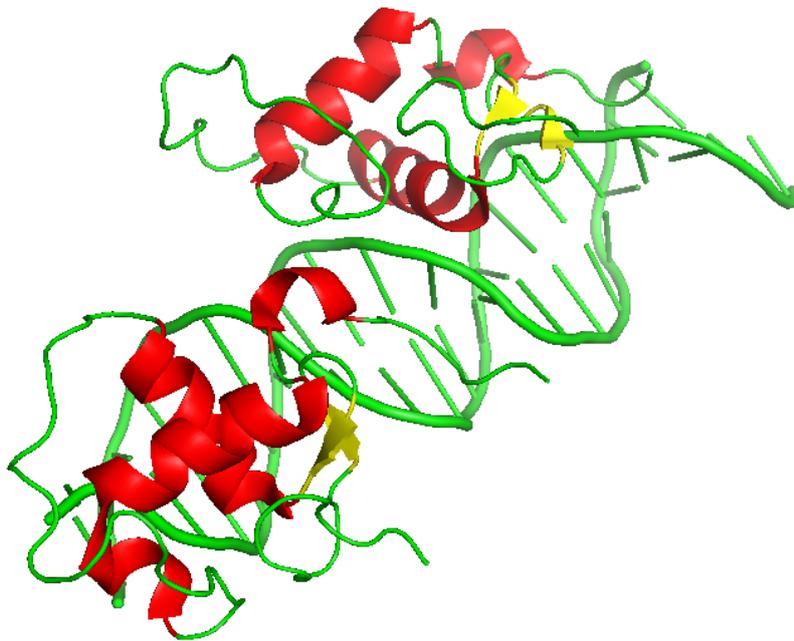


MICHAEL ERMISCH

REGULATION DER NUKLEÄREN REZEPTOREN
ROR α UND REVERB α



REGULATION DER NUKLEÄREN REZEPTOREN
ROR α UND REVERB α

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

vorgelegt beim Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
MICHAEL ERMISCH
aus Augsburg

Frankfurt am Main (März 2011)
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

DEKAN:

Prof. Dr. Dieter Steinhilber

GUTACHTER:

Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Prof. Dr. Rolf Marschalek

DATUM DER DISPUTATION: 04.07.2011

Meiner Familie

ZUSAMMENFASSUNG

Nukleäre Rezeptoren regulieren eine Vielzahl von Genen durch Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen im Promotor dieser Gene. Sie fungieren als Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung ihres Liganden die Transkription aktivieren oder supprimieren. In ihrer Funktion werden sie weiterhin durch verschiedene Signale moduliert, beispielsweise durch posttranslationale Veränderungen. Aufgrund der Möglichkeit, durch Liganden, in der Regel kleine lipophile Moleküle, die Aktivität nukleärer Rezeptoren und in der Folge die Transkription definierter Gene zu beeinflussen, sind nukleäre Rezeptoren gute Zielstrukturen für Arzneistoffe und stehen im Zentrum intensiver Forschungsbemühungen.

ROR α und RevErb α sind nukleäre Rezeptoren aus der Gruppe der sogenannten Orphan-Rezeptoren. Die Angehörigen dieser Gruppe wurden als Waisen bezeichnet, da ihr Ligand zum Zeitpunkt ihrer Charakterisierung unbekannt war. 2007 gelang es zwei Gruppen unabhängig voneinander Häm als den Liganden des RevErb α zu identifizieren, für ROR α werden verschiedene potentielle Liganden diskutiert, wobei bisher keiner allgemein anerkannt wurde. ROR α und RevErb α steuern die Expression ihrer Zielgene über ein gemeinsames Response-Element, wobei ROR α die Expression dieser Gene aktiviert und RevErb α sie inhibiert. Gemeinsam nehmen sie eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung zirkadianer Rhythmen und an der Integration dieser in metabolische Prozesse ein. ROR α ist weiterhin beteiligt an der Reifung der Cerebellums sowie an der Steuerung der Immunabwehr.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der beiden Rezeptoren auf molekularer Ebene aufzuklären. Hierfür wurden Untersuchungen auf Ebene der Transkription ebenso wie auf posttranslationaler Ebene durchgeführt. Es zeigte sich, dass ROR α -hnRNA *in vitro* extrem stabile Sekundärstrukturen ausbildet und somit bei der reversen Transkription den Transkriptionsstart selbst initiieren kann. Im Zuge der durchgeführten Untersuchungen konnte nicht nachgewiesen werden, welche Auswirkung diese Sekundärstrukturen *in vivo* zeigen. Studien anderer Gruppen hatten aber gezeigt, dass die Ausbildung von RNA-Doppelsträngen an vielen Stellen in die Regulationen von Genen eingreift, sei es durch Veränderungen des Spleißmusters, RNA-Editierung oder durch Herabregulierung der Transkriptmenge.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl RevErb α als auch ROR α einer intensiven Regulation durch posttranslationale Veränderungen unterliegen, im Speziellen durch Phosphorylierung. Vorangegangene Studien hatten Hinweise geliefert, dass ROR α durch ERK-2 phosphoryliert werden kann. In meinen Studien war ich in der Lage nachzuweisen, dass auch RevErb α Ziel dieser Kinase ist. Im Gegensatz zu ROR α wird RevErb α jedoch gleichzeitig an mehreren Stellen phosphoryliert, wobei die physiologische Funktion dieser Phosphorylierungen Gegenstand weiterer Untersuchungen ist.

Die Aktivität von ROR α am Response-Element wird durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels stark stimuliert. Im Zuge meiner Untersuchungen konnte eine Beteiligung sowohl des cAMP-Response-Element-bindenden Proteins CREB als auch des PPAR γ -Coaktivators 1a an der Vermittlung dieser Aktivitätssteigerung ausgeschlossen werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Effekt durch eine Hemmung der Proteinkinase A dosisabhängig aufgehoben werden konnte. In weiteren Untersuchungen konnte ich eine direkte Phosphorylierung von ROR α , nicht aber von RevErb α durch PKA nachweisen und die Phosphorylierungsstelle als Serin 99 des ROR α 4 identifizieren. Da eine Mutation der in der C-terminalen Verlängerung der DNA-bindenden Domäne des Rezeptors gelegenen Aminosäure jedoch nicht in der Lage war, die Aktivitätssteigerung zu verhindern, sind auch noch weitere Faktoren, vermutlich zelluläre Coaktivatoren an deren Vermittlung beteiligt.

Bereits in früheren Untersuchungen war beschrieben worden, dass die Aktivität von ROR α durch eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels stark stimuliert wird. Weiterhin fanden sich Hinweise, dass die Calcium/-Calmodulin-abhängige Kinase IV an der Vermittlung dieser Stimulation beteiligt ist, jedoch ohne direkte Phosphorylierung von ROR α durch CaMKIV. Es konnte allerdings nicht aufgeklärt werden, über welchen Mechanismus die Signaltransduktion stattdessen erfolgt. In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass eine Inhibition durch Proteinkinase A aktivierter Signalwege auch die Aktivierung von ROR α durch CaMKIV dosisabhängig hemmte.

Zusammengenommen lieferten meine Untersuchungen weitere Hinweise auf eine wichtige Rolle von ROR α in der Regulation metabolischer Prozesse wie des Glycogen- und Lipidstoffwechsels. Außerdem deuten meine Ergebnisse auf eine Verknüpfung der Signalwege von CaMKIV und Proteinkinase A hin und etablieren ROR α als gemeinsame Zielstruktur.

PUBLIKATIONEN

Einige Ideen und Grafiken wurden bereits in der folgenden Publikation verwendet:

M. ERMISCH, B. FIRLA & D. STEINHILBER: Protein kinase A activates and phosphorylates ROR α 4 *in vitro* and takes part in ROR α activation by CaMK-IV, in: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408 (2011) S. 442 – 446

*The chances of finding out
what's really going on in the universe
are so remote,
the only thing to do is hang the sense of it
and keep yourself occupied...*
Douglas Adams: The Hitchhiker's Guide To The Galaxy

DANKSAGUNG

Danke...

- ... meiner Frau Steffi, für Deine Liebe und Deinen unerschütterlichen Glauben an mich
- ... meinen Eltern, für Eure Liebe und Unterstützung über all die vielen Jahre
- ... meiner Schwester Martina, für die Ehre Dein Bruder sein zu dürfen
- ... Prof. Dieter Steinhilber für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, diese Arbeit zu verfassen
- ... Dr. Beate Firla für die Einweisung in das Thema und kritische Diskussion meiner Arbeit
- ... Dr. Lars Tausch für die Aufnahme ins Labor und die gute Zusammenarbeit
- ... Laura Pufahl für die wunderbare Laboratmosphäre trotz anfänglicher Reibungen
- ... Ann-Kathrin Häfner für Freundschaft und viele anregende Gespräche
- ... Dr. Careen Katryniok für Unterstützung im Labor und die Weinstube im Nordend
- ... Astrid Fischer, Dr. Marika Hoffmann, Dr. Christina Hörnig, Dr. Michael Hörnig, Dr. Julia Metzner, Svenja Steinbrink & Thea Wöbke für die gute Zusammenarbeit im 8. Semester
- ... Astrid Brüggerhoff für die Betreuung der Routinezellkultur und das Bestellmanagement
- ... allen weiteren Kollegen des Arbeitskreises, alten wie neuen, für die kollegiale Atmosphäre, die Kaffeepausen und die Diskussionen im Arbeitskreiseminar

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG IN WICHTIGE THEMENGEBIETE	1
1.1	Struktur nukleärer Rezeptoren	1
1.1.1	Die DNA-bindende Domäne	3
1.1.2	Die ligandenbindende Domäne	6
1.2	Expressionsregulation durch nukleäre Rezeptoren	9
1.3	Retinoid-related-Orphan-Rezeptor α	14
1.3.1	Purkinjenzellentwicklung	15
1.3.2	Regulation der T _H -Zellentwicklung	16
1.3.3	Lipidmetabolismus	18
1.3.4	Krebsentstehung	18
1.3.5	Potentielle Liganden	19
1.3.6	Posttranslationale Modifikationen	20
1.4	RevErb α	22
1.4.1	Liganden	23
1.4.2	Posttranslationale Modifikationen	24
1.4.3	Steuerung zirkadianer Rhythmen	24
1.4.4	Funktionen im Metabolismus	26
1.5	Zielsetzung der Arbeit	27
2	MATERIALIEN UND METHODEN	29
2.1	Zellkultur	29
2.2	Kompetente E. coli-Stämme	29
2.3	Gewinnung von Plasmidvektoren	30
2.3.1	Präparation von Plasmidvektoren	30
2.3.2	Klonierung	31
2.3.3	Punktmutation	31
2.3.4	Verwendete Plasmide	31
2.4	Gewinnung nukleärer Extrakte	32
2.5	Isolation nukleärer Melatoninbindungspartner	33
2.6	Gewinnung von ROR α 4 und RevErb α	33
2.7	Proteinbestimmung nach Bradford	33
2.8	Transfektionen	34
2.9	Reportergenanalysen	34
2.10	Etablierung stabil transfizierter Zelllinien	34
2.11	RNA-Isolierung	35
2.12	cDNA-Synthese	35
2.13	qRT-PCR	35
2.14	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	35
2.15	<i>In vitro</i> Kinaseanalysen	36
2.16	Peptide Maps	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Regulation der Expression von ROR α	37
3.1.1	Regulation durch Antisensetranskripte	37
3.1.2	Regulation durch Melatonin	43

3.2	Regulation der Aktivität von ROR α & RevErb α	45
3.2.1	Veränderung der zellulären Lokalisation	46
3.2.2	ROR α , RevErb α und ERK2	47
3.2.3	Auswirkungen des zellulären cAMP-Spiegels	55
3.2.4	ROR α und PKA	61
3.2.5	ROR α , CaMKIV und PKA	63
4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	67
4.1	Transkriptionsregulation	67
4.2	Aktivitätsregulation durch Melatonin	69
4.3	Aktivitätsregulation durch PGC1 α	70
4.4	Aktivitätsregulation durch Kinasen	71
4.4.1	Extrazellulärsignalregulierte Kinase 2	72
4.4.2	Proteinkinase A	74
4.4.3	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV	75
4.5	Bewertung der Ergebnisse	77
	APPENDICES	79
A	TABELLEN	81
A.1	Nomenklatur Nukleärer Rezeptoren	81
A.2	PCR-Primer	84
A.3	Primer zur Mutation	85
A.4	Knockdown-Konstrukte	86
A.5	Verwendete Antikörper	86
B	LITERATURVERZEICHNIS	87
C	ERKLÄRUNG	107
D	LEBENS LAUF	109

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Modularer Aufbau nukleärer Rezeptoren	2
Abbildung 2	DNA-Bindung nukleärer Rezeptoren	4
Abbildung 3	Primärstruktur der DNA-bindenden Domäne	6
Abbildung 4	Kristallstrukturen DNA-bindender Domänen	7
Abbildung 5	Struktur der ligandenbindenden Domäne	8
Abbildung 6	Bindung von Coregulatoren	10
Abbildung 7	Regulation der Genexpression	12
Abbildung 8	Struktur der ROR α - <i>hnRNAs</i>	14
Abbildung 9	Regulation der Purkinje- & Granularzellreifung	16
Abbildung 10	Zirkadiane Rhythmen	25
Abbildung 11	Metabolismus und zirkadiane Rhythmen	28
Abbildung 12	Identifizierung putativer ROR α -NATs	39
Abbildung 13	Detektion von ROR α -NATs (I)	40
Abbildung 14	Detektion von ROR α -NATs (II)	41
Abbildung 15	Expressionsregulation durch Melatonin	44
Abbildung 16	Melatonin-derivate für Bindungsstudien	44
Abbildung 17	Aktivität der ROR α -Isoformen	46
Abbildung 18	Regulation durch Melatonin & Calreticulin	47
Abbildung 19	Regulation durch GSK 3 β	49
Abbildung 20	Negativkontrolle für Reporteranalysen	49
Abbildung 21	Regulation durch GSK 3 β II	50
Abbildung 22	Struktur von 1-Azakenpaullon	50
Abbildung 23	Regulation durch CaMKIV	51
Abbildung 24	Regulation durch ERK2	51
Abbildung 25	IVKA der RevErb α -Einzelmutanten	52
Abbildung 26	Peptide Map von RevErb α	53
Abbildung 27	Analyse tryptischer RevErb α -Phosphopeptide	53
Abbildung 28	RevErb α -Phosphorylierung durch ERK2	54
Abbildung 29	Regulation durch dBcAMP	56
Abbildung 30	Regulation durch CREB	57
Abbildung 31	Detektion überexprimierten PGC1 α	58
Abbildung 32	Regulation durch PGC1 α	59
Abbildung 33	Effizienz des PGC1 α -Knockdowns	60
Abbildung 34	Regulation durch PGC1 α -Knockdown	60
Abbildung 35	H89 antagonisiert die dBcAMP-Wirkung	61
Abbildung 36	Weitere H89-Effekte	62
Abbildung 37	Analyse tryptischer ROR α -Phosphopeptide	63
Abbildung 38	ROR α 4-Phosphorylierung durch PKA	63
Abbildung 39	Aktivität der ROR α 4-S99A Mutante	64
Abbildung 40	ROR α , CaMKIV und PKA (I)	65
Abbildung 41	ROR α , CaMKIV und PKA (II)	65

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Metabolische ROR α /RevErb α k.o. Phänotypen	26
Tabelle 2	Nomenklatur nukleärer Rezeptoren	81
Tabelle 3	PCR-Primer	84
Tabelle 4	Primer zur Mutation	85
Tabelle 5	Verwendete <i>shRNA</i>	86
Tabelle 6	Verwendete Antikörper	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAR	Doppelsträngige RNA-spezifische Adenosindesaminase
AP-1	Aktivierendes Protein 1
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AF-2	Aktivierungsfunktion 2
BIM-1	Bisindolylmaleimid 1
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARM1	Coaktivator-assoziierten Arginin N-methyltransferase 1
CK2	Casein Kinase II
CoRNR	Corepressorbindungsmotiv nukleärer Rezeptoren
COUP-TF	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter - Transcription Factor II
CREB	Cyclo-AMP-Response-Element-bindendes Protein
CBP	CREB-bindendes Protein
CRE	cAMP-Response-Element
CTD	C-terminale Domäne
CTE	C-terminale Verlängerung (c-terminal elongation)
dBcAMP	Dibutyryl-cyclo-Adenosinmonophosphat
DBD	DNA-bindende Domäne
DSIF	DRB-Sensitivität induzierender Faktor
ER	Estrogenrezeptor
ERR	Estrogen Related Receptors
FGF21	Fibroblast Growth Factor 21
GCNF	Germ Cell Nuclear Factor
Gö6976	12(2-Cyanoethyl)6,7,12,13-tetrahydro13-methyl5-oxo-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole
GR	Glucocorticoidrezeptor

GSK ₃	Glycogensynthasekinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histonacetyltransferase
HLH	Helix–Loop–Helix
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
<i>hn</i> RNA	heteronukleäre RNA
hnRNPK	heteronukleäres Ribonukleoprotein K
LBD	Ligandenbindende Domäne
MAPK	mitogenaktivierte Kinase
TRAP/Mediator	Thyroidhormonrezeptor-assoziiertes Protein/Mediator
MG-132	N-(Benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal
<i>mi</i> RNA	microRNA
NAT	natürliches Antisensetranskript
NCoR	Nuclear Receptor Corepressor
NELF	Negativer Elongationsfaktor
NF κ B	Nukleärer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen
NFR	Nukleosomfreie Region
NGFI-B	Nerve Growth Factor IB
NLS	Kern-Transport-Signal (nuclear localisation signal)
NPM ₁	Nucleophosmin
NRF	Nuclear Respiratory Factor
PAS	Domäne der Proteine Per, Arndt & Sim
PBS	Phospho buffered saline
p/CAF	p300/CBP-assoziiierter Faktor
PGC-1 α	PPAR- γ -Coaktivator 1 α
PIC	Präinitiationskomplex
PI 3-Kinase	Phosphoinositid-3-kinase
PKA	Proteinkinase A / cAMP-abhängige Kinase
PKB	Proteinkinase B / AKT

PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMNL	Polymorphonukleäre Leukozyten
PPAR	Peroxisome-proliferator-aktivierter Rezeptor
PRMT ₁	Protein-Arginin-N-Methyltransferase 1
P-TEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
RAC	Receptor-Associated Cofactor
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RAR	Retinoinsäurerezeptor
RARE	Retinoinsäurerezeptor-Response-Element
RE	Response-Element
RISC	RNA-induced Silencing Complex
ROR	Retinoid-related-Orphan-Rezeptor
RORE	ROR-Response-Element
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCN	suprachiasmatischer Nukleus
Shh	Sonic hedgehog
<i>shRNA</i>	short hairpin RNA
<i>siRNA</i>	small interfering RNA
SMRT	Silencing Mediator for Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptors
<i>snoRNA</i>	Small nucleolar RNA
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
SRC	Steroidrezeptor-Coaktivatoren
SR ₁₀₇₈	N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl) ethyl]phenyl]-4-trifluoromethylbenzolcarbonamid
SWI/SNF	Switch/Sucrose Nonfermentable
TAF	TBP-assoziiierter Faktor
TBP	TATA-Bindeprotein
TFII	Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase II

TIF	Transcriptional Mediators/Intermediary Factor
TLX	Human Homologue of the Drosophila Tailless Gene
TR	Thyroidrezeptor
TRE	Thyroidrezeptor-Response-Element
To901317	N-(2,2,2-Trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzolsulfonamid
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D-Response-Element

1.1 STRUKTUR NUKLEÄRER REZEPTOREN

Nukleäre Rezeptoren [69, 121] sind zelluläre Proteine aus der Superfamilie der Transkriptionsfaktoren und vermitteln die genomische Antwort auf die Anwesenheit kleiner lipophiler Moleküle wie den Steroidhormonen, dem Thyroidhormon, Fettsäuren oder Retinoiden. Einige dieser Substanzen induzieren auch nicht-genomische, binnen extrem kurzer Zeit erfolgende Effekte. Deren Mechanismus konnte bisher noch nicht genau aufgeklärt werden, steht aber auch nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit [132]. Daneben gibt es auch nukleäre Rezeptoren, deren Liganden (noch) unbekannt sind oder von denen eine ligandenunabhängige Funktion vermutet wird. Diese Rezeptoren werden wegen des fehlenden Liganden als Orphan-(„Waisen“)-Rezeptoren bezeichnet. Auf Grund ihrer Funktion sind nukleäre Rezeptoren gute Zielstrukturen für die Arzneistoffentwicklung, da durch ihre Modulation gezielt in zelluläre Regelkreise eingegriffen werden kann. Insgesamt sind im menschlichen Genom 48 dieser Rezeptoren bekannt [131], die in der Literatur geordnet nach ihrer evolutionären Verwandtschaft in sechs phylogenetische Unterfamilien eingeteilt werden. Die in dieser Arbeit genauer untersuchten Orphan Rezeptoren Retinoid-related-Orphan-Rezeptor (ROR) α und RevErb α sind ebenso Teil der großen Familie NR1 wie beispielsweise der Thyroidrezeptor (TR), der Vitamin D-Rezeptor (VDR) und die Peroxisome-proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs).

Nukleäre Rezeptoren regulieren die Transkription ihrer Zielgene durch direkte Bindung an definierte DNA-Sequenzen innerhalb der Promotorregionen ihrer Zielgene, die sogenannten Response-Elemente. Diese Aktivität wird im wesentlichen auf drei Arten kontrolliert: Durch Bindung eines Liganden, durch posttranslationale Veränderungen wie beispielsweise Phosphorylierungen und durch Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren [71]. Hierbei ist anzumerken, dass diese Regulationsmechanismen nicht isoliert betrachtet werden können, sondern sich durch Vernetzung gegenseitig bedingen und ein komplexes Gesamtbild ergeben. Im Standardmodell bindet der kleine lipophile Ligand nach Diffusion durch die Zellmembran den cytosolisch vorliegenden nukleären Rezeptor und induziert eine Konformationsänderung von der Apo- in die Holo-Form. Dadurch werden Interaktionsstellen für Coaktivatoren freigelegt und die Bindung an Corepressoren gestört. Nach Bindung bestimmter Transportproteine transloziert der Rezeptor schließlich in den Zellkern, wo er den RNA-Polymerase-II-Komplex rekrutiert und die Gentranskription einleitet.

Alle nukleären Rezeptoren teilen denselben modularen Aufbau aus unabhängigen, aber miteinander interagierenden Domänen. Dieser Aufbau wurde zum ersten Mal am Beispiel des galliden Estrogenrezeptors defi-

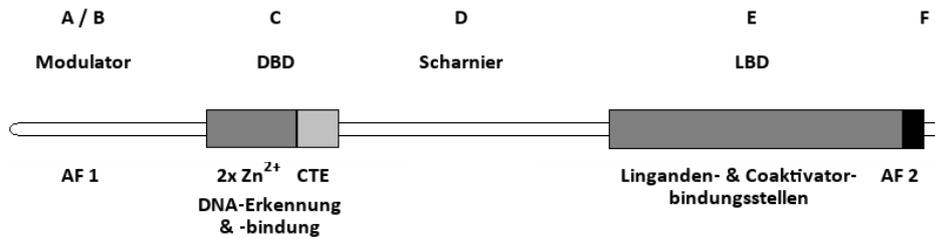


Abb. 1 – Modularer Aufbau nukleärer Rezeptoren
Schematische Darstellung der Domänen nukleärer Rezeptoren nach [71]

niert [115]: Ein typischer nukleärer Rezeptor besteht demnach aus einer N-terminalen, modulierenden A/B-Domäne, einer hochkonservierten DNA-bindenden C-Domäne, einer sogenannten Scharnierdomäne (oder D-Domäne) und einer ebenfalls konservierten ligandenbindenden E-Domäne. Einige Rezeptoren besitzen auch eine C-terminale F-Domäne unbekannter Funktion (siehe Abb. 1).

Unter diesen Domänen weist die N-terminale A/B-Domäne die größte Variabilität auf [117], sowohl zwischen den einzelnen Rezeptorfamilien als auch (durch alternatives Spleißen) innerhalb der Familien. Letzteres führt zur Bildung mehrerer Isoformen desselben Rezeptors, ein Phänomen das mit am besten am Beispiel der Retinoidsäurerezeptoren (RAR) untersucht worden ist [39]. Die A/B-Domäne wird auch als Modulordomäne bezeichnet, unter anderem da sie Ziel zahlreicher posttranslatieller Veränderungen wie zum Beispiel Phosphorylierungen sein kann [176]. Weiterhin interagiert sie mit zahlreichen Cofaktoren und enthält die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF-1). Die Bezeichnung als ligandenunabhängig ist etwas irreführend, da die Aktivierungsfunktion zwar nach Elimination der ligandenbindenden Domäne (LBD) konstitutiv aktiv ist, im Kontext des Gesamt Rezeptors jedoch promotor- und zellspezifisch sowie ligandenabhängig kontrolliert wird [26]. Details zur Entstehung dieser unterschiedlichen Spezifitäten sind noch unbekannt, allerdings wurde beschrieben, dass große Teile der AF-1 in einer intrinsisch ungeordneten (ID) Struktur vorliegen. Dies könnte eine Interaktion mit einer Vielzahl an Bindungspartnern ermöglichen und die allosterische Einwirkung auf andere Rezeptordomänen erklären [116].

Die DNA-bindende Domäne (DBD) ist der am stärksten konservierte Bereich innerhalb der Familie der nukleären Rezeptoren. Über diese Domäne binden nukleäre Rezeptoren an die Response-Elemente im Promotor ihrer Zielgene – wobei als Bindungsmodi abhängig vom Rezeptor Bindungen als Monomer, Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) oder als Homodimer beschreiben wurden [74]. Diese DNA-Bindung erfolgt über zwei Zinkfinger, wobei eine C-terminale Verlängerung (CTE) und weitere Proteinbereiche die Spezifität der DNA-Bindung, die Aktivität einer in der DBD befindlichen Dimerisierungsstelle und die Kontakte zu den das Response-Element (RE) flankierenden DNA-Sequenzen kontrollieren (zu Details siehe Kap.1.1.1.1).

Die Scharnierdomäne ist wiederum sehr variabel in Struktur und Länge. Sie verbindet die DNA-bindende Domäne mit der LBD und erlaubt die freie

Die Struktur der DBD ist in der Familie der nukleären Rezeptoren hochkonserviert

Drehung der beiden gegeneinander. Dennoch gehen ihre Funktionen über eine reine Verbindung hinaus: Es wurden auch posttranslationale Modifikationen der sogenannten Hinge beschrieben [123], ebenso die Tatsache, dass sie Ort der Interaktion mit Corepressoren sein kann [88]. Des Weiteren enthält die Scharnierdomäne meist das Signal für die nukleäre Lokalisation der Rezeptoren (NLS).

Die Ligandenbindende Domäne ist weniger stark konserviert als die DBD, funktionell aber hochkomplex: Sie besteht aus vier, trotz unterschiedlicher Struktur funktionell verknüpften Strukturen – einer Dimerisierungsstelle, der Ligandenbindungstasche, einer Bindungsstelle für Coregulatoren und der carboxyterminalen, helikalen, ligandenabhängigen Aktivierungsfunktion 2 (AF-2). Wie schon in Zusammenhang mit der ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion 1 erwähnt, ist für beide Funktionen beschrieben, dass ihre Funktion in Abhängigkeit vom Promotorkontext und zellspezifisch reguliert wird.

Bis heute ist es verschiedenen Gruppen gelungen, von mindestens einem Mitglied jeder Rezeptorsubklasse ligandenbindende Domänen und DNA-bindende Domänen zu kristallisieren. In ihrer Gesamtheit ist die Struktur der nukleären Rezeptoren dennoch nicht letztgültig entschlüsselt, da es aufgrund der flexiblen Gesamtstruktur bisher nur einer Gruppe gelungen ist, eine Kristallstruktur vollständiger Rezeptoren, in diesem Fall von PPAR- γ - und RXR- α -Deletionsmutanten gebunden an DNA, zu erstellen [40]. Diese wiesen nur wenige Unterschiede zu den Modellen auf, die anhand der kristallographischen Studien der DBDs und LBDs entworfen worden waren. Dazu gehörten intensive Kontakte zwischen dem der DBD-CTE folgenden Teil der Scharnierdomäne des PPAR- γ und stromaufwärts des REs gelegenen DNA-Sequenzen sowie eine Protein-Protein-Interaktion zwischen der PPAR- γ LBD und der DBD-CTE des RXR- α . Es ist noch nicht bekannt, inwiefern diese Ergebnisse auf andere Rezeptorkomplexe übertragbar sind.

Die flexible Gesamtstruktur erschwert die Kristallisation vollständiger nukleärer Rezeptoren

1.1.1 Die DNA-bindende Domäne

Die DNA-bindende Domäne besteht im Wesentlichen aus zwei, von 66-70 Basen kodierte, cysteinreichen Zinkfingern, zwei α -Helices und einer C-terminalen Verlängerung (CTE) von ungefähr 25 Basen Länge. Teil dieser Strukturelemente sind auch die sogenannten P, D, T und A-Boxen, die durch erfolgreiche Kristallisation von DBDs verschiedener Rezeptoren als Strukturbestandteile bestätigt wurden (z.B. [134, 184]). Die Bindung an die DNA erfolgt durch Anlagerung der Zinkfinger in die große Furche der DNA an die spezifischen Response-Elemente [134], die allesamt Derivate derselben hexameren Grundstruktur 5'-PuGGTCA sind. Diese Bindung ist spezifisch und neben der Sequenz des REs abhängig von der Primärstruktur der DNA-bindenden Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch bestimmter Aminosäuren im Estrogenrezeptor zu einer selektiven Bindung an das Glucocorticoid-RE anstelle des Estrogen-REs führt [230]. Der Grad an Selektivität wird nochmals dadurch erhöht, dass für die Rezeptoren drei verschiedene Bindungsmodi beschrieben wurden – die DNA-Bindung erfolgt entweder als

Homodimer, als Heterodimer oder als Monomer [74]. Die Bindung als Heterodimer erfolgt in der Regel im Komplex mit RXR, wobei RXR funktionell seinem Bindungspartner untergeordnet wird. Daher ist RXR allein – auch in Anwesenheit seines Liganden – nicht in der Lage, die Transkription der Zielgene seiner Bindungspartner zu aktivieren. Im Komplex jedoch verstärkt die Anwesenheit von RXR mit gebundener 9-cis-Retinoinsäure die Aktivität seines jeweiligen Partners [144].

Der Aufbau der Response-Elemente ist ein Selektivitätskriterium für die DNA-Bindung

Die Response-Elemente, die dimerische Rezeptorbindung ermöglichen, liegen nicht nur in der jeweils passenden Sequenz vor, sondern können je nach Bindungsmodus palindromisch, als direkte Wiederholung oder als gespiegelte Wiederholung vorliegen. Diese Wiederholungen sind durch einen definierten Abstand von einander getrennt und es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Veränderung dieses Abstands zu einer veränderten Rezeptorselektivität führt: Die Anordnung zweier 5-AGGTCA-Sequenzen im Abstand von drei Nukleotiden erzeugt ein funktionelles Vitamin D-Response-Element (VDRE). Bei einem Abstand von vier Nukleotiden resultiert ein funktionelles Thyroidrezeptor-Response-Element (TRE), während fünf Nukleotide Abstand ein Retinoinsäurerezeptor-Response-Element (RARE) ergeben [200]. Daraus lässt sich ein stark vereinfachtes Schaubild (Abb. 2) ableiten, das aber

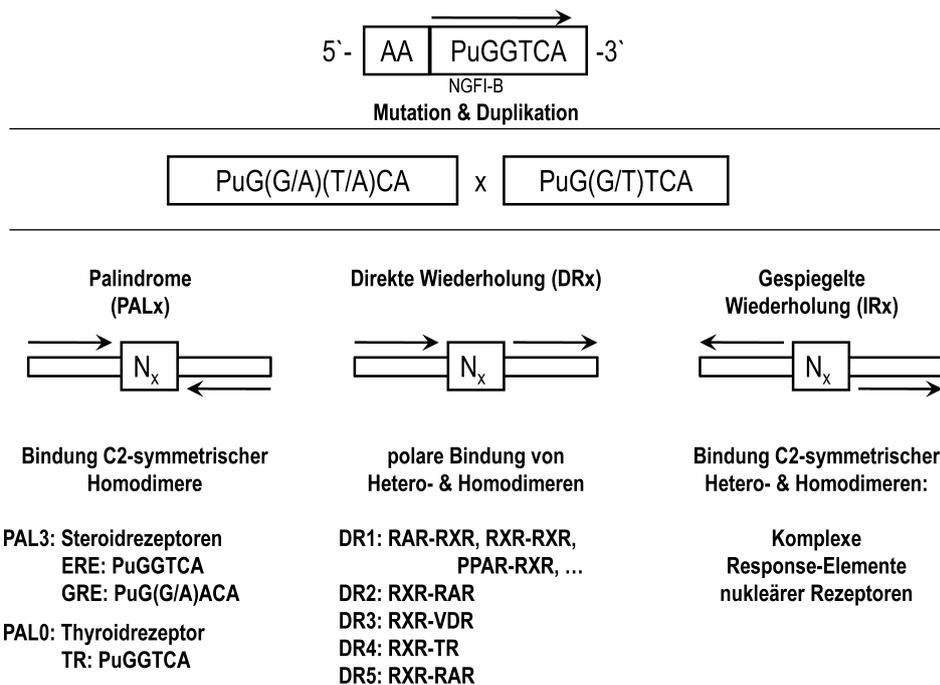


Abb. 2 – DNA-Bindung nukleärer Rezeptoren

Darstellung der verschiedenen Bindungsmodi nukleärer Rezeptordimere an Response-Elemente nach [121]: Das zentrale Response-Element besteht aus der Sequenz PuGGTCA und zwei vorausgehenden Adenosinbasen, dem RE für NGFI-B. Durch Mutation und Duplikation entstehen die für die dimerische Bindung verschiedener nukleärer Rezeptoren notwendigen Response-Elemente, die auf verschiedene Weise angeordnet sind.

einige Fragen offen lässt: Beispielsweise ist bis heute nicht geklärt, ob *in vitro* funktionelle Response-Element Anordnungen im Abstand eines Nukleotids

auch *in vivo* funktionell sind. Des Weiteren wird nicht zwischen einer Bindung als Homodimer und einer als Heterodimer unterschieden, die dem Rezeptor verschiedene Optionen zur Nutzung der Response-Elemente eröffnen könnte. Auch ignoriert das Schaubild die Tatsache, dass homodimere und heterodimere Rezeptorkomplexe auch an die Response-Elemente für andere Rezeptoren binden können. Dies wurde zusätzlich durch die Feststellung bestätigt, dass natürliche Response-Elemente häufig mutiert sind und nicht dem Konsensus entsprechen. Am Beispiel des Estrogenrezeptor (ER) konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass durch Veränderungen in der Konformation der DBD eine Bindung an natürlich vorkommende, mutierte Response-Elemente erfolgen kann. Diese Bindung ist allerdings verglichen mit der Bindung an das Konsensus-RE energetisch ungünstiger, woraus eine verringerte Bindungsaffinität resultiert. Dies könnte ein evolutionärer Mechanismus zur Feinregulation der Transkription über nukleäre Rezeptoren kontrollierter Gene sein [183, 184]. Auch die A/B-Domäne nimmt über noch nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen Einfluss auf die Selektivität der DNA-Bindung, da unter anderem am Beispiel von ROR α gezeigt werden konnte, dass die verschiedenen Isoformen mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene Response-Elemente binden [73].

Der Einfluss der Primärstruktur verschiedener Bereiche der DBD auf die Selektivität der DNA-Bindung wurde in ausführlichen Mutationsstudien untersucht. Dabei konnte nicht nur nachgewiesen werden, dass ein Austausch dreier Aminosäuren des ersten Zinkfingers, der sogenannten P-Box (proximale Box) die Selektivität des Glucocorticoidrezeptors in die eines Estrogenrezeptors umwandelte [230], sondern weiterhin, dass ein Austausch von fünf Aminosäuren des zweiten Zinkfingers, der sogenannten D-Box (distale Box) zur Bindung des Glucocorticoidrezeptors an das Response-Element des Thyroidhormonrezeptors [199] führte (Schematische Darstellung der Struktur der DBD mit den Boxen s. Abb. 3). Weiterhin wurden mit der A-Box und der T-Box zwei außerhalb der Zinkfinger in der CTE der DBD gelegene Regionen identifiziert, die ebenfalls zur DNA-Erkennung beitragen. Die A-Box besteht aus 7 Aminosäuren und ist beispielsweise bei der monomeren Bindung von NGFI-B (NR4A1) für die Erkennung von zwei bis drei Adeninbasen in der 5'-Region des Response-Elements zuständig, wobei diese Erkennung über die kleine Furche der DNA erfolgt [213]. In späteren Studien wurden Hinweise darauf gefunden, dass die A-Box auch an der Spezifizierung des Abstands zwischen den Response-Elementen in Fällen der Bindung von Heterodimeren beteiligt ist. Die T-Box umfasst 12 Aminosäuren und wurde als Teil der Dimerisierungsstelle von RXR identifiziert. Dort ist sie beteiligt an der Festlegung des für die Rezeptorbindung notwendigen Abstands der Response-Elemente [227]. Am Beispiel des RXR wurde auch gezeigt, dass die CTE während der Bindung an die DNA eine dritte Helix ausbilden kann, die gegen den ersten Zinkfinger geneigt ist und bei Bindung des Rezeptors an das 3' gelegene Response-Element über die kleine Furche ebenfalls an die DNA bindet [127] (s. Abb. 4).

Die Selektivität der DNA-Bindung wird durch funktionelle Bereiche der Primärstruktur der DBD definiert

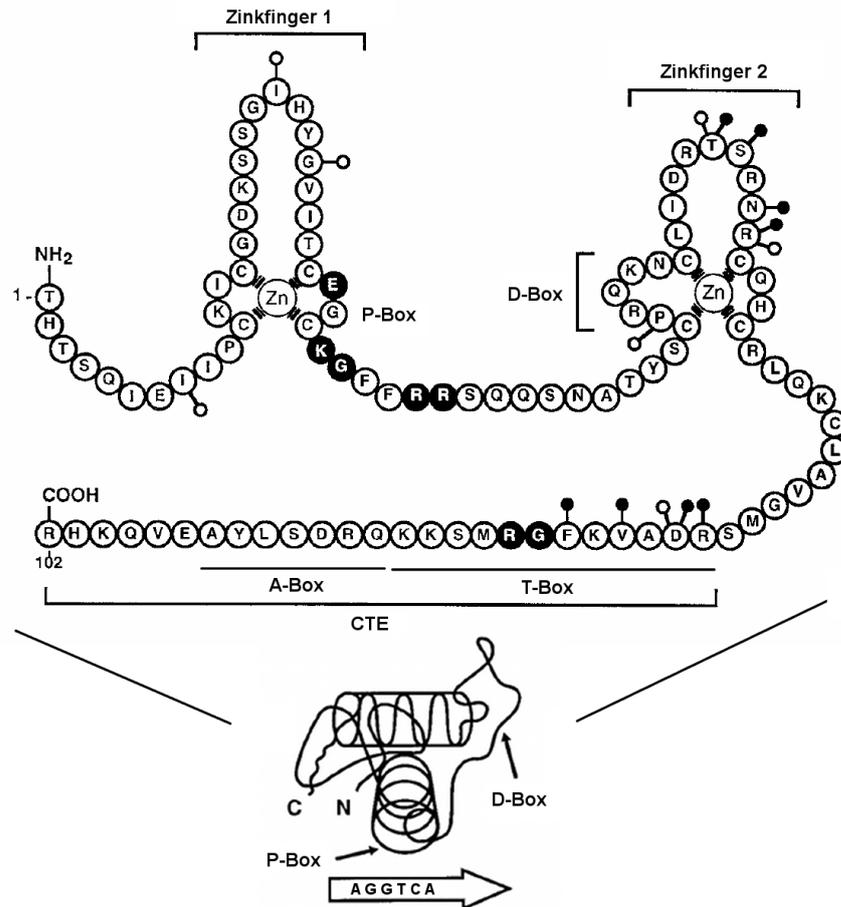


Abb. 3 – Primärstruktur der DNA-bindenden Domäne

Schematische Darstellung der Zinkfinger und verschiedener Strukturelemente der DBD nach [8, 71, 74]: Für Aminosäuren in schwarzen Kreisen wurden direkte Kontakte mit der DNA nachgewiesen, mit Ringen gekennzeichnete Aminosäuren sind an der Dimerisierung nukleärer Rezeptoren beteiligt; die P-Box umfasst im Beispiel die Aminosäuren E, G & K, die das 4. Cystein umgeben; die D-Box umfasst die 5 zwischen den das Zink koordinierenden Cysteinen gelegenen Aminosäuren; die T-Box umfasst die ersten 12 Aminosäuren der C-terminalen Verlängerung; die A-Box 7 Aminosäuren C-terminal der T-Box.

1.1.2 Die ligandenbindende Domäne

Das Lehrbuchmodell der Aktivierung nukleärer Rezeptoren beschreibt eine cytosolische Lokalisation des an Heat Shock Proteine gebundenen Apo-Rezeptors. Durch Bindung des Liganden dissoziiert dieser Komplex, der Rezeptor transloziert in den Nukleus und aktiviert dort die Expression verschiedener Gene. Auch wenn dieses Modell für einige Steroidrezeptoren durchaus gültig ist [165], sind die meisten nukleären Rezeptoren konstitutiv im Zellkern anzutreffen und liegen dort auch in Abwesenheit eines Liganden gebunden an die DNA vor. Bis zur Bindung des Liganden inhibieren sie so die Transkription ihrer Zielgene [88, 161]. Die Veränderungen der Rezeptorkonformation durch die Ligandenbindung bewirken ein Abdiffundieren

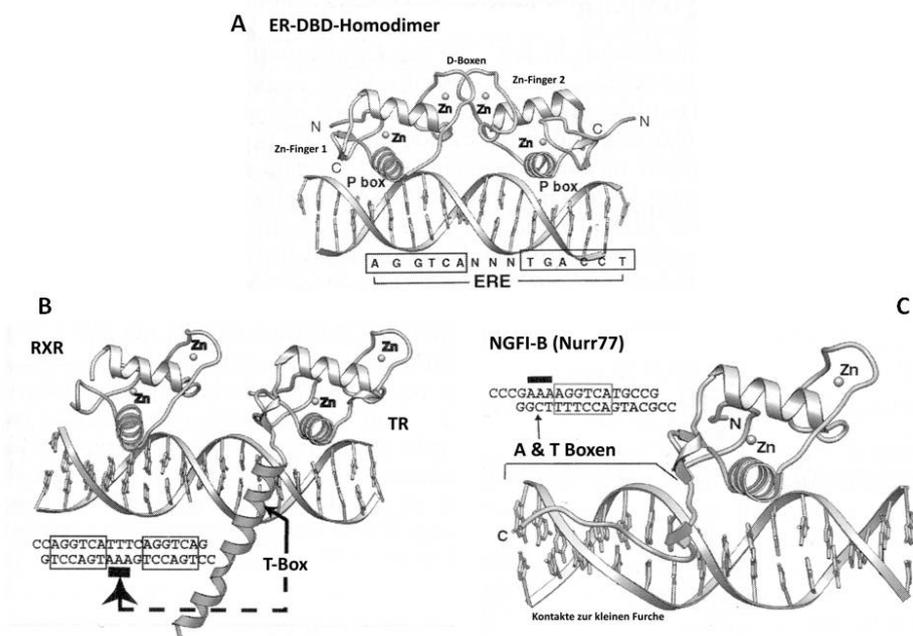


Abb. 4 – Kristallstrukturen DNA-bindender Domänen

Beispielhafte Darstellung der DBD dreier verschiedener nukleärer Rezeptoren gebunden an Response-Elemente. A: ER-DBD gebunden als Homodimer [184], B: TR-RXR-DBD-Heterodimer, die T-Boxen des 3'-gebundenen TR geht weitere Kontakte mit der kleinen Furche der DNA ein und erkennt so den Abstand der Response-Elemente [173], C: NGFI-B-DBD gebunden als Monomer, die Bindung wird stabilisiert durch Kontakte der A- & T-Boxen zur kleinen Furche der DNA [142]

an die Apo-Form des Rezeptors gebundener Corepressorproteine und eine Bindung von Coaktivatorproteinen an die sich ausbildende Holo-Form.

