

**HMGA1**

**als neuer Koregulator der Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptor  $\gamma$ -  
vermittelten Transrepression in humanen Gefäßmuskelzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Mandy Bloch**

aus Belzig

Januar 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2006 bis Mai 2012 am Institut für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin / Center for Cardiovascular Research unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Kintscher angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kintscher

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Datum der Disputation: 22. Mai 2013

## Danksagung

---

### Danksagung

Ich möchte gerne allen von ganzem Herzen Danke sagen, die mich in den letzten Jahren unterstützt und zum Gelingen meines Promotionsvorhabens beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Professor Dr. Ulrich Kintscher für das spannende sowie aktuelle Forschungsthema und die engagierte Betreuung während meiner Doktorarbeit. Seinen Forschungsideen, die wissenschaftlichen Diskussionen aber auch die Möglichkeit zum unabhängigen Arbeiten verdanke ich meine Begeisterung für die Wissenschaft. Mein Dank gilt ihm auch für das große Vertrauen, dass er mir stets entgegengebracht hat und auch der Möglichkeit, mein Projekt auch international vorstellen und verteidigen zu dürfen.

Darüber hinaus danke ich ihm für seine positive Einstellung und Unterstützung gegenüber Familie und Beruf, die es mir ermöglichten trotz Elternzeitunterbrechungen und mit drei kleinen Kindern meine Promotionsarbeit abschließen zu können.

Herrn Professor Dr. Thomas Unger danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme und Möglichkeit, diese Arbeit am Institute for Cardiovascular Research, Institut für Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchführen zu können. Sein beständiges Interesse an meiner Promotionsarbeit habe ich sehr geschätzt.

Besonders möchte ich mich zudem bei Herrn Professor Dr. Matthias Melzig bedanken, der hilfsbereit und spontan die Betreuung meiner Doktorarbeit am Institut für Pharmazie der freien Universität Berlin übernommen hat.

Für die langjährige Freundschaft sowie für das Korrekturlesen dieses Manuskripts und den vielen wertvollen Hilfestellungen danke ich Christian Kukat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Anna Foryst-Ludwig bedanken. Ich danke ihr nicht nur für den fachlichen Rat und die wissenschaftlichen Diskussionen sondern auch für die herzliche Zusammenarbeit.

Ich danke auch den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern Franziska Rompe, Yaosi Li, Ilse N. Bähr, Jens Schacherl, Jana Reinemund, Martin Hartge, Christian Böhm, Daniela Zaade, Kristin Lucht, Sabrina Klare, Kerstin Seidel, Sebastian Kirsch, Verena Benz, Robin Winkler, Sami Wardat, Katja Giersch, Jana Grune, Beata Höft, Frau Sprang und Miranda Schröder von

## Danksagung

---

ganzem Herzen für fachliche Diskussionen, unvergleichliche Teamarbeit, Motivation und Unterstützung und auch für den Humor, der so manchen anstrengenden Labor(all)tag wiederaufzuhellen vermochte, aber auch für die unvergessliche Zeit mit tollen Erinnerungen außerhalb des CCRs und die daraus entstandenen Freundschaften.

Meinen Freunden und meiner Familie, besonders meinen Eltern Annegret und Günter Bloch sowie meiner Schwester Sabine Bloch danke ich sehr herzlich für ihre bedingungslose Unterstützung.

Gunnar, dir danke ich aus tiefstem Herzen für deine unermüdliche Unterstützung und dein Vertrauen in mich. Danke, dass du für mich da bist. Ich weiß mein Glück zu schätzen!

## INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen .....	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	VII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Atherosklerose .....	1
1.1.1 Definition .....	1
1.1.2 Aufbau einer Arterienwand .....	2
1.1.3 Entwicklung einer Atherosklerose .....	2
1.1.4 Die Rolle von MMP-9 in der Pathogenese der Atherosklerose .....	5
1.2 PPAR $\gamma$ .....	7
1.2.1 Genomische Organisation, Isoformen, Aufbau .....	7
1.2.2 PPAR $\gamma$ -Liganden .....	8
1.2.3 Metabolische Effekte von PPAR $\gamma$ .....	10
1.2.4 Vaskuläre Effekte von PPAR $\gamma$ .....	11
1.3 Genregulationsmechanismen durch PPAR $\gamma$ .....	15
1.3.1 Ligand-abhängige Aktivierung .....	16
1.3.2 Ligand-unabhängige Transrepression .....	16
1.3.3 Ligand-abhängige Transrepression .....	18
1.4 HMGA1 .....	21
1.4.1 Genomische Organisation, Isoformen, Aufbau .....	21
1.4.2 Biologische Funktion von HMGA1-Proteinen .....	22
<b>2 ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>27</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
3.1 Material .....	28
3.1.1 Versuchstiere, Zelllinien und Bakterienstämme .....	28
3.1.2 Laborgeräte .....	28
3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Medikamente .....	29
3.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	31
3.1.5 Puffer, Lösungen und Medien .....	32
3.1.6 Enzyme .....	34
3.1.7 Kits und Marker .....	34
3.1.8 Oligonukleotide, Vektoren und siRNA .....	34
3.1.9 Antikörper .....	36
3.2 Methoden .....	37
3.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	37
3.2.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren .....	37
3.2.1.2 RNA-Isolierung .....	37
3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	38
3.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	38

## Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Klonierung von DNA	43
3.2.2.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	43
3.2.2.2	DNA-Modifizierung durch Enzymbehandlung	45
3.2.2.3	Screening	46
3.2.2.4	Klonierungsstrategien	47
3.2.3	Proliferationsassay	48
3.2.4	Chromatin Immunopräzipitation	48
3.2.4.1	DNA Protein Crosslinking und Zellyse	48
3.2.4.2	Immunopräzipitation der Protein-DNA-Komplexe	49
3.2.4.3	Ermittlung der relativen Rekrutierung von Proteinen an den Zielpromotor	50
3.2.5	Co-Immunopräzipitationen	50
3.2.6	Microarray	51
3.2.7	Proteinbiochemische Methoden	52
3.2.7.1	Proteinisolierung	52
3.2.7.2	Quantifizierung der Proteine mit Bicinchoninsäure-Methode (BCA)	52
3.2.7.3	SDS-PAGE	53
3.2.7.4	Western Blot	53
3.2.8	Histologische Methoden	54
3.2.9	Zellkulturtechniken	54
3.2.9.1	Kultivierung und Aufbewahrung	54
3.2.9.2	Transiente Transfektionen mit Plasmid-DNA	55
3.2.9.3	Transiente Transfektionen mit siRNA	56
3.2.9.4	Stimulationen	56
3.2.9.5	Bestimmung der Luziferaseaktivität für Promotor-Reportergergen-Studien	56
3.2.10	Tierversuch	57
3.2.10.1	Tiermodell / Versuchsaufbau	57
3.2.10.2	Operation der Maus	57
3.2.10.3	Entnahme der A. femoralis	59
3.2.11	Statistische Berechnungen	60
4	<b>ERGEBNISSE</b>	61
4.1	PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression in VSMCs	61
4.1.1	PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Glitazone inhibiert die MMP-9 Transkription	61
4.1.2	Glitazon-vermittelte MMP-9 Transrepression ist PPAR $\gamma$ -abhängig	62
4.1.3	PPAR $\gamma$ -abhängige MMP-9 Promotorregulation verläuft über NF $\kappa$ B regulatorische Promotorelemente	65
4.2	Genexpressionsmuster humaner Kernrezeptoren und Koregulatoren in VSMCs	67
4.3	Einfluss von HMGA1 auf die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression	68
4.3.1	HMGA1 Deletion blockiert die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression	68
4.3.2	HMGA1 Überexpression verstärkt PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression	72
4.3.3	Bedeutung der HMGA1/PPAR $\gamma$ Interaktion auf andere NF $\kappa$ B-regulierte Gene	74
4.3.4	Einfluss von HMGA1 ist PPAR $\gamma$ spezifisch	75
4.4	Molekularer Mechanismus der HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten MMP-9 Transrepression in VSMCs	77
4.4.1	Komplexbildung von HMGA1, Ubc9 und PPAR $\gamma$	77
4.4.2	Sumoylierung von PPAR $\gamma$	78
4.4.3	PPAR $\gamma$ Sumoylierung erfolgt am Lysinrest K367	79
4.4.4	Keine physikalische Interaktion zwischen NF $\kappa$ B Untereinheit p65 und PPAR $\gamma$	80
4.4.5	Interaktion von HMGA1 und Korepressor SMRT	81
4.4.6	Kofaktorrekutierung zum MMP-9 Promotor	82

## Inhaltsverzeichnis

4.4.7	Rolle von HMGA1 für die PPAR $\gamma$ -Rekrutierung zum MMP-9 Promotor.....	84
4.4.8	Kofaktorrekutierung zu den NF $\kappa$ B-regulierten Promotoren PDGF und VCAM..	85
4.5	Relevanz der HMGA1/PPAR $\gamma$ Interaktionen auf die gefäßschützenden Funktionen von PPAR $\gamma$ im Tiermodell.....	88
4.5.1	Neointimabildung nach Dilatation der A. femoralis und Pioglitazon-Behandlung in Wildtyp- und HMGA1-/- Mäusen .....	88
4.5.2	Immunhistochemischer Nachweis von MMP-9 .....	89
4.5.3	MMP-9 und ET-1 Expressionsniveau in der A. femoralis .....	90
4.5.4	Expressionsniveau spezifischer Marker für die phänotypische VSMC-Modulation in der A. femoralis .....	91
5	<b>DISKUSSION</b> .....	93
5.1	PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression in VSMCs.....	93
5.2	Identifizierung von HMGA1 als neuen PPAR $\gamma$ -Koregulator.....	94
5.3	Molekularer Mechanismus der HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression.....	97
5.3.1	Kofaktorrekutierung zum MMP-9 Promotor.....	97
5.3.2	Einfluss von HMGA1 auf die Kofaktorrekutierung zum MMP-9 Promotor .....	100
5.3.3	Bedeutung des Korepressors SMRT .....	102
5.3.4	Einfluss von NF $\kappa$ B .....	104
5.3.5	MMP-9 und ET-1 mRNA Expression in der A. femoralis.....	107
5.4	Methodische Diskussion.....	108
5.4.1	HMGA1 und die Sumoylierung von PPAR $\gamma$ .....	108
5.4.2	Relevanz des Tiermodells .....	110
5.4.3	Nachweis von MMP-9.....	113
5.4.4	Phänotypische VSMC-Modulation .....	114
5.5	Ausblick.....	114
6	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	116
6.1	Zusammenfassung.....	116
6.2	Summary.....	118
7	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	119
8	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b> .....	138
8.1	Originalarbeiten.....	138
8.2	Kongressbeiträge .....	138



## Abkürzungen

---

### Abkürzungen

ApoE	Apolipoprotein E
A. femoralis	Femoralarterie, <i>Arteria profunda femoralis</i>
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>bovines</i> Serumalbumin
CCL2	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
c-Rel	Transcription factor, NFκB-Untereinheit
DAD	Deacetylase-Aktivierungsdomäne
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	dulbecco's modifiziertes <i>eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1	Zinkfingertranskriptionsfaktor, <i>early growth response-1</i>
ERE	Estrogen <i>Response</i> Element
ERβ	Estrogenrezeptor β
ET-1	Endothelin-1
ETS	Transkriptionsfaktor
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLUT1	Glukosetransporter 1
GLUT4	Glucose Transporter 4
HD	Hinge-Domäne
HDAC3	Histondeacetylase 3
HDL	Lipide hoher Dichte
HID	Histon-Interaktionsdomäne
HMGA1	Nicht-Histon Protein, <i>High Mobility Group Protein A1</i>
IB	Immunblot
IFNγ	Interferon γ

## Abkürzungen

---

IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IP	Immunopräzipitation
IRF2	Interferon-regulierenden Faktor
IRS-1 und IRS-2	Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LDL	Lipide niedriger Dichte
LPS	Lipopolysaccharide
LXR $\alpha$	Leber X Rezeptor $\alpha$
MCM6	<i>Minichromosom Maintenance Protein 6</i>
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9
NCoR	<i>Nuclear hormone receptor corepressor</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NTC	<i>non template control</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
p50	Transcription factor, NF $\kappa$ B-Untereinheit
p53	Transcription factor, NF $\kappa$ B-Untereinheit
p65	Transcription factor, NF $\kappa$ B-Untereinheit
PAGE	Polyacryl Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Wachstumsfaktor, <i>Platelet-derived growth factor</i>
Pio	Pioglitazon
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PolII	RNA Polymerase II
PPAR $\alpha$	Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor $\alpha$
PPAR $\gamma$	Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor $\gamma$
PPRE	PPAR Response Element
PRE	Progesteron Response Element
qPCR	quantitative real time Polymerase Kettenreaktion
Rapa	Rapamycin
RLA	relative Luziferaseaktivität
Rosi	Rosiglitazon
RXR $\alpha$	Retinoid X-Rezeptor $\alpha$
SDS	Natriumdodecylsulfat

## Abkürzungen

---

SKP2	S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2
SM1	<i>smooth muscle heavy chain 1</i>
SMemb	<i>non-muscle myosin heavy chain B</i>
SMRT	<i>silencing mediator of thyroid-hormone receptor</i>
SP1	Specificity Protein 1
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TBL1	<i>transducin beta-like protein-1</i>
TBLR1	<i>TBL-1-related protein</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TZD	Thiazolidinedione
Ubc9	<i>SUMO-conjugating Enzyme</i>
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
veh	Vehikel
VIM	Intermediärfilament Vimentin
VLDL	Lipide sehr niedriger Dichte
VSMCs	glatte Gefäßmuskelzellen
WT	Wildtyp
$\alpha$ -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>

**Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1.1	Darstellung des Aufbaus einer normalen Arterie.....	2
Abbildung 1.2	Darstellung der endothelialen Dysfunktion der Atherosklerose.....	3
Abbildung 1.3	Darstellung der Fettstreifen Formation der Atherosklerose.....	4
Abbildung 1.4	Darstellung der Thrombusbildung der Atherosklerose.....	5
Abbildung 1.5	Schematische Struktur von nukleären Hormonrezeptoren bzw. PPAR $\gamma$ .....	8
Abbildung 1.6	Die chemische Struktur von Pioglitazon (links) und Rosiglitazon (rechts).....	10
Abbildung 1.7	Metabolische Effekte von PPAR $\gamma$ im Fettgewebe, in der Leber und im Muskel.....	11
Abbildung 1.8	Vaskuläre Effekte von PPAR $\gamma$ in Endothelzellen, Makrophagen und VSMCs.....	12
Abbildung 1.9	Mechanismus der Ligand-abhängigen Transaktivierung.....	16
Abbildung 1.10	Mechanismus der Ligand-unabhängigen Repression.....	17
Abbildung 1.11	Mechanismus der Ligand-abhängigen Transrepression.....	18
Abbildung 1.12	Mechanismus der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression.....	18
Abbildung 1.13	Mechanismus der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression.....	19
Abbildung 1.14	Mechanismus der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression.....	20
Abbildung 1.15	Korepressor-abhängiges Modell für Transrepression.....	20
Abbildung 1.16	Strukturelle Hauptmerkmale der HMG-Proteinfamilien.....	21
Abbildung 1.17	Veränderungen der Chromatinstruktur durch HMGA1-Proteine.....	23
Abbildung 3.1	A Elektropherogramm einer untersuchten RNA-Probe, B Gelelektrophorese einer untersuchten RNA-Probe.....	39
Abbildung 3.2	Überblick zur Oligo GEArray® Prozedur aus Oligo GEArray® Human Nuclear Receptors & Coregulators Microarray.....	51
Abbildung 4.1	Zeitauflösende Darstellung der MMP-9 mRNA Expression in VSMCs.....	61
Abbildung 4.2	Zeitauflösende Darstellung der MMP-9 mRNA Expression in VSMCs.....	62
Abbildung 4.3	PPAR $\gamma$ Expressionsniveau in VSMCs nach siRNA-Suppression.....	63
Abbildung 4.4	MMP-9 mRNA Expression nach PPAR $\gamma$ Suppression.....	63
Abbildung 4.5	MMP-9 Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ .....	64
Abbildung 4.6	Promotoraktivität verschiedener humaner MMP-9 Deletionskonstrukte.....	65
Abbildung 4.7	MMP9 Promotoraktivität mit nativer und mutierter NF $\kappa$ B-Sequenz.....	66
Abbildung 4.8	Expressionsprofil der VSMCs für humane Kernrezeptoren und Koregulatoren.....	67
Abbildung 4.9	HMGA1 Expressionsniveau in VSMCs nach siRNA-Suppression.....	68
Abbildung 4.10	MMP-9 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression.....	69

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 4.11 HMGA1 Expressionsniveau in HEK293-Zellen nach siRNA-Suppression.....	69
Abbildung 4.12 MMP-9 Promotoraktivität nach HMGA1 Suppression.....	70
Abbildung 4.13 MMP-9 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression.....	71
Abbildung 4.14 ET-1 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression.....	72
Abbildung 4.15 HMGA1 Expressionsniveau in VSMCs nach Überexpression.....	73
Abbildung 4.16 MMP-9 mRNA Expression nach HMGA1 Überexpression.....	73
Abbildung 4.17 Expressionsniveau verschiedener NFκB-regulierter Gene nach HMGA1 Suppression.....	74
Abbildung 4.18 SKP2 und MCM6 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression.....	75
Abbildung 4.19 Proliferationsassay in VSMCs.....	76
Abbildung 4.20 Co-Immunopräzipitation von HMGA1 mit Ubc9 und PPARγ mit HMGA1.....	77
Abbildung 4.21 Co-Immunopräzipitation von PPARγ mit SUMO1 .....	78
Abbildung 4.22 MMP-9 Promotoraktivität unter Verwendung von PPARγ Konstrukten mit mutierten Sumoylierungsstellen.....	80
Abbildung 4.23 Co-Immunopräzipitation von PPARγ mit p65.....	81
Abbildung 4.24 Co-Immunopräzipitation von SMRT mit HMGA1 .....	82
Abbildung 4.25 Chromatin Immunopräzipitation.....	83
Abbildung 4.26 Chromatin Immunopräzipitation.....	84
Abbildung 4.27 Chromatin Immunopräzipitation.....	86
Abbildung 4.28 Chromatin Immunopräzipitation.....	87
Abbildung 4.29 Histologischer Vergleich der Neointimabildung in der A. femoralis.....	88
Abbildung 4.30 I/M Ratio der A. femoralis.....	88
Abbildung 4.31 Immunhistochemische Färbung gegen MMP-9.....	89
Abbildung 4.32 MMP-9 und ET-1 Expressionsniveau in der A. femoralis.....	90
Abbildung 4.33 Expressionsniveau verschiedener Marker für die VSMC-Modulation vom kontraktile zum proliferativen Phänotyp in der A. femoralis.....	92
Abbildung 5.1 Aktive Repression.....	98
Abbildung 5.2 Transkriptionelle Aktivierung.....	99
Abbildung 5.3 Transrepression.....	100
Abbildung 5.4 PPARγ Sumoylierung und transkriptionelle Repression inflammatorischer Gene.....	108
Abbildung 5.5 PPARγ Sumoylierung mit HMGA1 und Ubc9.....	109
Abbildung 5.6 Zeichnung der endovaskulären Verletzung der Femoralarterie.....	111
Tabelle 3.1: Übersicht der Auftrennung von linearer DNA in Agarose-Gelen.....	38
Tabelle 3.2 Antibiotika-Stammlösung.....	44

### 1 EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) noch immer die weltweite Haupttodesursache. Dabei fasst die Bezeichnung kardiovaskuläre Erkrankungen folgende krankhafte Ereignisse zusammen: zerebrovaskuläre Erkrankungen, Bluthochdruck, Krankheiten von Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venen und Lymphgefäßen sowie pathologische Veränderungen am Herzen. In Deutschland waren im Jahr 2010 fünf der zehn häufigsten Todesursachen die chronische ischämische Herzkrankheit, die Herzinsuffizienz, der akute Myokardinfarkt, der Schlaganfall und die hypertensive Herzkrankheit. An diesen fünf Erkrankungen verstarben allein in Deutschland im Jahr 2010 mehr als 220.000 Menschen davon waren 94.000 männlich und 126.000 weiblich (Statistisches Bundesamt). Häufig liegt diesen kardiovaskulären Erkrankungen der Prozess der Atherosklerose zugrunde. Aufgrund der steigenden Inzidenz für Atherosklerose muss weiterhin ein Forschungsschwerpunkt die Entwicklung neuer Therapieansätze für die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen sein. Hierbei sind in letzten Jahren von wachsendem Interesse für die Gefäßbiologie und Atheroskleroseforschung die Erkenntnisse aus der Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )-Forschung geworden. Derzeit werden Thiazolidinedione (TZD) zur Aktivierung von PPAR $\gamma$  in der Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) eingesetzt, um die Insulinresistenz, welche ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung des T2DM ist, zu verbessern. Neben der blutzuckersenkenden Wirkung konnte gezeigt werden, dass die PPAR $\gamma$ -Aktivierung entscheidende gefäßschützende Effekte ausübt. In diesem Kapitel werden nun Einblicke in die Prozesse zur Entstehung der Atherosklerose gegeben, wobei insbesondere die Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) dargestellt wird, welche eine wesentliche Funktion bei den pathologischen Gefäßwandumbauprozessen einnimmt. Weiterhin wird der Kernrezeptor PPAR $\gamma$  vorgestellt, die Funktion von PPAR $\gamma$  in der Gefäßwand und die PPAR $\gamma$ -vermittelten Genregulationsmechanismen werden besprochen. Abschließend wird das Nicht-Histon Kernprotein High Mobility Group Protein A1 (HMGA1) vorgestellt, dass im Rahmen dieser Dissertation als ein neuer Koregulator von PPAR $\gamma$  in der Gefäßwand identifiziert werden konnte.

#### 1.1 Atherosklerose

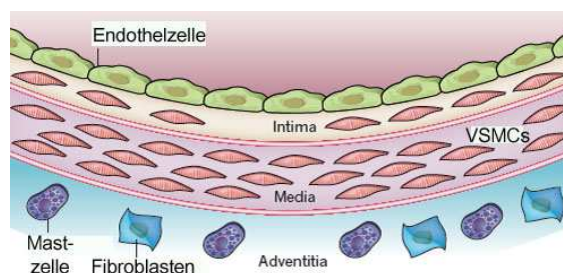
##### 1.1.1 Definition

Der Begriff Atherosklerose stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus "athero" (Schleim oder Ansammlung) und "sclerosis" (Verhärtung) zusammen und wird als ein hochkomplexer, aktiver Prozess betrachtet, der im Wesentlichen durch inflammatorische Reaktionen in der Gefäßwand charakterisiert ist.

Laut Definition der WHO ist Atherosklerose eine Kombination von Veränderungen in der Arterienwand, die einhergehen mit einer Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, von Blut und Blutbestandteilen und die ebenso mit der Bildung eines fibrösen Gewebes verbunden ist.

### 1.1.2 Aufbau einer Arterienwand

Die gesunde arterielle Gefäßwand besteht aus drei voneinander getrennten Zellschichten, der Tunica intima, media und adventitia. Diese Schichten werden von Zellen gebildet, die in eine extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet sind. Sowohl der Zelltyp, als auch die Zusammensetzungen der EZM unterscheiden sich in den einzelnen Zellschichten. Die Tunica adventitia, die äußerste Gefäßschicht, setzt sich aus Fibroblasten und einer dicht angeordneten EZM zusammen. Die Tunica media besteht aus ruhenden, kontraktilen, konzentrisch angeordneten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs), die von einer dünnen Schicht EZM umgeben sind. Die Membrana elastica externa grenzt die Tunica media von der Tunica adventitia ab. Die Tunica intima bildet die innerste Schicht und ist dem Gefäßlumen zugewandt. Sie besteht aus Endothelzellen, die die Innenseite der Arterie auskleiden. Sie müssen eine nichthaftende Oberfläche haben, um Turbulenzen im Blut zu verhindern, die wiederum Gerinnungsfaktoren aktivieren können. Die Tunica intima wird von der Tunica media durch die Membrana elastica interna abgegrenzt (Libby et al., 2011). Die nachfolgende Abbildung 1.1 zeigt den Aufbau einer normalen Arterie mit den einzelnen Zellschichten.



**Abbildung 1.1** Darstellung des Aufbaus einer normalen Arterie  
verändert nach Libby et al., 2011

### 1.1.3 Entwicklung einer Atherosklerose

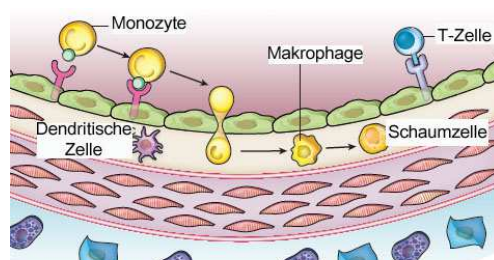
In den letzten Jahrzehnten wurde das Verständnis der Atherosklerose-Pathogenese revolutioniert und wesentlich dazu beigetragen haben die Arbeiten von Ross, der in den 70er Jahren die „Response to injury“- Hypothese formulierte (Ross and Glomset, 1973).

Diese Hypothese nimmt als Ursprung der Atherosklerose eine Endothelverletzung an und beschreibt die Entwicklung der Atherosklerose als ein multifaktorielles Geschehen, das auf Wechselbeziehungen zwischen Blutgefäßen und Zellkomponenten der Gefäßwand basiert.

### Endotheliale Dysfunktion und Schaumzellbildung

Der erste Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose ist die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion. Diese wird durch lokale Risikofaktoren gefördert wie turbulente Flussbedingungen an Gefäßverzweigungen oder systemische Risikofaktoren wie ein erhöhter Cholesterinspiegel im Plasma, T2DM, Übergewicht oder ein erhöhter Blutdruck (Ross, 1999; Lefkowitz and Willerson, 2001). Ein gesundes Endothel hemmt die Adhäsion von inflammatorischen Zellen an der Gefäßwand. Veränderungen im Blutfluss durch mechanische oder chemische Verletzung können die endotheliale Zellschicht beschädigen und zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führen. Dies führt zur Ablagerung von Lipiden niedriger Dichte (LDL), zur Sezernierung von chemotaktischen Proteinen und zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie VCAM. Inflammatorische Zellen wie Monozyten und CD4-positive Lymphozyten werden zur Gefäßwand rekrutiert und interagieren dann mit Adhäsionsmolekülen auf dem entzündlichen Endothel (endotheliale Dysfunktion) und dringen anschließend in den subintimalen Raum ein (Hansson, 2005).

Im weiteren Verlauf differenzieren Monozyten zu Makrophagen und nehmen LDL und oxidiertes LDL, welches durch Oxidation freier Radikale entsteht, auf. Durch die verstärkte Akkumulation der Lipide differenzieren diese zu Schaumzellen und exprimieren vermehrt proinflammatorische Zytokine, wie den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Matrix-degradierende Enzyme, unter anderem MMP-9, Wachstumsfaktoren wie PDGF und weitere proatherogene Faktoren, die die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen unterstützen (Ross, 1995; Stemme et al., 1995).

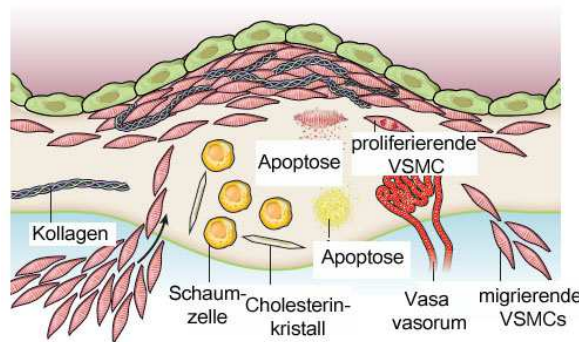


**Abbildung 1.2** Darstellung der endothelialen Dysfunktion der Atherosklerose verändert nach Libby et al., 2011



### Fettstreifen Formation

Schaumzellen bilden das klassische zelluläre Substrat der sog. Fettstreifen (fatty streaks), die frühesten erkennbaren Gewebsveränderungen in der Arterienwand. Durch diese Entzündungsmechanismen können nun weitere Zellen in der Gefäßwand aktiviert werden. VSMCs transformieren von einem physiologischen kontraktiven, ruhenden Phänotyp, mit einer sehr geringen Proliferation- und Migrationsneigung in einen synthetischen Phänotyp. Diese synthetischen VSMCs wandern von der Tunica media in die Tunica intima ein, proliferieren dort und bilden vermehrt EZM (Scott et al., 1996). Die Migration, Proliferation und Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen stellen somit essentielle Schritte in der Pathophysiologie der Atherosklerose dar (Libby et al., 2011).

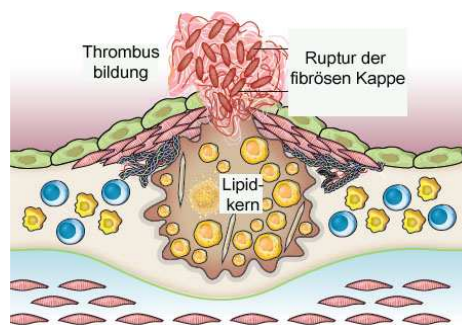


**Abbildung 1.3** Darstellung der Fettstreifen Formation der Atherosklerose verändert nach Libby et al., 2011

### Die Entstehung eines Fibrösen Plaques und eines Thrombus

VSMCs und Endothelzellen reagieren nicht nur auf inflammatorische Botenstoffe. Sie sind auch in der Lage, diese selber zu bilden und unterstützen somit zusammen mit den Makrophagen und den aktivierten T-Lymphozyten den entzündlichen Prozess der Plaque-Entstehung (Ross, 1995). Es entwickelt sich eine fortschreitende atherosklerotische Läsion. Beeinflusst von inflammatorischen Mediatoren kommt es zur Apoptose von Zellen, zu zunehmender Akkumulation von Makrophagen und Schaumzellen bilden im Inneren der Neointima einen nekrotischen Kern, der auch Atherom genannt wird. Zunächst sind diese Läsionen stabil, d.h. sie besitzen eine stabile, schützende fibröse Kappe bestehend aus VSMCs und EZM. Diese Kappe trennt das zirkulierende Blut im Gefäßlumen von dem darunterliegenden nekrotischen Lipidkern (Fuster, 1994). Stabile Plaques können jedoch im Laufe der Zeit zu instabilen, gefährlichen, Läsionen konvertieren. Dabei wird der nekrotische Lipidkern zunehmend größer, die fibröse Kappe dagegen dünner. Charakteristisch für diese entzündliche Region ist die Produktion und

Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs), die eine Degradation der EZM (z.B. Kollagen, Elastin) verursachen und dadurch die fibröse Kappe destabilisieren (Libby, 2001b). Unter diesen Umständen können die Plaques jederzeit aufbrechen. Durch die Ruptur einer fibrösen Kappe entstehen akute koronare Syndrome. Dabei gelangt das zirkulierende Blut in Kontakt mit Kollagen und dem prothrombogenen Material des Lipidkerns (Schwartz et al., 2000). Dieser Kontakt initiiert eine Thrombusbildung, die zu einem plötzlichen und möglicherweise totalen Verschluss des betroffenen Gefäßes führen kann. Klinisch manifestiert sich die Plaqueruptur mit Thrombusbildung als instabile Angina pectoris oder akuter Myokardinfarkt bzw. zerebraler Insult (Schwartz et al., 2000; Libby, 2001a).



