenolpyruvat carboxykinase 2 (mitochondrial) PEPCK2</b>      | EAW66115  | 71.483 | Katalysiert Umwandlung von Oxalacetat mittels GTP zu Phosphoenolpyruvat (Gluconeogenese)   | 69 |
| <b>Keratin 10</b>   | AAA60544  | 59.020 | Gehört zur Superfamilie der Intermediärfilamentproteine, involviert im Zytoskelett   | 89 |

Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifikation der mittels Pulldown aus humanem Lebergewebe isolierten Proteine mit Proteinname, Zugangsnummer in der Datenbank, Molekulargewicht in Dalton und Funktionalität

#### 4.2.4. Proteinverteilung nach funktionellen Eigenschaften

Mittels Massenspektrometrie konnten neue mit CAR-LBD interagierende Proteine identifiziert werden. In dieser Arbeit wurden massenspektrometrische Analysen von Pulldown-Proben mit Gesamtrattenleberhomogenat durchgeführt, um eine Übersicht aller Proteine in einem sogenannten „screening“ zu bekommen. Die Analysen zeigten nach wiederholten Experimenten die reproduzierbare Identifizierung der Proteine (siehe Kapitel 4.2.2), die sich anhand ihrer Funktionalität sowie ihrer Eigenschaften prozentual unterteilen lassen (Abb. 4.8 A und B).





**Abb. 4.8: Prozentuale Verteilung identifizierter Proteine nach funktionellen Eigenschaften**

Das dargestellte Schema zeigt den prozentualen Anteil der identifizierten Proteine aus Rattenleberhomogenat (A) und humanem Lebergewebe (B) gemäß ihrer Funktionalität. In Klammern ist in der jeweiligen Kategorie die absolute Anzahl der identifizierten Proteine aufgeführt.

Mit 42 % sind die meisten der identifizierten Proteine aus Rattenleberhomogenat, die an CAR-LBD gebunden haben, in metabolischen Signalwegen involviert. Die zweitgrößte Gruppe der gebundenen Proteine bilden mit 34 % die Strukturproteine. Neben den verschiedenen Subfamilien der faserförmigen Cytokeratine sind auch weitere Proteine identifiziert worden, mit dem Bewegungsapparat verknüpft sind. Als drittgrößte Gruppe wurden 16 % Proteine identifiziert, die wiederum einen wichtigen Bestandteil an der Synthese neuer Proteine darstellen. Jedoch sind mit 8 % auch Proteine aufgelistet, denen bisher keine bestimmte Funktion zugeordnet werden konnte und die meist als Vorläufer bestimmter Proteine erkannt wurden. Die meisten der identifizierten Proteine aus diesen Pulldown-Experimenten sind an Prozessen wie Proteinsynthese, Katalyse und metabolischer Regulation sowie in Strukturelementen des Bewegungsapparates oder der Muskulatur beteiligt. Die Proteine, die aus humanem Leberhomogenat identifiziert wurden, sind zu 50 % am Signalwegmetabolismus involviert und 50 % sind Strukturproteine

### **4.3. BAF 155 (SMARCC1) als neuer Interaktionspartner des Kernrezeptors CAR**

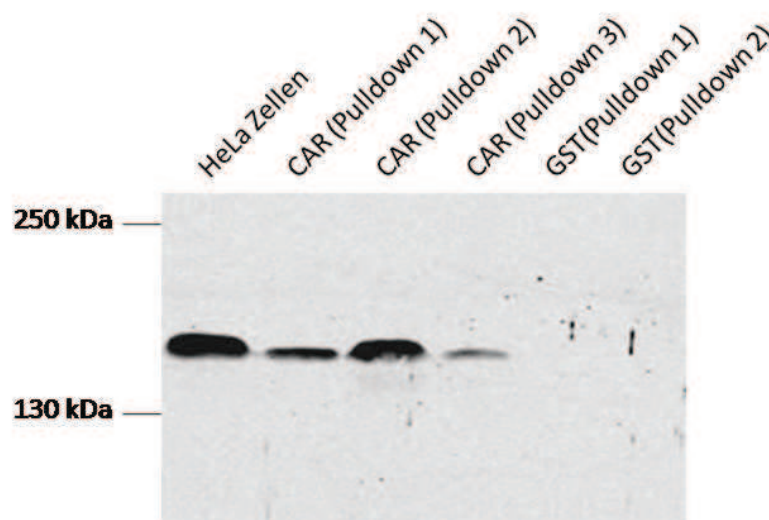
Ein interessanter potenzieller Interaktionspartner von CAR ist das in dieser Arbeit mittels MALDI-Massenspektrometrie identifizierte Protein SMARCC1, auch BAF 155 genannt



(Kapitel 4.2.1). BAF 155 steht für BRG1-assoziiertes Faktor und ist eine von 10 BAF-Untereinheiten des humanen SWI / SNF Chromatin Remodeling Komplexes, der als multimere enzymatische Maschinerie die nukleosomale Struktur mittels Energie aus der ATP-Hydrolyse verändert (Vignali et al, 2000). Der humane SWI / SNF Komplex besitzt neben den verschiedenen BAFs zusätzlich als katalytische ATPase entweder die Untereinheit BRG1 oder Brm (siehe Diskussion).

Der SWI / SNF Komplex spielt außerdem eine wichtige Rolle in grundlegenden zellulären Prozessen wie Transkription, Replikation und der Reparatur von Chromatin (Martens and Winston, 2003; Peterson and Cote). Da CAR ein Transkriptionsfaktor für verschiedene Zielgene darstellt und BAF 155 einen möglichen Einfluss auf diese Funktion von CAR haben könnte, wurde die Interaktion von BAF 155 und CAR in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden untersucht.

Zur Validierung der Interaktion von BAF 155 und CAR wurden Western Blots mit Pulldown-Proben durchgeführt. Dabei wurde das an das affinitätsgereinigte GST-CAR-LBD-Fusionsprotein gebundene Proteingemisch mit dem spezifischen monoklonalem anti-BAF 155-Antikörper inkubiert (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Detektion von BAF 155 in Pulldown-Assays**

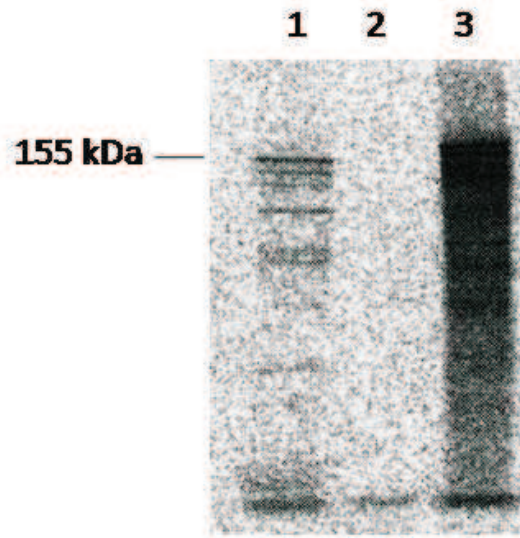
Es wurden gleiche Mengen Proteinproben aus verschiedenen Pulldown-Assays aufgetragen. Die Analyse erfolgte nach Auftrennung über SDS-PAGE mittels Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen BAF 155. Als Negativkontrolle wurden Proteine aus GST-Pulldown-Assays eingesetzt. In der ersten Spur wurde Gesamtzellenproteinextrakt von HeLa Zellen aufgetragen und mit anti-BAF 155-Antikörper inkubiert.

Im Western Blot (Abb. 4.9) wurde BAF 155 in drei verschiedenen Pulldownproben des GST-CAR-LBD-Fusionsproteins bei der erwarteten Größe von 155 kDa detektiert. Als Positivkontrolle wurde endogenes BAF 155 Protein aus einem Gesamtzellenextrakt von HeLa Zellen eingesetzt und ebenfalls von dem spezifischen Antikörper detektiert. Die Banden der Pulldown-Proben sind verglichen mit endogenem BAF 155 aus dem Gesamtzellextrakt von HeLa-Zellen etwas schwächer in der Signalintensität. Als Negativkontrolle wurden zwei Proben des an GST gebundenen Proteingemisches eingesetzt, in denen erwartungsgemäß kein BAF 155 detektiert wurde. Somit konnte das BAF 155 Protein mittels spezifischen Antikörpers als Interaktionspartner der CAR-LBD nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen den Pulldown-Assays von GST-CAR-LBD-Fusionsprotein und GST deutet auf spezifische Interaktionspartner hin. Zusätzlich wurde auch die Reproduzierbarkeit der Interaktion mit BAF 155 nachgewiesen.

### **4.3.1. Interaktion von BAF 155 und CAR *in vitro***

#### **4.3.1.1. [<sup>35</sup>S]-Methionin Markierung von BAF 155**

Für den GST-*in vitro*-Interaktionsassay bzw. autoradiografischen Nachweis der Bindung von CAR an BAF 155, wurde BAF 155 zunächst *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Der Unterschied zum *in vitro* Pulldown-Assay mit Leberhomogenat ist, dass hier der potenzielle CAR-Partner durch Überexpression in TNT-Retikulozytenlysate ein mehr oder weniger gereinigtes Protein darstellt, das zudem spezifisch markiert ist. Die Synthese des radioaktiven BAF 155 Proteins erfolgte durch *in vitro* Transkription/Translation unter Verwendung von <sup>35</sup>S markiertem Methionin und eines BAF 155 Expressionsplasmids. Das synthetisierte, radioaktiv markierte Protein BAF 155 wurde daraufhin mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend autoradiographisch mit Hilfe eines Phosphoimagers detektiert.



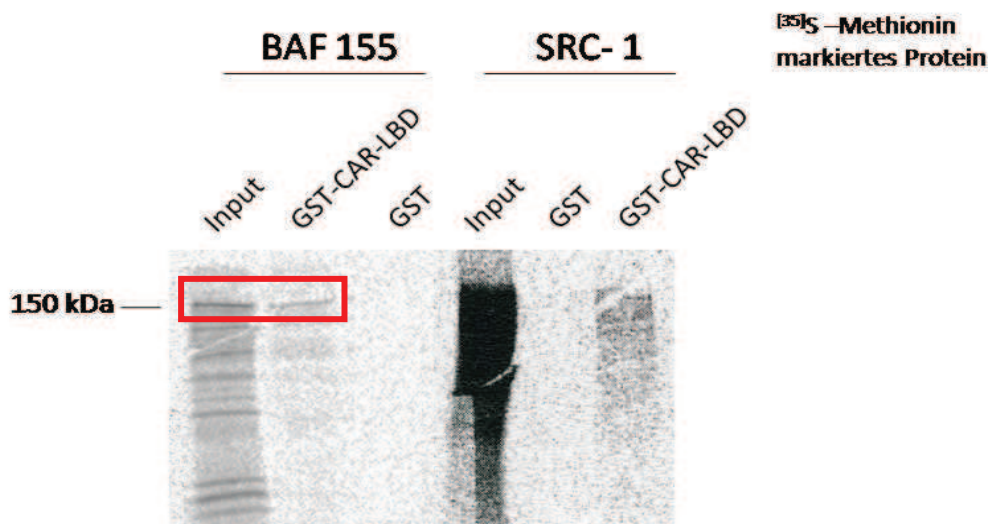
**Abb. 4.10: Synthese der [35S]-Methionin markierten TNT-Proteine**

Die Synthese der TNT- Proteine erfolgte in einem Retikulozyten-Lysat unter Verwendung von radioaktiven [35S]-Methionin und der Expressionsplasmide pCR3.1-SRC-1 und pcDhuBAF 155. Die translatierten TNT-Proteine wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in einem Phosphoimager exponiert. Spur 1 zeigt das Volllängen-Protein BAF 155 bei 150 kDa. Als Positivkontrolle wurde der Ko-Aktivator von CAR, das SRC-1 Protein translatiert (Spur 3). Zur Kontrolle der Synthese wurde in Spur 2 als Negativkontrolle der Leervektor pcDNA 3.1 eingesetzt.

Abbildung 4.10 zeigt die Radioaktivmarkierung von BAF 155 sowie als Negativkontrolle eine *in vitro* Transkription/Translationsreaktion mit dem leeren Expressionsplasmid pcDNA3.1. Als Positivkontrolle für den Bindungsassay *in vitro* wurde ein in der Literatur beschriebener Ko-Aktivator von CAR, das SRC-1 Protein, radioaktiv markiert. Das translatierte BAF 155 zeigte in Spur 1 die erwartete Bandengröße von ca. 155 kDa. Jedoch waren auch Proteine unterhalb des Molekulargewichts von BAF sichtbar, die möglicherweise durch Degradationen oder interne Starts der Translation entstanden sind. In Spur 2 ist kein Signal zu sehen, was bedeutet, dass erwartungsgemäß kein Protein bei der Negativkontrolle radioaktiv markiert wurde. Das synthetisierte SRC-1 in Volllänge zeigte einen Schmier mit leicht unscharfen Proteinbanden unterhalb der Größe von 160 kDa, die vermutlich auch auf Degradationen zurückzuführen sind. Die [35S]-markierten Proteine BAF 155 und SRC-1 wurden anschließend im *in vitro* Bindungsassay zur Untersuchung einer Interaktion mit CAR eingesetzt (4.3.1.2).

#### 4.3.1.2. Interaktion von BAF 155 und CAR im Bindungsassay *in vitro*

Zur Bestätigung der Interaktion zwischen BAF 155 und CAR wurde das an Glutathion-Sepharose gebundene und affinitätsgereinigte Fusionsprotein GST-CAR-LBD mit dem *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten BAF-Protein inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das an GSH-Sepharose gebundene affinitätsgereinigte GST-Protein mit radioaktivem BAF inkubiert, als Positivkontrolle für eine Interaktion mit CAR diente das *in vitro* translatierte und radioaktiv markierte SRC-1 Protein. Nach gründlichem Waschen der Inkubationsansätze und anschließender elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte die Auswertung autoradiographisch mit einem Phosphoimager (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11: Interaktion zwischen BAF 155 und CAR im GST-Bindungsassay *in vitro***

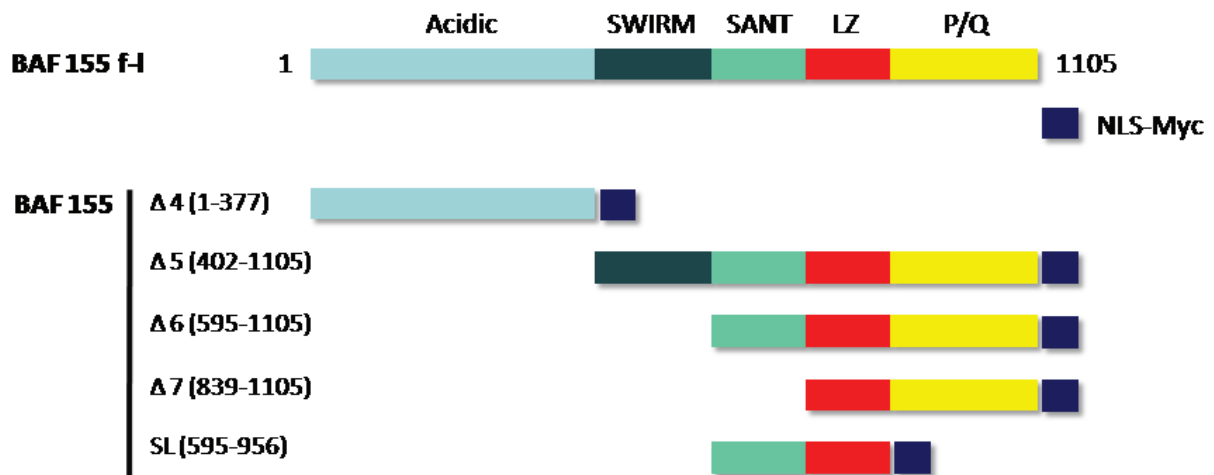
Im GST-Bindungsassay wurden die Retikulozytenlysate mit den translatierten und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten Proteinen BAF 155 bzw. SRC-1 mit GST-CAR-LBD- bzw. GST-Sepharose (Negativkontrolle) inkubiert. Die Sepharosematrix wurde anschließend gewaschen, die gebundenen Proteine in reduzierendem Probenpuffer denaturiert und elektrophoretisch auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurden jeweils 10 µl des verdünnten radioaktiven BAF 155 bzw. SRC-1 in den linken Spuren verwendet (10 % der im Pulldown eingesetzten Proteinmenge). Die Detektion der gebundenen Proteine an die radioaktiv markierten TNT-Proteine erfolgte durch Autoradiographie. Der rote Kasten zeigt hierbei das detektierte BAF 155 Protein.

Der Bindungsassay (Abb. 4.11) zeigte eine Interaktion von BAF 155 mit der Ligandenbindungsdomäne des Kernrezeptors CAR *in vitro* (roter Kasten). Die Bande der interagierenden Proteine bei der erwarteten Größe von 150 kDa ist quantitativ gesehen schwächer verglichen mit der Inputbande. Die Inkubation von translatiertem BAF 155 und GST zeigte erwartungsgemäß keine Bande und damit keine Interaktion. Wie erwartet wurde

eine Wechselwirkung des [35S]-Methionin radioaktiv markierten Koaktivator SRC-1 mit der CAR-LBD nachgewiesen. Die LBD besitzt eine Bindungsdomäne für Ko-Aktivatoren sowie für Ko-Repressoren. Auch hier ist das Signal des gebundenen SRC-1 schwächer verglichen mit dem eingesetzten SRC-1 (Input), was auf eine geringere Menge an radioaktiv gebundenem Protein schließen lässt und somit wenig an die CAR-LBD gebunden werden kann, wie die schwache Interaktion zeigt. Zudem ist eine Degradation des Proteins in Form von Banden unterhalb des erwarteten Molekulargewichtes sichtbar. Inkubierte man affinitätsgereinigtes GST mit radioaktivmarkiertem SRC-1, zeigte sich kein radioaktives Signal. Proteine, die unterhalb der erwarteten Molekulargrößen von den translatierten Proteinen BAF 155 und SRC-1 auch in weiteren Wiederholungen des Versuchs beobachtet wurden, könnten durch Proteolysereaktionen verursacht worden sein. Zusammengefasst konnte eine Interaktion von BAF 155 und CAR reproduzierbar durch den *in vitro* Bindungsassay bestätigt werden.