Kristallographische Studien zeigten, dass die LBDs verschiedener Rezeptoren trotz ihrer heterogenen Primärstruktur eine ähnliche Struktur aufweisen. Daraus lässt sich eine kanonische Struktur ableiten [217], die einen Aufbau aus drei antiparallelen Lagen mit insgesamt 11-13 α -Helices und 2-4 kurzen β -Schleife vorschlägt, deren Zentrum eine Kavität zur Aufnahme des Liganden beinhaltet. Eine amphipathische Helix der untersten Schicht dieses Sandwiches (Helix 12) ist essentiell für die ligandenabhängige Aktivierung der Transkription und bildet somit die AF-2 aus [29, 175]. Die Bindung des Liganden erfolgt in einer Art Mausefallenmechanismus: Helix 11 wird durch den Liganden in die Verlängerung von Helix 10 verschoben, was ein Umklappen der Helix 12 bewirkt, die somit die Ligandenbindungstasche versiegelt und in den meisten Fällen die Bindung des Liganden durch zusätzliche Interaktionen verstärkt (siehe Abb. 5 und Kap. 1.2). Allerdings stehen nicht alle nukleären Rezeptoren unter der Kontrolle eines Liganden. Insbesondere durch Röntgenkristallstrukturen der LBDs der Rezeptoren aus der Gruppe der Orphan Rezeptoren wurden in den letzten Jahren für einige der Rezeptoren potentielle Liganden identifiziert. Dennoch bleiben immer noch Rezeptoren, die entweder keine Ligandenbindungstasche zu besitzen

Ein Mausefallenmechanismus führt zur Bindung des Liganden

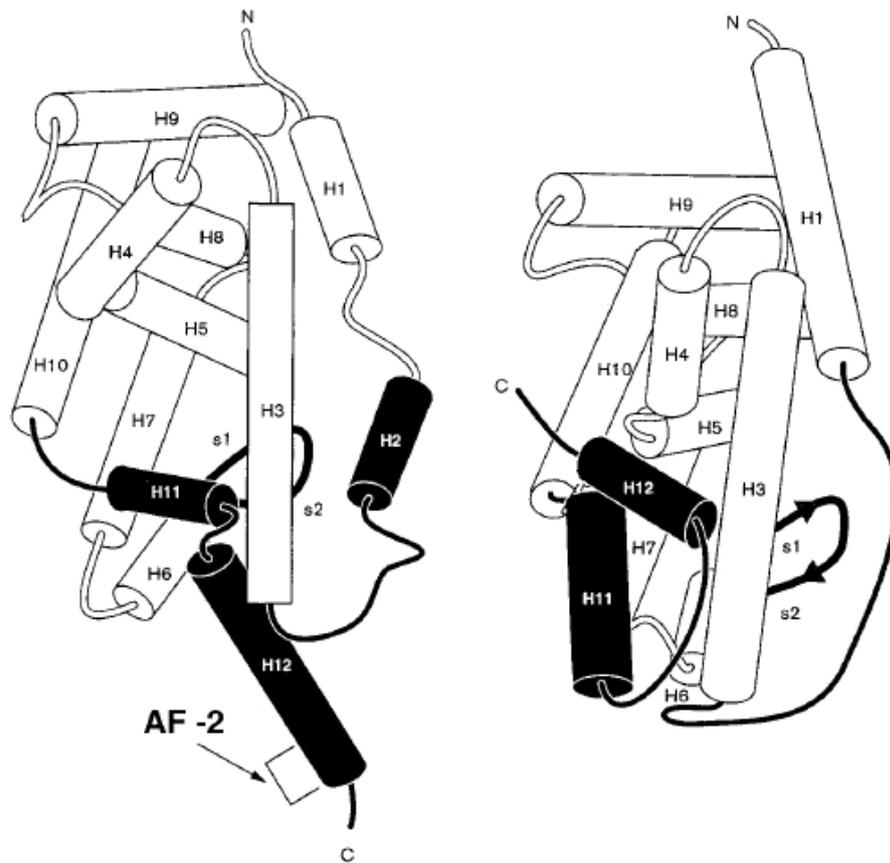


Abb. 5 – Struktur der ligandenbindenden Domäne

Schematische Darstellung der ligandenbindenden Domäne nukleärer Rezeptoren, links die Kristallstruktur der Apo-Form des RXR α , rechts die Kristallstruktur der Holo-Form des RXR γ . Die α -Helices sind als Zylinder dargestellt und nummeriert von 1-12, Helix 12 enthält den Kern der AF2, nach [217]

scheinen, Rezeptoren deren Ligandenbindungstasche leer ist und Rezeptoren deren Ligandenbindungstasche strukturelle Liganden enthält oder bei denen die physiologische Relevanz der identifizierten Liganden fragwürdig ist. Es existieren z.B. mit COUP-TF, GCNF, TLX und anderen auch Rezeptoren, bei denen die bisher vorliegenden Informationen nicht für eine Charakterisierung ausreichen. Ein Beispiel für einen nukleären Rezeptor ohne Ligandenbindungstasche stellt NURR1 dar, dessen LBD zwar der kanonischen Faltung entspricht, bei dem aber eine voluminöse Aminosäureseitenkette den Platz der Ligandenbindungstasche füllt [210]. Ein Beispiel für einen konstitutiv aktiven Rezeptor mit leerer Ligandenbindungstasche stellt ERR γ dar, während in der HNF-4 γ -Ligandenbindungstasche eine Fettsäure gefunden wurde, die diese ohne Denaturierung des Rezeptors nicht verlassen kann. Einen ausführlicheren Überblick über diese und weitere Beispiele liefern Benoit et al. [18]

Ebenfalls auf Basis der LBD-Kristallstrukturdaten wurden Modelle für die Interaktion verschiedener Rezeptoren über die jeweiligen LBDs entwickelt: In Zug der Kristallisation der RXR Apo-LBD erhielt man die Struktur eines

Homodimers, wobei je 11% der Oberfläche der LBDs als Dimerisierungsstelle verwendet wurden. Helices 9 & 10 bildeten gemeinsam mit den Kurven 7 & 8 eine α -helikale Struktur, in der jede siebte Aminosäure ein Leucin (oder eine andere hydrophobe Aminosäure) ist. Dieses für Leucin-Zipper- (oder B-Zip-) Motive typische Heptadenmuster besteht dabei aus insgesamt neun Leucinen und dient der Ausbildung der Dimerisierungsstelle. Dabei sind nicht alle neun Heptaden direkt an der Dimerisierung beteiligt, sondern dienen teilweise nur zur Stabilisierung der LBD. Auch dies wurde durch die Kristallstruktur des RXR α -RAR α -LBD-Heterodimers bestätigt. Dabei wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem die strukturelle Konservierung der Dimerisierungsoberfläche den Charakter der Dimerisierung mitbestimmt [30, 174].

1.2 EXPRESSIONSREGULATION DURCH NUKLEÄRE REZEPTOREN

Gentranskription besteht im Prinzip aus 4 Schritten: Der Rekrutierung der Polymerase II an den Promotor, der Initiation der Transkription, der Elongation und schließlich der Termination. Chromosomale DNA liegt im Zellkern in einer perlenschnurartigen Konfiguration vor, wobei die Perlen den Nukleosomen entsprechen. Nukleosomen bestehen aus 147 Basenpaaren DNA, die um ein Histon-Oktamer gewickelt sind. Transkriptionell aktives Chromatin zeichnet sich durch eine verhältnismäßig lockere Struktur und verschiedenartig acetylierte Histone aus, während inaktives Chromatin zu bis zu 30 nm durchmessenden Fasern kompaktiert werden kann. Diese repressive Kompaktierung ist häufig assoziiert mit desacetylierten Histonen und der Methylierung des Lysin 9 des Histons 3 (H3K9) oder des H3K27, wobei nicht klar ist, ob diese Methylierungen die Repression bewirken oder nur einen Marker inaktiver Genbereiche darstellen. Im offenen Chromatin hingegen liegen Promotorsequenzen sogar häufig in nukleosomfreien Regionen (NFR), in Bereichen die nicht auf Histone gewickelt und daher frei zugänglich für Transkriptionsfaktoren sind [201]. Nach welchem Mechanismus diese NFR gebildet werden ist nicht geklärt, jedoch wurden Assoziationen mit poly-dA:dT-Bereichen der DNA festgestellt.

Nukleäre Rezeptoren, die nicht wie beispielsweise der Glucocorticoidrezeptor (GR) an Corepressoren gebunden im Zytosol vorliegen [165], sind meist auch in Abwesenheit ihrer Liganden nukleär lokalisiert. Dort binden sie in der Apo-Form an ihre Response-Elemente. In dieser Apo-Form bildet die LBD eine hydrophobe Oberflächenstruktur aus, an die Corepressoren über ein in dieser Proteinfamilie häufig vorkommendes, α -helikales Lxx I/H Ixxx I/L (CoRNR) Motiv binden können [89, 150, 160]. Auf diesem Weg rekrutierte Corepressoren wie der Nuclear Receptor Corepressor (NCoR) oder der Silencing Mediator for Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptors (SMRT) führen zu einer potenten Unterdrückung der Gentranskription. Beide Proteine zeigen zwar selbst keine Enzymaktivität, rekrutieren aber hochmolekulare Proteinkomplexe mit spezifischen Histondesacetylasen, was eine Desacetylierung von Lysinen des Histons 4 durch HDAC3 zur Folge hat. Durch diese Desacetylierung der Histone verstärkt sich die positive

Ein CoRNR-Motiv dient der Bindung von Corepressoren an die LBD des Apo-Rezeptors

Ladung der Histonproteine und das Chromatin wird verdichtet. Ein Angriff weiterer Transkriptionsfaktoren (insbesondere solcher mit Bromodomänen) wird somit unterbunden [84].

Die Bindung des Liganden an den am Promotor ruhenden Rezeptor bewirkt die bereits beschriebene Konformationsänderung, durch die Helix 12 der LBD gegen die Helices 3 und 12 gelehnt wird. Neben dem Verschluss der Ligandenbindungstasche bewirkt dies auch eine Veränderung der Struktur der hydrophoben Corepressorbindungsstelle. Während die Leucine des c-terminalen Endes der Helix 3, der Schleifen 3 & 4 sowie der Helix 4 weiterhin hydrophobe Wechselwirkungen eingehen können, wird die Größe der Bindungstasche durch das Freilegen eines Lysins auf Helix 3 und eines Glutamats der AF-2 auf Helix 12 in ihrer Länge deutlich begrenzt. Somit ist eine Bindung des relativ großen Lxx I/H Ixxx I/L Motivs nicht mehr möglich, dafür aber die von deutlich kleineren LxxLL-Motiven (schematisch dargestellt in Abb. 6). Diese Motive sind häufig in verschiedenen nukleären Cofaktoren anzutreffen [163], unter anderem in den Coaktivatoren der p160-Familie. Auch die AF-1 ist an der Bindung von Cofaktoren beteiligt, aufgrund

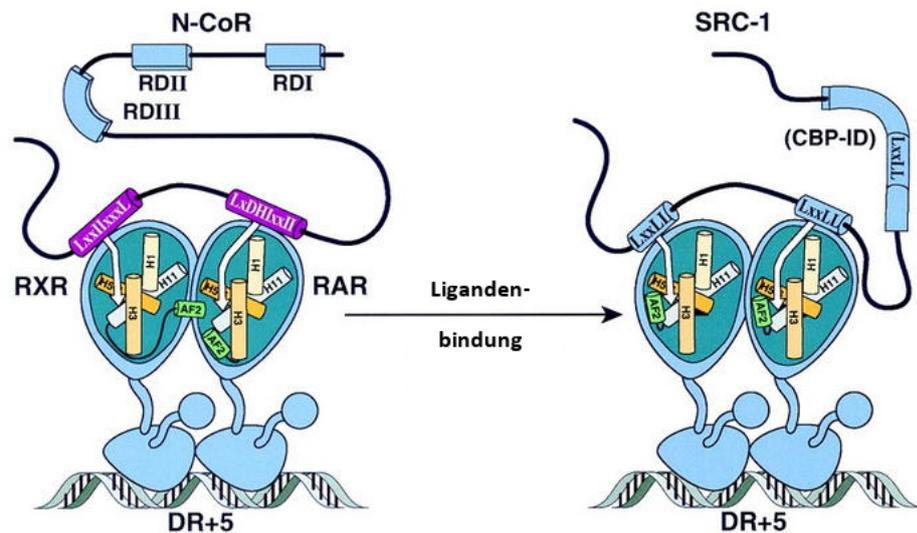


Abb. 6 – Bindung von Coregulatoren

Schematische Darstellung der Bindungsstellen von Corepressoren und Coaktivatoren in Abhängigkeit der durch die Ligandenbindung verursachten Konformationsänderung der LBD am Beispiel des Heterodimers RAR/RXR, nach [160]

der heterogenen Struktur der AF-1 ist es bisher aber noch nicht gelungen, verlässliche Bindungsflächen zu definieren [116]. Mitglieder der p160-Familie sind beispielsweise die Steroidrezeptor-Coaktivatoren: SRC₁, TIF₂ und RAC₃. Diese bewirken eine Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren, insbesondere von Mitgliedern der p300/CBP-Familie oder der p/CAF-Familie [152]. Teil deren Struktur ist eine intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Funktion, wodurch sie die Lockerung der Chromatinstruktur in der Promotorumgebung verstärken und so die Bindung weiterer allgemeiner Transkriptionsfaktoren ermöglichen. Als zentrale Bausteine des sich

ausbildenden Multiproteinkomplexes führen sie zur Bindung weiterer, das Chromatin modulierender Faktoren wie der Coaktivator-assoziierten Arginin N-methyltransferase 1 (CARM1) und der Protein-Arginin-N-Methyltransferase 1 (PRMT1), die durch Methylierung der Histone H₃ und H₄ letztlich die durch nukleäre Rezeptoren vermittelte Gentranskription steigern [214]. Auch die ATP-abhängigen Chromatinmodulatoren der humanen (orthologen) SWI/SNF-Komplexe werden in den Komplex integriert und bewirken nach direkter Interaktion mit dem nukleären Rezeptor weitere Modifikationen der Histonstruktur.

Mit der Bindung des TRAP/Mediator-Komplexes an den nukleären Rezeptor beginnt schließlich die Ausbildung des Präinitiationskomplex (PIC). Einige Untereinheiten von Mediator wie beispielsweise TRAP220 binden über LxxLL-Motive direkt an nukleäre Rezeptoren während andere mit der RNA-Polymerase II interagieren, womit TRAP/Mediator eine Art Brücke zwischen den nukleären Rezeptoren und der RNA-Polymerase darstellt. TRAP/Mediator kontrolliert dabei die Zusammenstellung des PIC: Dessen Aufbau wird solange blockiert, bis die p300-Histonacetylasefunktionen ihre Zielstrukturen vollständig acetyliert haben. Im Anschluss an die Acetylierung der Histone acetyliert p300 sich selbst und diffundiert aus dem Komplex, worauf die Zusammenstellung des PIC vollendet wird. p300 und TRAP/Mediator fungieren hier als Checkpoint für die Acetylierung des Chromatins [201].

Ähnliche posttranslationale Veränderungen der an den verschiedenen Komplexen beteiligten Proteine und deren dadurch bewirkter Austausch (wie hier am Beispiel von p300 beschrieben) dürfen auch für weitere Komponenten als gesichert gelten, da die Anzahl der an der Initiation der Transkription beteiligten Proteine für eine gleichzeitige Bindung an die nukleären Rezeptoren zu groß ist. Auch hier findet sich also ein fein orchestriertes Konzert vieler sich gegenseitig beeinflussender Komponenten [153].

Der Aufbau des PIC wurde detailliert aufgeklärt und vollzieht sich wie folgt: TFIID, bestehend aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und den TBP-assoziierten Faktoren (TAF), bindet an die TATA-Box des Promotors. Diese Bindung wird durch die Bindung von TFIIA und TFIIB oberhalb und unterhalb der TATA-Box verstärkt. An die so gebildete Plattform kann schließlich die an TFIIF gebundene Polymerase II binden. Mit der Anlagerung von TFIIIE und TFIIH liegt schließlich der vollständige Initiationskomplex vor und die bis zu diesem Zeitpunkt inaktive Polymerase II wird durch TFIIH an Serin 5 ihrer C-terminale Domäne (CTD) phosphoryliert. Dadurch lockert sich die Bindung der CTD an die DNA und mithilfe der DNA-Helicasefunktion des TFIIH beginnt die Entwindung der DNA und die Transkription [111]. Interessanterweise rekrutieren auch an TATA-lose Promotoren, die in der Mehrheit der Gene vorliegen, TFIID und den PIC nach einem analogen Muster [13].

Häufig kommt es durch Bindung des negativen Elongationsfaktors (NELF) oder des DRB Sensitivität induzierenden Faktors (DSIF) kurz nach Beginn der Transkription zu einem Pausieren der Transkription. Erst Bindung des positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P-TEFb) führt dann über eine Phosphorylierung von NELF und DSIF sowie des Serins 2 der CTD der Poly-

Untereinheiten von Mediator bilden eine Brücke zwischen dem nukleären Rezeptor und der RNA-Polymerase II

merase zur Fortsetzung der Transkription. Eine dichte Phosphorylierung der CTD der RNA-Polymerase ist für die weitere Elongation der RNA essentiell und wird von zahlreichen daran beteiligten Proteinen erkannt, die ihrerseits beispielsweise über Histonmodifikation das Ablesen der DNA ermöglichen. Eine detaillierte Darstellung dieser Vorgänge findet sich in den Referenzen [111, 201], einen schematischen Überblick über die an der Genregulation durch nukleäre Rezeptoren beteiligten Coregulatoren gibt Abb. 7.

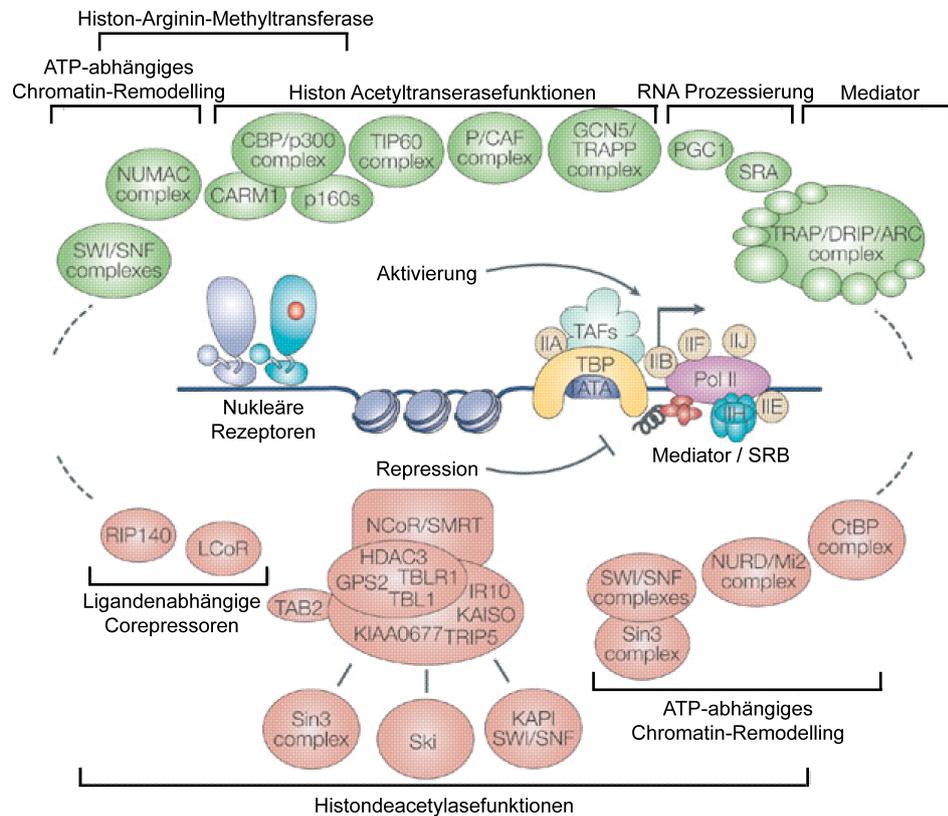


Abb. 7 – Regulation der Genexpression

Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression durch nukleäre Rezeptoren unter Einbindung verschiedener Corepressor- & Coaktivatorkomplexe sowie der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie, nach [159]

Transkriptionsinitiation, Elongation aber auch RNA-Prozessierung wie Capping, Spleißen und sogar der mRNA-Export und die Translation können nach heutigem Stand nicht als getrennte Prozesse betrachtet werden, sondern sind über coregulatorische Proteine eng verzahnt [11]. Ein Beispiel hierfür stellt der PPAR- γ -Coaktivator 1 α (PGC-1 α) dar: Dieser gewebespezifisch im braunen Fettgewebe, in Skelett- und in Herzmuskelzellen hoch exprimierte Coaktivator zahlreicher nukleärer Rezeptoren interagiert über seine C-terminale Domäne direkt mit dem TRAP/Mediator-Komplex. Über seine N-terminale Domäne bindet er weiterhin an CBP/p300 und beeinflusst über dessen Histonacetyltransferasefunktion den Acetylierungsstatus des Chromatins [168, 206]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass PGC-1 α mit Spleißfaktoren interagiert, über seine c-terminale Domäne das Spleißmuster endogener Gene beeinflusst [146] und somit ein Beispiel dafür darstellt, dass

Coaktivatoren auf zahlreichen Wegen in die Signaltransduktion nukleärer Rezeptoren eingreifen können.

Auch vereinfacht die obige Schilderung die Vorgänge dahingehend, dass Bindung nukleärer Rezeptoren sowie der Coregulatoren weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von aktivierenden Liganden statisch sind. Alle Faktoren unterliegen zyklischen Fluktuationen, einem ständigen Wechsel zwischen Bindung und Freisetzung, wobei Zyklen Sekunden, aber auch 20 Minuten dauern können. Dieses Fließgleichgewicht könnte einen physiologischen Mechanismus zur kontinuierlichen Überprüfung des zellulären Umfelds darstellen [159]. Weiterhin gibt es neben den hier geschilderten Mechanismen zur ligandenabhängigen Aktivierung von Genen weitere Wege zur Einflussnahme auf zelluläre Signalwege durch nukleäre Rezeptoren: So konnten am Beispiel mehrerer Rezeptoren, unter anderem des GR, transrepressive Mechanismen nukleärer Rezeptoren gezeigt werden. Der Glucocorticoidrezeptor ist neben seinen genomischen Mechanismen in der Lage durch direkte Interaktion mit dem aktivierenden Protein τ (AP-1) und NF κ B-Signalwegen antiinflammatorische Wirkungen zu entfalten, ohne dass dafür Genexpression GR-abhängiger Gene vonnöten wäre [86].

Die Aktivität der nicht einer Steuerung durch Liganden unterliegenden nukleären Rezeptoren folgt ähnlichen Regeln wie den oben geschilderten, allerdings liegt ihre LBD konstitutiv in aktiver oder repressiver Struktur vor. Eine Abstimmung ihrer Aktivität erfolgt daher über andere Mechanismen. Zu nennen sind dabei primär posttranslationale Veränderungen wie Acetylierung, SUMOylierung, Phosphorylierung und/oder (Poly-)Ubiquitylierung der Rezeptoren selbst oder anderer im Komplex gebundener Transkriptionsfaktoren [159]. Aber auch ligandenabhängige nukleäre Rezeptoren unterliegen einer zusätzlichen Steuerung durch posttranslationale Modifikationen, auch wenn die Bindung des Liganden der primärer Stimulus bleibt. Besonders intensiv untersucht wurde die Phosphorylierung nukleärer Rezeptoren, da gezeigt werden konnte, dass selbst im Fall ligandenabhängiger nukleärer Rezeptoren ein starkes Phosphorylierungssignal zur Aktivierung des Rezeptors führen kann, ohne dass der Ligand gebunden hätte. So konnte der gallide Progesteronrezeptor durch 8-Br cAMP aktiviert werden, was letztlich auf eine Phosphorylierung von SRC-1 zurückzuführen war [178]. Die meisten in der Literatur beschriebenen Phosphorylierungen nukleärer Rezeptoren finden sich in der A/B-Domäne, es wurden jedoch Phosphorylierungen in allen Bereichen der Proteine beschrieben. Die Mehrheit der Phosphorylierungsmotive sind Motive für prolinabhängige Kinasen wie CDKs und MAPKs, wobei sowohl Wirkung der Phosphorylierung als auch Vermittlung weit divergieren. So wurden aktivierende und inaktivierende Phosphorylierungen, aber auch ligandenabhängige und -unabhängige, sowie verschiedene Kombinationen beschrieben. In vielen Fällen sind die Auswirkungen der Phosphorylierung auch schlicht noch nicht bekannt. Einen guten Überblick über diese und weitere posttranslationale Veränderung verschiedener nukleärer Rezeptoren liefern die Übersichtsartikel [59, 164, 176, 211], Informationen zu den beteiligten Enzymen finden sich zum Beispiel im Handbook of Cell Signaling [50].

*Posttranslationale
Veränderungen sind
an der Steuerung der
Aktivität nukleärer
Rezeptoren beteiligt*

Erwähnenswert ist, dass dank der Förderung durch das US-amerikanische National Institute of Health der Nuclear Receptor Signaling Atlas unter der Leitung von Ron N. Margolis ins Leben gerufen wurde. Diese wissenschaftliche Vereinigung amerikanischer, auf dem Gebiet der nukleären Rezeptoren forschender Wissenschaftler betreibt neben einem Open Access Journal für Publikationen auf diesem Gebiet auch die Website NURSA.org, auf der Lehrmaterialien und verschiedene Datensätze (wie beispielsweise Expressionsprofile nukleärer Rezeptoren) bereit gestellt werden.

1.3 RETINOID-RELATED-ORPHAN-REZEPTOR α

Wie die meisten nukleären Rezeptoren wurden auch die Mitglieder der Retinoid-related-Orphan-Rezeptor (ROR) α -Familie [78, 94–97, 121] durch systematische PCRs mit degenerierten Primern Anfang der 1990er Jahre identifiziert [15] und in der Folge durch 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) und das Screening von cDNA-Banken ihre gesamte codierende Sequenz bestimmt. Der Rezeptor wurde als das humane Ortholog des *Drosophila* DHR3 identifiziert und vorerst unter dem Namen RZR α geführt. In der Folge wurden drei weitere, strukturell verwandte mRNA-Spezies isoliert und vorerst als ROR α 1-3 benannt. Spätere Analysen identifizierten alle 4 Proteine als Isoformen eines Rezeptors, woraufhin RZR α als Isoform 4 des ROR α eingestuft wurde. Die vier ROR α -Proteine wurden in Ermangelung eines identifizierten Liganden in die Gruppe der Orphan Rezeptoren eingeordnet. Das humane ROR α -Gen liegt auf Chromosom 15q22.2 und umfasst eine mit 730 kb relative große Region. Es besteht aus insgesamt 15 Exons und bildet die vier beschriebenen Isoformen aufgrund unterschiedlichen Spleißens und unterschiedlicher Promotornutzung. Diese unterscheiden sich einzig in ihrer A/B-Domäne, unterscheiden sich jedoch deutlich im Expressionsmuster und regulieren unterschiedliche physiologische Prozesse [73] (Aufbau des Gens siehe Abb. 8). Die Struktur der A/B-Domäne beeinflusst auch die DNA-

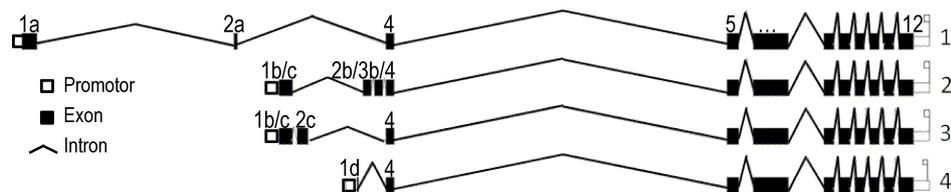


Abb. 8 – Struktur der ROR α -hnRNAs

Schematische Darstellung der Introns & Exons in den hnRNAs der 4 ROR α -Isoformen. ROR α 2&3 werden vom gleichen Promotor transkribiert, nutzen aber nach einem gemeinsamen ersten Exon unterschiedliche Spleißstellen, die Transkription von ROR α 1&4 geht von zwei weiteren Promotoren aus. Die Exons werden aufsteigend nummeriert und mit Buchstaben indiziert: a = α 1; b = α 2; ... Ab Exon 4 nutzen alle Isoformen dieselbe Sequenz, bei den Isoformen 1 & 3 existiert daher kein Exon 3, bei Isoform 4 keine Exons 2d & 3d. Es ergeben sich für ROR α 1-4 Proteine der Längen 523, 556, 548 & 468 Aminosäuren, die sich die c-terminalen 456 Aminosäuren teilen. Davon umfasst die DBD 95, die Scharnierdomäne 110 und die LBD 251 Aminosäuren.

Bindungsspezifität der verschiedenen Isoformen: Als Konsensus-RORE wurde ein auf eine 6 bp lange, A/T-reiche Sequenz folgendes PuGGTCA-Motiv identifiziert, das von den einzelnen Isoformen mit unterschiedlicher Spezifität erkannt wird [73]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass auch der weitere Promotorkontext einen Einfluss auf die Aktivität von ROR α ausübt. Auffallende strukturelle Merkmale in ROR α sind eine verhältnismäßig lange Scharnierdomäne und eine hoch konservierte CTE der LBD, zwei Merkmale die an die Struktur von NGFI-B erinnern und analog auch bei ROR α für eine monomere DNA-Bindung sorgen [72]. Auch die Struktur des RORE bestätigt die monomere DNA-Bindung. Während die Expression der Isoformen 2 & 3 weitgehend auf die Testes beschränkt ist, wurden *mRNAs* der Isoformen 1 & 4 in den meisten Geweben des Körpers gefunden. Besonders hohe Konzentrationen konnten im zentralen Nervensystem (insbesondere in den Purkinje-Zellen des Cerebellums), im Skelettmuskelgewebe und im Auge nachgewiesen werden.

Diese Verteilung passt ausgezeichnet zu der Symptomatik, die in ROR $\alpha^{-/-}$ -Mäusen gezeigt werden konnte. Das murine ROR α -Gen liegt auf Mauschromosom 9 und produziert nur zwei Isoformen, die den humanen ROR α -Isoformen 1 & 4 entsprechen. Der Phänotyp der Knock-Out Mutanten entspricht dem der homozygoten sogenannten *staggerer*-Mäuse (*sg/sg*) [191], einer natürlich auftretenden, 1962 zum ersten Mal beschriebenen Mausmutante, die auf eine 6,4 kb lange Deletion im Maus-Chromosom und den daraus folgenden Verlust des 122bp langen fünften Exons von ROR α zurückgeht. Diese Deletion führt zum Verlust des Beginns der LBD, einer Verschiebung des Leserasters und zu einem vorzeitigen Stopp der Translation [78]. *Staggerer*-Mäuse sind charakterisiert durch Tremor, Ataxie, geringe Körpergröße und -gewicht sowie ein verändertes Knochenwachstum. Sie sterben ungefähr einen Monat nach der Geburt.

1.3.1 Purkinjzellentwicklung

Die Ataxie der ROR^{sg/sg}-Mäuse beruht auf einer Atrophie des Cerebellums, in dem auf Grund von defekten Purkinje-Zellen die Ausbildung der Granularzellen unterbleibt. Dieser Zusammenhang konnte durch Studien an *Staggerer*-Chimären elegant bewiesen werden [87]. Während die Chimären normal gestaltete Granularzellen bildeten, zeigten die Purkinje-Zellen mit *Staggerer*-Herkunft die bekannte mangelhafte Reifung des Dendritenbaums. Purkinje-Zellen mit Wildtyp-Herkunft hingegen waren voll funktionsfähig. Dies zeigte auch, dass der Verlust von ROR α nicht die Entstehung der Purkinje-Zellen, sondern deren korrekte Reifung verhindert. Weitere Versuche zeigten, dass die exogene Expression von *hROR α 1* in den murinen Purkinjellen zu deren korrekter Reifung unter Ausbildung der entsprechenden Dendriten führte [28]. Ein Ziel von ROR α in reifenden Purkinje Zellen ist der Sonic hedgehog (Shh)-Promotor [77]. In Purkinje-Zellen gebildetes Shh wird nach einer autokatalysierten Proteolyse über den Golgi-Apparat ausgeschüttet und bindet auf Zielzellen an den Patched-Transporter (Ptc1). Freier Ptc1 inhibiert über einen indirekten Mechanismus den heptahelikalen Rezeptor Smoothened

ROR α -Expression ist essentiell für die korrekte Reifung von Purkinje-Zellen

(Smo), vermutlich unter Beteiligung von Oxysterolen [45]. Bindung von Shh an Ptc1 inhibiert diesen und enthemmt damit Smo. Über einen noch unbekanntem Signalweg führt dies zur Aktivierung von Proteinen der Gli-Familie, die als Zinkfingerproteine in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen ermöglichen [93, 192]. Exogene Gabe von Shh konnte die Proliferation von Granularzellen im Cerebellum von Staggerermäusen deutlich steigern [28], wodurch bewiesen wurde, dass Shh ein wichtiger Faktor in der Vermittlung der Aktivität von ROR α in der Reifung von Purkinje- und Granularzellen ist (siehe auch Abb. 9). Auch die Funktion reifer Purkinjezellen steht

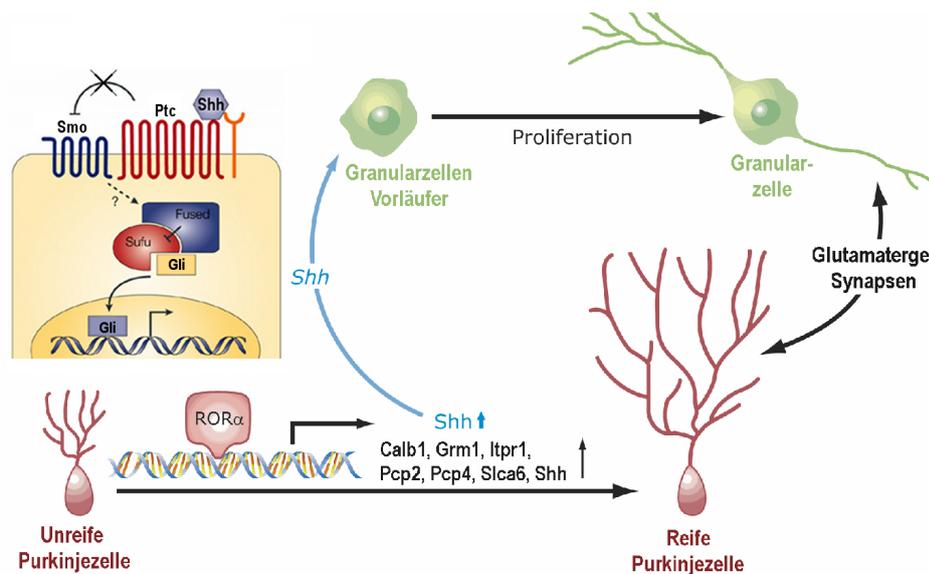


Abb. 9 – Regulation der Purkinje- & Granularzellreifung

Schematische Darstellung der Regulation der Reifung von Purkinjezellen und der damit verbundenen Reifung von Granularzellen. Purkinjezellen exprimieren ROR α , in Granularzellen konnte kein ROR α nachgewiesen werden. Nach [95, 136].

im Zusammenhang zu ROR α -Proteinspiegeln: Im Mausmodell der spinocerebellären Ataxie, einer autosomal dominant vererbten neurodegenerativen Erkrankung die durch einen verlängerten Polyglutaminbereich in Ataxin 1 (ATXN1) bedingt wird, konnte nachgewiesen werden, dass die Erkrankung mit einem verringerten zellulären Spiegel an ROR α einhergeht. Dieser kommt zumindest teilweise durch verringerte Proteinstabilität zustande. Da ROR α in gesunden Zellen über einen Komplex mit ATXN1 und TIP60 RORE reguliert, wird ein enger Zusammenhang zwischen ROR α und dem Krankheitsbild angenommen [77, 186]. Es zeigte sich außerdem, dass TIP60 (HTATIP) eine in ROR α -Komplexen häufig zu findende Acetyltransferase ist.

1.3.2 Regulation der T_H-Zellentwicklung

Milz und Thymus ROR α ^{-/-}-Mäuse sind deutlich verkleinert und die Zahl an Spleno- sowie Thymozyten deutlich verringert, wobei bei letzteren eine starke Abnahme der CD4⁺CD8⁺-Zellen bei gleichzeitiger Zunahme der

CD4⁻CD8⁻-Zellen und der CD4⁺CD8⁻- bzw. CD4⁻CD8⁺-Zellen zu beobachten ist [57]. Auch war die auf LPS-Exposition folgende IL-6 und TNF α -vermittelte Immunantwort der Mastzellen und Macrophagen in ROR α ^{-/-}-Mäusen deutlich verstärkt. Zusammen mit Berichten, dass ROR α die Expression von I κ B α positiv reguliert [49], deuten diese Befunde darauf hin, dass ROR α ein negativer Regulator im Entzündungsgeschehen sein könnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ROR α eine wichtige Rolle in der Genese der erst in den letzten Jahren entdeckten T-Helfer Zellen 17 spielt. Wie alle T-Helfer Zellen nach Kontakt mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen aus CD4⁺ Vorläuferzellen entstehend, scheinen T_H17 Zellen eine der wichtigsten proinflammatorischen Zelllinien in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder multipler Sklerose zu sein.

T-Helfer Zellen werden durch ihr Expressionsmuster verschiedener Zytokine charakterisiert, charakteristisch für T_H1 ist Interferon γ , für T_H2 sind es die Interleukine 4, 5 und 13. T_H17 Zellen produzieren die Interleukine 17A&F, 21 und 22, während regulatorische T-Helfer Zellen (T_{reg}) durch eine Produktion von Interleukin 10 und TGF β 1 gekennzeichnet werden. Die Differenzierung von T_H17 und T_{reg} ist häufig gegenläufig, was auf miteinander vernetzten Signalwegen beruht, die unter anderem auf den Gegenspielern ROR γ t und FOXP3 gründen [22, 113].

Die Reifung von T_H17 Zellen aus T_H-Vorläuferzellen ist neben dem Kontakt mit der antigenpräsentierenden Zelle auch vom passenden Zytokinumfeld, genauer gesagt der Anwesenheit von IL-6 oder IL-21 sowie TGF β , abhängig. TGF β führt in den Vorläuferzellen zur Induktion Smad-abhängiger Gene, Interleukin 6 zur Induktion STAT-3-abhängiger Gene. Zusammen starten sie ein genetisches Programm das letztlich in der Generierung von T_H17 Zellen mündet. Interessanterweise führt die Anwesenheit von TGF β allein zur Ausbildung FOXP3-produzierender T_{reg}. Wie genau die Zytokine die Programmierung der T_H17 bewirken ist noch Bestandteil intensiver Forschung, aber es konnte gezeigt werden, dass die IL-6-vermittelte Aktivierung von STAT3 notwendig, nicht aber ausreichend für die im Zuge der Reifung erfolgende Hochregulation von ROR γ t und ROR α ist. Die beiden nukleären Rezeptoren führen synergistisch in die Reifung von T_H17 Zellen, wobei durch Knockout-Experimente klar wurde, dass ROR γ t die gewichtigere Rolle in der Regulation zufällt, aber erst die parallele Elimination von ROR α und ROR γ t führte zu einer fast vollständigen Inhibition der Bildung von T_H17 Zellen [220]. Auch wenn TGF β an der Aktivierung von ROR α beteiligt ist, bewirkt es in Abwesenheit von IL-6 eine wesentlich stärkere Induktion von FOXP3. FOXP3 bindet über seine LxxLL-Domäne an die AF2 von ROR α 4 und verhindert so (und nicht über seine Funktion als Repressor in der Gentranskription) dessen Aktivierung [52]. Ein analoger Mechanismus wurde auch für die FOXP3-vermittelte Inhibition von ROR γ t beschrieben [92]. Dabei wurde auch die Anwesenheit eines funktionellen RORE im IL17-Promotor entdeckt, über dessen Bedeutung im Gesamtzusammenhang allerdings noch Unklarheit besteht. Insgesamt deuten diese Erkenntnisse eine komplexe Funktion von ROR α in der Regulation des Immunsystems hin und unterstreichen

*ROR α führt
gemeinsam mit
ROR γ t zur Reifung
von T_H17-Zellen*

seine potentielle Bedeutung als Zielstruktur zur Therapie beispielsweise von Autoimmunerkrankungen.

1.3.3 Lipidmetabolismus

Teil der Auffälligkeiten im Phänotyp der $ROR\alpha^{sg/sg}$ -Mäuse sind ausgeprägte Störungen des Lipidmetabolismus. Sie weisen eine ausgeprägte Hypoalphalipoproteinämie auf, gekennzeichnet durch erniedrigte HDL-, ApoLipoprotein- und Triglyceridspiegel [137]. Die Promotoren von ApoA1 und ApoC-III stehen unter Kontrolle eines RORE, wobei der ApoA1-Promotor nur durch $ROR\alpha_1$, nicht aber durch $ROR\alpha_2$ & 3 aktiviert werden konnte [171, 202]. Weiterhin bewirkt die staggerer-Mutation ein im Vergleich zum Wildtyp geringeres Körpergewicht auch bei fettreicher Diät und einen Schutz vor der Entwicklung einer Fettleber [120]. Letzteres wurde mit einer verringerten Expression des SREBP1c und einer daraus folgenden Verringerung der Expression SREBP-abhängiger Gene wie der Fettsäuresynthase erklärt. Auch dieses Gen steht unter direkter Kontrolle eines RORE, wobei aufgrund der Tatsache, dass $ROR\alpha_4$ die in der Leber hauptsächlich exprimierte $ROR\alpha$ -Isoform darstellt auf eine Kontrolle durch $ROR\alpha_4$ geschlossen wurde [loc.cit.].

Auch eine Reihe von Enzymen der Metabolismusphasen I & II werden von $ROR\alpha$ und/oder $ROR\gamma$ kontrolliert. $ROR\alpha$ -abhängig sind dabei zum Beispiel Cyp2B9, Cyp39A1 und Cyp7B1, allesamt an der Hydroxylierung von Steroiden und der Gallensäuresynthese beteiligt, sowie Cyp4A10 und Cyp4A14, die an der Hydroxylierung von Fettsäuren beteiligt sind [104, 203]. Auch diverse Sulfotransferasen unterliegen einer Kontrolle durch $ROR\alpha$, so zum Beispiel Sult1E1, deren Aktivität in staggerer-Mäusen deutlich erhöht ist. Die genaue Bedeutung dieser Erkenntnisse ist noch zu klären, es besteht jedoch eine auffällige Überlappung von $ROR\alpha$ - und LXR-abhängigen Genen. Wada et al. schlugen daher einen funktionellen Antagonismus der beiden Rezeptoren vor [204]. Hinweise darauf gaben auch Reporteranalysen, in denen $ROR\alpha$ dosisabhängig die Aktivierung eines LXR-Promotors hemmen konnte [203] und umgekehrt [204]. Dies und die Ergebnisse der Untersuchungen zu $ROR\alpha$ -Liganden (siehe auch Kap. 1.3.5) weisen auf eine bedeutende, aber noch genauer zu untersuchende Rolle von $ROR\alpha$ in der Regulation des Lipidmetabolismus hin.

Die Expression
zahlreicher Cyp-
Enzyme unterliegt
einer Kontrolle durch
 $ROR\alpha$

1.3.4 Krebsentstehung

Bisher konnte noch keine direkte Verbindung zwischen $ROR\alpha$ und der Entstehung diverser Krebsarten gezeigt werden, allerdings lassen verschiedene Erkenntnisse eine gewisse Beteiligung von $ROR\alpha$ am Krebsgeschehen wahrscheinlich werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass $ROR\alpha$ auch zu einer Erhöhung der Aromataseexpression (Cyp19a1) führt [155]. Die dadurch vermehrt gebildeten Sexualhormone, insbesondere die Estrogene könnten zu einem vermehrten Wachstum estrogenabhängiger Tumore führen. Auch liegt das $ROR\alpha$ -Gen wie schon eingangs erwähnt auf Chromosom 15q22.2 und damit mitten in einer großen, fragilen Stelle des Chromosoms.