**Abbildung 1.4** Darstellung der Thrombusbildung der Atherosklerose verändert nach Libby et al., 2011

### 1.1.4 Die Rolle von MMP-9 in der Pathogenese der Atherosklerose

Im Rahmen der Atherosklerose kommt der Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) als eines von mehr als 20 Mitgliedern der MMP-Familie eine bedeutende Rolle zu. Bei den MMPs handelt es sich um Zink- und Kalzium-abhängige Endopeptidasen, die die Fähigkeit besitzen, Proteinbestandteile der EZM abzubauen. MMPs tragen zur Umstrukturierung von Geweben bei und spielen somit eine zentrale Rolle in physiologischen (z.B. Organentwicklung) und pathologischen Prozessen (Entzündungsvorgänge, Gefäßumbauprozesse, Tumorprogression und -angiogenese) (Galis et al., 2002).

Traditionell wurden MMPs anhand ihrer Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine eingeteilt. Allerdings ist diese strikte Trennung nach Substraten mit dem aktuellen Wissensstand nicht mehr aufrechtzuerhalten, da mit den Fortschritten in der Erforschung der Aktivitätsspektren sich die Familie der MMPs ständig erweitert und auch zunehmend überschneidet (Clark et al., 2008). Deshalb werden MMPs nun eher basierend auf ihrer Domänenstruktur, dem Aktivierungsmechanismus und ihrer zellulären Lokalisation eingeteilt (Brinckerhoff and Matrisian, 2002).

MMP-9 wird zur Gruppe der Gelatinasen gezählt und wird bisweilen auch als Gelatinase B bezeichnet. Das Gen der Gelatinase B wird in vaskulären Zellen wie VSMCs, Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen nur sehr schwach exprimiert. Die Aktivität von MMP-9 kann jedoch durch verschiedenartige Stimuli induziert werden. Zahlreiche Wachstumsfaktoren (wie TNF $\alpha$ ), Zytokine (wie IL-4), Tumorstimulanzien (wie Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)) oder auch Hormone regulieren die Expression von MMP-9 (Birkedal-Hansen et al., 1993; Van den Steen et al., 2002). Die Aktivierung der Matrix Metalloproteinase-9 ist von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit Plaquestabilität. MMP-9 wird in hohem Maße in atherosklerotischen Läsionen exprimiert (Galis and Khatri, 2002; Newby, 2012). Wichtige Rückschlüsse auf die Rolle von MMP-9 bei der Initiierung der Plaqueruptur wurden aufgrund der Ergebnisse von Newby und Kollegen gezogen. Sie zeigten, dass die extrazelluläre Matrixdegradation durch MMP-9 zu einer dünnen fibrösen Kappe führt und der Kollagengehalt geringer wird, typische Merkmale eines instabilen Plaques (Newby, 2005). Ein weiteres Beispiel für die Rolle von MMP-9 innerhalb der pathophysiologischen Prozesse, die im Rahmen der Atherosklerose auftreten, lieferten Marx und Kollegen. Sie zeigten, dass die Hochregulation von MMP-9 während der Transformation von Monozyten zu Makrophagen die Makrophageninvasion in die Gefäßintima beschleunigt (Marx et al., 1998a). VSMCs stellen während der strukturellen Veränderungen in der Tunica intima eine Klasse vermehrt nachweisbarer Zellen, die MMP-9 sezernieren dar. Auf diese Weise kann über die unkontrollierte Steigerung der Expression von MMP-9 das Einwandern ebenso wie die Proliferation der VSMCs beschleunigt werden, was zu einer Schwächung der fibrösen Kappe führt und somit eine Ruptur der atherosklerotischen Läsion zur Folge hat (Galis and Khatri, 2002; Newby, 2006).

Somit ist MMP-9 von besonderem Interesse im Zusammenhang mit der Atheroskleroseprogression und stellt ein wichtiges therapeutisches Ziel dar. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass PPAR $\gamma$ -Liganden die MMP-9 Expression inhibieren und somit in der Gefäßwand dem atherosklerotischen Prozess entgegenwirken können. Im nächsten Abschnitt wird deshalb der Kernrezeptor PPAR $\gamma$  und seine gefäßschützende, anti-inflammatorische Funktion vorgestellt.

### 1.2 PPAR $\gamma$

Der Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  ist ein Mitglied der nukleären Rezeptorfamilie Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPAR) und gehört zu den Ligand-aktivierten nukleären Hormonrezeptoren, die die Expression spezifischer Zielgene modulieren können (Evans, 1988; Spiegelman, 1998; Kersten et al., 2000).

Derzeit sind 48 Mitglieder der Kernrezeptorfamilie beschrieben und dazu zählen unter anderem die Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren, die Retinoidrezeptoren und die Vitamin-D-Rezeptoren (Willson et al., 2001). Der Name PPAR beruht auf der Beobachtung, dass verschiedene chemische Verbindungen (z.B. Fibrate) in Nagern zu einer Vermehrung und Vergrößerung von Peroxisomen führten, welche mit der Aktivierung eines Proteins einherging, das PPAR genannt wurde. Dieser Name ist heute allerdings reichlich irreführend, denn einerseits konnte das Phänomen der Peroxisomenproliferation im humanen System nie gezeigt werden und andererseits konnte in humanen Lebern kein karzinogener Effekt der Peroxisomenproliferatoren, welcher in den Nagetieren beschrieben wurde, gezeigt werden (Reddy et al., 1980). Nach gegenwärtigem Kenntnisstand umfasst die PPAR-Familie drei Subtypen: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) und PPAR $\gamma$  (NR1C3) (Michalik et al., 2006). PPAR $\alpha$  wird hauptsächlich in der Leber, Niere und im Herz exprimiert wo es vor allem die Genexpression im Lipidmetabolismus reguliert (Keller et al., 1993a, 1993b; Gulick et al., 1994). Die Expression von PPAR $\beta/\delta$  wird ubiquitär beschrieben. PPAR $\beta/\delta$  stimuliert die Fettsäureoxidation vorwiegend im Skelettmuskel (Fredenrich and Grimaldi, 2005). PPAR $\gamma$  ist verantwortlich für die Regulation von verschiedenen zellulären Mechanismen, welche vom Glucose- und Lipidmetabolismus (Issemann and Green, 1990; Tontonoz et al., 1994a, 1994b; Michalik et al., 2006) bis zu anti-inflammatorischen, pro-apoptotischen und anti-atherosklerotischen, gefäßschützenden Effekten in vaskulären Zellen reicht (Nagy et al., 1998a; Ricote et al., 1998b; Touyz and Schiffrin, 2006).

#### 1.2.1 Genomische Organisation, Isoformen, Aufbau

Die chromosomale Lokalisation des PPAR $\gamma$ -Gens wurde sowohl für die Maus als auch für den Menschen identifiziert. In der Maus ist PPAR $\gamma$  auf dem Chromosom 6 an Position E3-F1 lokalisiert. Das humane PPAR $\gamma$ -Gen befindet sich auf Chromosom 3 an Position 3p25, in unmittelbare Nähe zu zwei weiteren Kernrezeptoren RAR $\beta$  und TR $\beta$ . In der Maus wurden zwei Spleißvarianten von PPAR $\gamma$  identifiziert, g1 und g2, beim Mensch existieren mindestens noch zwei weitere Isoformen 3 und 4 (Duan et al., 2008).

Diese Isoformen unterscheiden sich als Konsequenz der Verwendung verschiedenartiger PPAR $\gamma$ -Promotoren sowie durch alternatives Splicing (Desvergne and Wahli, 1999). Die humanen Spleißvarianten PPAR $\gamma$ 1, 3 und 4 haben unterschiedliche Promotoren und unterscheiden sich auf Ebene der mRNA, während das Protein identisch ist. PPAR $\gamma$ 2 ist gegenüber den anderen Isoformen am N-Terminus um 30 (Maus) bzw. 28 (Mensch) Aminosäuren verlängert (Lehrke and Lazar, 2005). PPAR $\gamma$ 1 wird ubiquititär in Endothelzellen, VSMCs, Makrophagen und Kardiomyocyten exprimiert, während PPAR $\gamma$ 2 hauptsächlich in Adipozyten exprimiert wird (Tontonoz et al., 1994b; Ricote et al., 1998a; Marx et al., 1999). Die Struktur von PPAR $\gamma$ , die von Nolte et. al. mittels der Röntgen-Raman-Streuungs-Methode aufgeklärt wurde, zeigt den für nukleäre Hormonrezeptoren typischen Aufbau aus fünf Domänen (Abbildung 1.5) (Nolte et al., 1998).



**Abbildung 1.5** Schematische Struktur von nukleären Hormonrezeptoren bzw. PPAR $\gamma$ .

A/B: Aktivierungsdomäne, AF1 (Liganden-unabhängig), C: DNA-Bindungsdomäne, (2 Zinkfinger-Motive), D: Linkerdomäne/Dimerisierung, E/F: Dimerisierung, Liganden-Bindungsdomäne, AF2)

Der N-Terminus besteht aus der Liganden-unabhängigen Aktivierungsdomäne [A/B], die auch als AF1 bezeichnet wird, gefolgt von der DNA-Bindungsdomäne (DBD), die zwei Zink-Finger-Motive enthält [C]. Diese Domäne erlaubt es dem Protein mit der DNA zu interagieren und an das entsprechende Bindungsmotiv im Promotor, das so genannte PPAR Response Element (PPRE) zu binden. Der DNA-Bindungsdomäne folgt die Hinge-Domäne (HD) [D], welche dem Protein eine Flexibilität hinsichtlich der Fähigkeit zur Liganden- und DNA-Bindung ermöglicht. Diese Domäne spielt somit eine wichtige Rolle bei Konformationsänderungen und ist weiterhin auch in der Lage mit anderen Kofaktoren eine direkte Protein-Interaktion einzugehen. Darauf folgt die Domäne E mit der Liganden-Bindungsdomäne (LBD), an die der Ligand binden kann. Die beiden Domänen C und D mit der DBD und der LBD sind am stärksten konserviert. Am C-terminalen Ende des PPAR $\gamma$  Proteins befindet sich die Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne AF2 in der Region F (Berger and Moller, 2002).

### 1.2.2 PPAR $\gamma$ -Liganden

PPAR $\gamma$  hat als Transkriptionsfaktor vielfältige Möglichkeiten in verschiedene Signalkaskaden regulierend einzugreifen. Grundvoraussetzung für diese Fähigkeiten ist allerdings die Bindung von spezifischen PPAR $\gamma$ -Liganden. Da die PPAR-Isoformen aber strukturell weitestgehend

homolog sind, ist es nicht verwunderlich, dass deren Liganden ebenfalls vergleichbare Strukturen besitzen. So ist die aktivierende Wirkung eines Liganden meist nicht auf einen PPAR-Subtyp beschränkt. Natürliche Liganden der PPARs sind gesättigte und ungesättigte Fettsäuren. So können beispielsweise die ungesättigten Fettsäuren wie Linolsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure alle drei PPAR-Isoformen binden (Kliwer et al., 1994). Es wurden jedoch sowohl natürliche als auch synthetische PPAR-Liganden identifiziert, die selektiv nur eine Isoform der PPARs binden, weshalb die selektiven PPAR $\gamma$ -Liganden im Folgenden dargestellt werden.

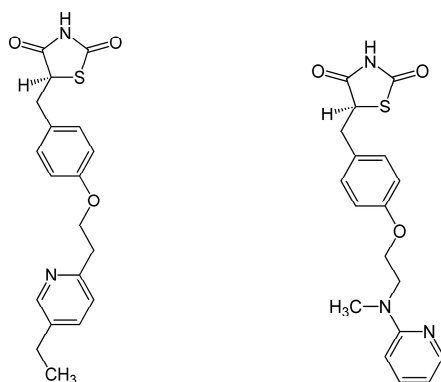
### Natürliche PPAR $\gamma$ -Liganden

Als selektive natürliche Liganden von PPAR $\gamma$  sind interessanterweise die zu den Eicosanoiden zugehörigen 15-Deoxy- $\Delta^12,14$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (15-dPGJ<sub>2</sub>), ein Prostaglandin-Derivat, sowie Metaboliten der Linolsäure 9- und 13-Hydroxyoctadecadienoic Säure (HODE) und 8 (S)-Hydroxyeicosanoic Säure (HETE) bekannt. (Forman et al., 1995; Kliwer et al., 1995; Fajas et al., 1997; Huang et al., 1999; Schopfer et al., 2005; Széles et al., 2007). Darüber hinaus konnte in Monozyten bzw. Makrophagen nachgewiesen werden, dass Komponenten von oxidierten LDL, welches die bereits erwähnten Komponenten 9-HODE und 13-HODE enthält, PPAR $\gamma$  aktiviert, und somit eine wichtige Rolle bei der Schaumzellendifferenzierung bzw. der Pathogenese der Atherosklerose spielt (Nagy et al., 1998b). Vor allem die Identifikation von Fettsäurederivaten als selektive PPAR $\gamma$ -Liganden, die infolge von inflammatorischen Prozessen entstehen, bestätigte, neben seinen Funktionen im Glukose- und Lipidstoffwechsel, die enorme Bedeutung von PPAR $\gamma$  als potentieller Regulator der Atherosklerose.

### Synthetische PPAR $\gamma$ -Liganden

Die synthetischen PPAR $\gamma$ -Liganden sind die Thiazolidindione (TZDs), welche auch als Glitazone bezeichnet werden (Lehmann et al., 1995a). Dazu zählen Pioglitazon und Rosiglitazon. Mitte der 80er Jahre wurden sie als potentielle Therapeutika gegen T2DM identifiziert, bei dem es zu einem stark erhöhten Blutglukosespiegel kommt, da der Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel aufgrund einer Insulinresistenz gestört ist. Patienten mit T2DM, denen Glitazone oral verabreicht wurden, zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin. Zusätzlich zur antidiabetischen Wirkung der TZDs konnte ihnen, basierend auf Tiermodellen, auch eine Beeinflussung des Lipidstoffwechsels zugeordnet werden. Zunächst war der genaue Wirkmechanismus der TZDs allerdings unbekannt, bis Lehmann *et al.* nachweisen konnten, dass die TZDs hochaffine selektive PPAR $\gamma$ -Liganden darstellen (Lehmann et al., 1995b). Somit führt die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch TZDs, vor allem im Fettgewebe, zur Regulation von Genen, die die

Insulinsensitivität maßgeblich beeinflussen. Die klinische Verwendung der Glitazone ist aber begrenzt aufgrund verschiedener Nebenwirkungen wie Körpergewichtszunahme, Flüssigkeitsretention, Ödeme, Knochenfrakturen oder ein potentiell erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Nesto et al., 2003; Dormuth et al., 2009; Bourg and Phillips, 2012). Die Diskussion um die kardiovaskuläre Sicherheit von Rosiglitazon führte im Herbst 2010 dazu, dass die Zulassung für Rosiglitazon aufgehoben wurde. Kürzlich wurde unter Pioglitazontherapie ein leicht erhöhtes Risiko für Harnblasenkarzinome dokumentiert. Dies führte zur Ausweitung der Kontraindikationen für Pioglitazon auf Patienten mit aktivem Blasenkarzinom, Blasenkrebs in der Anamnese oder nicht-abgeklärter Hämaturie. Pioglitazon ist jedoch weiterhin im Handel erhältlich. In Abbildung 1.6 sind die Strukturformeln von Pioglitazon und Rosiglitazon als Vertreter dieser Wirkstoffgruppe darstellt.



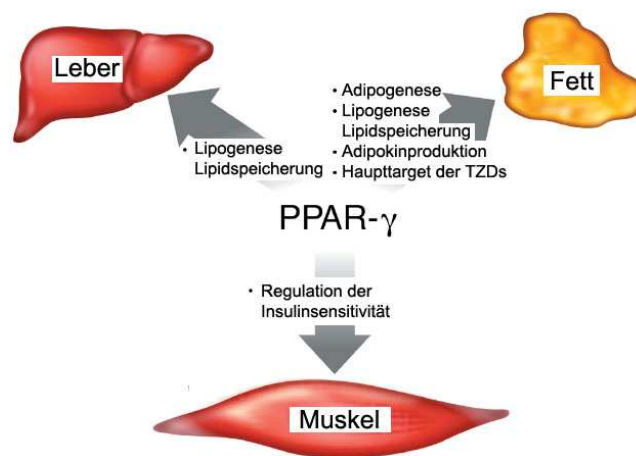
**Abbildung 1.6** Die chemische Struktur von Pioglitazon (links) und Rosiglitazon (rechts)

Exemplarisch sind die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Thiazolidindione Pioglitazon und Rosiglitazon dargestellt.

### 1.2.3 Metabolische Effekte von PPAR $\gamma$

Die PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Glitazone führt zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität durch eine verminderte Glukoseproduktion in der Leber und einer gesteigerten Glukoseaufnahme im Muskel sowie im Fettgewebe und somit zur Senkung des Blutglukosespiegels (siehe Abbildung 1.7) (Gervois et al., 2000; Meirhaeghe and Amouyel, 2004; LeBrasseur et al., 2006; Jay and Ren, 2007). Darüber hinaus regulieren Glitazone den Lipidmetabolismus und die Fettzellendifferenzierung durch Regulation der Genexpression im Fettgewebe (Drori et al., 2005). Dabei werden Adipozytokine, die die Insulinresistenz fördern, reduziert und die Serumspiegel von Adiponektin, einem Hormon, welches ausschließlich von Fettzellen produziert wird und die Wirkung des Insulins verstärkt, werden erhöht (Pajvani et al., 2004; Rangwala and Lazar, 2004; Marx and Walcher, 2007). Außerdem fördert eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung die Aufnahme von

Fettsäuren in Adipozyten und schützt dadurch insulinempfindliches Gewebe vor lipotoxischen Schäden (Armoni et al., 2005). Ebenso konnte in experimentellen und klinischen Studien gezeigt werden, dass TZDs die  $\beta$ -Zell Funktion verbessern (Marx and Walcher, 2007). Weitere günstige Effekte auf den Lipidstoffwechsel, die durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung erreicht werden, sind vermehrte Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT 4 und Insulin Rezeptor Substrate IRS-1 und IRS-2 in Fett- und Muskelzellen. Wie bereits angedeutet greifen Glitazone über ihre Wirkung auf PPAR $\gamma$  neben den Effekten auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel auch in andere Prozesse des Organismus ein. In nächsten Abschnitt wird auf die Aspekte im Atheroskleroseprozess eingegangen.



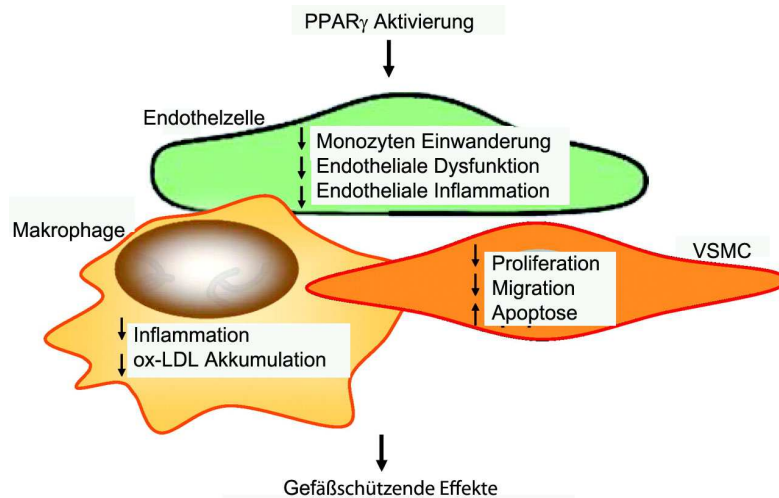
**Abbildung 1.7** Metabolische Effekte von PPAR $\gamma$  im Fettgewebe, in der Leber und im Muskel verändert nach Evans et al., 2004b; TZDs Thiazolidindione

### 1.2.4 Vaskuläre Effekte von PPAR $\gamma$

In zahlreichen neueren Studien rücken die anti-inflammatorischen und pro-apoptischen Wirkungen von PPAR $\gamma$  immer mehr in den Vordergrund und weisen darauf hin, dass Glitazone lokal in der Gefäßwand dem Atheroskleroseprozess entgegenwirken (Marx et al., 2004). Während man die Isoform PPAR $\gamma$ 2 fast ausschließlich in Adipozyten findet, wird PPAR $\gamma$ 1 ubiquitär exprimiert und ist somit auch in vaskulären Zellen wie Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und T-Zellen vorzufinden (Marx et al., 1998a, 1998b; Ricote et al., 1998c). Ebenso konnte gezeigt werden, dass der für die Glitazonwirkung wichtige PPAR $\gamma$ -Rezeptor sowohl in der normalen Gefäßwand als auch in humanen atherosklerotischen Läsionen nachweisbar ist (Law et al., 2000). Diese Ergebnisse deuten auf die enorme Relevanz von transaktivierenden und/oder transreprimierenden PPAR $\gamma$ -Eigenschaften in vaskulären Zellen hin (siehe Abbildung 1.8).



## Einleitung



**Abbildung 1.8** Vaskuläre Effekte von PPAR $\gamma$  in Endothelzellen, Makrophagen und VSMCs verändert nach Duan et al., 2008

Glitazone haben durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$  protektive Effekte in der frühen Phase der Atherosklerose: Sie hemmen die Einwanderung von Monozyten und T-Zellen durch Hemmung der Produktion von Chemokinen wie Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Marx et al., 2000) sowie Zytokinen wie TNF $\alpha$  und Interleukinen wie IL-6, IL-1 $\beta$  (Brummer et al., 2005) und durch Hemmung der Expression von Adhäsionsmoleküle wie ICAM und VCAM (Pasceri et al., 2000; Verrier et al., 2004; Sasaki et al., 2005).

Zusätzlich kommt es zur Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B, AP-1, welche ebenso für die Induktion von Adhäsionsmolekülen benötigt werden (Collins et al., 1995; Wang et al., 2002). Nach der Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand differenzieren diese zu Schaumzellen und vermitteln so vielfältige anti-inflammatorische Effekte. So wird unter anderem die Expression von PPAR $\gamma$  erhöht. (Ricote et al., 1998c). Weitere Studien zeigten, dass PPAR $\gamma$ -Aktivierung die Produktion der Cytokine reduziert, die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und der Matrix-degradierenden Metalloproteinase-9 MMP9 in Makrophagen inhibiert (Jiang et al., 1998; Marx et al., 1998b; Ricote et al., 1998b, 1999). Merkmale endothelialer Dysfunktion sind die geringere Verfügbarkeit von NO sowie die Sezernierung des Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) aus Endothelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$ -Aktivatoren die Expression von ET-1 hemmen und die Ausschüttung von NO erhöhen (Delerive et al., 1999; Calnek et al., 2003; Ptasinska et al., 2007). Weiterhin löst eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung den Rückgang der Fettstreifenbildung aus durch eine gesteigerte Cholesterolabnahme aus Makrophagen mittels Induktion von Genen wie den Cholesteroltransportergenen ABCA1 und ABCG1 (Akiyama et al., 2002; Hou et al., 2007).

Ein weiterer entscheidender Schritt während der Atherosklerose ist die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die PPAR $\gamma$ -Aktivierung in den Gefäßmuskelzellen der Tunica intima im Vergleich zu VSMCs der Tunica media erhöht ist (Bishop-Bailey et al., 2002). Auch hier haben Glitazone protektive Effekte. PPAR $\gamma$ -Liganden inhibieren die Vermehrung der Gefäßmuskelzellen durch Behinderung der DNA-Replikation und des Zellzyklusses (Kihara et al., 1998; de Dios et al., 2003). Dabei erhöhen PPAR $\gamma$ -Aktivatoren einerseits das Expressionsniveau des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p27 (Wakino et al., 2000) und erniedrigen andererseits den Phosphorylierungsstatus des Retinoblastoma Proteins Rb was zum Zellzyklus Arrest führt. (Bruemmer et al., 2003).

Glitazone haben zudem protektive Effekte in VSMCs in der Phase der Fettstreifen-Formation durch Hemmung der Migration glatter Muskelzellen (Goetze et al., 1999b, 1999c; Zahradka et al., 2006). Sie unterdrücken die Ausschüttung von Matrix-degradierenden Enzymen wie MMP-9, die wichtig sind für die Gefäßzellmigration (Marx et al., 1998a; Maldonado et al., 2003). Außerdem sind MMPs an der Umwandlung von stabilen in instabile Plaques beteiligt und daher können Glitazone durch Stabilisierung atherosklerotischer Plaques zur Prävention einer Plaqueruptur beitragen. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass PPAR $\gamma$  Apoptose in Gefäßmuskelzellen induziert. Hierbei kommt es zu einer Hochregulation des Wachstumsarrest und des DNA damage-inducible Gen 45 (GADD45) (Blaschke et al., 2004). Weiterhin gibt es die initiale Beobachtung von Tontonoz et al., dass PPAR $\gamma$  in Makrophagen CD36 hochreguliert. Dieser Prozess wäre proatherosklerotisch durch die vermehrte Aufnahme von oxLDL (Tontonoz et al., 1998). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Lipidaufnahme und -speicherung in Makrophagen durch PPAR $\gamma$  kein erhöhtes atherosklerotisches Risiko bedeutet, da gleichzeitig Effluxtransportsysteme, wie der Reverse Cholesteroltransport aktiviert werden, wodurch eine atherosklerotische Lipidakkumulation verhindert wird (Chawla et al., 2001; Chinetti et al., 2001). Fasst man die bislang verfügbaren *in vitro*-Daten zusammen, so haben Glitazone überwiegend protektive Effekte in allen Phasen der Atherosklerose.

Zur Untersuchung der Wirkung von PPAR $\gamma$ -Aktivatoren in der Atheroskleroseentwicklung wurden verschiedene Tiermodelle untersucht. Eine Studie wurde am Modell der LDL-Rezeptor-defizienten Maus, eines der best-etablierten Mausmodelle zur Untersuchung der Atherosklerose, von Li und Kollegen durchgeführt (Li et al., 2000a). In dieser Studie erhielten Mäuse, die unter einer cholesterinreichen Diät eine vermehrte Atheroskleroseentwicklung zeigten, für 10 Wochen einen PPAR $\gamma$ -Aktivator, und anschließend wurde die Plaquegröße im Aortenbogen im Vergleich zur Kontrollgruppe quantifiziert. Es zeigte sich, dass das Glitazon und GW7845 (ein Nicht-Glitazon PPAR $\gamma$ -Aktivator) die Atheroskleroseprogression in männlichen Mäusen signifikant verringern konnten (Li et al., 2000a). Ähnlich positive Effekte zeigt die Behandlung von LDL-

Rezeptor-defizienten Mäusen mit Troglitazon, d.h. auch hier kam es zur Reduktion von atherosklerotischen Läsionen (Collins et al., 2001). In einer anderen Studie wurde der Effekt von Glitazonen auf die Intimahyperplasie nach Gefäßverletzung in der Ratte geprüft. Dabei handelt es sich die um die Reaktion eines Gefäßes auf ein beliebiges Trauma. Klinische Relevanz besteht vor allem bei Restenoseprozessen oder Gefäßverschlüssen. Als entscheidender Mechanismus ist die Proliferation und Migration von VSMCs aus der Tunica media in die Tunica intima, zusammen mit der Produktion von EZM, anerkannt. Die Auswertung der Studie ergab, dass eine Glitazontherapie die fortschreitende Neointimabildung nach Gefäßläsion signifikant reduzierte (Law et al., 1996). Die Daten im Tiermodell legen somit nahe, dass Glitazone auch *in vivo* den Atheroskleroseprozess positiv beeinflussen.

Eine Möglichkeit zu untersuchen, ob die Ergebnisse aus den Tiermodellen auch auf den Menschen übertragbar sind, ist die Messung von Surrogatparametern der Atherosklerose im Blut. Ein solcher Surrogatparameter der Atherosklerose ist das Adhäsionsmolekül E-Selektin, das nach Aktivierung auf Endothelzellen exprimiert wird und die Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand unterstützt (Verma et al., 2003). Erhöhte E-Selektin-Spiegel findet man bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und/oder Atherosklerose, so dass der E-Selektin-Spiegel das Ausmaß der Endothelschädigung bei vaskulären Erkrankungen widerspiegelt (Hwang et al., 1997). Eine Glitazontherapie führte bei Patienten mit T2DM zu einer signifikanten Reduktion der E-Selektin-Spiegel und zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation (Cominacini et al., 1998; Murakami et al., 1999). Inwieweit diese Effekte auf einer Verbesserung der Blutzuckereinstellung beruhen war zunächst nicht klar, aber weitere Daten zeigten, dass diese Glitazoneffekte auf die Endothelfunktion komplett unabhängig von ihren metabolischen Wirkungen sind. In einer Studie mit gesunden, nichtdiabetischen Probanden wurde gezeigt, dass die Rosiglitazontherapie schon nach einem Tag zu einer signifikanten Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation führt (Hetzl et al., 2005).