#### **4.3.2. *In vivo* Interaktion von BAF 155 und CAR mittels Ko-Immunpräzipitation und Identifizierung der Interaktionsdomäne**

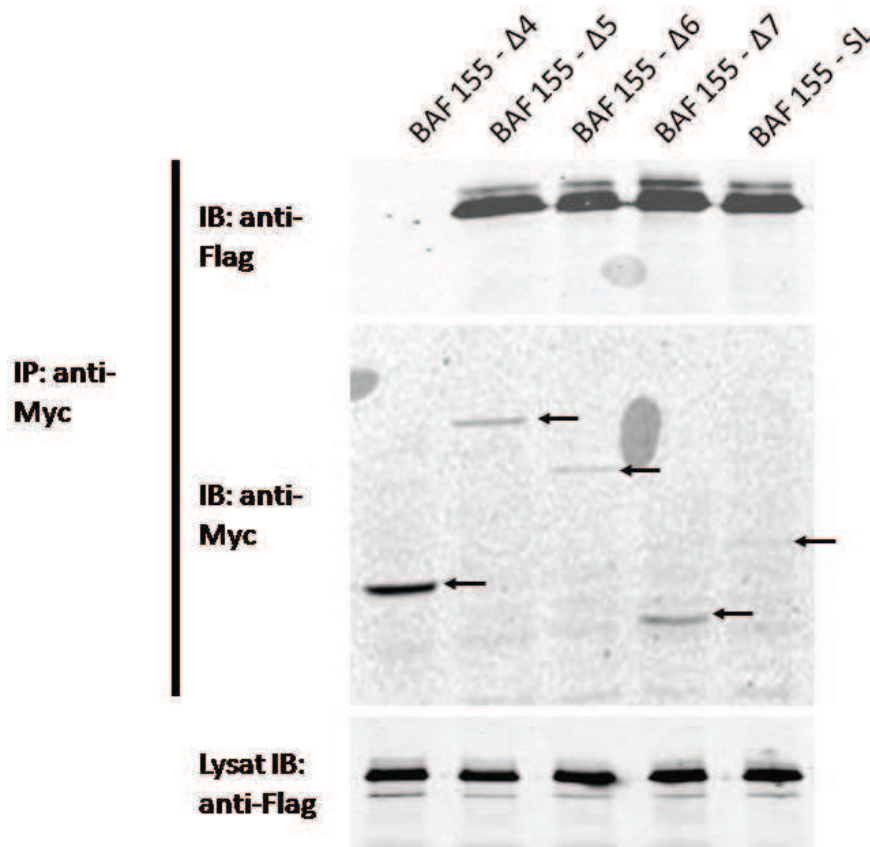
Zum Nachweis von Protein-Interaktionen in eukaryotischen Zellen wurden Extrakte aus transfizierten Zellen immunchemisch analysiert. Um die Interaktion von BAF 155 und CAR *in vivo* zu überprüfen und zudem zu ermitteln, welche Domäne von BAF 155 mit CAR interagiert, wurden COS-1-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion (3.2.1.3) mit unterschiedlich großen BAF-Konstrukten, die alle ein Myc-Epitop und ein nukleares Lokalisationssignal (NLS) besaßen, sowie einem Flag-markiertem CAR-Protein ko-transfiziert. Die unterschiedlich großen BAF-Konstrukte sind in Abbildung 4.12 schematisch dargestellt.



**Abb. 4.12: Schematische Darstellung unterschiedlicher BAF 155 Konstrukte**

Schematisch dargestellt sind die unterschiedlich großen humanen BAF 155 Deletionskonstrukte mit ihren funktionellen Domänen, zusammen mit dem 1105 Aminosäuren großen BAF 155 Volllängenprotein (f-l). Alle Mutanten wurden mit einem nuklearen Lokalisationssignal (NLS) und einem Myc-Epitop im C-Terminus fusioniert. LZ = Leuzinzipper Region; P/Q = Prolin- und Glutaminreiche Region (modifiziert nach Cheng and Archer, 2005).

Neben dem BAF 155-Volllängenprotein (f-l) mit einer Größe von 1105 Aminosäuren sind fünf unterschiedlich große BAF 155-Deletionsmutanten ( $\Delta 4$ ,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 7$  und SL) eingesetzt worden (Abb. 4.12). Das Volllängen-BAF 155 besitzt eine Region, die reich an sauren Aminosäuren ist (Acidic), die SWIRM- und SANT-Regionen sowie eine Leuzinzipperdomäne (LZ) und eine Region im C-Terminus, die Aminosäuren wie Prolin und Glutamin (P/Q) in großer Menge aufweisen. Um eine Interaktion *in vivo* zu bestätigen, wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die aus dem COS-1-Zelllysat extrahierten Proteine mit dem monoklonalem anti-Myc-Antikörper inkubiert, der das C-terminale Myc-Epitop der verschiedenen BAF 155 Konstrukte detektiert. Die Immunpräzipitate wurden mehrfach gewaschen und anschließend Western Blots mit einem anti-Flag-Antikörper durchgeführt, um das Flag-Epitop von CAR zu detektieren und somit eine Interaktion zwischen beiden Proteinen *in vivo* nachzuweisen (Abbildung 4.13, oberer Abschnitt).



**Abb. 4.13: Interaktion zwischen BAF 155 und CAR *in vivo***

COS-1-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen BAF 155 Deletionskonstrukte und mit einem Expressionsplasmid für CAR-Flag ko-transfiziert. Proteingeesamtzellextrakte wurden präpariert und mit einem anti-Myc-Antikörper inkubiert. Nach der Auftrennung der Immunpräzipitate auf einem SDS-PAGE erfolgte die Analyse im Western Blot mit anti-Flag-Antikörper (oberer Abschnitt). Anschließend wurden die Antikörper von dieser Membran abgewaschen und die Membran mit anti-Myc-Antikörper inkubiert (mittlerer Abschnitt), um die Expressionsstärke der BAF-Konstrukte zu überprüfen. Die Pfeile deuten dabei auf die unterschiedlichen Molekulargewichte der unterschiedlich großen BAF 155 Konstrukte hin. Proteingeesamtzellextrakte wurden im Immunoblot mit anti-Flag-Antikörper inkubiert (unteres Bild).

Der verwendete anti-Flag-Antikörper zeigte ein deutliches Signal bei vier der eingesetzten BAF 155 Deletionskonstrukten, sodass eine Interaktion zwischen diesen und CAR *in vivo* bestätigt werden konnte (Abb. 4.13). Dabei zeigte CAR eine Ko-Immunpräzipitation mit BAF 155-Δ5, BAF 155-Δ6, BAF 155-Δ7 und BAF 155-SL, jedoch nicht mit BAF 155-Δ4. Aufgrund des dargelegten Ergebnisses der Immunpräzipitation scheint die Leuzin-Zipper Region von BAF 155, die alle Deletionsmutanten außer Δ4 aufweisen, eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit CAR zu spielen.

Um die Expressionstärke der immunpräzipitierten unterschiedlich großen BAF-Proteine zu überprüfen, wurden die Präzipitate auf einem SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und

mittels Western Blot mit demselben anti-Myc-Antikörper, der zur Immunpräzipitation verwendet wurde, analysiert. Dabei wurden die mit dem Myc-Epitop markierten BAF-Konstrukte detektiert. Die verschiedenen BAF 155 Konstrukte wurden unterschiedlich stark von dem anti-Myc-Antikörper im Western Blot detektiert (Abb. 4.13, mittlerer Abschnitt, Pfeile). Der Expressionsunterschied zwischen BAF 155-Δ4 und BAF 155-ΔSL war dabei verhältnismäßig am größten. Jedoch wird in dem Blot auch ersichtlich, dass die restlichen BAF 155 Konstrukte ebenfalls schwächer in der Expressionsintensität sind als BAF 155-Δ4.

Als folgendes Kontrollexperiment zur Validierung der Ko-Immunpräzipitation wurden Western Blots mit Gesamtzellextrakt aus COS-1-Zellen durchgeführt. Diese essenzielle Kontrolle dient der Überprüfung, ob alle CAR-Flag in allen Transfektionsansätzen des Versuchs gleichmäßig exprimiert sind. Dabei sollte der anti-Flag-Antikörper das Flag-Epitop von CAR detektieren.

Die Abbildung 4.13 (unterer Abschnitt) zeigt in allen Spuren starke Banden bei ca. 36 kDa an, welche dem Molekulargewicht des Flag-markiertem CAR entsprechen. Das bedeutet, dass die CAR-Flag gleichmäßig exprimiert wurden und das Ergebnis des obersten Abschnitts nicht durch eine schlechte CAR-Flag Expression bei der Transfektion mit dem BAF 155-Δ4 Konstrukt zustande gekommen ist.

Abschließend zeigen diese Experimente *in vivo*, dass die Leuzin-Zipper Region von BAF 155 essenziell für eine Interaktion mit CAR ist.

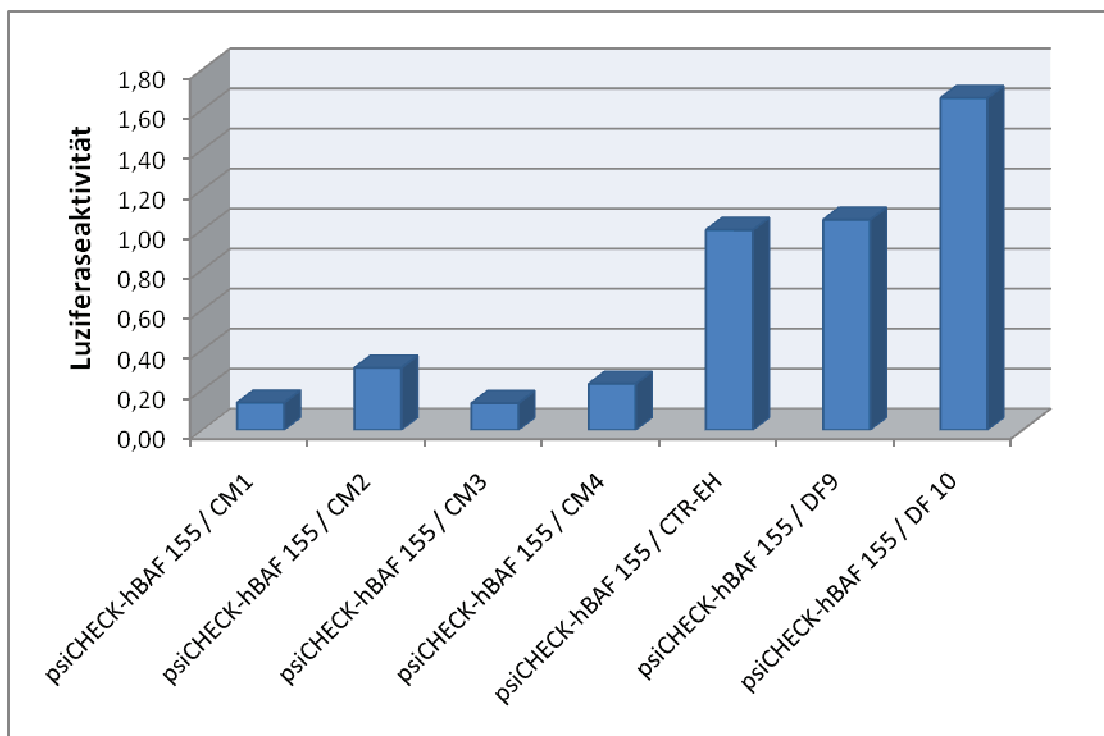
### **4.3.3. Untersuchung der BAF 155 Funktion in der CAR-abhängigen Genregulation**

Die Ergebnisse aus 4.3.2 haben gezeigt, dass BAF 155 mit CAR sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* interagiert. Zudem wurde BAF 155 im Western Blot bei Proben aus dem GST-CAR-LBD-Pulldown-Assay in der erwarteten BAF 155 Proteingröße mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert. Es stellt sich nun die Frage, welche Bedeutung der Interaktion mit BAF 155 für die Aktivität von CAR zukommt. Um diese Frage untersuchen zu können, wurde ein methodischer Ansatz gewählt, bei dem die Expression von BAF 155 durch RNA-Interferenz herunterreguliert werden sollte, um anschließend die Auswirkung dieses „knock downs“ von BAF 155 auf die Aktivität von CAR untersuchen zu können. Dazu wurde zunächst die Funktionalität von vier BAF 155 shRNA-Konstrukten (Abkürzung: CM 1-4) mit



dem bereits etabliertem psiCHECK System für funktionale Tests von si / shRNAs getestet. Zu diesem Zweck wurde BAF 155 in den Plasmidvektor psiCheck-2 kloniert (psiCHECK-hBAF155). Die in pENTR-Vektor klonierten BAF 155 shRNA Konstrukte CM 1-4 wurden zusammen mit dem psiCheck-hBAF155 Plasmid in HEK 293 Zellen ko-transfiziert und im Anschluß die Reporteraktivität gemessen. Es wurden dabei vier verschiedene shRNA Konstrukte verwendet, die unterschiedliche Teilbereiche von BAF 155 abdecken (psiCHECK-hBAF 155 / CM1-CM4). Als Negativkontrollen wurden verschiedene pENTR Leerplasmide CTR-EH, DF9 und DF 10 ko-transfiziert. Die Abbildung 4.14 zeigt die Luziferaseaktivität im Reporterassay mit einer jeweils eingesetzten Menge von 0,2 µg pENTR-shRNA der BAF 155 Konstrukte bzw. Negativkontrollen.

### HEK Zellen

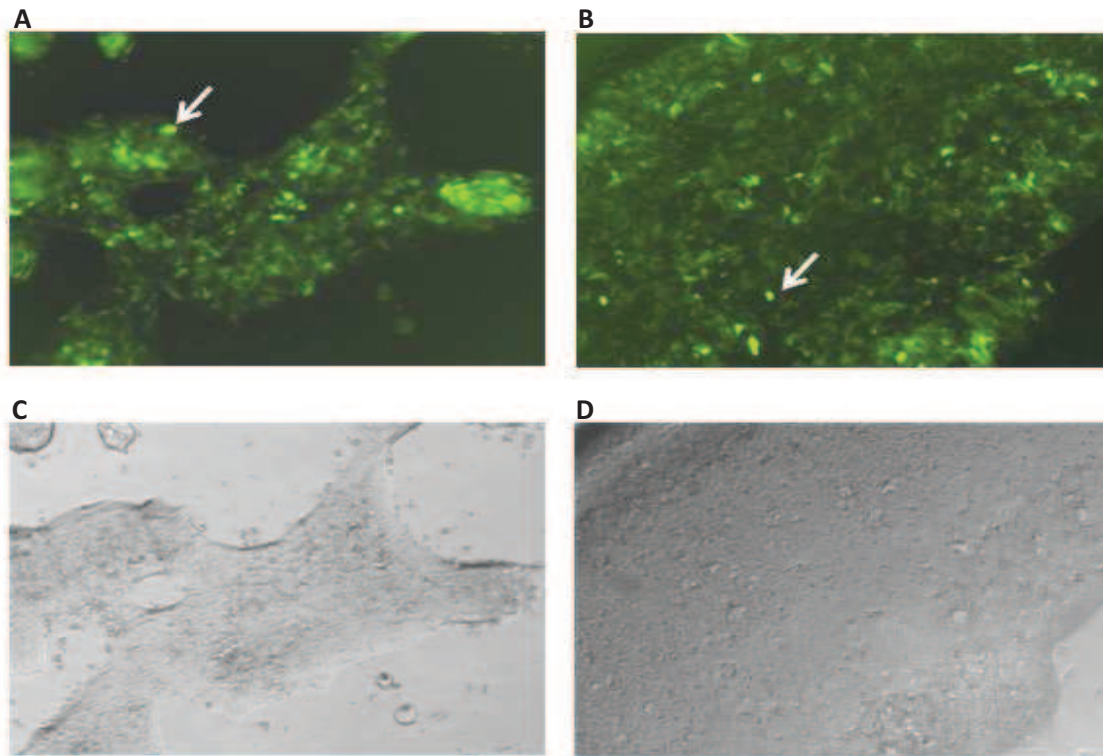


**Abb. 4.14: Effekt der shRNA BAF 155 Konstrukte in HEK Zellen**

Im Reporterassay wurden HEK 293-Zellen mit dem Reporterplasmid psiCheck, in welches das BAF 155 Gen kloniert wurde und mit jeweils 0.2 µg der entsprechenden pENTR-shRNA Konstrukte CM 1-4 ko-transfiziert. Die Reporteraktivität wurde 48 h nach der Transfektion gemessen. Die Balken zeigen die Aktivität nach Ko-Transfektion des BAF 155 psiCheckvektors mit den verschiedenen BAF 155 shRNA Konstrukten CM 1, CM 2, CM 3 und CM 4 bzw. Kontroll-shRNA (Abkürzung: CTR-EH, DF9 und DF 10).

Die Ko-Transfektion von BAF 155-shRNA-Konstrukten hemmt die Reporteraktivität des BAF 155-psiCheck Plasmids in HEK 293-Zellen, im Vergleich zur Ko-Transfektion der

Kontroll-sh-RNAs (Abb. 4.14). Das Balkendiagramm zeigt, dass die BAF 155-shRNA Konstrukte CM 1 und CM 3 die Reporteraktivität besser reprimieren als CM 2 und CM 4. Somit konnte die inhibierende Wirkung der vier BAF 155 shRNA-Konstrukte auf die Genexpression von BAF 155 im Reporterassay mit dem psiCHECK-Vektorsystem demonstriert werden.