Fragile Stellen sind instabile genomische Regionen, die besonders häufig an Translokationen und Deletionen beteiligt sind [75, 76]. Das ROR α -Gen liegt inmitten der fragilen Stelle FRA_{15A} und wird in diversen Krebsarten inaktiviert [229]. Interessant könnte dies sein, da gezeigt wurde, dass ROR α durch zellulären Stress, insbesondere durch Hypoxie aktiviert wird [20, 42] und dass staggerer-Mäuse vermehrt zur Angiogenese neigen, ROR α , also ein negativer Regulator der Angiogenese ist [21]. Diese Schlussfolgerung wird zusätzlich gestützt durch die Feststellung, dass das ROR α -Gen selbst durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 (HIF1) aktiviert wird [41]. Die Inaktivierung des ROR α -Gens durch die fragile Stelle könnte daher in Krebspatienten zu einer vermehrten Angiogenese und daher zu verbessertem Tumorwachstum führen.

1.3.5 *Potentielle Liganden*

Seit der ersten Beschreibung von ROR α und seiner Einordnung als Orphan Rezeptor haben sich verschiedene Gruppen um eine Identifizierung eines Liganden bemüht. Bis heute blieb jedoch letztlich ungeklärt, ob ROR α eine ligandenunabhängige, konstitutive Aktivität zeigt, wie die beispielsweise ein Homologiemodell der Gruppe um Muscat nahe legt [83] oder ob es, möglicherweise strukturelle, Liganden gibt. Letztlich wurde eine Reihe möglicher Liganden erforscht, ohne dass bis heute Beweise ihrer physiologischen Funktion schlüssig wären:

Angestoßen durch Untersuchungen, die eine nukleäre Funktion von Melatonin nahelegten und nukleäre Bindungsstellen für Melatonin identifizierten [1, 2], berichtete die Gruppe um Carlberg von der Identifizierung ROR β s als nukleärem Melatoninrezeptor [17]. Einige Monate später identifizierten sie auch ROR α als nukleären Melatoninrezeptor [212]. In ihren Untersuchungen konnten sie eine dosisabhängige Steigerung der ROR α -Aktivität am RORE durch Melatonin nachweisen, sofern die Zellen ohne Serum kultiviert worden waren und identifizierten somit Melatonin als im Serum enthaltenen Liganden und somit auch eine Begründung für die scheinbare konstitutive Aktivität ROR α s. Parallel berichteten sie die Entdeckung von Thiazolidindionen (Leitsubstanz: CGP52608) als synthetische Liganden für ROR α [145]. Diese Ergebnisse sind jedoch umstritten: Die Experimente, die ROR β als nukleären Rezeptor für Melatonin identifiziert hatten, konnten von der Gruppe selbst nicht reproduziert werden und wurden daher revidiert [16]. Auch bezüglich der ROR α betreffenden Experimente wurde von mehreren Gruppen über Probleme bei der Reproduktion berichtet [121, 197], sie wurden aber bis heute nicht revidiert.

2002 und 2004 fand die Gruppe um Fournier in mehreren Kristallstrukturen der ligandenbindenden Domäne des ROR α Cholesterol und Cholesterolsulfat in der Ligandenbindungstasche des Rezeptors und zeigten in einem recht aufwändigem Versuchsaufbau eine Aktivierung der ROR α -abhängigen Gentranskription durch Cholesterol [101, 102]: Hierzu depletierten sie transient mit einem ROR-Reportergen transfizierte U-2OS-Zellen durch Inkubation mit Lovastatin (einem HMG-CoA-Reduktaseinhibitor) und Hydroxypropyl-

Kristallographische Studien deuten auf eine Bindung von Cholesterolderivaten an ROR α hin

β -cyclodextrin (einem cholesterolbindenden Cyclodextrin, das zur partiellen Depletion intrazellulären Cholesterols verwendet wird) und kultivierten diese in LDL-freiem Medium. Zugabe von Cholesterol führte unter diesen Bedingungen zu einer Steigerung der ROR α -Aktivität, die jedoch bei weitem nicht das Niveau vor der Behandlung der Zellen erreichte und angesichts der artifiziellen, zytotoxischen Bedingungen nur schwer von einer generalisierten Steigerung der Transkription in den behandelten Zellen unterschieden werden kann. Daher bleibt die physiologische Relevanz dieser Erkenntnisse umstritten, auch wenn eine Funktion von ROR α als Sensor für zelluläre Cholesterol (-derivate) angesichts der funktionellen Verknüpfung von ROR α und Enzymen des Lipidstoffwechsels durchaus möglich erscheint.

Letzte Veröffentlichungen der Gruppen um Burris und Griffin deuten ebenfalls in diese Richtung: Sie beschreiben, dass sowohl 7-Oxysterole als auch 24S-Hydroxycholesterol an ROR α wie auch ROR γ binden und als inverse Agonisten wirken [207, 209]. Für den synthetischen LXR-Agonist To901317 konnte ein dosisabhängiger Antagonismus an ROR α und ROR γ , nicht aber an ROR β gezeigt werden. Auch wenn hier kein physiologischer Ligand diese Wirkung hat, sondern eine Substanz, die relativ viele nukleäre Rezeptoren beeinflusst (wie beispielsweise auch FXR), stimmt dieses Verhalten gut mit dem beschriebenen funktionellen Antagonismus von ROR α und LXR überein. Auch die Beschreibung von LXR als Cholesterolsensor [100] ist mit diesem Bild vereinbar. Ausgehend von To901317 wurde mit SR1078 eine Substanz synthetisiert, die keine Aktivität mehr an LXR und FXR aufwies, dafür aber agonistisch auf ROR α und ROR γ wirkte [208]. Interessanterweise führte die Klonierung der ROR α -LBD auf die Gal4-DBD im Zuge der weithin üblichen Reporteranalysen von Gal4-Chimären zu einer Inversion der SR1078 Wirkung. Auch wenn weiterhin umstritten ist, ob und wenn ja welchen endogenen Ligand ROR α besitzt, könnten diese Substanzen wertvolle Hilfsmittel in der weiteren Untersuchung der ROR α Funktion sein.

1.3.6 Posttranslationale Modifikationen

Auch ROR α unterliegt, wie für nukleäre Rezeptoren üblich, zahlreichen posttranslationalen Veränderungen. So konnte gezeigt werden, dass ROR α -Isoformen durch verschiedene Kinasen (ERK-2, PKC und GSK 3) phosphoryliert werden und einer SUMOylierung unterliegen: *In vitro* Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass ROR α 4 durch eine in mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimulierten PMNL enthaltene Kinase phosphoryliert wird. Da diese Phosphorylierung durch Vorinkubation der Zellen mit U0126, einem selektiven Inhibitor der ERK-2 aktivierenden MEK vollständig aufhebbar war, schlossen wir auf eine Beteiligung von ERK-2 an dieser Phosphorylierung. Dies konnte durch *in vitro* Kinaseanalysen mit rekombinanten ERK-2 bestätigt und gleichzeitig das in einem P-X-S/T-P Motiv in der Scharnierdomäne gelegene Threonin 128 als Phosphorylierungsstelle identifiziert werden [123]. Da dieses Phosphorylierungsmotiv in der konstanten Region der ROR α -Isoformen liegt, ist dieser Befund auf alle vier Isoformen übertragbar. Auch wenn sich nach Inkubation mit PMA und U0126 keine

Unterschiede in der Aktivität von ROR α 4-Wildtyp und der T128A-Mutante zeigen ließen, schien die nicht mehr phosphorylierbare Mutante eine etwas höhere Affinität zum RORE zu haben. Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung konnte durch diese Versuche noch nicht aufgeklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Duplus et al. [56] wiederum konnten zeigen, dass die Aktivität von ROR α 1 in COS-7-Zellen durch Inkubation mit PMA gehemmt wird. Diese Inhibition konnte durch BIM-1, einem Inhibitor aller PMA-induzierten Proteinkinasen des Typs C (PKC) und durch Gö6976, einem Inhibitor der cPKC, nicht aber durch U0126 inhibiert werden. Weitere Versuche offenbarten, dass ROR α 1 in COS-7-Zellen basal phosphoryliert vorliegt und dass die Phosphorylierung, analog zu unseren Ergebnissen, durch Inkubation mit PMA verstärkt wird. Im Kontrast zu unseren Ergebnissen jedoch war diese Phosphorylierung durch Inkubation mit U0126 nicht vollständig aufhebbar. Die Autoren folgerten daraus, dass die Phosphorylierung hauptsächlich durch PKC und nur zu einem untergeordneten Teil durch mitogenaktivierte Kinase (MAPK) wie ERK-2 erfolgte. In dieser Studie wurde darauf verzichtet, das phosphorylierte Motiv zu identifizieren, jedoch identifizierten Lee et al. kürzlich die Phosphorylierung von ROR α 1 durch PKC an Serin 35 [126]. Dieses ist Teil der A/B-Domäne des Rezeptors, was diese Phosphorylierung als isoformspezifischen Regulationsmechanismus identifiziert. Unklar bleibt weiterhin die Beteiligung weiterer PKC-abhängiger Kinasen, die in *in vitro* Kinaseanalysen nicht identifiziert werden könnten und auch Wirkungen auf andere Isoformen vermitteln könnten.

Keine direkte Phosphorylierung liegt der auf eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels folgenden Aktivierung von ROR α durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK) IV zugrunde, die Kane und Means zeigen konnten [103]. Nach Inkubation transient transfizierter HaCaT-Zellen mit dem Calciumkanalbildner Ionomycin beobachteten sie eine potente Aktivierung von ROR α , die durch Inkubation mit KN-93, einem selektiven Inhibitor der CaMK aufhebbar war. Durch Untersuchungen mit kotransfizierten konstitutiv aktiven Mutanten verschiedener CaMK konnten sie CaMKIV als für die Erhöhung der ROR α -Aktivität verantwortliche Kinase identifizieren. *In vitro* Kinaseanalysen ergaben keine direkte Phosphorylierung von ROR α durch CaMKIV, es konnte aber gezeigt werden, dass die ligandenbindende Domäne und darin enthaltene potentielle Coaktivatorbindungsstellen für die Vermittlung des CaMKIV Einflusses essentiell sind. Kane und Means schlugen daher eine CaMKIV-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung eines Coaktivators vor, der ähnlich wie SRC-1 im Falle des galliden Progesteronrezeptors (siehe auch Kap. 1.2) die Aktivität von ROR α erhöht.

Nach bisher unveröffentlichten Untersuchungen der Gruppe um Muscat ist auch Glycogensynthasekinase 3 (GSK3) β in der Lage, *in vitro* zu einer Phosphorylierung von ROR α zu führen. Auch in meinen Versuchen konnte ich diese Phosphorylierung in *in vitro* Kinaseanalysen bestätigen. Ihre physiologische Relevanz jedoch ist ungeklärt, da die Mutation potentieller Phosphorylierungsstellen zu keiner Änderung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp führte [124]. Auch sollte bedacht werden, dass im Falle des GSK3 β

ROR α -Isoformen werden durch zahlreiche Kinasen direkt & indirekt beeinflusst

die Ergebnisse von *in vitro* Kinaseanalysen schwer zu erklären sind. GSK3 β weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den mitogenaktivierten Kinasen auf, zeichnet sich jedoch durch einen besonderen Bindungsmodus aus, da ihre Affinität zum Bindungsmotiv stark erhöht ist, wenn dieses bereits durch eine andere Kinase phosphoryliert wurde. Im Falle der Glycogensynthese wurde Casein Kinase II (CK2) als für diese Phosphorylierung verantwortlich identifiziert, das Phosphorylierungsmotiv hat die Struktur S/T-X-X-X-pS/pT [43]. Da in *in vitro* Kinaseanalysen in der Regel nur eine Kinase für die direkte Phosphorylierung des Substrates eingesetzt wird, sollte die GSK3 β hier negative oder nur schwache Ergebnisse liefern.

In Untersuchungen von Hwang et al. konnte gezeigt werden, dass ROR α 1 Ziel einer SUMOylierung an Lysin 240 in mitten eines klassischen ψ -K-X-E Motivs ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese sowohl durch SUMO1 als auch durch SUMO2 erfolgt und durch Proteine der PIAS-Familie positiv, durch SENP2 negativ beeinflusst wird. Eine Mutation der SUMOylierungsstelle K240 nach Alanin führte zu einer Abschwächung der Aktivierung RORE-enthaltender Promotoren [90]. Auch wenn diese Untersuchungen eine Rolle von SUMO in der Regulation der ROR α Aktivität vermuten lassen und diese Rolle aufgrund der Lage des Lysins 240 isoformübergreifend sein sollte, bleibt die genaue physiologische Bedeutung noch zu untersuchen, da Hwang et al. trotz Verwendung SUMO-exprimierender Plasmidvektoren in der Veröffentlichung darauf verzichteten, die Ergebnisse einer Kotransfektion des ROR α 1-Wildtyps und SUMO1/2 zu zeigen. Die veränderte Aktivität der K240A-Mutante könnte daher auch auf eine veränderte Faltung des Proteins zurückzuführen sein.

Auch die Ubiquitinylierung von ROR α und anschließender Abbau durch das 26S-Proteasom wurden als wichtige Bestandteile des Lebenszyklus von ROR α identifiziert. Inhibition des Proteasoms durch MG-132 bewirkte eine Akkumulation ubiquitinylierten ROR α und eine Reduktion der transkriptionellen Aktivität von ROR α , wobei letzteres in der Studie nicht schlüssig geklärt werden konnte [147]. Vermutlich muss man zur Klärung Erkenntnisse zum proteasomalen Abbau von RevErb α (siehe Kapitel 1.4.2) mit einbeziehen.

1.4 REVERB α

RevErb α [121, 225], auch bekannt als ear1 und NR1D1, das 1989 gleichzeitig von zwei Gruppen entdeckt wurde, entstammt dem 7933 bp langen Gen *erbA* von Chromosom 17q11.2, dessen Sequenz teilweise mit der des TR α überlappt [85]. Phylogenetisch ist RevErb α eng verwandt mit den nukleären Rezeptoren ROR und PPAR [44], strukturell zeigt es mit 97% in der DBD und 68% in der LBD die größte Ähnlichkeit mit RevErb β , das wider Erwarten keine alternative Spleißform darstellt, sondern von einem eigenen Gen auf Chromosom 3p24.2 transkribiert wird. Diese doppelte Kodierung zweier nach heutigen Kenntnissen funktionell sehr ähnlichen Rezeptoren unterstreicht ihre evolutionäre Bedeutung. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass die Expression von sowohl RevErb α als auch RevErb β in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden konnte [121]. Beide Rezeptoren zeigen

identisches DNA-Bindungsverhalten und binden dasselbe Response-Element wie auch ROR α [61]. Durch ihre verkürzte ligandenbindende Domäne, der die Helix 12 fehlt und die daher inmitten der postulierten AF-2 endet, sind sie nicht in der Lage Coaktivatoren zu binden und bewirken daher am Response-Element eine effektive Transkriptionsrepression. Sie können folglich als passive Repressoren der ROR α vermittelten Gentranskription gelten. Auch RevErb bindet das RORE als Monomer [81], allerdings konnte auch eine homodimerische Bindung an durch C T getrennte DR2 Response-Elemente und die Bindung zweier Monomere an weiter getrennte Response-Elemente gezeigt werden [82]. Die Bildung eines Heterodimers mit RXR scheint RevErb hingegen unmöglich zu sein [81].

Die Kristallstruktur zweier DNA-bindender Domänen von RevErb α gebunden an das DR2-RE zeigte zusätzlich zu den Zinkfingern zwei weitere Protein-DNA Interaktionen: Wie erwartet war auch die P-Box an das RE gebunden, während die C-terminale Verlängerung der LBD an die A/T-reiche Region vor dem RE gebunden vorlag. Auch zeigte die Struktur das klassische Interaktionsmotiv zweier DBD, in dem ein Teil des zweiten Zinkfingers der stromaufwärts gelegenen DBD mit der mangels einer zweiten A/T-reichen Region nicht an der der DNA-Bindung beteiligten CTE des stromabwärts gelegenen interagiert und den Abstand der beiden definiert (siehe Titelbild [228]). Bei Bindung zweier RevErb-Monomere oder des -Homodimers an die DNA wird der NCoR-Komplex [222, 226] rekrutiert und führt über dessen Histondesactylasenfunktion zu einer Verstärkung der Repression. Ein Monomer allein ist aufgrund der Stöchiometrie des NR-NCoR Komplexes nicht in der Lage NCoR zu binden, wirkt aber durch Konkurrenz um das Response-Element trotzdem repressiv. Die Struktur des Komplexes war in Ermangelung einer Kristallstruktur lange Zeit umstritten, 2010 jedoch konnte die Gruppe um Lazar eine Kristallstruktur eines Peptids der NCoR-Interaktionsdomäne 1 (ID1) gebunden an die ligandenbindende Domäne des RevErb α gewinnen [162]. Es zeigte sich, dass der N-terminale Teil der ID1 eine neue Konformation des C-terminalen Teils der ligandenbindenden Domäne erwirkt und beide daraufhin unerwartete antiparallele β -Faltblätter ausbilden. Die restlichen Teile der ID1 bilden die für eine CoRNR Bindung bekannte α -Helix, die sich in die Coaktivatorbindungstasche legt. Die Ausbildung des β -Faltblatts erfordert eine Konformationsänderung der Helix 11 der LBD, die normalerweise für die Ligandenbindung benötigt wird.

Zwei RevErb α rekrutieren NCoR unter Ausbildung ungewöhnlicher Sekundärstrukturen

1.4.1 Liganden

Lange Zeit galt RevErb gerade auch aufgrund der reprimierenden Funktion und der verkürzten LBD als klassisches Beispiel eines nukleären Rezeptors ohne Liganden. 2007 jedoch identifizierten zwei Gruppen parallel die stöchiometrische und reversible Bindung von Häm an RevErb α & β , die mit einer Verstärkung der durch den Rezeptor vermittelten Repression verbunden werden konnte [170, 224]. Die Hämaffinität der Rezeptoren wurde durch Isoalorimetrie als 2-4 μ M bestimmt und eine Depletion intrazellulären Häms führte zu einem weitgehenden Verlust der repressiven RevErb-Aktivität. Auch wenn

dies bisher durch strukturelle Studien nicht erklärt werden konnte, führt die Bindung von Häm an RevErb zu einer verstärkten Rekrutierung von NCoR. Häm ist aufgrund seines Molekulargewichts von 616 Da und seiner Größe ein ungewöhnlicher Ligand für nukleäre Rezeptoren, jedoch erfüllt es zumindest bezüglich der Lipophilie die üblichen Anforderungen. Trotzdem erfordert die Bindung von Häm in die verhältnismäßig kleine LBD der RevErb eine deutlich Änderung in deren Konformation [38, 162]. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, RevErb als einen zellulären Hämsensor einzustufen. Aufgrund unten genauer ausgeführter physiologischer Funktionen erscheint diese Rolle eine sinnvolle Verknüpfung der nukleären Rezeptoren mit metabolischen Funktionen. Die Entdeckung Häms als RevErb-Liganden führte zu vermehrter Forschung nach synthetischen Liganden zur Steuerung der Aktivität von RevErb. Einen ersten Erfolg präsentierten Meng et al. 2008: Ihr Modulator 1,1-Dimethylethyl-N-[(4-chlorophenyl)methyl]-N-[(5-nitro-2-thienyl)methyl]glycinat zeigte eine dosisabhängige Steigerung der Rekrutierung von NCoR an den Rezeptor bei einem EC_{50} von 250 nM [143].

*RevErb α & β sind
zelluläre
Hämsensoren*

1.4.2 Posttranslationale Modifikationen

Im Vergleich zu ROR α sind bei RevErb α deutlich weniger posttranslationale Modifikationen beschrieben worden, die beschriebene zeigt dafür aber umso eindrucksvoller, welche Bedeutung Modifikationen für die Regulation der Gentranskription haben können: Die Gruppe um Lazar konnte 2006 zeigen, dass RevErb α Ziel einer Phosphorylierung durch die konstitutiv aktive GSK3 β ist [43, 51, 62]. GSK 3 β kann durch Phosphorylierung an Serin 9 inhibiert werden, was durch eine Vielzahl von Signalwegen erreicht werden kann, in Zellkulturversuchen beispielsweise auch durch einen Serumschock, der üblicherweise zur Synchronisierung der Zellen verwendet wird oder durch Inkubation mit LiCl. Inhibition der GSK 3 β führte zu einem Abfall der zellulären Konzentration von RevErb α , der durch Ubiquitinylierung und Abbau durch das 26S-Proteasom erreicht wurde. Inhibition des Proteasoms mit MG-132 führte zu einer Akkumulation intrazellulären RevErb α s. Dies könnte auch die Beobachtung erklären, dass diese Inhibition eine Abnahme der Aktivität von ROR α bewirkt (siehe Kap. 1.3.6). Es zeigte sich, dass GSK 3 β über eine Phosphorylierung der Serine 55 & 59 eine Stabilisierung von RevErb α bewirkt [223]. Diese Phosphorylierung ist zugleich ein weiteres Beispiel für die Verknüpfung metabolischer Prozesse und nukleärer Rezeptoren, da ein wichtiger Stimulus für eine Inhibition der GSK3 beispielsweise eine Erhöhung des Insulinspiegels ist.

*Phosphorylierung
durch GSK 3 β
stabilisiert RevErb α*

1.4.3 Steuerung zirkadianer Rhythmen

Zahlreiche endogene Regelkreise unterliegen einer zirkadianen Rhythmik, der nach außen hin auffälligste ist sicherlich der Schlaf-Wach-Zyklus. Aber auch die Ausschüttung zahlreicher Hormone zeigt ein zirkadianes Muster, weithin bekannt ist hier sicherlich die endogene Cortisolspitze in den Morgenstunden, die bei der exogenen Glucocorticoidgabe beachtet werden sollte. All

diese Zyklen unterliegen einer ungefähr 24-stündigen Rhythmik, die durch Lichtsignale auf der Retina über den zentralen Zeitgeber justiert wird. Dieser zentrale Zeitgeber ist im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) lokalisiert. Seine Signale synchronisieren die zirkadianen Rhythmen, die in den meisten Zellen durch Expressionskreisläufe aufrechterhalten werden [31, 79, 112, 198]. Kern dieser Zelluhren ist die Ausbildung eines Komplexes der beiden HLH-PAS Domänen enthaltenden nukleären Proteine CLOCK und Bmal1, welcher über die Bindung an E-Boxen der entsprechenden Promotoren die Expression von Per und Cry aktiviert. Diese wiederum bilden ebenfalls Komplexe, bewirken eine Rückkopplung und unterdrücken die Expression von CLOCK und Bmal1. Neben der groben Taktung des zentralen Zyklus im SCN durch retinale Signale über den Tractus retinohypothalamicus bewirken zahlreiche zelluläre Signalwege eine Feinabstimmung und Stabilisierung des Expressionszyklus. Dazu gehören neben posttranslationalen Modifikationen der beteiligten Proteine [64] auch die in dieser Arbeit untersuchten nukleären Rezeptoren ROR α und insbesondere RevErb α (siehe auch Abb. 10). Mehrere

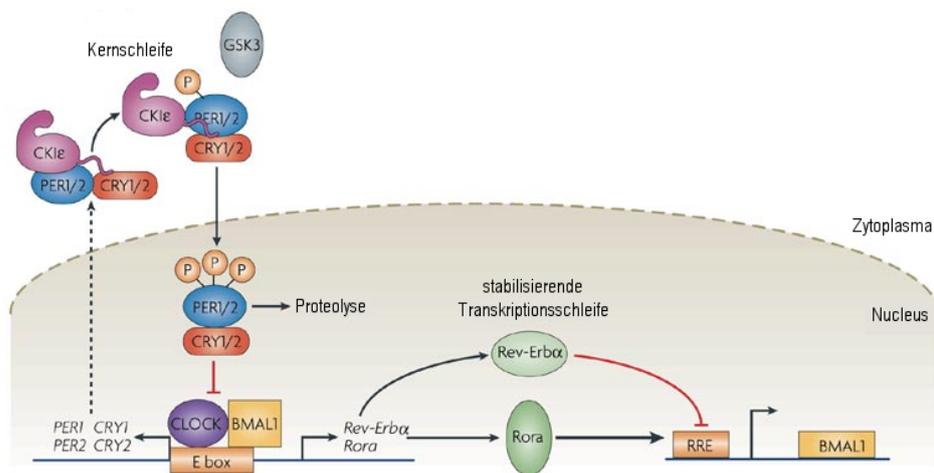


Abb. 10 – Zirkadiane Rhythmen

Schematische Darstellung der an der Aufrechterhaltung der Funktion der zirkadianen Uhr beteiligten Rückkopplungsmechanismen nach [64].

Studien zeigten, dass der RevErb α -Promotor unter Kontrolle von ROR-Response-Elementen steht und es konnte gezeigt werden, dass sowohl ROR α als auch RevErb α diese RORE binden können [4, 172], womit das RevErb-Gen einer klassischen Autoregulation unterliegt. Eine ähnliche Autoregulation wird aufgrund von RORE in ROR α -Promotor auch für ROR α diskutiert, konnte jedoch in unserer Arbeitsgruppe nicht nachgewiesen werden [141]. Eine Verknüpfung des ROR α -RevErb Zyklus mit der zirkadianen Uhr findet über Bmal statt, dessen Promotor ebenfalls unter Kontrolle eines RORE steht [5, 222], das durch beide Rezeptoren angesprochen wird. Dabei sollte angemerkt werden, dass PCR-Analysen zeigten, dass die Expression von ROR α nur in wenigen Geweben (interessanterweise im SCN) zirkadianen Schwankungen unterliegt, während RevErb α -Rhythmik weit verbreitet ist [154]. Untersuchungen der Expression von Bmal1 zeigten, dass RevErb α und RevErb β redundante Funktionen ausüben, da erst die Elimination beider

*RevErb α stabilisiert
zirkadiane
Rhythmen, ROR α
regelt deren
Amplitude*

Rezeptoren die Rhythmizität von Bmal1 verhinderte. Interessanterweise zeigte sich jedoch auch nach Elimination beider RevErb die Rhythmizität von Per und Cry stabil. ROR α hingegen scheint keine essentielle Rolle in der Generierung der Bmal1 Rhythmizität zu haben, da auch Fibroblasten aus ROR $\alpha^{sg/sg}$ Mäusen diese noch aufweisen. Es zeigte sich jedoch, dass die absoluten Transkriptmengen von Bmal1 und anderen Zeitgeberproteinen wie CLOCK und CRY im Vergleich zu Wildtypmäusen reduziert waren [129]. Diese Erkenntnisse begründen das Modell, nachdem RevErb zur Stabilität zirkadianer Rhythmen beiträgt, während ROR α die Amplitude der Rhythmen steuert.

1.4.4 Funktionen im Metabolismus

Stoffwechselfunktionen und Hormonproduktion unterliegen ebenfalls einer zirkadianen Steuerung und es konnte gezeigt werden, dass auch Essensaufnahme ein wichtiges Signal für ein Nachjustieren zirkadianer Rhythmen ist. Studien zeigten, dass Personen mit gestörten zirkadianen Rhythmen wie beispielsweise Schichtarbeiter ein erhöhtes Risiko tragen, am metabolischen Syndrom zu erkranken. Auch wurden metabolische Erkrankungen wie Diabetes Typ II und Fettsucht mit Polymorphismen der zentralen Zeitbergene assoziiert [55]. Eine Untersuchung der Expressionsprofile nukleärer Rezeptoren in Mäusen ergab, dass gerade in am Metabolismus beteiligten Geweben (Leber, Muskulatur, braunes & weißes Fettgewebe) viele nukleäre Rezeptoren eine zirkadiane Rhythmik zeigten [219]. Unter diesen stachen besonders RevErb α und β hervor, deren Rhythmik in allen untersuchten Geweben nachweisbar und stark ausgeprägt war. Weiterhin zeigten sowohl ROR $\alpha^{sg/sg}$ als auch RevErb $\alpha^{-/-}$ Mäuse einen pathologischen Phänotyp auch bei metabolischen Prozessen (siehe Tab. 1). Deren teilweise scheinbare Widersprüchlichkeit ist noch nicht vollständig geklärt, begründet sich aber wahrscheinlich in den vielfach verknüpften Regulationswegen, in denen beispielsweise RevErb β und ROR γ den Verlust der ausgeschalteten Gene teilweise kompensieren.

Maus	Phänotyp	Maus	Phänotyp
RevErb $\alpha^{-/-}$	apoC-III \uparrow Körpergewicht 20% \downarrow Triglyceride \uparrow VLDL \uparrow	ROR $\alpha^{sg/sg}$	apoA-I \uparrow Atheroscleroserisiko \uparrow HDL \downarrow VLDL \downarrow

Tab. 1: Metabolische Phänotypen in ROR $\alpha^{sg/sg}$ & RevErb $\alpha^{-/-}$ Mäusen nach [38]

RevErb α ist an vielen Stellen mit metabolischen Funktionen verknüpft und kontrolliert zahlreiche an metabolischen Prozessen beteiligte Gene: So inhibiert es die Expression des Apo-Lipoprotein C-III [46] und ist auch hier endogener Antagonist von ROR α . In einem Microarray-Vergleich der Expressionsprofile von RevErb $\alpha^{-/-}$ -Mäusen mit RevErb α überexprimierenden Mäusen und dem Wildtyp zur Identifizierung potentieller RevErb α Zielgene wurden

mehrere für den Metabolismus wichtige Proteine RevErb-abhängig inhibiert, darunter das auch durch ROR α kontrollierte SREBP1c [139]. Auch kontrolliert RevErb indirekt die Synthese seines Liganden: RevErb α inhibiert die Expression des Coaktivators PGC1 α , der neben PPAR γ auch weitere nukleäre Rezeptoren (wie auch ROR α) aktiviert und vermutlich über FOXO1 und NRF1 [80] die Expression von ALAS1, dem die Umsetzungsgeschwindigkeit limitierenden Enzym der Hämsynthese, kontrolliert [216]. Die Inaktivierung von RevErb α durch Hemmung der GSK 3 β stellt somit wie bereits erwähnt eine wichtige Verbindung metabolischer Prozesse mit zirkadianen Rhythmen dar: Insulin führt zu Dephosphorylierung und Aktivierung der durch GSK 3 gehemmten Glycogensynthase, indem es durch Aktivierung der PI 3-Kinase zu einer Aktivierung der PKB führt. PKB-Aktivierung wiederum führt zur Phosphorylierung der GSK 3 an Serin 9 (GSK 3 β) bzw. Serin 21 (GSK 3 α), die inhibierend wirkt [51]. Ein dadurch bewirkter, parallel erfolgender RevErb α -Abbau könnte eines der Signale für die Justierung der Zelluhr durch Nahrungszufuhr sein. Weiterhin wurde gezeigt, dass die selbst rhythmisch exprimierten nukleären Rezeptoren PPAR α & γ an den RevErb α - und den Bmal1-Promotor binden und deren Transkription fördern [55, 70]. Diese und einige weitere Berichte [38, 54, 55, 225] zeigen eine enge Verknüpfung zwischen für die zirkadiane Rhythmik zuständigen Genen (insbesondere RevErb) und metabolischen Funktionen. Eine schematische Darstellung einiger dieser und einiger hier nicht besprochener Einflussfaktoren findet sich in Abb. 11.

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aufbauend auf den Arbeiten meiner Vorgänger im Arbeitskreis und auf aktuellen Forschungsergebnissen, eine detaillierte Untersuchung der Regulation der nukleären Rezeptoren ROR α 4 und RevErb α vorzunehmen. Gegenstand dieser Untersuchungen sollten sowohl die Regulation der Transkription der nukleären Rezeptoren als auch die Regulation der Aktivität durch posttranslationale Modifikationen und coregulatorische Proteine sein. Es sollten Ergebnisse meiner Vorgänger aufgegriffen und mechanistisch aufgeklärt werden. Außerdem sollten anhand der beispielsweise in Tiermodellen beschriebenen physiologischen Bedeutung der nukleären Rezeptoren mögliche Einflüsse identifiziert und deren Bedeutung und Mechanismus aufgeklärt werden.

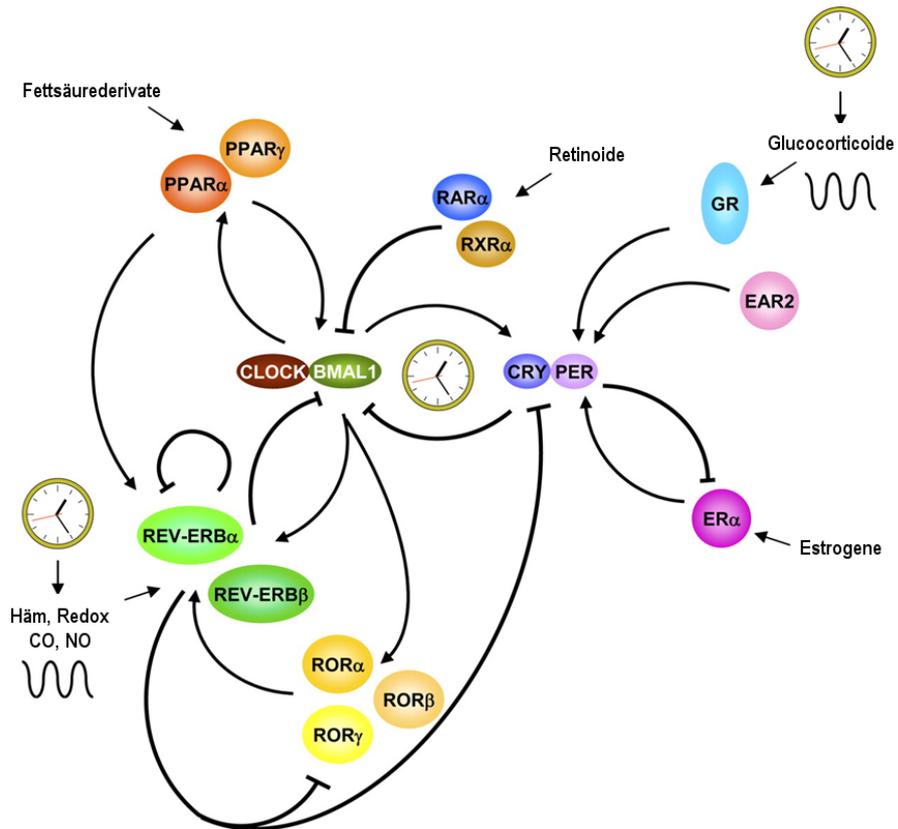


Abb. 11 – Metabolismus und zirkadiane Rhythmen
 Schematische Darstellung einiger Verknüpfungen der zirkadianen Rhythmen mit metabolischen Einflussfaktoren nach [196].

MATERIALIEN UND METHODEN

Alle allgemeinen Chemikalien wurden in der jeweils benötigten Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (89555 Steinheim), AppliChem GmbH (64291 Darmstadt) und Carl Roth GmbH & Co. KG (76185 Karlsruhe) bezogen.

2.1 ZELLKULTUR

Als Standardzelllinie wurden HeLa-Zellen (DSMZ Nr.: ACC 57) verwendet. HeLa-Zellen sind eine epithelartig einschichtig wachsende humane Zelllinie, die 1951 aus einem epitheloiden Zervixkarzinom gewonnen wurden, das später als Adenokarzinom diagnostiziert wurde. Sie wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Österreich) mit 4,5 g/l Glucose, substituiert mit 2 mM L-Glutamin und 0,11 g/l Natriumpyruvat kultiviert. Das Medium wurde weiterhin mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (FCS superior, Biochrom AG, 12247 Berlin) versetzt. Die Zellen wurde zweimal die Woche 1:10 umgesetzt und bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatmosfera in einem Binder Zellinkubationsschrank kultiviert. Unter denselben Bedingungen wurden bei Bedarf auch die beiden Zelllinien MCF-7 (eine ebenfalls epithelartig einschichtig wachsende humane Brust-Adenokarzinomzelllinie, die aus einem metastasierenden Mammakarzinom gewonnen wurde, DSMZ Nr.: ACC 115), 293 (eine einschichtig adhärent fibroblastoid wachsende humane embryonale Nierenzelllinie, die durch Transformation von Nierenzellen mit Adenovirus 5 gewonnen wurde, DSMZ Nr.: ACC 305) sowie 293T-Zellen (eine aus 293-Zellen durch lentivirale Transduktion mit pCMVSPORT6Tag.neo gewonnene Zelllinie, die das SV₄₀ große-T-Antigen exprimiert, DSMZ Nr.: ACC 635) kultiviert. Die Kultivierung der humanen multiplen Myelomzelllinie U266 (DSMZ Nr.: ACC 9) erfolgte unter den gleichen Bedingungen, jedoch in RPMI-1640-Medium (Gibco, Invitrogen), supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum.

2.2 KOMPETENTE E. COLI-STÄMME

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden die *E. coli*-Stämme Sure (Invitrogen) und BL21 (GE Healthcare, 42655 Solingen) mittels der Rubidiumchlorid-Methode (adaptiert von [151]) kompetent gemacht: Eine Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stamms wurde in 200 ml Luria Broth (LB) Medium von Invitrogen bis zu einer OD₆₆₀ von 0,4-0,6 herangezogen und dann pelletiert. Das Pellet wurde in einem eisgekühlten Puffer von pH = 5,8, bestehend aus 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM

CaCl₂ und 15% (w/v) Glycerol resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen in einem Puffer von pH = 6,8, bestehend aus 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ und 15% (m/V) Glycerol gequollen, anschließend aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden dann ca. 5 µl Plasmidlösung auf die Bakterien gegeben und diese für eine halbe Stunde auf Eis geschüttelt. Nach einem zwei-minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurde mit 500 µl LB-Medium abgestoppt und eine Stunde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Je nach Bedarf wurden die transformierten Zellen anschließend entweder in LB-Medium (versetzt mit selektionierendem Antibiotikum) kultiviert oder auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen.

2.3 GEWINNUNG VON PLASMIDVEKTOREN

Für die Gewinnung der für die Arbeit verwendeten Plasmidvektoren wurden verschiedene Strategien angewendet. Alle dabei verwendeten Nucleotidprimer wurden von den Firmen Sigma Genosys (Sigma-Aldrich) oder Eurofins MWG Operon (85560 Ebersberg) in der erforderlichen Reinheit bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme, Polymerasen und Ligasen wurden von NEB (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) oder Fermentas (Fermentas GmbH, 68789 St. Leon-Rot) bezogen und in den laut Angaben der Hersteller passenden Puffern eingesetzt. Restriktionsansätze wurden je nach Versuchsanforderung eine halbe Stunde bis über Nacht bei 37 °C angesetzt, Ligationsansätze je nach Versuchsanforderung auch bei niedrigeren Temperaturen. Agarosegele wurden je nach zu erwartender DNA-Länge mit 0,5-2,5% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH = 8,0) mit 100 ng/ml Ethidiumbromid angefertigt und in Bio-Rad Kammersystemen mittels elektrischer Spannung entwickelt. Die Auswertung erfolgte an einem UV-Transilluminatorsystem der Firma Vilber Lourmat (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, 88436 Eberhardzell). Aus diesen Gelen ausgeschnittene DNA-Fragmente wurden mittels des Nucleo Spin-Extract Kits (Macherey-Nagel) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt.

2.3.1 *Präparation von Plasmidvektoren*

Plasmidvektoren wurden zur Vermehrung in *E. coli* des Stammes Sure nach obigem Protokoll transformiert, die transformierten Bakterien auf Agar-Platten ausgebracht und über die eingeführte Resistenz gegen Ampicillin oder Kanamycin selektioniert. Einzelne Klone wurden von den Platten gelesen und mit 5 ml selektionierendem LB-Medium bei 37 °C vermehrt. Anschließend wurde die darin enthaltene Plasmid-DNA entweder direkt mittels des GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) aufgereinigt oder die Bakterien in 500 ml LB-Medium weiter vermehrt und schließlich mit dem GenElute™ Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich) aufgereinigt.

2.3.2 Klonierung

Für die Klonierung von Expressionsvektoren wurde im ersten Schritt eine PCR mit Pfu-Polymerase zur Gewinnung der kodierenden Sequenz des Zielgens aus cDNA von HeLa-Zellen durchgeführt. Die dabei verwendeten Primer wurden *in silico* so entworfen, dass sie über ca. 20-25 Basen dem Anfang der kodierenden Sequenz entsprachen bzw. zum Ende der kodierenden Sequenz komplementär waren und je mit einem ca. 12 Basen langem Überhang versehen, in dem die für den Einbau in den Zielvektor benötigten Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthalten waren. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt über ein Agarose-Gel visualisiert und aus diesem extrahiert. Dann wurden sowohl der Zielvektor als auch das PCR-Produkt mittels der passenden Restriktionsenzyme verdaut, erneut aufgereinigt und schließlich mittels T₄-Ligase ligiert. Nach Transformation des Produkts in *E. coli* des Stamms Sure und Ausbringen auf selektionierendem Agar wurden einzelne Klone ausgesucht und der Erfolg der Ligation durch DNA-Sequenzierung (SRD – Scientific Research and Development GmbH, 61440 Oberursel) überprüft.

2.3.3 Punktmutation

Für die Untersuchung von Proteinen in *in vitro* Kinaseanalysen war es notwendig Serine oder Threonine innerhalb potentieller Phosphorylierungsmotive in Alanine zu mutieren, die durch Kinasen nicht mehr phosphoryliert werden können. Dies wurde durch Punktmutationen von DNA-Triplets innerhalb der kodierenden DNA-Sequenzen erreicht. Es wurden komplementär zu kodierendem und codogenem Strang DNA-Primer entworfen, die vor und hinter der zu mutierenden Stellen für ca. 15 Basen der Originalsequenz entsprachen und in der Mitte die zu erreichende Substitutionsmutation aufwiesen. Diese Primer wurden in einer PCR verwendet um mittels Pfu-Polymerase vollständige Kopien der ursprünglichen Wildtypvektoren zu erstellen, in die durch den Einbau des Primers die gewünschte Mutation integriert wurde. Nach Verdau des ursprünglichen, vom Spenderorganismus methylierten Vektors mittels DpnI wurde das Produkt der PCR in *E. coli* des Stammes Sure transformiert, als Vektormutante vermehrt und aufgereinigt [179]. Der Erfolg der Klonierung wurde durch DNA-Sequenzierung (SRD – Scientific Research and Development GmbH, 61440 Oberursel) überprüft.

2.3.4 Verwendete Plasmide

Für die Reportergerneanalysen (siehe Kapitel 2.9) wurden zahlreiche Plasmide verwendet: Als Reporter dienten zum einen das von Dr. Nadine Meindl im Rahmen ihrer Dissertation erzeugte Konstrukt tkLuc-REa23 [141], zum anderen das von Dr. Adriane Lechtken im Rahmen ihrer Dissertation erzeugte Konstrukt pGL3-Bmall [122].

Der Vektor tkLuc-REa23 wurde auf Basis eines von V. Giguere [73]) zur Verfügung gestellten Plasmids konstruiert, das die Sequenz des bevorzugt

ROR α 1&4 bindenden RORE Typ 2 (Sequenz: ATA ACT AGG TCA) nutzt um die Aktivität eines vor die Firefly-Luciferase-Sequenz des pGL3basic Vektors (Promega) klonierten Thymidinkinasepromotors zu steigern. tkLuc-REa23 unterscheidet sich vom ursprünglichen Konstrukt dadurch, dass es insgesamt 3 Kopien des RORE beinhaltet. Der Vektor pGL3-Bmall wurde durch Klonierung der Sequenz des *hBmall*-Promotors vor die Firefly-Luciferase des pGL3-basic gewonnen.

Als Kontrolle diente pRL-SV40 (Promega), das die Sequenz einer Renilla Luciferase unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors konstitutiv exprimiert. Die Expressionsvektoren für ROR α 1-4 (pSG5-ROR α 1-4) wurden aus von C. Carlberg (damals Kuopio, Finnland) zur Verfügung gestellten Expressionsvektoren in pSG5 kloniert [141], der Expressionsvektor für RevErb α (pSG5-RevErb α) durch Insertion der kodierenden Sequenz in pSG5, ebenso der Expressionsvektor für Calreticulin (pSG5-Calreticulin).

Der Expressionsvektor für CREB1 β (pSG5-CREB1 β) wurde von mir durch Insertion der aus HeLa-Zellen gewonnen kodierenden Sequenz in pSG5-leer unter Verwendung der Schnittstellen für EcoRI (3') und HindIII (5') erzeugt, der Expressionsvektor für PGC1 α (pCDNA4-PGC1 α) wurde, da eine Expression des Proteins in pSG5 und pCDNA3.1 fehlschlug, von addgene (www.addgene.org) bezogen [91]. Die Vektoren zur Expression konstitutiv aktiver Mutanten der CaMK-I, -II & -IV wurden freundlicherweise von A.R. Means [103] zur Verfügung gestellt.