Da die blutzuckersenkende und lipidmodulierende Wirkung von Glitazonen erst nach vier bis sechs Wochen einsetzt und in dieser Studie gesunde Probanden untersucht wurden, geht man von einer direkten Wirkung der Glitazone auf das Gefäßsystem aus (Walcher et al., 2010). Die vorgestellten Ergebnisse zur Atherosklerosemodulation anhand von Surrogatparametern können durch weitere klinische Daten untermauert werden. Arbeiten von Haffner und Kollegen konnten bei Patienten mit T2DM zeigen, dass eine Therapie mit Rosiglitazon oder Pioglitazon zu einer signifikanten Reduktion der Serumkonzentrationen von C-reaktivem Protein (CRP) und MMP-9 führt (Haffner et al., 2002). Diese Daten konnten mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Sidhu und Kollegen bestätigt werden. Sie zeigten, dass bei gesunden Probanden oder nichtdiabetischen Patienten mit koronarer Herzerkrankung Glitazone die inflammatorischen

Surrogatmarker CRP und E-Selektin reduzierten (Sidhu et al., 2003). Neben dem Einfluss auf die Gefäßfunktion scheinen Glitazone auch strukturelle Veränderungen an atherosklerotischen Gefäßen zu bewirken. So ergab eine Studie zur Analyse der Intima-Mediadicke nach koronarer Stent-Implantation, dass die Therapie mit Pioglitazon das im Ultraschall gemessene neointimale Volumen im gestenteten Segment signifikant reduziert (Marx et al., 2005).

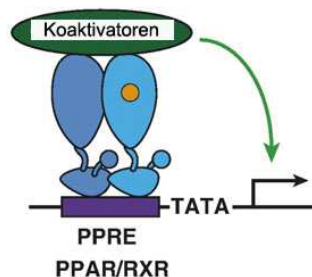
Die PROactive Studie (= PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events ) ist eine prospektive, randomisierte Placebo-kontrollierte Endpunkt-Studie. Sie untersuchte bei Patienten mit T2DM, die bekannte makrovaskulären Vorerkrankungen hatten, den Effekt einer Pioglitazontherapie versus Placebo auf kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität. Mehr als 5000 Patienten im Alter von 62 Jahren mit T2DM und makrovaskulären Erkrankungen nahmen an der Studie teil und erhielten bis zu 45mg Pioglitazon oder Placebo am Tag. Der primäre, aus sieben Einzelendpunkten zusammengesetzte Endpunkt dieser Studie war die Kombination aus Gesamtmortalität, nicht-tödlichem Myokardinfarkt, Schlaganfall, akutem Koronarsyndrom, Beinamputation sowie kardiale Intervention und Beinrevaskularisation. Nach bereits drei Jahren zeigte sich unter Pioglitazon eine 10%-ige Reduktion des primären kombinierten Endpunktes, verfehlte aber knapp die statistische Signifikanz ( $p=0,09$ ). Die Kombination des sekundären Endpunktes bestehend aus Gesamtmortalität, nicht-tödlichem Myokardinfarkt und Schlaganfall zeigte eine signifikante Reduktion um 16% ( $p=0,027$ ). Allerdings kam es in der Pioglitazongruppe häufiger zur Hospitalisation wegen Herzinsuffizienz, jedoch war die Mortalitätsrate durch Herzinsuffizienz in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Studie zeigt das Pioglitazon das Potential besitzt, makrovaskuläre Ereignisse zu reduzieren. Insgesamt scheint es, dass diejenigen Typ-2-Diabetiker mit makrovaskulären Gefäßschäden, die keine Herzinsuffizienz entwickeln, von einer Pioglitazontherapie bezüglich der Morbidität und Mortalität makrovaskulärer Ereignisse profitieren (Dormandy et al., 2005). Diese Studien zeigen somit, dass Glitazone auch beim Menschen protektive Effekte in Bezug auf kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität haben und den Atheroskleroseprozess beeinflussen. Im nächsten Abschnitt werden nun die PPAR $\gamma$ -vermittelten Genregulationsmechanismen besprochen, die diese Effekte auslösen.

### **1.3 Genregulationsmechanismen durch PPAR $\gamma$**

PPAR $\gamma$  kann die Genexpression durch verschiedene Mechanismen positiv oder negativ regulieren: Dazu gehören Ligand-abhängige Transaktivierung, Ligand-unabhängige Repression und Ligand-abhängige Transrepression. Diese werden im Folgenden ausführlich erläutert.

### 1.3.1 Ligand-abhängige Aktivierung

Die Ligand-abhängige Transaktivierung ermöglicht PPAR $\gamma$  in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor vor allem die positive Genregulation bei der Adipozytendifferenzierung und im Glukose-Metabolismus im Fettgewebe, im Muskel und in der Leber. Zur Aktivierung von PPAR $\gamma$  muss die Bindung eines Liganden an die Liganden-Bindungsdomäne, sowie die Heterodimerisierung mit dem Retinoid X-Rezeptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), der ebenfalls durch einen Liganden aktiviert wird, erfolgen. RXR $\alpha$  gehört, wie PPAR $\gamma$  zu den nukleären Hormonrezeptoren. Die Ausbildung des Heterodimerkomplexes PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  ermöglicht nun die direkte Bindung an PPAR Response Elemente (PPRE) im Promotorbereich des Zielgens (Mangelsdorf and Evans, 1995; Schulman et al., 1998). Die als PPRE bezeichnete Basensequenz weist ein so genanntes direktes Repeat auf, mit einer Base Abstand zwischen den Wiederholungen; wobei die Konsensussequenz AGGTCA $n$ AGGTCA lautet (Keller et al., 1993a). Zur vollständigen Transaktivierung werden mehrere Koaktivatoren, wie z. B. der Steroid Rezeptor Koaktivator 1 (SRC1), das cAMP Response Element Bindungsprotein (CBP) oder p300 rekrutiert. Diese Koaktivatorkomplexe reorganisieren durch ihre Histonacetyltransferaseaktivität die Chromatinverpackung und erlauben so der Transkriptionsmaschinerie den Zugang zur Promotorregion, wodurch die Transkription PPAR $\gamma$ -gesteuerter Gene gestartet wird, wie in Abbildung 1.9 dargestellt (Glass and Rosenfeld, 2000; McKenna and O'Malley, 2002; Rosenfeld et al., 2006).



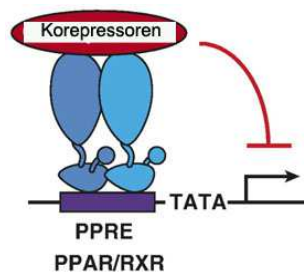
**Abbildung 1.9** Mechanismus der Ligand-abhängigen Transaktivierung

PPAR $\gamma$  aktiviert Ligand (gelber Punkt)-abhängig die Transkription durch Ausbildung eines Heterodimerkomplexes mit RXR $\alpha$  und bindet dadurch direkt an spezifische PPAR-Response Element (PPRE) in Targetgenen. Dies führt zur Rekrutierung von Koaktivatorkomplexen, Modifikation der Chromatinstruktur und zur Zusammenlagerung der Transkriptionsmaschinerie am Promotor. verändert nach Ricote and Glass, 2007

### 1.3.2 Ligand-unabhängige Transrepression

Neben seiner Fähigkeit die Genexpression zu induzieren, ist PPAR $\gamma$  auch in der Lage in Abwesenheit eines Liganden die Gentranskription verschiedener Zielgene zu unterdrücken.

Diese Aktivität ist verbunden mit der Rekrutierung von Korepressorkomplexen, die den Effekten von Koaktivatoren entgegenwirken (siehe Abbildung 1.10) (Dowell et al., 1999; Jepsen et al., 2000; Yu and Reddy, 2007). Die am besten charakterisierten Korepressoren sind hierbei NCoR (Nuclear hormone receptor corepressor) und SMRT (silencing mediator of thyroid-hormone receptors) (Chen and Evans, 1995; Hörlein et al., 1995). Diese Korepressoren bilden zusammen mit Histondeacetylase 3 (HDAC3), TBL1 (transducin beta-like protein-1) und TBLR1 (TBL-1-related protein) einen Korepressorkomplex und können so zusammen mit verschiedenen Kernrezeptoren in Abwesenheit eines Liganden transkriptionelle Repression vermitteln (Li et al., 2000b; Yoon et al., 2003). Der Wechsel von Repression zu Aktivierung schließt eine Ligand-induzierte allosterische Veränderung in der C-terminalen Ligandbindungsdomäne (LBD) ein, so dass die Affinität für Kopressoren reduziert wird und für Koaktivatoren erhöht wird (Nolte et al., 1998; Hu and Lazar, 1999; Perissi et al., 1999; Xu et al., 2002). Zusätzlich zu den Konformationsänderungen in der LBD, zeigt eine Studie von Perissi und Kollegen, dass ein aktiver Ubiquitin-abhängiger Schritt zur Entfernung von NCoR-Komplexen vom Zielgenpromotor notwendig ist (Perissi et al., 2004). Obwohl NCoR und SMRT ursprünglich als Korepressoren von Kernrezeptoren identifiziert wurden, weiß man inzwischen, dass diese auch weitere Funktionen ausüben.



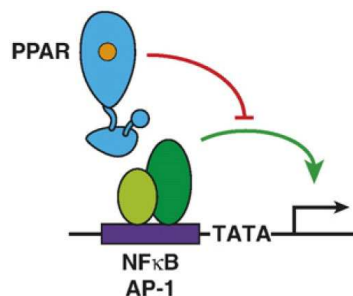
**Abbildung 1.10** Mechanismus der Ligand-unabhängigen Repression

PPAR $\gamma$  bindet in Abwesenheit eines Liganden an Response Elemente und dies führt zur Rekrutierung von Korepressorkomplexen, die die aktive Repression vermitteln. verändert nach Ricote and Glass, 2007

Sie sind beteiligt an der aktiven Repression von Genen, die unter der Kontrolle von verschiedenen signal-abhängigen Transkriptionsfaktoren stehen (Hoberg et al., 2004a; Ogawa et al., 2004; Pascual et al., 2005). Für die transkriptionelle Aktivierung von AP-1 und NF $\kappa$ B Zielgenen wird eine aktive signal-abhängige Entfernung von NCoR und SMRT benötigt (Hoberg et al., 2004b; Ogawa et al., 2004; Perissi et al., 2004; Pascual et al., 2005). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass NCoR/SMRT Komplexe auch für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression benötigt werden.

### 1.3.3 Ligand-abhängige Transrepression

Die meisten der PPAR $\gamma$ -vermittelten anti-inflammatorischen Effekte ereignen sich durch Transrepressionsmechanismen (Touyz and Schiffrin, 2006). Im Gegensatz zur transkriptionellen Aktivierung und Repression, die die Bindung von PPAR $\gamma$  an PPRE-Sequenzen im Promotorbereich erfordert, wird dies bei der Transrepression nicht nötig, denn hier wirkt PPAR $\gamma$  Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF $\kappa$ B entgegen, dargestellt in Abbildung 1.11. Bisher wurden verschiedene Transrepressionsmechanismen identifiziert, die im Folgenden erläutert werden.

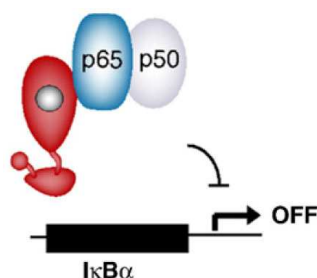


**Abbildung 1.11** Mechanismus der Ligand-abhängigen Transrepression

PPAR $\gamma$  inhibiert die Transkription Ligand (gelber Punkt)-abhängig durch Inhibierung der Aktivierung von anderen Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B oder AP-1. verändert nach Ricote and Glass, 2007

#### Direkte Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren

PPAR $\gamma$  ist in der Lage direkt an andere Transkriptionsfaktoren oder deren Untereinheiten zu binden, wodurch diese an der Assoziation mit ihrem entsprechenden Responsive Element im Promotorbereich gehindert werden. Dadurch wird die Genexpression regulierter Zielgene des entsprechenden Transkriptionsfaktors inhibiert.



**Abbildung 1.12** Mechanismus der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression

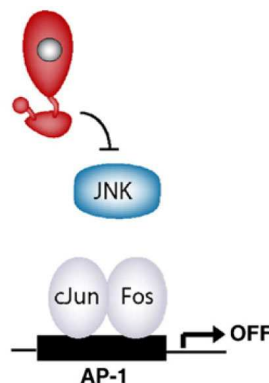
Direkte Interaktion zwischen PPAR $\gamma$  und p65 verändert nach Ricote and Glass, 2007

Dieser Mechanismus wird als ‚cross coupling‘ bezeichnet. Beispiele hierfür sind die Hemmung von LPS-induzierter IL-12 Produktion in Makrophagen durch direkte Interaktion von PPAR $\gamma$  mit

p65/p50 (Chung et al., 2000). In T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen NFAT und PPAR $\gamma$  zur Inhibierung von der Zytokine IL-2 und IL-12 führt (Chung et al., 2000; Yang et al., 2000). Weiterhin inhibiert PPAR $\gamma$  die Aktivierung von AP-1 und JNK und reduziert die IKK-Aktivität was wiederum zur Degradierung von I $\kappa$ Ba und somit zu einer reduzierten Aktivität von NF $\kappa$ B führt, wie in Abbildung 1.12 gezeigt (Zingarelli et al., 2003).

### Regulation der Kinaseaktivität

Ein weiterer beschriebener Mechanismus ist die PPAR $\gamma$ -vermittelte Hemmung des Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK)-Signalweges. Durch die Hemmung der MAPK können entsprechende MAPK-abhängige Transkriptionsfaktoren nicht mehr aktiviert werden. Dies kann ebenfalls zur Hemmung der Expression pro-inflammatorischer Gene führen. Aktivierung von PPAR $\gamma$  reduziert die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) MAPK und p38 im Darm und führt zur Reduktion pro-inflammatorischer Genexpression (siehe Abbildung 1.13) (Desreumaux et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse konnten Goetze und Kollegen in hVSMCs beobachten. Rosiglitazon inhibierte die Migration über ERK/MAPK-Signalwege. (Goetze et al., 1999a, 1999b, 1999c, 2001). Bisher ist allerdings noch nicht geklärt wie PPAR $\gamma$  die Kinaseaktivitäten hemmt.



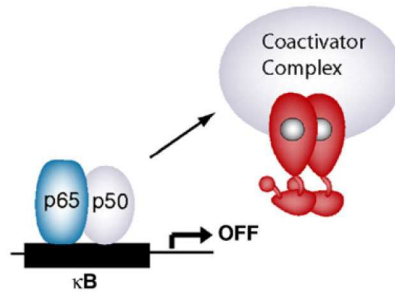
**Abbildung 1.13** Mechanismus der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression

PPAR $\gamma$  Aktivierung inhibiert die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) verändert nach Ricote and Glass, 2007

### Interaktionen mit Koregulatoren

Weiterhin kann PPAR $\gamma$  Koaktivatoren, wie SRC-1 und CBP/p300 binden, welche auch essentiell für die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren sind. Nach der Aktivierung von PPAR $\gamma$  stehen diese Koaktivatoren unter anderem dem pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B oder AP-1 nicht mehr zur Verfügung, wodurch deren Fähigkeit zur Induktion pro-inflammatorischer Gene vermindert ist, dargestellt in Abbildung 1.14 (Kamei et al., 1996; Kodera et al., 2000).



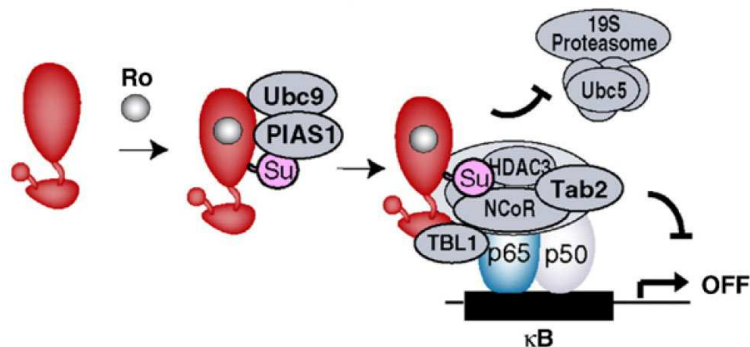


**Abbildung 1.14** Mechanismus der PPARγ-vermittelten Transrepression

Konkurrenz für eine limitierte Anzahl von Koaktivatoren, verändert nach Ricote and Glass, 2007

PPARγ-Sumoylierung vermittelt Transrepression

Am Beispiel des iNOS Gens in Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die PPARγ-Modifikation durch SUMO („small ubiquitin-like modifier“) die NFκB-vermittelte, pro-inflammatorische Genexpression transreprimiert (siehe Abbildung 1.15) (Pascual et al., 2005). Der erste Schritt dieses Signalweges beinhaltet eine Ligand-abhängige Sumoylierung der PPARγ-Ligandbindungsdomäne an Position K365.



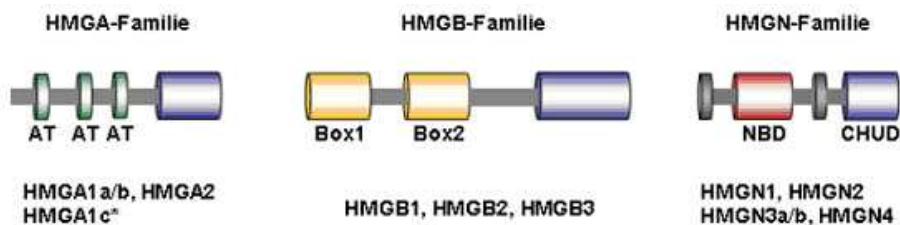
**Abbildung 1.15** Korepressor-abhängiges Modell für Transrepression

In Anwesenheit eines Liganden wird PPARγ sumoyliert und zum Targetpromotor rekrutiert um dort die Entfernung von NCoR-Komplexen zu unterbinden. AP1 activator protein 1, NCoR nuclear-receptor co-repressor complexes, HDAC3 histone deacetylase, TBL1 transducin-β-like 1, TBLR1 TBL-1 related protein, PIAS1 protein inhibitor of activated STAT1, Tab2 TAK1-binding protein, Su sumoyliertes PPARγ verändert nach Ricote and Glass, 2007

Daraufhin wird PPARγ im Komplex mit den NCoR-HDAC3-TBL1-TBLR1 Korepressoren zum pro-inflammatorischen iNOS Promotor rekrutiert. Dies wiederum verhindert den proteasomalen Abbau des Repressorkomplexes, dass normalerweise signalabhängig zur Entfernung benötigt wird und damit Genaktivierung ermöglicht. Das Ergebnis ist somit die Aufrechterhaltung der Transrepression der NFκB-vermittelten Genexpression des iNOS-Gens in Makrophagen (Pascual et al., 2005).

## 1.4 HMGA1

Im letzten Abschnitt der Einleitung wird nun das Nicht-Histon Kernprotein High Mobility Group Protein A1 (HMGA1) vorgestellt, dass im Rahmen dieser Dissertation als ein neuer Koregulator von PPAR $\gamma$  in der Gefäßwand identifiziert werden konnte. Das HMGA1-Protein gehört zur Familie der HMG-Proteine (High Mobility Group-Proteine), welche ihren Namen aufgrund der hohen Laufgeschwindigkeit in der Polyacrylamidgelelektrophorese erhalten haben (Tallini and Dal Cin, 1999). HMG-Proteine sind Chromatin-assoziierte Nicht-Histon-Proteine und wurden 1973 von Goodwin und Johns erstmals entdeckt und beschrieben (Goodwin and Johns, 1973). Die Familie der HMG-Proteine besteht aus den drei Mitgliedern A, B und N, die sich aufgrund charakteristischer, funktioneller Sequenzmotive voneinander unterscheiden (Prymakowska-Bosak et al., 2001; Flohr et al., 2003; Catez et al., 2004). Die Interaktion zwischen HMG-Proteinen und DNA bzw. Chromatin erfolgt mit Hilfe dieser Sequenzmotive. Bezeichnend für die jeweilige Bindungsdomäne ist der letzte Buchstabe der Subfamilien. Die Bindungsdomäne der HMGA-Proteine ist der so genannte AT-Hook, die HMG-Box ist die Bindungsdomäne der HMGB-Proteine und die nukleosomale Bindungsdomäne ist charakteristisch für HMGN-Proteine (Bustin, 1999). Die Domänenstruktur der HMG-Proteine ist in Abbildung 1.16 dargestellt.



**Abbildung 1.16** Strukturelle Hauptmerkmale der HMG-Proteinfamilien

HMGA1-Proteine besitzen drei AT-Hooks (grün) und einen sauren C-Terminus (blau). Eine Ausnahme bildet HMGA1c mit nur zwei AT-Hooks. HMGA-Proteine besitzen alle zwei HMG-Boxen als DNA-Bindungsmotiv (gelb) und einen erweiterten C-Terminus (blau). Die Mitglieder der HMGN-Familie besitzen eine positiv geladene nukleosomale Bindungsdomäne (NBD, rot) und eine negativ geladene C-terminale Chromatin unfolding domain (CHUD, blau), verändert nach Hock et al., 2007.

### 1.4.1 Genomische Organisation, Isoformen, Aufbau

HMGA-Proteine sind hoch konserviert und wurden in der Hefe, in Insekten, Pflanzen und in Vertebraten beschrieben (Reeves, 2001). Die Familie der HMGA-Proteine besteht aus den vier Proteinen: HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c und HMGA2, die lediglich durch zwei Gene kodiert werden.

Dabei stellen HMGA1a-c Spleißvarianten des HMGA1-Transkriptes dar, wohingegen HMGA2 von einem eigenen Gen kodiert wird (Cleynen and Van de Ven, 2008; Nagpal et al., 1999). Das HMGA1-Gen der Maus ist auf dem Chromosom 17 (Pedulla et al., 2001) und beim Mensch auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21) lokalisiert (Cleynen and Van de Ven, 2008). Das humane HMGA1-Gen umfasst einen Bereich von 10 kb und besteht aus acht Exons, von denen Exon fünf bis acht für das HMGA1-Protein kodieren (Friedmann et al., 1993). Dabei kodieren Exon fünf bis sieben jeweils für eine AT-Hook-Domäne, während Exon acht für eine saure C-terminale Domäne kodiert und eine 1345 bp große 3' UTR enthält (Chau et al., 1995; Fusco and Fedele, 2007). Jedes HMGA1-Protein verfügt über drei, unabhängig voneinander funktionierende DNA-bindende Domänen, den AT-Hooks mit denen HMGA1-Proteine in der Lage sind an die kleine Furche von AT-reichen DNA-Abschnitten zu binden (Bustin and Reeves, 1996; Reeves, 2001). In Metaphasechromosomen beim Mensch und bei der Maus lokalisieren HMGA1-Proteine in den AT-reichen G/Q- und C-Banden (Disney et al., 1989) und sind in lebenden Interphasezellen im Heterochromatin angereichert (Harrer et al., 2004). Das AT-Hook-Peptidmotiv zeichnet sich durch die palindromische Aminosäureabfolge aus und besteht aus neun positiv geladenen Aminosäuren, wobei die vier letzten Aminosäuren invariabel sind. Sie stellen ein Motiv dar, das in der Evolution von Bakterien bis hin zu Säugern hoch konserviert ist und auch in Nicht-HMGA-Proteinen wie Transkriptionsfaktoren oder Komponenten von Chromatin-Remodeling-Komplexen vorkommt (Reeves, 2001). Es wird vermutet, dass die AT-Hooks zusammen mit den sie umgebenden Nachbarsequenzen eine Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen darstellen (Yie et al., 1999). Ein weiteres strukturelles Merkmal der HMGA-Proteine ist ihr saurer C-Terminus, dessen Funktion bis heute nicht vollständig geklärt ist. Es gibt Vermutungen, dass diese wichtig für Protein-Protein Interaktionen sei und somit eine erhöhte Transkriptionsfaktoraktivität zur Folge hätte (Yie et al., 1997; Noro et al., 2003).

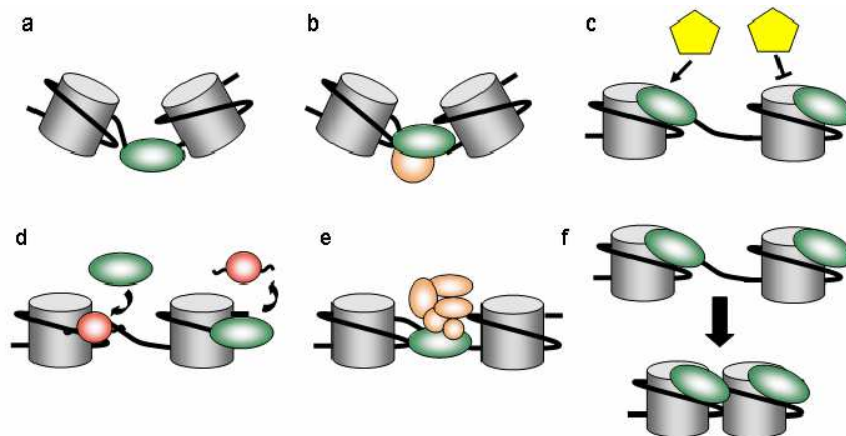
### 1.4.2 Biologische Funktion von HMGA1-Proteinen

Über diese Modulation der Chromatinstruktur sowie verschiedene Protein-Protein-Interaktionen können HMGA1-Proteine unter anderem in die Genregulation eingreifen und beeinflussen darüber die Entstehung, Progression und Malignität von Tumoren, die zelluläre Seneszenz, Krankheiten wie Typ-2-Diabetes und die Regulation zellulärer und embryonaler Differenzierungsprozesse, wie Spermatogenese, Fettzellendifferenzierung und Myogenese (Hock et al., 2007).

Modulation der Chromatinarchitektur

Eines der Hauptkennzeichen der HMGA1-Proteine ist ihre hohe intrinsische Flexibilität. Diese erreichen sie durch das Fehlen einer sekundären Proteinstruktur, solange sie nicht an Partner-Moleküle (DNA oder andere Proteine) gebunden oder sekundär modifiziert sind.

Interagieren sie allerdings mit einem ihrer Partner, so nehmen die HMGA1-Proteine induzierte strukturelle Formen an. Somit ermöglicht ihnen ihre intrinsische Flexibilität die Interaktion mit ihren vielen verschiedenen Partner-Molekülen (Edberg et al., 2004). Sie erkennen primär die Chromatinstruktur und sekundär die Nukleotidsequenz ihrer Substrate, was zur Folge hat, dass sie bevorzugt an verdrehter oder in „Supercoils“ angeordneter DNA binden (Evans et al., 1995). Zudem sind sie in der Lage, abhängig von der Sequenz, der Topologie, der Organisation oder der Länge des DNA-Substrats, lineare DNA zu strecken, entwinden, biegen oder auch Supercoils in die DNA einzufügen (Bustin and Reeves, 1996; Bagga et al., 2000). Weiterhin können sie auch an 4-way-junction-DNA (Hill and Reeves, 1997) und an nukleosomale Kern-Partikel binden (Reeves and Nissen, 1993; Reeves and Wolffe, 1996).



**Abbildung 1.17** Veränderungen der Chromatinstruktur durch HMGA1-Proteine

Modelle zweier benachbarter Nucleosomen (grau mit DNA (schwarz)) und gebundenem HMGA (grün). (a) HMGA induziert Biegungen in der Chromatinstruktur. (b) HMGA-Proteine werden durch bestimmte regulatorische Faktoren (beige Kugel) an spezifische Zielorte rekrutiert und verändern dort die Chromatinstruktur. (c) HMGA vermittelt oder unterbindet die Bindung von weiteren Chromatin-modulierenden Faktoren (gelb). (d) HMGA konkurriert mit nukleären Proteinen (rot) um Chromatinbindungsstellen, (e) HMGA sind Teil von regulatorischen Multiproteinkomplexen (beige). (f) HMGA führt zur Kompaktierung des Chromatins und unterstützt somit die Heterochromatinbildung. verändert nach Hock et al., 2007.

Alle HMG-Proteine funktionieren als Architekturelemente, die die Struktur von DNA und Chromatin modifizieren, um eine Konformation zu erzeugen, die verschiedene DNA-abhängige Aktivitäten wie Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur erleichtert und verstärkt und zur Rekrutierung weiterer Chromatinproteine beziehungsweise Proteinkomplexe führt (Hock et al., 2007). Die strukturellen Modulationsmöglichkeiten der Chromatinarchitektur durch die HMGA-Proteine sind in Abb. 1.17 dargestellt.

### Transkriptionsregulation

HMGA1-Proteine können die Transkription durch Ummodellierung der Chromatinstruktur kontrollieren. HMGA1-Proteine können Histon H1-Proteine in der DNA verdrängen, um damit die Chromatinstruktur zu öffnen. Dies ermöglicht dann die Bindung von Histonacetyltransferasen, die nun wiederum die DNA acetylieren können. Das Nucleosom wird destabilisiert und die DNA ist zugänglich für Kernrezeptoren wie RXR oder RAR und es kann aktive Transkription erfolgen (Nagpal et al., 1999). Am Beispiel des Interleukin Rezeptor 2-Gens konnte gezeigt werden, dass HMGA1-Proteine eine lokale Veränderung in der Chromatinstruktur auslösen. Indem sie das Rotationsverhalten der DNA auf der Oberfläche eines inhibierenden Nucleosoms modifizieren ermöglichen sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA (Attema et al., 2002).