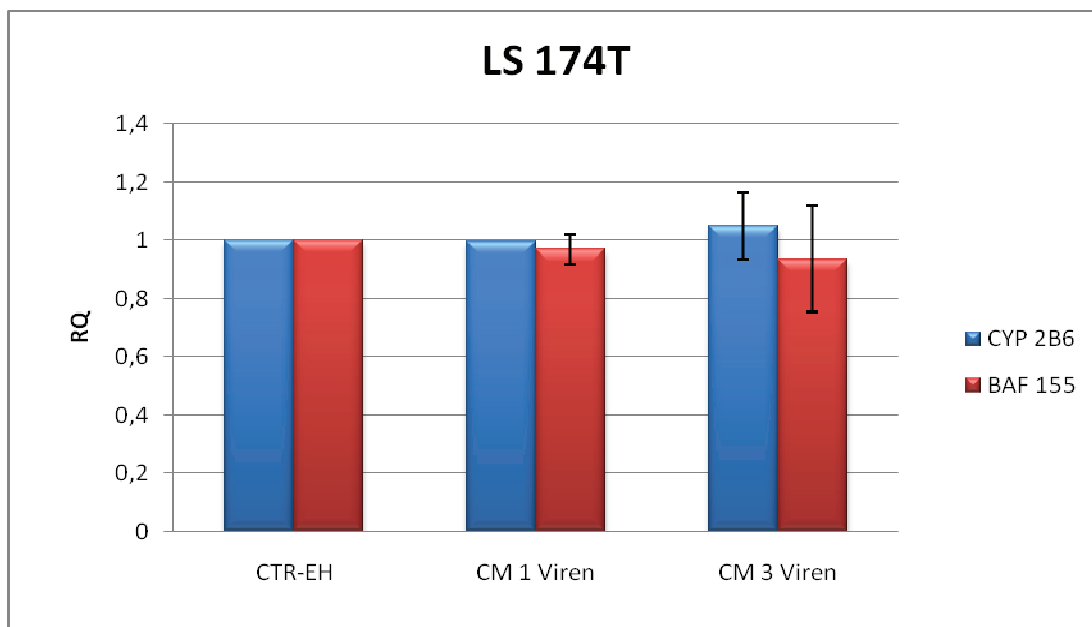
**Abb. 4.15: Infektion von LS-CAR-Zellen mit BAF 155 CM1-Viren**

LS174T Zellen, die CAR stabil exprimieren, wurden mit BAF 155 CM1-Lentiviren infiziert. Fünf Tage nach der viralen Infektion ist eine großflächige Grünfluoreszenz des GFP-Proteins in den Zellen sichtbar. Stark fluoreszierende Zellen werden beispielhaft durch Pfeile angedeutet (A, B). (C) bzw. (D) stellen die zu (A) bzw. (B) dazugehörigen Durchlichtaufnahmen dar.

Um nun die Genregulation durch BAF 155 zu untersuchen, wurden Lentiviren produziert. Dazu wurden eigens hergestellte BAF 155 shRNA-Expressionskassetten in pLenti-Vektoren kloniert und HEK 293FT-Zellen mit diesen transfiziert. LS174T-Zellen, die CAR stabil exprimieren (Burk et al, 2005), wurden mit den aus den HEK-Zellen isolierten BAF 155-Viren infiziert und nach 5-tägiger Inkubation anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Die mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels Taqman real-time RT-PCR relativ quantifiziert. Die Infektionsrate der Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität des mit den shRNA-Konstrukten ko-exprimierten GFP-Proteins mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen. In Abbildung 4.15 sind solche Fluoreszenzaufnahmen beispielhaft dargestellt.

In den Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 4.15A und B) sind unter dem Mikroskop LS-CAR-Zellen mit grüner Fluoreszenz zu sehen. Diese stellt durch GFP sichtbare Infektion der Zellen dar, die auch Indiz für die shRNA-Expression sein sollte. Die Abbildungen 4.19 C und D stellen die zu den Fluoreszenzaufnahmen dazugehörigen Durchlichtbilder dar. Um zu überprüfen, ob BAF 155 in regulatorische transkriptionale Aktivitäten von CAR involviert ist, wurde in den folgenden knockdown-Experimenten die Expression des CAR-Zielgens CYP2B6 sowie des BAF 155 Gens in LS-CAR Zellen untersucht. Dabei wurden nur die shRNA-Konstrukte CM 1 und CM 3 eingesetzt, da diese am besten die Luziferaseaktivität reprimierten sowie die Negativkontrolle CTR-EH zur Kalibrierung.

Die Abbildung 4.16 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA aus infizierten LS174T Zellen durch Taqman real-time RT-PCR.



**Abb. 4.16: Effekt der Genregulation durch BAF 155**

LS174T Zellen, die CAR stabil exprimieren, wurden viral mit siRNA BAF 155 CM1 und CM3 Konstrukten infiziert und nach 72 Stunden die RNA präpariert. Zur Kalibrierung wurde der Kontrollplasmid CTR-EH verwendet. Die mRNA Level von BAF 155 und CYP2B6 wurden mittels Taqman real-time RT-PCR relativ quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung.

Zur relativen Quantifizierung wurde die CYP2B6- bzw. BAF 155-Expression der mit dem Kontrollplasmid CTR-EH infizierten Zellen auf 1 gesetzt und die Expressionsstärke der Gene in den mit CM1- bzw. CM3-Konstrukten infizierten Zellen relativ zu dieser Kontrolle angegeben. Wie Abbildung 4.16 zu entnehmen ist, zeigten die CM1 und CM 3 Viren mit Regulationsfaktoren von 0,0033 (bei CYP2B6 / CM1 Viren) bis 0,0621 (BAF 155 CM 3 Viren) keinen Einfluss auf die mRNA Expression von BAF 155 (roter Balken) sowie von

CYP2B6 (blauer Balken). Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die shRNA-Konstrukte kein Knockdown von BAF 155 und somit ebenso keine Expressionsveränderung des Zielgens CYP2B6 hervorgerufen wurde.

Die Funktionalität der shRNA-Konstrukte BAF 155 CM 1 und CM 3 konnte somit zwar im Reporterassay demonstriert werden, jedoch konnte in einem Pilotversuch kein „knock down“ von BAF 155 in den CAR-exprimierenden LS174T-CAR Zellen durch Infektion mit BAF 155 shRNA Lentiviren erzielt werden.

## **5. Diskussion**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein mit der Ligandenbindungsdomäne des Kernrezeptors CAR hergestellt und in Pulldown-Assays zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen eingesetzt. Beim Pulldown-Assay erfolgte die Inkubation des Fusionsproteins mit Leberhomogenat (von Mensch und Ratte), um sich einen Gesamtüberblick über die Proteine in der Leber zu verschaffen, die mit dem Kernrezeptor interagieren. Um mögliche Interaktionspartner von CAR nicht zu verlieren, wurde auch keine Fraktionierung des Leberhomogenats durchgeführt. Die nach dem Pulldown von den Affinitätsäulen eluierten Proteine wurden über eindimensionale Gele aufgetrennt, um auch Membranproteine als putative Interaktionspartner von CAR zu untersuchen, die bei 2D-Gelelektrophorese aufgrund hydrophober Eigenschaften nicht in die 1. Dimension eintreten (Hartinger et al., 1996). Die Analyse der Proteine erfolgte schließlich mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Auf diese Weise wurde das Protein BAF 155 als interessanter Interaktionspartner von CAR identifiziert. BAF 155 ist ein Bestandteil des SWI / SNF Chromatin-remodeling Komplexes (Martens und Winston, 2003). Desweiteren wurden Proteine identifiziert, die als Enzyme in einer Vielzahl von Signalwegen involviert sind, aber auch Struktur- und Transportproteine. Eine Auswahl dieser putativen Interaktionspartner von CAR wird in dieser Arbeit diskutiert.

### **5.1. Pulldown-Assay zur Untersuchung von CAR-interagierenden Proteinen**

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde Leberhomogenat mit Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-CAR-LBD-Fusionsprotein inkubiert. Die eluierten Proteine wurden auf eindimensionalen Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, um auch eventuell gebundene Membranproteine als putative Interaktionspartner zu identifizieren. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften lassen sich Membranproteine bei der 2D-Gelelektrophorese durch die in der ersten Dimension verwendeten Detergenzien schlecht solubilisieren (Hartinger et al., 1996). Daher tritt ein Großteil dieser Proteine nicht in die erste Dimension

ein. Zudem kann es zur Aggregation der Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt im Gel kommen.

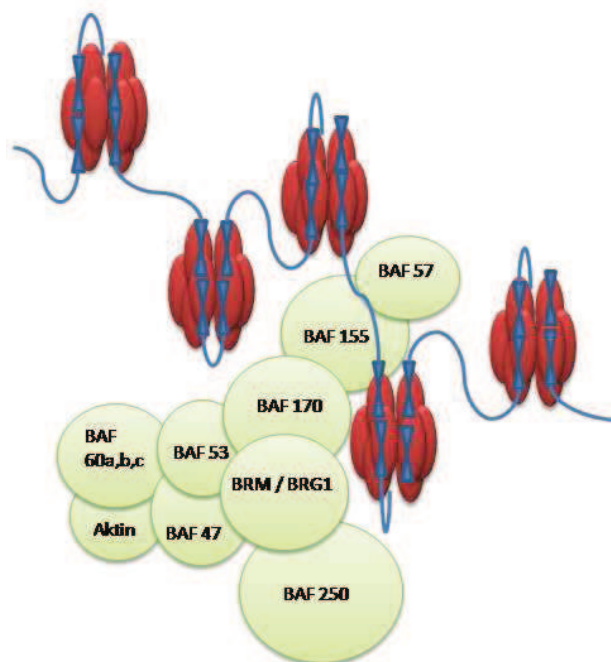
Um den Pulldown-Assay auf dessen Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden mehrere Assays unter gleichen Bedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.2), analysiert und die aufgetrennten Proteine nach MALDI-Identifizierung miteinander verglichen. Problematisch waren die anfänglichen Waschbedingungen mit weniger stringenten Waschpuffern wie NaCl, bei denen sich die Proteinmuster von GST-CAR-LBD nicht von denen der GST-Negativkontrolle unterschieden. Da die eindimensionalen Gele aber in der Regel zuverlässig sind, wurde der Pulldown als Schwachstelle angenommen. Somit wurde als erste Überlegung die Optimierung der Waschbedingungen in Betracht gezogen. Versuche, die unspezifisch an das Fusionsprotein gebundenen Proteine in den Waschschritten mit 2 M Harnstoff abzulösen (Abb. 4.3), resultierten generell in stringenter Dissoziation vieler Proteine, unter denen möglicherweise auch spezifisch an die CAR-LBD gebundene Proteine sein könnten. Die dargestellten Silbernitrat gefärbten Gele der an GST-CAR-LBD gebundenen Proteine zeigten nach den Waschschritten mit 0,5 M Harnstoff (Abb. 4.3 C) dabei ähnliche Proteinmuster wie nach den Waschschritten mit 2 M Harnstoff (Abb. 4.3 B). Die nach dem Pulldown an GST gebundenen Proteine wurden mit 2 M Harnstoff effizient gewaschen. Um einen Verlust von eventuell spezifisch an CAR gebundenen Proteinpartnern zu vermeiden, wurde die Harnstoffkonzentration auf 0,5 M gesenkt. Ein Vergleich der gebundenen Proteine an GST und GST-CAR-LBD zeigte einen deutlichen Unterschied. Nach den Waschschritten mit 0,5 M Harnstoff waren bei GST ähnlich viele Proteine wie bei 2 M Harnstoff zu sehen, bei dem Pulldown mit der GST-CAR-LBD waren jedoch nach Waschen mit 0,5 M Harnstoff deutlich mehr Banden sichtbar als mit 2 M Harnstoff. Mittels MALDI-MS konnten dabei das Protein BAF 155 sowie verschiedene Enzyme, Transport- und Strukturproteine identifiziert werden (Abb. 4.3). Der Pulldown-Assay mit anschließender MALDI-MS hat den Vorteil, dass keine spezifischen Antikörper wie beim Western Blot zur Untersuchung von Interaktionen benötigt werden und somit auch bislang unbekannte Interaktionspartner gefunden werden können. Im Vergleich zu anderen Methoden für Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen mittels „Yeast Two Hybrid“ (Y2H) Methode (Fields and Sternglanz, 1994) oder „Mammalian Two Hybrid System“ (Luo et al, 1997), ist der Pulldown jedoch weniger zeitintensiv und wurde schon bei vielen verschiedenen Geweben eingesetzt (Kurahashi et al, 2000). Beide „two hybrid“ *in vivo* Systeme basieren auf einer Protein-Protein-Interaktion-abhängigen Reporter-genaktivierung. Der Unterschied bei beiden Systemen ist, dass bei dem Y2H-System Hefe als Expressionssystem verwendet wird, bei dem anderen System Säugerzelllinien. Zwei

Vorteile bei dem Säuger-System bestehen darin, dass die ersten Ergebnisse schon 48 h nach Transfektion erhalten werden und dass Proteininteraktionen in Säugetierzellen als *in vivo*-Interaktionen besser nachgestellt werden können. Für die Y2H-Methode werden zwei Hybridproteine benötigt. Hybridprotein 1 besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne und einem zu untersuchenden Protein, während das Hybridprotein 2 aus einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne fusioniert mit einem putativen Interaktionsprotein zusammengesetzt ist. Die putative Interaktion findet ausschließlich im Zellkern statt, da beide an den Ribosomen translatierten Hybridproteine dorthin translozieren. Nur wenn die beiden Hybridproteine miteinander interagieren, sind sie als funktioneller Transkriptionsfaktor in der Lage, die Transkription des Reportergens zu aktivieren. Kommt es zu keiner Interaktion beider Proteine, wird das Reporterprotein (z.B.  $\beta$ -GAL) nicht exprimiert (Fields and Song, 1989). Bei der Durchführung des Pulldown-Assays mit GST-Fusionsproteinen können mit dem GST-Protein interagierende Proteine als Negativkontrolle schnell ausgeschlossen werden. Ein Nachteil beider Methoden gleichermaßen ist der hohe Anteil an falsch-positiven Interaktionen (Bartel et al., 1993). In den Pulldown-Assays dieser Arbeit haben viele Proteine an das GST-CAR-LBD-Fusionsprotein sowie an GST gebunden, jedoch wurden die wenigsten nach der MALDI-TOF massenspektrometrischen Analyse und der MASCOT Datenbanksuche als putative Interaktionspartner von CAR signifikant identifiziert. Als signifikant wurden identifizierte Proteine bezeichnet, wenn der Proteinscore bei der Datenbankanalyse höher als 61 betrug (siehe Kapitel 3.2.6.5). Viele der signifikant identifizierten Proteine interagierten sowohl mit der LBD von CAR als auch mit der GST-Negativkontrolle. Aufgrund dessen wurden diese Proteine nicht weiter untersucht. Zu den falsch-positiven Proteinen zählen auch diverse Keratine wie Keratin 6, 13, und 19, die in der Haut und im Haar vorkommen und somit wahrscheinlich als Verunreinigung in der Probe gelangten.

## **5.2. CAR-Interaktionspartner BAF 155 als Mitglied des SWI / SNF Komplexes**

Das Protein BAF 155, auch SMARCC1 genannt, konnte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie als Interaktionspartner von CAR identifiziert werden. Methoden zur Validierung der Interaktion mit CAR wie radioaktiv markierte TNT-Proteine in GST-

Pulldown-Assays, Ko-Immunpräzipitationen und Western Blot (siehe Kapitel 4.3) bestätigten diese. BAF 155 ist Bestandteil eines großen SWI / SNF Komplexes (Abb. 5.1), der die Fähigkeit aufweist, Chromatin umzuwandeln. Der SWI / SNF Komplex wurde in den frühen 1980er Jahren als erstes in Hefe entdeckt. Zu dieser Zeit wurden Gene untersucht, die das paarungstypische Umwandeln (switching, SWI) und die Saccharosefermentation (SNF) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beeinflusst haben (Carlson et al, 1981). Die SWI / SNF Chromatin-remodeling Komplexe sind evolutionär konservierte multimere enzymatische Maschinerien, die die nukleosomale Struktur mit Energie aus der ATP-Hydrolyse verändern. Die Komplexe spielen wichtige Rollen in fundamentalen Prozessen wie Transkription, Replikation und der Reparatur von Chromatin (Martens und Winston, 2003; Peterson und Cote, 2004). Sie erhöhen zudem durch Umwandlung des Chromatins den Zugang zur nukleosomalen DNA für Transkriptionsfaktoren (Cote et al, 1994; Kwon et al, 1994; Utley et al, 1997). Alle SWI / SNF Proteine besitzen Helicase-ähnliche Motive, die das Chromatin durch Aufwickeln der DNA verändern können. Durch diese Motive wird der SWI / SNF Komplex der Superfamilie II der Helicase-verwandten Proteine zugeordnet (Cote et al, 1994).



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung des humanen SWI /SNF Komplexes mit Chromatin**

Proteine des SWI / SNF Komplexes werden als grüne Kugeln gemäß ihrer Volumina, welche proportional zu ihrer Masse sind, dargestellt. Genomische DNA ist blau dargestellt und windet sich um die roten Histone, wobei jeweils ein Oktamer zusammen mit der DNA ein Nukleosom bildet. SWI / SNF Komponenten mit putativen DNA Bindungsmotiven für die Untereinheiten BAF 57, BAF 250, BAF 155, BAF 170 und ATPase BRM / BRG1 und putative Histonbindungsmotive für BAF 155, BAF 170, BRM / BRG1 stehen in Kontakt mit dem DNA-Strang und den Histonektameren. Modifiziert nach Halliday et al (2009).



Der humane ATP-abhängige SWI / SNF Komplex ist ein großer Multiproteinkomplex mit einer ungefähren Größe von 2 MDa (Abb. 5.1). Innerhalb des eukaryotischen Zellkerns ist die DNA in einem hochstrukturellen Nukleoproteinkomplex, dem Chromatin, organisiert. Das Nukleosom ist die fundamentale Chromatineinheit, welches aus einem 147 bp großen DNA Fragment besteht und um den Kern der Histone (je zwei Histone H2A, H2B, H3 und H4) gewickelt ist (Ramakrishnan, 1997; Richmond und Davey, 2003). Die Nukleosome und die Chromatin-assoziierten Proteine (CAP) sind dabei sehr dicht und kompakt zusammengefaltet, so dass die Bindungsstellen für interagierende Proteine nicht zugänglich sind. Nach Bindung des SWI / SNF Komplexes, wird die DNA um die Histone so weit bewegt, dass die nukleosomale Struktur destabilisiert wird und so die DNA-Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren freigelegt werden. Die Chromatinstruktur ist dynamisch, da der Zustand von Chromatin mit der Genexpression korreliert. Es gibt zwei Arten von Chromatin, die die Genexpression beeinflussen. Kompakteres Chromatin führt zu verminderter, lockeres Chromatin zu verstärkter Genexpression (Felsenfeld et al, 1996). Der SWI / SNF Komplex assoziiert mit diversen Regulatoren, die Gene aktivieren und deren Aktionen zur Zellproliferation führen. Zu diesen Faktoren gehören der Glucocorticoidrezeptor, der Östrogenrezeptor (Yoshinaga et al, 1992; Muchardt und Yaniv, 1993; Ichinose et al, 1997; Ostlund-Farrants et al, 1997; Fryer und Archer, 1998), das Retinoblastoma-Tumorsuppressorprotein (RB; Dunaief et al, 1994) und Cyclin E (Shanahan et al, 1999).