Zur Etablierung stabiler Kockdowns (siehe Kapitel 2.10) von GAPDH und PGC1 α wurden auf Basis von Ambions (Applied Biosystems, Austin, Texas (USA)) p*Silencer*4.1-CMV neo short hairpin RNA (*shRNA*)-produzierende Vektoren erstellt. Für GAPDH wurde das von Ambion gelieferte *shRNA*-Konstrukt verwendet, für PGC1 α wurde das Konstrukt auf Basis der von Kawakami et al. [106] publizierten small interfering RNA (*siRNA*) erstellt. Beide Konstrukte wurden, wie auch die ebenfalls von Ambion zur Verfügung gestellte Negativkontrolle, nach Anweisung des Herstellers [7] in den linearisierten p*Silencer*4.1-CMV neo kloniert. Für die Bestimmung der Effizienz der Transfektionsmethode wurden die Zellen mit pEGFP-C2-Vektoren von Clontech transfiziert und mittels FACS-Analyse der Anteil EGFP-positiver, grün fluoreszierender Zellen bestimmt.

Für die Expression vollständiger, 6xHistidin gekoppelter ROR α 4- und RevErb α -Proteine in *E. coli* waren die kodierenden Sequenzen der Proteine in pET28a-Vektoren kloniert worden [122], für die Untersuchung der Phosphorylierung wurden sie wie oben beschrieben mutiert.

2.4 GEWINNUNG NUKLEÄRER EXTRAKTE

Nukleäre Extrakte, die unter anderem der Isolation nukleärer Bindungspartner für Melatonin dienten, wurden analog zu einem Protokoll hergestellt, das von Shapiro et al. [188] für HeLa-Zellen entwickelt worden war: Dabei wurden ca. 8×10^8 Zellen nach Waschen mit Phospho buffered saline (PBS) (pH = 7,4) pelletiert und in hypotonischem Puffer aufgequollen und mittels eines Dounce-Homogenisators die Zellwände zerstört. Durch Zugabe eines

saccharosehaltigen Puffers wurden die Zellkerne stabilisiert und durch Zentrifugation gesammelt. Das sich im Überstand der Zentrifugation befindende Zytosol wurde abgetrennt und die Zellkerne resuspendiert. Die unlöslichen Kernmembranen wurden durch erneute Zentrifugation abgetrennt und die löslichen Kernproteine in ein neues Gefäß überführt und mittels $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation aufkonzentriert.

2.5 ISOLATION NUKLEÄRER MELATONINBINDUNGSPARTNER

Für die Isolierung von Melatoninbindungspartnern in den nukleären Extrakten verwendete ich ein Protokoll, das sich an das Protokoll zur Coimmunopräzipitation von Adams und Ohh [3] anlehnt: Die an Melatonin (oder Melatoninderivate) gekoppelte Sepharose wurde in einer an die Zusammensetzung des Puffers der nukleären Extrakte angelehnten Variation des NET-N-Puffers (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 120 mM KCl; 0,75% Nonidet P-40; 1 µg/ml PMSF; 10 µg/ml STI; 10 µg/ml Leupeptin) zu 800 µg des nukleären Extrakts gegeben und über Nacht bei 4°C unter ständigem Umwenden inkubiert. Nach Sammeln der Sepharose mittels Zentrifugation wurde diese mit eben diesem Puffer gewaschen und schließlich mit SDS-Ladepuffer gekocht. Die freigesetzten Proteine wurden in SDS-Gelelektrophoresen aufgetrennt und weiteren Analysen zugeführt.

2.6 GEWINNUNG VON ROR α 4 UND REVERB α

Die beiden für diverse Versuche benötigten Proteine und deren Mutanten wurden nach einem Protokoll überexprimiert und aufgereinigt, das Dr. Adriane Lechtken während ihrer Dissertation entwickelt hatte [122, 125]. In Kürze: Die für die Proteine kodierenden Sequenzen wurden in pET28a (Novagen) kloniert, in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert und in 500ml LB Medium bei 37°C bis zu einer OD_{660} von 0,4-0,6 kultiviert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur die Translation der Proteine mittels IPTG ($c = 1 \mu\text{M}$) induziert und die Bakterien für 4 Stunden inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mittels Lysozym, DNase I, RNase A und Ultraschall vollständig lysiert und die als Einschlusskörperchen anfallenden Proteine mittels Zentrifugation gesammelt. Anschließend wurden die Einschlusskörperchen in Rückfaltepuffer mit 6 M Guanidinium-HCl gekocht und in mehreren Schritten mittels Dialyse gegen abnehmende Konzentrationen von Guanidinium-HCl und schließlich Arginin rückgefaltet. In einem letzten Dialyseschritt wurden die nativen Proteine in einen Lagerpuffer mit 50% Glycerol überführt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.7 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Zur Bestimmung der Konzentration der rückgefalteten Proteine wurden Proteinbestimmungen nach Bradford mit dem Protein Assay Dye Reagent Concentrate von BioRad in Triplikaten durchgeführt: 10 µl der Proteinlö-

sung wurden in einer durchsichtigen Mikrotiterplatte mit Wasser auf 100 µl verdünnt und mit 25 µl des Farbstoffkonzentrats gemischt. Die Absorption der entstehenden Blaufärbung wurde im Mikroplattenleser Infinite® M200 von Tecan bei 595nm bestimmt und über eine Eichgerade aus Albumin aus Rinderserum (BSA) die Proteinkonzentration berechnet [23, 32].

2.8 TRANSFEKTIONEN

Für die Durchführung der transienten Transfektionen wurden die Zellen in der durch Dr. Nadine Meindl als optimal bestimmten Konzentration (HeLa-Zellen: 40 000 Zellen, MCF-7-Zellen: 80 000 Zellen und 293-Zellen: 100 000 Zellen pro Vertiefung [141]) in 24-well-Platten ausgesät. 24 Stunden nach erfolgter Aussaat wurden die Zellen mit Calciumphosphat-DNA-Kristallen transfiziert. Dabei fand folgendes Protokoll Anwendung: In einem Gesamtvolumen von 450 µl wurden insgesamt 12,5 µg der zu transfizierenden Plasmide gemischt, mit 50 µl 2,5 M Calciumchloridlösung versetzt und tropfenweise über eine Minute in eine Vorlage von 500 µl HeBS-Puffer gegeben. Nach 5-sekündigem Vortexen wurde das Gemisch 1 Minute lang bei Raumtemperatur digeriert um die Ausbildung eines feinkristallinen DNA-Calciumphosphat-Niederschlags zu ermöglichen. Anschließend wurden in jede Vertiefung mit Zellen 40 µl der Suspension gegeben [109] und den Zellen für 16 Stunden im Zellinkubator ermöglicht, die DNA-Kristalle durch Endocytose aufzunehmen. Im Anschluss wurden überschüssige Kristalle mit dem Kulturmedium von den Zellen genommen und frisches Medium zugegeben.

2.9 REPORTERGENANALYSEN

Zur Durchführung von Reporteranalysen wurden 10 µg eines Plasmids mit Firefly-Luciferase als Reporter, 0,5 µg eines Kontrollvektors (pRL-SV40 von Promega: Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines SV40-Promotors) und insgesamt 2 µg verschiedener Expressionsplasmide nach oben genannter Methode in verschiedene Zellen transfiziert. 24 Stunden nach Durchführung des Medienwechsels wurde eine Messung der Aktivität der Luciferasen mittels DualGlow® Reagenz von Promega nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Lichtemission erfolgte an einem Infinite® M200 von Tecan, aus dem Quotienten der Luciferaseaktivitäten ergab sich der Wert der Relative Light Unit (RLU), bezogen auf die jeweilige (Leer-) Kontrolle der Wert der relativen Luciferaseaktivität.

2.10 ETABLIERUNG STABIL TRANSFIZIERTER ZELLINIEN

Die Erstellung stabil transfizierter Zelllinien wurde nach folgendem Protokoll unternommen: In einem ersten Schritt wurden HeLa-Zellen im 24-well Format ausgesät, nach Adhäsion mit steigenden Konzentrationen G418 (0-700 µg/ml) behandelt und das Medium 3x/Woche erneuert [7]. Die niedrigste Konzentration, bei der nach einer Woche massiver Zelltod eintrat, wur-

de als toxische G₄₁₈-Konzentration definiert. Anschließend wurden HeLa-Zellen im 24-well Format mit 500 ng p*Silencer*-Plasmid (Ambion) transfiziert und 24 h nach dem Abwaschen überschüssiger DNA-Kristalle trypsiniert und ins 96-well Format überführt. Nach Adhäsion der Zellen wurden diese mit der toxischen G₄₁₈-Konzentration behandelt und das Medium 3x/Woche erneuert (siehe auch [148, 180, 195]). Nach ca. 3 Wochen waren in einzelnen Vertiefungen Zellkolonien erkennbar, die unter ständigem Selektionsdruck vermehrt wurden und in denen die Effizienz der stabilen Transfektion durch qRT-PCR für das Zielgen ermittelt wurde. Klone mit der gewünschten Genexpression wurden unter Selektionsdruck für weitere Versuche kultiviert und eingefroren konserviert.

2.11 RNA-ISOLIERUNG

RNA-Isolierungen wurden mittels des eZNA RNA Mini Kit von Omega bio-tek nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden über UV-Spektroskopie am Nanophotometer Nanodrop (Implen, 81829 München) die Konzentration und über mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele die Integrität der RNA-Extrakte bestimmt.

2.12 cDNA-SYNTHESE

Nach Vermessung der Konzentration der RNA-Extrakte wurden die isolierten RNA-Spezies mittels des iScript cDNA-Synthesis Kits von BioRad nach Anweisung des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die erhaltenen Lösungen wurden am Nanophotometer Nanodrop photometrisch vermessen und anschließend auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Zur Untersuchung zellulärer Antisense-RNA-Produkte wurde die cDNA-Synthese mit spezifischen Primern und SuperScript™ II oder ThermoScript™ Reverser Transkriptase (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers bei Annealingtemperaturen von bis zu 65 °C durchgeführt.

2.13 qRT-PCR

Quantitative RT-PCRs wurden unter Verwendung von SYBR Green I (Invitrogen) und rekombinanter Taq-DNA-Polymerase (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 25 µl am BioRad iCycler durchgeführt. Temperaturen, Zeitschemata und Konzentrationen der verwendeten Substanzen wurden vor der Messung etabliert.

2.14 SDS-GELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophoresen wurden nach dem Protokoll von Laemmli [119] auf einem Mini Protean Elektrophorese System (BioRad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Die so aufgetrennten Proteine wurden für die weitere Analyse entweder mittels Essigsäure oder Trichlores-

sigsäure fixiert und nach Standardprotokollen mit Coomassie Brillantblau G-250 (AppliChem) oder Silber gefärbt oder aber unter Verwendung des BioRad Systems nass auf Nitrocellulose Membranen (Hibond-C Extra, Amersham Biosciences) geblottet. Nach Inkubation mit entsprechenden Antikörpern wurden diese Western Blots zur Detektion auf einem Odyssey Imaging System (LiCor Biosciences, Lincoln, Nebraska USA) gescannt.

2.15 IN VITRO KINASEANALYSEN

Zur Durchführung von *in vitro* Kinaseanalysen wurden Proben überexprimierter Proteine im jeweiligen Kinasepuffer mit der zu untersuchenden Kinase (ERK-2: human rekombinant, Biaffin (34132 Kassel); PKA-C α : human rekombinant, Cell Signaling (Danvers Massachusetts, USA)) gemischt, eine Stunde lang in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert und anschließend über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das erhaltene Gel wurde zwischen zwei Lagen Cellophan getrocknet und für 12-72 h zur Belichtung auf eine „Imaging Plate“ (Fujifilm) gelegt. Diese wird mittels eines FLA-3000 Phosphoimagers (Fujifilm) ausgelesen.

2.16 PEPTIDE MAPS

Für die Erstellung von zweidimensionalen Phosphopeptidkarten wurden die nach dem Protokoll für *in vitro* Kinaseanalysen phosphorylierten Proteine im SDS-Gel mit Coomassie Brillantblau G-250 gefärbt und die Bande ausgeschnitten. Nach Extraktion des Phosphoproteins wurde dieses mit Perameisensäure oxidiert und mittels Trypsin (Sequencing Grade, Promega) verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden auf eine cellulosebeschichtete DC-Platte (Merck) aufgebracht und in der ersten Dimension mittels eines Hunter Thin Layer Peptide Mapping Electrophoresis System (HTLE-7000, CBS Scientific Company Inc., [149]) in Puffer pH = 1,9 (50 ml Ameisensäure [88% m/v], 156 ml Eisessig, 1794 ml VE-Wasser) elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurde in der zweiten Dimension in Phosphochromatographiepuffer (750 ml n-Butanol, 500 ml Pyridin, 150 ml Eisessig, 600 ml VE-Wasser) eine Trennung über Dünnschichtchromatographie vorgenommen [66]. Die DC-Platten wurden nach Trocknen in Polyethylenfolie eingeschlagen und zur Belichtung ebenfalls auf eine „Imaging Plate“ gelegt. Diese wurde schließlich im FLA-3000 analysiert.

3.1 REGULATION DER EXPRESSION VON ROR α

Aus zahlreichen Versuchen in unserem Labor ist bekannt, dass die in verschiedenen Zellen detektierten Mengen an ROR α 4-Transkript verhältnismäßig gering sind. In PCR-Versuchen bedurfte es zur Detektion von ROR α -Amplicons verhältnismäßig hohe Zyklenzahlen [9] und ein Nachweis nativen Proteins im Western Blot gelang bisher nicht [122]. Auch die Regulation der Bildung der ROR α -Isoformen ist bisher noch ungeklärt. Daher lag es nahe, mögliche Einflüsse auf die Expression von ROR α zu untersuchen.

3.1.1 Regulation durch Antisensetranskripte

In den letzten Jahren enthüllten computergestützte Analysen der Daten diverser Sequenzierungsprojekte in verschiedenen eukaryotischen Systemen eine Fülle natürlicher Antisensetranskripte und deren Beteiligung an der Regulation der Gentranskription [128]. Daher scheint es möglich, dass Antisensetranskripte einen weitverbreiteten Regulationsmechanismus eukaryotischer Zellen darstellen könnten. Diese Mechanismen umfassen vor allem Störungen in der Transkription, RNA-Maskierung und weitere Folgen der Bildung doppelsträngiger RNAs: Störungen in der Transkription kommen vor allem dadurch zustande, dass die Transkription zweier überlappender Gene sterisch gehindert scheint. Dies konnte eindrucksvoll in einer Studie in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, als durch überlappende Anordnung der Gene für GAL7 und GAL10 eine Reduktion der Transkriptmenge durch eine Hemmung der Elongation im Vergleich zur Anordnung der Gene in getrennten Loci erreicht wurde [166]. RNA-Maskierung beschreibt die Ausbildung von DNA-Duplexen zwischen Sense- und Antisense-RNA und die daraus resultierende Maskierung regulatorischer Bereiche. Untersucht wurden solche Mechanismen unter anderem am Beispiel der Thyroidrezeptoren: TR α wird vom Gen *erbA α* abgelesen und durch alternatives Spleißen werden die beiden Isoformen TR α 1 und TR α 2 erzeugt. Durch den veränderten C-Terminus fehlt TR α 2 im Gegensatz zu TR α 1 eine Aktivierungsfunktion und die Möglichkeit zur Triiodthyronin-(T₃)-Bindung. TR α 2 zeigt daher eine dominant negative Funktion und wirkt der durch TR α 1 bewirkten Transkription thyroidabhängiger Gene entgegen. Somit ist das Verhältnis zwischen TR α 1 und TR α 2 ein bestimmender Faktor für die Transkriptmenge dieser TR-Responsegene. *RevErb α* wird vom dem *erbA α* -Gen gegenüberliegenden Strang kodiert und das 3'-Ende des Gens überlappt mit dem von TR α 2, nicht aber von TR α 1. Durch Bildung von Duplexen aus *RevErb α* -RNA und TR α -*hn*RNA wird die für die Bildung von TR α 2 notwendige Spleißstelle verdeckt und die Menge an TR α 2 zugunsten von TR α 1 verringert [85].

Antisense-Transkripte spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genen

Die Ausbildung doppelsträngiger RNAs ist weiterhin ein Signal, das in Eukaryoten mehrere Antworten provozieren kann. Eine Reaktion auf dieses Signal ist eine unspezifische, interferonvermittelte Stilllegung der gesamten Translation, die schließlich zur Apoptose betroffener Zellen führt. Weniger massive und wesentlich spezifischere Regulationswege sind die durch Dicer vermittelte RNA-Interferenz und die Modifikation durch ADAR [111]. Einerseits wird doppelsträngige RNA durch die RNase Dicer erkannt, gebunden und in Bruchstücke von 21-25bp geschnitten. Diese werden durch DNA-Helikasen in ihre Einzelstränge getrennt und auf den RISC-Komplex geladen. Bindung des RISC-Komplexes an RNA führt zu deren Spaltung und Abbau, wodurch die Gentranskription effektiv unterdrückt wird. Andererseits können doppelsträngige RNAs auch Ziel der ADARs werden, durch die Adenosin zu Inosin desaminiert werden kann, das von den meisten Enzymen wie Guanodin behandelt. Durch diese posttranskriptionelle Veränderung der Primärstruktur der RNA verändern ADARs die Bedeutung von Codons oder erzeugen neue Spleißstellen [14].

Natürliche Antisensetranskripte (NAT) sind RNAs, die teilweise komplementär zu anderen endogenen RNAs sind. Nach dem Ort ihrer Transkription unterscheidet man *cis*- und *trans*-NATs, *cis* bedeutet dabei die Transkription vom selben Genlocus, *trans* die Transkription an anderer Stelle des Genoms. *Trans*-NATs sind funktionell eng verwandt mit *mi*RNAs [33] und *sno*RNAs [110], die ihre Zielstrukturen ebenfalls durch eher ungenaue Basenpaarung erkennen. *Cis*-NATs hingegen sind vollständig komplementär zu ihren Zielstrukturen, da sie vom Gegenstrang desselben Genlocus abgelesen werden.

In silico Analysen zeigten die Anwesenheit von CYCSP38, des Cytochrom C somatischen Pseudogens 38 im Gegenstrang des ROR α -Gens. Auch wenn für dieses Pseudogen bisher noch keine Transkription gezeigt werden konnte, zeigte sich in den letzten Jahren vermehrt, dass Pseudogene wesentlich häufiger transkriptionell aktiv sind als vermutet [12]. Daher beschlossen wir die mögliche Beteiligung von Antisensetranskripten in der Regulation von ROR α näher zu untersuchen. Da außerdem gezeigt werden konnte, dass Antisense-RNAs einen bedeutenden Einfluss auf die Regulation der zirkadianen Uhr im Modellorganismus *Neurospora crassa* haben [114], könnte hier auch ein funktioneller Zusammenhang mit der humanen zirkadianen Uhr vorliegen.

Zur Identifizierung natürlicher Antisensetranskripte des ROR α -Gens wurde folgendes Protokoll entwickelt: Aus HeLa-Zellen isolierte Gesamt-*m*RNA wurde mit DNaseI von eventuellen DNA-Verunreinigungen befreit und über Agarosegele auf ihre Integrität überprüft. Anschließend wurde die reine *m*RNA mittels genspezifischer Primer in cDNA umgeschrieben. Die verwendeten Primer wurden analog zu den für normale cDNA-Synthesen verwendeten oligo-dT-Primern in einer Länge von 16-18 Basen konstruiert. Zur reversen Transkription des putativen Antisensetranskripts verwendete ich Primer, die an jene Bereiche der Antisense-RNA binden, die komplementär zu verschiedenen Exons des ROR α -Gens sind, genauer gesagt komplementär zu den Exons 1d (ROR α 4), 2b (α 2), 4, 6 und 10 (letztere liegen im konstanten Teil des ROR α). Als Kontrolle setzte ich auch die jeweils gegenläufigen Primer ein, über die reguläre Transkripte des ROR α -Gens erfasst werden können. Im

Der Gegenstrang des ROR α -Gens enthält das CYCSP38-Pseudogen, potentielle Quelle eines *cis*-NATs

Anschluss an die cDNA-Synthese wurden die Proben in PCRs mit Primern eingesetzt, die verschiedene Bereiche des ROR α überspannen und daher die Anwesenheit verschiedener Bereiche der Transkripte in den verschiedenen cDNAs belegen oder widerlegen sollten (12).

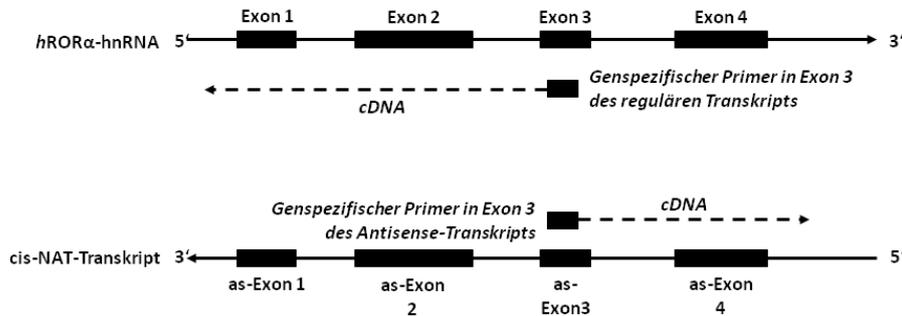


Abb. 12 – Identifizierung putativer ROR α -NATs

Durch Transkription vom Gegenstrang des ROR α -Gens entsteht eine *hn*RNA, die komplementär zu Teilen der *hn*RNA des ROR α ist. Ein Spleißen dieser *hn*RNA ist denkbar, aber nicht erwiesen. Genspezifische Primer ermöglichen nun die cDNA-Synthese verschiedener Bereiche der *hn*RNA, folgende PCRs ergeben nur dann ein Produkt, wenn das gesamte Amplicon Teil der cDNA ist.

Für die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription wurde abweichend von der in Kap. 2.12 beschriebenen Vorgehensweise der Verwendung des iScript cDNA-Synthese-Kits nach dem Verdau mit DNaseI SuperScript™ II Reverse Transkriptase von Invitrogen verwendet, da dieses Protokoll den Einsatz verschiedener genspezifischer Primer erlaubt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und der Ablauf der Reaktion folgte den Anweisungen des Herstellers: Genspezifische Primer wurden für 2 Minuten bei 42°C an die RNA angelagert, zufällige Hexamerprimer bei 25°C. Anschließend wurde die Elongation der cDNA 50 Minuten bei 42°C ermöglicht.

Überraschenderweise ergaben sich auch in den PCR-Ansätzen Produkte, in denen das Amplicon im Bereich 5' der cDNA gelegen war, also eigentlich keine Vorlage für die PCR-Reaktion vorhanden sein sollte. Ein beispielhaftes Versuchsergebnis zeigt Abb. 13. In allen Ansätzen wurde versucht, die gebildeten cDNAs durch eine PCR nachzuweisen, die eine Sequenz von 454 Basenpaaren amplifizierte. Dieses Amplicon erstreckte sich von Exon 1d des ROR α 4 bis zum Exon 6 des konstanten Teils. Zur Herstellung der cDNAs waren verschiedene genspezifische Primer verwendet worden. In *Probe A* war die cDNA-Synthese mittels eines Primers erfolgt, der komplementär zu Exon 4 regulärer Transkripte des ROR α -Gens ist. Dabei entstand eine cDNA, die sich von Exon 4 bis in die 5'-UTR des ROR α erstreckte. Da einer der PCR-Primer komplementär zu einer Sequenz in Exon 6 war, das in der cDNA nicht enthaltenen war, hätte hier kein Produkt entstehen sollen. Analog wäre auch für *Probe B* keine Amplifizierung zu erwarten gewesen: Hier war die cDNA-Synthese mittels eines Primers erfolgt, der komplementär zur Struktur des Exons 6 ist, wie dieses in einem putativen Antisense-Transkript zu finden wäre. Daraus resultierte eine cDNA, die von Exon 6 bis in die 3'-UTR des ROR α -Gens reichte und somit keine Bindungsstellen für die PCR-Primer enthielt.

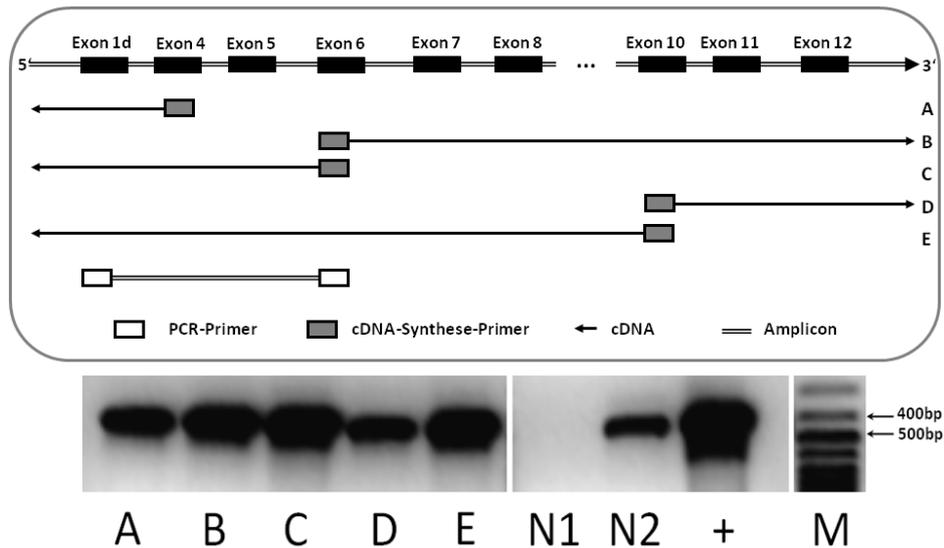


Abb. 13 – Detektion von ROR α -NATs (I)

Nach cDNA-Synthese bei 42 °C mit verschiedenen Primern wurde in allen Proben eine PCR durchgeführt, die eine 454 bp umfassende Teilsequenz der ROR α -cDNA amplifizierte (s. o., Details im Text); Auswertung der PCR mittels eines ethidiumbromidhaltigen Agarosegels (s. u.); M bezeichnet die Bahn des 100 bp DNA-Markers.

Im Gegensatz dazu umfasste die in den *Proben C & E* gebildete cDNA die für die Amplifizierung in der PCR notwendigen Sequenzbereiche, während in *Probe D* erneut kein PCR-Produkt hätte auftreten sollen. In *Probe N1* war die cDNA-Synthese ohne Zugabe von reverser Transkriptase zur RNA betrieben worden und es wurde folglich keine cDNA gebildet. Auch in *Probe N2*, in der die cDNA-Synthese zwar unter Zugabe von reverser Transkriptase, jedoch ohne Zugabe von Primern betrieben worden war, hätte keine cDNA-Synthese erfolgen sollen und folglich auch keine Amplifizierung in der PCR. *Probe +* bezeichnet eine Positivkontrolle, für die die cDNA-Synthese mit zufälligen Hexamerprimern betrieben wurde und die folglich Transkripte aller in der Zelle vorkommenden RNAs erfasste.

Aufgrund der Tatsache, dass in *Probe N1* keine amplifizierten DNA-Sequenzen gefunden werden konnten, können Verunreinigungen der RNA-Proben durch genomische oder andere DNA ausgeschlossen werden. Die Detektion von PCR-Produkten sowohl aus der ohne Primer synthetisierten cDNA als auch in den Ansätzen, in denen das Amplicon außerhalb der genspezifisch erzeugten cDNA lag, lässt auf einen unerwarteten Einfluss schließen. Zur Identifizierung der amplifizierten DNA-Sequenzen wurden diese aus dem Agarosegel extrahiert, gereinigt und sequenziert. Diese Sequenzierung zeigte in allen Fällen das für die PCR-Primer erwartete Produkt, womit auch eine unspezifische Bindung der PCR-Primer endgültig ausgeschlossen werden konnte.

Es sind verschiedene Begründungen für dieses Ergebnis denkbar: Oyama et.al beschrieben bereits 1988 [157] am Beispiel einer partiellen Ovalbumin-mRNA die Möglichkeit eines Primens der Reversen Transkriptase durch

stabile Sekundärstrukturen der RNA. Dabei bildete das 3'-OH-Ende der RNA eine Schleife und bildet einen kurzen doppelsträngigen RNA-Abschnitt, der als Angriffspunkt für die Reverse Transkriptase dienen konnte. Außerdem könnten durch den DNaseI-vermittelten Abbau genomischer DNA im Zuge der RNA-Isolierung kurze DNA-Bruchstücke erzeugt werden, die als zufällige Primer an die RNA binden und so einen Startpunkt für die reverse Transkriptase bilden. Letzteres ist aber als höchst unwahrscheinlich zu betrachten, da sich in den Agarosegelen zur Kontrolle der Integrität der RNA keine Hinweise auf derartige Primer zeigten. Kurze, in diesen Gelen leicht zu übersehende Bruchstücke müssten wie auch die zufälligen Hexamerprimer bei wesentlich niedrigeren Temperaturen an die RNA angelagert werden als die genspezifischen Primer, um eine cDNA-Synthese primen zu können.

Daher ist das sogenannte Selbst-Primen als wahrscheinlichste Erklärung für die von mir beobachteten Ergebnisse einzuschätzen und ich beschloss die RNA-Sekundärstrukturen durch Erhöhung der für die Anlagerung der Primer verwendeten Temperatur zu zerstören. Für diesen Zweck verwendete ich eine temperaturstabile Mutante der reversen Transkriptase und erhöhte Anlagerungs- und Elongationstemperatur bei der Verwendung der genspezifischen Primer schrittweise bis an das zulässige Maximum von 65°C, eine Temperatur die weit über der theoretischen Anlagerungstemperatur der genspezifischen Primer liegt. Außerdem ergänzte ich den Ansatz zur reversen Transkription durch 5% DMSO, das z.B. in Northern Blots erfolgreich zur Denaturierung von RNA eingesetzt wurde [35] und in unserem Labor zur Zerstörung von Sekundärstrukturen während der PCR eingesetzt wird.

Durch diese Maßnahmen gelang es, den Umfang des Selbst-Primens erheblich zu reduzieren, leider aber nicht vollkommen zu eliminieren. Beispielhaft lässt sich das in Abb. 14 erkennen. In diesem Fall wurde in allen Ansätzen

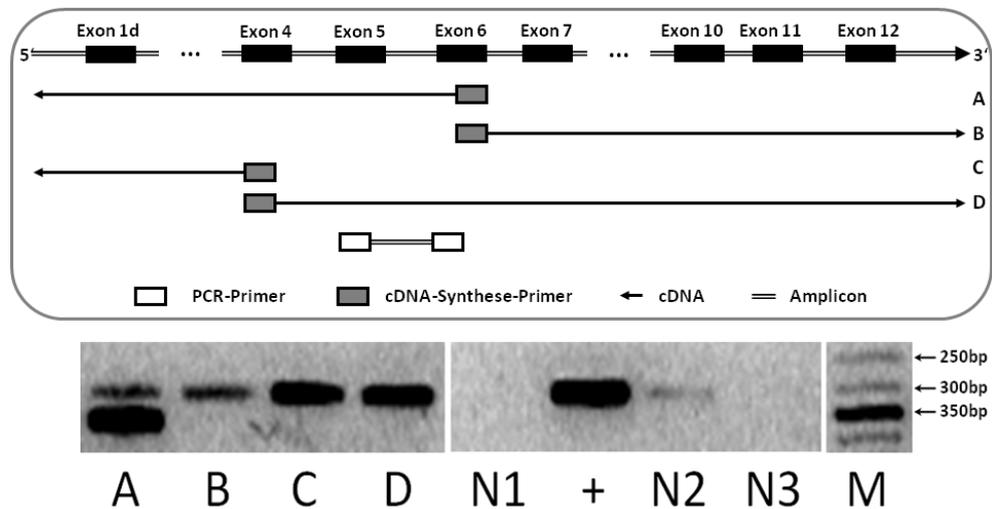


Abb. 14 – Detektion von ROR α -NATs (II)

Nach cDNA-Synthese bei 65 °C und Anwesenheit von 5% DMSO mit verschiedenen Primern wurde in allen Proben eine PCR durchgeführt, die eine 306 bp umfassende Teilsequenz der ROR α -cDNA amplifizierte (s. o., Details im Text); Auswertung der PCR mittels eines ethidiumbromidhaltigen Agarosegels (s. u.); M bezeichnet die Bahn des 50 bp DNA-Markers.

versucht, die mit verschiedenen genspezifischen Primern gebildeten cDNAs durch eine PCR nachzuweisen, deren amplifizierte Sequenz eine Länge von 304 Basenpaaren ergab und sich von Exon 5 bis Exon 6 des konstanten Teils des ROR α erstreckte. In den *Probe A & D* enthielt die potentielle cDNA beide Bindungsstellen für die PCR-Primer, weswegen eine Amplifikation in der PCR erwartet worden war. In den *Proben B & C* hingegen lagen beide PCR-Primer außerhalb der Sequenz der zu erwartenden cDNA, weswegen kein Produkt der PCR zu erwarten gewesen wäre. *Probe N1* war eine Leerkontrolle, in der die PCR ohne Zugabe einer Vorlage betrieben wurde, um Verunreinigungen des PCR-Mix auszuschließen. Für *Probe +* wurde erneut eine Positivkontrolle eingesetzt, die durch cDNA-Synthese unter Verwendung zufälliger Hexamere erzeugt worden war. In *Probe N2* wiederum war die cDNA-Synthese mit Thermoscript™ Reverser Transkriptase ohne die Zugabe von Primern betrieben worden und hätte in der PCR kein Produkt ergeben dürfen. Um DNA-Kontaminationen der isolierten RNA auszuschließen, war in *Probe N3* durch DNase I verdaute RNA direkt als Vorlage für die PCR eingesetzt worden.

Die durch Selbst-Primen entstandene Bande in *Probe N2* ist zwar schwächer als in den früheren Ansätzen, aber immer noch vorhanden. Sie erklärt zum einen die Produkte in den *Proben B & C*, in denen die amplifizierten DNA-Sequenzen nicht Teil der durch die genspezifischen Primern gebildeten cDNA waren. Zum anderen entwertet sie die Bande in *Probe D*, die normalerweise nur bei Anwesenheit eines Antisense-Transkripts zu erwartende gewesen wäre, so aber nicht vom durch Selbst-Primen entstandenen Produkt differenziert werden kann. Im ersten Moment rätselhaft war die kräftigere Bande in *Probe A*, die rund 50bp größer als das erwartete Amplicon ausfiel. Wie durch Sequenzierung gezeigt werden konnte, entstand sie durch die Nutzung des ursprünglich für die cDNA-Synthese verwendeten Primers als Teil der PCR-Reaktion in Konkurrenz zum eigentlichen Primerpaar. Auch die anderen PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel extrahiert, gereinigt und sequenziert. Ihre Sequenzen entsprachen wie schon in den vorangegangenen Versuchen den für die PCR-Primer erwarteten Amplicons reifer ROR α -mRNA.

Interessant ist, dass in allen Ansätzen nur PCR-Produkte detektiert wurden, die auf Grund ihrer Länge und Sequenz cDNAs entstammen müssen, die aus gespleißten mRNAs gebildet wurden. Für diese Beobachtung lassen sich mehrere Erklärungen finden: Die offensichtlichste ist sicherlich die Annahme, dass in keinem der Ansätze Antisense-Transkript vorhanden war und alle entsprechenden Banden durch das Selbst-Primen reifer ROR α -mRNA zustande kamen. Aber auch bei Anwesenheit eines Antisense-Transkripts gibt es verschiedene Erklärungen für die Beobachtungen: So ist ein Spleißen des Antisense-Transkriptes analog zu dem des regulären Transkriptes zwar unwahrscheinlich, aber nicht vollkommen auszuschließen. Außerdem würde die Amplifikation einer aus der nicht gespleißten Antisense-mRNA gebildeten cDNA in der PCR in Konkurrenz zu der Amplifikation der aus dem Selbst-Primen entstandenen cDNA stehen, wobei letztere aufgrund des kürzeren Amplicons deutlich bevorzugt würde. Daher könnte ein entsprechend längeres Amplicon des Antisense-Produktes unter der Nachweisgrenze blei-

ROR α -mRNA bildet stabile Sekundärstrukturen und fördert so die reverse Transkriptionsreaktion

ben. Aber auch wenn die Frage einer Regulation der ROR α -Expression über natürliche Antisensetranskripte durch diese Versuche nicht geklärt werden konnte, lieferten sie doch interessante Einblicke in die Struktur der ROR α -Transkripte und geben Anlass zu Spekulationen über deren Bedeutung *in vivo*.

3.1.2 Regulation durch Melatonin

2000 konnte Dr. Michael Wagner im Rahmen seiner Dissertation [205] zeigen, dass die Behandlung von U266-Zellen mit 100 nM Melatonin zu einer 8,4-fachen Steigerung der Expression von ROR α 4 führte, ohne dass der diese Induktion bewirkende Signalweg aufgeklärt werden konnte. Da Publikationen eine nukleäre Bindungsstelle für Melatonin beschrieben hatten [1], eine Studie, die ROR α 4 als nukleären Melatoninrezeptor beschreiben hatte, jedoch umstritten ist [17], beschlossen wir diese Untersuchungen erneut aufzugreifen und zu versuchen, Bindungspartner für immobilisiertes Melatonin zu identifizieren. Außerdem beschlossen wir zu untersuchen, ob auch die Expression von RevErb α durch Melatonin beeinflusst werden kann. Dafür sollten in einem ersten Schritt cDNAs aus unbehandelten und über 48 h mit 100 nM Melatonin behandelten U266-Zellen gewonnen werden und die Transkriptmengen untersucht werden. In einem zweiten Schritt sollten durch Moritz Schübler (Arbeitskreis Prof. Dr. Stark, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt) zwei verschiedene Melatonininderivate synthetisiert werden, um diese an Sepharose zu koppeln und damit in Extrakten von Zellnuklei Bindungspartner zu identifizieren.

Die Quantifizierung des Effektes war in der Originalarbeit durch semi-quantitative PCRs erfolgt. Daher war mein erstes Ziel, diese Quantifizierung mittels qRT-PCR zu wiederholen. Hierfür wurde spezielle Primer entworfen, die jeweils ungefähr 100 Basenpaare der kodierenden Sequenz der zu untersuchenden *mRNAs* amplifizierten: Bei β -Aktin wurde mittels der Primer b-Aktin-99bp-fw & b-Aktin-99bp-rv ein 99 bp langes Stück, bei RevErb α mittels der Primer RevErb-101bp-fw & RevErb-101bp-rv ein 101 bp langes Stück und bei ROR α mittels der Primer ROR α 4-101bp-fw & ROR α 4-101bp-rv ein ebenfalls 101 bp langes Stück vermehrt. Die Sequenzen der Primer finden sich in Tabelle 3 (siehe Appendix). Die Primer wurden mit ähnlichen Schmelztemperaturen entworfen, sodass sie in einer Konzentration von 1 μ M ohne unerwünschte Nebenprodukte im selben Puffersystem (200 μ M dNTP, 75 mM Tris-HCl (pH8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 1x SYBR green, 0,03 u/ μ l Taq-Polymerase) und qRT-PCR-Programm (45x 1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 2,5 min 72 °C) eingesetzt werden konnten.

Das Ergebnis ist in Abbildung 15 wiedergegeben und zeigt keine Reproduktion der Ergebnisse von Dr. Wagner. Da für dieses Ergebnis zahlreiche Gründe denkbar sind, insbesondere da Abweichungen in Details meines Versuchsaufbaus und dem Dr. Wagners nicht auszuschließen sind, stellte es keinen Grund dar, auf den zweiten Teil des Versuches zu verzichten. Hierfür synthetisierte Moritz Schübler die beiden Melatonininderivate ST 814 & ST 815, die gemäß den Anweisungen des Herstellers nach Aktivierung durch N-

Melatonin beeinflusst in meinen Versuchen die ROR α -Transkription in U266-Zellen nicht

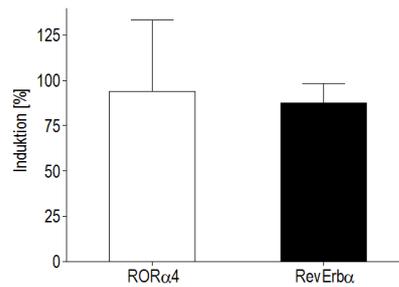


Abb. 15 – Expressionsregulation durch Melatonin

Einfluss 48-stündiger Behandlung von U266-Zellen mit 100 nM Melatonin auf die Transkriptmengen von ROR α und RevErb α . Normalisierung auf die Transkriptmengen der unbehandelten Zellen und β -Aktin als Haushaltsgen nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Induktionen ergeben sich als $\Delta\Delta$ Ct-Potenz von 2; Mittelwert & Standardfehler dreier unabhängiger qRT-PCRs.

(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide Hydrochlorid (EDAC) an EAH Sepharose 4B (GE Healthcare) gekoppelt wurden. Mit ST 814 wurde ein Melatoninderivat entworfen, bei dem die 5-Methoxygruppe des Melatonins verlängert und zur Verbindung zur Sepharose genutzt wurde, in ST 815 wurde die Methoxygruppe in Position 5 erhalten und die Verbindung zur Sepharose über eine in Position 6 eingeführte phenolische Funktion und eine daran gekoppelte Tetraoxadecengruppe geschlossen (siehe Abbildung 16). Als Negativkontrolle wurde in den folgenden Versuchen EAH Sepharose 4B verwendet, deren Bindungsstellen mit aktivierter Essigsäure abgesättigt worden waren. Als Proben dienten nukleäre Extrakte aus U266-Zellen (Pro-

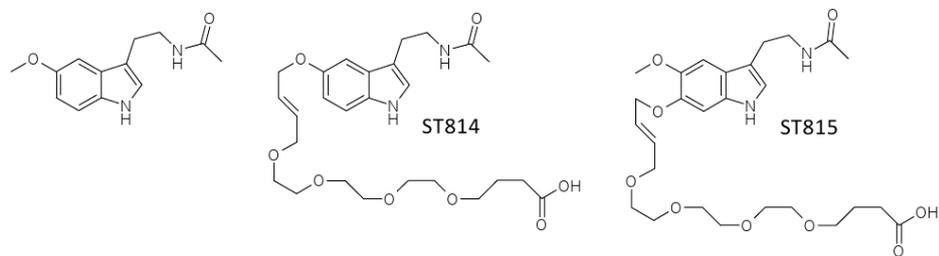


Abb. 16 – Melatoninderivate für Bindungsstudien

Strukturformeln von Melatonin (links) und der für Bindungsstudien an EAH Sepharose 4B gekoppelten Melatoninderivate (rechts: ST 814, ST 815).

tokoll siehe Kap. 2.4). Mit dem verwendeten Protokoll gelingt die Isolation nativer, *in vitro* transkriptionsaktiver Zellkernproteine, deren Konzentration laut Bradford-Proteinbestimmung ungefähr 3 mg/ml betrug. Die mittels der Sepharose aus den Proben isolierten Proteine (Protokoll siehe Kap. 2.5) wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie oder Silber gefärbt. Banden, die nur in der Bahn der Melatonin-gekoppelten Sepharose, nicht aber in der Kontrolle zu sehen waren, wurden aus dem Gel extrahiert, von Tobias Beckhaus (Arbeitskreis Prof. Dr. Karas, Johann Wolfgang Goethe-

Universität) mittels MALDI-TOF identifiziert und mit dem entsprechenden Gelextrakt der Kontrolle verglichen.

Insgesamt bleibt festzustellen, dass eine Vielzahl von Proteinen sowohl durch die Melatonin-gekoppelte Sepharose als auch durch die Kontrolle gebunden wurde, was die Auswertung der Gele verkomplizierte. Trotzdem wurden in mehreren Versuchen individuelle Proteinbanden extrahiert und in zwei Fällen das Protein erfolgreich identifiziert. In beiden Fällen erfolgte die Isolierung der Proteine aus dem nukleären Extrakt durch ST814. Zum einen handelte es sich dabei um humanes Nucleophosmin 1, Isoform 2 (Nucleolar Phosphoprotein B23.2/NPM1), identifiziert über Mascot mit einem Wahrscheinlichkeitswert von 53 und über eine MS-MS-Analyse mit einem Wahrscheinlichkeitswert von 430 bestätigt. Zum anderen handelt es sich um das humane heterogene nukleäre Ribonucleoprotein K (hnRNPK), das über Mascot mit einem Wahrscheinlichkeitswert von 86 identifiziert werden konnte.