Zudem sind HMGA-Proteine direkt in die Genregulation involviert. Sie sind meist an der Ausbildung von Enhanceosomenkomplexen beteiligt. Das bestuntersuchte Beispiel für die Regulation der Genexpression durch HMGA1 ist die Bindung von HMGA1a an den Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ )-Promotor. Dies führt zu einer kooperativen Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren wie NF $\kappa$ B, ATF2/c-Jun und dem Interferon-regulierenden Faktor (IRF). Die Interaktion von HMGA1a mit diesen Faktoren führt zum Aufbau des Enhanceosoms. Das CREB-bindende Protein (CBP) nutzt dies als Bindungsplattform, was zur Transkriptionsaktivierung führt. CBP wiederum acetyliert HMGA1a, was einen Zerfall des Enhanceosoms bewirkt. Somit stellt HMGA1a einen sensitiven, molekularen Schalter zur Aktivierung und anschließenden Inaktivierung der IFN- $\beta$ -Genexpression dar (Yie et al., 1999; Chau et al., 2005). Für den Zusammenbau des Enhanceosoms sind nicht nur Protein-DNA Interaktionen sondern auch Protein-Protein Interaktionen erforderlich. Diese kooperativen Interaktionen beinhalten Bindungen zwischen HMGA1 und anderen Kernproteinen oder regulatorischen Proteinen, wobei verschiedene Proteine mit verschiedenen Teilen des HMGA1-Proteins interagieren. Die Rolle von HMGA1 in der Genregulation scheint abhängig vom zellulären Kontext, so kann HMGA1 die Genexpression auch negativ regulieren. Das BRCA1-Gen ist ein Beispiel für negative Genregulation durch HMGA1. Dabei binden HMGA1-Proteine direkt im Promotorbereich des Gens und dies führt zu einer Inhibierung der Promotoraktivität (Baldassarre et al., 2003).

### Proliferation und Differenzierung

HMGA1-Proteine werden während der Embryonalentwicklung und in undifferenzierten Zellen besonders stark exprimiert, da sie vor allem bei zellulären Differenzierungsprozessen aktiv sind. In adulten, differenzierten Zellen liegen hingegen, mit wenigen Ausnahmen, eine sehr geringe oder keine Expression vor (Chiappetta et al., 1996; Rogalla et al., 1996). In der frühen Mausentwicklung wurde eine sehr hohe HMGA1-Expression in allen embryonalen Geweben bis an Tag acht detektiert. Während diesem Zeitraum finden die wichtigsten Ereignisse der Organentwicklung statt. Dabei sind HMGA1-Proteine in die Regulation entwicklungsrelevanter Gene involviert, wie zum Beispiel Frizzled-5, Wnt-13, Wnt-10B und Notch-4 involviert (Reeves et al. 2001).

Diese entwicklungsabhängige Expression beziehungsweise Verteilung spricht für eine spezifische Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. In embryonalen Stammzellen (ES) ist HMGA1 notwendig für die lympho-hämatopoetische Differenzierung (Battista et al. 2003). HMGA1 führt auch zur Hochregulierung von Genen, welche in der Zellzyklusregulation und der Signaltransduktion involviert sind. Darunter befinden sich Cyclin A, C und D, Raf, JNK2 und p38 MAPK (Reeves, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HMGA1 einen negativen Effekt auf die Proliferation und einen positiven Effekt auf die Differenzierung von 3T3-Adipozyten hat. Die Differenzierung von 3T3-L1-Präadipozyten zu Adipozyten durch hormonelle Stimulation ist ein gut etabliertes Differenzierungsmodell. Während der Differenzierung werden HMGA1-Proteine zur Interaktion mit CEBP-Proteinen benötigt, da sie die transkriptionelle Aktivität der CEBP-Proteine erhöhen können. CEBP-Proteine werden wiederum zur Expression Adipozyten-spezifischer Gene benötigt (Smas and Sul, 1995).

### Die Rolle von HMGA-Proteine bei der Entstehung von Krankheiten

Eine erhöhte Expression von HMGA-Proteinen steht meistens mit einer Veränderung des zellulären Wachstums und Differenzierung in Verbindung. Mittlerweile wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Überexpression von HMGA1 in vielen malignen Tumoren nachgewiesen, und zwar sowohl in Zelllinien menschlichen und tierischen Ursprungs, in Biopsie- und Operationspräparaten als auch in künstlich erzeugten Karzinomen im Tierversuch. Eine Überexpression von HMGA1 ist in Brust-, Colon-, Magen-, Prostata-, Haut- und Lungentumoren nachweisbar (Reeves and Beckerbauer, 2001; Fusco and Fedele, 2007). HMGA1 spielt als Zielgen von c-Myc eine wichtige Rolle in der c-Myc-vermittelten neoplastischen Transformation (Dolde et al., 2002; Evans et al., 2004a). Neben ihrem offensichtlichen Einfluss auf die Onkogenese, wurde HMGA1 eine antiproliferative Aktivität in myelo-lymphoproliferativen Störungen und während der zellulären Seneszenz zugeschrieben, was einer malignen

Transformation entgegenwirken würde (Fedele et al., 2006; Narita et al., 2006). Während der Seneszenz trägt HMGA1 durch die Bildung von Seneszenz assoziierten Heterochromatinfoci (SAHF) zur globalen Modulation des Chromatins bei (Hock et al., 2007). Eine weitere wichtige Erkrankung mit einer bedeutenden Rolle von HMGA1 ist der Typ 2 Diabetes mellitus. Studien in *Hmga1*<sup>-/-</sup>-Mäusen haben gezeigt, dass HMGA1a notwendig für eine einwandfreie Expression des Insulinrezeptors ist. Das Fehlen von HMGA1 führt zur Ausbildung einer Insulinresistenz, zurückzuführen auf die negativ regulierte Insulinrezeptorexpression und dessen Funktion in insulinsensitiven Zellen und Geweben. Dies beeinträchtigt die Insulinsignalwege, reduziert die Insulinsekretion und hat für Patienten die Entwicklung eines T2DM zur Folge. Bei einigen Diabetespatienten, war die Deletion eines einzelnen Nukleotids in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) für eine drastische Reduktion der Halbwertszeit der HMGA1a-mRNA verantwortlich (Foti et al., 2005). Zusätzlich zum diabetischen Phänotyp, leiden HMGA1-defiziente und HMGA1-heterozygote Knockout-Mäuse an einer kardialen Hypertrophie. Vermutlich kann man dies zurückführen auf eine Funktion von HMGA1 in der Entwicklung der Kardiomyozyten, durch erhöhte CaMKII Kalzium/Calmodulin abhängige Proteinkinasespiegel, welche normalerweise durch HMGA1 reprimiert werden (Fedele et al., 2006).

## 2 ZIELSTELLUNG

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Aktivierung des Kernrezeptors Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) entscheidende protektive anti-inflammatorische Effekte in vaskulären Zellen ausüben kann und so die PPAR $\gamma$ -Aktivierung dem Atheroskleroseprozess in der Gefäßwand entgegenwirken kann. Diese Ergebnisse deuten die enorme Relevanz von transreprimierenden PPAR $\gamma$ -Funktionen in der Gefäßwand an, aber über die molekularen Mechanismen der PPAR $\gamma$ -vermittelten Wirkungen lagen in humanen Gefäßmuskelzellen (VSMCs) noch keinerlei Erkenntnisse vor. Daher befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung des molekularen Prozesses der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression in VSMCs.

Diese Zielstellung beinhaltete zunächst *in vitro*-Analysen der PPAR $\gamma$ -abhängigen Genregulation für die Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), welche eine zentrale Rolle bei den pathologischen Gefäßwandumbauprozessen einnimmt.

Auf der Suche nach weiteren Einflussfaktoren für die funktionelle Analyse der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression wurde das Expressionsprofil der VSMCs für humane Kernrezeptoren und Koregulatoren mittels Oligo GEArray® (SuperArray®) bestimmt.

Daraufhin wurde das Nicht-Histon Kernprotein High Mobility Group Protein A1 (HMGA1) als ein neuer potentieller Koregulator von PPAR $\gamma$  in der Gefäßwand identifiziert. Darauf aufbauend wurde die funktionelle Bedeutung des HMGA1-Proteins für den molekularen Mechanismus der Transrepression etabliert.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die *in vivo*-Erforschung der funktionellen Bedeutung der HMGA1/ PPAR $\gamma$ -Interaktionen für die PPAR $\gamma$ -abhängigen gefäßschützenden Funktionen bei der Entstehung der Atherosklerose. Zur Untersuchung der Relevanz dieses Prozesses wurde die Femoralarterie von C57BL6/129SBJ Wildtyp-Mäusen und HMGA1-defizienten Mäusen, die mit Pioglitazon/ Vehikel behandelt wurden, zur mechanischen Verletzung dilatiert.



### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Versuchstiere, Zelllinien und Bakterienstämme

###### Versuchstiere

Genotyp	Organismus	Herkunft
C57Bl6/129SBJ	Mus musculus	A. Brunetti und A. Fusco, Neapel, I
HMGA1- Gesamtknockout	Mus musculus	A. Brunetti und A. Fusco, Neapel, I

###### Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Ursprung	Hersteller
VSMC	Homo sapiens	Gefäßmuskelzellen der Aorta	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
HeLa	Homo sapiens	Zervix-Karzinom	Deutsche Sammlung von Zellkulturen, Braunschweig, D
Hek293	Homo sapiens	embryonale Nierenzellen	Deutsche Sammlung von Zellkulturen, Braunschweig, D

###### Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
Escherichia coli <i>DH5<math>\alpha</math>F'</i>	F' / endA1 hsdR17 (rK-mK+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 $\Delta$ (lacIZYA-argF)U169 deoR ( $\Phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)
Escherichia coli <i>XL1-Blue</i>	endA1 supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi-1 relA1 lac-[F'proAB+lacIq $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]

##### 3.1.2 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzers	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Analysenwaage BL 150S, BL 310	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav System V-150	Systemec, Wettenberg, D
Bioruptor	Diagenode, Liège, B
Blotkammer und Apparatur	BioRad, München, D
CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell 150	Heraeus, Hanau, D
Curix 60 Entwicklungsmaschine	AGFA, Köln, D
Elektrophoresekammer 250 EX	Whatman, Brentford, UK
Gel-Dokumentations-System ChemiDoc	Bio-Rad, Hercules, USA
Ikamag RCT Heizplatte/Magnetrührer	Th. Karow GmbH, Berlin, D
Laminar-Flow-Arbeitsbank LaminAir 1.2	Heto-Holten, Allerød, DK
Leica CTRMIC, DM LB2, EG1130	Leica Camera AG, Solms, D
Luminometer	PJK, Kleinbittersdorf, D

## Material und Methoden

---

Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab, Erlangen, D
PCR-Cycler iCycler	Bio-Rad, Hercules, USA
pH-Meter pH 340	WTW, Weilheim, D
Präzisionswaage SC2	Sartorius, Göttingen, D
Real-time PCR-System Mx3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Rollenmischgerät RM5	Karl Hecht, Sondheim, D
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohema, USA
Spektrophotometer SmartSpec 3000	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Galaxy Mini	Merck Eurolab, Darmstadt, D
Überkopfrotor	Hausanfertigung
Vakuumsaugpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, D
Wasserbad WB14	Memmert, Schwabach, D
Wheaton Dounce Tissue Grinder	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Zentrifuge 32R, Micro 20	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge 5415R, 5810R	Eppendorf, Hamburg, D

### 3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Medikamente

Produkt	Hersteller
Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL
Acrylamid/Bis (30%)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, D
Albumin bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Solingen, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Atropinsulfat (0,5 mg/ml)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
BCA Protein Assay Reagent A und B	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
Bromphenolblau	VWR, Darmstadt, D
Chloroform	Merck Eurolab, Darmstadt, D
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Coomassie	AppliChem, Darmstadt, D
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP)	Promega, Mannheim, D
DharmaFect 1 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
DSG	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Eosin	Waldeck GmbH, Münster, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	VWR, Darmstadt, D

## Material und Methoden

---

Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Hämatoxyllin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Hiperfect	Qiagen, Hilden, D
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Isofluran-Baxter	Baxter Deutschland, Unterschleißheim, D
Isomount	Merck, Darmstadt, D
NaCl-Lösung (0,9%), steril	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, D
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Ketamin Incesa (50 mg/ml)	INCRESA ARZNEIMITTEL, Freiburg, D
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver, Blotting Grade	Roth, Karlsruhe, D
Natrium acetat- Trihydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumlactat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Natriumpyrophosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Natronlauge	Merck, Darmstadt, D
NeoClear	Merck, Darmstadt, D
Nonidet P-40 substitute (NP-40)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Orange G	Merck, Darmstadt, D
PDGF	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
PEG	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Pioglitazon	Axxora, Lörrach, D
PMA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Solingen, D
Restore Western Blot Stripping Solution	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
Rompun® 2 %	BAYER VITAL, Leverkusen, D
Rosiglitazon	GlaxoSmithKline, München, D
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, D
SDS (Laurylsulfat)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

## Material und Methoden

---

Tissue Tek O.T.C. Compound	Leica Jung, Solms, D
TNFalpha	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
TRIzol Reagent	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D
Ultra Pure Water	Biochrom AG, Berlin, D
Xylocain® 2 %	ASTRA ZENECA GmbH, Wedel, D
Xylol	J.T. Baker, Deventer, NL

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
96-well Multiply PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
CryoTube Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Hybond-C extra Blotting-Membran	Amersham, Little Chalfont, UK
Hyperfilm ECL Chemilumineszenz-Film	Amersham, Little Chalfont, UK
Kanülen Sterican (versch. Größen)	Braun Melsungen, Melsungen, D
Kapillaren EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, D
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kulturflaschen und -platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Lab-Tek ChamberSlides	Nunc, Wiesbaden, D
PCR Tubes und Caps	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Pipetten 0,5 - 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Polyvinylidenfluorid-Membranen	GE Healthcare, Solingen, D
Spektralphotometer-Küvetten	Hellma, Müllheim D
Spritzen Omnifix (versch. Größen)	Braun Melsungen, Melsungen, D
Standardführungsdraht für Katheter	William Cook, Bjaeverskov, DK
Sterilfilter	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Whatman Filter	Roth, Karlsruhe, D

### 3.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Produkt	Zusammensetzung/Hersteller
10x Dephosphorylierungs-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D
10x Ligase-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D
10x PCR-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D
10x Restriktionsendonuklease-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Cryo-Medium	PromoCell, Heidelberg, D
Dulbecco' s Minimal Essential Medium (DMEM)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Fetales bovines Serum (FBS)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
LB Medium ( SOB )	Roth, Karlsruhe, D
M-MLV RT 5x Buffer	Promega, Mannheim, D
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Smooth muscle cell Medium 2	PromoCell, Heidelberg, D
Supplement-Mix	PromoCell, Heidelberg, D
TNS-Lösung	PromoCell, Heidelberg, D
0,5 M Sammelgel-Puffer	6,05 g Tris-Base pH auf 6.8 mit HCl einstellen auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
1 M Trenngelpuffer	18,15 g Tris-Base pH auf 8.8 mit HCl einstellen auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
10x Elektrophoresepuffer für Westernblot	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glycin 10% SDS add H <sub>2</sub> O
10x TBS pH 7,6	24,22 g Tris-Base 87,6 g NaCl pH auf 7.6 mit HCl einstellen auf 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
1x TAE-Puffer für DNA-Gelelektrophorese	4,8 g Tris 0,74 g EDTA <sub>2</sub> Na 1,14 ml Essigsäure (100%) mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 Liter aufgefüllt
1x TBS-T	100 ml 10x TBS 900 ml ddH <sub>2</sub> O 1 ml Tween-20

## Material und Methoden

---

1xTSS-Lösung	LB-Medium 10% (w/v) PEG 4000 5% (v/v) DMSO 20-50 mM Mg <sup>2+</sup> (MgCl <sub>2</sub> ) pH 6,5 einstellen sterilfiltrieren
4x Probenpuffer	0,25 M Tris-Base 8% SDS 40% Glycerin 20% 2-Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenol-Blau add ddH <sub>2</sub> O
Blockpuffer	5% Milchpulver in 1x TBS-T-Puffer
Blotpuffer (Towbin-Puffer)	0,025 M Tris-Base 0,192 M Glycin 0,05% SDS 20% Methanol add ddH <sub>2</sub> O
Realtime-PCR-Housemix	100 mM Tris HCl 15 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM KCl (pH 8,3) 50 mM 20% DMSO in H <sub>2</sub> O mit 10x SYBR 10 mM pro Desoxynukleotid (dNTPs) 0,5% NP40 (v/v) 0,5% Tween 20 (v/v) 200 µg/ml ROX add ddH <sub>2</sub> O
RIPA-Puffer	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1% Nonidet P-40 2,5% Glycerol 1mM EDTA 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 50mM NaF 10mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 100µM Phenylmethylsulfonylfluorid 1 Tablette Proteaseinhibitoren "Com. Mini"
SOC-Medium	LB-Medium mit 10% Glucose sterilfiltriert

### 3.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase	Promega GmbH, Mannheim, D
M-MLV RT RNase H Minus	Promega GmbH, Mannheim, D
M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim, D
Pfu Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Proteinase K	Diagenode, Liège, B
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
RNasin	Promega GmbH, Mannheim, D
SAP-FAST	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Superscript-II-Reverse Transcriptase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Taq Polymerase	PAN, Aidenbach, D
Trypsin	Roche Diagnostics, Mannheim, D

### 3.1.7 Kits und Marker

Produkt	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, D
BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Perbio Science, Piece, Bonn, D
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega, Mannheim, D
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham-Pharmacia, Freiburg, D
Gene Ruler™ 1 kb und 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Insulin ELISA	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Invisorb® Spin Tissue Mini Kit	Invitek, Berlin, D
LowCell ChIP Kit	Diagenode, Liège, B
NucleoSpin RNA XS und II	Macherey-Nagel, Düren, D
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Kit und Extract II	Macherey-Nagel, Düren, D
Oligo GEArray® Human Nuclear Receptors & Coregulators Microarray	Biomol, Hamburg, D
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
RNeasy_Micro Kit	Qiagen, Hilden, D

### 3.1.8 Oligonukleotide, Vektoren und siRNA

#### Oligonukleotide

Oligonukleotid	Forward	Reverse
Negativ-Kontrolle (intergenic) außerhalb der NF <sub>κ</sub> B-site	5' ggcagatcacttgagtcagaag 3'	5' ctgaggcaggagaattgctt 3'
Negativ-Kontrolle außerhalb MMP-9 Promotor auf Chr.20	5' ctctctgggttcaatgattc 3'	5' ccagcactttaggaggcaga 3'
Positiv-Kontrolle für humanen β-Aktin Promotor	5' aatgctgcactgtgcggcga 3'	5' ggcggatcggcaaaggcga 3'

## Material und Methoden

MMP-9 Promotor um die NF $\kappa$ B-site (-670/-512)	5' aggctgctactgtccccttt 3'	5' ctccctgacagccttctttg 3'
hVEGF	5' AGACTCAATGCATGCCACG 3'	5' TTGAGTCTCTCCAGCATCC 3'
hVIM	5' CTCTTCCAAACTTTTCCTCCC 3'	5' AGTTTCGTTTCATAACCTGTCC 3'
hPDGF	5' CGAGTTGGACCTGAACATGA 3'	5' GTCACCGTGGCCTTCTTAAA 3'
hCCL2	5' GATCTCAGTGCAGAGGCTCG 3'	5' TGCTTGTCAGGTGGTCCAT 3'
hIRF2	5' GCTGGTCTCAAACCTCTGA 3'	5' ACCGGATTGCTCTCCTCTTT 3'
hVCAM	5' GATACAACCGTCTTGGTCAGCCC 3'	5' CGCATCCTTCAACTGGCCTT 3'
hMCM6	5' TGTCACCTGCTCTGCCACTAA 3'	5' GCAGCATGCCAAGACTTT 3'
hSKP2	5' AGCCCGACAGTGAGAACTC 3'	5' GAAGGGAGTCCCATGAAACA 3'
hET-1	5' gagatctgaggaaccgcag 3'	5' ctgagctcagcgcctaagac 3'
hPPAR $\gamma$	5' tcaaacacatcaccctctg 3'	5' tggcagcctgaaagatgc 3'
hHMGA1	5' cgaagtgccaacacctaag 3'	5' aggaagctgctcctccagt 3'
hMMP9	5' ccacctcgaactttgacagc 3'	5' tcagtgaagcggtagataggg 3'
h18S	5' ccgcagctaggaataatggaata 3'	5' tctagcggcgcaatacgaat 3'
mSMemb	5' ACACACTGAACGAGCTAG 3'	5' CTAATTTGTTGGCGGCTGCTC 3'
mSM1	5' CTCAAGAGCAAACCTCAGGAG 3'	5' TCTGTGACTTGAGAACGAAT 3'
mET-1	Assay on Demand	Assay ID: Mm00438656_m1
m $\beta$ -Actin	5' gacaggatgcagaaggagattactg 3'	5' gctgatccacatatgatggaa 3'
mAdiponectin	5' tccgggactctactacttctcttaccac 3'	5' gtcccatccccatacacctg 3'
mCD36	5' gattaatggcacagacgcagc 3'	5' tccgaacacagcgtagatagacc 3'
mHMGA1	5' gaagtgccaaactccgaag 3'	5' gacagctgctcctcagtg 3'
mMMP9	5' accctgtgtgttcccgttcat 3'	5' gatactggatgccgtctatgctg 3'
m $\alpha$ -SMA	5' caggcatggatggcatcaatcac 3'	5' actctagctgtgaagtcagtgctg 3'

### Vektoren

Vektor	Hersteller/Ursprung
HA-PPARG-K367R	Addgene, Cambridge, USA
HA-PPARG-K97R	Addgene, Cambridge, USA
pEZ-M06-PPARG2	Addgene, Cambridge, USA
pcDNA3-hRXR	Addgene, Cambridge, USA
pcDNA3-cFlag	Addgene, Cambridge, USA
pcDNA3-cFlag- p65	Addgene, Cambridge, USA
pcDNA3-HA-Sumo1	Addgene, Cambridge, USA
pCMV-hUbc9 wt-HA	Addgene, Cambridge, USA
phHMGA1a-EGFPN1	BD Biosciences, Heidelberg, D
pRL-Tk	Promega, Mannheim, D
pGL3-basic	Promega, Mannheim, D
pGL3-MMP9 (-2176/+54)	Promega, Mannheim, D
pGL3-MMP9 (-670/+54), (-670/-512), (-603/+54)	Promega, Mannheim, D
pGL3-MMP9 (NF $\kappa$ B-site Mut)	Promega, Mannheim, D

### siRNA

#### ON TARGETplus SMARTpool L-004597-00, Human HMGA1, NM 145903

J-004697-05, HMGA1	J-004697-06, HMGA1	J-004697-07, HMGA1	J-004697-08, HMGA1
GCGAAGUGCCAACACCUAA	GAGGGCAUCUCGAGGAGU	CACCACAACUCCAGGAAGG	GAGGAGCAGZGACCAUGC



## Material und Methoden

---

ON TARGETplus SMARTpool L-003436-00, Human PPARG, NM\_005037

J-003436-06, PPARG

J-003436-07, PPARG

J-003436-08, PPARG

J-003436-09, PPARG

CAAAUCACCAUUCGUAUC

GACAUGAAUCCUUAAGA

GAUAUCAAGCCCUUCACUA

GACAGCGACUUGGCAAUAU

ON TARGETplus SMARTpool L-003436-00, KONTROLLSIRNA

### 3.1.9 Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-goat	DIANOVA, Hamburg, D
anti-mouse	DIANOVA, Hamburg, D
anti-rabbit	DIANOVA, Hamburg, D
anti $\beta$ -Actin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
anti GAPDH	abCam, Cambridge, UK
anti-HMGA1	Imgenex, San Diego, CA
anti-IgG	Diagenode, Liège, B
anti-P65	Millipore, Schwalbach, D
anti-Pol II	Millipore, Schwalbach, D
anti-PPARG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
anti-SMRT	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.2.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

###### Isolierung von Plasmid-DNA

Um bis zu 40 µg Plasmid-DNA aus *E.coli*-Kulturen für analytische Zwecke zu gewinnen, wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit verwendet. Hierzu wurden 5 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, pelletiert und nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die so erhaltene DNA wurde bei -20 °C gelagert. Für präparative Zwecke (bis zu 500 µg DNA-Ausbeute) wurde das NucleoBond® Plasmid PC 500 Kit verwendet.

###### DNA-Fragmentisolierung aus dem Agarosegel, von PCR-Produkten und ChIP-Proben

Zunächst wurde die mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA im TAE-Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract II. Dabei wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und im Kit spezifischen Puffer gelöst. Für die Aufreinigung von PCR-Produkten und ChIP-Proben wurde nach Herstellerangaben aufgereinigt.

###### Isolation genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien

Die genomische DNA (bis zu 50 µg DNA-Ausbeute) wurde aus einem etwa 1 cm langen Stück der Mausschwanzspitze gewonnen. Hierfür wurde das Invisorb® Spin Tissue Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert und für die Genotypisierung der verwendeten Mausstämmen eingesetzt.

##### 3.2.1.2 RNA-Isolierung

###### Isolation von RNA aus kultivierten Zellen

Die Isolation von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Nucleo-Spin®RNA II Kits sowie für geringere Zellmengen mit Hilfe des NucleoSpin® RNA XS Kits. Beide Kits wurden gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die erhaltenen RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

###### Isolation von RNA aus tierischem Gewebe

Für die RNA-Präparation aus Organgewebe kam zunächst die Trizol®-Methode (einphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat) zur Anwendung. Das tiefgefrorene Gewebe wurde zur Homogenisierung zunächst in flüssigem Stickstoff zermörsert und mit Trizol

behandelt. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau. Danach wurde die RNA ein weiteres Mal mit dem Nucleo-Spin®RNA II Kit aufgereinigt, um besonders qualitativ hochwertige RNA aus Gewebe zu erhalten. Für die Aufarbeitung der Arterien wurde das RNeasy\_Micro Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA-Proben wurden bei - 80 °C gelagert.

### 3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosematrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel wurden 0,7-2,5 %-ige Gele in 1xTAE-Puffer verwendet (siehe Tabelle 3.1). Zur Herstellung eines Agarosegels wurde Agarose im Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,1 µg/ml) und auf den Gelträger gegossen und anschließend ein Kamm mit Taschen für die DNA-Proben eingesetzt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Orange-G Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. In Abhängigkeit von Gelgröße, Laufdauer und Auftrennungseffizienz wurde eine Spannung von 70-140 V angelegt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte durch das Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die doppelsträngige DNA inkaliert. Die Größenbestimmung erfolgte jeweils im Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard.

Konzentration Agarose in % (w/v)	Auftrennung linearer DNA (bp)		
0,6	1.000	-	20.000
0,8	500	-	10.000
1,0	400	-	5.000
1,5	200	-	3.000
2,0	100	-	2.000
3,0	50	-	1.000
4,0	20	-	500

**Tabelle 3.1:** Übersicht der Auftrennung von linearer DNA in Agarose-Gelen

### 3.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

#### Quantifizierung der RNA/DNA mittels NanoDrop™ Spektralphotometer

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung kann spektralphotometrisch bei 260 bzw. 280 nm mit Wasser als Referenz bestimmt werden. Eine OD von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm einer Konzentration von 50 µg/ml für dsDNA, bzw. 40 µg/ml für RNA. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich folgende Beziehung:

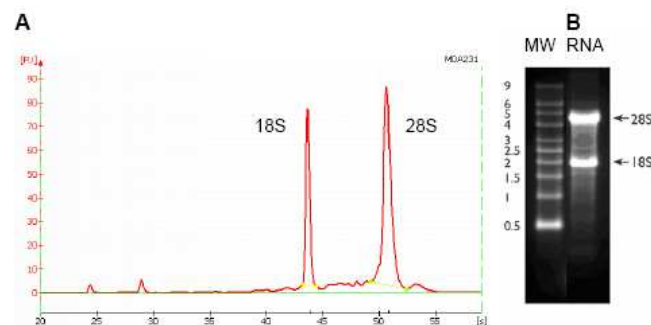
$$\text{DNA/(RNA)-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = E_{260} * 50/(40) * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten OD260/OD280 abschätzen. Beträgt dieser Wert des Quotienten 1,8 kann die DNA als rein angesehen werden, für RNA sollte der Quotient 2,0 betragen.

Für die Messung am NanoDrop™ Spektralphotometer wurden 1,3 µl unverdünnte Probe auf die Messoberfläche pipettiert. Durch die Oberflächenspannung entstand eine Flüssigkeitssäule zwischen den optischen Fasern des Spektralphotometers, die den Messweg darstellten.

### Quantifizierung der RNA mittels Bioanalyser Agilent

Zur Qualitätskontrolle von Gesamt- und mRNA aus Gewebeproben wurde der Agilent 2100 Bioanalyzers mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit nach Herstellerangaben benutzt. Es wurden Elektropherogramme (Abbildung 3.1 A) mit den zu untersuchenden Proben und den im Kit enthaltenen Markern erstellt und mit jeder Probe wurde eine Gelelektrophorese (Abbildung 3.1 B) durchgeführt. Die Konzentration wurde vermessen und die Qualität der RNA wurde anhand des Quotienten aus 18S und 28S RNA bestimmt, man konnte nun zwischen verschiedenen mRNA-Typen (scharfe Banden für 18S und 28S RNA erkennbar) sowie gedradierter RNA (Schmierbanden erkennbar) unterscheiden.



**Abbildung 3.1** A Elektropherogramm einer untersuchten RNA-Probe, B Gelelektrophorese einer untersuchten RNA-Probe

### 3.2.1.5 PCR-Methoden

#### Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen, enzymatischen Amplifikation eines DNA-Fragmentes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die an den jeweils komplementären DNA-Strang (DNA-Template) gebunden sind. Die DNA-Polymerase fügt dann an die 3' OH-Enden der Primer komplementäre Nucleotide an. Dieses Produkt wird anschließend denaturiert. Dieser Zyklus bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wird dann 35mal wiederholt um ausreichend DNA-Fragmente zu amplifizieren.

Zur Synthese der DNA wurden abhängig von der Fragestellung die *Taq*-Polymerase oder *Pfu*-Polymerase verwendet und die Reaktionen in einem programmierbaren Thermocycler durchgeführt. Die *Taq*-Polymerase hat den Vorteil der höheren Einbaugeschwindigkeit gegenüber der *Pfu*, jedoch besitzt die *Pfu*-Polymerase eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Dies ermöglicht ihr, Nukleotide auf Korrektheit des Einbaus zu überprüfen und gegebenenfalls auszutauschen. Die Reaktionsparameter wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Eine Standardreaktion umfasste ein Volumen von 25 µl und folgende Zusammensetzung:

Template-DNA	10 ng Plasmid-DNA/ 25 pg genomische DNA
Forward-Primer	0,5 µl (10 pmol/ml)
Reverse-Primer	0,5µl (10 pmol/ml)
dNTP-Mix	1 µl (10 mM)
10x PCR-Puffer	2,5 µl
DNA-Polymerase	0,125 µl (1-5 U)
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Reaktionsbedingungen (35 Zyklen):

Denaturierung:	93 °C	1 min
Hybridisierung:	abhängig vom Primerpaar	1 min
Elongation:	72 °C	1 - 2 min

### Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die *Reverse Transkriptase (RT)* ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Umschreibung in cDNA wurden Random Hexanucleotide der Firma Promega gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen.