### **5.2.1. Aufbau des SWI / SNF Komplexes**

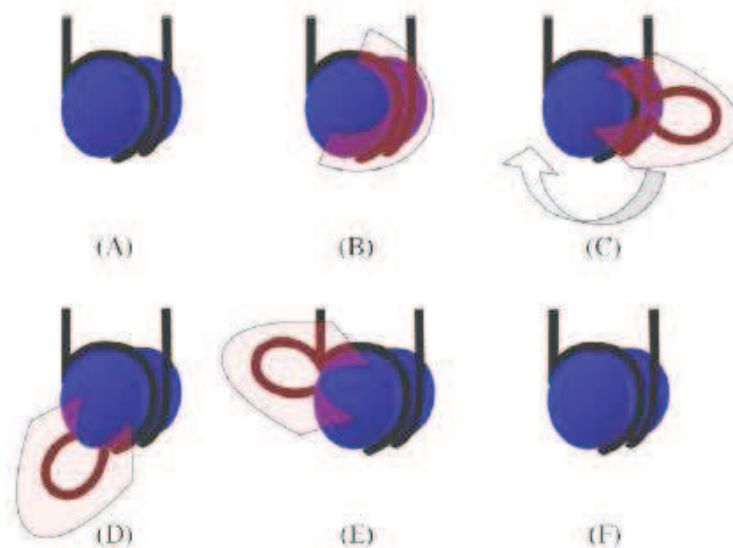
Der exakte Aufbau der Untereinheiten des SWI / SNF Komplexes variiert, wodurch unterschiedliche Subfamilien unterschieden werden. Im Menschen gibt es zwei Subfamilien des SWI / SNF Komplexes: SWI / SNF-A oder BAF (BRG1 oder BRM-assoziiierter Faktor) und SWI / SNF-B oder PBAF (Polybromo-assoziiierter Faktor). Die SWI / SNF Komplexe besitzen jeweils eine ATPase Untereinheit, die entweder Brahma (BRM) oder brahmaverwandtes Gen 1 (BRG1) heißt. Die ATPase Untereinheit weist zusätzlich eine Bromodomäne auf, welche auch in vielen Transkriptionsfaktoren gefunden wurde (Kwon et al, 1994; Cote et al, 1994). Die Komplexe SWI / SNF-A und -B sind in ihrer Zusammensetzung ähnlich und teilen sich acht Untereinheiten (BRM oder BRG1, BAF 170, BAF 155, BAF 60a, BAF 57, BAF 53, Aktin, BAF 47). Während der SWI / SNF-A (BAF)

Komplex die BAF 250 Untereinheit und entweder die ATPase Untereinheit BRM oder BRG1 aufweist, besitzt der SWI / SNF-B (PBAF) Komplex nur die BRG1 ATPase-Untereinheit und die Proteine BAF 180 und BAF 200 (Yan et al, 2005). Trotz der Ähnlichkeiten beider Komplexe ist nur die Subfamilie SWI / SNF-A (BAF) fähig, die ligandenabhängige transkriptionale Aktivierung durch Kernrezeptoren zu ermöglichen. Somit wäre eine Interaktion von CAR mit dieser Subfamilie aufgrund dieser Argumentation durchaus denkbar. Welche der beiden Subfamilien aber letztendlich mit dem Kernrezeptor CAR durch BAF 155 interagiert, müsste in weiteren Folgeexperimenten geklärt werden. Denn wie schon zuvor erläutert, ist sowohl in Subfamilie-A als auch in Subfamilie-B die Proteinuntereinheit BAF 155, welche in dieser Arbeit als CAR-Interaktionspartner mit MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert und mit verschiedenen Nachweismethoden *in vivo* und *in vitro* bestätigt wurde, zu finden.

### 5.2.2. Aktivierungsmechanismus des SWI / SNF Komplexes

Es sind zwei Aktivierungsmechanismen des SWI / SNF Komplexes bekannt. Beim ersten Mechanismus wird die DNA vom SWI / SNF Komplex, der BAF 155 als Komponente enthält, um die Nukleosome in einer Korkezieher-ähnlichen Bewegung gewickelt. Dieser Mechanismus wird „Spirale Defektdiffusion“ genannt (DiMasi et al, 2009). Die Aktivität des Komplexes beeinflusst die Drehung der DNA und verändert deren Position auf der Oberfläche der Histone. Beim zweiten Mechanismus wird die DNA partiell als Schleife auf der Oberfläche des Histonoktamers verändert. Der Vergleich mit dem ersten Mechanismus zeigt, dass die DNA am Nukleosomenrand lockerer mit dem Histonoktamern verbunden ist als die mit dem Nukleosomenzentrum assoziierte DNA (Polach und Widom, 1995). Die an verschiedenen Downstreamseiten anschließend vom SWI / SNF Komplex partiell abgelöste DNA bildet eine verlängerte Schleife, die sich im Laufe des Aktivierungsmechanismus immer mehr von dem Nukleosom entfernt (Abb. 5.2; Studitsky et al, 2004). Der SWI / SNF Komplex löst somit die DNA von der Oberfläche des Histonkerns ab und positioniert diese ungefähr 52 bp weiter von der ursprünglichen Position (Zofall et al, 2006). Solche Schleifen können vermehrt um den Histonoktamern auftreten und bewirken einen offenen Zugang zu den DNA-Bindungsstellen für interagierende Proteine wie beispielsweise den Kernrezeptor CAR. Kondensierte Chromatinstruktur verhindert physikalisch die Bindung von

Transkriptionsfaktoren und des RNA-Polymerase II-Komplexes an die Ziel-DNA (Kadonaga, 1998; Struhl, 1999).



**Abb. 5.2: Nukleosomenmobilität des SWI / SNF chromatin-umbildenden Komplexes**

A) DNA (schwarz) wickelt sich um den Kern des Histonproteinoktamers (blau). B) Der SWI / SNF Komplex (rosa) bindet daraufhin an die DNA. C) Der Komplex löst die DNA von der Histonoberfläche, was zu einer verlängerten Schleife führt. (C-E) Die DNA-Schleife rotiert um den Histonoktamernkern ohne Energie und bewirkt einen Zugang zu den DNA-Bindungsstellen für interagierende Proteine. F) Nach Dissoziation des SWI / SNF Komplexes wird die DNA um den Histonoktamernkern wieder straff gespannt. Das Nukleosom wurde aber um 52 Basenpaare entlang des DNA Stranges bewegt. Adaptiert von Halliday et al (2009)

### 5.2.3. Funktion von BAF 155

Ko-Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren weisen eine intrinsische Histonacetylierungsaktivität auf, welche durch Hyperacetylierung der Histone zu einer Drehbewegung der DNA um die Histone führt und somit den Promotor für Transkriptionsfaktoren zugänglicher macht (Ogryzko et al, 1996; Spencer et al, 1997). Somit könnten die Ko-Aktivatoren von CAR wie SRC-1 oder TIF2 verstärkt die DNA-Bindungsstelle des Kernrezeptors freilegen. Die Ko-Repressoren veranlassen dagegen die Deacetylierung der Histone, was zu einer kompakteren Form der DNA führt und somit die Transkription reprimiert (Nagy et al, 1997, Heinzl et al, 1997). Ko-Aktivatoren bilden durch direkte Protein-Protein-Interaktionen die Brücke zwischen Kernrezeptoren und dem Transkriptionsapparat, was eine direkte Interaktion zwischen CAR und BAF 155 durch Ko-

Aktivatoren verstärken würde. Dies ist eine interessante Feststellung, da hormon- und rezeptorabhängige Transkriptionen von *in vitro* DNA-Matrizen zudem auch Ko-Aktivatoren benötigen. Damit bildet der SWI / SNF Komplex eine physikalische Brücke zwischen Aktivator und der Transkriptionsmaschinerie, die wiederum das aktive Stadium von Chromatin aufrecht erhält (Kingston und Narlikar, 1999). Die Funktion von BAF 155 ist noch ungeklärt. Da BAF 155 nur ein kleiner Bestandteil dieses großen SWI / SNF Chromatin-remodeling Komplexes ist, konnte die genaue Funktion von BAF 155 oder seine Aktivität in Bezug auf die CAR-Interaktion bis jetzt noch nicht näher untersucht werden. Somit ist es schwierig nachzuvollziehen, wie die Interaktion zwischen BAF 155 und CAR letztendlich abläuft und wie sich daraufhin die Funktionalität beider Proteine z.B. auf die Genregulation verändert. Im Bereich der Stammzellforschung mit embryonalen Stammzellen (ESC) aus Mäusen wurde gezeigt, dass Mitglieder des Maus Swi / Snf Chromatin-remodeling Komplexes, einschließlich Baf 47, Baf 57 und Baf 155, für die Repression der Genexpression nach Differenzierung der embryonalen Stammzellen bei der Maus erforderlich sind (Schaniel et al, 2009). Die Expression von Baf 155 ist für die Heterochromatinanordnung und Chromatinkompaktierung während der Differenzierung wichtig. Das Protein Baf 155 spielt hiermit eine wichtige Rolle in der ESC-Differenzierung durch Genrepression und kann somit eine lokale Veränderung in der Chromatinstruktur hervorrufen. Somit lässt sich spekulativ sagen, dass das humane BAF 155 Protein durchaus die Transkription der CAR Gene möglicherweise hemmen könnte. Weitere Studien belegen, dass verschiedene Zinkfingerproteine wie EKLF (erythroider Krüppel-like Faktor) mit der DNA-Bindungsdomäne direkt mit dem humanem SWI / SNF Komplex interagieren. EKLF ist verantwortlich für die Reifung von roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und als Transkriptionsfaktor in drei Hauptprozessen involviert, die alle für die Transkription des  $\beta$ -Globingens wichtig sind. Dazu gehören das Chromatin-remodeling, die Modulierung bei der Umwandlung von gamma- in beta-Globin sowie deren transkriptionale Aktivierung. Die Studien zeigten, dass die zwei SWI / SNF Untereinheiten BRG1 und BAF 155 für das Chromatin-remodeling und die transkriptionale Aktivierung durch EKLF *in vitro* notwendig sind (Kadam et al, 2000). Hier spielt das humane BAF 155 Protein eine entscheidende Rolle in der transkriptionalen Genaktivierung mit EKLF. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass BAF 155 die Gentranskription indirekt aktiviert und auch im Zusammenhang eine Aktivierung oder Hemmung der CAR Zielgene hervorrufen könnte.

Prozentual ist die Anzahl humaner Gene, die einen funktionellen SWI / SNF Komplex für die transkriptionelle Aktivität benötigen, unbekannt. Jedoch werden 7 % der Gene in der Hefe auf

diese Weise reguliert (Sudarsanam et al, 2000). Die Regulation der Genexpression wird durch eine Vielzahl von Signalkaskaden vermittelt, die den SWI / SNF Komplex zu dem spezifischen Zielpromotor rekrutieren. Die MKK6/p38 (mitogenaktivierte Proteinkinase)-Signalkaskade begünstigt die Muskeldifferenzierung durch indirekte Signale, die über den SWI / SNF Komplex zu dem eukaryotischen Transkriptionsfaktor MyoD führen. Die Rekrutierung dieses Komplexes beeinflusst auch Signalwege zur erythroider, neuronaler und Adipocyten-Differenzierung (Simone, 2006). Hormonsignalkaskaden führen zu einer Inaktivität des SWI / SNF Remodeling-Prozesses durch Interaktionen mit den BAF 250-, BAF 60a- und BAF 57-Untereinheiten. Zudem interagieren die ATP-Untereinheiten BRM und BRG1 mit einem Retinoblastomprotein, welches das Wachstum der zellulären G1/S - Wechselfase anschließend reduziert. Ein weiterer Interaktionspartner des mammalianen SWI / SNF Komplexes ist Cyclin E, ein essenzielles regulatorisches Protein des Zellzykluses, welches für den Übergang von der G1- zu der S-Phase erforderlich ist (Simone, 2006). Die beiden SWI / SNF Untereinheiten BAF 155 und BRG1 interagieren zusammen mit Cyclin E und werden dabei durch die Cyclin E-assoziierte Kinaseaktivität phosphoryliert. Cyclin E wird während der G1-Phase im Zellzyklus synthetisiert und bindet die cyclinabhängige Kinase (cyclin-dependent kinase, cdk; Dulic et al, 1992). Der Cyclin E-cdk-Komplex spielt hierbei eine wichtige Rolle während des Überganges der beiden Phasen G1 und S (Resnitzky et al, 1994; Tsai et al, 1993). Die Interaktion von BAF 155 und BRG1 mit Cyclin E ist funktionell interessant, da Cyclin E die Fähigkeit von BRG1, den Wachstumsstillstand zu induzieren, aufheben kann.

Als potenzieller Interaktionspartner zeigte BAF 155 mit den verschiedenen in dieser Arbeit durchgeführten Nachweismethoden (siehe Kapitel 4.3) eine Interaktion mit dem Kernrezeptor CAR *in vitro* und *in vivo*. Dabei konnte in dieser Arbeit mit dem GST-Bindungsassay (siehe Abb. 4.11) eine Interaktion zwischen [35S]-radioaktivmarkiertem BAF 155 und affinitätsgereinigtem GST-CAR-LBD-Fusionsprotein gezeigt werden. Auch eine Ko-Immunpräzipitation von BAF 155 und CAR konnte die Interaktion *in vivo* bestätigen (Abb. 4.13). Um den Einfluss von BAF 155 auf die Genregulation durch CAR zu untersuchen, wurde die RNA-Interferenz Methode (3.2.7) angewendet. Dazu wurden LS174T-Zellen, die CAR stabil exprimieren (Burk et al, 2005), mit Lentiviren infiziert, welche BAF 155 shRNA-Konstrukte enthielten. Die Infektionsrate der Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität des zusätzlich exprimierten GFP-Proteins nachgewiesen. Es liegen zwar unterschiedliche Expressionskassetten für GFP und die shRNAs vor, jedoch sollten die Zellen, die GFP exprimieren auch shRNA exprimieren, da beide von der lentiviralen DNA kodiert werden.

Mittels Taqman real-time PCR wurde der Einfluss dieses BAF 155 knockdowns auf die Genexpression des CAR-Zielgens CYP2B6 untersucht. Leider zeigte die lentivirale Infektion keinen Einfluss auf die Expression von BAF 155 und somit auch keinen Einfluss auf die Expression von CYP2B6. Es fand demnach kein knockdown von BAF 155 statt, obwohl die Expression von GFP in den infizierten Zellen eine Ko-Expression des shRNA-Konstruktes vermuten ließ (siehe 4.3.3). Eine mögliche Ursache für den mangelnden knockdown könnte die Überexpression des ko-exprimierten GFP-Proteins aus dem pLentivektor darstellen, die 5 Tage nach Infektion der Zellen mit einer starken Grünfluoreszenz ein falsch-positives Signal setzte. Die GFP-Expression könnte im Vergleich zur Expression der shRNA-Konstrukte überproportional erhöht sein und demnach keinen verlässlichen Indikator für die sh-RNA Expressionseffizienz darstellen. Die experimentellen Bedingungen für diesen Versuch müssen demnach noch optimiert werden, um einen funktionellen Einfluss von BAF 155 auf die regulatorische transkriptionale Aktivität von CAR demonstrieren zu können. Dies war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

Eine Publikation von Hong et al (2005) hat gezeigt, dass das SRG3 Protein (SWI3-related gene product) die Aktivierung des Androgenrezeptors zusammen mit dem Ko-Aktivator SRC-1 unter Bildung eines Komplexes verstärkt. SRG3, bekannt als Maus-Homolog zu Hefe SWI3, Drosophila MOIRA und humanem BAF 155, ist eine Kernkomponente des SWI / SNF Chromatin-remodeling Komplexes (Bultman et al, 2000; Jeon et al, 1997; Wang et al, 1996). SRG3 bindet direkt mit der Leuzinzipperregion an die DNA-Bindungsdomäne des Androgenrezeptors und funktioniert als dessen Ko-Aktivator unabhängig vom SWI / SNF Komplex. Neben dem Androgenrezeptor werden auch die Glukokorticoide-, Östrogen-, Progesteron- und Retinoidsäure-Rezeptoren durch den SWI / SNF Komplex reguliert (Wang et al, 2004; Marshall et al, 2003; DiRenzo et al, 2000; Fryer und Archer, 1998). Da bewiesen wurde, dass SRG3 mit einem Steroidkernrezeptor interagiert, ist die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion des humanen Homologs BAF 155 mit CAR möglich. Der SWI / SNF Komplex ist zudem in der Glukokorticoide-Rezeptor-Transaktivierung involviert (Muchardt und Yaniv, 1993; Ostlund Farrants et al, 1997; Yoshinaga et al, 1992), in der BAF 60a und BAF 57 den Rezeptor direkt mit dem Komplex verbinden, jedoch wurde noch nicht nachgewiesen, dass BAF 155 auch in der Aktivierung des Rezeptors beteiligt ist (Hsiao et al, 2003). Es wurde zudem publiziert, dass BAF 60a auch mit dem Progesteronrezeptor  $\beta$ , dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  und dem Farnesoidrezeptor interagiert. Zusätzlich wurde bewiesen, dass BAF 57 das direkte Bindeglied zwischen dem Östrogenrezeptor und dem SWI / SNF Komplex ist (Belandia et al, 2002). Analog zu diesen Interaktionen der BAF Mitglieder wird in dieser

Arbeit die Interaktion von BAF 155 mit CAR postuliert. Vorherige Studien zeigten, dass der Transkriptionsfaktor Notch1 die Expression von SRG3 in Makrophagen herunterreguliert (Choi et al, 2001). Dieser könnte auch einen Einfluss auf die BAF 155 Expression haben. Vielleicht muss erst der genaue Mechanismus der Interaktion verstanden werden, um bessere Aussagen zur Protein-Protein-Bindung von CAR und BAF 155 machen zu können. Generell aktivieren Ligandenbindungen Hormonrezeptoren und rekrutieren Ko-Aktivatoren, die diverse Aktionsmechanismen wie direkte Interaktion mit basalen Transkriptionsfaktoren, kovalente Modifikationen der Histone und anderer Proteine, die die Expression der Zielgene induzieren, hervorrufen können (Bannister und Kouzarides, 1996; Imhof et al, 1997; Truss et al, 1995). Aufgrund der Tatsache, dass der SWI / SNF Komplex auch mit anderen Kernrezeptoren interagiert und deren transkriptionelle Aktivität beeinflusst, lässt sich die Liste dieser Rezeptoren durch diese Arbeit um den konstitutiven Androstanrezeptor erweitern. BAF 155 könnte zusammen mit Ko-Aktivatoren wie SRC-1 die CAR-Aktivierung verstärken, nachdem ein Komplex gebildet wurde, so wie die Publikation für das BAF 155 Maushomolog SRG3, das den Androgenrezeptor aktiviert, zeigt (Hong et al, 2005). Das Baf 155 Protein aus Maus inhibierte die Genexpression der embryonalen Stammzellen nach deren Differenzierung. Eine andere Publikation zeigte, dass BAF 155 zusammen mit dem Zinkfingerprotein EKLF (erythroider Krüppel-like Faktor) die Transkription des Gens Globin induziert und somit eine Aktivierung des Gens verursacht (Kadam et al, 2000). Wie letztendlich der Einfluss von BAF 155 auf die Regulation von CAR ist, muss noch experimentell untersucht werden. Basierend darauf, dass das Mausprotein Baf 155 die Genexpression in differenzierten Stammzellen inhibiert, jedoch das humane BAF 155 die Transkription des untersuchten Gens (Globin) induziert, lässt die Frage noch offen, wie das humane BAF 155 die CAR-Zielgentranskription beeinflusst.