Nucleophosmin ist ein Phosphoprotein das an zahlreichen Prozessen beteiligt ist, unter anderem an der Biogenese der Ribosomen in den Nucleoli und am Transport von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma [63]. Außerdem wurde beschrieben, dass Nucleophosmin als Histonchaperon fungiert [156] und dass es über Komplexe mit verschiedenen Riboproteinen zum Schutz der Zelle vor nucleolärem Stress beiträgt, identifiziert wurden beispielsweise Komplexe mit hnRNPU & hnRNPA [221]. Dieser Proteinfamilie wiederum entstammt auch das ebenfalls identifizierte hnRNPK, für das ebenfalls zahlreiche Funktionen beschrieben wurden. Diese umfassen die mechanistisch noch nicht aufgeklärte Beteiligung an der Gestaltung der Chromatinstruktur, die Beteiligung an der Transkription durch Interaktion mit TBP, die Beteiligung am Spleißen und die Beeinflussung der mRNA-Stabilität sowie der Translation [27].

Eine Interaktion zwischen hnRNPK und NPM1 scheint denkbar und eine Bindung des Komplexes an Melatonin könnte zu interessanten regulatorischen Konsequenzen führen. Ein direkter Zusammenhang dieser Proteine mit einer Regulation der Expression von ROR α oder eine Regulation der ROR α -Expression durch Melatonin konnte in meinen Versuchen jedoch nicht detektiert werden. Diese Zusammenhänge sind daher Gegenstand weiterer Untersuchungen.

3.2 REGULATION DER AKTIVITÄT VON ROR α & REVERB α

Wichtig für das Verständnis der im folgenden gezeigten Daten aus Reporteranalysen ist die Kenntnis der unterschiedlichen Aktivität der ROR α -Isoformen, wie sie bereits 1994 von Giguere beschrieben wurde [73]. In ihrer Dissertation nutzte Dr. Nadine Meindl [141] diese Erkenntnisse zum Design des auch in meiner Arbeit hauptsächlich verwendeten Reporterkonstrukts tkLuc-REa23. Dieses wurde, wie bereits in Kap. 2.3.4 beschrieben, als selektiv für ROR α 1 & 4 entworfen, die Isoformen ROR α 2 & 3 zeigen an diesem Response-Element keine nennenswerte Aktivität. Aus nicht näher geklärten Gründen zeigt ROR α 1 reproduzierbar eine höhere Aktivität am RE als

ROR α 4 (siehe Abb. 17). Um Unterschiede in der Beeinflussung der Aktivität

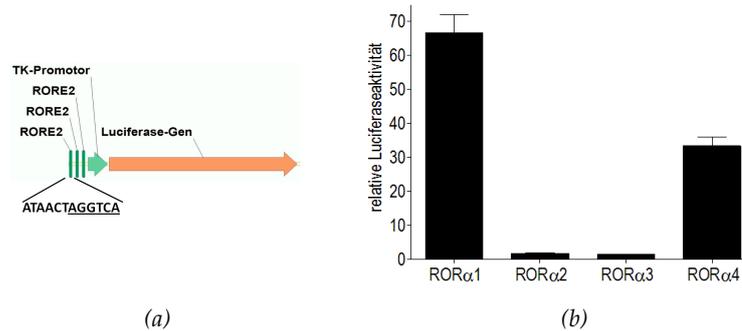


Abb. 17 – Aktivität der ROR α -Isoformen

(a) Aufbau des Reporters tkLuc-REa23; (b) Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23, 20 ng pRL-SV40, 4 ng pSG5-ROR α 1-4 & 76 ng pSG5-Leervektor in HeLa-Zellen. Mittelwert & Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen; Induktion relativ zu pSG5-Leervektor.

der beiden Isoformen aufzuzeigen werde ich daher in der Folge mitunter beide Basaleffekte auf denselben Wert normieren.

3.2.1 Veränderung der zellulären Lokalisation

Calreticulin ist ein calciumbindendes Chaperon des endoplasmatischen Retikulums, wo es an der korrekten Faltung einer Vielzahl von Proteinen beteiligt ist. Über seine Calciumbindungsfähigkeit ist es an der Aufrechterhaltung der Calciumspeicherfähigkeit des endoplasmatischen Retikulums beteiligt [68]. Außerdem konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass Calreticulin an ein KXFF(K/R)R-Motiv binden kann, das in der cytoplasmatischen Domäne aller Integrin α -Untereinheiten und in der DNA-bindenden Domäne der meisten nukleären Rezeptoren zu finden ist [37, 47]. Durch die Bindung von Calreticulin an die DBD [187] wird ein zwischen den Zinkfingern gelegenes Exportsignal aktiviert, es kommt zum Export der Rezeptoren aus dem Zellkern [24] und somit zu einer verminderten Transkription abhängiger Gene. Sowohl ROR α als auch RevErb α tragen dieses hochkonservierte Motiv, keiner der Rezeptoren wurde jedoch bisher auf seine Calreticulinsensitivität untersucht. Daher stellte sich uns die Frage, ob auch die Aktivitäten von ROR α und RevErb α durch Calreticulin beeinflusst werden können.

Eine Veröffentlichung von Macias et al. aus dem Jahr 2003 [135] legte außerdem die Vermutung nahe, dass Melatonin an dieser Regulation beteiligt sein könnte. In dieser Untersuchung war versucht worden Bindungspartner für Melatonin zu identifizieren. Der Versuchsaufbau ähnelte dabei dem von uns entworfenen: Melatonin wurde über eine in Position 6 eingeführte Hydroxylgruppe an Epoxy-aktivierte Sepharose 6B gekoppelt und mit dieser wurden Proteine aus nukleären Extrakten von Rattenleberzellen isoliert. Eines der isolierten Proteine wurde als Calreticulin identifiziert. In der Folge durchgeführte Bindungsstudien mit in *E.coli* exprimiertem GST-

Kaninchencalreticulin und 2-¹²⁵Iodomelatonin ergaben eine Dissoziationskonstante von $K_d = 1,08 \pm 0,2$ nM und für die maximale Bindungskapazität einen Wert von $B_{max} = 34$ fmol/mg Protein. Eine funktionelle Bedeutung der Melatoninbindung an Calreticulin konnte in diesen Versuchen jedoch nicht gezeigt werden.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Kombination von Melatonin und Calreticulin auf die Aktivität von ROR α_4 an seinem Response-Element hat, führten wir in Reporteranalysen eine Coexpression von ROR α_4 und Calreticulin durch und behandelten die Zellen mit 100nM Melatonin. Wie erwartet

Calreticulin hemmt die Aktivität von ROR α_4 durch Förderung nukleären Exports

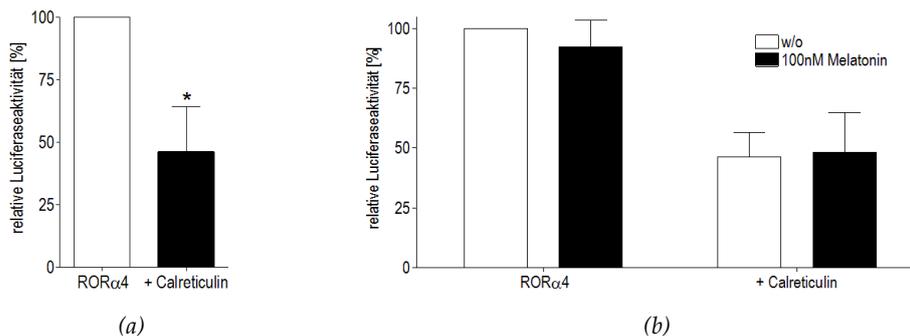


Abb. 18 – Regulation durch Melatonin & Calreticulin

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23, 20 ng pCMV-SEAP, 40 ng pSG5-ROR α_4 & 40 ng pSG5-Leervektor bzw. 40 ng pSG5-Calreticulin in HeLa-Zellen. Nach Medienwechsel Inkubation über 48 h mit DMSO bzw. 100 nM Melatonin. Mittelwert & Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen; Induktion der Firefly-Luciferase relativ zu pSG5-ROR α . * $p < 0,05$ im gepaarten T-Test.

reduziert die Coexpression von Calreticulin die Aktivität von ROR α_4 um rund 50% (siehe Abb. 18a). Ob auch RevErb α durch Calreticulin gebunden wird, ist in den Reporteranalysen nicht feststellbar, auch wenn eine Hemmung von RevErb α zu einer Aktivitätssteigerung von ROR α führt. Da aber ROR α ebenfalls durch Calreticulin gehemmt wird, überwiegt in der Summe diese Hemmung. Die Inkubation mit 100 nM Melatonin bewirkte keine Veränderung der Aktivität von ROR α_4 , weder allein noch in der Kombination mit einer Überexpression von Calreticulin (siehe Abb. 18b). Somit kann geschlossen werden, dass eine direkte Regulation der Aktivität von ROR α durch Melatonin erfolgt. Zum anderen kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die Bindung von Melatonin an Calreticulin dessen Aktivität als nukleäres Transportprotein nukleärer Rezeptoren beeinflusst.

3.2.2 ROR α_4 , RevErb α und ERK2

Im Zuge ihrer Dissertation in unserer Arbeitsgruppe konnte Dr. Adriane Lechtken [122] *in vitro* zeigen, dass humanes ROR α_4 durch ERK2 in der Scharnierdomäne an Threonin 128 phosphoryliert werden kann. Bedauerlicherweise war es unter unseren Versuchsbedingungen nicht möglich, die Funktion dieser Phosphorylierung aufzuzeigen, da sich ROR α_4 -Mutanten

in denen Threonin 128 in Alanin oder in (aufgrund der Ladung) phosphomimetische Glutamin- bzw. Asparaginsäure mutiert wurde, in ihrer Funktion nicht von der des Wildtyps unterschieden. Eines meiner Ziele war daher, die Versuchsbedingungen der Reporteranalysen für die Analytik von Phosphorylierungseinflüssen weiter zu verfeinern.

3.2.2.1 Optimierung der Reporteranalysen

Eine aufgrund ihrer physiologischen Bedeutung interessante Positivkontrolle für den Nachweis der Effekte von Proteinphosphorylierungen in Reporteranalysen stellt die Phosphorylierung von RevErb α durch GSK 3 β dar, die im Jahr 2006 von der Gruppe um Mitchell A. Lazar publiziert worden war [223]. Sie konnten zeigen, dass RevErb α direktes Ziel einer Phosphorylierung durch GSK3 β an den Serinen 55 & 59 ist. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Stabilisierung des Proteins, eine Hemmung der GSK 3 β durch 20 mM LiCl führt zu einem Verlust der Phosphorylierung und nachgeschaltet zur Ubiquitylierung und zum Abbau von RevErb α durch das Proteasom. Da RevErb α sowohl *in vivo* als auch unter den Bedingungen der Reporteranalysen die ROR α -vermittelte Gentranskription antagonisiert, sollte eine Senkung der zellulären RevErb α -Spiegels eine Steigerung der Aktivität von ROR α bewirken, ein Effekt der in obiger Arbeit auch gezeigt werden konnte.

Eine für indirekte Auswirkungen einer Kinaseaktivierung relevante Positivkontrolle findet sich in einer Veröffentlichung von Kane & Means aus dem Jahr 2000 [103]. Sie konnten zeigen, dass die Überexpression der Calcium/-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase IV (CaMKIV) die Aktivität von ROR α am RORE deutlich verstärkt, ohne dass dabei eine direkte Phosphorylierung von ROR α gezeigt werden konnte oder ein für die Vermittlung des Effekts verantwortlicher Signalweg bzw. Cofaktor identifiziert wurde.

Der Versuch, den Effekt der Hemmung von GSK3 β unter den von Dr. Lechtken verwendeten Bedingungen der Reporteranalysen nachzustellen, gelang erwartungsgemäß nur eingeschränkt: Zwar zeigte sich eine signifikante Steigerung der Aktivität von ROR α am Reporter, jedoch waren die Ergebnisse stark schwankend, nur bei hohen Fallzahlen signifikant und die Induktion mit rund 50% nur schwach ausgeprägt (siehe Abb. 19). Zur Verfeinerung der Versuchsbedingungen wurden verschiedene Konzentrationen an Vektoren, verschiedene Zeitabstände zwischen dem Wechsel des Transfektionsmediums und der Messung sowie verschiedene Inkubationszeiträume evaluiert. Es zeigte sich, dass die Reduktion der Menge an transfizierten Expressionsvektoren von 40 ng auf 4 ng pro Vektor und pro Vertiefung (unter Erhalt der maximalen Gesamtmenge von 80 ng) bei gleichzeitiger Reduktion der Zeit zwischen Wechsel des Transfektionsmediums und Messung der Luciferaseaktivität von 48 h auf 24 h zu deutlich besser auswertbaren Ergebnissen führte. Die Inkubation mit Inhibitoren wurde aufgrund der meist geringen Halbwertszeit der Inhibitoren im Zellmedium 14 h vor der Messung begonnen, eine weitere Verkürzung dieses Zeitraums verbot sich aufgrund der Halbwertszeit der verwendeten Luciferasen von ungefähr 3 Stunden [6].

Um für den ROR α – RevErb α Signalweg selektive Effekte von solchen unterscheiden zu können, die ohne Beteiligung der ROR-Response Elemente

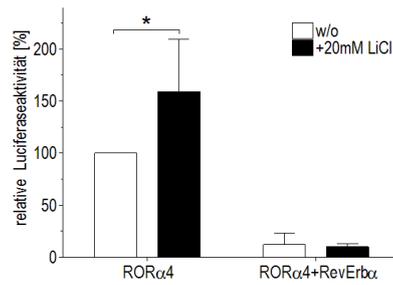


Abb. 19 – Regulation durch GSK 3 β

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23, 20 ng pCMV-SEAP, 4 ng pCDNA3-Leervektor, 38 ng pSG5-ROR α 4 & 38 ng pSG5-Leervektor bzw. 38 ng pSG5-RevErb α in HeLa-Zellen. Messung der Induktion der Firefly-Luciferase 48 h nach Medienwechsel, Wiedergabe relativ zu pSG5-ROR α . Mittelwert & Standardabweichung aus 8 unabhängigen Versuchen. *p<0,05 im gepaarten T-Test.

durch andere Teile des Promotors vermittelt werden, wurde eine Negativkontrolle etabliert. Diese bestand in einem tkLuc-Konstrukt, aus dem durch Dr. Bernd Sorg mittels Selbstligation die RORE eliminiert worden waren. Die Funktionalität dieses Ansatzes konnte dadurch gezeigt werden, dass die Kotransfektion von pSG5-ROR α mit tkLuc-w/o-RORE im Gegensatz zur Kotransfektion mit tkLuc-REa23 zu keiner Erhöhung der Luciferaseaktivität führte (siehe Abb. 20). Mittels dieser Veränderungen ließ sich eine deutliche

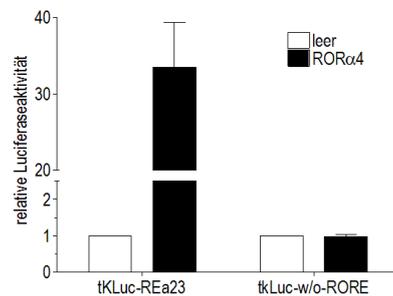


Abb. 20 – Negativkontrolle für Reporteranalysen

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23 bzw. tkLuc-w/o-RORE, 20 ng pCMV-SEAP, 76 ng pSG5-Leervektor & 4 ng pSG5-ROR α 4 in HeLa-Zellen. Messung der Induktion der Firefly-Luciferase 24 h nach Medienwechsel, Wiedergabe relativ zu pSG5-Leervektor. Mittelwert & Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen.

Steigerung des Effektes der Hemmung der GSK3 β durch LiCl erzielen und gleichzeitig zeigen, dass dieser Effekt in der Hauptsache über die RORE, also über ROR α und RevErb α vermittelt wird (siehe Abb. 21). Die Tatsache, dass auch die Überexpression von ROR α keine Verstärkung des relativen Effektes der GSK 3 β -Hemmung bewirkt, belegt auch die Feststellung, dass diese einzig durch Abbau endogenen RevErb α s eine Enthemmung der ROR α vermittelten Promotoraktivierung bewirkt. Leider gelang die Reproduktion mit einem zweiten Hemmstoff der GSK 3 β , 1-Azakenpaullon [1 μ M] [118],

nicht voll befriedigend, da die Hemmwirkung zwar signifikant, aber nicht sonderlich ausgeprägt war (siehe Abb. 21). Grund dafür könnte ein Abbau des Inhibitors sein, dessen Struktur (siehe Abb. 22) partiell den Benzodiazepinen ähnelt und einem ähnlichen oxidativen Metabolismus (an C-7) unterliegen könnte. Auch der RORE-abhängige, stimulierende Effekt der CaMKIV konnte

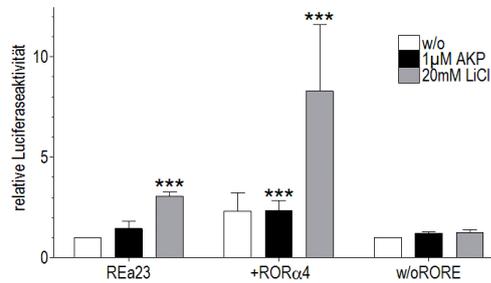


Abb. 21 – Regulation durch GSK 3β II

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23 bzw. tkLuc-w/o-RORE, 20 ng pRL-SV40 und je nach Angabe 4 ng pSG5-RORα4 in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Inkubation mit 1 μM 1-Azakenpaullon oder 20 mM LiCl. Mittelwert & Standardabweichung aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen. ***p<0,001 im gepaarten T-Test.

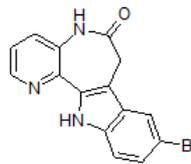


Abb. 22 – Struktur von 1-Azakenpaullon

in meinen Versuchen voll bestätigt werden (siehe Abb. 23). Unter den verbesserten Versuchsbedingungen zeigte sich eine Steigerung der RORα4-Aktivität an tkLuc-REa23 durch die Coexpression von CaMKIV um das ungefähr 4,5-fache, während die Luciferaseaktivität des Reporterkonstrukts ohne RORE unverändert blieb.

3.2.2.2 ERK2 und RORα4

Die Testung der Beeinflussung der Aktivität von RORα4 durch die Aktivität von ERK2 unter diesen verbesserten Bedingungen ergab interessante Ergebnisse. In den Untersuchungen der ERK-2-vermittelten Phosphorylierung von RORα4 konnten wir zeigen, dass durch Inkubation mit PMA die Aktivität von RORα4 am Response-Element vermindert wird und die dadurch bewirkte Phosphorylierung an Threonin 128 durch Inkubation mit U0126, einem selektiven Inhibitor von MEK1/2, vollständig aufhebbar und auf Aktivierung der ERK2 zurückzuführen ist [123]. Allerdings beeinflusste eine Mutation des Threonins 128 nach Alanin das Verhalten von RORα unter Einfluss von PMA oder U0126 nicht. Meine Ergebnisse unter den verbesserten Versuchsbedingungen zeigen ebenfalls, dass die Mutation der Phosphorylierungsstelle die Beeinflussbarkeit durch PMA und U0126 nicht verändert,

Darstellung der
Einflüsse von
GSK 3β und
CaMKIV in
Reportergenanalysen
möglich

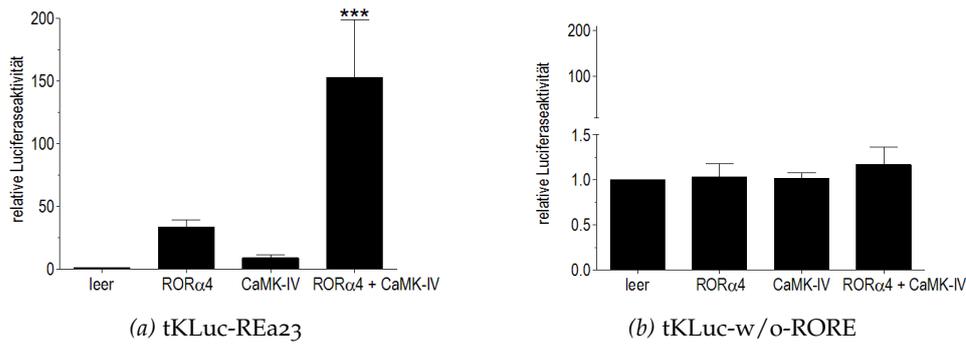


Abb. 23 – Regulation durch CaMKIV

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23 bzw. tkLuc-w/o-RORE, 20 ng pRL-SV40 und je nach Angabe 4 ng pSG5-ROR α 4 oder 4 ng pSG5-CaMKIV in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Mittelwert & Standardabweichung aus mindestens 5 unabhängigen Versuchen. ***p<0,001 im gepaarten T-Test.

deren Effekte also nicht durch die Phosphorylierung von ROR α allein erklärbar sind. Jedoch zeigte sich unter den veränderten Versuchsbedingungen eine von der Anwesenheit der RORE im Promotor abhängige Steigerung der Aktivität von ROR α (siehe Abb. 24). Offensichtlich liegen hier äußerst komplexe, vermutlich in der relativ unselektiven Wirkung des PMA begründete Mechanismen vor. Letztlich gelang es jedoch auch durch die Optimierung

Von der direkten Phosphorylierung durch ERK2 unabhängige Steigerung der ROR α -Aktivität durch PMA

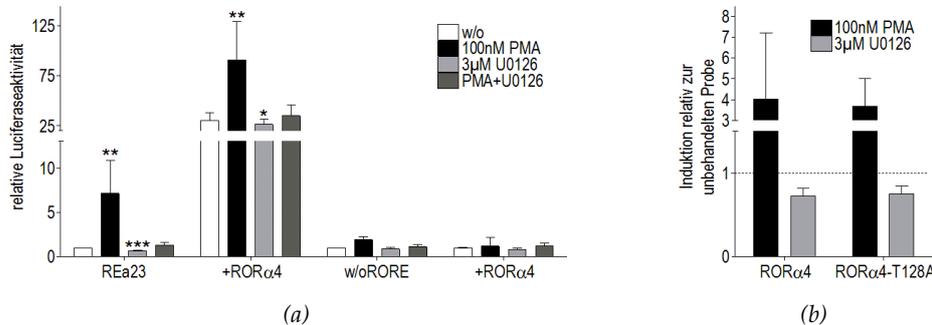


Abb. 24 – Regulation durch ERK2

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23 bzw. tkLuc-w/o-RORE, 20 ng pRL-SV40 und je nach Angabe 4 ng pSG5-ROR α 4-WT oder -T128A in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. (a) Untersuchung der Selektivität der Behandlung mit 100 nM PMA & 3 μ M U0126 (b) Vergleich der Behandlung von ROR α 4-Wildtyp und -T128A. Wiedergabe der Werte als Mittelwert & Standardabweichung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 im gepaarten T-Test.

der Versuchsbedingungen nicht, den Effekt einer ROR α -Phosphorylierung an Threonin 128 darzustellen. Dennoch wurden die für die Darstellung der Effekte von GSK 3 β und CaMKIV optimierten Versuchsbedingungen in der Folge als Standardbedingungen für Reporteranalysen verwendet.

3.2.2.3 *ERK2 und RevErb α*

Im Rahmen der Untersuchungen der Phosphorylierung von ROR α 4 durch ERK2 lag es nahe ebenfalls zu untersuchen, ob auch RevErb α durch ERK2 phosphoryliert werden kann. Da Dr. Adriane Lechtken und ich die Ausgangsversuche zu dieser Frage gemeinsam durchgeführt hatten, wurde ein erstes Ergebnis bereits im Rahmen ihrer Dissertation veröffentlicht [122]. Es konnte dabei in *in vitro* Kinaseanalysen gezeigt werden, dass auch in *E. coli* überexprimiertes, nach dem für ROR α 4 etablierten Protokoll [125] rückgefaltetes und auf seine Fähigkeit zur DNA-Bindung untersuchtes RevErb α durch ERK2 phosphoryliert werden kann. Wir beschlossen daher in einem ähnlichen Ansatz wie bei der Untersuchung von ROR α 4 auch die Phosphorylierungsstelle des RevErb α zu identifizieren und zu charakterisieren.

Phosphorylierungen durch ERK-2 erfolgen innerhalb des Konsensus-Motivs der MAP-Kinasen Pro-X-Ser/Thr-Pro an Serin oder Threonin [215], wobei auch beschrieben wurde, dass bereits die letzten beiden Aminosäuren dieser Sequenz als Minimalmotiv für die Phosphorylierung ausreichen können. Eine *in silico* Analyse der Primärstruktur des RevErb α enthüllte die Anwesenheit von insgesamt 18 potentiellen Phosphorylierungsmotiven, von denen die beiden um Serin 55 und Serin 278 gelegenen Motive dem Konsensus entsprachen und die restlichen 16 dem Minimalmotiv. Mittels Mutagenese-PCRs erzeugte ich ausgehend vom für die Überexpression und Rückfaltung des Proteins verwendeten Vektorkonstrukt pET28a-RevErb α alle 18 Mutanten, in denen je das Serin/Threonin des Phosphorylierungsmotivs durch Alanin ersetzt wurde. Bei der in der *in vitro* Kinaseanalyse erfolgenden Inkubation mit humaner rekombinanter ERK-2 (Biaffin GmbH & Co. KG) und radioaktiv markiertem ATP sollte die Mutation der im Wildtyp-Protein phosphorylierten Aminosäure zu einem Ausbleiben des radioaktiven Signals führen. Überraschend für uns konnten jedoch sämtliche 18 mutierten Proteine weiterhin durch ERK-2 phosphoryliert werden (siehe Abb. 25). Zur Aufklärung dieses Ergebnisses versuchte ich durch die Erstellung einer

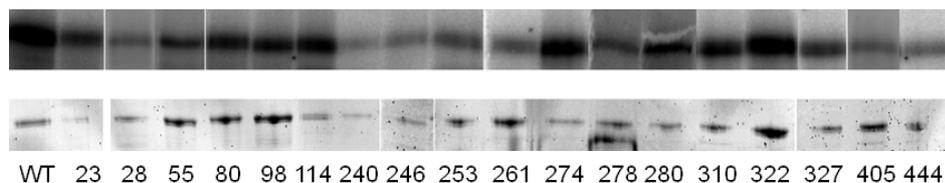


Abb. 25 – IVKA der RevErb α -Einzelmutanten

In vitro-Kinaseanalysen der RevErb α -Einzelmutanten mit ERK2 (oben) und Expressionskontrollen mittels Coomassie gefärbter SDS-Polyacrylamidgele (unten).

Phosphopeptidkarte, einer sogenannten (Phospho-)Peptide Map (siehe Kap. 2.16), herauszufinden an wie vielen der Motive RevErb α durch ERK2 phosphoryliert werden kann. Interessanterweise konnte ich nach Elektrophorese und dünnschichtchromatographischer Entwicklung in zwei Dimensionen nur einen Phosphopeptidpunkt detektieren (siehe Abb. 26). Da die Auswertung der 18 Einzelmutationen die Anwesenheit nur einer Phosphorylierungsstelle

ausschließt, kann dies entweder bedeuten, dass hier zwei in Ladung, Lipophilie und Struktur sehr ähnliche tryptische Peptide übereinander detektiert werden oder dass mehrere Phosphorylierungsstellen auf demselben tryptischen Peptid liegen. Eine *in silico* Analyse des tryptischen Verdauens von

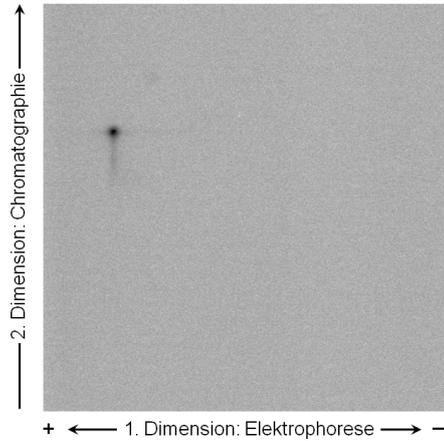


Abb. 26 – Peptide Map von ERK-2-phosphoryliertem RevErb α
 Tryptisch verdautes, durch ERK-2 phosphoryliertes RevErb α zeigte in einer Peptide Map (Durchführung siehe Kap. 2.16 einen einzelnen Phosphopeptidpunkt.

RevErb α mittels des Peptide Cutter Programms auf dem ExPASy-Server [65] ergab, dass letzteres in der Tat der Fall sein könnte. Selbst bei 100%igem Verlauf des tryptischen Verdauens finden sich jeweils mehrere der potentiell phosphorylierten Serine oder Threonine auf demselben Peptid. Genauer gesagt befinden sich die potentiell phosphorylierten Aminosäuren an Position 28 & 55, an 80 & 98, an 240, 246, 253, 261 & 274, an 278 & 280 sowie an 310, 322 & 327 auf je einem Peptid (s. Abb. 27). Eine Analyse all dieser Kombi-

Phosphorylierung von RevErb α durch ERK-2 an mehreren Stellen des Proteins

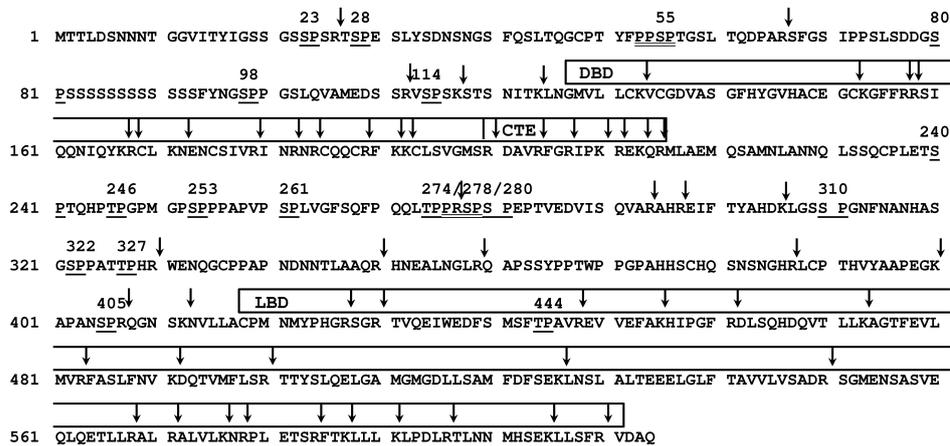


Abb. 27 – Analyse tryptischer RevErb α -Phosphopeptide
In silico-berechnete Phosphorylierungsmotive für ERK2 sind in der Sequenz durch Unterstreichung, Idealmotive durch doppelte Unterstreichung gekennzeichnet, die Schnittstellen des Trypsins [65] durch Pfeile. Domänenkennzeichnung nach NP_068370.1.

nationen als Zwei- bis Fünffachmutanten schien wenig erfolgsversprechend,

nicht zuletzt da jede Mutation potentiell die Struktur ganzer Proteinbereiche verändert. Daher wurde ein Ansatz gesucht, der eine exakte Quantifizierung der Phosphorylierungsintensität ermöglicht. Eine Möglichkeit schien die Kombination eines quantitativen Western Blots mit der *in vitro* Kinaseanalyse zu sein. Durch exakte Einstellung der eingesetzten Proteinmengen sollte gezeigt werden, ob die Mutation einer der an der Phosphorylierung beteiligten Aminosäuren zu einer Abnahme des Phosphorylierungssignals führt.

Im ersten Schritt wurden die Intensitäten der rekombinanten Proteinbanden im Western Blot vermessen und ins Verhältnis zur Intensität der Bande des Wildtyp-Proteins gesetzt. So ergaben sich Volumenfaktoren zur Ermittlung äquivalenter Proteinmengen, die dann im zweiten Schritt in den *in vitro* Kinaseanalysen eingesetzt werden sollten. Bedingt durch Unterschiede in der Effizienz der Aufreinigung der Proteinproben umspannte die Ausgangskonzentration der verschiedenen Proteinmutanten jedoch einen Bereich von mehr als einer Zehnerpotenz: Eine Quantifizierung mit der relativ unzuverlässigen Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kap. 2.7) ergab Proteinkonzentrationen von 40–400 µg/ml Proteinlösung, was sich in den Ergebnissen des Western Blots bestätigte. Aufgrund der Beschränkung des Probenvolumens auf das Fassungsvermögen einer Tasche der in den *in vitro* Kinaseanalysen eingesetzten Gele (abzüglich der Volumina für Kinasepuffer, Kinase, ATP und diverse Inhibitoren) ergaben sich für die Analytik relativ niedrige maximale Proteinmengen von ca. 300 pg. Auch wenn der Nachweis eines phosphorylierten Proteins in diesen Mengen relativ problemlos möglich ist, zeigte eine Verdünnungsreihe mit phosphoryliertem RevErb α , dass aufgrund der Hintergrundstrahlung der zur Auftrennung der Proteinproben verwendeten Gele eine quantitative Auswertung erst oberhalb von ungefähr 1 ng möglich ist (siehe Abb. 28), eine Menge die leider nicht für jede der Proteinmutanten erreichbar ist. Ergänzt wird diese Problematik durch einen Mangel an Robustheit und Präzision des Western Blot Systems für RevErb α und die daraus resultierenden großen Ergebnisschwankungen in verschiedenen Konzentrationsbereichen. Somit konnte auch mittels dieses Ansatzes die Bestimmung

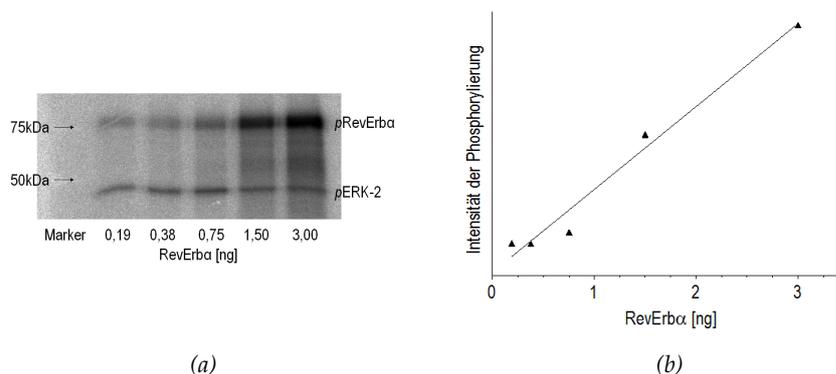


Abb. 28 – RevErb α -Phosphorylierung durch ERK2

Inkubation steigender Mengen rekombinanten RevErb α -Wildtypproteins mit je 14 mU ERK-2; (a) Auswertung der Bandenintensität über den Phosphoimager und Auftrag gegen die Proteinmenge. (b)

der genauen Anzahl und Lage der durch ERK-2 phosphorylierten Aminosäuren der Primärstruktur des RevErb α nicht erfolgen. Auch ein Versuch, die Phosphorylierungsstellen durch Analyse des Phosphoproteins mittels MALDI-TOF-MS zu identifizieren, führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Ein Großteil der potentiellen Phosphorylierungsstellen wurde durch die in der Massenspektrometrie detektierten Peptide nicht abgedeckt. Die durch die gleiche Kinase erfolgende Phosphorylierung von ROR α und RevErb α verleitet zu interessanten Spekulationen. Da sich jedoch aus den vorangegangenen Versuchen keine Hinweise zur Funktion der ERK-2-vermittelten Phosphorylierung von ROR α und RevErb α ergeben hatten, wurde auf eine weitere Verfeinerung der massenspektrometrischen Untersuchung verzichtet. Dies zu versuchen sollte erneut ins Auge gefasst werden, wenn weitere Untersuchungen eindeutige Hinweise auf eine physiologische Bedeutung dieser theoretisch sehr interessanten Phosphorylierung liefern.

3.2.3 Auswirkungen des zellulären cAMP-Spiegels

Bereits Dr. Michael Wagner [205] und Dr. Nadine Meindl [141] konnten im Rahmen ihrer Dissertationen zeigen, dass eine Inkubation mit Dibutyl-cyclo-Adenosinmonophosphat (dBcAMP) zu einer Induktion des ROR α -Promotors und einer Steigerung der Menge an ROR α -mRNA führt. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass ROR $\alpha^{sg/sg}$ -Mäuse unter anderem Störungen des Lipidstoffwechsels zeigen, die sich durch erniedrigte Triglyceridspiegel und erniedrigte Konzentrationen freier Fettsäuren im Blut auszeichnen [95, 120]. Ein wichtiger Second Messenger in der Regulation des Glucose- und Fettstoffwechsels ist cAMP, das über verschiedene Signaltransduktionswege systemische Glucosespiegel mit der Regulation der Lipolyse und nachfolgend der β -Oxidation von Fettsäuren zur Energiegewinnung verknüpft. Wir diskutierten angesichts dieser Befunde die Frage, ob dBcAMP neben seiner Beeinflussung der Transkription von ROR α auch die Aktivität bereits gebildeten ROR α -Proteins beeinflussen könnte.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden erneut Reporteranalysen herangezogen. Nach Transfektion der Zellen mit ROR α_4 nach dem neuen Standardprotokoll wurden die Zellen beginnend 10 Stunden nach dem Wechsel des Transfektionsmediums für 14 Stunden mit 3 mM dBcAMP inkubiert und anschließend die Aktivität der Luciferase gemessen. Dabei ergab sich, in Abhängigkeit von der Koftransfektion von ROR α und der Anwesenheit von ROR-Response-Elementen, eine ausgeprägte, durch dBcAMP bewirkte Aktivierung des Reportergens. Es zeigte sich auch, dass die Aktivierung unabhängig von der ROR α -Isoform ist, da auch eine Mutante mit fehlender, die Isoformen definierender, A/B-Domäne dBcAMP sensitiv war (siehe Abb. 29). Die naheliegende Frage war nun, über welchen Mechanismus die Aktivierung von ROR α erfolgt. In den Fokus unseres Interesses rückten dabei einige Koaktivatoren, namentlich CREB und PGC-1 α , über die eine Verknüpfung des zellulären cAMP-Spiegels mit der Aktivität von ROR α erfolgen könnte.

Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels führt zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivität von ROR α

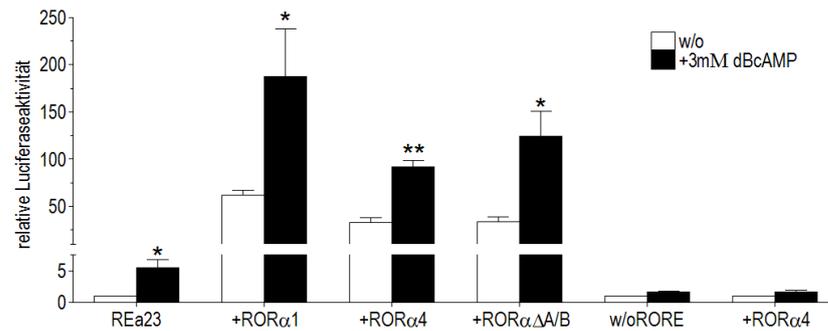


Abb. 29 – Regulation durch dBcAMP

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23 bzw. tkLuc-w/o-RORE, 20 ng pRL-SV40 und je 4 ng der angegebenen pSG5-ROR α Isoform in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Luciferase-Aktivität relativ zu pSG5-Leervektor. Wiedergabe der Werte als Mittelwert & Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im gepaarten T-Test.

3.2.3.1 ROR α und CREB

Unser erster Gedanke bezüglich des für die Vermittlung des Effekts von dBcAMP verantwortlichen coregulatorischen Proteins galt dem Cyclo-AMP-Response-Element bindenden Protein. CREB ist eines der ersten identifizierten Ziele des cAMP-Signalwegs: Nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf der Zelloberfläche kommt es zur Aktivierung der Adenylat-Cyclase, die aus ATP cAMP generiert. Dieses bindet an den inaktiv im Zytosol vorliegenden Proteinkinase A-Komplex, wodurch die regulatorischen Untereinheiten aus dem Komplex gelöst werden und auf den katalytischen Untereinheiten ein Kern-Transport-Signal (NLS) freigelegt wird. So gelangt die PKA in den Zellkern, wo sie (unter anderem) CREB in dessen P-Box phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ermöglicht im zellulären Kontext eine Bindung von CBP und P300, Coaktivatoren die auch mit ROR α interagieren (s. Kap. 1.2). Beachtenswert ist weiterhin, dass nicht nur PKA zu einer Aktivierung von CREB führen kann, sondern auch andere Proteinkinasen, insbesondere CaMKIV [111], MAP-Kinasen [99] und GSK 3 [189]. Kombiniert mit dem Wissen, dass obwohl CREB in der Regel als Dimer an das cAMP-Response-Element (CRE) bindet auch eine monomere DNA-Bindung beschrieben wurde [25], scheint es denkbar, dass CREB an der Vermittlung einiger dieser Stimuli an ROR α beteiligt ist.

Ziel war es folglich zu untersuchen, ob durch Veränderung des zellulären CREB-Spiegels die Aktivität von ROR α moduliert werden kann und ob die Kombination mit einer Erhöhung des cAMP-Spiegels einen zusätzlichen Einfluss ausübt. Die Amplifikation der für CREB1 (auch bekannt als CREB oder aktives CREB) kodierenden cDNA aus HeLa-Zell-cDNA mittels PCR und anschließende Klonierung in den Expressionsvektor pSG5 ergab das Konstrukt pSG5-CREB1 β , das im Vergleich zur Isoform α durch Nutzung eines weiteren Exons um 42 Basen länger ist, sich in seiner Funktion aber nach bisherigem Kenntnisstand nicht von der kürzeren Isoform unterscheidet

[19]. Überexpression dieses Vektors in HeLa-Zellen führte zu im Western Blot gut nachweisbaren Proteinspiegeln (siehe Abb. 30b). In den folgenden Reporteranalysen jedoch zeigte eine Coexpression von CREB und ROR α keine veränderte Expression des Reportergens und auch die Induktion des Reportergens durch Inkubation mit dBcAMP wurde vom CREB-Spiegel nicht beeinflusst (siehe Abb. 30a), weswegen eine Beteiligung von CREB an der Vermittlung des Effekts sicher ausgeschlossen werden konnte. Damit konnte gleichzeitig nachgewiesen werden, dass die bei einer Suche mit dem Transcription Element Search System TESS [181] nachgewiesenen potentiellen CRE-Motive in tkLuc-REa23 nicht funktional, da durch Überexpression von CREB nicht aktivierbar, sind.

CREB1 β ist nicht an der Vermittlung der ROR α -Aktivierung durch cAMP beteiligt

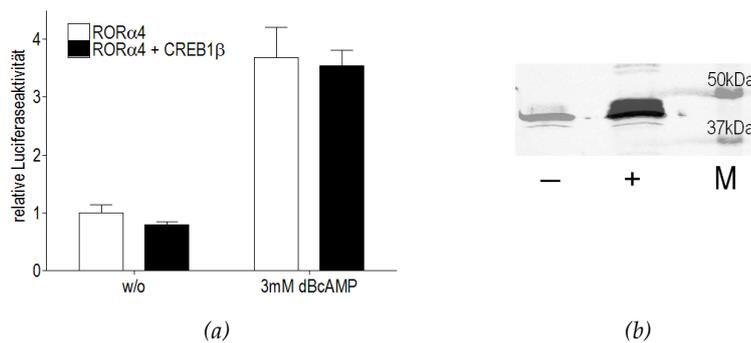


Abb. 30 – Regulation durch CREB

(a) Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23, 20 ng pRL-SV40, 4 ng pSG5-ROR α 4 sowie wo angegeben 4 ng pSG5-CREB1 β in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Luciferase-Aktivität relativ zu pSG5-ROR α 4; Mittelwert & Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen; (b) Western Blot zur Detektion von β -Aktin und CREB1 in HeLa-Zellen. Detektion in Wildtyp („-“) und mit 500 ng pSG5-CREB1 β -transfizierten („+“) Zellen.