Die RNA wurde nach folgendem Protokoll der Firma Promega in cDNA umgeschrieben, wobei die Standardreaktion ein Volumen von 50 µl umfasste.

RNA	0,25 – 2 µg
Random Hexanucleotide	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 38,5 µl

5 min  
dann sofort auf Eis

70°C

5x Reaktionspuffer	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
RNAsin (40 U/µl)	1 µl
<i>M-MLV-Transkriptase</i>	0,25 µl

1 h

37°C

Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert. Für eine nachfolgende Realtime PCR wurden einheitliche Mengen cDNA je Probe verwendet, d.h. nach erfolgter RT wurde der Ansatz abhängig vom zu untersuchenden Gen auf 2-10 ng/µl cDNA verdünnt.

Realtime PCR

Die Realtime PCR-Technologie ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit der quantitativen Echtzeitanalyse der PCR bietet. Die Quantifizierung erfolgt über die kontinuierliche Messung von Laser-induzierten Fluoreszenzsignalen, die während der PCR proportional zur Menge des Amplifikationsprodukts ansteigen. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der unspezifisch in DNA interkaliert. Diese Einlagerung führt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Die Quantifizierung basiert auf der Software-gestützten Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes. Der Zyklus, in dem eine zu untersuchende Probe diesen berechneten Fluoreszenzschwellenwert signifikant überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus („Threshold Cycle“ =  $C_t$ ) der jeweiligen Probe zugewiesen. Der Schwellenwert wird umso eher erreicht, je mehr Zielsequenzen sich in der zu untersuchenden Probe befinden. Die Wahl des Schwellenwertes erfolgte so, dass die  $C_t$ -Werte jeweils im Bereich der exponentiellen Zunahme des PCR-Produktes liegen. Die Verwendung von SYBR-Green ist aber unspezifisch hinsichtlich des DNA-Templates, da es auch einen Fluoreszenzanstieg in Primer-Dimeren oder unerwünschten Nebenprodukten verursacht.

Deshalb wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die beiden Einzelstränge der farbstoffassoziierten DNA werden bei ansteigender Temperatur in Abhängigkeit zum Schmelzwert ( $T_m$ ) des Doppelstranges mehr oder weniger stark voneinander getrennt. Dadurch wird der Farbstoff wieder freigesetzt, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Sie erreicht ihr Maximum, wenn beide Stränge vollständig voneinander getrennt werden. Spezifische Primer führen zu einem Maximum für das Hauptprodukt, wohingegen weitere Maxima für unspezifische Nebenprodukte nicht auftreten sollten. Kleinere Fragmente wie z.B. Primerdimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als das spezifische PCR-Produkt.

Durchführung

Realtime-PCR Ansatz für Housemix	Realtime PCR- Ansatz für Power SYBR® Green PCR Master Mix
Realtime PCR-Housemix	Power SYBR® Green PCR
Forward Primer (10 µM)	10 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl
cDNA (2ng/µl)	10 µl
	ad 20 µl
	H <sub>2</sub> O
	cDNA (2ng/µl)

Die Realtime-PCR wurde in speziellen 96-Well Real-time Platten durchgeführt. Dabei wurde für jeden Reaktionsansatz der Mastermix vorgelegt und die cDNA nachfolgend zugegeben.

Verwendet wurden entweder ein selbst hergestellter Realtime PCR-Housemix oder für gering exprimierte Gene der Power SYBR® Green PCR Master Mix nach Herstellerangaben.

Reaktionsbedingungen (40 Zyklen):

Initiale Denaturierung:	95 °C	2 min
Zyklische Denaturierung:	95 °C	15 s
Hybridisierung	60°C	15 s
Elongation:	72°C	15 s

Finale Schmelzkurvenermittlung:

95 °C	15 s
60 °C	1 min
95 °C	15 s

Kühlung: 4 °C ∞

### Datenanalyse

Zur Analyse der Realtime PCR-Daten wurde die Methode der relativen Quantifizierung genutzt. Dabei wurde das PCR-Signal mit einer Referenz, wie z.B. unbehandelte Kontrolle oder unstimulierten Probe, verglichen. Dafür wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet, um die relativen Veränderungen der Genexpression aus Realtime-Daten zu bestimmen. Dazu wurden im ersten Schritt die  $C_t$ -Werte ermittelt. Wieviele Amplifikationszyklen erforderlich sind, bis die Targetmenge einen festen Schwellenwert, den  $C_t$ -Wert, erreicht hat, hängt einerseits von der Ausgangsmenge der cDNA ab und andererseits von der PCR-Effizienz.

Da es sich um sehr kleine Amplifikate (bis ca. 250 bp) handelte und die Primer- sowie  $Mg^{2+}$  Konzentrationen optimiert worden sind, geht man bei dieser Berechnungsmethode davon aus, dass die PCR-Effizienz gleich eins ist, d.h. dass sich in einem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt. Die Ermittlung der  $C_t$ -Werte erfolgte in Triplikaten und die behandelten Proben wurden zunächst mit einer Referenz (Housekeeper-Gen) normalisiert. Es wurden nicht die absoluten Startkopienzahlen bestimmt, sondern die DNA-Moleküle in den zu untersuchenden Proben auf die Referenz bezogen. D.h. der  $C_t$ -Wert des Housekeepers wurde vom  $C_t$ -Wert der zu untersuchenden Materialien subtrahiert.

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Housekeeper-Gen})$$

Nach dieser Normierung wurde vom  $\Delta C_t$ -Wert der experimentell behandelten Proben der  $\Delta C_t$ -Wert der Kontrolle abgezogen ( $\Delta\Delta C_t$ ).  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$

Anschließend wurde das arithmetische Mittel der drei Einzelwerte bestimmt. Der relative Unterschied (Expressionsniveau) einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zur Referenz, ergibt sich dann aus der arithmetrischen Formel:  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

### Zielgerichtete Mutagenese

Mit dieser Methode können in doppelsträngige DNA Punktmutationen eingeführt und Deletionen oder Insertionen von wenigen Basenpaaren Länge generiert werden. Die Grundlage hierfür ist eine PCR-Reaktion, bei der die Primer, in der Mitte ihrer Oligodesoxynukleotidsequenz eine Mutation enthalten. Der Bereich mit der gewünschten Mutation wurde mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die Enden des PCR-Produktes mit den entsprechenden Restriktionsendonuklease gespalten und das Insert in den gewünschten Vektor ligiert und zur Überprüfung des mutierten Bereiches sequenziert.

### Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der von Sanger und Coulson (Sanger et al., 1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Diese beruht darauf, dass die Elongation dann abbricht, wenn ein 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphat (ddNTPs, so genannte Terminatoren) eingebaut wird, an die eine DNA-Polymerase wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe an der Ribose des Nukleotids kein weiteres anfügen kann. Auf diese Weise erhält man DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die alle an ihren Enden ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP tragen, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff versehen war (Adenin: R6G, grün; Thymin: ROX, rot; Cytosin: TAMRA, gelb; Guanin: R110, blau).

## 3.2.2 Klonierung von DNA

Bei der DNA-Klonierung mit Hilfe von Bakterien wurde eine ausgewählte DNA-Sequenz *in vivo* vervielfältigt. Dazu wurde ein DNA-Fragment (Insert), welches mittels PCR und/oder Restriktionsendonuklease-Behandlung gewonnen worden war, mit einer unabhängig replizierenden DNA-Sequenz (Vektor) *in vitro* ligiert. Diese Hybrid-DNA wurde in geeignete *E. coli*-Wirtszellen transformiert, in denen die DNA selektiv vermehrt werden konnte.

### 3.2.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

#### Übernachtflüssigkultur

Für eine Übernachtskultur wurden je nach benötigter Menge 10 ml (5 ml) LB-Medium in einem 50 ml (15 ml) Röhrchen vorgelegt. Zur Selektion wurde das benötigte Antibiotikum (siehe Tabelle 3.2) hinzugefügt. Das Selektionsmedium wurde mit Bakterienmaterial aus einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C ÜN geschüttelt.



## Material und Methoden

Antibiotika:	Konzentration Stocklösung mg /ml	gelöst in	µl Stocklösung/ ml LB-Medium	Endkonzentration µg/ml
Ampicillin	50	ddH <sub>2</sub> O	2	100
Kanamycin	10	ddH <sub>2</sub> O	5	50

**Tabelle 3.2** Antibiotika-Stammlösung

### Bakterienkultur auf Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurde der Agar (1,5 %) in LB-Medium eingewogen und autoklaviert. Nachdem die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurden die Antibiotika dazugegeben. Anschließend konnte man den flüssigen Agar in die Petrischalen gießen. Sobald der Agar fest geworden ist, drehte man die Schalen um, um ein Auftropfen von Kondenswasser auf den Nährboden zu verhindern. Die Platten wurden ÜN getrocknet und dann bei 4 °C gelagert. Um aus einer Flüssigkultur eine Plattenkultur herzustellen, wurden 50 –100 µl der Kultur auf die Platte pipettiert und mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausplattiert. Sterilisiert wurde der Spatel mit 100 % Ethanol durch Abflammen.

### Glycerinkultur

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angesetzt. Hierzu wurden 750 µl Glycerin mit 750 µl einer Übernachtskultur vermischt und sofort tiefgefroren bei –80°C. Bei Bedarf wird mit einer sterilen Pipettenspitze eine geringe Menge der gefrorenen Bakterien aus der Glycerinkultur entnommen und auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen und inkubiert. Es ist immer darauf zu achten, dass die Glycerinkultur nur sehr kurze Zeit der RT ausgesetzt wird, da mehrmaliges Auftauen die Bakterien beschädigt.

### Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterien mit Plasmiden zu transformieren, benötigen die Zellen die Kompetenz, DNA aus der unmittelbaren Umgebung aufnehmen zu können. Diese Kompetenz kann man bei verschiedenen Bakterienstämmen durch chemische Modifikation der Lipiddoppelschicht erreichen. Zunächst wurden 5 bis 10 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und bei 37 °C ÜN unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 1 ml der Übernachts-Flüssigkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis mittels des Spektralphotometers eine optische Dichte (OD) nach Bradford ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) von 0,3 – 0,4 erreicht war. Danach wurde die Suspension auf 50 ml Rörchen aufgeteilt und bei 1000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Währenddessen wurde die benötigte Anzahl an 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen für die Aliquotierung der Bakterien und die 1x TSS-Lösung auf Eis vorgekühlt.

Der Überstand des Zentrifugats wurde verworfen, das Pellet (auf Eis) in 250 µl eiskalter 1x TSS-Lösung durch vorsichtiges Rühren mit einer Pipettenspitze resuspendiert und in 50 µl-Aliquots in die Mikroreaktionsgefäße (auf Eis) überführt. Diese wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert.

### Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Aufnahme von Fremd-DNA-Molekülen in Bakterien bezeichnet man als Transformation.

Damit die Fremd-DNA nicht abgebaut wird, muss sie ringförmig vorliegen und einen Replikationsstartpunkt besitzen, den die Bakterienzelle erkennt. Weiterhin trägt die Plasmid-DNA eine Antibiotikaresistenz um eine Selektion der transformierten Bakterien zu ermöglichen. Zur Transformation wurden kompetente Zellen der *E. coli*-Bakterienstämme *XL1-Blue* und *DH5α* verwendet. Die Lipiddoppelschicht von kompetenten Zellen wurde durch Vorbehandlung mit Salzen durchlässiger bzw. brüchiger, wodurch die Bakterien leichter plasmidförmige DNA aufnehmen. Ein 100 µl Aliquot der kompetente *E. coli*-Bakterien (*XL1-blue* oder *DH5α*) wurde auf Eis angetaut und dann wurde entweder 0,1 µg Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz dazugegeben und resuspendiert. Nach 15 - 20 min Inkubation auf Eis wurde eine Hitzschocktransformation durchgeführt, d.h. für 45 sek auf 42 °C erhitzt und sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurden die *E. coli*-Bakterien mit 900 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt.

Anschließend wurden zwei Verdünnungen (10 % und 90 %) auf Agarplatten ausplattiert, d.h. zunächst wurden 100 µl ausplattiert, danach wurde der restliche Ansatz bei 2500 rpm für 3 min zentrifugiert und das Pellet wurde in 100 µl resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die am nächsten Morgen erhaltenen Klone wurden über eine Colony-screening PCR und/oder einer Restriktionsanalyse getestet.

### 3.2.2.2 DNA-Modifizierung durch Enzymbehandlung

#### Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Für das Schneiden von Plasmid-DNA wurden *Restriktionsendonukleasen* entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers in den mitgelieferten Puffern und bei den empfohlenen Temperaturen eingesetzt. Die Restriktion erfolgte für 2 h. Eine Standardrestriktionsanalyse beinhaltete in 50 µl Gesamtvolumen folgende Komponenten:

Restriktionsendonuklease	1U
10x Puffer	1/10 Volumen
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

### Dephosphorylierung

Bei der Ligation kann zum einen das Insert in den linearisierten Vektor integriert werden, es kann aber auch zu einer Autoligation des Vektors kommen.

Die Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um die Autoligationsrate zu vermindern, da die Ligase phosphorylierte 5' Enden für eine Ligation benötigt. Um die Religation, z.B. eines geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde die 5'-Phosphatgruppe vor der Ligation mit Fremd-DNA durch *alkalische Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase, SAP)* hydrolysiert. Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte im Anschluss an die Restriktionsendonukleasebehandlung. Entweder wurde das Restriktionsenzym durch Gelextraktion der DNA-Fragmente eliminiert oder aber durch Hitze inaktiviert.

Ein Dephosphorylierungs-Standardansatz beinhaltet:

linearisierter Vektor	~150 ng
10x Dephosphorylierungspuffer	1/10 Volumen
SAP-FAST	1 U
dd H <sub>2</sub> O	ad 10µl

Der Ansatz wurde gut gemischt und bei 37 °C im Thermomixer für 5 min inkubiert. Zur Inaktivierung der *Phosphatase* wurde der Ansatz anschließend auf 70 °C für 15 min erhitzt.

### Ligation

Der Vorgang der Ligation dient dazu ein gewünschtes Insert in einen Klonierungsvektor zu inserieren. Das hierzu verwendete Enzym – die *T4-DNA-Ligase* – katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen doppelsträngiger DNA mit freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen. Zur Ligation von Fremd-DNA mit einer dephosphorylierten Vektor-DNA wurde normalerweise ein molares Verhältnis von 3:1 gewählt. Für das Zusammenfügen von komplementären, kohäsiven DNA-Enden wurden folgende Reaktionskomponenten bei 16 °C ÜN, 4 °C für 2 d oder bei RT für 1 h inkubiert:

linearisierter Vektor	~150 ng (bzw. kompletter Dephosphorylierungsansatz)
Insert-DNA	3-fache molare Menge
10x Ligationspuffer	1/10 Volumen
T4-DNA-Ligase	6U
bei blunt-end-Ligationen:	PEG-4000 (1-5 µl)
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 – 40 µl

### 3.2.2.3 Screening

#### Kolonie-PCR Screening

Die PCR kann auch als Methode zum Nachweis positiver, bakterieller Klone verwendet werden. Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass die zu testenden Bakterien während der initialen

Denaturierung durch die Hitze zerstört werden und die in ihnen enthaltene DNA als Template für eine PCR zur Verfügung steht. Dazu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein geringer Teil der Kolonie in ein Reaktionsgefäß gerieben, das alle Komponenten der PCR außer DNA enthielt, denn diese wurde mit den Bakterien eingebracht. Durch geschickte Auswahl der Primer, konnten die Kolonien nicht nur auf den Erhalt des Plasmids, sondern auch auf die Orientierung des Inserts im Vektor getestet werden, sofern zwei Orientierungen möglich waren.

Um die positiven Kolonien nach der PCR noch verwenden zu können, wurde eine Replika-Platte angelegt. Die Replika-Platte wurde bei 37 °C ÜN inkubiert. Sofern die Kolonie-PCR als Ergebnis positive Klone bestätigte, konnte von diesen unter Zuhilfenahme der Replika-Platte Übernachtflüssigkulturen angesetzt werden, um die gewünschte DNA mittels Plasmidpräparation aus den Bakterien zu isolieren. Desweiteren wurde eine Spaltung mit Hilfe von *Restriktionsendonukleasen* durchgeführt, um das Ergebnis zu verifizieren.

### Screening mittels Restriktionsspaltung

Eine Alternativmethode war, von den Kolonien Übernachtflüssigkulturen anzusetzen und die Plasmide zu präparieren. Mit diesen wurde dann eine Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt, wobei die Schnittstellen so gewählt wurden, dass man abschätzen konnte, ob das Insert in den Vektor ligiert wurde. Bei geeigneten Spaltstellen kann auch die Orientierung des Inserts im Vektor festgestellt werden. Das Ergebnis konnte als Bandenmuster nach einer Agarose-Gelelektrophorese visualisiert werden.

#### 3.2.2.4 Klonierungsstrategien

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Klonierung verschiedener Deletionsmutanten des MMP9 Promotors in den *firefly*-Luziferase-Reportervektor pGL3, die nun erläutert werden:

##### pGL3-MMP-9/-2176/+54

Das Promotorkonstrukt pGL3-MMP-9/-2176/+54 wurde freundlicherweise von Prof. Boyd zur Verfügung gestellt.

##### pGL3-MMP-9/-670/+54

Für das Konstrukt pGL3-MMP-9/-670/+54 wurde der gewünschte Promotorbereich mittels PCR amplifiziert, und in den mit *SacI* und *BglII* linearisierten Vektor pGL3-basic gerichtet kloniert.

##### pGL3-MMP9/-670/+512

Das pGL3-MMP9/-670/+512 Konstrukt wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert, und ungerichtet in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pGL3-basic kloniert.

### pGL3-MMP-9/-603/+54

Für das Konstrukt pGL3-MMP-9/603/+54 wurde der Vektor pGL3-MMP9/-2176/+54 mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BglII und der Vektor pGL3-basic mit BglII geschnitten. Dabei erhielt man das gewünschte Insert aus dem Vektor pGL3-MMP9/-2176/+54 und den linearisierten Vektor pGL3-basic, welche anschließend ligiert wurden.

### pGL3-MMP-9/-670/+54 (MUTNF $\kappa$ Bsite)

In Zusammenarbeit mit Lena Herbst wurde für die Klonierung des Konstruktes mit der mutierten NF  $\kappa$  B-site (pGL3-MMP-9/-670/+54 (MUTNF  $\kappa$  Bsite)) zunächst der Bereich von -670 bp bis +54 bp in zwei Schritten mit Mutageneseprimern amplifiziert und anschließend wieder mittels einer dritten PCR zusammengefügt, wobei das Produkt die gewünschte Mutation enthielt. Dieses wurde dann in den mit BglII linearisierten Vektor pGL3-basic kloniert. Abschließend wurden alle verwendeten und neu klonierten Vektoren sequenziert.

### 3.2.3 Proliferationsassay

VSMCs wurden wie angegeben kultiviert und stimuliert. In Kooperation mit Anna Foryst-Ludwig wurde die Zellproliferation mittels CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferationassay (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt.

### 3.2.4 Chromatin Immunopräzipitation

#### 3.2.4.1 DNA Protein Crosslinking und Zellyse

##### Vorbereitung der Antikörper-Beads Komplexe

Im ersten Schritt erfolgte die spezifische Antikörper-Präzipitation. Dazu wurden die magnetischen Beads zweimal mit eiskaltem Puffer A (Diagenode) gewaschen und für 5 min bei 1300 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde mit der doppelten Menge an Puffer A aufgefüllt wie Beads vorhanden waren. Für die Antikörperbindung wurde Puffer A vorgelegt, dann die magnetische Beads dazugegeben sowie der spezifische Antikörper, wobei pro Ansatz je 3  $\mu$ g Antikörper verwendet wurden. Diese wurden dann für 2-4 h bei 4 °C rotierend inkubiert.

##### Crosslinking und Zellyse

Es wurden jeweils 3x 6wells mit ca. 80 - 90 % konfluenten humanen Gefäßmuskelzellen (VSMCs) verwendet. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und zweimal vorsichtig mit PBS bei RT gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen dann mit frisch angesetztem 2 mM DSG für 45 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS bei RT gewaschen und dann noch mal mit 1% Formaldehyd für 7 min bei 37 °C fixiert. Anschließend wurde zum Stoppen des Crosslinks 2 min mit 2 M Glycin bei RT inkubiert und dann zweimal mit eiskaltem

PBS gespült. Für die Zellyse wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgekratzt und mithilfe von eiskaltem PBS abgespült und in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. Zum Pelletieren der Zellen wurde bei 200 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen, wobei das Zellpellet in ca. 20 µl Restvolumen verbleiben sollte. Als nächstes konnte entweder direkt weitergearbeitet werden oder aber das Pellet bei –80 °C weggefroren werden.

### Sonifikation

Für die Fragmentierung der DNA-Protein-Komplexe wurde zunächst das Zellpellet mit Puffer B sowie Proteaseinhibitor 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde eine Ultraschall-Behandlung mit dem Bioruptor durchgeführt. Hierzu wurden die Proben mit 20 Zyklen High Power sonifiziert. Dabei war darauf zu achten alle 4-5 Zyklen das Eiswasser aus dem Bioruptor zu entfernen und durch neues zu ersetzen, um größere Hitzeeinwirkungen zu vermeiden. Danach wurden die Proben mit Puffer A und Proteaseinhibitor versetzt.

### 3.2.4.2 Immunopräzipitation der Protein-DNA-Komplexe

Die PCR-Stripes gefüllt mit den Antikörper-Beads-Komplexen wurden kurz in einer Tischzentrifuge runterzentrifugiert und dann für 1 min ins magnetische Rack gestellt. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und je 100 µl verdünntes geschertes Chromatin für eine Immunopräzipitation dazugeben. 100 µl wurden als Input bei 4° C gelagert. Die magnetischen Beads wurden in den Stripes gut aufwirbelt, und wenn alles in Lösung war, inkubierten die Proben rotierend bei 4 °C.

### Waschen

Dazu wurden die Proben dreimal mit Puffer A und einmal mit Puffer C bei 4°C nach folgendem Schema gewaschen:

- PCR-Stripes kurz mit der Tischzentrifuge runterzentrifugieren
- 1 min im magnetischen Rack zum Absetzen der Beads
- Überstand abnehmen und werfen
- 100 µl Puffer zum Waschen dazugeben
- 1 min rotieren

### Elution

Diese Arbeitsschritte konnten nun bei RT durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst der DIB-Puffer mit Proteinase K versetzt, die PCR-Stripes kurz mit der Tischzentrifuge zentrifugiert und zum Absetzen der Beads ins magnetische Rack gestellt. Anschließend wurde vorsichtig der Überstand entfernt und verworfen und der DIB-Puffer zur Elution zu den Proben und auch zum Input dazugegeben und resuspendiert. Alle Proben wurden in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 55 °C und 1000 rpm rotiert und danach 15 min bei 100 °C und 1000

rpm rotiert. Anschließend wurde für 5 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden entweder direkt für die Realtime-PCR eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

### 3.2.4.3 Berechnung der relativen Rekrutierung von Proteinen an den Zielpromotor

Zur Promotoranalyse wurde eine Realtime-PCR durchgeführt und die relative Rekrutierung an den jeweils untersuchten DNA-Promotorbereich nach folgender Formel ausgewertet:

$$X = \frac{2^{-[C_t(\text{IP (Targetgen/ Targetprom)}) - C_t(\text{Input/ Targetprom})]}}{2^{-[C_t(\text{IP (RNA-PolIII/ } \beta\text{-Aktin Prom)}) - C_t(\text{Input/ } \beta\text{-Aktin Prom})]}}$$

Dabei wird die Rekrutierung der Targetproteine standardisiert gegen die Rekrutierung einer Komponente des Transkriptionsapparates wie beispielsweise der *RNA-Polymerase II* an den transkriptionellen Startpunkt des humanen  $\beta$ -Aktin-Promotors. In dieser Gleichung ist:

Ct (IP (Targetgen/ Targetprom))	Ct-Wert des immunopräzipitierten Targetgens
Ct (Input/ Targetprom)	Ct-Wert der Input-Kontrolle des jeweiligen Targetpromotors
Ct (Input/ $\beta$ -Aktin Prom)	Ct-Wert der Input-Kontrolle des $\beta$ -Aktin-Gens
Ct (IP (RNA-PolIII/ $\beta$ -Aktin Prom))	Ct-Wert der immunopräzipitierten RNA-Polymerase II am $\beta$ -Aktin Promotor

Weiterhin mussten folgende Kriterien erfüllt, wobei ">" mindestens ein Unterschied von 3 C<sub>t</sub>-Werten darstellt:

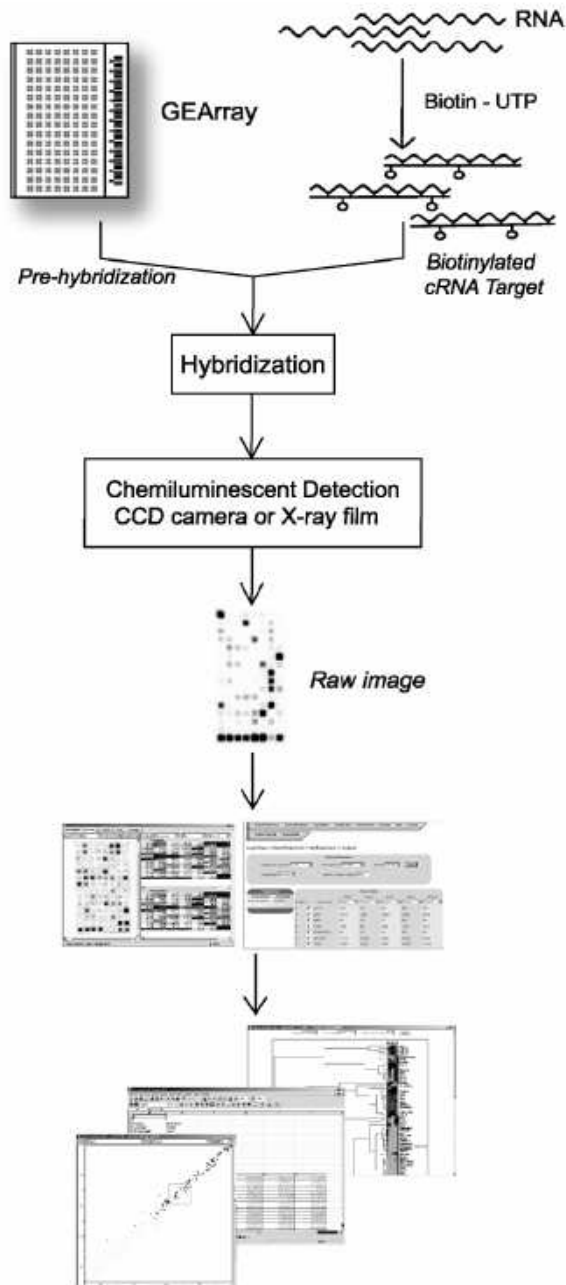
C <sub>t</sub> (IP (IgG/ Targetprom))	>	C <sub>t</sub> (IP (Targetgen/ Targetprom))
C <sub>t</sub> (IP (IgG/ $\beta$ -Aktin Prom))	>	C <sub>t</sub> (IP (RNA-PolIII/ $\beta$ -Aktin Prom))
C <sub>t</sub> (IP (Targetgen/ intergen.Prom))- C <sub>t</sub> (Input/ intergen.Prom)	>	C <sub>t</sub> (IP (Targetgen/ Targetprom))- C <sub>t</sub> (Input/ Targetprom)
C <sub>t</sub> (IP (RNA-PolIII/ intergen.Prom))- C <sub>t</sub> (Input/ intergen. Prom)	>	C <sub>t</sub> (IP (RNA-PolIII/ $\beta$ -Aktin Prom))- C <sub>t</sub> (Input/ $\beta$ -Aktin Prom)

nicht-Template Kontrollen (NTC) ergeben kein Amplifikationsprodukt innerhalb von 40 Zyklen

### 3.2.5 Co-Immunopräzipitationen

In Kooperation mit Anna Foryst-Ludwig erfolgte nach der Zelllyse mit RIPA-Puffer die Immunopräzipitation mittels Sepharose und den spezifischen Antikörpern für 3-4 Stunden. Die immunopräzipitierten Proteine wurden dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen, in Elutionspuffer eluiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden gleiche Mengen des Lysats verwendet.

### 3.2.6 Microarray



Der Oligo GEArray® Human Nuclear Receptors & Coregulators Microarray diente dazu, die Expression von 113 Genen (Kernrezeptoren und deren Koregulatoren) in humanen Gefäßmuskelzellen zu ermitteln. Dieser Array beinhaltet Rezeptoren für Thyroid- and Steroidhormone, Retinoid- und Vitamin D Rezeptoren, als auch Orphanrezeptoren, Koaktivatoren und Korepressoren. Auch Chromatin-modifizierende Enzyme sind in diesem Array enthalten. Zusätzlich zu den 113 Genen der Kernrezeptoren und Koregulatoren war die Membran mit drei Negativkontrollen (pUC 18 DNA), drei Leerwerte und zehn Housekeepinggenen, wie z.B.  $\beta$ -Actin und Glycerinaldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH), versehen. Housekeepinggene sind Gene, die in jeder Körperzelle konstant exprimiert werden und für universelle Proteine kodieren, welche der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen. Sie dienen als Vergleichswert bei der Auswertung verändert exprimierter Gene. Das Prinzip des Mikroarrayverfahrens wird in der nebenstehende Abbildung 3.2 verdeutlicht.