### 5.3. Weitere Interaktionspartner von CAR

In diesem Kapitel wird eine Auswahl der Proteine diskutiert, die mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie als mögliche Interaktionspartner von CAR identifiziert wurden (Tab. 4.1 und 4.2). Neben Enzymen, die an vielen Signalwegen beteiligt sind, wurden auch Struktur- und Transportproteine identifiziert. Deren Interaktionen mit CAR müsste allerdings noch in weiteren Experimenten mit anderen unabhängigen Validierungsmethoden wie Ko-Immunpräzipitationen, Western Blot Analysen, „two hybrid“ Experimenten oder [35S]-GST-Pulldowns bestätigt werden. Dabei wäre es auch denkbar, dass die identifizierten Proteine einen Komplex mit CAR bilden, eine direkte Interaktion demnach nicht zwingend notwendig ist.

#### 5.3.1. Pyruvatcarboxylase (PC)

In den GST-Pulldown-Assays mit Rattenleberhomogenat und der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse konnte das Enzym Pyruvatcarboxylase (PC) identifiziert werden. Die PC wurde erstmals 1959 entdeckt und ist eine tetramerische Ligase, die allosterisch von Acetyl CoA und Aspartat reguliert wird. PC katalysiert die  $\text{HCO}_3^-$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat. Das Enzym katalysiert den ersten Schritt in der Glukoneogenese und stellt dabei Oxalacetat für die Umwandlung durch die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) in Phosphoenolpyruvat (PEP) zur Verfügung (Hanson und Patel, 1994). PEPCK (Isoform 2) wurde in den GST-Pulldown-Assays mit humanem Leberhomogenat mittels MALDI-TOF identifiziert (Tab. 4.2), aber nicht in den Assays mit Rattenlebergewebe. Das Endprodukt PEP wird durch die mitochondriale Membran in das Cytoplasma transportiert, wo es in Glukose umgewandelt wird. Die PC ist nicht nur an der *de novo* Fettsäuresynthese beteiligt (Ballard und Hanson, 1967), sondern auch an der Glukoneogenese zur Synthetisierung von Glycerin, das mit Fettsäuren die Fette bildet (Reshef et al, 2003). In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass die PC-Expression durch Kernrezeptoren beeinflusst wird. Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren alpha und gamma (PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma$ ) regulieren die PC-Genexpression. Normalerweise erhöht PPAR- $\gamma$  die PC-Expression im Fettgewebe. (Jitrapakdee et al, 2005; Li et al, 2002). Synthetische PPAR- $\alpha$



Liganden oder natürliche PPAR-Liganden (freie Fettsäuren), welche primär die PPAR-Aktivität stimulieren, erhöhen die PPAR- $\alpha$  Expression zusammen mit der PC-Expression und Glukose-induzierter Insulinsekretion (Yoshikawa et al, 2001). Auch der Kernrezeptor LXR (Leber X Rezeptor) reguliert die PC-Expression. Bei Untersuchungen mit dem LXR-Agonisten MIN6 wurde nachgewiesen, dass dieser ebenfalls die Glukose-induzierten Insulinsekretion steigert (Efanov et al, 2004). Dies zeigt, dass der Kernrezeptor LXR die Insulinsekretion durch die PC-Genaktivität reguliert. Dabei ist es unklar, ob LXR oder PPAR- $\alpha$  direkt die PC-Gentranskription regulieren, da weder ein LXR „response element“ noch ein PPAR „response element“ (PPRE) im Promotor des PC-Gens gefunden wurde. Da die Kernrezeptoren PPAR und LXR die PC-Expression beeinflussen, wäre es auch möglich, dass der Transkriptionsfaktor CAR die Genexpression von PC regulieren könnte.

Die Involvierung von PC und PEPCK im Phosphoenolpyruvat-Signalweg lässt die Frage offen, weshalb PEPCK in den Pulldown-Assays mit humanem Lebergewebe, aber nicht mit Rattenlebergewebe via MALDI signifikant identifiziert wurde (5.3.5). Möglicherweise wurde das Protein durch Proteine mit gleichem Molekulargewicht im Gel maskiert, so dass bei der Proteinidentifizierung der Peptidfingerabdruck in der Datenbank nicht abgeglichen werden konnte.

### 5.3.2. Argininosuccinatsynthetase 1 (ASS1)

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass das Enzym Argininosuccinatsynthetase 1 (ASS1) mit dem transkriptionellen Regulator CAR interagiert. Die Bedeutung dieser Interaktion konnte noch nicht genauer untersucht werden. Aber weitere Experimente zur Bestätigung dieser Interaktion mit dem Kernrezeptor CAR könnten zeigen, ob vielleicht auch die Expression der CAR-Zielgene beeinflusst wird. ASS1 ist ein cytosolisches Enzym des Harnstoffzykluses, welches hauptsächlich in Hepatozyten exprimiert wird. Dieses Enzym ist in der Argininsynthese involviert und katalysiert die Kondensation von Citrullin und Aspartat zu Argininosuccinat durch Verwendung eines ATPs (Kobayashi et al., 1990). Ein Defizit von ASS1 verursacht eine autosomale rezessive Funktionsstörung, die Citrullinämie (Typ I) genannt wird. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit einem ASS1-Defizit eine neonatale Hyperammonämie und asymptomische individuelle Phänotypen aufwiesen

(Beaudet et al, 1986). Spekulativ hat die Aufklärung der genauen Abläufe, an denen auch CAR beteiligt sein könnte, demnach medizinische Relevanz.

### 5.3.3. Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)

Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) ist ein glykolytisches Enzym (Sirover, 2005). Dieses formt einen homotetrameren Komplex, der entscheidende Reaktionen des glykolytischen Signalwegs katalysiert. Es verwendet  $\text{NAD}^+$  und wandelt Glyceraldehyd-3-Phosphat in 1,3 Biphosphoglycerat um, unter Freisetzung von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (Chunag et al, 2005). Neben der metabolischen Rolle ist das Enzym auch an diversen zellulären Funktionen beteiligt (Colell et al, 2009), wie an der Struktur der Kernmembran und am Membrantransport vom ER zum Golgi-Apparat (Nakawaga et al, 2003; Tisdale et al, 2004). GAPDH ist ein RNA-bindendes Protein, das die mRNA Stabilität reguliert (Rodriguez-Pascual et al, 2008; Zhou et al, 2008). Das Enzym zeigt auch nukleare Funktionen wie die Transkriptionsregulation (Harada et al, 2007; Kim et al, 2007; Dai et al, 2008). Somit könnte dieses Protein auch eine wichtige Rolle bei CAR und dessen Zielgenen spielen. Die erhöhte Expression von GAPDH in Prostatakrebszelllinien steigert die ligandenabhängige transkriptionale Aktivität des Androgenrezeptors und führt zu einer erhöhten Expression des prostatakrebspezifischen Antigens. Demnach führt die erhöhte Expression von GAPDH bei Prostatakrebs zu einer hemmenden Wirkung von anti-Androgenen, die normalerweise das Tumorstadium begünstigen und somit dieses nun senken. Jedoch konnte keine GAPDH Aktivität bei dem Glukokortikoidrezeptor oder Östrogenrezeptor nachgewiesen werden. Experimente zeigten, dass GAPDH als Ko-Aktivator mit hoher Androgenrezeptorselektivität fungiert und die AR-Transaktivierung unabhängig die glykolytische Aktivität von GAPDH erhöht. Obwohl dieser Komplex sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus gefunden wurde, ist die Formierung des Proteinkomplexes GAPDH-Androgenrezeptor im Cytoplasma wichtiger für die erhöhte Androgenrezeptortransaktivierung durch GAPDH als im Nukleus. Die GAPDH-Translokation vom Cytoplasma in den Nukleus erfolgt nur als Heterodimer mit dem Androgenrezeptor. Ko-Aktivatoren wie z.B. GAPDH spielen eine entscheidendere Rolle z.B. in der Tumorentwicklung und im Verlauf von androgenabhängigen Prostatakrebszellen als herkömmliche Ko-Aktivatoren wie SRC-1 bei Kernrezeptoren (Harada et al, 2007). GAPDH besitzt im Gegensatz zu CAR keine nukleare Lokalisationssequenz (NLS), aber die

Assoziation mit Siah1 (eine Ubiquitinligase) ermöglicht die Glukose-induzierte nukleare Translokation (Yego et al, 2009). Die NLS ist für die xenobiotisch-induzierte nukleare Translokation von CAR erforderlich und wurde in der Scharnierregion und in der DBD des Kernrezeptors CAR gefunden (Kanno et al, 2005; Xia und Kemper. 2007). Im Nukleus stabilisiert GAPDH das Protein Siah1 und erhöht dessen Ubiquitinligaseaktivität. Der nukleare GAPDH/Siah1 Komplex erhöht auch die p300/CBP-assoziierte Acetylierung von Nuklearproteinen wie p53 und veranlasst deren Degradation (Fiucci et al, 2004; Hara et al, 2005; Sen et al, 2008). Zwei antiapoptotische Agenzien (CGP3466 und R(-)Deprenyl) mit neuroprotektiver Aktivität interagieren zudem mit GAPDH und verhindern den nuklearen Transport (Kragten et al, 1998). Eine Acetylierung von GAPDH durch die Acetyltransferase P300/CBP-assoziiierter Faktor (PCAF) ist für die nukleare Translokation essenziell. Dadurch, dass GAPDH hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert ist und unter verschiedenen Bedingungen, beispielsweise während Zellzyklusprogression oder nach apoptotischer Stimulation in den Nukleus transloziert (Sawa et al, 1997; Senatorov et al, 2003; Sirover, 2005; Park et al, 2009), wäre eine Interaktion mit CAR im Cytoplasma bzw. im Zellkern nach Translokation durchaus denkbar.

#### 5.3.4. Carbonylreduktase 1 (CBR1)

In dieser Arbeit wurde das Enzym Carbonylreduktase 1 (CBR1) als CAR-Interaktionspartner mit MALDI-TOF massenspektrometrisch identifiziert. CBR1 metabolisiert eine Vielzahl von xenobiotischen Komponenten, einschließlich den Karzinogenen, die beim Rauchen entstehen, sowie vielen relevanten pharmakologischen Agenzien wie das Antikrebsmittel Doxorubizin und das antipsychotische Mittel Haloperidol (Forrest und Gonzalez, 2000). Die individuell variable Carbonylreduktaseaktivität wurde in Erythrozyten, Brust- und Lungentumoren und auch in der Leber dokumentiert (Iwata et al, 1993; Wong et al, 1993; Lopez de Cerain et al, 1999), was in Einklang mit einer Interaktion mit CAR eine mögliche Interaktion mit CAR untermauert. Die CBR1-Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) hemmen *in vitro* den Metabolismus von Antitumor-Anthracyclin-Antibiotika in Krebspatienten. Carbonylreduktionen spielen eine signifikante Rolle im Phase I Metabolismus (siehe Kapitel 1.1) von Carbonyl-enthaltenen Medikamenten (Bachur, 1976; Ahmed et, 1979; Felsted und Bachur, 1980; Imamura et al, 1993; Rosemund und Walsh,

2004), die zu weniger lipophilen Alkoholmetaboliten umgewandelt werden. Bei anderen Phase I Reaktionen wie der Oxidation durch das CYP450 System, ist die Carbonylreduktion in einer Vielzahl von Prozessen involviert, die Medikamente inaktivieren. Zu diesen Medikamenten zählen z.B. Warfarin, Haloperidol oder das Antitumormedikament Oracin (Wsol et al, 2003 und 2004). Aus pharmakologischer Sicht ist die Carbonylreduktion wichtig im Inaktivierungsprozess von Medikamenten, die Carbonylgruppen tragen. Verglichen mit dem oxidativen CYP P450 System, wurden die Carbonyl-reduzierenden Enzyme lange Zeit weniger beachtet. Es wurden schließlich viele Carbonyl-reduzierende Enzyme identifiziert und charakterisiert, u.a. die Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD), welche im xenobiotischen Carbonylkomponentenmetabolismus involviert ist, um die Oxidreduktion ihrer physiologischen Steroidsubstrate zu katalysieren (Maser, 1995). Studien zeigten, dass die CBR1-Expression mit Aktivatoren bekannter Kernrezeptoren wie den Glukokorticoidrezeptor, den pregnanen X Rezeptor und auch CAR nicht in den HepG2- und MCF-7-Zelllinien induziert wurde. Nur der Arylhydrogenrezeptorligand  $\beta$ -Naphthoflavon konnte die CBR1-Expression signifikant induzieren (Forrest et al, 1990; Lakhman et al, 2007). Eine Interaktion von CBR1 mit CAR direkt oder in einem Komplex konnte noch nicht bestätigt werden, wäre aber denkbar.

### 5.3.5. Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK)

Die in dieser Arbeit gezeigte Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) katalysiert die GTP-unterstützte Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat. PEPCK ist das Schlüsselenzym der Glukoneogenese in der Leber, dessen Expression durch den Insulin-Antagonisten Glukagon induziert wird. Das Enzym wird hauptsächlich in der Leber, Niere und im Dünndarm exprimiert. Es wurden viele Proteine identifiziert, die die PEPCK-Expression regulieren. Dazu zählen unter anderem die Rezeptoren HNF-3 (Hepatozytennuklearfaktor 3), GR (Glukokorticoidrezeptor), RAR (Retinoidsäurerezeptor, retinoid acid receptor), RXR (Retinoid-X-Rezeptor) und ERR alpha (Östrogenverwandter Rezeptor, estrogen-related receptor; Sugiyama et al, 1998; Choi et al, 2005; Herzog et al, 2005). Der Kernrezeptor SHP (small heterodimer partner), der wie CAR in der Leber exprimiert ist und eine wichtige Rolle in der Regulation des Glukose- und Lipidmetabolismus spielt, inhibiert nicht nur die Östrogenrezeptoraktivität (Seol et al, 1998), sondern reprimiert

auch die Transkription des PEPCK-Gens (Park et al, 2007). PEPCK ist sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien lokalisiert (Utter und Kurahashi, 1954; Nordlie und Lardy, 1963). Die Glukoneogenese benötigt NADH und Phosphoenolpyruvat (PEP) im Cytosol. Aus Malat werden NADH+H<sup>+</sup> und der PEP Vorläufer Oxalacetat in den Mitochondrien gebildet und gelangen ins Cytosol, wo sie durch die cytosolische PEPCK in PEP umgewandelt werden. Aus Laktat wird NADH H<sup>+</sup> im Cytosol, aber Oxalacetat in den Mitochondrien gebildet, wo es durch mitochondriales PEPCK anschließend in PEP konvertiert und in das Cytosol transferiert wird (Horton et al, 1993; Lehninger et al, 1993). Aufgrundessen, dass PEPCK mit vielen Kernrezeptoren wie RXR interagiert, wäre eine Interaktion mit CAR nicht ausgeschlossen. RXR bindet mit CAR als Heterodimer im Nukleus an die DNA und induziert somit die Transkription der Zielgene. Die mögliche Wirkung von CAR auf die PEPCK Regulation, ob reprimierend oder stimulierend, könnte in weiteren Experimenten geklärt werden.

### 5.3.6. Struktur- und Transportproteine

In den Pulldown-Assays mit Ratten- und humanem Leberhomogenat wurden zudem Proteine identifiziert, die an der Zellstruktur bzw. am Transport von Proteinen beteiligt sind. Die nähere Charakterisierung der Interaktion von diesen Proteinen mit CAR ist interessant, da CAR in den Zellkern translozieren muss, um dort die Zielgentranskription zu induzieren. Zu den signifikant identifizierten Strukturproteinen zählen u.a. das Fibrinogen beta, Lamin A und Dysferlin (Tab. 4.1). Das Glykoprotein Fibrinogen beta reguliert die Zelladhäsion und wird durch Thrombin zu Fibrin reduziert. Dysferlin ist im Skelettmuskel in der Reparatur der Zellmembran involviert (Klinge et al, 2007; Bansal et al, 2003). Als Transportprotein wird das Phosphatidylinositol-Transferprotein 1 diskutiert. Außerdem wurde zu den Struktur- und Transportproteinen auch das Hitzeschockprotein HSP70 analysiert, das schon als neuer Interaktionspartner des Kernrezeptors CXR („chicken X receptor“) identifiziert werden konnte (Blättler, 2007).