3.2.3.2 ROR α und PGC1 α

2007 konnte die Gruppe um Jiandie D. Lin [130] zeigen, dass eine Kotransfektion von PGC1 α die Aktivität von murinem ROR α an dessen Promotor steigert. Diese Steigerung konnte sowohl auf der Ebene der ROR α -abhängigen Produktion muriner Bmal-*mRNA* als auch in Reporteranalysen gezeigt werden. PGC-1 α interagiert nicht nur (wie schon in Kap. 1.2 beschrieben) mit denselben Komplexen der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie wie auch ROR α , sondern wird zusätzlich durch zahlreiche zelluläre Signalwege beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass sowohl β -adrenerge/cAMP-Signale als auch die CaMKIV die Expression von PGC-1 α -*mRNA* steigern [60], beides Signalwege die auch die Aktivität von ROR α steigern (siehe Kap. 1.3.6 & 3.2.3). Posttranslational wird PGC-1 α durch mindestens drei Kinasen an verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert: durch p38 MAP-Kinasen, AMP-Kinase und Akt/PKB [177]. Dies ließ uns in Betracht ziehen, dass PGC-1 α die gesuchte Verbindung zu den von uns beobachteten, ROR α -stimulierenden Signalwegen sein könnte.

Zur Untersuchung dieser Frage beschloss ich, analog zu den geschilderten Versuchen im Mausmodell, in Reporteranalysen zu untersuchen, ob auch humanes PGC-1 α die Aktivität von humanem ROR α an dessen Response Element steigert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse beschloss ich, zusätzlich zu tkLuc-REa23 ebenfalls einen Reporter zu verwenden, bei dem das Luciferasegen unter der Kontrolle des Bmal1-Promotors steht. Erste Versuche einer Überexpression von PGC-1 α mittels pCDNA3 und pSG5-Vektoren scheiterten aus nicht vollständig geklärten Gründen, erst die Verwendung eines pCDNA4-PGC-1 α -Konstruktes von Ichida et al. [91] führte zu einer im Western Blot nachweisbaren Überexpression (siehe Abb.31). Sowohl der monoklonale Mausantikörper gegen das Myc-Tag des Fusionsproteins als auch der polyklonale Kaninchenantikörper gegen PGC-1 α detektierten dieselbe Proteinbande bei einer Größe von ungefähr 140 kDa, obwohl die Proteingröße mitsamt der 6-His- und Myc-Tags in silico auf rund 95 kDa kalkuliert wurde.

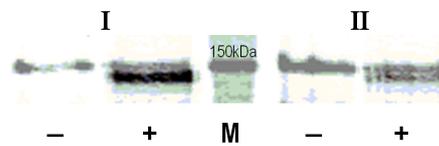


Abb. 31 – Detektion überexprimierten PGC1 α

Zwei unabhängige Western Blots mit Proben aus HeLa-Wildtyp („-“) bzw. aus mit 500 ng pCDNA4-PGC-1 α („+“) transfizierten HeLa-Zellen. Detektion mit Antikörpern gegen das Myc-Tag (9B11) und PGC-1 (H-300) unter Verwendung des Odyssey-Systems. In der Markerbahn M ist die 150 kDa große Markerbande des gefärbten Precision Plus Protein™ zu sehen.

Die Überexpression von PGC-1 α in Reporteranalysen führte zu eher überraschenden Ergebnissen: In Übereinstimmung mit den publizierten Daten bewirkte eine Transfektion von PGC-1 α allein keine Steigerung der durch endogene Proteine hervorgerufenen Luciferaseaktivität. Unerwartet war jedoch, dass auch eine Kotransfektion mit verschiedenen Isoformen des humanen ROR α zu keiner Aktivitätssteigerung führte – im Gegenteil, im Fall des ROR α 4 zeigte sich sogar eine schwache, aber statistisch signifikante Abschwächung. Zur Überprüfung der Validität dieser Daten war es gerade angesichts der Widersprüche zum Mausmodell interessant zu untersuchen, welche Folgen eine Verringerung der endogenen PGC-1 α -Konzentration hat. Zur Untersuchung dieser Frage wurde versucht, einen Knockdown von PGC-1 α in HeLa-Zellen zu etablieren. Dafür wurde wie in Materialien und Methoden (siehe Kap. 2.3.4) beschrieben eine von Kawakami et al. [106] publizierte siRNA nach den Methoden von Paddison et al. [158] in eine shRNA konvertiert und in Ambions pSilencer4.1-CMV neo Vektor ligiert. Mittels FACS-Analyse mit pEGFP-C2 transfizierter Zellen konnte ermittelt werden, dass zum Zeitpunkt der Reporteranalyse (also ungefähr 40 Stunden nach Versetzen der Zellen mit den DNA-Calciumphosphat-Kristallen) im Schnitt ein Drittel der Zellen EGFP-positiv war. Auch durch die Verwendung von Lipofectamin™ 2000 ließ sich keine deutlich höhere Anzahl transfizierter Zellen erzielen. Der Grund dafür ist in der Tatsache zu suchen, dass transient transfizierte Plasmide bei einer Teilung transfizierter Zellen nicht an beide

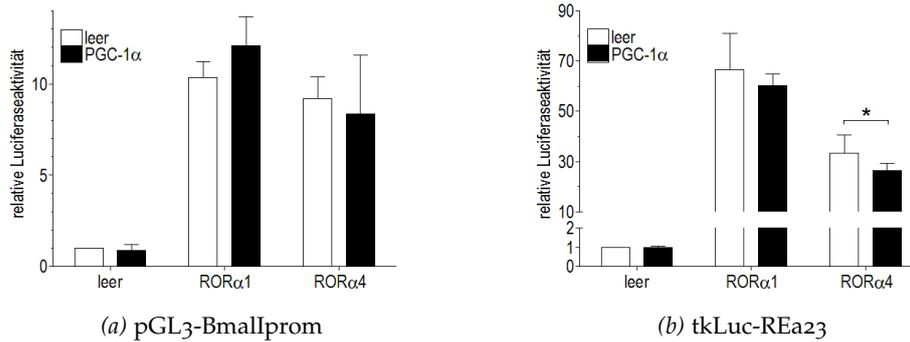


Abb. 32 – Regulation durch PGC1 α

Transfektion von 400 ng pGL3-Bmallprom (a) bzw. tkLuc-REa23 (b), 20 ng pRL-SV40 und je nach Angabe 4 ng pSG5-ROR α oder 4 ng pCDNA4-PGC1 α in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Firefly-Luciferase relativ zu pSG5-Leervektor; Mittelwert & Standardabweichung aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ im gepaarten T-Test.

Tochterzellen vererbt werden. Einen Beweis dafür lieferte die Erkenntnis, dass sich bei Verwendung des an die Kernmatrix (S/MAR, scaffold/matrix attachment area) bindenden und daher mit hoher Effizienz an die Tochterzellen vererbten pEPI-Vektors [138] im beschriebenen Protokoll zur Calciumphosphat-Transfektion nach 40 Stunden durchschnittlich 70% transfizierter Zellen nachweisen ließen. Da auch die pSilencer-Plasmide nicht an die Kernmatrix binden, ließe sich mit den beschriebenen Transfektionseffizienzen selbst ein 99%iger Knockdown nur schwer mittels qRT-PCR signifikant nachweisen, da in der Mischpopulation selbst bei idealem Verlauf und ohne Rückkopplungseffekte nur eine Absenkung der RNA-Menge auf rund 66% zu beobachten wäre. Daher beschlossen wir statt der Untersuchung der Folgen eines transienten Knockdowns einen stabilen Knockdown von PGC-1 α zu etablieren und zu untersuchen. In verschiedenen, nach dem in Kap. 2.10 beschriebenen Protokoll produzierten Klonen, die unter Selektionsdruck proliferierten und daher das transfizierte pSilencer in ihr Genom integriert hatten, wurde die PGC-1 α -Transkriptmenge im Vergleich zu einer Negativkontrolle (Zellen stabil transfiziert mit pSilencer-NegCtrl, einer shRNA deren Sequenz im humanen Genom nicht zu finden ist [7]) und den Haushaltsgenen GAPDH und β -Actin mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei wurde für den besten Klon eine Effizienz des Knockdowns von 66% (entspricht einer Restaktivität von 33%) ermittelt (siehe Abb. 33). Morphologisch zeigten die stabil transfizierten Zellen keine Auffälligkeiten verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Zellen, unterschieden sich aber deutlich in ihrer Wachstumsrate, die um ungefähr 50% reduziert war. Entsprechend wurde auch die Zahl der für die weitere Transfektion für die Reportergermanalysen verwendeten Zellen angepasst. Eine Verdoppelung auf 80 000 Zellen je Vertiefung führte zur erwünschten Dichte von ungefähr 80% zum Zeitpunkt der Transfektion.

Wie auch schon im Fall der Überexpression von PGC-1 α zeigte auch der Knockdown keinen ausgeprägten Einfluss auf die Aktivität von ROR α an den

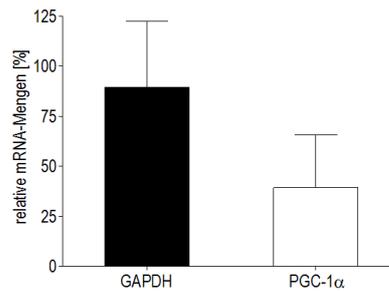


Abb. 33 – Effizienz des PGC-1 α Knockdowns

Bestimmung mittels qRT-PCR; Mittelwert und Standardabweichung aus 4 unterschiedlichen Messzeitpunkten, normalisiert gegen die Negativkontrolle (mit pSilencer-NegCtrl stabil transfizierten Zellen) und das Haushaltsgen β -Aktin mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Induktionen ergeben sich als $\Delta\Delta$ Ct-Potenz von 2.

Weder
Überexpression noch
Knockdown von
PGC1 α beeinflussen
die Aktivität von
ROR α

verschiedenen Promotorkonstrukten. In beiden stabil transfizierten Zelllinien

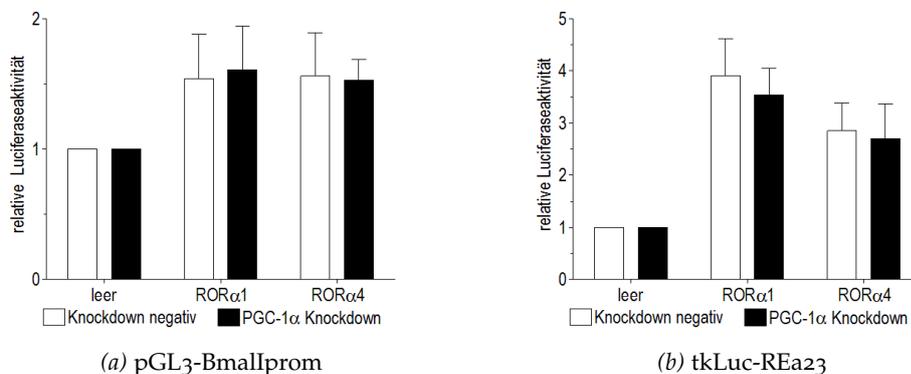


Abb. 34 – Regulation durch PGC1 α -Knockdown

Transfektion von 400 ng pGL3-Bmal1prom (a) bzw. tkLuc-REa23 (b), 20 ng pRL-SV40 und je 4 ng pSG5-ROR α in stabil transfizierte HeLa-Zellen (pSilencer-NegCtrl und pSilencer-PGC1 α). Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Firefly-Luciferase relativ zu pSG5-Leervektor; Wiedergabe der Werte als Mittelwert & Standardabweichung.

waren die relativen Induktionen niedriger als es aufgrund der Ergebnisse in unbehandelten HeLa-Zellen zu erwarten gewesen wäre. Interessant ist die Beobachtung, dass trotz der in den stabil transfizierten Zellen stark erniedrigten Aktivität der Renilla-Luciferase, ein Hinweis auf niedrige Transfektionseffizienz, die Aktivitäten der Firefly-Luciferase sich nur wenig unterscheiden. Offensichtlich ist die basale Aktivität der beiden Reporterpromotoren durch den Selektionsdruck stark erhöht, möglicherweise ein Zeichen für zellulären Stress. Unabhängig davon erwies es sich als unmöglich, in humanen Zellen einen positiven Einfluss der Expression von PGC-1 α auf die Aktivität von ROR α zu zeigen. Angesichts einer Sequenzidentität von 94% zwischen humanem und murinem PGC-1 α ist dieses Ergebnis zwar nicht unmöglich, aber doch überraschend. Leider blieb eine Anfrage an Prof. Jiandie D. Lin

auf Überlassung des in der Publikation verwendeten Expressionsvektors für PGC-1 α unbeantwortet, weswegen nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Grund für das Ergebnis im Versuchsaufbau zu finden ist.

3.2.4 ROR α und PKA

Da eine Vermittlung des Einflusses von dBcAMP durch die beiden in Betracht gezogenen Coaktivatoren ausgeschlossen werden konnte, beschlossen wir zu überprüfen ob der zelluläre cAMP-Spiegel über direkte Phosphorylierung der nukleären Rezeptoren durch Proteinkinase A die Aktivitätsmodulation vermittelt. Hierfür galt es in einem ersten Schritt die Rolle der PKA in der Signalübertragung zu bestätigen und die Beteiligung anderer Signalwege auszuschließen. Bei Beteiligung der PKA an der Vermittlung des Effektes sollte sich die Aktivierung des Reportergens dosisabhängig durch einen selektiven PKA-Inhibitor wie H89 [67] antagonisieren lassen. In der Tat konnte in Reporteranalysen durch eine Inkubation mit steigenden Konzentrationen an H89 die Aktivierung des Reportergens durch dBcAMP aufgehoben werden, ohne dass die verwendeten Konzentrationen einen Einfluss auf die basale Aktivität von ROR α zeigten. Erst in hohen Konzentrationen des Inhibitors zeigte sich eine Dämpfung dieser Basalaktivität, die allerdings auch mit sichtbarem Zelltod einherging (siehe Abb. 35). Wie aufgrund dieses Ergebnisses

PKA vermittelt die auf Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels erfolgende Aktivierung von ROR α

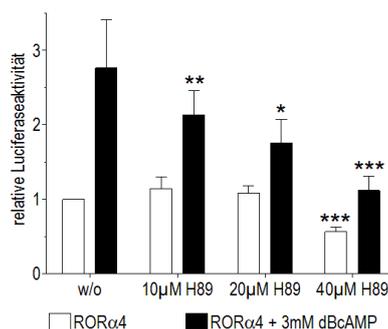


Abb. 35 – H89 antagonisiert die dBcAMP-Wirkung

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23, 20 ng pRL-SV40 und 4 ng pSG5-ROR α 4 in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Luciferase-Aktivität relativ zu pSG5-ROR α 4; Mittelwert & Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im gepaarten T-Test

und der Abhängigkeit der Aktivierung durch dBcAMP von der Anwesenheit der RORE im Reporterkonstrukt (siehe Kap. 3.2.3) zu erwarten gewesen war, zeigte sich auch kein Einfluss von H89 auf die Negativkontrolle tkLuc-w/o-RORE (siehe Abb. 36a). Überraschend hingegen war, dass es bei Anwesenheit der RORE aber ohne Überexpression von ROR α zu einer dosisabhängigen Steigerung der Basalaktivität endogenen ROR α s am Reporter kam, die bei Anwesenheit exogenen ROR α s nicht zu beobachten gewesen war (siehe Abb. 36b).

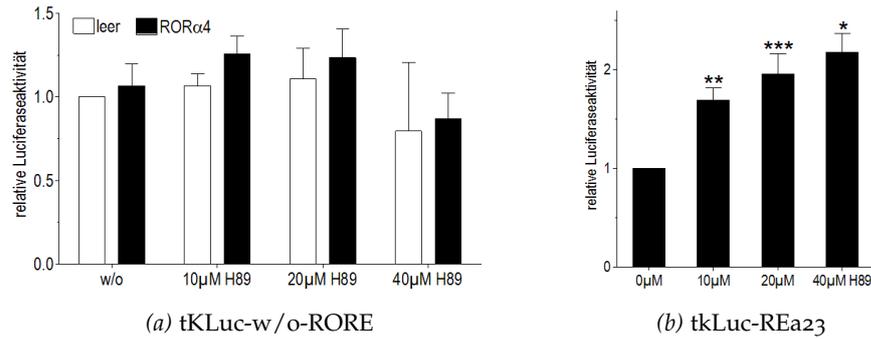


Abb. 36 – Weitere H89-Effekte

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23 bzw. tkLuc-w/o-RORE, 20 ng pRL-SV40 und wo angegeben 4 ng pSG5-ROR α 4 in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Luciferase-Aktivität relativ zu pSG5-ROR α 4; Mittelwert & Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im gepaarten T-Test (a) Negativkontrolle ohne RORE (b) Kontrolle der H89-Wirkung an tkLuc-REa23 ohne exogenes ROR α .

Durch diese Versuche konnte klar belegt werden, dass der Effekt einer Veränderung im zellulären cAMP-Spiegel durch PKA an ROR α vermittelt wird. Es stellte sich nun die Frage, ob eine direkte Phosphorylierung von ROR α und/oder RevErb α durch PKA Teil der Signaltransduktion ist. Eine *in silico*-Analyse der Primärstrukturen der beiden Proteine auf die Anwesenheit der in der Literatur beschriebenen PKA-Phosphorylierungsmotive R-R/K-X-S/T, R-X₂-S/T oder R-X-S/T [107] ergab in ROR α 4 fünf und in RevErb α sieben potentielle Phosphorylierungsstellen sowie in beiden Fällen eine weitere, gelegen in der Thrombinschnittstelle des durch Verwendung des pET28a-Vektors exprimierten Fusionsproteins. Letzteres erwies sich in der Folge als in beiden Proteinen funktionelles Motiv, weswegen für die folgenden Versuche eine Mutation des Serins dieses Motivs zu Alanin vorgenommen werden musste.

Nach Abschluss dieser Mutation zeigte sich in *in vitro* Kinaseanalysen eine direkte Phosphorylierung von ROR α 4, nicht aber von RevErb α durch PKA. Eine *in silico* Analyse des tryptischen Verdaus von ROR α 4 mittels des PeptideCutter Programms auf dem ExPASy-Server [65] zeigte, dass in diesem Fall die Phosphorylierungsstellen (Ser-44, Ser-65, Ser-93, Ser-99 & Thr-429) auf einzelnen tryptischen Peptiden liegen sollten (s. Abb 37). Eine Phosphopeptidkarte der nicht mutierten Fusionsproteine hatte zuvor zwei radioaktive Peptide für ROR α 4 und ein radioaktives Peptid für RevErb α gezeigt, wovon jeweils ein Punkt auf die Phosphorylierung des in der Thrombinschnittstelle liegenden Motivs zurückgeführt werden konnte. Zur Aufklärung der Lage der verbleibenden, singulären Phosphorylierung des ROR α 4 wurden die Serine bzw. Threonine der putativen Phosphorylierungsstellen einzeln nach Alanin mutiert. *In vitro* Kinaseanalysen dieser Mutanten enthüllten das Serin an Position 99 als einzige funktionelle Phosphorylierungsstelle für PKA (siehe Abb. 38), da die nach seiner Mutation gewonnene Proteinmutante nicht mehr durch PKA phosphoryliert werden konnte. Um zu ergründen ob

PKA phosphoryliert
ROR α an Serin 99,
nicht aber RevErb α

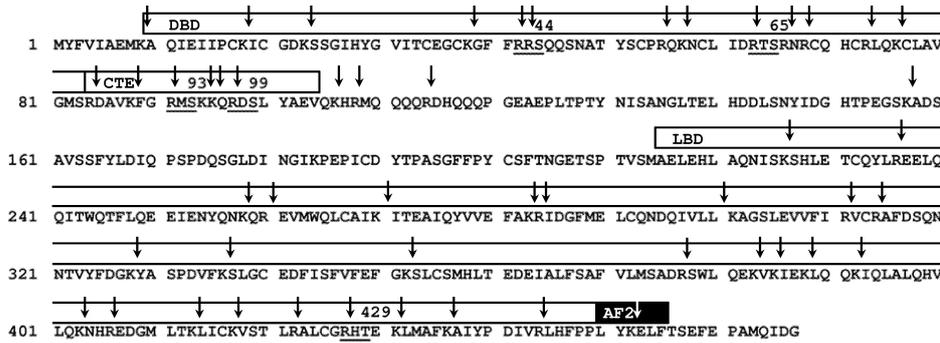


Abb. 37 – Analyse tryptischer ROR α -Phosphopeptide

In silico-berechnete Phosphorylierungsmotive für PKA sind in der Sequenz durch Unterstreichung gekennzeichnet, die Schnittstellen des Trypsins [65] durch Pfeile. Domänenkennzeichnung nach NP_599024.1 und [71].

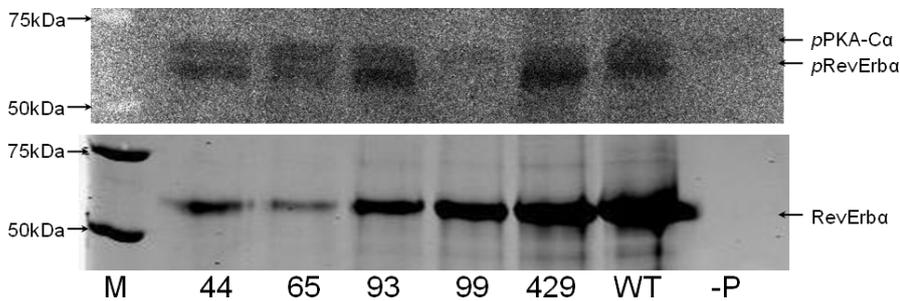


Abb. 38 – ROR α -Phosphorylierung durch PKA

In vitro Kinaseanalyse der fünf verschiedenen Serin/Threonin X → Alanin Mutanten (Bild oben); „M“ = Markerbahn, „-P“ = PKA ohne ROR α . Die obere Bande der Doppelbanden entspricht pPKA, die untere pROR α . Zum Vergleich des Proteinauftrags: Coomassiefärbung der Proteinproben (Bild unten)

die direkte Phosphorylierung von ROR α durch PKA den einzigen cAMP-abhängige Mechanismus zur Aktivierung des Proteins darstellt, wurde die ROR α -S99A-Mutante in Reporteranalysen getestet. Es zeigte sich, dass auch die nicht mehr direkt durch PKA phosphorylierbare ROR α -Mutante noch durch dBcAMP aktiviert werden kann und eine ähnliche Aktivität wie das Wildtypprotein zeigt (siehe Abb. 39). Möglicherweise tragen hier noch weitere Faktoren wie beispielsweise Coaktivatoren zur Gesamtaktivität bei und können unter den Bedingungen der Reporteranalysen den Wegfall der direkten Phosphorylierung kompensieren.

3.2.5 ROR α , CaMKIV und PKA

Die Tatsache, dass zumindest ein Teil der durch die Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels bewirkten Effekte über andere Mechanismen als die direkte Phosphorylierung von ROR α vermittelt werden, erinnert an die Regulation der ROR α -Aktivität durch CaMKIV. Kane und Means [103] konnten die hier schon beschriebene starke ROR α -Aktivierung zeigen (siehe Abb. 23), konnten aber auch zeigen, dass diese Aktivierung nicht durch direkte Phosphorylierung vermittelt wird, sondern durch eine nicht aufgeklärte über die

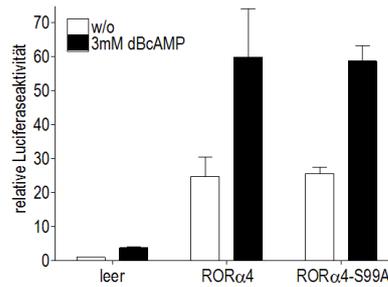


Abb. 39 – Aktivität der ROR α 4-S99A Mutante

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23, 20 ng pRL-SV40 und 4 ng pSG5-ROR α 4-WT bzw. -S99A in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Luciferase-Aktivität relativ zu pSG5-leer; Mittelwert & Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

ligandenbindende Domäne vermittelte Interaktion. Sie konnten außerdem zeigen, dass CaMKIV die Interaktion einiger LXXLL-Motive enthaltender Peptide mit der ROR-LBD verstärken kann. Die ROR α 4 Phosphorylierung durch PKA wiederum erfolgt an Serin 99, einer am Ende der DNA-bindenden Domäne in der CTE und damit in der Nähe der Scharnierdomäne gelegenen Aminosäure. Diesem Proteinbereich war in dieser Publikation keine besondere Aufmerksamkeit gewidmet worden. Insofern ist eine Verknüpfung zwischen CaMKIV und der Aktivierung der PKA denkbar, zumal eine Verknüpfung verschiedener Aktivierungswege auch physiologisch sinnvoll sein könnte. Zur Aufklärung einer eventuellen Verknüpfung der Signalwege bot sich ein zweiseitiger Ansatz an - zum einen die Untersuchung der Frage ob eine Inhibition der PKA einen Einfluss auf die ROR α -Aktivierung durch CaMKIV ausübt, zum anderen die Frage, ob die nicht mehr durch PKA phosphorylierbare ROR α -Mutante S99A ebenso durch CaMKIV aktivierbar wird wie das Wildtypprotein.

Eine Inkubation von in Reportergenanalysen mit Expressionsplasmiden für ROR α 4 und CaMKIV transfizierten HeLa-Zellen mit steigenden Mengen H89 zeigte, dass auch die Aktivierung durch CaMKIV mittels des selektiven PKA-Inhibitors dosisabhängig und selektiv aufhebbar ist. Somit existieren starke Hinweise auf eine Beteiligung PKA-abhängiger Signalwege an der Vermittlung der ROR α -Stimulation durch CaMKIV-Aktivierung. Allerdings ist anzumerken, dass es im Gegensatz zur Aktivierung der ROR α -Aktivität durch dBcAMP selbst mit einer Dosierung von 40 μ M H89 nicht gelang, die Aktivität vollständig bis auf den Basalwert abzusenken, auch wenn zwischen den Aktivitätswerten von ROR α 4 + 40 μ M H89 und ROR α 4 + CaMKIV + 40 μ M H89 kein statistisch signifikanter Unterschied mehr errechnet werden konnte (siehe Abb. 40). Diese Feststellung wird weiterhin dadurch gestützt, dass auch die nicht mehr direkt durch PKA phosphorylierbare ROR α 4-S99A-Mutante durch CaMKIV aktiviert werden kann und auch diese Aktivierung durch H89 dosisabhängig hemmbar ist (siehe Abb. 41b). Auch wenn diese Versuche Hinweise darauf lieferten, dass diese CaMKIV-vermittelte Aktivierung

CaMKIV aktiviert
ROR α zumindest
teilweise über PKA-
abhängige
Signalwege

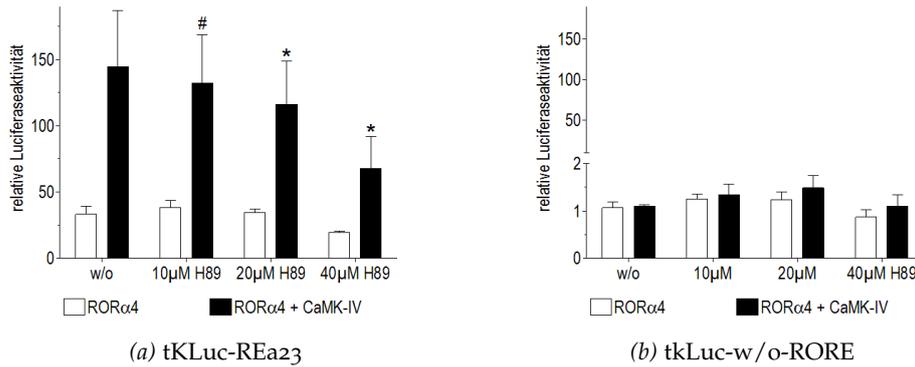


Abb. 40 – ROR α , CaMKIV und PKA (I)

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23 (a) bzw. tkLuc-w/o-RORE (b), 20 ng pRL-SV40, 4 ng pSG5-ROR α 4 und wo angegeben 4 ng pSG5-CaMKIV in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Luciferase-Aktivität relativ zu pSG5-leer; Mittelwert & Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. #p=0,054; *p<0,05 im gepaarten T-Test

an ROR α 4-S99A schwächer ausfallen könnte als die des Wildtyp-Proteins, konnten weitere Versuche in diese Richtung keinen statistisch signifikanten Unterschied beweisen. Angesichts der in hohen Konzentrationen auftretenden Toxizität des Inhibitors ist auch die scheinbar vollständige Aufhebung der Aktivierung durch 40 μ M H89 eher zurückhaltend zu bewerten.

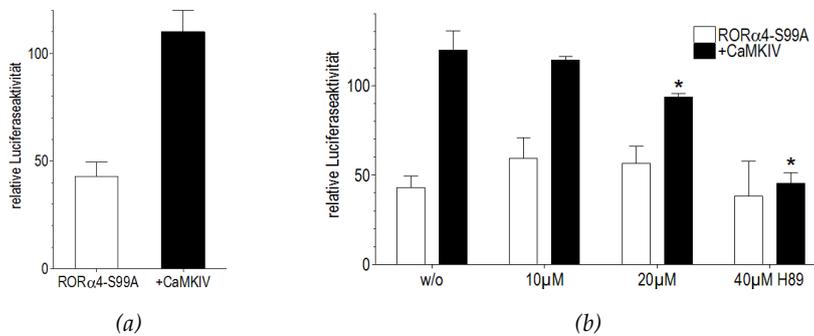


Abb. 41 – ROR α , CaMKIV und PKA (II)

Transfektion von 400 ng tkLuc-REa23, 20 ng pRL-SV40, 4 ng pSG5-ROR α 4 und wo angegeben 4 ng pSG5-CaMKIV in HeLa-Zellen. Die Menge an Expressionsplasmiden wurde mit pSG5-Leervektor auf gesamt 80 ng ergänzt. Induktion der Luciferase-Aktivität relativ zu pSG5-leer; Mittelwert & Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. *p<0,05 im gepaarten T-Test (a) Induktion der ROR α 4-S99A Mutante durch CaMKIV; (b) Inkubation mit steigenden Mengen H89

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.1 TRANSKRIPTIONSREGULATION

Ein Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Regulation der ROR α -Expression auf der Ebene der Transkription des ROR α -Gens. Untersuchungen in unserem Labor hatten ergeben, dass die intrazellulären Mengen sowohl an ROR α -Transkripten als an ROR α -Protein verhältnismäßig gering sind. In PCR-Versuchen bedurfte es zur Detektion von ROR α -Amplicons verhältnismäßig hohe Zyklenzahlen [9] und ein Nachweis nativen Proteins im Western Blot gelang bisher nicht [122]. Außerdem ist bis zum heutigen Tag weitgehend unklar, wodurch die Transkriptionsrate, aber auch die Wahl der Isoform, die unter anderem gewebespezifisch erfolgt [15, 154], determiniert werden. Die Charakterisierung des ROR α -Promotors durch Dr. Nadine Meindl [141] zeigte ein Fehlen von TATA-Boxen sowie eine Regulation über insgesamt 9 GC-Boxen, konnte aber die niedrigen Transkriptmengen ebenfalls nicht erklären. Dieser Mangel an Daten brachte uns zu der Frage, ob nicht die Länge des Gens ein Grund für die niedrigen endogenen Transkriptmengen sein könnte. Die Regulation der Expression über die Länge des Gens könnte auf mehrere Weisen erfolgen: So wurde an zahlreichen Stellen beschrieben, dass es während der Elongation immer wieder zu einem Pausieren der RNA-Polymerase kommt, sei es aufgrund von Fehlern in der gebildetem *mRNA*, sei es aufgrund struktureller Besonderheiten des Gens [111, 185, 190]. Vermittelt wird dieses Pausieren beispielsweise durch die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren, bereits angesprochen wurden NELF oder DSIF. Ähnlich könnte auch die von Dr. Michael Wagner [205] beobachtete Erhöhung der Transkriptmenge durch Melatoninbehandlung statt auf einer Regulation über den ROR α -Promotor durch eine Stabilisierung der Elongation erfolgen. Und wie am Beispiel des TR gezeigt wurde, kann auch die Anwesenheit von Antisense-Transkripten die Transkriptmenge regulieren [85] und in der bevorzugten Expression einer Isoform münden.

Der Versuch, die Daten von Dr. Wagner zu reproduzieren scheiterte, eine Erhöhung der ROR α -Transkriptmengen durch Behandlung mit Melatonin konnte nicht beobachtet werden. Eine kritische Analyse des Vorgehens offenbarte mehrere mögliche Gründe für das Scheitern: Zum einen war es unmöglich, exakt dieselben Versuchsbedingungen herzustellen wie sie bei der Erstellung der Originaldaten vorlagen. So wurden in den vergangenen Jahren sämtliche Zellkulturmedien durch die anderer Hersteller ersetzt, ebenso das für die Supplementierung der Medien verwendete FCS. Auch die von Dr. Wagner verwendete Zelllinie konnte nur in unbekannter, aber vermutlich hoher Passagezahl aufgetaut werden und wurde daher durch eine neue Charge der DSMZ ersetzt. Bedenkt man, dass Expression und Regulation von ROR α stark zelltypabhängig sind [10], so könnten diese zahlreichen

Änderungen durchaus auch diesen Effekt negativ beeinflusst haben. Auf der anderen Seite bleibt ebenfalls kritisch anzumerken, dass Dr. Wagner die von ihm beobachtete 8,4-fache Induktion mittels semiquantitativer PCR bestimmt hatte. Diese Erhöhung entspricht bei idealem PCR-Verlauf im linearen Bereich der DNA-Vermehrung binnen dreier PCR-Zyklen und ist auch mit modernen Methoden nur mittels validierter und robuster Bedingungen klar nachweisbar. Die Möglichkeit, dass es sich hier um aufsummierte Artefakte aus nicht idealen PCRs und der Auswertung mittels Fluoreszenz handelt, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die in meinen Versuchen beobachtete Bindung von Melatonin an das hnRNP-K könnte jedoch eine Erklärung für eine Induktion der ROR α -Transkription durch Melatonin liefern. Zu den zahlreichen zellulären Prozessen an denen diese Proteinfamilie beteiligt ist, gehört auch die Steigerung der Gentranskription durch eine Interaktion mit TBP [27]. Eine Förderung dieser Interaktion durch Melatonin könnte auch zu einer Steigerung der ROR α -Transkription führen, ist aber durch die vorliegenden Daten nicht belegt. Die Tatsache, dass es in den Versuchen nicht vollständig gelang, unspezifische Bindungen von Proteinen an die für die Bindungsstudien verwendete Sepharose zu unterdrücken, machte es schwierig, verlässliche Versuchsreplikate zu erhalten. Auch beinhaltet die verwendete Methode das stete Risiko falsch negativer Ergebnisse, da einerseits hochaffine, aber niedrig konzentrierte Komplexe nicht detektiert werden können, andererseits niedriger affine Komplexe selbst wenn sie in relativ hohen Konzentrationen auftreten während der Aufreinigung verloren gehen.

Physiologisch wäre eine Beeinflussung zellulärer ROR α -Spiegel durch Melatonin ein denkbarer Mechanismus zur Verstärkung der von Melatonin über membranständige Rezeptoren vermittelten systemischen Synchronisation zirkadianer Rhythmen [53]. Insgesamt betrachtet wäre es jedoch verfrüht, eine verlässliche Aussage über den Zusammenhang von zellulären Melatoninkonzentrationen und der Transkription von ROR α treffen zu wollen.

Ebenfalls interessant ist der negative Verlauf eines Nachweises natürlicher Antisensetranskripte für ROR α . Diese wären eine mögliche Erklärung sowohl für die niedrigen Transkriptspiegel als auch, zumindest teilweise, für die Isoformverteilung gewesen. Cis-NATs, wie sie durch die Expression des CYCSP38-Pseudogens entstehen könnten, könnten sowohl die Transkription als auch die Translation von ROR α deutlich beeinflussen. Auf Transkriptionsebene könnte neben der direkten Störung der Transkription durch überlappende Gene [166] auch eine teilweise Maskierung der naszierenden RNA stattfinden, die durch eine Überdeckung von Spleißstellen zu einer Beeinflussung der Isoformverteilung führen könnte. Aber auch eine durch Dicer vermittelte Stilllegung der ROR α -Transkription in einzelnen Zellen wäre vorstellbar, dank unterschiedlicher Promotoren der Isoformen sogar isoformspezifisch.

Leider konnte die Existenz solcher NAT durch meine Versuche weder belegt noch widerlegt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die ROR α -mRNA zur Ausbildung extrem stabiler Sekundärstrukturen befähigt ist, die selbst durch bis an die Grenze der enzymatischen Aktivität der reversen Transkriptase

erhöhte Anlagerungstemperaturen und die Zugabe von Sekundärstrukturen inhibierendem DMSO nicht vollständig zerstört werden konnten. Auch wenn der Beweis der Existenz von Sekundärstrukturen der ROR α -mRNA *in vivo* noch aussteht, könnte sie zu ähnlichen Konsequenzen wie die vermuteten NATs führen. Auch durch Schleifen in der mRNA ausgebildete Duplexe sind letztlich doppelsträngige RNAs, und so können durch Sekundärstrukturen erzeugte RNA-Duplexe ähnliche Folgen wie durch Antisensetranskripte erzeugte haben. Besonders eindrucksvoll zeigten sich die Einflüsse von RNA-Sekundärstrukturen am Beispiel viraler RNAs, aber auch in Eukaryoten wurden zahlreiche Effekte beobachtet. Diese reichten von Inhibition der Translation durch Maskierung der Ribosomenbindungsstelle über Veränderungen im ribosomalen Leseraster und Änderungen der zellulären Lokalisation der mRNAs bis zur Stilllegung ganzer Genabschnitte [34, 194].

Zusammengenommen liefern meine Ergebnisse erste Hinweise auf die Existenz stabiler RNA-Sekundärstrukturen in der RNA von humanem ROR α . Deren Existenz *in vivo* und mögliche Folgen dieser Existenz bedürfen allerdings noch weiterer Untersuchungen.

4.2 AKTIVITÄTSREGULATION DURCH MELATONIN

Für Melatonin wurden, neben seiner als physiologisch relevant bestätigten Bindung an MT₁₋₂-Rezeptoren ein ganze Reihe von Bindungsstellen beschreiben, darunter die hier schon angesprochen Bindung an ROR α , ROR β und Calreticulin, aber auch Bindung an Calmodulin, Tubulin und die Chinonreduktase [133]. Allerdings konnte nur für die wenigsten dieser Bindungen eine Funktion aufgezeigt werden, weswegen ihre physiologische Relevanz und ihre Spezifität angezweifelt werden können. Neben der komplizierten Situation betreffend das Verhältnis von Melatonin und den RORs, betrifft dies auch Calreticulin: Bis heute findet sich in der Literatur keine über die erste Beschreibung der Bindung [135] hinausgehende Bestätigung deren Existenz. Meine Versuche bestätigen diese Tendenz, denn Melatonin zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität von Calreticulin an ROR α . Überhaupt ist die Datenlage über die Wirkung von Melatonin auf die Aktivität nukleärer Rezeptoren widersprüchlich und scheint daher einen gemeinsamen Mechanismus, beispielsweise über Calreticulin eher auszuschließen. Während die Gruppe um Carlberg [17] eine Aktivierung von ROR α durch die Behandlung mit Melatonin beobachtete, berichteten Presman et al. von einer Inhibition des Glucocorticoidrezeptors [167] und führten dies auf eine verminderte Translokation des GR zurück. Verminderte Translokation könnte schwer von einer calreticulinvermittelten, vermehrten Ausschleusung aus dem Zellkern zu unterscheiden sein, dennoch dürfte diese Begründung nicht zutreffend sein, da aufgrund der hohen Konservierung der Calreticulinbindungsdomäne in nukleären Rezeptoren alle Rezeptoren dasselbe Verhalten aufweisen sollten. Insofern gilt es, eine Vermittlung dieser Effekte über andere Signaltransduktionswege in Betracht zu ziehen. Schuster et al. [182] berichteten von einer in Zellen neuronaler Herkunft auftretenden Erhöhung intrazellulären cAMP durch Melatonin und führten dies auf einen calmodulinabhängigen

Mechanismus zurück. Damit zeigten sie einen alternativen Mechanismus der Signaltransduktion durch Melatonin, während in bisherigen Studien wiederholt eine Kopplung der $MT_{1/2}$ -Rezeptoren über G_i sowie seltener über G_q gezeigt worden war [98]. Dies deutet auf einen starken Einfluss des zellulären Kontexts auf die durch $MT_{1/2}$ -Rezeptoren vermittelten Signale hin, was auch ohne die Beteiligung anderer Melatoninrezeptoren eine Erklärung für die teils widersprüchlichen Melatoninwirkungen sein könnte. Unter diesem Gesichtspunkt ist auch die von mir beobachtete Bindung von Melatonin an hnRNPK und Nucleophosmin 1 eher kritisch zu bewerten und sollte, solange es an einer Darstellung der physiologischen Bedeutung der Bindung mangelt, als unspezifisch angesehen werden, auch wenn die möglichen Implikationen dieser Bindung zu Spekulationen anregen: So ist es durchaus bemerkenswert, dass nach Calreticulin hier für ein weiteres am Transport von Proteinen zwischen Nukleus und Cytosol beteiligtes Protein eine Bindung von Melatonin gezeigt werden konnte. Ebenso wie Calreticulin ist auch für Nucleophosmin 1 eine Chaperonfunktion beschrieben worden, womit Melatonin eine Verknüpfung zur Kontrolle der korrekten Faltung von Proteinen darstellen könnte, sowie über die Funktion von Nucleophosmin in der Biogenese von Ribosomen an der Proteinsynthese selbst. Eine entsprechende Verknüpfung ist auch auf der Ebene der Transkription über hnRNPK vorstellbar, so dass in der Zirbeldrüse rhythmisch produziertes und als Hormon in den Kreislauf gebrachtes Melatonin neben der Signaltransduktion über MT-Rezeptoren auch direkt Kontrolle über die Expression ausüben könnte.

4.3 AKTIVITÄTSREGULATION DURCH PGC1 α

PGC-1 α wurde in zahlreichen Publikationen als Coaktivator nukleärer Rezeptoren identifiziert [60]. Als solcher ist PGC-1 α beteiligt an der Regulation von Stoffwechselgenen und interagiert beispielsweise über PPAR γ mit zahlreichen anderen Transkriptionsfaktoren, wozu auch CREB und NRFs gehören. PGC-1 α ist somit eine weitere Verbindung externer Stimuli, metabolischer Vorgänge und der energetischen Homöostase. Entdeckt wurde PGC-1 α als Coaktivator von PPAR γ im braunen Fettgewebe, wohingegen im weißen Fettgewebe keine Expression von PGC-1 α feststellbar war.

Da auch ROR α als durch PGC-1 α aktivierter Rezeptor beschrieben worden war [130], untersuchte ich die Effekte einer Expression von PGC-1 α in unserem Reporter-gen-System. Dabei beobachteten wir eine verglichen mit der *in silico* errechneten Größe von rund 95 kDa deutlich abweichende Proteingröße von mit 140 kDa. Da die Detektion des Proteins aber mit unterschiedlichen Antikörpern reproduzierbar bei dieser Größe erfolgte, schlossen wir eine unspezifische Bindung der Antikörper und damit die Detektion eines falschen Proteins aus. Als Gründe für die aberante Proteingröße lassen sich verschiedene Aspekte diskutieren: Zum einen könnte PGC-1 α in HeLa-Zellen einer bisher nicht beschriebenen posttranslationalen Modifikation unterliegen. Insbesondere glykosilierte Proteine erscheinen im SDS-Gel häufig bei zu großem Molekulargewicht, was neben dem durch die Glykosylierung erhöhten Molekulargewicht auch an einer aufgrund der hydrophilen

Struktur verringerten Bindung von SDS an das Protein liegt. Zum anderen ergaben Kalkulationen auf dem ExPASy-Server, dass PGC-1 α auch ohne post-translationale Modifikationen schon eine relativ hydrophile Gesamtstruktur aufweist.

Das Ergebnis, dass in unserem System eine Kotransfektion von ROR α und PGC-1 α nicht nur zu keiner Steigerung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur alleinigen Transfektion von ROR α führte, sondern sogar eine leichte Abschwächung beobachtet werden konnte, überraschte uns. Dieser Widerspruch zu den Ergebnissen der Gruppe um Jiandie D. Lin könnte auf mehreren Einflussfaktoren beruhen: Augenscheinlich ist, dass ich in meinen Versuchen mit humanen Proteinen arbeitete, während Liu et al. murine Proteine untersucht hatten. Auch führte ich meine Versuche in HeLa-Zellen durch, während in den publizierten Versuchen BOSC293-Zellen verwendet worden waren. Angesichts des komplexen Aufbaus des unter der Beteiligung von PGC-1 α gebildeten transkriptionellen Komplexes ist es durchaus vorstellbar, dass in HeLa-Zellen ein wichtiger Bestandteil des Komplexes ebenso wenig exprimiert wird wie PGC-1 α selbst und dass daher trotz exogener PGC-1 α -Produktion kein funktioneller Coaktivatorkomplex gebildet werden kann. Auch führt die Rolle von PGC-1 α als Coaktivator nicht immer zu einer positiven Genregulation: Estall et al. zeigten 2009 [58] dass PGC-1 α über vermehrte Expression von RevErb α die Expression des über zwei RORE kontrollierten FGF21 reduzierte.