**Abbildung 3.2** Überblick zur Oligo GEArray® Prozedur aus Oligo GEArray® Human Nuclear Receptors & Coregulators Microarray

Der Mikroarray wurde nach Herstellerangaben durchgeführt: Zuerst wurde die RNA präpariert und am Bioanalyser analysiert. Nun wurden 2  $\mu$ g RNA in Anwesenheit von mit Biotin gekoppeltem UTP revers transkribiert. Das heißt die extrahierten mRNA-Moleküle wurden mit einer Reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.



Mithilfe einer linearen Polymerase-Reaktion (LPR) erfolgte deren Amplifizierung. Im Gegensatz zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden bei der LPR nur forward-Primer benutzt. In jedem Zyklus wurde nur der Strang der „originalen cDNA“ als Schablone (Template) genutzt und repliziert. In einem zweiten Reaktionsschritt wurde mit einer in-vitro Transkription komplementäre RNA (cRNA) mit biotinmarkiertem UTP hergestellt. Anschließend wurde die so markierte cRNA über Säulen aufgereinigt und konnte nun direkt für die Hybridisierung verwendet werden. Während eines Hybridisierungsprozesses fanden komplementäre Basenpaarungen statt, dazu band die cRNA an komplementären DNA-Sonden, welche auf einer Nylon-Trägermembran befestigt waren. Die DNA-Sonden entsprachen den humanen Genen der Kernrezeptoren und Koregulatoren. Auf der Membran wurde Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase an die biotinylierte und hybridisierte cDNA gebunden. Es folgten Waschvorgänge und die Markierung der gebundenen RNA-Stränge. Durch die Zugabe von CDP-Star-Reagenz wurde die Hybridisierung als photochemische Reaktion auf einem HyperFilm ECL sichtbar gemacht. Nach der Digitalisierung der Messergebnisse wurde die optische Dichte der Signale dann mit dem Programm Scanalyze (Superarray Inc., Bethesda, USA) gemessen.

### 3.2.7 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.7.1 Proteinisolierung

Dafür wurden zunächst das vorhandene Zellkultur-Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. VSMCs wurden mit Hilfe eines Zellschabers mit RIPA-Puffer abgekratzt und in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. HEK293-Zellen dagegen wurden in PBS-Puffer abgekratzt und für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet ebenfalls in RIPA-Puffer resuspendiert. Beide Zelllinien wurden anschließend gleich weiterbehandelt. Zur vollständigen Homogenisierung wurden die Proben bei mittlerer Stärke für 6 Impulse auf Eis sonifiziert und anschließend bei 14000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proben konnten aufgearbeitet oder bei -20 °C eingefroren werden.

#### 3.2.7.2 Quantifizierung der Proteine mit Bicinchoninsäure-Methode (BCA)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination der selektiven Bicinchoninsäure-Komplexierung mit  $\text{Cu}^+$ . Sie beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ . BCA bildet spezifisch mit  $\text{Cu}^+$  einen Farbkomplex. Dies ermöglicht einen sensitiven, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm, dem Absorptionsmaximum des Komplexes. Die BCA wurde mit dem BCA<sub>TM</sub> Protein Assay Reagent Kit durchgeführt.

Aus der Messung einer BSA-Konzentrationsreihe wurde nach linearer Regression eine Eichgerade ermittelt, aus der die Proteinkonzentration unbekannter Proben bestimmt wurde. Die Extinktion wurde mit einem Spektralphotometer gemessen.

### 3.2.7.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierbei wurden zunächst die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Denaturierung mit DTT und  $\beta$ -Mercaptoethanol zerstört und durch Zusatz von SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. Somit erfolgt die elektrophoretische Auftrennung nur nach der Größe der Proteine. Standardmäßig wurden 20 bis 50  $\mu$ g Gesamtprotein mit der entsprechenden Menge an 6x SDS-Probenpuffer versetzt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden in die Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels geladen und unter Mitführung eines Molekulargewichtsmarkers elektrophoretisch bei 140 Volt für 90 min aufgetrennt.

	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
1,5 M Trenngelpuffer	5 ml	-
0.5 M Sammelgelpuffer	-	2.5 ml
30 % Acrylamid-Lösung	6.6 ml	1.3 ml
10 % SDS	200 $\mu$ l	100 $\mu$ l
10 % APS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	12 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	8 ml	6.1 ml

### 3.2.7.4 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels elektrophoretischem Transfer für 1 h bei 100 V auf eine PVDF-Membran geblottet. Im Anschluss wurde die Membran mit Blockpuffer für 1 h blockiert und dann mit dem in Blockpuffer verdünntem Primärantikörper  $\ddot{U}$ N inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xTBS/Tween-Puffer wurde die Membran mit in Blockpuffer verdünntem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Dieser Sekundärantikörper muss gegen den Isotyp des Primärantikörpers gerichtet sein. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion mittels ECL System. Dabei bewirkt die Oxidation von Luminol durch die Peroxidase eine Lichtemission, die durch die entsprechende Exposition (1 min bis 1 h) mit einem lichtempfindlichen Film sichtbar gemacht werden kann.

### 3.2.8 Histologische Methoden

#### 3.2.8.1 Herstellung von Kryoschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde die in Tissue Tek O.T.C. Compound eingefrorene Arterie in das Gefriermikrotom überführt und dort bei -20 °C Kammertemperatur und -17 °C Objektstichtaltertemperatur 15 min temperiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Probe auf dem Objektsticht in der gewünschten Position mit dem bei RT flüssigen Einbettungsmittel Tissue Tek O.T.C. Compound, welches in der kalten Kammer aushärtet. Zur Herstellung einer glatten Schnittoberfläche wurden zunächst einige Trimmschnitte von 50 µm Dicke angefertigt, anschließend 5 µm Feinschnitte produziert und auf einen Objektträger übertragen. Die Feinschnitte wurden luftgetrocknet und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren. Dieser Vorgang wurde an fünf Abschnitten innerhalb einer Arterie wiederholt.

#### 3.2.8.2 Hämatoxilin-Eosin-Färbung und MMP-9 Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, wobei Hämatoxilin im alkalischen Bereich basophile, anionische Strukturen wie z.B. DNA im Zellkern blau, während Eosin als saurer Farbstoff kationische Verbindungen wie Proteine im Zytoplasma rot färbt. Die Färbung erfolgte durch Eintauchen der Objektträger in Glasküvetten in folgende Lösungen bei RT:

- zweimal 5 min NeoClear
- je 2 min EtOH 98 %, EtOH 96 %, EtOH 80 %, EtOH 70 %
- 5 min ddH<sub>2</sub>O,
- 5 min Hämatoxilin,
- 10 sek ddH<sub>2</sub>O
- 5 min Bläuen der Schnitte mit fließendem Leitungswasser,
- 5 min Eosin,
- 5 min ddH<sub>2</sub>O
- je 2 min EtOH 70 %, EtOH 80 %, EtOH 96 %, EtOH 98 %
- zweimal 5 min NeoClear
- Abschließend wurden die Objektträger mit dem Kunstharz Isomount eingedeckt.

Die MMP-9 Färbung wurde am Deutschen Herzzentrum von Phillipp Stawovy durchgeführt.

### 3.2.9 Zellkulturtechniken

#### 3.2.9.1 Kultivierung und Aufbewahrung

##### Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen mit einer 0.4%igen Trypanblau-Lösung versetzt. Tote Zellen nehmen diesen Farbstoff auf und sind somit im Mikroskop anhand ihrer Blaufärbung deutlich zu erkennen. Die Berechnung der Zellkonzentration erfolgte mittels folgender Formel:

$$C = 2(x \cdot V \cdot 10^4)$$

Der Mittelwert (x) wurde aus den ausgezählten Zellen pro Großquadrat bestimmt. Der Faktor 2 entspricht der Verdünnung, die durch Zugabe von Trypanblau entstanden ist, V ist der Verdünnungsfaktor der Zellkultur und  $10^4$  entspricht der Kammerkonstanten.

### Zellkulturbedingungen

Die humane Aortic Smooth Muscle Zelllinie (VSMCs) wurde mit Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit 5 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 5 % Supplement-Mix (5 % fetales Kälberserum (FBS), 0,1 % endothelialer Wachstumsfaktor (EGF), 0,5 % fibroblastischer Wachstumsfaktor (bFGF), 1 % Insulin) und die HEK293-Zellen mit Dulbecco's modifiziertes (DMEM) Medium mit 5% Pen/Strep sowie 10 % FBS bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Bei beiden Zelllinien wurde regelmäßig ein Mediumswechsel durchgeführt oder die Zellen wurden gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit vorgewärmten PBS-Puffer gewaschen und für 1-2 min mit 1x Trypsin/EDTA bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinierung der VSMCs mit TNS-Lösung neutralisiert. Beide Zelllinien wurden dann in neuem Vollmedium resuspendiert und in neue Kulturflaschen aufgenommen.

### Zellernte

Für die Zellernte wurden die Zellen ebenfalls gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in PBS-Puffer abgekratzt und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C eingefroren.

### Konservierung

Zur Konservierung der Zellen im lebenden Zustand wurden diese gewaschen, trypsinisiert und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 700 g für 5 min bei RT zentrifugiert, mit Einfrier-Medium resuspendiert und in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese möglichst schnell auf 37 °C erwärmt und in einer Kulturflasche mit Medium aufgenommen.

#### 3.2.9.2 Transiente Transfektionen mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine nach Herstellerangaben verwendet. Dafür wurden die Zellen standardmäßig in 6well (VSMCs) oder 12well Platten (HEK-293, HeLa-Zellen) ausgesät, nach Herstellerangaben transfiziert. Am nächsten Tag wurde den Zellen für 24 h Medium ohne Wachstumsfaktoren verabreicht und dann entsprechend der Versuchsbedingungen stimuliert.

### 3.2.9.3 Transiente Transfektionen mit siRNA

In der vorliegenden Arbeit wurden siRNAs zur gezielten Inhibierung der Genexpression der Gene: PPAR $\gamma$  und HMGA1 eingesetzt. Für die Transfektion mit siRNA in VSMCs wurde das Transfektionsreagenz Dharmafect1 und in HEK-293-Zellen Hiperfect nach Herstellerangaben verwendet. Dafür wurden die Zellen in 6well (VSMCs) oder 12well Platten (HEK-293) ausgesät, nach Herstellerangaben transfiziert, am nächsten Tag wurde den Zellen für 24 h die Nährstoffe entzogen und dann entsprechend der Versuchsbedingungen stimuliert.

### 3.2.9.4 Stimulationen

Die VMSCs wurden standardmäßig in 6wells ausgesät und falls erforderlich transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in Nährstoff-freiem Medium kultiviert und dann mit den Glitazonen Pioglitazon und Rosiglitazon für 30 min vorbehandelt. Zur Induktion der MMP-9 Expression wurden die Zellen mit dem Phorbolester Phorbol-Mistrat-Acetat (PMA) und mit dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) behandelt. Als Vehikelkontrolle diente das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Zur Quantifizierung des Expressionsniveaus wurde für 10 h und für die ChIP-Experimente für 2h stimuliert und anschließend für die mRNA-Expressionsanalyse mit PBS geerntet und direkt vermessen oder bei -80 °C eingefroren. Die Messungen der Promotoraktivität wurden in HEK293-Zellen durchgeführt. Diese wurden dann standardmäßig in 12wells ausgesät und falls erforderlich transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 in 0,5% FBS-Medium kultiviert und mit Pioglitazon für 30 min vorbehandelt. Zur Induktion der MMP-9 Expression wurde für 24 h mit PMA behandelt und anschließend für die Luziferaseaktivitätsbestimmung mit 1x Lyse-Puffer resuspendiert und direkt vermessen oder bei -20 °C eingefroren. Für die Co-Immünpräzipitationen wurden HeLa-Zellen verwendet. Diese wurden standardmäßig in 12wells ausgesät und mit den angegebenen Konstrukten für 24 h transfiziert und 1,5 oder 24 h mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und direkt für die Co-Immünpräzipitationsexperimente verwendet.

### 3.2.9.5 Bestimmung der Luziferaseaktivität für Promotor-Reporter-Gen-Studien

Zur Luziferaseaktivitätsmessung wurden standardgemäß 20  $\mu$ l Probe verwendet und mithilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay die Firefly- sowie die Renilla-Luziferaseaktivität im Luminometer nach Herstellerangaben gemessen. Die Auswertung erfolgte dann durch Bildung des folgenden Quotienten:

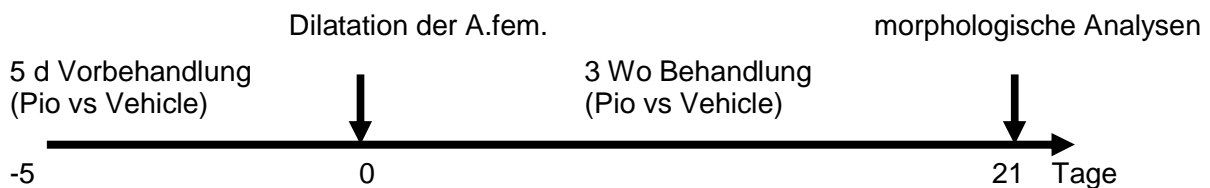
$$\text{RLA} = \frac{[\text{Firefly Luziferase}_{(\text{Konstrukt})} / \text{Renilla Luziferase}_{(\text{pRL-null})}]}{[\text{Firefly Luziferase}_{(\text{pGL3-basic})} / \text{Renilla Luziferase}_{(\text{pRL-null})}]}$$

### 3.2.10 Tierversuch

Für die *in vivo*-Experimente wurden Wildtyp-Mäuse C57BL6/129SBJ und HMGA1-defiziente Mäuse verwendet. Diese Tiere wurden in Kooperation mit Francesco Paonessa, Prof. A. Brunetti und Prof. A. Fusco bereitgestellt. Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Einrichtung des Instituto Nazionale dei Tumori - Fondazione G. Pascale in Neapel durchgeführt. Eine Klimaanlage sowie ein 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus sorgten für standardisierte Umweltbedingungen. In den Käfigen hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter. Alle Tierexperimente und die Haltung wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Tierschutzes für Labortiere unter Aufsicht eines am Ort befindlichen Tierarztes durchgeführt. Die Tierversuche nach dortigen Institutsrichtlinien in Kooperation mit André Prock und Prof. D. Sedding (Universität Gießen) durchgeführt.

#### 3.2.10.1 Tiermodell / Versuchsaufbau

##### HMGA1 -/- vs WT-Mäuse:



#### 3.2.10.2 Operation der Maus

##### Narkose

Um die Narkose einzuleiten, ließ man den Mäusen kurzzeitig Isofluran inhalieren. Die Wirkung der Narkose ließ sich an der Atemfrequenz der Maus ablesen. Zur darauffolgenden Dauernarkose der Mäuse wurde folgendes Schema verwendet:

Angewendetes Mischungsverhältnis: 4 ml Ketamin + 1 ml Rompun (2%)+ 5 ml NaCl –Lösung

Von dieser Lösung, die nochmals 1:1 mit NaCl verdünnt wurde, spritzte man, abhängig vom Gewicht, 0,05-0,1 ml intramuskulär in ein Bein. In dieser Dosierung hielt die Narkose aus Erfahrung etwa zwei Stunden. Um vagale Reize durch die Narkose zu eliminieren, bekamen die Mäuse noch 0,1 ml Atropinsulfat intramuskulär, in der Verdünnung 1:10, in das zur ersten Injektion kontralaterale Bein.

##### Operation

Die für die Operation verwendeten Instrumente und Pharmaka wurden bereitgelegt. Die narkotisierte Maus wurde auf dem Rücken liegend, mit Klebestreifen über den vorderen und hinteren unteren Extremitäten unter dem Gesichtsfeld des Mikroskops so befestigt, dass in der

kleinsten Vergrößerung der gesamte Operationsbereich am Oberschenkel sichtbar war. Als nächstes wurden die Haare im Operationsbereich abgeschnitten und das Bein mit Desinfektionsmittel abgesprüht. Mit einer geraden Schere wurde entlang des vermuteten Verlaufs der A. femoralis, von distal nach proximal ein Hautschnitt gesetzt. Mit zwei stumpfen Pinzetten wurde, das über den Gefäßen befindliche Bindegewebe entfernt oder zur Seite gedrängt. Als nächstes trennte man den N. femoralis von den Gefäßen, ohne diesen dabei zu verletzen. Das Bindegewebe, zwischen Nerv und Arterie wurde abgelöst: Mit einer Branche der Pinzette fuhr man unter den Nerv und hob diesen leicht an. Mit der zweiten Pinzette schob man das Bindegewebe stumpf zur Seite und löst es somit vom Nerv ab. Die Länge über die der Nerv freigelegt werden sollte, richtete sich nach der Lage und der Länge der begleitenden A. femoralis. Als Orientierung diente die Länge vom Abgang der A. profunda femoris bis zum Übergang der A. femoralis in die A. iliaca externa. War der Nerv abgelöst, wurde er nach lateral weggelegt. Im folgenden Schritt trennte man die Arteria von der Vena femoralis und zwar noch etwas weiter nach distal als den Nerv. Man hob mit einer stumpfen Pinzette die Arterie an und fuhr mit einer Branche der anderen Pinzette zuerst zwischen Arterie und Vene und dann unter dem Gefäß hindurch. Nun konnte man mit beiden Pinzetten das Bindegewebe wieder stumpf zur Seite drängen. Als nächstes suchte man die A. profunda femoris und löste diese ebenso von der Vene. Ein arterieller Muskelast, der proximal der A. profunda verlief, wurde durchtrennt und koaguliert. Im Folgenden benötigte man drei Fäden mit einer Länge von 10 cm und der Stärke 7-0 zum Anschlingen der freigelegten Gefäße. Mit diesen Fäden wurde zunächst die A.femoralis, distal des Abgangs der A. profunda femoris angeschlungen (Ligatur 2), dann die Arteria profunda selbst (Ligatur 1) und zuletzt die A. iliaca externa, proximal des Übergangs zur A. femoralis (Ligatur 3). Dazu führte man den Faden unter dem Gefäß hindurch und überkreuzte ihn einmal. Die Fäden wurden mit Klebestreifen fixiert. Vor der Denudation wurde Xylocain auf die Gefäße getropft, um sie zu erweitern. Die Fäden der angeschlungenen Gefäße wurden nun straff gezogen, um den Blutfluss kurzzeitig, während der Denudation, zu unterbrechen. Begonnen wurde mit der A. femoralis, dann folgte die A. profunda und zum Schluss die A. iliaca externa. An der A. profunda femoris wurde, etwas distal von deren Abgang, mit einer feinen Schere nach Vannas, ein kleiner Schnitt quer zur Verlaufsrichtung des Gefäßes gesetzt. Mittels einer kleinen, zuvor hakenförmig abgebogenen Injektionsnadel erweiterte man das im Gefäß entstandene Loch, indem man die Arterie zur Seite zog. Der Führungsdraht zur Denudation des Gefäßes wurde mit einer vorne gummierten Pinzette in das erweiterte Loch in der A. profunda femoris eingeführt und etwas vorgeschoben. Der Faden an der A. iliaca externa wurde leicht gelockert und der Draht bis zur A. iliaca externa vorgeschoben. Dort verblieb er eine Minute. Bevor man den Draht entfernte, tropfte man erneut etwas Xylocain auf die Arterie und zog den

gelockerten Faden wieder fest. Der Draht wurde entfernt. Um eine Blutung zu verhindern wurde die A. profunda proximal und distal des Einschnittes mit Faden ligiert. Danach entfernte man die verwendeten Fäden in umgekehrter Reihenfolge wieder. Die A. femoralis sollte nach dem Eingriff wieder komplett perfundiert sein. Dies konnte an der Färbung und der Pulsation des Gefäßes kontrolliert werden. Jetzt wurde der operierte Situs wieder verschlossen, das heißt die Haut über der denudierten Arterie mit Einzelknopfnähten zugenäht. Nach der Operation wurde die Maus bis zum Erwachen unter eine Wärmelampe gelegt, um ein weiteres Auskühlen des Körpers zu vermeiden.

### 3.2.10.3 Entnahme der A. femoralis

#### Blutentnahme für Serumgewinnung

Für die Blutentnahme wurde die Maus zunächst mit Isofluran narkotisiert. Dann wurde eine Hämatokritkapillare im Augenwinkel eingeführt und am Augapfel vorbei wird der Venenkomplex im Innern der Augenhöhle angestochen. Das Blut konnte so in einem Mikroreaktionsgefäß aufgefangen werden. Anschließend wurde es für 15 min bei RT und danach für mehrere Stunden bei 4 °C gelagert. Nach 5 min Zentrifugation bei 4000 rpm wurde das Serum zur Konservierung in einem Tiefkühlschrank bei -80 °C aufbewahrt.

#### Brustkorb öffnen

Bevor das denudierte Gefäß nach drei Wochen entnommen werden konnte, wurde es, in NaCl-Lösung von intraluminal durchspült. Dazu wurde die Maus zunächst getötet, indem man sie eine Überdosis Isofluran inhalieren ließ. Anschließend wurde ein kleiner Querschnitt ventral im unteren Bauchbereich gesetzt. Dabei wurde nur die Haut mit dem Fell und noch nicht die Bauchdecke durchschnitten. Von hier aus wurde median die Haut bis zum Unterkiefer cranial geschnitten. Dann wurde mit einem Y-Schnitt vom medianen Schnitt her in Richtung der vier Extremitäten geschnitten. Es musste vorsichtig geschnitten werden, damit nicht die Brustdecke durchschnitten wird. Nun wurde die äußere Haut mit einer Schere vorsichtig von der Unterhaut gelöst, indem man das Fell mit einer Pinzette etwas anhob. Das Fell wurde so weit vom Körper abgelöst bis man es ohne Deformierung des Körpers feststecken konnte. An den Extremitäten wurde es bis zu den Oberschenkeln abgelöst. Nun wurde die Haut der Bauchdecke am Sternum mit der Pinzette angehoben und von hier beidseitig am letzten Rippenbogen entlang nach dorsal bis zum Hinterrand des Brustkorbes geschnitten. Der Brustkorb wurde eröffnet, indem man mit einer Pinzette das Sternum anhob und mit der spitzen Schere vorsichtig das Zwerchfell vom Brustkorbansatz trennte. Anschließend wurden mit der Schere beidseitig vom Sternum bis zum Unterkiefer die Rippen des Brustkorbes durchschnitten.



### Perfusion der Blutgefäße

Mit einer Injektionsnadel konnte der linke Ventrikel punktiert werden und die NaCl-Lösung langsam appliziert werden. Durch den Druck der sich über dem Herzen befindlichen Wassersäule, das Gefäßsystem perfundiert. Dieser Vorgang dauerte fünf Minuten, um eine ausreichende Durchspülung des gesamten Gefäßes zu gewährleisten. Gleichzeitig wurde das noch im Gefäßsystem der Maus vorhandene Blut entfernt. Das passierte durch Setzen einer kleinen Inzision im rechten Vorhof, über die das Blut abfloss.

### Gefäßentnahme

In Vorbereitung wurde zunächst ein 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit Tissue Tek befüllt. Für die Gefäßentnahme wurde durch einen Hautschnitt das ehemalige Operationsgebiet eröffnet und die denudierte A. femoralis aufgesucht. Das gelang, indem man von den vormals gesetzten Ligaturen an der A. profunda femoris dem Gefäßverlauf nach proximal folgte. Nun wurde das über dem Gefäßsystem befindliche Bindegewebe sowie der N. femoralis mit zwei stumpfen Pinzetten erneut entfernt und die denudierte Arterie so weit wie möglich freigelegt. Anschließend wurde das Gefäß zuerst am Übergang der A. femoralis zur A. iliaca und dann am Abgang der A. profunda femoris herausgetrennt, in einer Petrischale mit NaCl-Lösung von eventuellen Blutresten gereinigt. Dann wurde die fixierte Arterie der Länge nach in das Eppendorfggefäß eingebettet. Hierzu wurde die A. femoralis vorsichtig ins Eppendorfreaktionsgefäß eingetaucht und beim Herausziehen der Pinzette wurde darauf geachtet, dass das Gefäß möglichst gerade eingebettet wurde. Zeigte das proximale Ende der Arterie in Richtung Öffnung des Gefäßes, wurde beim späteren Schneiden des Gefäßes das denudierte, distale Ende zuerst bearbeitet. Als nächstes kam das fixierte und eingebettete Gefäß zum Einfrieren in flüssigen Stickstoff und wurde zur Konservierung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die A. femoralis im linken Oberschenkel wurde ebenfalls nach diesem Protokoll entnommen, mit der Ausnahme das hier keine Ligatur an der A. profunda gesetzt wurde und man somit zunächst die Bifokation aufsuchte und dann dem Gefäßverlauf nach proximal folgte.

### **3.2.11 Statistische Berechnungen**

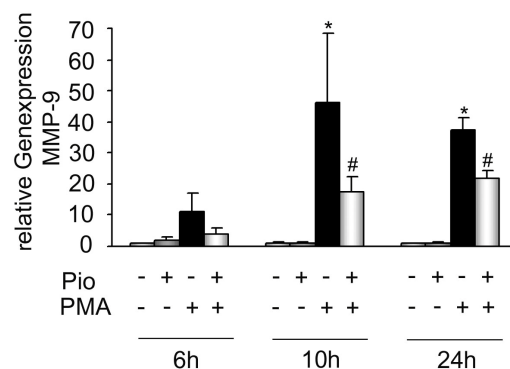
Die in dieser Arbeit gezeigten Daten sind als Mittelwerte des mittleren Standardfehlers dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben t-Test bei 2 Gruppen bzw. one-way ANOVA bei mehr als zwei Gruppen. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von  $p < 0.05$  angenommen. In den Histogrammen kennzeichnen die vertikalen Linien jeweils die Standardabweichung.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression in VSMCs

#### 4.1.1 PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Glitazone inhibiert die MMP-9 Transkription

Zur Ermittlung der Wirkungsweise des nukleären Transkriptionsfaktors Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in der Regulation bedeutender Gene für die Entstehung der Atherosklerose in der Gefäßwand wurde zunächst die Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) ausgewählt. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer unbalancierten Steigerung der MMP-9 Expression in der Gefäßwand, die sowohl zu einer Destabilisierung der atherosklerotischen Plaques als auch zur Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) führt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit VSMCs verwendet. Differenzierte, kontraktile VSMCs exprimieren Proteine der extrazellulären Matrix wie MMP-9 nur sehr schwach, infolgedessen wurden VSMCs mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA, 50 ng/ml) stimuliert. Zur transkriptionellen Aktivierung von PPAR $\gamma$  wurde zunächst der Ligand Pioglitazon (Pio, 10  $\mu$ M) eingesetzt. Zur Etablierung des Versuchsystems wurde eine Zeitkinetik erstellt, VSMCs wurden vor der Stimulation für 36 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert, 30 Minuten mit Pioglitazon vorbehandelt und anschließend mit folgenden Komponenten inkubiert: Pioglitazon und PMA allein sowie in Kombination. Danach wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und die Expression der MMP-9 mRNA mithilfe von Realtime-PCR quantifiziert. Die nachfolgende Abbildung 4.1 zeigt nun den Einfluss von Pioglitazon und PMA auf die mRNA Expression des MMP-9 Gens in VSMCs zu den verschiedenen Zeitpunkten.

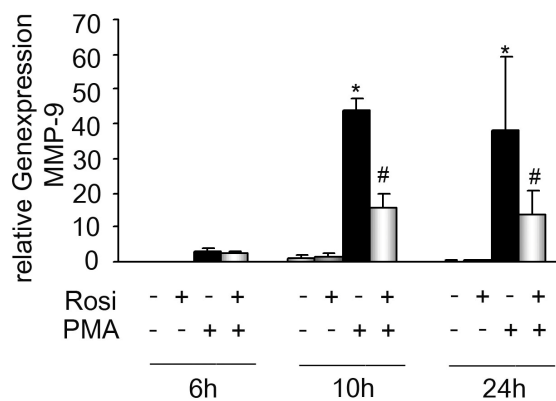


**Abbildung 4.1** Zeitauflösende Darstellung der MMP-9 mRNA Expression in VSMCs

VSMCs wurden mit  $\pm$  Pio/PMA stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (x-Achse). Die MMP-9 mRNA Expression wurde mittels Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

## Ergebnisse

In den unbehandelten Zellen wurde lediglich eine schwache basale Expression detektiert. Dagegen stieg die Expression von MMP-9 im Vergleich zum Vehikel durch die PMA-Behandlung stark an und nahm dann nach 24 Stunden leicht ab. Die stärkste Expression wurde nach 10 Stunden gemessen, wobei das MMP-9 Transkriptionsniveau durch die PMA-Behandlung etwa 40fach verstärkt wurde. Weiterhin konnte anhand dieser Daten ermittelt werden, dass sich in Anwesenheit des PPAR $\gamma$ -Liganden Pioglitazon die PMA-induzierte MMP-9 mRNA Expression nach 10 Stunden maximal reduzierte. Diese Daten verdeutlichen, dass die PMA-vermittelte Induktion der MMP-9-Expression durch die PPAR $\gamma$ -Aktivierung mit Pioglitazon reprimiert wurde. Zur Untersuchung liganden-spezifischer Unterschiede wurde in einem weiteren Versuchsansatz der PPAR $\gamma$  Ligand Rosiglitazon (Rosi, 10  $\mu$ M) verwendet.



**Abbildung 4.2** Zeitauflösende Darstellung der MMP-9 mRNA Expression in VSMCs

VSMCs wurden mit  $\pm$  Rosi/PMA stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (x-Achse). Die MMP-9 mRNA Expression wurde mittels Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

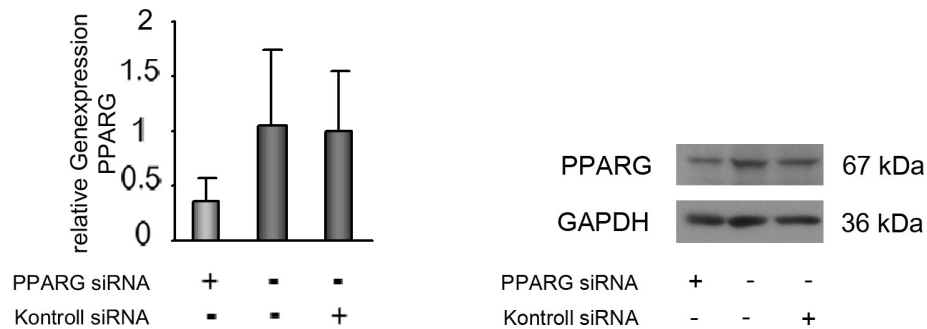
Die Abbildung 4.2 veranschaulicht, dass Rosiglitazon eine signifikante Reduktion der PMA-induzierten MMP-9 mRNA Expression um 64% bewirkte. Beide untersuchten PPAR $\gamma$ -Liganden inhibieren somit die PMA-induzierte MMP-9 mRNA Expression. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Glitazon-vermittelte PPAR $\gamma$ -Aktivierung eine entscheidende Rolle bei der transkriptionellen Regulation der MMP-9 mRNA Expression spielt.