### 5.3.6.1. Lamin A

Lamine vom Typ A sind Hauptproteinbestandteile der Säugetiernuklearlamina und dienen als Grundgerüst für Proteinkomplexe, welche die Kernstruktur und -funktion regulieren. Lamin A ist auch in Signaltransduktionswegen involviert. Es interagiert mit ERK (extrazelluläre signalregulierte Kinase) 1 und 2 an der nuklearen Peripherie und beteiligt sich an der Regulation des Aktivatorproteins 1 (Gonzales et al, 2008). ERK 1 und 2 verhindern auch die Translokation von CAR in den Nukleus. Diese werden in einem anderen Signalweg durch MEK-Proteinkinasen aktiviert, welche wiederum durch HGF (Hepatozytenwachstumsfaktor) oder EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) stimuliert werden. Nur der MEK-Inhibitor U0126 repressiert die Aktivierung von beiden ERK und begünstigt die nukleare CAR-Translokation (Koike et al, 2007). Es wurde auch gezeigt, dass Interaktionen von Lamin A mit Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren (Andres und Gonzales, 2009). Die Überexpression von Lamin A reduzierte die Expression des Transkriptionsfaktors Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR)- $\alpha$ , der durch SREBP1 reguliert wird (Capanni et al, 2005; Maraldi et al, 2007). Desweiteren kann die Expression von Lamin A-Mutanten die Entstehung von Fettzellen (Adipogenese) durch Veränderung der Lokalisation und Funktion von SREBP1 stören. SREBP ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression der Gene reguliert, die an der Cholesterinbiosynthese und adipogenetischen Differenzierung beteiligt sind (Raghow et al, 2008). Eine Interaktion von CAR mit Lamin A wird durch diese Studien demnach untermauert. Es bleibt dabei noch zu klären, welche Funktionen beide zusammen in einer heterodimeren Bindung oder sogar in einem Multimerkomplex mit anderen Proteinen haben könnten und ob ein Einfluß auf eine CAR-abhängige Genexpression beobachtet werden könnte. Es wäre auch durchaus möglich, dass die Genregulation von Lamin durch CAR über die ERKs beeinflusst werden kann. Interessanterweise bindet Lamin A auch an ein BAF-Protein des SWI / SNF Chromatin-remodeling Komplexes. Jedoch konnte noch nicht geklärt werden, welches BAF mit Lamin A interagiert (Andrés und González, 2009). BAF ist als Chromatin-assoziiertes Protein involviert in die Kernstruktur, Chromatinorganisation und Genexpression und bindet neben Lamin A, wie schon zuvor beschrieben, auch die DNA und Histone (Segura-Totten und Wilson, 2004). Somit könnte eine Interaktion zwischen CAR, Lamin A zusammen mit dem BAF-Protein des SWI / SNF Komplexes eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des Multimerkomplexes spielen.

### 5.3.6.2. Fibrinogen

Das in dieser Arbeit identifizierte Glykoprotein Fibrinogen wird in der Leber von Wirbeltieren gebildet und danach ins Blutplasma ausgeschüttet. Es reguliert die Zelladhäsion, sowie Entzündungen und die Gewebereparatur (Ryu et al, 2009). Bei der Blutgerinnung wird Fibrinogen durch das Enzym Thrombin zusammen mit Calcium zu Fibrin reduziert, welches für die Bildung des sekundären Thrombus wichtig ist (Spraggon et al, 1997). Fibrinogen besteht aus drei Untereinheiten (alpha, beta, gamma), wobei massenspektrometrisch in dieser Arbeit nur die beta-Version identifiziert wurde. Das Fibrinogen besitzt im Promotor eine Bindungsstelle für den Kernrezeptor Hepatozytennuklearfaktor 1 (HNF 1; Dalmon et al, 1992). HNF-1 ist wie der CAR-Interaktionspartner HNF-4 ein Mitglied der Homeoproteinfamilie und spielt eine essenzielle Rolle in der Transkription von vielen hepatischen Genen (Mendel und Crabtree, 1991). Somit könnte CAR mit HNF-1 und Fibrinogen als Komplex an die DNA binden und somit die Transkription der Zielgene induzieren. Die Bindung von Fibrinogen an Integrin verursacht ein breites Spektrum von Zellsignalantworten wie die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) / Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), um Adhäsion, Migration, Chemotaxis und Phagozytose zu bewirken. Die fibrinogenregulierte Signalkaskade spielt eine zentrale Rolle in der Nervenregeneration. Der Signaltransduktionsweg der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK) 1/2 wird in Schwannzellen durch Fibrinogen aktiviert (Akassoglou et al, 2002). Diese Erkenntnisse identifizieren Fibrinogen als einen kritischen Regulator, der die Wiederherstellung der Myelinscheide aus den peripheren Nervenfasern (Remyelinisierung) inhibiert. Fibrinogen ist an verschiedenen Signaltransduktionswegen in Nervenzellen involviert, u.a. als Ligand für zellspezifische Rezeptoren im Nervensystem (Spraggon et al, 1997; Adams et al, 2007). Das Protein aktiviert zudem den Integrinrezeptor in Mikrogliazellen, induziert die Phagozytose (Adams et al, 2007) und inhibiert das Neuritenwachstum durch Integrin-vermittelte Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF; Schachtrup et al, 2007). EGF stimuliert indirekt ERK 1 und 2 (Koike et al, 2007), die auch die nukleare Translokation von CAR reprimieren (5.3.6.1; Koike et al, 2007). Eine Interaktion von Fibrinogen mit dem Kernrezeptor CAR könnte einen Aufschluss darüber geben, ob Fibrinogen primär die CAR-Translokation in den Nukleus und somit die Transkription der CAR-Zielgene beeinflussen könnte.

### 5.3.6.3. Dysferlin

In dieser Arbeit wurde Dysferlin identifiziert, ein 230 kDa großes Plasmamembranprotein, das vorwiegend im Skelettmuskel vorkommt. Es wird aber auch verstärkt in Herz und Plazenta sowie nur schwach in Lunge, Niere, Pankreas und in der Leber exprimiert (Bashir et al, 1998; Anderson et al, 1999). Dysferlin bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Phospholipide (Davis et al, 2002) und spielt eine wichtige Rolle in dem Reparationsmechanismus der Skelettmuskelfibrillenmembran. Die Assoziation von Dysferlin und Annexin A1/A2 ist  $\text{Ca}^{2+}$ - und membranabhängig. Eine Mutation von Dysferlin verursacht Muskeldystrophie (Therrien et al, 2006). Ein Dysferlindefizit reduziert die Effizienz der Membranreparatur im Herzmuskel (Han et al, 2007) und führt häufig zu progressiven Myonekrose (Bansal et al, 2003; Lennon et al, 2003). Die gezeigte Interaktion von CAR und Dysferlin könnte möglicherweise auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sein. Dexamethason, welches die Expression von CAR in humanen Hepatozyten steigert und damit die Transkription von CYP3A4, CYP2B6 und CYP2C8 erhöht (Pascucci et al, 2000), induziert auch Dysferlinexpression in Myoblasten und erhöht ihre myogenische Differenzierung (Belanto et al, 2010). Dysferlin könnte mit CAR als Komplex die Zielgenexpression induzieren. Um dies genauer untersuchen zu können, sind weitere Experimente notwendig, die diese Interaktion bestätigen.

### 5.3.6.4. Phosphatidylinositol-Transferprotein 1 (PITP)

Phosphatidylinositol (PtdIns) Transferprotein (PITP) ist ein cytosolisches Protein, das PtdIns und Phosphatidylcholin (PtdCho) zwischen den Lipidschichten austauschen kann (Wirtz, 1991). PITP transportiert Phospholipide vom Synthesort über das ER und den Golgi-Apparat zu anderen Zellmembranen. PITP ist eine essenzielle Komponente der Polyphosphoinositidsynthese und spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des phosphoinositidspezifischen Phospholipase C (PLC) Signalweges (Kauffmann-Zeh et al, 1995). Zudem ist PITP mit der Phosphoinositid-4-Kinase an der Produktion von Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PIP3) beteiligt. Es wurde auch gezeigt, dass im Polyphosphoinositidsyntheseweg in Anwesenheit von PITP die EGF-induzierte Hydrolyse von PtdIns-4,5-bisphosphat stimuliert wird. PITP ist als cytosolischer Faktor für die EGF-Stimulation von PtdIns 4-Kinaseaktivität erforderlich, was zeigt, dass PITP physikalisch mit



einem Signalkomplex interagiert, der mit EGF-Rezeptor, PtdIns 4-Kinase und PLC assoziiert ist (Thomas et al, 1993; Kauffmann-Zeh et al, 1995). EGF ist an der indirekten Stimulation der extrazellulären signalregulierten Kinasen ERK 1 und 2 beteiligt, die wiederum die Translokation von CAR in den Nukleus verhindern (Koike et al, 2007). Die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von PITP mit CAR könnte somit in Zusammenhang mit diesem EGF – ERK Signalweg stehen, der den Transfer von CAR in den Nukleus verhindert.

### **5.3.6.5. Hitzeschockprotein 70 (HSP70)**

Das massenspektrometrisch identifizierte Hitzeschockprotein 70 (HSP70) ist ein molekulares Chaperon, das mit hydrophoben Aminosäuren in Polypeptiden interagiert (Mayer und Bukau, 2005; Bukau et al, 2006; Genevaux et al, 2007; Frydman, 2001). Molekulare Chaperone sind Schutzmechanismen, ohne die zelluläre Proteine nicht richtig gefaltet und damit aggregieren würden. HSP70 faltet und aktiviert viele Substratproteine und reguliert deren Funktion (Kramer, 2009; Hohfeld et al, 2001; Young et al, 2003; Meimaridou et al, 2009). Dieses Chaperon ist z.B. verantwortlich für das Clathrinremodeling während der Endozytose und es stabilisiert Proteine, die mit apoptotischen und nuklearen Hormonen assoziiert sind (Liberek et al, 2008; Pratt, 2006; Eisenberg und Greene, 2007; Nollen et al, 2002). Genetische Studien zeigen einen engen Bezug von HSP70 und seinen Ko-Chaperonen zu vielen Krankheiten, einschließlich Krebs, Neurodegeneration und mikrobieller Pathogenese. Die Überexpression von HSP70 vermindert die Toxizität von anormalen gefalteten Proteinen, die in Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, lateraler Sklerose oder der Huntingtonkrankheit vorkommen. HSP70 wird hierbei als therapeutisches Hilfsmittel für diese Krankheiten favorisiert (Witt, 2009). HSP70 wird zudem in vielen subzellulären Kompartimenten exprimiert. Ein Heteromerkomplex bestehend aus dem Kernrezeptor CAR, HSP90, der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und dem cytosolischen Retentionsprotein (CCRP) wurde im Cytoplasma bereits beschrieben (Yoshinari et al, 2003).

In Säugetieren wurde nachgewiesen, dass die Chaperone HSP70 und HSP90 durch das 60 kDa große Ko-Chaperon Hop miteinander verbunden sind und dadurch einen Multichaperonkomplex im Cytoplasma formen (Johnson et al, 1998). Dieser HSP70/HSP90-Multichaperonkomplex wird ATP-abhängig reguliert. Das Zusammenspiel beider Chaperone ist wichtig für die Lebensfähigkeit von Zellen und Organismen. Zudem sind HSP70 und

HSP90 in Säugetieren in der Faltung und Aktivierung von regulatorischen Schlüsselproteinen wie Steroidhormonrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Kinasen involviert (Wegele et al, 2004). Durch diese enge Zusammenarbeit dieser beiden Chaperone als interagierender Komplex, wird die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von CAR mit HSP70 untermauert. In dieser Arbeit konnte HSP70 mittels MALDI-TOF signifikant identifiziert werden (Tab. 4.1). Eine Interaktion von HSP70 und dem Rezeptor CXR („Chicken X Receptor“, Hühnchen-X-Rezeptor) konnte *in vivo* mittels Ko-IP bestätigt werden (Blättler, 2007). Aufgrunddessen, dass HSP70 und HSP90 in einem Multichaperonkomplex vorliegen, wäre auch eine Interaktion von HSP70 mit CAR als Heteromerkomplex im Cytosol denkbar.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Adams, R.A.; Bauer, J.; Flick, M.J.; Sikorski, S.L.; Nuriel, T.; Lassmann, H. (2007). The fibrin-derived gamma 377–395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* **204**: 571–582
- Adams, R.A.; Passino, M.; Sachs, B.D.; Nuriel, T.; Akassoglou, K. (2004). Fibrin mechanisms and functions in nervous system pathology. *Mol Interv* **4**: 163–176
- Adams, R.A.; Schachtrup, C.; Davalos, D.; Tsigelny, I.; Akassoglou, K. (2007). Fibrinogen signal transduction as a mediator and therapeutic target in inflammation: Lessons from Multiple Sclerosis. *Curr Med Chem* **14**: 2925–2936
- Ahmed, N. K., Felsted, R. L., Bachur, N. R. (1979). Comparison and characterization of mammalian xenobiotic ketone reductases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **209**: 12–19
- Akassoglou, K.; Yu, W.-M.; Akpınar, P.; Strickland, S. (2002). Fibrin inhibits peripheral nerve regeneration by arresting Schwann cell differentiation. *Neuron* **33**: 861–875
- Anderson, L.V.B.; Davison, K.; Moss, J.A.; Young, C.; Cullen, M.J.; Walsh, J.; Johnson, M.A.; Bashir, R.; Britton, S.; Keers, S.; Argov, Z.; Mahjneh, I.; Fougousse, F.; Beckmann, J.S.; Bushby, K.M.D. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Mol Gen* **8**(5): 855–861
- Andres, V. and Gonzales, J.M. (2009). Role of A-Type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J. Cell Biol.* Vol. 187 (7): 945–957
- Axelrod, J. (1955). The enzymatic deamination of amphetamine (bezadrine). *J. Biol. Chem.* **214**, 753–763
- Bachur, N. R. (1976). Cytoplasmic aldo-keto reductases: A class of drug metabolizing enzymes. *Science* **193**: 595–597
- Baes, M.; Gulick, T.; Choi, H.S.; Martinoli, M.G.; Simha, D.; Moore, D.D. (1994). A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol. Cell Biol.* **14**: 1544–1552
- Bain, D.L.; Heneghan, A.F.; Connaghan-Jones, K.D. and Miura, M.T. (2007). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol* **69**: 201–20
- Ballard, F.J.; Hanson, R.W. (1967). The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: replenishment of oxaloacetate. *J. Lipid Res* **8**: 73–79
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone cetyltransferase. *Nature* **384**: 641–643

- Bansal, D.; Miyake, K.; Vogel, S.S.; Groh, S.; Chen, C.C.; Williamson, R.; McNeil, P.L.; Campbell, K.P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* **423** (6936): 168-72
- Bartel, P.; Chien, C.T.; Sternglanz, R.; Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two hybrid system. *Biotechniques* **14**(6): 920-4
- Bashir, R.; Britton, S.; Strachan, T.; Keers, S.; Vafiadaki, E.; Lako, M.; Richard, I.; Marchand, S.; Bourg, N.; Argov, Z. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* **20**: 37-42
- Beaudet, A.L.; O'Brien, W.E.; Bock, H.G.; Freytag, S.O.; Su, T.S. (1986). The human argininosuccinate synthetase locus and citrullinemia. *Adv Hum Genet* **15**:161-196
- Belandia, B.; Orford, R.L.; Hurst, H.C. and Parker, M.G. (2002). Targeting of SWI/SNF chromatin remodeling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J.* **21**: 4094-4103
- Belanto, J.J.; Diaz-Perez, S.V.; Magyar, C.E.; Maxwell, M.M.; Yilmaz, Y.; Topp, K.; Boso, G.; Jamieson, C.H.; Cacalano, N.A.; Jamieson, C.A. (2010). Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation. *Neuromuscul Disord* **2**: 111-21
- Bernard, P.; Coutourier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**(3): 735-45
- Bukau, B.; Weissman, J.; Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125** (3): 443-451
- Bultman, S.T.; Gebuhr, T.; Yee, D.; LaMantia, C.; Nicholson, J.; Gilliam, F.; Randazzo, F., Metzger, D.; Chambon, P.; Crabtree, G. and Magnuson, T. (2000). A BRG1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell.* **6**: 1287-1295
- Capanni, C., E. Mattioli, M. Columbaro, E. Lucarelli, V.K. Parnaik, G. Novelli, M. Wehnert, V. Cenni, N.M. Maraldi, S. Squarzoni, and G. Lattanzi. (2005). Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **14**:1489-1502
- Carlson, M.; Osmond, B.C.; Botstein, D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* **98**: 25-40
- Chang, T.K.; Waxman, D.J. (2006). Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). *Drug. Metab. Rev.* **38**: 51-73
- Choi, Y.I.; Jeon, S.H.; Jang, J.; Han, S.; Kim, J.K.; Chung, H., Lee, H.W.; Chung, H.Y.; Park, S.D. and Seong, R.H. (2001). Notch1 confers a resistance to glucocorticoid-induced apoptosis on developing thymocytes by down-regulating SRG3 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10267-10272