Interessant ist weiterhin, dass ich ebenso wie Liu et al. [130] keine Erhöhung der RORE-abhängigen relativen Luciferaseaktivität beobachten konnte, wenn ich PGC-1 α ohne ROR α transfizierte. Daraus schließe ich, dass in meinen Experimenten auch endogenes ROR α nicht durch PGC-1 α aktiviert werden kann. Aschrafi et al. [10] hatten in HeLa-Zellen die Expression von ROR α -mRNA nachgewiesen und auch wenn es uns bisher nicht gelungen ist, die endogene Expression von ROR α -Protein im Western Blot zu beweisen, gibt es Hinweise auf eine Expression von funktionellem ROR α -Protein in HeLa-Zellen. So zeigte sich in verschiedenen Reporteranalysen eine Stimulation ROR-abhängiger Promotoren durch die ROR α -Aktivität steigernde Substanzen auch ohne exogene ROR α -Expression. Liu et al. jedoch hätten in ihrem Experimenten, abhängig von der Konzentration an endogenem ROR α , zumindest eine mäßige Erhöhung der Luciferaseaktivität beobachten sollen - oder nachweisen, dass die von Ihnen verwendete Zelllinie ROR α -negativ ist. Die durch PGC-1 α ausgeübte Kontrolle der Genexpression ist folglich wesentlich vielschichtiger als seine Funktion als Coaktivator dies auf den ersten Blick vermuten ließe und abhängig vom zellulären Kontext ist auch in Reporteranalysen eine komplexe Regulation der Genexpression denkbar.

4.4 AKTIVITÄTSREGULATION DURCH KINASEN

ROR α und RevErb α unterliegen, wie für nukleäre Rezeptoren typisch, einer Kontrolle durch zahlreiche Kinasen. Die Ausübung dieser Kontrolle erfolgt jedoch über komplizierte Signalkaskaden und umfasst neben der Phosphory-

lierung des Rezeptors selbst (teils durch nachgeschaltete Kinasen) auch die Aktivierung oder Inaktivierung koregulatorischer Proteine [211].

4.4.1 Extrazellulär-signalregulierte Kinase 2

Hauptsächlich in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Zytokinen werden über die klassische MAPK-Kaskade ERK1 & 2 aktiviert. Der letzte Schritt dieser Aktivierung erfolgt durch MEK1 & 2, duale Serin-/Threonin- sowie Tyrosinkinase, die ein Tyr-Glu-Thr-Motiv in der T-Schleife der Kinasen phosphorylieren. Dabei findet innerhalb der Kaskade keine Amplifizierung des Signals statt, sondern in jedem Schritt eine Eins-zu-Eins-Umsetzung [215]. Hemmung der MEKs, beispielsweise durch U0126 führt zu einer effektiven und relativ selektiven Hemmung der ERKs - eine selektive Aktivierung der Kaskade ist leider schwerer zu erreichen: Häufig findet hierzu PMA/TPA Anwendung, ein Phorbol-ester, der über eine Aktivierung der PKC letztlich die MAP-Kinasen aktiviert. Es ist allerdings offensichtlich, dass durch die Verwendung der Inhibitoren und Aktivatoren keine absolut verlässliche Aussage getroffen werden kann, da jede der verwendeten Substanzen auch signifikante Aktivitäten an anderen Kinasen aufweist und die Signalkaskaden vielfältig verschränkt sind. Diese Komplexität spiegelt sich auch im von uns in Versuchen mit U0126 und PMA beobachteten, widersprüchlichen Verhalten transfizierten ROR α :

Während sich in früheren Versuchen mit 40 ng an transfiziertem pSG5-ROR α 4 eine Senkung der Luciferaseaktivität durch Inkubation mit PMA erreichen ließ [122], zeigte sich unter den verbesserten Versuchsbedingungen mit nur mehr 4 ng transfiziertem pSG5-ROR α 4 reproduzierbar eine RORE-abhängige Steigerung der Aktivität. Diese fiel, relativ zum jeweiligen Basalwert nicht mit PMA behandelten Zellen, noch deutlicher aus, wenn der transfizierte Mix kein pSG5-ROR α 4 enthielt, die Steigerung der Luciferaseaktivität also allein auf endogenem ROR α beruhte. Umgekehrt führte eine Hemmung der MEK in den früheren Versuchen zu einer Steigerung der Luciferaseaktivität, während ich in den späteren Versuchen nur eine mäßige Abschwächung beobachtete, die sich nicht signifikant von der RORE-freien Kontrolle unterschied. Allerdings war in allen Fällen der Effekt der Inkubation mit PMA durch Inkubation mit U0126 aufhebbar. Diese durch Änderung der Versuchsbedingungen erreichten, widersprüchlichen Ergebnisse, lassen sich im Vergleich der Versuchsbedingungen einzig auf die für die Transfektion verwendete Menge an pSG5-ROR α 4 zurückführen. Offensichtlich werden geringere Mengen an intrazellulärem ROR α 4 durch Aktivierung der MAP-Kinasen in ihrer Aktivität positiv beeinflusst, während größere Mengen gehemmt werden. Erklärungen für dieses unterschiedliche Verhalten zu finden erweist sich als schwer:

Niedrigere Konzentrationen transfizierter Plasmide führen zu einer geringeren Menge exprimierter Proteine, die in der Folge weniger um zelluläre Coaktivatoren konkurrieren. Auch die Konkurrenz um das Response-Element durch endogenes RevErb α spielt bei niedrigen Konzentrationen an exogenem ROR α eine größere Rolle als bei höheren. Letztere Möglichkeit

ist insbesondere deswegen interessant, da wir sowohl für ROR α als auch für RevErb α eine direkte Phosphorylierung durch ERK-2 zeigen konnten. Außerdem sinkt angesichts im Vergleich zu exogenen Proteinen niedriger endogener Kinasespiegel der Anteil an phosphoryliertem Protein mit steigender Proteinmenge, da Phosphorylierungen über den MAP-Kinase-Signalweg ohne Verstärkung des Signals erfolgen. *In silico* Untersuchungen zeigen, dass im Falle des RevErb α eine potentielle ERK-2-Phosphorylierungsstelle (Serin 55) Teil des durch GSK 3 β phosphorylierten Motivs ist, jedoch nicht das üblicherweise durch die primäre Kinase phosphorylierte Serin ist, sondern das vermutliche Ziel der GSK 3 β selbst [223]. Serin 278 ist ebenfalls Teil eines idealen ERK-2-Motivs und ist gleichzeitig das letzte Motiv eines potentiellen GSK 3 β -Motivs. Für dieses wurde keine Phosphorylierung beschrieben, was aber unter Umständen auf eine fehlende Aktivierung des Primärs durch ERK-2 zurückgeführt werden könnte. ROR α wiederum wird durch ERK-2 an Serin 128 phosphoryliert [123], ein Serin das genau 5' eines sich von Serin 130–134 erstreckenden theoretischen GSK 3 β -Motivs gelegen ist. Zusammenhänge zwischen den beiden Kinasen sind zwar spekulativ, aufgrund der Lage der potentiellen und nachgewiesenen Phosphorylierungsmotive aber vorstellbar. Auch andere posttranslationale Veränderungen der gebildeten Proteine folgen ähnlichen Gesetzmäßigkeiten. Leider ergeben sich aus unseren Versuchen keine Hinweise, welche dieser Einflüsse nach Aktivierung zellulärer Kinasen bei steigenden Proteinkonzentrationen statt zu einer Aktivierung zu einer Inaktivierung des nukleären Rezeptors führen können. Möglicherweise sind aber auch Reporteranalysen nicht das richtige Werkzeug zur Aufklärung eines relativ komplexen, an beiden Partnern des ROR α –RevErb α angreifenden, Regulationsmechanismus.

Andererseits bestätigt auch die vergleichsweise geringere Aktivierung des RORE in den stabil transfizierten Zellen (siehe Kap. 3.2.3.2), die von mir auf zellulären Stress zurückgeführt wurde, den beobachteten Effekt der Aktivierung extrazellulärer Kinasen. Behandlung transfizierter HeLa-Zellen mit PMA führte auch ohne Transfektion ROR α -produzierender Vektoren zu einer Erhöhung der Aktivität des RORE, vermutlich durch endogenes ROR α . Die relative Erhöhung dieser Aktivierung durch exogenes ROR α fällt folglich geringer aus und scheint gedämpft, wenn (wie im Fall der stabil transfizierten Zellen) keine Möglichkeit des Vergleichs mit unbehandelten Zellen besteht.

Erschwert wird die Aufklärung zusätzlich dadurch, dass es nicht gelang, Anzahl und Lage der Phosphorylierungsstellen in RevErb α aufzuklären. Da *in vitro* Kinaseanalysen für mehrfache Phosphorylierungen nicht das richtige Werkzeug darstellen, wurde auch eine Detektion phosphorylierter Peptide mittels MALDI-MS angestrebt. Hierbei konnte jedoch kein auswertbares Ergebnis erhalten werden, da sich weder nach Verdau durch Trypsin noch nach Verdau durch Elastase eine für die Detektion der Phosphorylierungsstellen ausreichende Sequenzabdeckung zeigte. Auch eine Anreicherung von Phosphopeptiden über TiO₂-Mikrosäulen führte zu keiner Verbesserung (Daten nicht gezeigt).

Es bleibt festzuhalten, dass die Phosphorylierung durch ERK-2 ein gerade aufgrund der Beteiligung von sowohl ROR α als auch RevErb α ein potentiell

hochinteressanter Regulationsmechanismus ist, dessen genaue Bedeutung jedoch durch weitere Untersuchungen genauer erhellt werden muss. Insbesondere ein *in vivo* erfolgreicher Nachweis der Phosphorylierungen, beispielsweise in radioaktiver Zellkultur, wäre äußerst wertvoll.

4.4.2 *Proteinkinase A*

Durch Signale zur Energiebereitstellung, beispielsweise die Bindung von Adrenalin oder Glucagon an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Diese Erhöhung führt über eine Aktivierung der Proteinkinase A beispielsweise zur Inaktivierung der Glycogensynthase, zur Aktivierung der Glycogenphosphorylase und somit zur vermehrten Gluconeogenese. Nukleäre Rezeptoren koppeln auf vielfältige Weise metabolische Prozesse und zirkadiane Rhythmen [54] und werden durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität beeinflusst [176]. Ich konnte in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Aktivierung der PKA, einer zentralen Kinase kataboler Stoffwechselprozesse, zu einer ausgeprägten, von der Isoform unabhängigen Aktivierung von ROR α - und damit ROR α -abhängiger Gene führt. Diese Aktivierung steht im Zusammenhang mit einer direkten Phosphorylierung von ROR α , nicht aber von RevErb α . Als Phosphorylierungsstelle konnte Serin 99 identifiziert werden, das sich in der C-terminalen Verlängerung der DNA-bindenden Domäne und somit im konstanten Bereich der ROR α -Isoformen befindet. Die CTE erfüllt wichtige Funktionen in der Erkennung des Bindungsmotivs und der Stabilisierung der monomeren DNA-Bindung nukleärer Rezeptoren. Eine Mutation des Serins beseitigte die durch Aktivierung der PKA hervorgerufene Aktivitätserhöhung aber nicht. Daraus ist zu schließen, dass PKA diese Aktivierung über mehrere, den Ausfall einzelner Komponenten kompensierende Signalwege bewirkt. Am Beispiel des galliden Progesteronrezeptors war gezeigt worden [178], dass eine Aktivierung der PKA über Phosphorylierung von SRC-1 zu einer Aktivierung des Rezeptors sogar in Abwesenheit von dessen Liganden führt. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von SRC-1 nicht in der Lage war die Aktivität von ROR α zu stimulieren [48], steht dennoch zu vermuten, dass die Vermittlung der Aktivierung auch über coaktivierende Proteine erfolgt. TIF-2, für das gezeigt werden konnte, dass es die ROR α -abhängige Gentranskription aktiviert, zeigte allerdings eine PKA-abhängige Reduktion seiner Expression [36], weswegen es weiterer Untersuchungen zur Identifizierung des verantwortlichen Coaktivators bedarf. Reporteranalysen dürften jedoch, da sie eine Arbeit mit überexprimierten Proteinen und starken Stimuli voraussetzen, nicht dazu geeignet sein zwischen den beiden Effekten zu differenzieren.

ROR α verknüpft folglich, wie auch RevErb α , metabolische Signale beispielsweise des Kohlehydratstoffwechsels mit der Gentranskription und zirkadianen Rhythmen [54, 55]. Interessanterweise führen hierbei eigentlich gegenläufige, katabole und anabole Signale zu auf Ebene der nukleären Rezeptoren gleichlaufenden Effekten: Während Glucagon über PKA zur Aktivierung ROR α -abhängiger Gene führt, bewirkt dessen endogener Gegenspieler,

Insulin, über Aktivierung der PI_3 -Kinase und letztlich PKB eine Hemmung der GSK 3β . Aktive GSK 3β bedingt neben einer Phosphorylierung und Inaktivierung der Glycogensynthase auch eine Stabilisierung von RevErb α [62, 223]. Eine Hemmung der GSK 3β durch Insulin resultiert folglich in einem Abbau von RevErb α und somit ebenfalls in einer Aktivierung ROR α -abhängiger Gene. Es ist also davon auszugehen, dass in die geschilderten Signalkaskaden auch durch weitere regulatorische Stimuli eingegriffen wird.

Auch die Beteiligung von ROR α am Lipidmetabolismus erhält durch diese Erkenntnisse eine zusätzliche Komplexität: Die Expression von SREBP $1c$ unterliegt einer Kontrolle durch ROR α [120], wobei eine Erhöhung der Aktivität von ROR α beispielsweise durch PKA die zellulären SREBP $1c$ -Spiegel erhöht. SREBP $1c$ ist allerdings eines der Schlüsselenzyme der Lipogenese, eines klassischen anabolen Stoffwechselweges und wird üblicherweise durch eine reduzierte Aktivität der GSK 3β aktiviert [108]. Möglicherweise findet hier schon in Phasen kataboler Stoffwechselsignale eine Erhöhung der SREBP $1c$ -Transkription statt, wobei die Aktivität des Proteins durch GSK 3β gehemmt wird. Während anaboler Stoffwechselphasen kann nun durch Hemmung der GSK 3β eine schnelle Aktivierung des Enzyms stattfinden, ohne dass die Notwendigkeit einer zeitaufwändigen Neusynthese bestünde. Parallel führt diese Hemmung der GSK 3β zu einem Abbau von RevErb α [223], was eine Enthemmung der ROR α -abhängigen Genexpression bewirkt und die so die Expression von SREBP $1c$ trotz Wegfalls der Aktivierung von ROR α durch PKA weiter fördert. Die Aktivierung von ROR α durch PKA könnte auch über die Regulation von SREBP $1c$ hinaus im Zusammenhang mit der vermuteten Funktion des Rezeptors als zellulärer Sensor für Cholesterinderivate stehen: Glucagon führt neben seiner Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel ebenfalls über PKA zu einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese. Möglicherweise gleicht die Aktivierung von ROR α durch PKA hierbei die Erniedrigung der Spiegel noch näher zu identifizierender Cholesterolderivate aus, die normalerweise als Liganden aktivierend auf ROR α wirken.

Unter Umständen bieten diese Ergebnisse auch weitere Hinweise darauf, dass katabole und anabole Stoffwechselwege nicht nur gegenläufige Effekte haben. Anhaltspunkte für diese These finden sich beispielsweise in der Steuerung des CREB, das durch PKA an Serin 133 phosphoryliert und somit aktiviert wird. An Serin 133 phosphoryliertes CREB wiederum ist Ziel einer Phosphorylierung durch GSK 3β an Serin 129, deren Funktion bisher noch nicht vollständig geklärt ist. Zwar wurde beschrieben, sie bewirke eine verminderte DNA-Bindung von CREB, andere Gruppen allerdings berichteten von einer vermehrten nukleären Lokalisation und Aktivierung von zweifach phosphoryliertem CREB [99].

4.4.3 Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV

Die Beteiligung von CaMKIV an der PKA-vermittelten Signaltransduktion gibt ebenfalls Hinweise auf eine enge Verknüpfung verschiedener Signalwege. Ich konnte in meinen Versuchen zeigen, dass die durch CaMKIV bewirkte

Aktivierung von ROR α zumindest teilweise über PKA erfolgt. H89, ein spezifischer Inhibitor der PKA der selbst keinen inhibitorischen Effekt auf CaMKIV ausübt [105], war in der Lage, diese Aktivierung dosisabhängig zu inhibieren.

Ungewöhnlich ist dies deswegen, da die Verknüpfung cAMP-abhängiger Signalwege mit CaMKIV üblicherweise anders beschreiben wird: Aktivierung der CaMKIV erfolgt durch Bindung aktivierten Calmodulins an sowohl CaMKIV wie auch an die CaMK-Kinase (CaMKK). Letztere phosphoryliert CaMKIV, die dann in Calcium/Calmodulinunabhängiger Form ihre Zielstrukturen phosphoryliert. Inaktivierung der CaMKIV erfolgt durch Proteinphosphatase 2 (PP2A), die bei sinkenden Calciumspiegeln aktiviert wird [169]. Calmodulin wird durch Bindung von Calciumionen aktiviert, deren intrazelluläre Konzentration durch verschiedene zelluläre Signale erhöht wird. Dazu gehören neben der Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle auch die Erhöhung intrazellulärer IP₃- und cAMP-Spiegel. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der PKA durch Forskolin und damit durch cAMP zu einer Phosphorylierung der CaMKK führt und so deren Aktivierung durch Calciumionen hemmt. Erfolgt die Erhöhung der cAMP-Spiegels jedoch nach einer Erhöhung des Calciumspiegels, wird die Hemmung der CaMKK durch PKA verhindert [193]. Die Aktivierung der CaMKIV und der PKA erfolgt über folglich über stark verschränkte Stimuli, nach Aktivierung wurden die Signalwege meist als getrennt beschreiben. So aktivieren beide CREB durch Phosphorylierung an Serin 133, beeinflussen sich dabei aber nicht gegenseitig [140, 169]. Allerdings wurde auch schon über physiologische Zusammenhänge der beiden Kinasen in virusinfizierten Makrophagen des Knochenmarks berichtet, in denen der Calcium/Calmodulin-Signalweg stromaufwärts des cAMP/PKA-Signalwegs zu liegen schien [218].

Kane und Means beschrieben in der ersten Veröffentlichung der Aktivierung von ROR α durch CaMKIV [103] eine Beteiligung der ligandenbindenden Domäne des Rezeptors an der Vermittlung des Effekts und präsentierten Ergebnisse, die auf eine Beteiligung von Coaktivatoren an der Vermittlung der Aktivierung durch CaMKIV nahelegten. Auf die Beteiligung der LBD wurde unter anderen aus Versuchen mit einer GAL₄-ROR α -LBD-Chimäre geschlossen. Zusammen mit meinen Ergebnissen ist von mehreren durch CaMKIV ausgelösten, aktivierenden Signalen auszugehen: Diese umfassen zum einen die durch CaMKIV bewirkte Aktivierung der PKA und eine daraus resultierende Phosphorylierung des Rezeptors. Leider gelang es nicht, die Phosphorylierung an Serin 99 direkt mit der Aktivierung des Rezeptors zu verknüpfen, da auch die Proteinmutante ROR α _{4-S99A} zumindest unter den artifiziellen Bedingungen der Reporteranalysen noch durch PKA aktiviert werden konnte. Dennoch ist es vorstellbar, dass die Phosphorylierung an der CTE der DNA-bindenden Domäne *in vivo* die Stabilität von ROR α oder die Bindung coregulatorischer Proteine beeinflusst. Da auch die Versuche mit der GAL₄-ROR α -LBD-Chimäre auf die Beteiligung coregulatorischer Proteine hindeuten, könnte man postulieren, dass deren Bindung den Wegfall der direkten Phosphorylierung kompensieren könnte. Meine Versuche der Kombination der ROR α -Mutante, dem PKA-Inhibitor H89 und der konstitutiv

aktiven CaMKIV deuten an, dass die Aktivierung der Coaktivatoren ebenfalls PKA-abhängig erfolgen könnte: Bei hohen Konzentrationen des Inhibitors scheint die durch CaMKIV ausgelöste Aktivierung voll reversibel zu sein. Somit könnte im physiologischen Kontext eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zu einer Aktivierung der CaMKIV führen, die in der Folge eine Aktivierung der PKA bewirkt, welche dann durch direkte Phosphorylierung des Rezeptors und Phosphorylierung coregulatorischer Proteine zu einer Aktivierung der Expression ROR α -abhängiger Gene führt. Auch eine von der CaMKIV unabhängige Aktivierung von PKA dürfte denselben Signalweg verwenden, womit erklärt werden könnte, weshalb die Mutation des PKA-Phosphorylierungsmotiv nicht zu einem Verlust der Aktivierbarkeit durch PKA führt.

4.5 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit gelang es mir, wichtige Mechanismen zur Regulation der Expression und der Aktivität der nukleären Rezeptoren ROR α und RevErb α aufzuklären. Neben der Beobachtung stabiler Sekundärstrukturen in der ROR α -mRNA sind insbesondere die den bisherigen Publikationen widersprechenden Ergebnisse des Einflusses von PGC-1 α und die Zusammenhänge zwischen ROR α , CaMKIV und PKA interessante Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen. Gerade letztere bestätigen erneut die wichtige Rolle der ROR α -RevErb α -Transkriptionsschleife in der Beeinflussung zirkadianer Rhythmen und metabolischer Prozesse sowie der Vernetzung beider Bereiche.

APPENDICES

TABELLEN

A.1 NOMENKLATUR NUKLEÄRER REZEPTOREN

Subfamilie & Gruppe	Gen	Trivialname	Zugangs- nummer
1A	NR1A1	TRa, c-erbA-1, THRA	M24748
	NR1A2	TRb, c-erbA-2, THRB	X04707
1B	NR1B1	RARa	X06538
	NR1B2	RARb, HAP	Y00291
	NR1B3	RARg, RARD	M57707
1C	NR1C1	PPARa	L02932
	NR1C2	PPARb, NUC1, PPARD, FAAR 5A	L07592
	NR1C3	PPARg	L40904
1D	NR1D1	REVERBa, EAR1, EAR1A	M24898
	NR1D2	REVERBb, EAR1b, BD73, RVR, HZF2	L31785
	NR1D3	E75	X51548
1E	NR1E1	E78, DR-78	U01087
1F	NR1F1	RORa, RZRa	U04897
	NR1F2	RORb, RZRb	Y08639
	NR1F3	RORg, TOR	U16997
	NR1F4	HR3, DHR3, MHR3, GHR3, CNR3, CHR3	M90806, U13075
1G	NR1G1	CNR14	U13074
1H	NR1H1	ECR	M74078
	NR1H2	UR, OR-1, NER1, RIP15, LXR	U07132
	NR1H3	RLD1, LXR, LXR	U22662
	NR1H4	FXR, RIP14, HRR1	U09416
1I	NR1I1	VDR	J03258
	NR1I2	ONR1, PXR, SXR, BXR	X75163
	NR1I3	MB67, CAR1, CARa	Z30425
	NR1I4	CAR2, CARb	AF00932

Subfamilie & Gruppe	Gen	Trivialname	Zugangs- nummer
1J	NR1J1	DHR96	U36792
1K	NR1K1	NHR1	U19360
2A	NR2A1	HNF4	X76930
	NR2A2	HNF4G	Z49826
	NR2A4	DHNF4, HNF4D	U70874
2B	NR2B1	RXRA	X52773
	NR2B2	RXRB, H-2RIIBP, RCoR-1	M84820
	NR2B3	RXRG	X66225
	NR2B4	USP, Ultraspiracle, 2C1, CF1	X52591
2C	NR2C1	TR2, TR2-11	M29960
	NR2C2	TR4, TAK1	L27586
2D	NR2D1	DHR78	U36791
2E	NR2E1	TLL, TLX, XTLL	S72373
	NR2E2	TLL, Tailless	M34639
2F	NR2F1	COUP-TFI, COUPTFA, EAR3, SVP44	X12795
	NR2F2	COUP-TFII, COUPTFB, ARP1, SVP40	M64497
	NR2F3	SVP, COUP-TF	M28863
	NR2F4	COUP-TFIII, COUPTFG	X63092
	NR2F5	SVP46	X70300
	NR2F6	EAR2	X12794
3A	NR3A1	ERa	X03635
	NR3A2	ERb	U57439
3B	NR3B1	ERR1, ERRa	X51416
	NR3B2	ERR2, ERRb	X51417
3C	NR3C1	GR	X03225
	NR3C2	MR	M16801
	NR3C3	PR	M15716
	NR3C4	AR	M20132
4A	NR4A1	NGFIB, TR3, N10, NUR77, NAK1	L13740
	NR4A2	NURR1, NOT, RNR1, HZF-3, TINOR	X75918
	NR4A3	NOR1, MINOR	D38530

Subfamilie & Gruppe	Gen	Trivialname	Zugangs- nummer
	NR4A4	DHR38, NGFIB, CNR8, C48D5	U36762, U13076
5A	NR5A1	SF1, ELP, FTZ-F1, AD4BP	D88155
	NR5A2	LRH1, xFF1rA, xFF1rB, FFLR, PHR, FTF	U93553
	NR5A3	FTZ-F1	M63711
5B	NR5B1	DHR39, FTZF1B	Lo6423
6A	NR6A1	GCNF1, RTR	U14666
oA	NRoA1	KNI, Knirps	X13331
	NRoA2	KNRL, Knirps related	X14153
	NRoA3	EGON, Embryonic gonad, EAGLE	X16631
	NRoA4	ODR7	U16708
	NRoA5	Trithorax	M31617
oB	NRoB1	DAX1, AHCH	S74720
	NRoB2	SHP	L76571

Tab. 2: Phylogenetische Nomenklatur der nukleären Rezeptoren: Angabe der Rezeptorsubfamilien, der nomenklatorisch korrekten Benennung der Gene und Rezeptoren, der alternativ verwendeten Trivialnamen sowie der RefSeq Zugangsnummer der einzelnen Rezeptoren; nach [44]

A.2 PCR-PRIMER

Bezeichnung	Sequenz	Lage
<i>β-Actin</i>		
bAct-fw-ME	CATTAAGGAG AAGCTGTGCT AC	Exon 4
bAct-rv-ME	GACTCGTCAT ACTCCTGCTT G	Exon 6
b-Actin-99bp-fw	CGGGACCTGA CTGACTACCT C	Exon 4
b-Actin-99bp-rv	CTTCTCCTTA ATGTCACGCA CG	Exon 4
<i>GAPDH</i>		
GAPDHnewII_fwd	TCACCAGGGC TGCTTTTAAC	Exon 3
GAPDHnewII_rev	GACAAGCTTC CCGTTCTCAG	Exon 4
<i>PGC1α</i>		
PGC1a-1352-fw	ACAGCTCCAA GACCAGGAAAT	Exon 7
PGC1a-1442-rv	GTCTTGTCTG CTTCGTCGTC	Exon 7
<i>RevErbα</i>		
RevErb-fw	CATGGTGTTA CTGTGTAAG TGTG	Exon 3
RevErb-rv	GTTGTGGAAA CTGGGAGAAG C	Exon 5
RevErb-fw-ME	CATCCAGCAG AACATCCAGT AC	Exon 4
RevEr-rv-ME	CATTGAAGTT GCCAGGTGAG	Exon 4
RevErb-101bp-fw	GCAAGGGCTT TTTCCGTCG	Exon 3-4
RevErb-101bp-rv	GCAGCGGTTG CGATTGATG	Exon 4
<i>RORα</i>		
RORa4-fw	TGTATTTTGT GATCGCAGAG	Exon 1 (α4)
RORa4-rv	CGTTGGCCGA GATGTTGTAG GT	Exon 6
RORa4-fw-Ex1-bo093	GATGTATTTT GTGATCGCAG	Exon 1(α4)
RORa4-rv-ME	GTGCCCGTCA ATGTAGTTAC	Exon 6
RORa4-101bp-fw	CTACTCCTGT CCTCGTCAGA AG	Exon 5
RORa4-101bp-rv	GAGACATCCC TACGGCAAGG	Exon 5
RORa-fw-Ex7-bo813	GCAGATAACG TGGCAGAC	Exon 7
RORa-rev-Ex9-b1032	GCACATTCTG ATAAACACCA C	Exon 9

Tab. 3: Liste der verwendeten PCR-Primer

A.3 PRIMER ZUR MUTATION

Mutante	Sequenz des Vorwärtsprimers
<i>RevErbα</i>	
S _{FIIa} A	CTGGTGCCGC GCGG GC ACA TATGACCACC CTG
S ₂₃ A	CAAGCCGCAC CG ACCTGAA TCCCTC
S ₂₈ A	CAAGCCGCAC CG ACCTGAA TCCCTC
S ₅₅ A	CTTCCCACCA GC ACCCACTG GCTC
S ₈₀ A	GTGATGACGG CG CTCCTTCT TCCTCATC
S ₉₈ A	CTATAATGGG CG CCCCCTG GGAGTC
S ₁₁₄ A	CAGCCGAGTG CG CCCAGCA AGAG
S ₂₄₀ A	GCTGGAGACT GC ACCCACCC AGC
T ₂₄₆ A	CAGCACCCCG CA CCAGGCC CATG
S ₂₅₃ A	CATGGGCCCC GC ACCACCCC CTG
S ₂₆₁ A	CTGCTCCGGT CCCC GC ACCC CTGGTG
S ₂₇₄ A	CCACAACAGC TGG CT CCTCC CAGATCC
S ₂₇₈ A	GCCTCCAGA GCT CCAAGCC CTGA
S ₂₈₀ A	CAGATCCCCA GC ACCTGAGC CCAC
S ₃₁₀ A	GCTGGGCAGC GCG CT GGCA ACTTC
S ₃₂₂ A	CATGCATCAG GT GC ACCTCC AGCCAC
S ₃₂₇ A	CTCCAGCCAC CG ACCACAT CGCTG
S ₄₀₅ A	CACCTGCCAA CG ACCCCGG CAGG
T ₄₄₄ A	CATGAGCTTC GC ACCCGCTG TGCG
<i>RORα</i>	
S _{FIIa} A	CTGGTGCCGC GCGG GC ACA TATGATGTAT TTTG
S ₄₄ A	CAAGGGCTTT TTCAGGAGAG CT CAGCAAAG CAATGCCACC
S ₆₅ A	CTGTTTGATT GATCGAACCG CT AGAAACCG CTGCCAACAC
S ₉₃ A	GTAAAATTTG GCCGAATGGC AAAA AAGCAG AGAGACAGC
S ₉₉ A	GTCAAAAAAG CAGAGAGACG CCT TGTATGC AGAAGTACA G
S ₄₂₉ A	GCCTTATGTG GACGACATGC AG AAAAGCTA ATGGCATT AAAG

Tab. 4: Liste der zur Mutation verwendeten Primer: Angegeben ist je die Sequenz des zur Punktmutation verwendeten Vorwärtsprimers. Das veränderte DNA-Triplett ist **fett** abgesetzt.

A.4 KNOCKDOWN-KONSTRUKTE

Zielgen	cDNA-Sequenz
PGC-1 α	GACCAGCCTC TTTGCCAGT TCAAGAGACT GGGCAAAGAG GCTGGTCTT
GAPDH	GTGGATATTG TTTGCCATCA TTCAAGAGAT GATGGCAACA ATATCCAC
n. b.*	ACTACCGTTG TTATAGGTGT TCAAGAGACA CCTATAACAA CGGTAGT

Tab. 5: Liste der verwendeten *sh*RNAs: Angegeben ist je die codogene Sequenz der in *pSilencer*TMklonierten cDNA, aus der intrazellulär *sh*RNA transkribiert wurde. Die 7–9 Nukleotide lange Schleife zwischen den komplementären Sequenzen ist **fett** abgesetzt.

*: n. b. = die kein humanes Gentranskript bindende Negativkontrolle

A.5 VERWENDETE ANTIKÖRPER

Ziel/Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Actin (I-19)	goat polyclonal IgG	Santa Cruz sc1616
CREB (48H2)	rabbit monoclonal IgG	Cell Signaling #9197
GAPDH (14C10)	rabbit monoclonal IgG	Cell Signaling #2118
Myc-Tag (9B11)	mouse monoclonal IgG2a	Cell Signaling #2276
PGC-1 α (3G6)	rabbit monoclonal IgG	Cell Signaling #2178
PGC-1 (H-300)	rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz sc-13067
<i>h</i> RevErb α (A8740A)	mouse polyclonal IgG	R & D Systems Antikörper 2ZA8740AH
IRDye 680 Anti-goat IgG (H+L)	donkey polyclonal IgG	Li-Cor 926-32224
IRDye 800 CW Anti-mouse IgG	donkey polyclonal IgG	Biomol 610-731-124
IRDye 800 CW Anti-rabbit IgG	donkey polyclonal IgG	Biomol 610-731-127
IRDye 680 Anti-rabbit IgG (H+L)	donkey polyclonal IgG	Li-Cor 926-32223

Tab. 6: Liste der verwendeten Antikörper

-
- [1] D. ACUÑA-CASTROVIEJO; M. I. PABLOS; A. MENENDEZ-PELAEZ & R. J. REITER: Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver, in: *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 82 (1993) S. 253–256.
- [2] D. ACUÑA-CASTROVIEJO; R. J. REITER; A. MENENDEZ-PELAEZ; M. I. PABLOS & A. BURGOS: Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver, in: *Journal of Pineal Research* 16 (1994) S. 100–112.
- [3] P. D. ADAMS & M. OHH: Identification of Associated Proteins by Coimmunoprecipitation, in: J. SAMBROOK & D. W. RUSSELL (Hg.), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Bd. 3, 3. Aufl., Kap. 18, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA (2001) S. 18.60–18.68.
- [4] G. ADELMANT; A. BÈGUE; D. STÉHELIN & V. LAUDET: A functional Rev-erb alpha responsive element located in the human Rev-erb alpha promoter mediates a repressing activity., in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996) S. 3553–3558.
- [5] M. AKASHI & T. TAKUMI: The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1, in: *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (2005) S. 441–448.
- [6] B. D. ALMOND; A. ZDANOVSKY; M. ZDANOVSKAIA; D. MA; P. STECHA; A. PAGUIO; D. GARVIN & K. WOOD: Introducing the Rapid Response™ Reporter Vectors, Promega Notes 87, Promega Corporation (2004).
- [7] AMBION: *pSilencer™ 4.1-CMV neo*, Ambion Inc., Austin, Texas, USA, 0506. Aufl. (2006).
- [8] A. ARANDA & A. PASCUAL: Nuclear hormone receptors and gene expression, in: *Physiological Reviews* 81 (2001) S. 1269–1304.
- [9] A. ASCHRAFI: Regulation mechanisms of the nuclear receptor RORalpha, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2004).
- [10] A. ASCHRAFI; N. MEINDL; B. FIRLA; R. P. BRANDES & D. STEINHILBER: Intracellular localization of RORalpha is isoform and cell line-dependent, in: *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (2006) S. 805–814.

- [11] D. AUBOEUF; E. BATSCHÉ; M. DUTERTRE; C. MUCHARDT & B. W. O'MALLEY: Coregulators: transducing signal from transcription to alternative splicing, in: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18 (2007) S. 122–129.
- [12] E. S. BALAKIREV & F. J. AYALA: Pseudogenes: Are They Junk or Functional DNA?, in: *Annual Review of Genetics* 37 (2003) S. 123–151.
- [13] A. D. BASEHOAR; S. J. ZANTON & B. PUGH: Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes, in: *Cell* 116 (2004) S. 699–709.
- [14] B. L. BASS: RNA Editing by Adenosine Deaminases That Act on RNA, in: *Annual Review of Biochemistry* 71 (2002) S. 817–846.
- [15] M. BECKER-ANDRÉ; E. ANDRÉ & J. F. DELAMARTER: Identification of Nuclear Receptor mRNAs by RT-PCR Amplification of Conserved Zinc-Finger Motif Sequences, in: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194 (1993) S. 1371–1379.
- [16] M. BECKER-ANDRÉ; I. WIESENBERG; N. SCHAEAREN-WIEMERS; E. ANDRÉ; M. MISSBACH; J.-H. SAURAT & C. CARLBERG: Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily., in: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) S. 16 707.
- [17] M. BECKER-ANDRÉ; I. WIESENBERG; N. SCHAEAREN-WIEMERS; E. ANDRÉ; M. MISSBACH; J. H. SAURAT & C. CARLBERG: Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily, in: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) S. 28 531–28 534.
- [18] G. BENOIT; A. COONEY; V. GIGUÈRE; H. INGRAHAM; M. LAZAR; G. MUSCAT; T. PERLMANN; J.-P. RENAUD; J. SCHWABE; F. SLADEK; M.-J. TSAI & V. LAUDET: International Union of Pharmacology LXVI. Orphan Nuclear Receptors, in: *Pharmacological Reviews* 58 (2006) S. 798–836.
- [19] L. A. BERKOWITZ & M. Z. GILMAN: Two distinct forms of active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein), in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1990) S. 5258–5262.
- [20] S. BESNARD; C. HEYMES; R. Merval; M. RODRIGUEZ; J.-P. GALIZZI; J. A. BOUTIN; J. MARIANI & A. TEDGUI: Expression and regulation of the nuclear receptor RORalpha in human vascular cells., in: *FEBS Lett* 511 (2002) S. 36–40.
- [21] S. BESNARD; J. S. SILVESTRE; M. DURIEZ; J. BAKOUCHE; Y. LEMAIGRE-DUBREUIL; J. MARIANI; B. I. LEVY & A. TEDGUI: Increased ischemia-induced angiogenesis in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor Roralpha., in: *Circulation Research* 89 (2001) S. 1209–1215.
- [22] E. BETTELLI; T. KORN; M. OUKKA & V. K. KUCHROO: Induction and effector functions of T(H)17 cells., in: *Nature* 453 (2008) S. 1051–1057.

- [23] BIO RAD: *Bio-Rad Protein Assay*, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA, c. Aufl. (1999).
- [24] B. E. BLACK; J. M. HOLASKA; F. RASTINEJAD & B. M. PASCHAL: DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals, in: *Current Biology* 11 (2001) S. 1749–1758.
- [25] D. S. BOAM; A. R. CLARK & K. DOCHERTY: Positive and negative regulation of the human insulin gene by multiple trans-acting factors, in: *Journal of Biological Chemistry* 265 (1990) S. 8285–8296.
- [26] M. BOCQUEL; V. KUMAR; C. STRICKER; P. CHAMBON & H. GRONEMEYER: The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific, in: *Nucleic Acids Research* 17 (1989) S. 2581–2595.
- [27] K. BOMSZTYK; O. DENISENKO & J. OSTROWSKI: hnRNP K: one protein multiple processes, in: *Bioessays* 26 (2004) S. 629–638.
- [28] F. BOUKHTOUCHE; S. JANMAAT; G. VODJDANI; V. GAUTHERON; J. MALLET; I. DUSART & J. MARIANI: Retinoid-related orphan receptor alpha controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation., in: *Journal of Neuroscience* 26 (2006) S. 1531–1538.
- [29] W. BOURGUET; M. RUFF; P. CHAMBON; H. GRONEMEYER & D. MORAS: Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha, in: *Nature* 375 (1995) S. 377–382.
- [30] W. BOURGUET; V. VIVAT; J.-M. WURTZ; P. CHAMBON; H. GRONEMEYER & D. MORAS: Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR and RXR Ligand-Binding Domains, in: *Molecular Cell* 5 (2000) S. 289–298.
- [31] K. BOZEK; A. RELOGIO; S. M. KIELBASA; M. HEINE; C. DAME; A. KRAMER & H. HERZEL: Regulation of clock-controlled genes in mammals, in: *PLoS One* 4 (2009) S. e4882.
- [32] M. M. BRADFORD: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, in: *Analytical Biochemistry* 72 (1976) S. 248–254.
- [33] J. BRENNER & S. M. COHEN: Towards a complete description of the microRNA complement of animal genomes, in: *Genome Biology* 4 (2003) S. 228.
- [34] I. BRIERLEY; S. PENNELL & R. J. C. GILBERT: Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication., in: *Nature Reviews Microbiology* 5 (2007) S. 598–610.
- [35] T. BROWN; K. MACKEY & T. DU: Analysis of RNA by Northern and Slot Blot Hybridization, in: *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 4 (2004) S. Unit 4.9.

- [36] B. BØRUD; T. HOANG; M. BAKKE; A. L. JACOB; J. LUND & G. MELLGREN: The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1., in: *Molecular Endocrinology* 16 (2002) S. 757–773.
- [37] K. BURNS; B. DUGGAN; E. A. ATKINSON; K. S. FAMULSKI; M. NEMER; R. C. BLEACKLEY & M. MICHALAK: Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor, in: *Nature* 367 (1994) S. 476–480.
- [38] T. P. BURRIS: Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock, in: *Molecular Endocrinology* 22 (2008) S. 1509–1520.
- [39] P. CHAMBON: A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, in: *FASEB Journal* 10 (1996) S. 940–954.
- [40] V. CHANDRA; P. HUANG; Y. HAMURO; S. RAGHURAM; Y. WANG; T. P. BURRIS & F. RASTINEJAD: Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA, in: *Nature* 456 (2008) S. 350–356.
- [41] C. CHAUVET; B. BOIS-JOYEUX; E. BERRA; J. POUYSSEGUR & J. L. DANAN: The gene encoding human retinoic acid-receptor-related orphan receptor alpha is a target for hypoxia-inducible factor 1, in: *Biochemical Journal* 384 (2004) S. 79–85.
- [42] C. CHAUVET; B. BOIS-JOYEUX & J.-L. DANAN: Retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) alpha4 is the predominant isoform of the nuclear receptor RORalpha in the liver and is up-regulated by hypoxia in HepG2 human hepatoma cells., in: *Biochemical Journal* 364 (2002) S. 449–456.
- [43] P. COHEN & S. FRAME: Glycogen Synthase Kinase 3, in: E. A. DENNIS & R. A. BRADSHAW (Hg.), *Handbook of Cell Signaling*, Bd. 1, Kap. 91, Academic Press, Amsterdam, NL (2003) S. 547–550.
- [44] N. R. COMMITTEE: A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily, in: *Cell* 97 (1999) S. 1–20.
- [45] R. B. CORCORAN & M. P. SCOTT: Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells., in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) S. 8408–8413.
- [46] H. COSTE & J. C. RODRÍGUEZ: Orphan nuclear hormone receptor Rev-erbalpha regulates the human apolipoprotein CIII promoter., in: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) S. 27 120–27 129.
- [47] S. DEDHAR; P. S. RENNIE; M. SHAGO; C. Y. HAGESTEIJN; H. YANG; J. FILMUS; R. G. HAWLEY; N. BRUCHOVSKY; H. CHENG; R. J. MATUSIK & ET AL.:

- Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin, in: *Nature* 367 (1994) S. 480–483.
- [48] P. DELERIVE; W. W. CHIN & C. S. SUEN: Identification of Rev-erb(α) as a novel ROR(α) target gene, in: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) S. 35 013–35 018.
- [49] P. DELERIVE; D. MONTE; G. DUBOIS; F. TROTTEIN; J. FRUCHART-NAJIB; J. MARIANI; J. C. FRUCHART & B. STAELS: The orphan nuclear receptor ROR α is a negative regulator of the inflammatory response, in: *EMBO Reports* 2 (2001) S. 42–48.
- [50] E. A. DENNIS & R. A. BRADSHAW (Hg.): *Handbook of Cell Singaling*, 1. Aufl., Academic Press, Amsterdam, NL (2003).
- [51] B. W. DOBLE & J. R. WOODGETT: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase., in: *Journal of Cell Science* 116 (2003) S. 1175–1186.
- [52] J. DU; C. HUANG; B. ZHOU & S. F. ZIEGLER: Isoform-specific inhibition of ROR α -mediated transcriptional activation by human FOXP3., in: *Journal of Immunology* 180 (2008) S. 4785–4792.
- [53] M. L. DUBOCOVICH; P. DELAGRANGE; D. N. KRAUSE; D. SUGDEN; D. P. CARDINALI & J. OLCESE: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors., in: *Pharmacological Reviews* 62 (2010) S. 343–380.
- [54] H. DUEZ & B. STAELS: The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism, in: *Diabetes & Vascular Disease Research* 5 (2008) S. 82–88.
- [55] H. DUEZ & B. STAELS: Nuclear receptors linking circadian rhythms and cardiometabolic control., in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (2010) S. 1529–1534.
- [56] E. DUPLUS; C. GRAS; V. SOUBEYRE; G. VODJDANI; Y. LEMAIGRE-DUBREUIL & B. BRUGG: Phosphorylation and transcriptional activity regulation of retinoid-related orphan receptor α 1 by protein kinases C, in: *Journal of Neurochemistry* 104 (2008) S. 1321–1332.
- [57] I. DZHAGALOV; V. GIGUÈRE & Y. W. HE: Lymphocyte development and function in the absence of retinoic acid-related orphan receptor α , in: *Journal of Immunology* 173 (2004) S. 2952–2959.
- [58] J. L. ESTALL; J. L. RUAS; C. S. CHOI; D. LAZNIK; M. BADMAN; E. MARATOS-FLIER; G. I. SHULMAN & B. M. SPIEGELMAN: PGC-1 α negatively regulates hepatic FGF21 expression by modulating the heme/Rev-erb(α) axis., in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009) S. 22 510–22 515.
- [59] H. FAUS & B. HAENDLER: Post-translational modifications of steroid receptors., in: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60 (2006) S. 520–528.