### 4.1.2 Glitazon-vermittelte MMP-9 Transrepression ist PPAR $\gamma$ -abhängig

Da Glitazone auch rezeptorunabhängige Effekte vermitteln oder andere Rezeptor-Subtypen aktivieren können, sollte zunächst die Bedeutung von PPAR $\gamma$  für diesen Transrepressionsmechanismus herausgestellt werden. Die Funktionsanalyse von PPAR $\gamma$  erfolgte mittels siRNA, um die Expression des nukleären Rezeptors gezielt zu unterbinden. Zu diesem Zweck wurden VSMCs mit siRNA gegen PPAR $\gamma$  transfiziert und die

## Ergebnisse

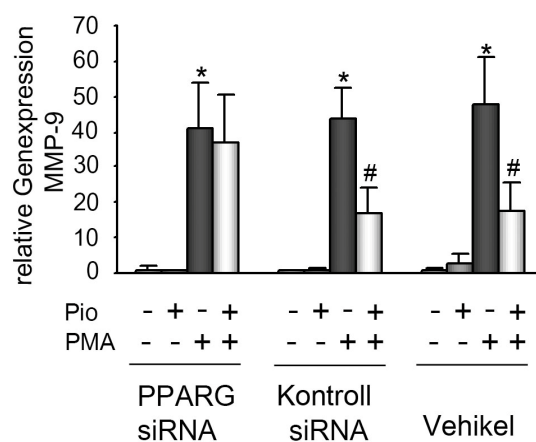
Transfektionseffizienz nach der RNA-Isolation mittels Realtime-PCR und nach der Protein-Isolation mittels Western Blot quantifiziert. Die Abbildung 4.3 stellt die Transfektionseffizienz der siRNA-vermittelten Suppression von PPAR $\gamma$  in VSMCs dar.



**Abbildung 4.3** PPAR $\gamma$  Expressionsniveau in VSMCs nach siRNA-Suppression

VSMCs wurden mit siRNA gerichtet gegen PPAR $\gamma$  transfiziert (x-Achse). Die PPAR $\gamma$  mRNA Expression wurde mithilfe von Realtime PCR (y-Achse) und der Proteingehalt mittels Western Blot quantifiziert.

Die Expression von PPAR $\gamma$ -mRNA und -Protein in den VSMCs im Vergleich zum Vehikel und zur Kontroll-siRNA reduzierte sich auf etwa 30 %. Nach erfolgreicher Suppression von PPAR $\gamma$  wurden VSMCs in den Ansätzen Vehikel, Kontroll-siRNA und PPAR $\gamma$ -siRNA für 16 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert, anschließend mit  $\pm$ Pioglitazon/PMA nach 30-minütiger Pioglitazon-Vorbehandlung für 10 Stunden inkubiert. Nach der Ernte erfolgten die RNA-Isolation und die Ermittlung der MMP-9 mRNA Expression. Die Abbildung 4.4 zeigt den Einfluss der PPAR $\gamma$  Deletion auf die mRNA Expression des MMP-9 Gens.

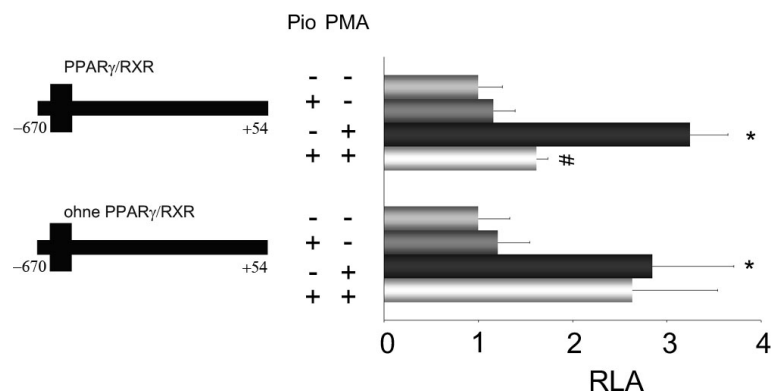


**Abbildung 4.4** MMP-9 mRNA Expression nach PPAR $\gamma$  Suppression

VSMCs wurden mit PPAR $\gamma$ -siRNA transfiziert und mit  $\pm$  Pio/ PMA stimuliert (x-Achse). Die MMP-9 mRNA Expression wurde mit Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

## Ergebnisse

Wie Abbildung 4.4 beweist, führte die verminderte Expression des Kernrezeptor PPAR $\gamma$  zu einer Aufhebung der Glitazon-Wirkung auf die MMP-9 Expression in den PPAR $\gamma$ -siRNA behandelten VSMCs im Vergleich zu den Vehikel und Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Die basalen Effekte und die PMA-induzierte MMP-9 Expression blieb dagegen in allen drei Ansätzen annähernd unverändert. Als weiterer Nachweis für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression von MMP-9 wurden Promotoranalysen mittels Luziferase-Reporter-Assay durchgeführt. Zunächst wurde ein der Luziferase-cDNA vorgeschalteter humaner MMP-9 Promotor in den Firefly-Luziferase-Reportervektor pGL3 kloniert (siehe Methodenteil 3.2.2). Anschließend wurden für diese Transaktivierungsassays HEK293-Zellen mit folgenden Konstrukten transient transfiziert: das MMP-9 Promotorkonstrukt (-670/+54), Renilla und  $\pm$  PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , da diese Zellen die Kernrezeptoren PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  nur sehr schwach exprimieren. Danach wurden die Zellen über Nacht in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert und dann für 24 Stunden mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA behandelt, wobei hier ebenfalls 30 Minuten mit Pioglitazon vorbehandelt wurde. Die Promotoraktivität wurde nach der Zellernte als relative Luziferaseaktivität (RLA) ermittelt. Die Abbildung 4.5 zeigt den Einfluss von PPAR $\gamma$  auf die Promotoraktivität des humanen MMP-9 Promotors unter Stimulation mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA.



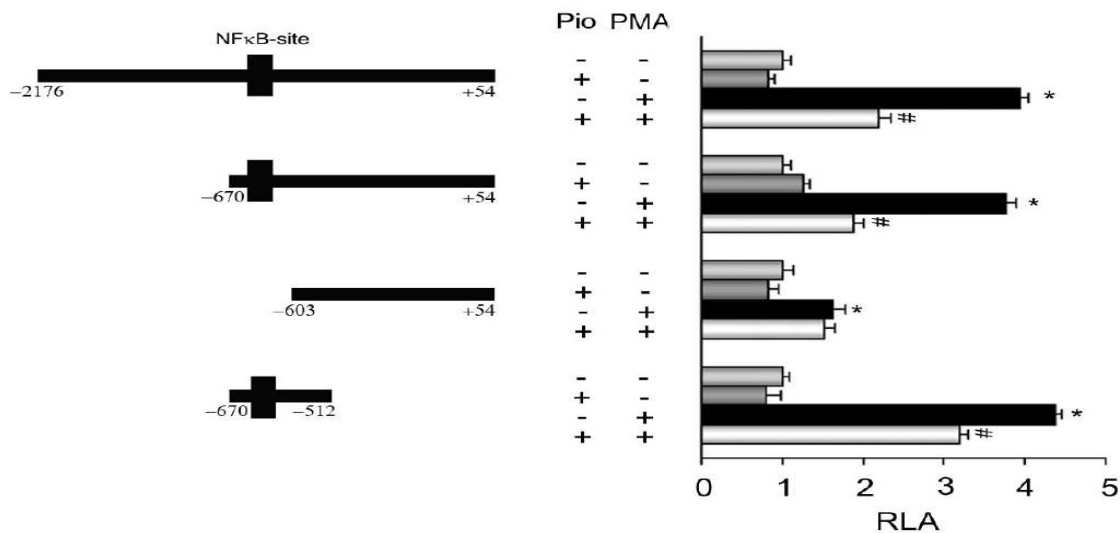
**Abbildung 4.5** MMP-9 Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$

HEK293-Zellen wurden mit dem MMP-9 Promotorkonstrukt (-670/+54),  $\pm$  PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  und Renilla transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt (y-Achse). Die Promotoraktivität ist als mittlere RLA aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt (x-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

Unter basalen Bedingungen konnte lediglich eine schwache Promotoraktivität detektiert werden. Dagegen führte die Stimulation mit PMA zum signifikanten Anstieg der RLA. In Übereinstimmung mit den Expressionsanalysen konnte der PMA-Effekt mit Pioglitazon in Anwesenheit von PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  inhibiert werden, nicht aber in Abwesenheit von PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ . Diese Daten belegen zusätzlich, dass die Glitazon-vermittelten Effekte abhängig von PPAR $\gamma$  sind.

### 4.1.3 PPAR $\gamma$ -abhängige MMP-9 Promotorregulation verläuft über NF $\kappa$ B regulatorische Promotorelemente

Im humanen MMP-9 Promotor liegen zahlreiche Konsensussequenzen für Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren, die zur Stimulation des MMP-9 Promotors beitragen (Masure et al., 1993; Sato et al., 1993; Ma et al., 2004). Für den Transkriptionsfaktor AP-1 liegen zwei AP-1 Promotorelemente an den Positionen (-533) und (-80) vor. Unmittelbar neben einem AP-1-Element befindet sich eine Bindungsstelle (-538) für ETS-Transkriptionsfaktoren sowie eine Bindungsstelle (558) für die Sp-1-Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus ist im MMP-9 Promotor eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (-604) vorhanden (Gum et al., 1996; Himelstein et al., 1997; Bond et al., 1998; Farina et al., 1999). In den folgenden Versuchsansätzen sollte daher eine Beteiligung verschiedener MMP-9-Promotorbereiche an der PPAR $\gamma$ -vermittelten MMP-9 Regulation identifiziert werden. Infolgedessen wurden verschiedene Deletionskonstrukte des MMP-9 Promotors in den Firefly-Luziferase-Reportervektor pGL3 kloniert (siehe Methodenteil 3.2.2) und deren Aktivität nach  $\pm$  Pioglitazon/PMA Stimulation mittels Luziferase-Reporter-Assay charakterisiert. In der Abbildung 4.6 ist die jeweilige Promotoraktivität der generierten MMP-9 Promotorkonstrukte mit den jeweiligen Stimulationsbedingungen dargestellt.

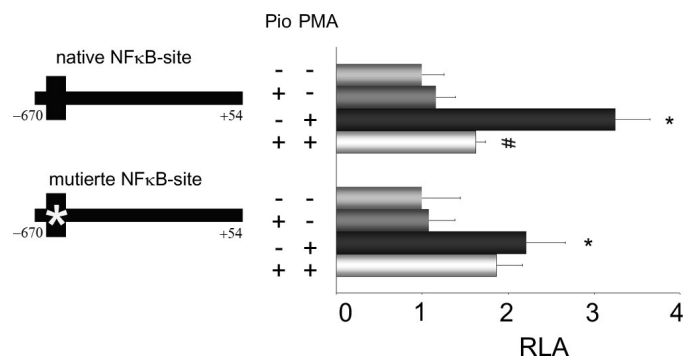


**Abbildung 4.6** Promotoraktivität verschiedener humaner MMP-9 Deletionskonstrukte

HEK293-Zellen wurden mit den verschiedenen MMP-9 Deletionskonstrukten, PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  und Renilla transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt (y-Achse). Die Promotoraktivität ist als mittlere RLA aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt (x-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

## Ergebnisse

Die Aktivität des Konstruktes -670/+54, wobei die Größe des Promotorbereiches strangaufwärts um 500 Basenpaare (bp) verkürzt wurde, zeigt eine annähernd identische Promotoraktivität wie die des gesamten MMP-9 Promotorkonstruktes -2176/+54. In Übereinstimmung mit den Expressionsanalysen konnte der PMA-Effekt durch eine Glitazon-vermittelte PPAR $\gamma$ -Aktivierung inhibiert werden. Das Konstrukt -670/+512 mit einer proximalen Deletion der AP-1 Bindungsstelle an Position -80 zeigte ebenso eine ähnliche Promotoraktivität nach PMA-Induktion oder nach Inhibierung durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung. Jedoch die Promotoraktivität des Konstruktes -603/+54, in welchem die NF $\kappa$ B-Sequenz des MMP-9 Promotors unterbrochen wurde, resultierte in einer reduzierten PMA-induzierten MMP-9 Promotoraktivität als auch in einer verminderten PPAR $\gamma$ -vermittelten Inhibierung. Die Effekte deuten darauf hin, dass es sich bei der transkriptionellen MMP-9 Regulation um einen NF $\kappa$ B-gekoppelten Mechanismus handeln könnte. Als weiterer Nachweis der PPAR $\gamma$ -vermittelten Modifikation der NF $\kappa$ B-Aktivität und somit der Veränderung der MMP-9 Expression sollten Promotorkonstrukte mit nativer und mutierter NF $\kappa$ B-Bindungssequenz generiert (siehe Methodenteil 3.2.2) und deren Promotoraktivität verglichen werden. Die Abbildung 4.7 zeigt die Promotoraktivität der generierten MMP-9 Promotorkonstrukte mit nativer NF $\kappa$ B-Bindungssequenz (GGAATTCCC) und mit mutierter, inaktiver Bindungssequenz (GaAATTCCaC) mit den jeweiligen Stimulationsbedingungen.



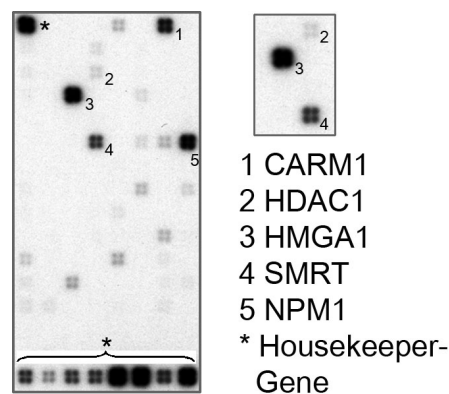
**Abbildung 4.7** MMP9 Promotoraktivität mit nativer und mutierter NF $\kappa$ B-Sequenz

HEK293-Zellen wurden mit den MMP-9 Promotorkonstrukten mit nativer und mutierter NF $\kappa$ B-Sequenz, PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  und Renilla transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt (y-Achse). Die Promotoraktivität ist als mittlere RLA aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt (x-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

Die Stimulationen mit dem Promotorkonstrukt mit mutierter, inaktiver Bindungssequenz zeigten sowohl eine verminderte PMA-Induktion als auch eine reduzierte Glitazon-Inhibierung der Promotoraktivität im Vergleich zu den Stimulationen mit dem Promotorkonstrukt mit nativer Bindungssequenz. Diese Daten bestätigen, dass die NF $\kappa$ B-Sequenz des MMP-9 Promotors an der PPAR $\gamma$ -induzierten Inhibierung beteiligt ist.

## 4.2 Genexpressionsmuster humaner Kernrezeptoren und Koregulatoren in VSMCs

Die Interaktion von PPAR $\gamma$  mit anderen Koregulatorproteinen ist ein sehr wichtiger Regulationsmechanismus in der spezifischen Wirkung des Rezeptors. Auf der Suche nach weiteren Einflussfaktoren für die funktionelle Analyse der PPAR $\gamma$ -vermittelten MMP-9 Transrepression wurde das Expressionsprofil der VSMCs für humane Kernrezeptoren und Koregulatoren mittels Oligo GEArray® (SuperArray®) bestimmt. Für den Array wurde qualitativ hochwertige Gesamt-RNA der VSMCs eingesetzt. In der Abbildung 4.8 ist eine repräsentative cDNA Membran des Oligo GEArray® dargestellt. Diese zeigt die mittels Chemilumineszenz detektierten Spotintensitäten der untersuchten Kernrezeptoren und Koregulatoren in den VSMCs. Diese Rohdaten wurden mit Hilfe der Software GEArray Analyser™ 1.0 analysiert und auf die Expression der Housekeeping-Gene normalisiert. Auf der Webseite: [saweb2.sabiosciences.com/gene\\_array\\_product/HTML/OHS-056.html](http://saweb2.sabiosciences.com/gene_array_product/HTML/OHS-056.html) befindet sich eine komplette Liste aller Gene sowie aller Housekeeper-Gene, die auf dem Array gespottet sind. Auf der Membran wurden die Spots der fünf am stärksten exprimierten Gene sowie die Housekeeping-Gene gekennzeichnet. Rechts in der Abbildung 4.8 ist eine Detailansicht der Region mit den Spots für die Gene HDAC1, HMGA1 und SMRT dargestellt.



**Abbildung 4.8** Expressionsprofil der VSMCs für humane Kernrezeptoren und Koregulatoren

RNA von VSMCs wurde in cRNA transkribiert und an komplementäre cDNA Sonden hybridisiert und die Digitalisierung der Messergebnisse dargestellt.

Anhand dieser Daten wurde HMGA1 als Koregulator mit der höchsten Expression in VSMCs identifiziert. Dies macht HMGA1 zu einem vielversprechenden Gen, um den zugrunde liegenden Mechanismus der PPAR $\gamma$ -Wirkung auf Ebene der Koregulatoren zu untersuchen. Die HMGA1 Expression wurde anschließend sowohl durch quantitative Realtime-PCR-Analyse als auch durch Western Blot auf Proteinebene verifiziert (siehe auch Abbildung 4.9).

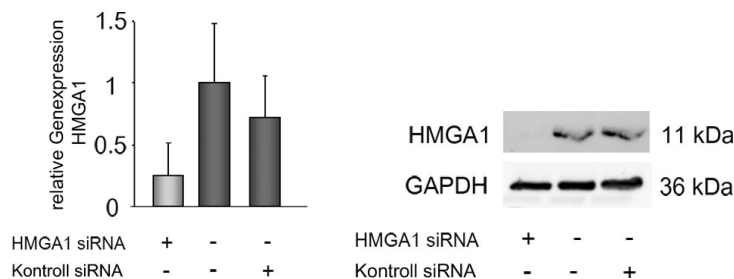


### 4.3 Einfluss von HMGA1 auf die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression

#### 4.3.1 HMGA1 Deletion blockiert die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression

Um die Relevanz des Chromatin-modifizierenden Proteins HMGA1 für den PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepressionsmechanismus zu ermitteln, wurde die HMGA1 Expression mittels RNA-Interferenz gezielt reduziert. Zu diesem Zweck wurden VSMCs mit siRNA gegen HMGA1 transfiziert, anschließend geerntet und die Transfektionseffizienz nach der RNA-Isolation mittels Realtime-PCR und nach der Protein-Isolation mittels Western Blot quantifiziert.

Die Abbildung 4.9 stellt die Transfektionseffizienz der siRNA-vermittelten Suppression von HMGA1 in VSMCs dar.

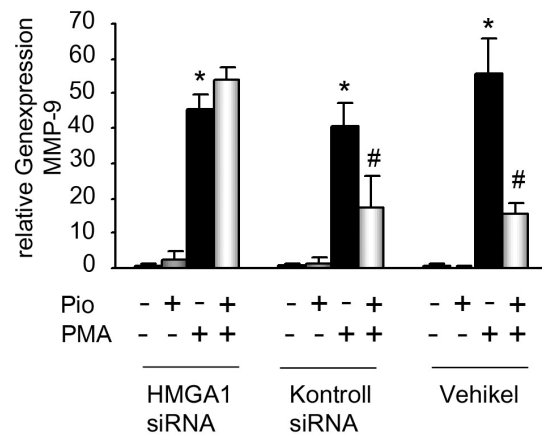


**Abbildung 4.9** HMGA1 Expressionsniveau in VSMCs nach siRNA-Suppression

VSMCs wurden mit siRNA gerichtet gegen HMGA1 transfiziert (x-Achse). Die HMGA1-Expression wurde mithilfe der Realtime PCR (y-Achse) und der Proteingehalt mittels Western Blot (rechts) quantifiziert.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die HMGA1 mRNA und auch die Protein Expression in den VSMCs im Vergleich zum Vehikel und zur Kontroll-siRNA auf etwa 20% reduzierte. Nach erfolgreicher Suppression von HMGA1 wurden die VSMCs in den drei verschiedenen Ansätzen (Vehikel, Kontroll-siRNA, HMGA1-siRNA) für 16 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert, anschließend mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA (30-minütige Pioglitazon-Vorbehandlung) für 10 Stunden inkubiert. Nach der Ernte erfolgten die RNA-Isolation und die Ermittlung der MMP-9 Expression mittels Realtime-PCR. Die nachfolgende Abbildung 4.10 zeigt nun den Einfluss der HMGA1 Deletion auf die mRNA Expression des MMP-9 Gens unter Stimulation mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA. Die basale als auch die PMA-induzierte MMP-9 Expression blieb in allen 3 Ansätzen annähernd gleich. Demgegenüber führte die verminderte Expression von HMGA1 zu einer Aufhebung der Pioglitazon Wirkung auf das MMP-9 Expressionsniveau in den PPAR $\gamma$ -siRNA behandelten VSMCs im Vergleich zu den Vehikel und Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Diese Daten belegen eindeutig, dass die PPAR $\gamma$ -vermittelten Effekte von HMGA1 abhängig sind.

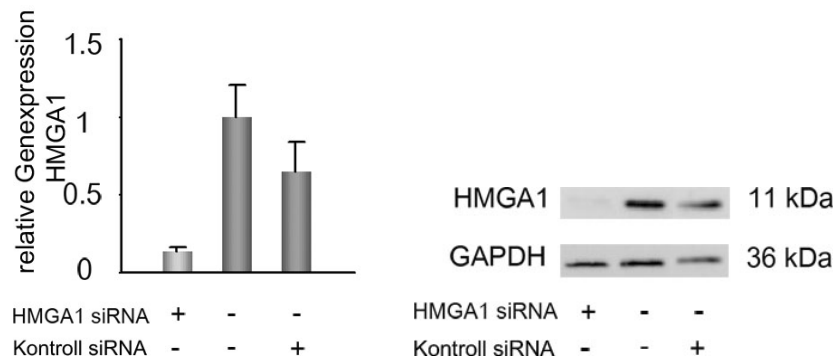
## Ergebnisse



**Abbildung 4.10** MMP-9 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression

VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA stimuliert (x-Achse). Die MMP-9 mRNA Expression wurde mithilfe der Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

Zur Validierung dieser Ergebnisse sollte ein weiterer Nachweis für die transkriptionelle Hemmung von MMP-9 durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung in Abhängigkeit von HMGA1 mittels Luziferase-Reporter-Assay erbracht werden. Für diese Transaktivierungsassays wurden HEK293-Zellen mit siRNA gegen HMGA1 transfiziert. Die Abbildung 4.11 stellt die Transfektionseffizienz der siRNA-vermittelten Suppression von HMGA1 in HEK293-Zellen dar.



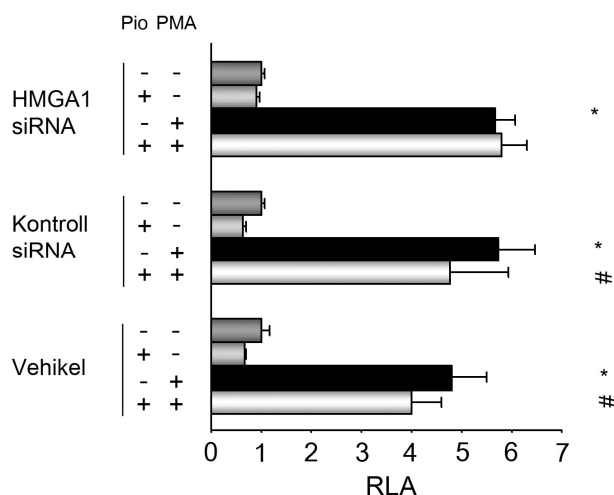
**Abbildung 4.11** HMGA1 Expressionsniveau in HEK293-Zellen nach siRNA-Suppression

HEK293-Zellen wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert (x-Achse). Die HMGA1 mRNA Expression wurde mithilfe der Realtime PCR (y-Achse) und der Proteingehalt mittels Western Blot (rechts) quantifiziert.

Die HMGA1 mRNA und auch die Protein Expression in den HEK293-Zellen reduzierte sich im Vergleich zum Vehikel und zur Kontroll-siRNA auf etwa 15 %. Nach erfolgreicher Suppression von HMGA1 wurden die HEK293-Zellen mit folgenden Konstrukten transient transfiziert: MMP-9 Promotorkonstrukt -670/+54, PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  und Renilla. Anschließend wurden die Zellen für 16

## Ergebnisse

Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert und danach für 24 Stunden mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA behandelt, wobei hier ebenfalls 30 Minuten mit Pioglitazon vorbehandelt wurde. Die Promotoraktivität wurde nach der Zellernte als relative Luziferaseaktivität (RLA) ermittelt. Die Abbildung 4.12 stellt den Einfluss der HMGA1 Deletion auf die MMP-9 Promotoraktivität unter Stimulation mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA dar.



**Abbildung 4.12** MMP-9 Promotoraktivität nach HMGA1 Suppression

HEK293-Zellen wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert und mit dem MMP-9 Deletionskonstrukt -670/+54, PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  und Renilla transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt (y-Achse). Die Promotoraktivität ist als mittlere RLA aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt (x-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

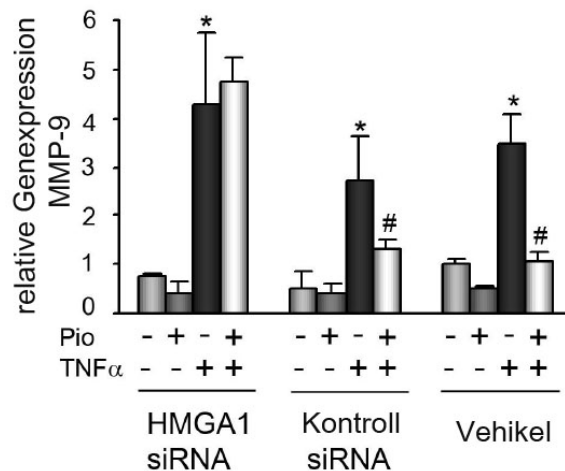
Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, konnte unter basalen Bedingungen in allen drei Transfektionsansätzen lediglich eine schwache Promotoraktivität detektiert werden. Dagegen resultierte die Stimulation mit PMA in einem signifikanten Anstieg der RLA.

Die PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch den Liganden Pioglitazon führte in den Vehikel- und Kontroll-siRNA behandelten Zellen zu einer Inhibierung der PMA-induzierten Promotoraktivität. Hingegen in den HMGA1-siRNA behandelten Zellen konnte diese Inhibierung nicht mehr detektiert werden. In Übereinstimmung mit den Expressionsanalysen liefern diese Ergebnisse also einen zusätzlichen Hinweis darauf, dass die PPAR $\gamma$ -vermittelte MMP-9 Transrepression auf eine transkriptionelle Hemmung des MMP-9 Gens zurückgeführt werden kann.

Ergänzend zu den bisherigen Daten wurde die PPAR $\gamma$ /HMGA1 Wirkung auf VSMCs, die mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) behandelt wurden, ermittelt. Zu diesem Zweck wurden VSMCs nach erfolgreicher Suppression von HMGA1 für 16 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert, anschließend mit  $\pm$  Pioglitazon/TNF $\alpha$  nach 30-minütiger Pioglitazon-Vorbehandlung für 24 Stunden inkubiert. Nach der Ernte erfolgten RNA-

## Ergebnisse

Isolation und Ermittlung der MMP-9 Expression mittels Realtime-PCR. Die Abbildung 4.13 veranschaulicht das MMP-9 Expressionsniveau nach HMGA1 Deletion und Pioglitazon/ TNF $\alpha$  Stimulation.



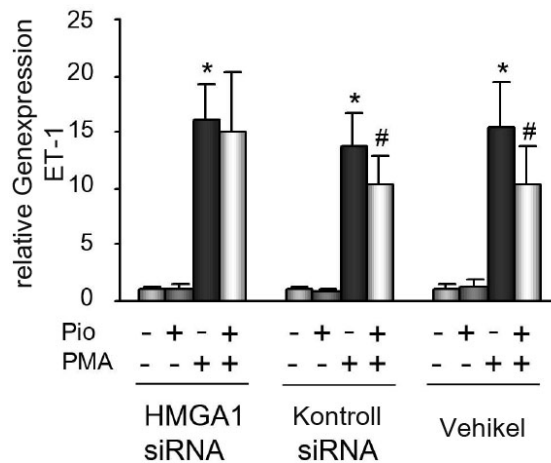
**Abbildung 4.13** MMP-9 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression

VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert und mit  $\pm$  Pio/TNF $\alpha$  stimuliert (x-Achse). Die MMP-9 mRNA Expression wurde mithilfe der Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

Die basale Expression von MMP-9 ist wiederum sehr niedrig, jedoch wird das MMP-9 Expressionsniveau in allen drei Transfektionsansätzen mit TNF $\alpha$  Stimulation etwa 3- bis 4-fach erhöht. In den Vehikel und Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde eine signifikante Reduktion der MMP-9 Transkriptionsrate detektiert. Im Gegensatz dazu bewirkte in den mit HMGA1-siRNA behandelten Zellen die Pioglitazon-Stimulation keine Reduktion der MMP-9 Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass TNF $\alpha$  die MMP-9 Expression signifikant induzieren konnte und bestätigen, dass die PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression von MMP-9 auch unter TNF $\alpha$  Stimulation von HMGA1 abhängig ist.