- Choi, J. H., Park, M. J., Kim, K. W., Choi, Y. H., Park, S. H., An, W. G., Yang, U. S. and Cheong, J. (2005). Molecular mechanism of hypoxia-mediated hepatic gluconeogenesis by transcriptional regulation. *FEBS Lett.* **579**: 2795–2801
- Colell, A.; Green, D.R.; Ricci, J.E. (2009). Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ* **16**: 1573–81
- Cote, J.; Quinn, J.; Workman, J.L.; Peterson, C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI / SNF complex. *Science* **265**: 53–60
- Chuang, D.M.; Hough, C.; Senatorov, V.V. (2005). Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 269–90
- Dai, R.P.; Yu, F.X.; Goh, S.R.; Chang, H.W.; Tan, Y.L.; Fu, J.L. (2008). Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD<sup>+</sup>/NADH redox status. *J Biol Chem* **283**: 26894–901
- Dalmon, J.; Laurent, M.; Courtois, G. (1992). The human  $\beta$  fibrinogen promotor contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element. *MolCellBio* **13**(2): 1183-1193
- Danielian, P.S.; White, R.; Lees, J.A.; Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* **11**(3):1025-33
- Davis, D.B.; Doherty, K.R.; Delmonte, A.J.; McNally, E.M. (2002). Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem* **277**: 22883–22888
- Dickins, M. (2004). Induction of cytochromes P450. *Curr. Top Med. Chem.* **4**: 1745-1766
- DiRenzo, J.; Shang, M.; Phelan, M.; Sif, S.; Myers, M.; Kingston, R. and Brown, M. (2000). BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7541-7549
- Dixit, S.G.; Tirona, R.G.; Kim, R.B. (2005). Beyond CAR and PXR. *Curr. Drug. Metab.* **6**: 385-397
- Dulic, V.; Lees, E. and Reed, S.J. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* **257**: 1958-1961
- Dunaief, J.L.; Strober, B.E.; Guha, S.; Khavari, P.A.; Alin, K.; Luban, J.; Begemann, M.; Crabtree, G.R. and Goff, S.P. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and co-operate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79**: 119-130
- Eichelbaum, M.; Spannbrucker, N.; Dengler, H.J. (1978). A Probably Genetic Defect of the Metabolism of Sparteine. *Biological Oxidation of Nitrogen.* Elsevier 113-18
- Eisenberg, E.; Greene, L.E. (2007). Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* **8**(6): 640–646

- Efanov, A.M.; Sewing, S.; Bokvist, K.; Gromada, J. (2004). Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, **53**: S75–S78
- Ellenberger, T. (1994). Getting a grip in DNA recognition: structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 12-21
- Estabrook, R.W.; Cooper, D.Y.; Rosenthal, S. (1963). The light-reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21 hydroxylation system of the adrenal cortex. *Biochem. Z.* **338**: 741-755
- Felsenfeld, G.; Boyes, J.; Chung, J.; Clark, D.; Studitsky, V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9384-9388
- Felsted, R. L., Bachur, N. R. (1980). Mammalian carbonyl reductases. *Drug Metab. Rev.* **11**: 1–60
- Fields, S.; Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10** (8): 286-92
- Fields, S.; Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340** (6230): 245-6
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature*. Bd. **391**: 806-811
- Fiucci, G.; Beaucourt, S.; Duflaut, D.; Lespagnol, A.; Stumptner-Cuvelette, P.; Geant, A. (2004). Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3510–5
- Forrest, G.L.; Akman, S.; Krutzik, S.; Paxton, R.J.; Sparkes, R.S.; Doroshov, J.; Felsted, R.L.; Glover, C.J.; Mohandas, T.; Bachur, N.R. (1990). Induction of a human carbonyl reductase gene located on chromosome 21. *Biochim Biophys Acta* **1048**: 149–155
- Forrest, G.L.; Gonzalez, B. (2000). Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact* **129**: 21-40
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**: 603–647
- Fryer, C.J. and Archer, T.K. (1998). Chromatin remodeling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* **398**: 88-91
- Fuhr, U. (2000). Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin. Pharmacokinet.* **38**: 493-504
- Ganten, D.; Ruckpaul, K. (2001). *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*. Springer, S. 7ff

- Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**: 493-509
- Genevaux, P.; Georgopoulos, C.; Kelley, W.L. (2007). The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol Microbiol* **66**(4): 840–857
- Germain, P.; Staels, B.; Dacquet, C.; Spedding, M.; Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **58**: 685-704
- Giguere, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* **20**: 689-725
- Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev.* **15**(3):391-407
- Gluzman Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182
- González, J.M., A. Navarro-Puche, B. Casar, P. Crespo, and V. Andrés. (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **183**: 653–666
- Graham F.L. (1987). Growth of 293 cells in suspension culture. *Journal of General Virology*, Vol **68**, 937-940
- Green, S.; Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* **4**(11): 309-14
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113-159
- Gronemeyer, H. (1991). Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet.* **25**: 89-123
- Gronemeyer, H.; Moras, D. (1995). Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature.* **375**: 190-1
- Halliday, G.M.; Bock, V.L.; Fergal, J.M.; Lyons, J.G. (2009). SWI/SNF: A chromatin-remodelling complex with a role in carcinogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*
- Han, R.; Bansal, D.; Miyake, K.; Muniz, V.P.; Weiss, R.M.; McNeil, P.L.; Campbell, K.P. (2007). Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J Clin Invest* **117** (7): 1805–1813
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanson, R.W.; Patel, Y.M. (1994). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP): The gene and the enzyme. *Adv. Enzymol* **69**: 203–281

- Hara, M.R.; Agrawal, N.; Kim, S.F.; Cascio, M.B.; Fujimuro, M.; Ozeki, Y. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* **7**: 665–74
- Harada, N.; Yasunaga, R.; Higashimura, Y.; Yamaji, R.; Fujimoto, K.; Moss, J.; (2007). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *JBiolChem* **282**: 22651–61
- Hartinger, J.; Stenius, K.; Hogemann, D.; Jahn, R. (1996). 16-BAC/SDS-PAGE: a twodimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem* **240**: 126-133
- Hayashi, O.; Katagiri, M.; Rothberg, S. (1955). Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J.Am. Chem. Soc.* **77**: 5450-5451
- Henzel, W.J.; Watanabe, C.; Stutts, J.T. (2003). Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom* **14** (9): 931-42
- Herzog, B., Cardenas, J., Hall, R. K., Villena, J. A., Budge, P. J., Giguere, V., Granner, D. K. and Kralli, A. (2006). Estrogen-related receptor  $\alpha$  is a repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* **281**: 99–106
- Hohfeld, J.; Cyr, D.M.; Patterson, C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* **2**(10): 885–890
- Hong, C.Y.; Su, J.H.; Kim, K.; Gong, E-Y.; Jeon, S.H.; Ko, M.; Seong, R.H.; Kwon, H.B.; Lee, K.(2005). Modulation of androgen receptor (AR) transactivation by SWI-3-related gene product (SRG3) in multiple ways. *Mol Cell Biol*, **25** (12): 4841-4852
- Honkakoski P., Zelko I., Sueyoshi T., Negishi M.(1998). The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* **18** (10):5652-8
- Horton, H. R.; Moran, L. A.; Ochs, R. S.; Rawn, J. D. and Scrimgeour, K. G. (1993). *Principles of Biochemistry*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ
- Hsiao, P.W.; Fryer, C.J.; Trotter, K.W.; Wang, W. and Archer, T.K. (2003). BAF 60a mediates critical interactions between nuclear receptors and the BRG1 chromatin-remodeling complex for transactivation. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 6210-6220
- Hurst, H.C. (1995). Transcription factors: bZIP proteins. *Protein Profile*, **2** (2): 101-68
- Ichinose, H.; Garnier, J.M.; Chambon, P. and Losson, R. (1997). Ligand-dependent interaction between the estrogen receptor and the human homologues of SWI2/SNF2. *Gene* **188**: 95-100
- Imamura, Y., Higuchi, T., Nozaki, Y., Sugino, E., Hibino, S., Otagiri, M. (1993). Purification and properties of carbonyl reductase from rabbit kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 570–576



- Imhof, A.; Yang, X.-J.; Ogryzko, V.V.; Nakatani, Y.; Wolffe, A.P. and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* **7**: 689-692
- Iwata, N.; Inazu, N.; Hara, S.; Yanase, T.; Kano, S.; Endo, T.; Kuriwa, F.; Sato, Y.; Satoh, T. (1993). Interindividual variability of carbonyl reductase levels in human livers. *Biochem Pharmacol* **45**: 1711-1714
- Jacobson, S.; Pillus, L. (1999). Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 175-84
- Jain, V.K.; Magrath, I.T. (1991). A chemiluminescent assay for quantification of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantification of beta-galactosidase in lacZ-transfected cells. *Anal Biochem* **199**(1): 119-24
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080
- Jeon, S.H.; Kang, M.G.; Kim, Y.H.; Jin, Y.H.; Lee, C.; Chung, H.Y.; Kwon, H.; Park, S.D. and Seong, R.H. (1997). A new mouse gene, SRG3, related to the SWI3 of *Saccharomyces cerevisiae*, is required for apoptosis induced by glucocorticoids in a thymoma cell line. *J. Exp. Med.* **185**: 1827-1836
- Jitrapakdee, S.; Slawik, M.; Medina-Gomez, G.; Campbell, M.; Wallace, J.C.; Sethi, J.K.; O'Rahilly, S.; Vidal-Puig, A. (2005). The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  regulates murine pyruvate carboxylase gene expression in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem* **280**: 27466-27476
- Johnson, B.D.; Schumacher, R.J.; Ross, E.D.; Toft, D.O. (1998). Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem.* **273**(6): 3679-86
- Kadam, S.; McAlpine, G.S.; Phelan, M.L.; Kingston, R.E.; Jones, K.A.; Emerson, B.M. (2000). Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes & Dev.* **14**: 2441-2451
- Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* **92**: 307-313
- Kaffman, A.; O'Shea, E.K. (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 291-339
- Kanno, Y.; Suzuki, M.; Nakahama, T.; Inouye, Y. (2005). Characterisation of nuclear localization signals and cytoplasmic retention region in the nuclear receptor CAR. *Biochim Biophys Acta* **1745**: 215-222
- Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem* **57**, 2935
- Karas, M.; Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299

- Kauffmann-Zeh, A.; Thomas, G. M.; Ball, A.; Prosser, S.; Cunningham, E.; Cockcroft, S. and Hsuan, J. J. (1995). Requirement for phosphatidylinositol transfer protein in epidermal growth factor signaling. *Science* **268**: 1188-90
- Kawana, K.; Ikuta, T.; Kobayashi, Y.; Gotoh, O.; Takeda, K.; Kawajiri, K. (2003). Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. *Mol Pharmacol.* **63**(3): 524-31
- Kim, S.; Lee, J.; Kim, J. (2007). Regulation of oncogenic transcription factor rhTAF(II)68-TEC activity by human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *BiochemJ* **404**: 197–206
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes & Dev.* **13**: 2339-2352
- Klinge, L.; Laval, S.; Keers, S.; Haldane, F.; Straub, V.; Barresi, R.; Bushby, K. (2007). From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB J.* **8**: 1768-76
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**: 376-386
- Kobayashi, K.; Jackson, M.J.; Tick, D.B.; O'Brien, W.E., Beaudet, A.L. (1990). Heterogeneity of mutations in argininosuccinate synthetase causing human citrullinemia. *J Biol Chem* **265**: 11361–11367
- Koike, C.; Moore, R. and Negishi, M. (2007). MEK-ERK is an endogenous signal retaining the nuclear receptor CAR in the cytoplasm of mouse primary hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 34538
- Kragten, E.; Lalande, I.; Zimmermann, K.; Roggo, S.; Schindler, P.; Muller, D. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the putative target of the antiapoptotic compounds CGP3466 and R(-)-deprenyl. *JBiolChem* **273**: 5821–8
- Kramer, G. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol* **16**(6): 589–597
- Kurahashi, Y.; Herbertsson, H.; Söderström, M.; Rosenfeld, M.G.; Hammarström, S. (2000). A 12(s)-hydroxyeicosatetraenoic acid receptor interacts with steroid receptor coactivator-1. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* **97** (11): 5779-83
- Kwon, H.; Imbalzano, A.N.; Khavari, R.E.; Kingston, R.E. and Green, M.R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature* **370**: 477-481
- Lakhman, S.S.; Chen, X.; Gonzalez-Covarrubias, V.; Schuetz, E.G.; Blanco, J.G. (2007). Functional characterization of the promoter of human carbonyl reductase 1 (CBR1). Role of XRE elements in mediating induction of CBR1 by ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol.* **72** (3): 734–743

- Lamba, V.; Lamba, J.; Yasuda, K.; Strom, S.; Davila, J.; Hancock, M.L.; Fackenthal, J.D.; Rogan, P.K.; Ring, B.; Wrighton, S.A.; Schuetz, E.G. (2003). Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to *CYP2B6* genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**: 906-922
- Lamba, J.K., Lamba, V.; Yasuda, K.; Lin, Y.S.; Assem, M.; Thompson, E.; Strom, S.; Schuetz, E. (2004). Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**: 811-821
- Laudet V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. In: *J. Mol. Endocrinol.* **19** (3): 207–26
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1993) *Principles of Biochemistry*, 2nd edn., Worth Publishers, New York
- Lennon, N.J.; Kho, A.; Bacskai, B.J.; Perlmutter, S.L.; Hyman, B.T.; Brown, R.H. Jr. (2003). Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* **278**: 50466– 50473
- Li, Y.; Lazar, M.A. (2002). Differential Gene Regulation by PPAR $\gamma$  Agonist and Constitutively Active PPAR $\gamma$ 2. *Mol. Endocrinol* **16**: 1040–1048
- Liberek, K.; Lewandowska, A.; Zietkiewicz, S. (2008). Chaperones in control of protein disaggregation. *Embo J* **27**(2): 328–335
- Liscovitch, M.; Cantley, L.C. (1995). Signal transduction and membrane traffic: the P13K/phosphoinositide connection. *Cell* **81** (5):659-662
- Lopez de Cerain, A.; Marin, A.; Idoate, M.A.; Tunon, M.T.; Bello, J. (1999). Carbonyl reductase and NADPH cytochrome P450 reductase activities in human tumoral versus normal tissues. *Eur J Cancer* **35**: 320-324
- Lottspeich, F.; Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Verlag
- Luo, Y.; Batalao, A.; Zhou, H.; Zhu, L. (1997). Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques* **22**(2): 350-2
- Mahgoub, A.; Dring, L.G.; Idle, J.R.; Lancaster, R.; Smith, R.L. (1977). Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* **2**: 584-586
- Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-9
- Maraldi, N.M., C. Capanni, E. Mattioli, M. Columbaro, S. Squarzone, W.K.Parnaik, M. Wehnert, and G. Lattanzi. (2007). A pathogenic mechanism leading to partial lipodystrophy and prospects for pharmacological treatment of insulin resistance syndrome. *Acta Biomed.* **78**: 207–215

- Marshall, T.W.; Link, K.A.; Petre-Draviam, C.E.; Knudsen, K.E. (2003). Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *J.Biol.Chem.* **278**: 30605-30613
- Martens, J.A. and Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/snf complexes. *Curr.Opin.Genet. Dev.* **13**: 136-142
- Mason, H.S.; Fowlks, L.; Peterson, E. (1955). Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.* **77**: 2851-2914
- Mayer, M.P.; Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62(6)**: 670–684
- McKenna, N.J.; Lanz, R.B. and O'Malley, B.W.(1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* **20**: 321-44
- Meimaridou, E.; Gooljar, S.B.; Chapple, J.P. (2009). From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *J Mol Endocrinol* **42(1)**: 1–9
- Mendel, D.B.; Crabtree, G.R. (1991). HNF1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J. Biol.Chem.* **266**: 677-680
- Meyer, T.S.; Lamberts, B.L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta* **107(1)**: 144-5
- Morano, K.A. (2007). New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp 70. *Ann N Y Acad Sci.* **1113**: 1-14
- Muangmoonchai, R.; Smirlis, D.; Wong, S.C.; Edwards, M.; Phillips, I.R.; Shepard, E.A.(2001). Xenobiotic induction of cytochrome P450 2B1(CYP2B1) is mediated by the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and requires steroid co-activator 1 (SRC-1) and the transcription factor Sp1. *Biochem J* **355**: 71-80
- Muchardt, C. and Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **12**: 4279-4290
- Muchardt, C. and Yaniv, M. (1999). ATP-dependent chromatin remodeling: SWI/SNF and Co are on the job. *J. Mol. Biol.* **293**: 187-198
- Mueller, G.C.; Miller, J.A. (1949). The reductive cleavage of 4-dimethylamino-azo-benzene by rat liver: the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for triphosphopyridine nucleotide. *J.Biol.Chem.* **180**, 1125
- Nagy, L. Und Schwabe, J.W. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* **29**: 317-24
- Nakagawa, T.; Hirano, Y.; Inomata, A.; Yokota, S.; Miyachi, K.; Kaneda, M. (2003). Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly. *J Biol Chem* **278**: 20395–404

- Narlikar, G.J.; Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**: 475-487
- Nollen, E.A.; Morimoto, R.I. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* **115**(14): 2809–2816
- Nordlie, R. C. and Lardy, H. A. (1963). Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *J. Biol. Chem.* **238**: 2259-2265
- Nuclear Receptor Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**:161–163
- Ogryzko, V.V.; Schiltz, R.L.; Russanova, V.; Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**: 953-959
- Omura, T.; Sato, R. (1962). A new cytochrom in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **276**: 36863-36864
- Ostlund-Farrants, A.K.; Blomquist, P.; Kwon, H. and Wrangé, O. (1997). Glucocorticoid receptor-glucocorticoid response element binding stimulates nucleosome disruption by the SWI /SNF complex. *Mol. Cell Biol.* **17**: 895-905
- Owen-Hughes, T. (2003). Pathways for remodeling chromatin. *Biochem Soc Trans* **31**: 893-905
- Park, J.; Han, D.; Kim, K.; Kang, Y.; Kim, Y. (2009). O-GlcNAcylation disrupts glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase homo-tetramer formation and mediates its nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 254–62
- Park, M.J.; Kong, H.J.; Kim, H.Y.; Kim, H.H.; Kim, J.H.; Cheong, J.H. (2007). Transcriptional repression of the gluconeogenic gene PEPCK by the orphan nuclear receptor SHP through inhibitory interaction with C/EBP $\alpha$ . *Biochem. J.* **402**: 567–574
- Pascussi, J-M; Gerbal-Chaloin, S.; Fabre, J-M.; Maurel, P. and Vilarem, M-J. (2000). Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes; consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol.Pharmacol* **58**(6): 1441-1450
- Peterson, C.L. and Cote, J. (2004). Cellular machinerie for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* **18**: 602-616
- Polach, K.J.; Widom, J. (1995). Mechanism of protein access to specific DNA-sequences in chromatin-a dynamic equilibrium-model for gen-regulation. *J Mol Biol* **254**: 130-49
- Pratt, W.B. (2006). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol* **172**: 111–138
- Rabilloud, T.; carpenter, G.; Tarroux, P. (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9**(6): 288-91