- [60] B. N. FINCK & D. P. KELLY: PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease, in: *Journal of Clinical Investigation* 116 (2006) S. 615–622.
- [61] B. M. FORMAN; J. CHEN; B. BLUMBERG; S. A. KLIEWER; R. HENSHAW; E. S. ONG & R. M. EVANS: Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors, in: *Molecular Endocrinology* 8 (1994) S. 1253–12 161.
- [62] S. FRAME & P. COHEN: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery, in: *Biochemical Journal* 359 (2001) S. 1–16.
- [63] L. J. FREHLICK; J. M. EIRÍN-LÓPEZ & J. AUSIÓ: New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones, in: *Bioessays* 29 (2007) S. 49–59.
- [64] M. GALLEGO & D. M. VIRSHUP: Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock., in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007) S. 139–148.
- [65] E. GASTEIGER; C. HOOGLAND; A. GATTIKER; S. DUVAUD; M. R. WILKINS; R. D. APPEL & A. BAIROCH: Protein Identification and Analysis Tools on the EXPASy Server, in: J. M. WALKER (Hg.), *The Proteomics Protocols Handbook*, Kap. 52, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA (2005) S. 571–607.
- [66] P. VAN DER GEER; K. LUO; B. M. SEFTON & T. HUNTER: Phosphopeptide Mapping and phosphoamino acid analysis on cellulose thin-layer plates, in: D. HARDIE (Hg.), *Protein Phosphorylation - A practical approach*, 2. Aufl., Kap. 5, Oxford University Press, New York, USA (1999) S. 97–126.
- [67] C. C. GEILEN; M. WIEPRECHT; T. WIEDER & W. REUTTER: A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl (amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells., in: *FEBS Letters* 309 (1992) S. 381–384.
- [68] P. GELEBART; M. OPAS & M. MICHALAK: Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, in: *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005) S. 260–266.
- [69] P. GERMAIN; B. STAELS; C. DACQUET; M. SPEDDING & V. LAUDET: Overview of nomenclature of nuclear receptors, in: *Pharmacological Reviews* 58 (2006) S. 685–704.
- [70] P. GERVOIS; S. CHOPIN-DELANNOY; A. FADEL; G. DUBOIS; V. KOSYKH; J. C. FRUCHART; J. NAJIB; V. LAUDET & B. STAELS: Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element., in: *Molecular Endocrinology* 13 (1999) S. 400–409.

- [71] V. GIGUÈRE: Orphan nuclear receptors: from gene to function, in: *Endocrine Reviews* 20 (1999) S. 689–725.
- [72] V. GIGUÈRE; L. D. MCBROOM & G. FLOCK: Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor, in: *Molecular and Cellular Biology* 15 (1995) S. 2517–2526.
- [73] V. GIGUÈRE; M. TINI; G. FLOCK; E. ONG; R. M. EVANS & G. OTULAKOWSKI: Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors, in: *Genes & Development* 8 (1994) S. 538–553.
- [74] C. K. GLASS: Differential Recognition of Target Genes by Nuclear Receptor Monomers, Dimers, and Heterodimers, in: *Endocrine Reviews* 15 (1994) S. 391–407.
- [75] T. W. GLOVER: Common fragile sites, in: *Cancer Letters* 232 (2006) S. 4–12.
- [76] T. W. GLOVER; M. F. ARLT; A. M. CASPER & S. G. DURKIN: Mechanisms of common fragile site instability, in: *Human Molecular Genetics* 14 Spec No. 2 (2005) S. R197–205.
- [77] D. A. GOLD; S. H. BAEK; N. J. SCHORK; D. W. ROSE; D. D. LARSEN; B. D. SACHS; M. G. ROSENFELD & B. A. HAMILTON: RORalpha coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways., in: *Neuron* 40 (2003) S. 1119–1131.
- [78] D. A. GOLD; P. M. GENT & B. A. HAMILTON: ROR alpha in genetic control of cerebellum development: 50 staggering years, in: *Brain Research* 1140 (2007) S. 19–25.
- [79] D. A. GOLOMBEK & R. E. ROSENSTEIN: Physiology of circadian entrainment., in: *Physiol Rev* 90 (2010) S. 1063–1102.
- [80] C. HANDSCHIN; J. LIN; J. RHEE; A.-K. PEYER; S. CHIN; P.-H. WU; U. A. MEYER & B. M. SPIEGELMAN: Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha., in: *Cell* 122 (2005) S. 505–515.
- [81] H. P. HARDING & M. A. LAZAR: The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element., in: *Molecular and Cellular Biology* 13 (1993) S. 3113–3121.
- [82] H. P. HARDING & M. A. LAZAR: The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat., in: *Molecular and Cellular Biology* 15 (1995) S. 4791–4802.
- [83] J. M. HARRIS; P. LAU; S. L. CHEN & G. E. MUSCAT: Characterization of the retinoid orphan-related receptor-alpha coactivator binding interface: a structural basis for ligand-independent transcription, in: *Molecular Endocrinology* 16 (2002) S. 998–1012.

- [84] H. B. HARTMAN; J. YU; T. ALENGHAT; T. ISHIZUKA & M. A. LAZAR: The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3, in: *EMBO Reports* 6 (2005) S. 445–451.
- [85] M. L. HASTINGS; H. A. INGLE; M. A. LAZAR & S. H. MUNROE: Post-transcriptional Regulation of Thyroid Hormone Receptor Expression by cis-Acting Sequences and a Naturally Occurring Antisense RNA, in: *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) S. 11 507–11 513.
- [86] P. HERRLICH: Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1, in: *Oncogene* 20 (2001) S. 2465–2475.
- [87] K. HERRUP & R. J. MULLEN: Staggerer chimeras: Intrinsic nature of purkinje cell defects and implications for normal cerebellar development, in: *Brain Research* 178 (1979) S. 443–457.
- [88] A. J. HÖRLEIN; A. M. NÄÄR; T. HEINZEL; J. TORCHIA; B. GLOSS; R. KUROKAWA; A. RYAN; Y. KAMEI; M. SÖDERSTRÖM & C. K. GLASS: Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor., in: *Nature* 377 (1995) S. 397–404.
- [89] X. HU & M. A. LAZAR: The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors, in: *Nature* 402 (1999) S. 93–96.
- [90] E. J. HWANG; J. M. LEE; J. JEONG; J. H. PARK; Y. YANG; J. S. LIM; J. H. KIM; S. H. BAEK & K. I. KIM: SUMOylation of RORalpha potentiates transcriptional activation function, in: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (2009) S. 513–517.
- [91] M. ICHIDA; S. NEMOTO & T. FINKEL: Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1alpha)., in: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) S. 50 991–50 995.
- [92] K. ICHIYAMA; H. YOSHIDA; Y. WAKABAYASHI; T. CHINEN; K. SAEKI; M. NAKAYA; G. TAKAESU; S. HORI; A. YOSHIMURA & T. KOBAYASHI: Foxp3 inhibits RORgamma-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgamma., in: *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) S. 17 003–17 008.
- [93] D. JENKINS: Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways., in: *Cell Signal* 21 (2009) S. 1023–1034.
- [94] A. M. JETTEN: Recent advances in the mechanisms of action and physiological functions of the retinoid-related orphan receptors (RORs), in: *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy* 3 (2004) S. 395–412.
- [95] A. M. JETTEN: Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism, in: *Nuclear Receptor Signalling* 7 (2009) S. e003.

- [96] A. M. JETTEN; S. KUREBAYASHI & E. UEDA: The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes, in: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 69 (2001) S. 205–247.
- [97] A. M. JETTEN & E. UEDA: Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cell survival, differentiation and disease, in: *Cell Death and Differentiation* 9 (2002) S. 1167–1171.
- [98] R. JOCKERS; P. MAURICE; J. A. BOUTIN & P. DELAGRANGE: Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?, in: *British Journal of Pharmacology* 154 (2008) S. 1182–1195.
- [99] M. JOHANNESSEN; M. P. DELGHANDI & U. MOENS: What turns CREB on?, in: *Cell Signalling* 16 (2004) S. 1211–1227.
- [100] N. Y. KALAANY; K. C. GAUTHIER; A. M. ZAVACKI; P. P. A. MAMMEN; T. KITAZUME; J. A. PETERSON; J. D. HORTON; D. J. GARRY; A. C. BIANCO & D. J. MANGELSDORF: LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation., in: *Cell Metabolism* 1 (2005) S. 231–244.
- [101] J. KALLEN; J. M. SCHLAEPPI; F. BITSCH; I. DELHON & B. FOURNIER: Crystal structure of the human RORalpha Ligand binding domain in complex with cholesterol sulfate at 2.2 Å, in: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) S. 14 033–14 038.
- [102] J. A. KALLEN; J. M. SCHLAEPPI; F. BITSCH; S. GEISSE; M. GEISER; I. DELHON & B. FOURNIER: X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha, in: *Structure* 10 (2002) S. 1697–1707.
- [103] C. D. KANE & A. R. MEANS: Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV, in: *EMBO Journal* 19 (2000) S. 691–701.
- [104] H. S. KANG; M. ANGERS; J. Y. BEAK; X. WU; J. M. GIMBLE; T. WADA; W. XIE; J. B. COLLINS; S. F. GRISSOM & A. M. JETTEN: Gene expression profiling reveals a regulatory role for ROR alpha and ROR gamma in phase I and phase II metabolism., in: *Physiological Genomics* 31 (2007) S. 281–294.
- [105] J. KASAHARA; K. FUKUNAGA & E. MIYAMOTO: Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region., in: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) S. 24 044–24 050.
- [106] Y. KAWAKAMI; M. TSUDA; S. TAKAHASHI; N. TANIGUCHI; C. R. ESTEBAN; M. ZEMMYO; T. FURUMATSU; M. LOTZ; J. C. I. BELMONTE & H. ASAHARA: Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9., in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) S. 2414–2419.

- [107] P. J. KENNELLY & E. G. KREBS: Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases., in: *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) S. 15 555–15 558.
- [108] Y.-M. KIM; Y.-H. SEO; C.-B. PARK; S.-H. YOON & G. YOON: Roles of GSK3 in metabolic shift toward abnormal anabolism in cell senescence., in: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201 (2010) S. 65–71.
- [109] R. E. KINGSTON; C. A. CHEN & H. OKAYAMA: Calcium Phosphate Transfection, in: *Current Protocols in Cell Biology Suppl.* 19 (2003) S. 20.3.1–8.
- [110] T. KISS: Small Nucleolar RNAs: An Abundant Group of Noncoding RNAs with Diverse Cellular Functions, in: *Cell* 109 (2002) S. 145–148.
- [111] R. KNIPPERS: *Molekulare Genetik*, 9. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, D (2006).
- [112] C. H. KO & J. S. TAKAHASHI: Molecular components of the mammalian circadian clock, in: *Human Molecular Genetics* 15 Spec No 2 (2006) S. R271–277.
- [113] T. KORN; E. BETTELLI; M. OUKKA & V. K. KUCHROO: IL-17 and Th17 Cells, in: *Annual Review of Immunology* 27 (2009) S. 485–517.
- [114] C. KRAMER; J. J. LOROS; J. C. DUNLAP & S. K. CROSTWAITE: Role for antisense RNA in regulating circadian clock function in *Neurospora crassa*, in: *Nature* 421 (2003) S. 948–952.
- [115] A. KRUST; S. GREEN; P. ARGOS; V. KUMAR; P. WALTER; J. BORNERT & P. CHAMBON: The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors., in: *EMBO Journal* 5 (1986) S. 891–897.
- [116] R. KUMAR & G. LITWACK: Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain, in: *Steroids* 74 (2009) S. 877–883.
- [117] V. KUMAR; S. GREEN; G. STACK; M. BERRY & P. CHAMBON: Functional domains of the human estrogen receptor, in: *Cell* 51 (1987) S. 941–951.
- [118] C. KUNICK; K. LAUENROTH; M. LEOST; L. MEIJER & T. LEMCKE: 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta., in: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 14 (2004) S. 413–416.
- [119] U. LAEMMLI: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, in: *Nature* 227 (1970) S. 680–685.
- [120] P. LAU; R. FITZSIMMONS; S. RAICHUR; S. C. WANG; A. LECHTKEN & G. E. MUSCAT: The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (sg/sg) mice are resistant to diet induced obesity, in: *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) S. 18 411–18 421.

- [121] V. LAUDET & H. GRONEMEYER: *The Nuclear Receptor*, 1. Aufl., Facts Book, Academic Press, London, UK (2002).
- [122] A. LECHTKEN: Overexpression and analysis on posttranslational modification of the Retinoic Acid Related Orphan Receptor α_4 , Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2007).
- [123] A. LECHTKEN; M. HÖRNIG; O. WERZ; N. CORVEY; I. ZÜNDORF; T. DINGERMANN; R. BRANDES & D. STEINHILBER: Extracellular signal-regulated kinase-2 phosphorylates ROR α_4 in vitro, in: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358 (2007) S. 890–896.
- [124] A. LECHTKEN & G. MUSCAT: GSK3 acts on ROR α (2008), nicht veröffentlichte, persönliche Information.
- [125] A. LECHTKEN; I. ZÜNDORF; T. DINGERMANN; B. FIRLA & D. STEINHILBER: Overexpression, refolding, and purification of polyhistidine-tagged human retinoic acid related orphan receptor ROR α_4 , in: *Protein Expression and Purification* 49 (2006) S. 114–120.
- [126] J. M. LEE; I. S. KIM; H. KIM; J. S. LEE; K. KIM; H. Y. YIM; J. JEONG; J. H. KIM; J.-Y. KIM; H. LEE; S.-B. SEO; H. KIM; M. G. ROSENFELD; K. I. KIM & S. H. BAEK: ROR α attenuates Wnt/beta-catenin signaling by PKC α -dependent phosphorylation in colon cancer., in: *Molecular Cell* 37 (2010) S. 183–195.
- [127] M. S. LEE; S. A. KLIEWER; J. PROVENCAL; P. E. WRIGHT & R. M. EVANS: Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding, in: *Science* 260 (1993) S. 1117–1121.
- [128] B. LEHNER; G. WILLIAMS; R. D. CAMPBELL & C. M. SANDERSON: Anti-sense transcripts in the human genome, in: *Trends in Genetics* 18 (2002) S. 63–65.
- [129] A. C. LIU; H. G. TRAN; E. E. ZHANG; A. A. PRIEST; D. K. WELSH & S. A. KAY: Redundant function of REV-ERB α and beta and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms, in: *PLoS Genetics* 4 (2008) S. e1000023.
- [130] C. LIU; S. LI; T. LIU; J. BORJIGIN & J. D. LIN: Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism, in: *Nature* 447 (2007) S. 477–481.
- [131] D. M. LONARD & B. W. O'MALLEY: Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation, in: *Molecular Cell* 27 (2007) S. 691–700.
- [132] R. LÖSEL & M. WEHLING: Nongenomic actions of steroid hormones, in: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (2003) S. 46–56.

- [133] F. LUCHETTI; B. CANONICO; M. BETTI; M. ARCANGELETTI; F. PILOLLI; M. PIRODDI; L. CANESI; S. PAPA & F. GALLI: Melatonin signaling and cell protection function., in: *FASEB Journal* 24 (2010) S. 3603–3624.
- [134] B. LUISI; W. XU; Z. OTWINOWSKI; L. FREEDMAN; K. YAMAMOTO & P. SIGLER: Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA, in: *Nature* 352 (1991) S. 497–505.
- [135] M. MACÍAS; G. ESCAMES; J. LEON; A. COTO; Y. SBIHI; A. OSUNA & D. ACUÑA-CASTROVIEJO: Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship, in: *European Journal of Biochemistry / FEBS* 270 (2003) S. 832–840.
- [136] M. P. DI MAGLIANO & M. HEBROK: Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance., in: *Nature Reviews Cancer* 3 (2003) S. 903–911.
- [137] A. MAMONTOVA; S. SÉGURET-MACÉ; B. ESPOSITO; C. CHANIALE; M. BOULY; N. DELHAYE-BOUCHAUD; G. LUC; B. STAELS; N. DUVERGER; J. MARIANI & A. TEDGUI: Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor ROR α ., in: *Circulation* 98 (1998) S. 2738–2743.
- [138] S. MANZINI; A. VARGIOLU; I. M. STEHLE; M. L. BACCI; M. G. CERRITO; R. GIOVANNONI; A. ZANNONI; M. R. BIANCO; M. FORNI; P. DONINI; M. PAPA; H. J. LIPPS & M. LAVITRANO: Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector., in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) S. 17672–17677.
- [139] G. L. MARTELOT; T. CLAUDEL; D. GATFIELD; O. SCHAAD; B. KORNMANN; G. L. SASSO; A. MOSCHETTA & U. SCHIBLER: REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis., in: *PLoS Biology* 7 (2009) S. e1000181.
- [140] R. P. MATTHEWS; C. R. GUTHRIE; L. M. WAILES; X. ZHAO; A. R. MEANS & G. S. MCKNIGHT: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression., in: *Molecular and Cellular Biology* 14 (1994) S. 6107–6116.
- [141] D. N. MEINDL: Identifizierung und Charakterisierung des ROR α - Promotors, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2004).
- [142] G. MEINKE & P. B. SIGLER: DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B, in: *Nature Structural Biology* 6 (1999) S. 471–477.
- [143] Q. J. MENG; A. MCMASTER; S. BEESLEY; W. Q. LU; J. GIBBS; D. PARKS; J. COLLINS; S. FARROW; R. DONN; D. RAY & A. LOUDON: Ligand modulation of REV-ERB α function resets the peripheral circadian clock in a phasic manner, in: *Journal of Cell Science* 121 (2008) S. 3629–3635.

- [144] S. MINUCCI; M. LEID; R. TOYAMA; J.-P. SAINT-JEANNET; V. J. PETERSON; V. HORN; J. E. ISHMAEL; N. BHATTACHARYYA; A. DEY; I. B. DAWID; & K. OZATO: Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression, in: *Molecular and Cellular Biology* 17 (1997) S. 644–655.
- [145] M. MISSBACH; B. JAGHER; I. SIGG; S. NAYERI; C. CARLBERG & I. WIESENBERG: Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity, in: *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) S. 13 515–13 522.
- [146] M. MONSALVE; Z. WU; G. ADELMANT; P. PUIGSERVER; M. FAN & B. M. SPIEGELMAN: Direct Coupling of Transcription and mRNA Processing through the Thermogenic Coactivator PGC-1, in: *Molecular Cell* 6 (2000) S. 307–316.
- [147] A. N. MORAITIS & V. GIGUÈRE: The co-repressor hairless protects RORalpha orphan nuclear receptor from proteasome-mediated degradation., in: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) S. 52 511–52 518.
- [148] R. MORTENSEN; J. D. CHESNUT; J. P. HOEFFLER & R. E. KINGSTON: Selection of Transfected Mammalian Cells, in: *Current Protocols in Molecular Biology* Supp. 62 (1997) S. 9.5.1–19.
- [149] N. N.: *Hunter Thin Layer Peptide Mapping Electrophoresis System - Model No. HTLE-7000 - Laboratory Manual*, C.B.S. Scientific Company, Inc, Del Mar, CA, USA, 8-15-03. Aufl. (2003).
- [150] L. NAGY; H.-Y. KAO; J. D. LOVE; C. LI; E. BANAYO; J. T. GOOCH; V. KRISHNA; K. CHATTERJEE; R. M. EVANS & J. W. SCHWABE: Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors, in: *Genes & Development* 13 (1999) S. 3209–3216.
- [151] NEWENGLANDBIOLABS: *Rubidium Chloride Transformation Protocol*, NEB, Ipswich, MA, USA, http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/rbcl_transformation_protocol.asp, abgerufen am 10.02.2010.
- [152] N. C. NICOLAIDES; Z. GALATAA; T. KINOB; G. P. CHROUSOSA & E. CHARMANDARI: The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function, in: *Steroids* 75 (2010) S. 1–12.
- [153] N. NOVAC & T. HEINZEL: Nuclear Receptors: Overview and Classification, in: *Current Drug Target - Inflammation & Allergy* 3 (2004) S. 335–346.
- [154] NURSA.ORG: Circadian expression patterns of nuclear receptors, online (2005), zuletzt abgerufen am 24.09.2010.
- [155] H. ODAWARA; T. IWASAKI; J. HORIGUCHI; N. ROKUTANDA; K. HIROOKA; W. MIYAZAKI; Y. KOIBUCHI; N. SHIMOKAWA; Y. IINO; I. TAKEYOSHI & N. KOIBUCHI: Activation of aromatase expression by retinoic acid

- receptor-related orphan receptor (ROR) alpha in breast cancer cells: identification of a novel ROR response element., in: *Journal of Biological Chemistry* 284 (2009) S. 17711–17719.
- [156] M. OKUWAKI: The structure and functions of NPM1 / Nucleophosmin / B23, a multifunctional nucleolar acidic protein., in: *Journal of Biochemistry* 143 (2008) S. 441–448.
- [157] F. OYAMA; R. KIKUCHI & T. UCHIDA: A Synthetic, Partial Pre-mRNA for Ovalbumin Primes Its Own Complementary DNA with Reverse Transcriptase, in: *Journal of Biochemistry* 104 (1988) S. 403–408.
- [158] P. J. PADDISON; A. A. CAUDY; E. BERNSTEIN; G. J. HANNON & D. S. CONKLIN: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells., in: *Genes & Development* 16 (2002) S. 948–958.
- [159] V. PERISSI & M. G. ROSENFELD: Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles, in: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (2005) S. 542–554.
- [160] V. PERISSI; L. M. STASZEWSKI; E. M. MCINERNEY; R. KUROKAWA; A. KRONES; D. W. ROSE; M. H. LAMBERT; M. V. MILBURN; C. K. GLASS & M. G. ROSENFELD: Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction, in: *Genes & Development* 13 (1999) S. 3198–3208.
- [161] T. PERLMANN & B. VENNSTRÖM: The sound of silence., in: *Nature* 377 (1995) S. 387–388.
- [162] C. A. PHELAN; R. T. GAMPE; M. H. LAMBERT; D. J. PARKS; V. MONTANA; J. BYNUM; T. M. BRODERICK; X. HU; S. P. WILLIAMS; R. T. NOLTE & M. A. LAZAR: Structure of Rev-erbalpha bound to N-CoR reveals a unique mechanism of nuclear receptor-co-repressor interaction., in: *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (2010) S. 808–814.
- [163] M. J. PLEVIN; M. M. MILLS & M. IKURA: The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation, in: *TRENDS in Biochemical Sciences* 30 (2005) S. 66–69.
- [164] V. M. POPOV; C. WANG; L. A. SHIRLEY; A. ROSENBERG; S. LI; M. NEVALAINEN; M. FU & R. G. PESTELL: The functional significance of nuclear receptor acetylation., in: *Steroids* 72 (2007) S. 221–230.
- [165] W. B. PRATT & D. O. TOFT: Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones, in: *Endocrine Reviews* 18 (1997) S. 306–360.
- [166] E. M. PRESCOTT & N. J. PROUDFOOT: Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002) S. 8796–8801.
- [167] D. M. PRESMAN; E. HOIJMAN; N. R. CEBALLOS; M. D. GALIGNIANA & A. PECCI: Melatonin inhibits glucocorticoid receptor nuclear translocation in mouse thymocytes, in: *Endocrinology* 147 (2006) S. 5452–5459.

- [168] P. PUIGSERVER; G. ADELMANT; Z. WU; M. FAN; J. XU; B. O'MALLEY & B. M. SPIEGELMAN: Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking, in: *Science* 286 (1999) S. 1368–1371.
- [169] L. RACIOPPI & A. R. MEANS: Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses: novel routes for an ancient traveller., in: *Trends in Immunology* 29 (2008) S. 600–607.
- [170] S. RAGHURAM; K. R. STAYROOK; P. HUANG; P. M. ROGERS; A. K. NOSIE; D. B. MCCLURE; L. L. BURRIS; S. KHORASANIZADEH; T. P. BURRIS & F. RASTINEJAD: Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β , in: *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (2007) S. 1207–1213.
- [171] E. RASPÉ; H. DUEZ; P. GERVOIS; C. FIÉVET; J. C. FRUCHART; S. BERNARD; J. MARIANI; A. TEDGUI & B. STAELS: Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor ROR α ., in: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) S. 2865–2871.
- [172] E. RASPÈ; G. MAUTINO; C. DUVAL; C. FONTAINE; H. DUEZ; O. BARBIER; D. MONTE; J. FRUCHART; J.-C. FRUCHART & B. STAELS: Transcriptional regulation of human Rev-erb α gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor α ., in: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) S. 49 275–49 281.
- [173] F. RASTINEJAD; T. PERLMANN; R. M. EVANS & P. B. SIGLER: Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats, in: *Nature* 375 (1995) S. 203–211.
- [174] J. P. RENAUD & D. MORAS: Structural studies on nuclear receptors, in: *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 (2000) S. 1748–1769.
- [175] J.-P. RENAUD; N. ROCHEL; M. RUFF; V. VIVAT; P. CHAMBON; H. GRONEMEYER & D. MORAS: Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid, in: *Nature* 378 (1995) S. 681–689.
- [176] C. ROCHETTE-EGLY: Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation, in: *Cell Signalling* 15 (2003) S. 355–366.
- [177] J. T. RODGERS; C. LERIN; Z. GERHART-HINES & P. PUIGSERVER: Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways, in: *FEBS Letters* 582 (2008) S. 46–53.
- [178] B. G. ROWAN; N. GARRISON; N. L. WEIGEL & B. W. O'MALLEY: 8-Bromocyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein., in: *Molecular and Cellular Biology* 20 (2000) S. 8720–8730.

- [179] J. SAMBROOK & D. W. RUSSELL: In Vitro Mutagenesis Using Double-stranded DNA Templates: Selection of Mutants with DpnI, in: J. SAMBROOK & D. W. RUSSELL (Hg.), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Bd. 2, 3. Aufl., Kap. 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA (2001) S. 13.19 – 13.25.
- [180] R. F. SANTERE; J. D. WALLS & B. W. GRINNELL: Use of Vectors to Confer Resistance to Antibiotics G418 and Hygromycin in Stably Transfected Cell Lines, in: E. MURRAY (Hg.), *Gene Transfer and Expression Protocols*, Bd. 7 von *Methods in Molecular Biology*, Kap. 19, Humana Press Inc., Clifton, NJ, USA (1991) S. 245–255.
- [181] J. SCHUG: Using TESS to Predict Transcription Factor Binding Sites in DNA Sequence, in: *Current Protocols in Bioinformatics* 21 (2003) S. 2.6.1–2.6.15.
- [182] C. SCHUSTER; L. M. WILLIAMS; A. MORRIS; P. J. MORGAN & P. BARRETT: The human MT₁ melatonin receptor stimulates cAMP production in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells via a calcium-calmodulin signal transduction pathway, in: *Journal of Neuroendocrinology* 17 (2005) S. 170–178.
- [183] J. W. SCHWABE; L. CHAPMAN & D. RHODES: The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation, in: *Structure* 3 (1995) S. 201–213.
- [184] J. W. F. SCHWABE; L. CHAPMAN; J. T. FINCH & D. RHODES: The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements, in: *Cell* 75 (1993) S. 567–578.
- [185] L. A. SELTH; S. SIGURDSSON & J. Q. SVEJSTRUP: Transcript Elongation by RNA Polymerase II., in: *Annual Review of Biochemistry* 79 (2010) S. 271–293.
- [186] H. G. SERRA; L. DUVICK; T. ZU; K. CARLSON; S. STEVENS; N. JORGENSEN; A. LYSHOLM; E. BURRIGHT; H. Y. ZOGHBI; H. B. CLARK; J. M. ANDRESEN & H. T. ORR: ROR α -mediated Purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice., in: *Cell* 127 (2006) S. 697–708.
- [187] M. SHAGO; G. FLOCK; C. Y. LEUNG HAGESTEIJN; M. WOODSIDE; S. GRINSTEIN; V. GIGUÈRE & S. DEDHAR: Modulation of the retinoic acid and retinoid X receptor signaling pathways in P19 embryonal carcinoma cells by calreticulin, in: *Experimental Cell Research* 230 (1997) S. 50–60.
- [188] D. J. SHAPIRO; P. A. SHARP; W. W. WAHLI & M. J. KELLER: A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract, in: *DNA* 7 (1988) S. 47–55.
- [189] A. J. SHAYWITZ & M. E. GREENBERG: CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals, in: *Annual Review of Biochemistry* 68 (1999) S. 821–861.

- [190] A. SHILATIFARD; R. C. CONAWAY & J. W. CONAWAY: The RNA polymerase II elongation complex., in: *Annual Review of Biochemistry* 72 (2003) S. 693–715.
- [191] R. L. SIDMAN; P. W. LANE & M. M. DICKIE: Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum, in: *Science* 137 (1962) S. 610–612.
- [192] F. SIMPSON; M. C. KERR & C. WICKING: Trafficking, development and hedgehog., in: *Mechanisms of Development* 126 (2009) S. 279–288.
- [193] T. R. SODERLING: The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade., in: *Trends in Biochemical Sciences* 24 (1999) S. 232–236.
- [194] P. SVOBODA & A. D. CARA: Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance., in: *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (2006) S. 901–908.
- [195] F. TAMANINI: Manipulation of Mammalian Cell lines for Circadian Studies, in: E. ROSATO (Hg.), *Circadian Rhythms - Methods and Protocols*, Bd. 362 von *Methods in Molecular Biology*, Kap. 36, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA (2007) S. 443–453.
- [196] M. TEBOUL; A. GRÉCHEZ-CASSIAU; F. GUILLAUMOND & F. DELAUNAY: How nuclear receptors tell time., in: *Journal of Applied Physiology* 107 (2009) S. 1965–1971.
- [197] M. TINI; R. A. FRASER & V. GIGUÈRE: Functional interactions between retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR alpha) and the retinoic acid receptors in the regulation of the gamma F-crystallin promoter, in: *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) S. 20 156–20 161.
- [198] H. R. UEDA; S. HAYASHI; W. CHEN; M. SANO; M. MACHIDA; Y. SHIGEYOSHI; M. IINO & S. HASHIMOTO: System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks, in: *Nature Genetics* 37 (2005) S. 187–192.
- [199] K. UMESONO & R. M. EVANS: Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors, in: *Cell* 57 (1989) S. 1139–1146.
- [200] K. UMESONO; K. K. MURAKAMI; C. C. THOMPSON & R. M. EVANS: Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors, in: *Cell* 65 (1991) S. 1255–1266.
- [201] B. J. VENTERS & B. F. PUGH: How eukaryotic genes are transcribed, in: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44 (2009) S. 117–141.
- [202] N. VU-DAC; P. GERVOIS; T. GRÖTZINGER; P. D. VOS; K. SCHOONJANS; J. C. FRUCHART; J. AUWERX; J. MARIANI; A. TEDGUI & B. STAELS: Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor RORalpha., in: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) S. 22 401–22 404.

- [203] T. WADA; H. S. KANG; M. ANGERS; H. GONG; S. BHATIA; S. KHADEM; S. REN; E. ELLIS; S. C. STROM; A. M. JETTEN & W. XIE: Identification of oxysterol 7 α -hydroxylase (Cyp7b1) as a novel retinoid-related orphan receptor alpha (RORalpha) (NR1F1) target gene and a functional cross-talk between RORalpha and liver X receptor (NR1H3)., in: *Molecular Pharmacology* 73 (2008) S. 891–899.
- [204] T. WADA; H. S. KANG; A. M. JETTEN & W. XIE: The Emerging Role Of Nuclear Receptor RORalpha And Its Crosstalk With LXR In Xeno-And Endobiotic Gene Regulation, in: *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.) 233 (2008) S. 1191–1201.
- [205] M. WAGNER: Untersuchungen zur Expression des nukleären RZR / RORalpha-Rezeptors und dessen Effekte auf den 5-Lipoxygenasestoffwechsel, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2000).
- [206] A. E. WALLBERG; S. YAMAMURA; S. MALIK; B. M. SPIEGELMAN & R. G. ROEDER: Coordination of p300-Mediated Chromatin Remodeling and TRAP/Mediator Function through Coactivator PGC-1 α , in: *Molecular Cell* 12 (2003) S. 1137–1149.
- [207] Y. WANG; N. KUMAR; C. CRUMBLEY; P. R. GRIFFIN & T. P. BURRIS: A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol)., in: *Biochimica et Biophysica Acta* 1801 (2010) S. 917–923.
- [208] Y. WANG; N. KUMAR; P. NUHANT; M. D. CAMERON; M. A. ISTRATE; W. R. ROUSH; P. R. GRIFFIN & T. P. BURRIS: Identification of SR1078, a Synthetic Agonist for the Orphan Nuclear Receptors RORalpha and RORgamma., in: *ACS Chemical Biology* XX (2010) S. XX, epub.
- [209] Y. WANG; N. KUMAR; L. A. SOLT; T. I. RICHARDSON; L. M. HELVERING; C. CRUMBLEY; R. D. GARCIA-ORDONEZ; K. R. STAYROOK; X. ZHANG; S. NOVICK; M. J. CHALMERS; P. R. GRIFFIN & T. P. BURRIS: Modulation of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha and gamma activity by 7-oxygenated sterol ligands., in: *Journal of Biological Chemistry* 285 (2010) S. 5013–5025.
- [210] Z. WANG; G. BENOIT; J. LIU; S. PRASAD; P. AARNISALO; X. LIU; H. XU; N. P. C. WALKER & T. PERLMANN: Structure and function of Nurrl1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors, in: *Nature* 423 (2003) S. 555–560.
- [211] N. L. WEIGEL & N. L. MOORE: Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action, in: *Nuclear Receptor Signalling* 5 (2007) S. e005.
- [212] I. WIESENBERG; M. MISSBACH; J. P. KAHLLEN; M. SCHRADER & C. CARLBERG: Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand, in: *Nucleic Acids Research* 23 (1995) S. 327–333.

- [213] T. WILSON; R. PAULSEN; K. PADGETT & J. MILBRANDT: Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors., in: *Cell* 256 (1992) S. 107–110.
- [214] I. M. WOLF; M. D. HEITZER; M. GRUBISHA & D. B. DEFranco: Coactivators and nuclear receptor transactivation, in: *Journal of Cellular Biochemistry* 104 (2008) S. 1580–1586.
- [215] J. R. WOODGETT: MAP Kinases, in: E. A. DENNIS & R. A. BRADSHAW (Hg.), *Handbook of Cell Singaling*, Bd. 1, Kap. 83, Academic Press, Amsterdam, NL (2003) S. 493–497.
- [216] N. WU; L. YIN; E. A. HANNIMAN; S. JOSHI & M. A. LAZAR: Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erbalpha, in: *Genes & Development* 23 (2009) S. 2201–2209.
- [217] J.-M. WURTZ; W. BOURGUET; J.-P. RENAUD; V. VIVAT; P. CHAMBON; D. MORAS & H. GRONEMEYER: A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors, in: *Nature Structural Biology* 3 (1996) S. 87–94.
- [218] M. YADAV; S. K. ROACH & J. S. SCHOREY: Increased mitogen-activated protein kinase activity and TNF-alpha production associated with Mycobacterium smegmatis- but not Mycobacterium avium-infected macrophages requires prolonged stimulation of the calmodulin/calmodulin kinase and cyclic AMP/protein kinase A pathways., in: *Journal of Immunology* 172 (2004) S. 5588–5597.
- [219] X. YANG; M. DOWNES; R. T. YU; A. L. BOOKOUT; W. HE; M. STRAUME; D. J. MANGELSDORF & R. M. EVANS: Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism, in: *Cell* 126 (2006) S. 801–810.
- [220] X. O. YANG; B. P. PAPPU; R. NURIEVA; A. AKIMZHANOV; H. S. KANG; Y. CHUNG; L. MA; B. SHAH; A. D. PANOPOULOS; K. S. SCHLUNS; S. S. WATOWICH; Q. TIAN; A. M. JETTEN & C. DONG: T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma, in: *Immunity* 28 (2008) S. 29–39.
- [221] Z. YAO; S. DUAN; D. HOU; W. WANG; G. WANG; Y. LIU; L. WEN & M. WU: B23 acts as a nucleolar stress sensor and promotes cell survival through its dynamic interaction with hnRNPU and hnRNPA1., in: *Oncogene* 29 (2010) S. 1821–1834.
- [222] L. YIN & M. A. LAZAR: The orphan nuclear receptor Rev-erbalpha recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene., in: *Molecular Endocrinology* 19 (2005) S. 1452–1459.
- [223] L. YIN; J. WANG; P. S. KLEIN & M. A. LAZAR: Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock, in: *Science* 311 (2006) S. 1002–1005.

- [224] L. YIN; N. WU; J. C. CURTIN; M. QATANANI; N. R. SZWERGOLD; R. A. REID; G. M. WAITT; D. J. PARKS; K. H. PEARCE; G. B. WISELY & M. A. LAZAR: Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways, in: *Science* 318 (2007) S. 1786–1789.
- [225] L. YIN; N. WU & M. A. LAZAR: Nuclear receptor Rev-erb α : a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism., in: *Nucl Recept Signal* 8 (2010) S. e001.
- [226] I. ZAMIR; H. P. HARDING; G. B. ATKINS; A. HÖRLEIN; C. K. GLASS; M. G. ROSENFELD & M. A. LAZAR: A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains., in: *Molecular and Cellular Biology* 16 (1996) S. 5458–5465.
- [227] C. ZECHEL; X.-Q. SHEN; J.-Y. CHEN; Z.-P. CHEN; P. CHAMBON & H. GRO-NEMEYER: Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements, in: *EMBO Journal* 13 (1994) S. 1414–1424.
- [228] Q. ZHAO; S. KHORASANIZADEH; Y. MIYOSHI; M. A. LAZAR & F. RASTINE-JAD: Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex., in: *Molecular Cell* 1 (1998) S. 849–861.
- [229] Y. ZHU; S. McAVOY; R. KUHN & D. I. SMITH: RORA, a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response, in: *Oncogene* 25 (2006) S. 2901–2908.
- [230] J. ZILLIACUS; J. CARLSTEDT-DUKE; J. A. GUSTAFSSON & A. P. WRIGHT: Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors., in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994) S. 4175–4179.



ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde gemäß den Regelungen des §4 Abs.2 Promotionsordnung vom 26. Mai 1993 von Prof. Dr. Dieter Steinhilber betreut.

Bei der Ausarbeitung der Dissertation wurden nur die in der Dissertation angegebenen Hilfen oder Hilfsmittel verwendet.

Berlin, März 2011

Michael Ermisch

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name Michael Ermisch
 Geburtsdatum 21.11.1979 in Augsburg
 Familienstand verheiratet

AUSBILDUNG

01/2006 – 11/2010 *Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt*
 Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie
 Schwerpunkt: -Untersuchung der Regulation der
 nukleären Rezeptoren ROR α & RevErb α
 -Betreuung von Studenten im Rahmen des
 Praktikums Pharmazeutische Chemie III

12/2005 Approbation als Apotheker

11/2005 3. Teil der Pharmazeutischen Prüfung, Gesamtnote: 2,0

10/2000 – 10/2004 *Ludwig-Maximilians-Universität München*
 Fakultät Chemie und Pharmazie – Department Pharmazie
 Studienfach: Pharmazie (Staatsexamen)
 Abschluss: 1. & 2. Teil der Pharmazeutischen Prüfung

09/1990 – 06/1999 *Gymnasium Königsbrunn*
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Gesamtnote: 1,5

BERUFSERFAHRUNG

12/2010 – heute *ID Information und Dokumentation
 im Gesundheitswesen GmbH & Co. KGaA*
 Inhaltliche Entwicklung im Bereich Pharma

05/2005 – 10/2005 *Bayer HealthCare-Pharma-Biotechnology*
 Pharma- & Chemiepark Wuppertal
 Praktikum (Praktische Ausbildung nach AAppO)
 Schwerpunkt: Untersuchung alternativer Kationenaustauscher
 für die pharmazeutische Wirkstoffproduktion

11/2004 – 04/2005 *Apotheke am Zoo, Berlin*
 Praktikum (Praktische Ausbildung nach AAppO)

12/2002 – 06/2003 &
 03/2002 – 04/2002 *Ludwig-Maximilians-Universität München*
 Fakultät Chemie und Pharmazie – Department Pharmazie
 Zentrum für Pharmaforschung - Arbeitskreis Prof. Wanner
 Studentische Hilfskraft (Labor- & Büroarbeiten)
 Schwerpunkt: Neue Methode zur diversitätsorientierten
 Synthese von β -Aminosäuren

BERUFSERFAHRUNG (FORTGESETZT)

09/2001	<i>Apotheke des Zentralklinikums Augsburg: Famulatur</i>
03/2001	<i>Ludwigs-Apotheke Königsbrunn: Famulatur</i>
06/1999 – 09/1999	<i>Opel Performance Center Bobingen</i> Mitverantwortliche Lagerverwaltung

WEITERE TÄTIGKEITEN

01/2009 – heute	Fachgruppe der Apotheker in Wissenschaft, Industrie & Verwaltung (WIV-Apotheker) Mitglied des Beirats
11/2004 – 11/2005	Bundesverband der Pharmaziestudierenden in Deutschland e.V. (BPhD e.V.) Präsident
11/2003 – 11/2004	Bundesverband der Pharmaziestudierenden in Deutschland e.V. (BPhD e.V.) Generalsekretär
10/2001 – 11/2005	Ludwigs-Maximilians-Universität München Mitglied der Fachschaft Pharmazie
11/1999 – 08/2000	Wehrdienst im FmBtl 230 in Dillingen/Donau

AKADEMISCHE LEHRER

- Prof. Dr. Martin Biel
- Prof. Dr. Franz Bracher
- Prof. Dr. Wolfgang Frieß
- Prof. Dr. Alexander Pfeifer
- Prof. Dr. Martin Schlitzer
- Prof. Dr. Dieter Steinhilber
- Prof. Dr. Angelika M. Vollmar
- Prof. Dr. Ernst Wagner
- Prof. Dr. Klaus T. Wanner
- Prof. Dr. Gerhard Winter

COLOPHON

Diese Dissertation wurde unter der Verwendung von $\text{\LaTeX 2}_{\epsilon}$ sowie Hermann Zapfs *Palatino* und *Euler* Schriftarten, der Type 1 PostScript Schriftarten *URW Palladio L* und *FPL*, gesetzt. Listen wurden in *BeraMono* gesetzt, im Original entwickelt von Bitstream, Inc. als „Bitstream Vera“. Die Type 1 PostScript Schriftarten wurden von Malte Rosenau und Ulrich Dirr zugänglich gemacht. Der Typographiestil wurde entwickelt von André Miede und ist inspiriert von Bringhursts „*The Elements of Typographic Style*“. Er ist über CTAN als „*classicthesis*“ verfügbar für $\text{\LaTeX 2}_{\epsilon}$.

*Du bist nur gut,
wenn Du Dinge machst,
die Dir selbst ähnlich sind.*

GÉRARD DEPARDIEU