- Ramakrishnan, V. (1997). Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**: 83-112
- Rasheed, S.; Nelson-Rees, w.A.; Toth, E.M.; Arnstein, P.; Gardner, M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33** (4): 1027-1033
- Reshef, L.; Olswang, Y.; Cassuto, H.; Blum, B.; Croniger, C.M.; Kalhan, S.C.; Tilghman, S.M.; Hanson, R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol Chem* **278**: 30413–30416
- Resnitzky, D.; Gossen, M.; Bujard, H.; Reed, S.I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1669-1679
- Richmond, T. and Davey, C. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**: 145-150
- Ryu, J.K.; Davalos, D. and Akassoglou, K. (2009). Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *J Thromb Haemost.* **7**: 151-154
- Robinson, B.H. (1971). Transport of phosphoenolpyruvate by the tricarboxylate transporting system in mammalian mitochondria. *FEBS Lett* **14**: 309–312
- Robinson-Rechavi, M.; Escriva Garcia, H. and Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J. Cell. Sci.* **116**: 585-6
- Rodriguez-Pascual, F.; Redondo-Horcajo, M.; Magan-Marchal, N.; Lagares, D.; Martinez-Ruiz, A.; Kleinert, H. (2008). Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *MolCellBio* **28**: 7139–55
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* Bd. **74**, S. 5463-5467
- Savkur, R.S.; Wu, Y.; Bramlett, K.S.; Wang, M.; Yao, S.; Perkins, D.; Totten, M.; Scarfoss; III.G.; Ryan, T.P.; Su, E.; Burris, T.P. (2003). Alternative splicing within the ligand binding domain of the human androstane receptor. *Mol.Genet.Metab.* **80**: 216-226
- Sawa, A.; Khan, A.A.; Hester, L.D.; Snyder, S.H. (1997). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11669–74
- Schachtrup, C.; Lu, P.; Jones, L.L.; Lee, J.K.; Lu, J.; Sachs, B.D. (2007). Fibrinogen inhibits neurite outgrowth via beta3 integrin-mediated phosphorylation of the EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11814–11819

- Schaniel, C.; ANg, Y.S.; Ratnakumar, K.; Cornier, C.; James, T.; Lemischka, I.R.; Paddison, P.J. (2009). Smarcc1/Baf155 Couples Self-Renewal Gene Repression with Changes in Chromatin Structure in Mouse Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* **27**: 2979–2991
- Scherer W.F., Syverton J.T. and Gey G.O. (1953). Studies on the propagation of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**: 695
- Segura-Totten, M., and K.L. Wilson. (2004). BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol.* **14**: 261–266
- Sen, N.; Hara, M.R.; Kornberg, M.D.; Cascio, M.B.; Bae, B.I.; Shahani, N. (2008). Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* **10**: 866–73
- Senatorov, V.V.; Charles, V.; Reddy, P.H.; Tagle, D.A.; Chuang, D.M. (2003). Overexpression and nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* **22**: 285–97
- Seol, W., Hanstein, B., Brown, M. and Moore, D. D. (1998). Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). *Mol. Endocrinol.* **12**: 1551–1557
- Shanahan, F.; Seghezzi, W.; Parry, D.; Mahony, D.; and Lees, E. (1999). Cyclin E associates with BAF 155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol.* **19**: 1460-1469
- Simone, C. (2006). SWI/SNF: the crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *J Cell Physiol* **207**: 309-14
- Sirover, M.A. (2005). New nuclear function of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* **95**: 45–52
- Smith, D.B.; Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**(1): 31-40
- Spraggon, G., Everse, S.J., Doolittle, R.F. (1997). Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* **389**: 455–462
- Squires, E.J.; Sueyoshi, T.; Negishi, M. (2004). Cytoplasmic Localization of Pregnane X Receptor and Ligand-dependent Nuclear Translocation in Mouse Liver. *J Biol Chem* **279**: 49307-49314
- Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**: 1-4
- Studitsky, V.M.; walter, W.; Kireeva, M.; Kashlev, M.; Felsenfeld, G. (2004). Chromatin remodeling by RNA polymerase. *Trends Biochem Sci* **29**: 127-35

- Sudarsanam, P.; Iyer, V.R.; Brown, P.O.; Winston, F. (2000). Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl acad Sci USA* **97**: 3364-9
- Sugiyama, T., Scott, D. K., Wang, J. C. and Granner, D. K. (1998). Structural requirements of the glucocorticoid and retinoic acid response units in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *Mol. Endocrinol.* **12**: 1487–1498
- Swales, K.; Negishi, M. (2004). CAR, driving into the future. *Mol Endocrinol.* **18** (7): 1589-98
- Tanaka, K. (1988). Generation of active oxygen by environmental factors: air pollutions. *Tanpakushitsu Kakusan koso* **33**(16): 2824-9
- Tavaria, M.; Gabriele T.; Kola, I.; Anderson, R.L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp 70 family. *Cell Stress Chaperones* **1**: 23-8
- Tisdale, E.J.; Azizi, F.; Artalejo, C.R. (2009). Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase and proteinkinase C {iota} to associate with microtubules and to recruit dynein. *J Biol Chem* **284**: 5876–84
- Therrien, C.; Dodig, D.; Karpati, G.; Sinnreich, M. (2006). Mutation impact on dysferlin inferred from database analysis and computer-based structural predictions. *J Neurol Sci* **250**: 71–78
- Thomas, G. M.; Cunningham, E.; Fensome, A.; Ball, A.; Totty, N.F.; Truong, O.; Hsuan, J. J. and Cockcroft, S. (1993). An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling. *Cell* **74**, 919-928
- Thomas, P.E.; Lu, A.Y.; Ryan, D.; West, S.B.; Kawalek, J.; Levin, W. (1976). Multiple forms of rat liver cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **251**:1385-1391
- Tom, B.H.; Rutzky, L.P.; Jakstys, M.M.; Oyasu, R.; Kaye, C.I.; Kahan, B.D. (1976). Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* **12**: 180-91
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **6**(9): 4350-4
- Trotter, K.W.; Archer, T.K. (2004). Reconstitution of glucocorticoid receptor-dependent transcription in vivo. *Mol Cellular Biol* **24**: 3347-58
- Truss, M.; Bartsch, J.; Schelbert, A.; Hache, R.J. and Beato, M. (1995). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* **14**: 1737-1751
- Tsai, L.H.; Lees, E.; Faha, B.; Harlow, E.; Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* **8**: 1593-1602
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 509-544



- Umesono, K.; Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**(7): 1139-46
- Utley, R.T.; Cote, J.; Owen-Hughes, T. and Workman, J.L. (1997). SWI/SNF stimulates the formation of disparate activator-nucleosome complexes but is partially redundant with cooperative binding. *J.Biol.Chem.* **272**: 12642-12649
- Utter, M. F. and Kurahashi, K. (1954). Mechanism of action of oxalacetic carboxylase. *J. Biol. Chem.* **207**: 787-802
- Vidnes, J. and Sovik, O. (1976). Gluconeogenesis in infancy and childhood III: Deficiency of the extramitochondrial form of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase in a case of persistent neonatal hypoglycaemia. *Acta Paediatr. Scand.* **65**: 307-312
- Vignali, M.; Hassan, A.H.; Neely, K.E. and Workman, J.L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1899-1910
- Wang, Q.; Udayakumar, T.S.; Vasaitis, T.S.; Brodie, A.M.; Fondell, J.D. (2004). Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells. *J.Biol.Chem.* **279**: 17319-17328
- Waxman, D.J. (1999). P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: control role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**: 11-23
- Wei, P.; Zhang, J.; Dowhan, D.H.; Han, Y.; Moore, D.D. (2002). Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics J.* **2**: 117-126
- Wegele, H, Müller, L.; Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **151**: 1-44
- Wirtz, K.-W. (1991). Phospholipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 73–99
- Witt, S. (2009). Hsp70 Molecular Chaperones and Parkinson's Disease. *Biopolymers* **93**: 218–228
- Wong, J.M.; Kalow, W.; Kadar, D.; Takamatsu, Y.; Inaba, T. (1993). Carbonyl(phenone) reductase in human liver: inter-individual variability. *Pharmacogenetics* **3**: 110-115
- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L., Maser, E. (2003). Stereochemical aspects of carbonyl reduction of the original anticancer drug oracin by mouse liver microsomes and purified 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chem. Biol. Interact.* **143–144**: 459–468
- Wsol, V., Szotakova, B., Skalova, L., Maser, E. (2004). The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Toxicology* **197**: 253–261
- Xia, J. and Kemper, B. (2007). Subcellular Trafficking Signals of Constitutive Androstane receptor: Evidence for a Nuclear Exprt Signal in the DNA Binding Domain. *Drug Metab Dispos* **35**(9): 1489-94

- Yan, Z.; Cui, K.; Murray, D.M.; Ling, C.; Xue, Y.; Gerstein, A. (2005). PBAF chromatin-remodeling complex requires a novel specificity subunit, BAF 200 to regulate expression of selective interferon-responsive genes. *Genes Dev* **19**: 1662-7
- Yao, R.; Yasuoka, A.; Kamei, A.; Kitagawa, Y.; Tateishi, N.; Tsuruoka, N.; Kiso, Y.; Sueyoshi, T.; Negishi, M.; Misaka, T., Abe, K. (2010). Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J Agric Food Chem.* 58(4): 2168-73
- Yego, E.C.; Vincent, J.A.; Sarthy, V.; Busik, J.V.; Mohr, S. (2009). Differential regulation of high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation in Muller cells by IL-1beta and IL-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 1920–8
- Yoshikawa, H.; Tajiri, Y.; Sako, Y.; Hashimoto, T.; Umeda, F.; Nawata, H. (2001a). Effects of free fatty acids on beta-cell functions: a possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha orpancreatic/duodenal homeobox. *Metabolism* **50**: 613–618
- Yoshinaga, S.K.; Peterson, C.L.; Herskowitz, I. and Yamamoto, K.R. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* **258**: 1598-1604
- Yoshinari, K.; Kobayashi, K.; Moore, R.; Kawamoto, T.; Negishi, M. (2003). Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett* **548**:17-20
- Young, J.C.; Barral, J.M.; Ulrich-Hartl, F. (2003). More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* 28(10): 541–547
- Zelko, I.; Sueyoshi, T.; Kawamoto, T.; Moore, R.; Negishi, M. (2001). The peptide near the C terminus regulates receptor CAR nuclear translocation induced by xenochemicals in mouse liver. *Mol Cell Biol.* **21**(8): 2838-46.
- Zhou, Y.; Yi, X. ; Stoffer, J.B.; Bonafe, N.; Gilmore-Hebert, M.; McAlpine, J. (2008). Themultifunctional protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is both regulated and controls colony-stimulating factor-1messenger RNA stability in ovarian cancer. *MolCancerRe* **6**: 1375–84
- Zofall, M.; Persinger, J.; Kassabov, S.R.; Bartholomew, B. (2006). Chromatin remodeling by ISW2 and SWI / SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 339-46

## **7. Anhang**

### **Zusammenfassung identifizierter Proteine**

**Tabelle 7.1: Identifizierte Proteine aus Pulldown-Assays mit Rattenleberhomogenat**

Mittels MASCOT-Datenbanksuche identifizierte Proteine. Signifikant sind Ergebnisse mit einem Score > 61.

| <b>Proteinname</b>   | <b>MASCOT- Score</b> |
|--|----------------------|
| Mitofusin 1  | 64                   |
| Fidgetin-like 1  | 61                   |
| Hypothetisches Protein                                     | 55                   |
| Ras-like Protein, Familie 10B                              | 56                   |
| Centrosomales Protein                                      | 65                   |
| Jmjd Protein 2a  | 60                   |
| ATP-abhängiger Kaliumkanal                                 | 51                   |
| Keratin 6  | 62                   |
| T-Box Protein 6  | 57                   |
| EGR 1  | 58                   |
| Elongationsfaktor RNS                                      | 60                   |
| Keratin 1  | 64                   |
| Olfaktorrezeptor   | 58                   |
| Myosin, schwere Kette 9                                    | 288                  |
| Carbomoylphosphatsynthetase                                | 230                  |
| Myosin, schwere Kette 1                                    | 72                   |
| Interferon   | 69                   |
| Actinin alpha  | 391                  |
| Hitzeschockprotein 70                                      | 91                   |
| Keratin 8  | 192                  |
| Replikationsfaktor C                                       | 57                   |
| Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)              | 69                   |
| Aktin beta   | 158                  |
| Pyruvatcarboxylase   | 100                  |
| Syntrophin alpha   | 63                   |
| Uracil-DNA Glykosylase                                     | 59                   |
| Mindbomb Homolog 2   | 60                   |
| Uridinmonophosphatsynthetase                               | 62                   |
| Proteinkinase C  | 52                   |
| SMARCC1/BAF 155  | 66                   |
| Kristallstruktur der Ankyrinbindungsdomäne der Na-K-ATPase | 135                  |
| Dysferlin  | 66                   |
| Keratin 18   | 50                   |
| Aktin gamma 1  | 223                  |
| Argininosuccinatsynthetase 1                               | 223                  |

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| Pantothenatkinase 1                | 40  |
| Uricase (Uratoxidase)              | 97  |
| Annexin                            | 28  |
| Ubiquitinkonjugatives Enzym        | 77  |
| Otopetrin                          | 24  |
| Keratin 13                         | 43  |
| Ubiquitinspezifische Peptidase     | 40  |
| Betainhomocysteinmethyltransferase | 182 |
| Caseinkinase 1                     | 67  |
| Lamin A                            | 138 |
| Keratin 19                         | 75  |
| Fibrinogen beta                    | 365 |
| Alpha Spektrin                     | 143 |

**Tabelle 7.2: Identifizierte Proteine aus Pulldown-Assays mit humanem Leberhomogenat**

Mittels MASCOT-Datenbanksuche identifizierte Proteine. Signifikant sind Ergebnisse mit einem Score > 64.

| Proteinname  | MASCOT- Score |
|--|---------------|
| Carboxypeptidase X   | 70            |
| Keratin 28   | 61            |
| Carbonylreduktase  | 170           |
| Phosphatidylinositol transfer protein<br>1, alpha isoform (PITPNA) | 78            |
| Phosphoenolpyruvat carboxykinase 2<br>(mitochondrial) PEPCK2       | 69            |
| Aktin beta   | 127           |
| Sialyltransferase IV alpha   | 60            |
| Keratin 10   | 89            |
| KIAA 1318 Protein  | 30            |
| Zinkfingerprotein 862  | 41            |
| Dynaktin 1   | 35            |
| Leuzinzipper Transkriptions regulator 2<br>(LZTR2/Sec16B)          | 76            |
| Hypothetisches Protein   | 45            |
| Protein hCG2039433   | 48            |
| BRCA1 Protein  | 56            |
| Myasteniaprotein   | 51            |

## **8. Danksagung**

Als erstes bedanke ich mich bei dem Leiter des Dr. Margarete-Fischer-Bosch Instituts für klinische Pharmakologie (IKP), Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab, der mir die Möglichkeit gegeben hat, experimentell zu forschen.

Herrn Prof. Dr. Lutz Graeve von der Universität Hohenheim danke ich für die freundliche Übernahme des Gutachtens sowie seine hilfreiche Unterstützung.

Auch danke ich Frau Prof. Dr. Christiane Bode von der Universität Hohenheim sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danke an meinen Betreuer und Arbeitsgruppenleiter am IKP, Herrn Dr. Oliver Burk, für die Überlassung des Themas, die lehrreiche Zeit und wissenschaftliche Unterstützung mit vielen hilfreichen Ideen, die zu dieser Arbeit geführt haben.

Ein besonderer Dank geht an Rita und Ella für die vielen Konversationen und daraus entstandenden Freundschaften.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Atmosphäre am Arbeitsplatz sowie den unvergesslichen Spaß im „James-Bond“- Labor 007.

Herzlichen Dank an meine lieben Post-Doc-Kollegen des Büros 258: Simone, Julia, Heike, Rainer und Tadashi, mit denen ich eine sehr schöne Zeit hatte.

Ich bedanke mich bei Prof Dr. Trevor Archer (Triangle Park, North Carolina, USA) für die Bereitstellung der verschiedenen BAF 155 Konstrukte.

Meinen Eltern Ursula und Melvin sowie meinem Bruder Jason danke ich recht herzlich, die mir immer stets unterstützend zur Seite gestanden haben.

Vielen lieben Dank an meine Freundin Sandra Grill aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckhard Friauf (Technische Universität Kaiserslautern), die mich mit Rattenlebergewebe versorgt hat. Aber hauptsächlich danke ich ihr zutiefst für ihre Geduld und ihre permanente Unterstützung während dieser Zeit sowie für das unermüdliche Korrekturlesen aller Kapitel. Ich kann ihr nicht genug dafür danken und weiß all die Mühe und Stunden/Tage, die sie damit verbracht hat, sehr zu schätzen.

***...Danke!***

## ***CURRICULUM VITAE***

Name: Clint Melgar  
Date of Birth: 30. Juni 1978  
Place of Birth: Landau in der Pfalz  
Nationality: German

### **Academic qualifications**

1999-2003 Study of biology at the University of Karlsruhe (Fridericiana)

2003-2006 Study of biology at the University of Kaiserslautern  
Graduation in biology at the laboratory of Juniorprof. Dr. Claudia Fecher-Trost (Department of Biology, Proteinfunktion/Proteomics)  
Diploma thesis title: „Characterisation of putative TRPV6-interaction partners using glutathion-S-transferase-fusion protein-binding studies (1,5)

2007-2010 PhD student in the laboratory of Dr. rer.nat. Oliver Burk at Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology (IKP) in Stuttgart  
PhD thesis title: Characterisation of new interaction partners of the nuclear receptor CAR („constitutive androstane receptor“) using MALDI-TOF mass spectrometry

### **Professional Career**

Since 2007 Research at the Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology (IKP) in Stuttgart, Head of the Institute: Prof. Dr. med. Matthias Schwab