Weiterhin wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluss von PPAR $\gamma$  und HMGA1 auf die Endothelin-1 (ET-1) Expression in VSMCs untersucht, da ET-1 ein starker Vasokonstriktor ist, der an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt ist und in krankhaft, atherosklerotisch veränderten Gefäßen verstärkt exprimiert wird und in zahlreiche proinflammatorische Schlüsselprozesse involviert ist. Zu diesem Zweck wurde die ET-1 Expression mittels Realtime-PCR quantifiziert. Die Abbildung 4.14 stellt den Einfluss der HMGA1 Deletion auf die mRNA Expression des ET-1 Gens unter Stimulation mit Pioglitazon/PMA dar.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.14** ET-1 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression

VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA stimuliert (x-Achse). Die ET-1 mRNA Expression wurde mithilfe der Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

Zunächst zeigt sich basal in allen drei Transfektionsansätzen kein Unterschied. ET-1 wurde schwach exprimiert. Die PMA-Stimulation führte in allen drei 3 Ansätzen gleichmaßen zu einer etwa 15fach gesteigerten ET-1 Expression. In den Vehikel und Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde eine signifikante Reduktion der ET-1 Transkriptionsrate detektiert. Im Gegensatz dazu bewirkte in den mit HMGA1-siRNA behandelten Zellen die Pioglitazon-Stimulation keine Reduktion der ET-1 Expression. Diese Daten charakterisieren erstmals HMGA1 als neuen Kofaktor für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression von MMP-9 und ET-1 in VSMCs.

Die Ergebnisse zeigen einen neuen Mechanismus inflammatorischer Genregulation durch HMGA1 und PPAR $\gamma$  in VSMCs.

### 4.3.2 HMGA1 Überexpression verstärkt PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurden HMGA1-Überexpressionsstudien in VSMCs durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden VSMCs mit dem HMGA1-GFP Konstrukt transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Transfektionseffizienz nach der RNA-Isolation mittels Realtime-PCR und nach der Protein-Isolation mittels Western Blot quantifiziert. Wie in der Abbildung 4.15 dargestellt, resultiert die HMGA1 Überexpression in einer etwa 3-fach höheren mRNA und Protein Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

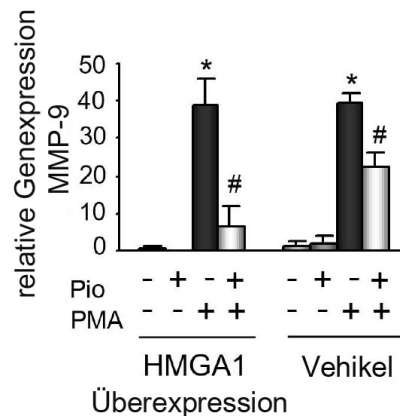
## Ergebnisse



**Abbildung 4.15** HMGA1 Expressionsniveau in VSMCs nach Überexpression

VSMCs wurden mit HMGA1-GFP transfiziert (x-Achse). Die HMGA1 mRNA Expression wurde mithilfe der Realtime PCR (y-Achse) und der Proteingehalt mittels Western Blot (rechts) quantifiziert.

Zur Untersuchung des Einflusses der HMGA1 Überexpression wurden die Zellen nach der Transfektion mit HMGA1-GFP für 16 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert und danach für 10 Stunden mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA behandelt, wobei 30 Minuten mit Pioglitazon vorbehandelt wurde. Anschließend wurde das MMP-9 Transkriptionsniveau mittels Realtime-PCR quantifiziert. Die Abbildung 4.16 stellt den Einfluss der HMGA1 Überexpression auf die mRNA Expression des MMP-9 Gens unter Stimulation mit Pioglitazon/PMA dar.



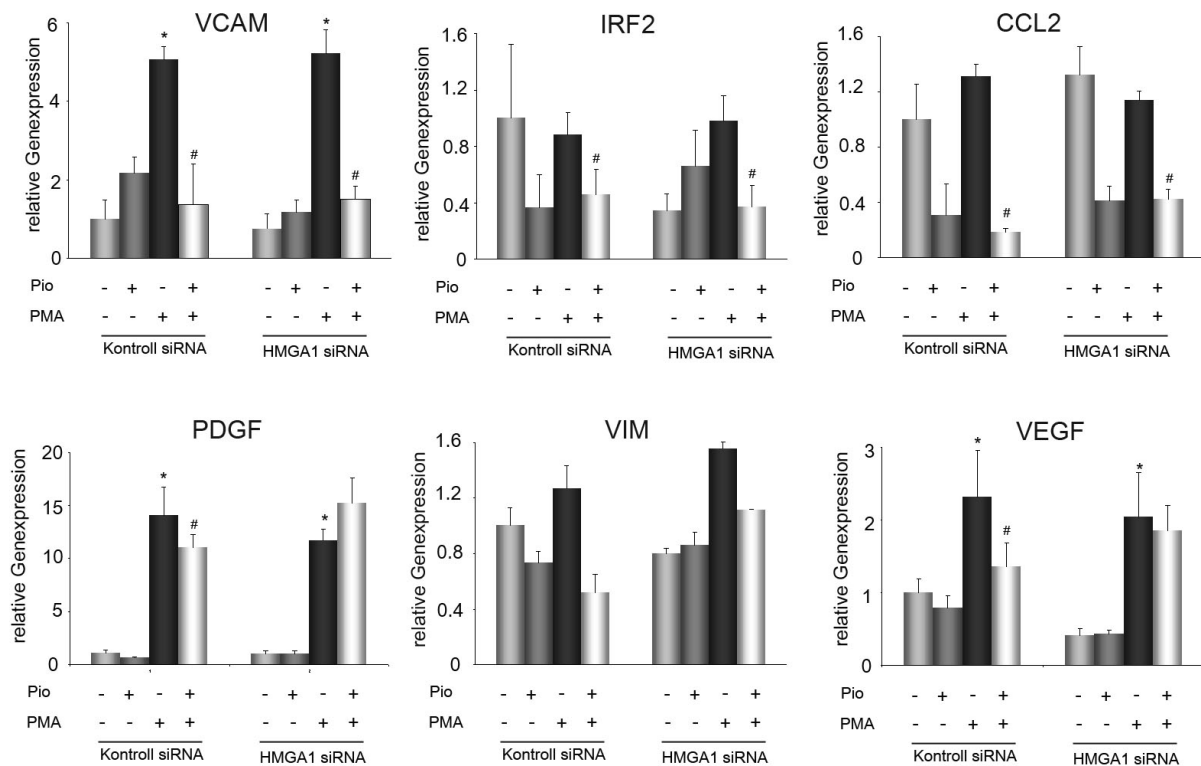
**Abbildung 4.16** MMP-9 mRNA Expression nach HMGA1 Überexpression

VSMCs wurden mit HMGA1-GFP transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA stimuliert (x-Achse). Die MMP-9 mRNA Expression wurde mit Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

Zunächst zeigt sich basal in den beiden Transfektionsansätzen Vehikel und HMGA1-Überexpression kein Unterschied. MMP-9 wurde schwach exprimiert. Die PMA-Stimulation führte in den beiden Ansätzen gleichermaßen zu einer ca. 40fach gesteigerten MMP-9 Expression. In den Vehikel-behandelten Zellen wurde eine signifikante Reduktion der MMP-9 Transkriptionsrate durch Pioglitazon detektiert. Darüber hinaus bewirkte in den mit HMGA1-überexprimierten Zellen die Pioglitazon-Stimulation eine verstärkte Reduktion der MMP-9 Expression. Diese Daten bestärken HMGA1 als neuen Koregulator der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression.

### 4.3.3 Bedeutung der HMGA1/PPAR $\gamma$ Interaktion auf andere NF $\kappa$ B-regulierte Gene

Zur Klärung der Fragestellung, inwieweit weitere NF $\kappa$ B-regulierte Gene in VSMCs, in Abhängigkeit von HMGA1 durch PPAR $\gamma$  inhibiert werden, wurden weitere Gene für proinflammatorische Mediatoren, die in die Pathogenese der Atherosklerose involviert sind und die ein putatives NF $\kappa$ B-Element in ihrer Promotorsequenz besitzen, untersucht. Die Abbildung 4.17 veranschaulicht das Expressionsniveau für das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (VCAM), den Interferon-regulierenden Faktor (IRF2), den Chemokin-Ligand (CCL2), den Wachstumsfaktor (PDGF), das Intermediärfilament Vimentin (VIM) und für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) nach siRNA-vermittelter HMGA1 Deletion und anschließender  $\pm$  Pioglitazon/PMA Stimulation.



**Abbildung 4.17** Expressionsniveau verschiedener NF $\kappa$ B-regulierter Gene nach HMGA1 Suppression

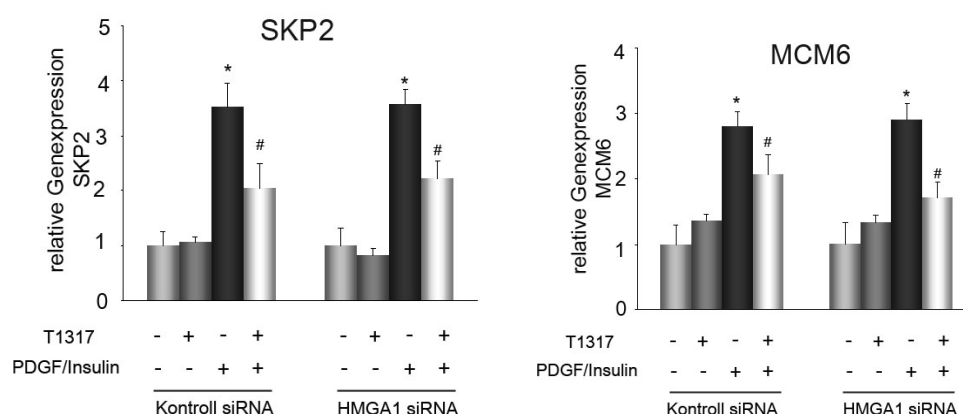
VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA stimuliert (x-Achse). Die mRNA Expression von VCAM, IRF2, CCL2, PDGF, VIM und VEGF wurde mithilfe der Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

Generell zeigten alle untersuchten Gene eine Induktion der Genexpression durch PMA-Stimulation. Des Weiteren war zu erkennen, dass die Gene VCAM, IRF2 und CCL2 trotz HMGA1-siRNA Transfektion weiterhin eine Reduktion der PMA-induzierten Erhöhung des Expressionsniveaus aufzeigen.

Dagegen wurde in den Genen PDGF, VIM und VEGF ähnlich wie ET-1 und MMP-9 durch die Suppression von HMGA1 keine verringerte Expression durch Pioglitazon-Stimulation erreicht. Die Untersuchung dieser NFκB-regulierten Gene bestätigt, dass einige Gene in Abhängigkeit von HMGA1 durch PPARγ-Aktivierung supprimiert werden können, jedoch veranschaulichen diese Daten auch, dass nicht alle NFκB-regulierten Gene inhibiert werden können. Dies impliziert nahezu, dass hier verschiedene Regulationsmechanismen Einfluss nehmen.

#### 4.3.4 Einfluss von HMGA1 ist PPARγ spezifisch

Der HMGA1-vermittelte Transrepressionsmechanismus von PPARγ zur inflammatorischen Genregulation in VSMCs ist möglicherweise auch für andere nukleäre Rezeptoren von Bedeutung. Daher wurde ermittelt, inwieweit der Kernrezeptor Leber X Rezeptor α (LXRα) in Abhängigkeit von HMGA1 anti-inflammatorische Genexpression in VSMCs reguliert. Die Arbeit von Blaschke und Kollegen zeigte zunächst die Expression von LXRα in VSMCs, und dass die LXRα-Aktivierung durch synthetische Liganden die mitogen-induzierte Zellproliferation hemmt (Blaschke et al., 2004). LXRα-Liganden konnten die Expression von S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2 (SKP2) und auch die Expression von Minichromosom Maintenance Protein 6 (MCM6), einem notwendigen Protein zur DNA-Replikation, inhibieren. In unseren Versuchen wurden VSMCs mit siRNA gegen HMGA1 transfiziert und für 16 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert, anschließend mit dem LXRα Liganden ±T1317 und den Wachstumsfaktoren ±PDGF/Insulin für 24 Stunden inkubiert. Nach der Ernte erfolgten RNA-Isolation und Ermittlung der SKP2 und MCM6 Expression, dargestellt in Abbildung 4.18.



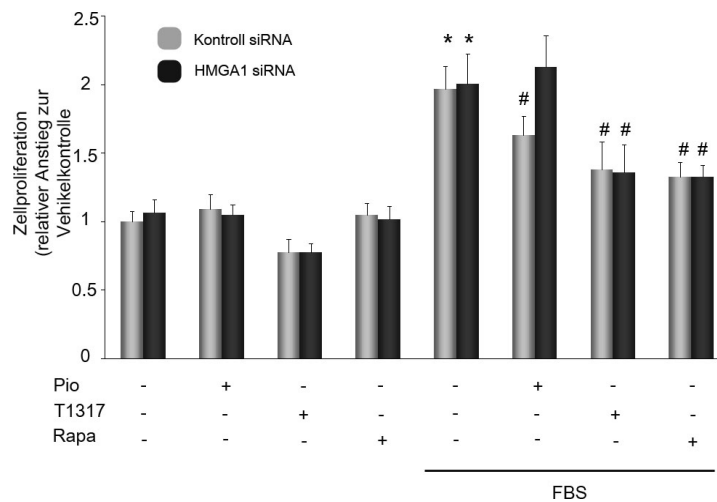
**Abbildung 4.18** SKP2 und MCM6 mRNA Expression nach HMGA1 Suppression

VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert und mit ± T1317 und ±PDGF/Insulin stimuliert (x-Achse). Die SKP2 und MCM6 mRNA Expression wurde mithilfe der Realtime PCR quantifiziert (y-Achse). (\*, p < 0.01 vs. Vehikel; #, p < 0.01 vs. PMA).



## Ergebnisse

Die basale Expression von SKP2 und MCM6 war sehr gering, konnte jedoch mit PDGF/Insulin signifikant erhöht werden. In den Kontroll-siRNA und den HMGA1-siRNA behandelten Zellen wurde eine deutliche Reduktion der SKP2 und MCM6 Transkriptionsrate mit dem LXR $\alpha$ -Liganden T1317 detektiert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass HMGA1 keinen Einfluss hat auf die LXR $\alpha$ -vermittelte Repression von SKP2 und MCM6 hat. Als weiterer Nachweis, dass der Einfluss von HMGA1 spezifisch für PPAR $\gamma$  ist wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Dafür wurden VSMCs mit siRNA gegen HMGA1 transfiziert und für 24 Stunden mit  $\pm 10\%$  FBS zur Induktion der Proliferation behandelt und dann zusätzlich für 48 Stunden mit Pioglitazon, mit dem LXR $\alpha$ -Liganden T1317 und Rapamycin (Rapa), einem mTOR Inhibitor der sowohl die Proliferation als auch die Migration von VMSCs inhibiert, inkubiert. Nach der Ernte erfolgte die Ermittlung der Zellproliferation mittels MTS Proliferationsassay (siehe Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.19** Proliferationsassay in VSMCs

VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert mit  $\pm 10\%$  FBS, nach 24h mit Pio, T1317 und Rapa inkubiert. Die Zellproliferation wurde als relativer Anstieg zur Vehikelkontrolle ermittelt (y-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. FBS/Vehikel).

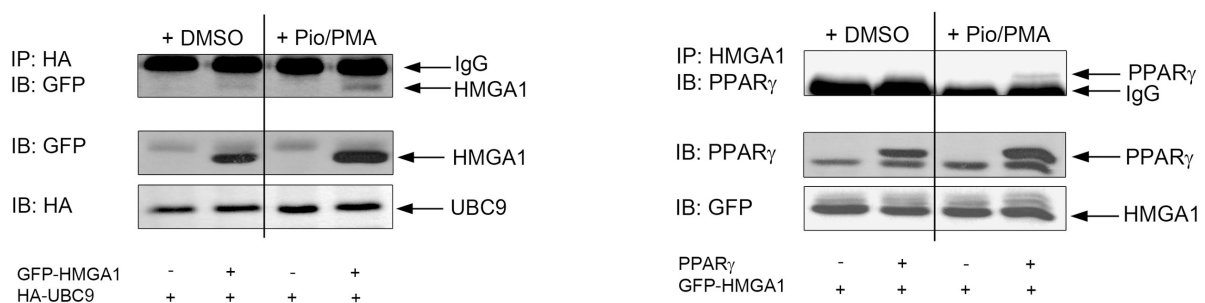
Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Proliferation in allen Ansätzen, die mit FBS behandelt worden sind. Weiterhin ist erkennbar, dass in den FBS/Pioglitazon-behandelten Zellen die Proliferation nach HMGA1 siRNA Transfektion nicht inhibiert wird. Dagegen gibt es in den Zellen die mit FBS/T1317 oder FBS/Rapamycin behandelt worden sind keine Unterschiede zwischen HMGA1- und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. In diesen Ansätzen zeigt die Abwesenheit von HMGA1 keinen Einfluss, d.h. beide Substanzen konnten die Proliferation auch in Abwesenheit von HMGA1 inhibieren. Infolgedessen ist der Einfluss von HMGA1 spezifisch für die PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression in VSMCs und hat ebenfalls Auswirkungen auf die antiproliferativen Eigenschaften von PPAR $\gamma$ -Liganden.

#### 4.4 Molekularer Mechanismus der HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten MMP-9 Transrepression in VSMCs

##### 4.4.1 Komplexbildung von HMGA1, Ubc9 und PPAR $\gamma$

Die Ligand-abhängige Transrepression ist ein bedeutender Mechanismus für die Inhibierung inflammatorischer Gene durch PPAR $\gamma$ . Die bisherigen Daten belegen, dass HMGA1 in die PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression involviert ist. Im Jahr 2005 konnten Pascual und Kollegen einen neuen molekularen Signalweg der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression identifizieren (Pascual et al., 2005). Dabei inhibiert PPAR $\gamma$  in Makrophagen den Promotor der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) durch die SUMO E2 Ligase Ubc9-abhängige PPAR $\gamma$  Sumoylierung und durch die Aufrechterhaltung der Korepressorbindung zum iNOS Promotor. Ubc9, die geschwindigkeitsbestimmende Sumo E2 Ligase wurde auch als HMGA1 interagierendes Protein identifiziert (Li et al., 2007).

Aufgrund dieser Daten sollte nun in den folgenden Versuchsansätzen eine Beteiligung der Ubc9-Sumoylierung an der HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten MMP-9 Regulation untersucht werden. Dafür wurden zunächst Interaktionsstudien mittels Co-Immunopräzipitation zwischen den beteiligten Kofaktoren HMGA1, Ubc9 und PPAR $\gamma$  durchgeführt. HeLa Zellen wurden jeweils mit den Konstrukten Ubc9  $\pm$  HMGA1 und HMGA1  $\pm$  PPAR $\gamma$  transfiziert und dann für 24 Stunden mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA behandelt. Nach der Zellernte wurden die Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. Abbildung 4.20 stellt die Co-Immunopräzipitationen von HMGA1 und Ubc9 sowie PPAR $\gamma$  und HMGA1 in An- und Abwesenheit von Pioglitazon/PMA dar.



**Abbildung 4.20** Co-Immunopräzipitation von HMGA1 mit Ubc9 und PPAR $\gamma$  mit HMGA1

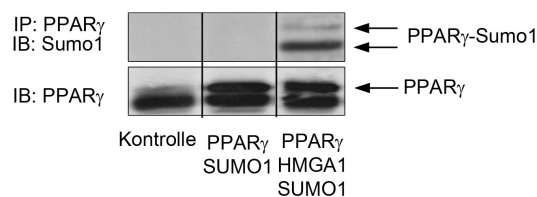
HeLa Zellen wurden jeweils mit den Konstrukten Ubc9  $\pm$  HMGA1 und HMGA1  $\pm$  PPAR $\gamma$  transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt anschließend erfolgte die Co-Immunopräzipitation und das Resultat wurde mittels Western Blot quantifiziert. (IP- Immunopräzipitation, IB-Immunblot)

## Ergebnisse

Die Abbildung 4.20 veranschaulicht auf der linken Seite das Ergebnis der Co-Immunopräzipitation von HMGA1 und Ubc9. Hierbei erkennt man, dass Ubc9 in allen Ansätzen (unteres Feld) und dass HMGA1 in den transfizierten Ansätzen detektierbar war (mittleres Feld). Das obere Feld zeigt die Co-Immunopräzipitation zwischen HMGA1 und Ubc9. Hierbei erkennt man basal lediglich eine schwache Interaktion, wohingegen diese Interaktion in Anwesenheit von Pioglitazon/PMA verstärkt werden konnte. D.h. in Anwesenheit des PPAR $\gamma$  Liganden Pioglitazon bilden HMGA1 und Ubc9 einen Komplex. Rechts in der Abbildung 4.20 ist die Co-Immunopräzipitation von PPAR $\gamma$  und HMGA1 dargestellt. Zunächst erkennt man, dass HMGA1 in allen Ansätzen (unteres Feld) und dass PPAR $\gamma$  in den transfizierten Ansätzen detektierbar war (mittleres Feld). Das obere Feld stellt nun die Co-Immunopräzipitation zwischen HMGA1 und PPAR $\gamma$ . Basal ist hier keine Interaktion erkennbar, aber nach Stimulation mit Pioglitazon/PMA ist eine Bindung zwischen PPAR $\gamma$  und HMGA1 detektierbar. Auch hier konnte also gezeigt werden, dass in Anwesenheit des Liganden eine Komplexbildung erfolgt. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass PPAR $\gamma$  nach Aktivierung durch seinen Liganden einen Komplex mit HMGA1 und Ubc9 bildet.

### 4.4.2 Sumoylierung von PPAR $\gamma$

Ergänzend zu den Interaktionsstudien sollte die PPAR $\gamma$  Sumoylierung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HeLa Zellen mit den Konstrukten SUMO1, PPAR $\gamma$  und  $\pm$  HMGA1 über Nacht transient transfiziert und dann mit Pioglitazon für 24 Stunden stimuliert. Nach der Zellernte erfolgte die Co-Immunopräzipitation mit einem PPAR $\gamma$ -Antikörper und anschließend wurden die Ergebnisse mittels Western Blot mit einem SUMO1-Antikörper quantifiziert. Die Abbildung 4.21 zeigt die Co-Immunopräzipitation von PPAR $\gamma$  und SUMO1 in An- und Abwesenheit von HMGA1.



**Abbildung 4.21** Co-Immunopräzipitation von PPAR $\gamma$  mit SUMO1

HeLa Zellen wurden mit den Konstrukten PPAR $\gamma$  SUMO1 und  $\pm$  HMGA1 transfiziert, anschließend erfolgte die Co-Immunopräzipitation und das Resultat wurde mittels Western Blot quantifiziert. (IP-Immunopräzipitation, IB-Immunblot)

Die Abbildung 4.21 veranschaulicht in der unteren Hälfte das Ergebnis des Western Blots mit dem PPAR $\gamma$ -Antikörper. Hierbei zeigt sich deutlich, dass im Kontrollansatz wenig bis kein PPAR $\gamma$  detektierbar war, dahingegen in den beiden transfizierten Ansätzen PPAR $\gamma$  nachgewiesen werden konnte.

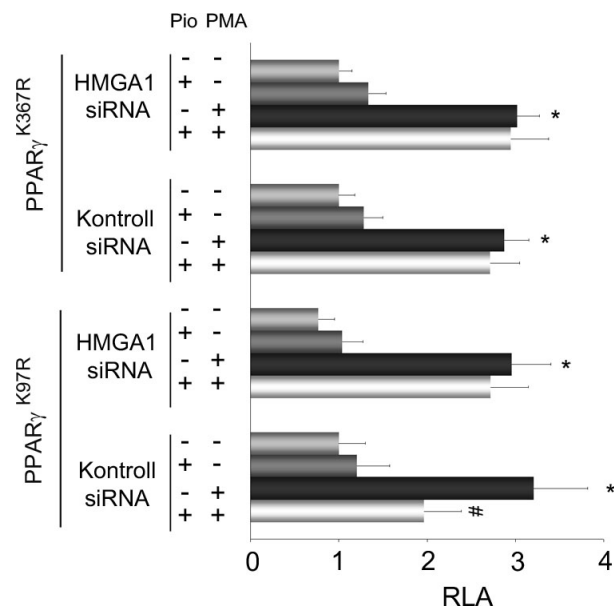
In der oberen Hälfte der Abbildung ist die Co-Immunopräzipitation gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass nur in dem Zellansatz, der mit allen drei Konstrukten transfiziert worden ist zwei Banden detektierbar waren. Die untere, stärkere Bande zeigt PPAR $\gamma$  und die obere, schwächere Bande zeigt sumoyliertes PPAR $\gamma$ . Diese Daten zeigen somit, dass eine PPAR $\gamma$  Sumoylierung nur in Anwesenheit von HMGA1 stattfindet.

### 4.4.3 PPAR $\gamma$ Sumoylierung erfolgt am Lysinrest K367

Frühere Arbeiten zeigten, dass die Sumoylierung der PPAR $\gamma$  Ligandbindungsdomäne am Lysinrest K367 verantwortlich ist für die Transrepression des iNOS Promotors (Pascual et al., 2005), wohingegen die Sumoylierung des Lysinrestes K97 innerhalb der AF1-Domäne von PPAR $\gamma$  in die Genaktivierung involviert ist (Floyd and Stephens, 2004; Ohshima et al., 2004). Um die Relevanz dieser beiden PPAR $\gamma$  Sumoylierungsstellen für den HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepressionsmechanismus zu ermitteln, wurden zwei verschiedene PPAR $\gamma$  Konstrukte mit mutierten Sumoylierungsstellen verwendet. Zum einen das Konstrukt PPAR $\gamma^{K367R}$  mit mutierter Sumoylierungsstelle an Position 367, wobei der Lysinrest durch Arginin ausgetauscht wurde und zum anderen das Konstrukt PPAR $\gamma^{K97R}$  mit mutierter Sumoylierungsstelle an Position 97, wobei hier ebenfalls der Lysinrest durch Arginin ausgetauscht wurde. Die Bedeutung dieser Sumoylierungsstellen sollte mithilfe von MMP-9 Promotoranalysen erbracht werden.

Dafür wurden HEK293 Zellen mit den Konstrukten MMP-9 Promotorkonstrukt -670/+54, Renilla, RXR $\alpha$  sowie PPAR $\gamma^{K367R}$  oder PPAR $\gamma^{K97R}$  transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit HMGA1 siRNA transfiziert und über Nacht in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert und danach für 24 Stunden mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA behandelt, wobei hier ebenfalls 30 Minuten mit Pioglitazon vorbehandelt wurde. Die Promotoraktivität wurde nach der Zellernte als relative Luziferaseaktivität (RLA) ermittelt. Die Abbildung 4.22 zeigt nun den Einfluss der verwendeten PPAR $\gamma$  Konstrukte mit den mutierten Sumoylierungsstellen auf die Promotoraktivität des humanen MMP-9 Promotors in An- und Abwesenheit von HMGA1. Auch in diesem Versuchsansatz konnte lediglich basal eine schwache Promotoraktivität detektiert werden. Dagegen führte die Stimulation mit PMA in allen Ansätzen zum signifikanten Anstieg der Promotoraktivität.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.22** MMP-9 Promotoraktivität unter Verwendung von PPAR $\gamma$  Konstrukten mit mutierten Sumoylierungsstellen

HEK293 Zellen wurden mit MMP-9 Promotorkonstrukt -670/+54, Renilla, RXR $\alpha$  sowie PPAR $\gamma$ <sup>K367R</sup> oder PPAR $\gamma$ <sup>K97R</sup> transfiziert, anschließend wurde mit HMGA1 siRNA transfiziert und danach für 24 h mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt (y-Achse). Die Promotoraktivität ist als mittlere RLA aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt (x-Achse). (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA).

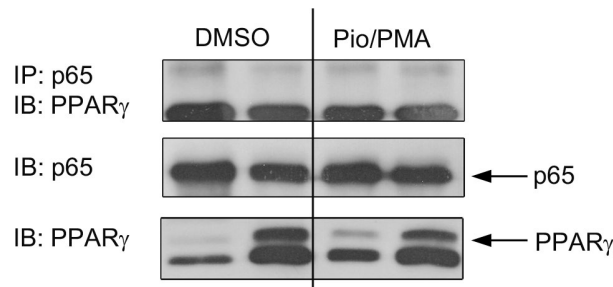
In den Ansätzen, in denen das Konstrukt PPAR $\gamma$ <sup>K97R</sup> transfiziert wurde, konnte der PMA-Effekt in den Kontroll-siRNA transfizierten HEK293 Zellen mit Pioglitazon inhibiert werden und das Fehlen von HMGA1 (siRNA) führte zur Aufhebung der Pioglitazon-vermittelten Inhibierung. Dagegen konnte in den Ansätzen, zwar die PMA-Stimulation dokumentiert werden, jedoch war die Inhibierung der PMA-induzierten MMP-9 Promotoraktivität aufgehoben. Die Manipulation von HMGA1 durch siRNA hatte in diesem Ansatz keine Wirkung mehr. Diese Daten weisen daraufhin, dass die Position K367 entscheidend ist für die Glitazon-vermittelten Effekte von PPAR $\gamma$  und HMGA1 auf die MMP-9 Promotoraktivität.

#### 4.4.4 Keine physikalische Interaktion zwischen NF $\kappa$ B Untereinheit p65 und PPAR $\gamma$

Die Arbeiten von (Delerive et al., 1999) Delerive und Kollegen beschreiben einen Ligand-abhängigen Transrepressionsmechanismus in VSMCs für PPAR $\alpha$  (Delerive et al., 1999). Dabei vermittelt PPAR $\alpha$  die Inhibierung der NF $\kappa$ B-abhängigen Interleukin-6 Promotoraktivierung, durch eine Interaktion von PPAR $\alpha$  mit c-Jun/p65 Komplexen. Zur Klärung der Fragestellung, ob nun PPAR $\gamma$  und p65 auch durch physikalische Interaktion in die Transrepression von MMP-9 involviert sind, wurde Co-Immunopräzipitation mit p65  $\pm$  PPAR $\gamma$  durchgeführt. HeLa Zellen

## Ergebnisse

wurden über Nacht mit den Konstrukten p65  $\pm$  PPAR $\gamma$  transfiziert und anschließend für 24 Stunden mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA behandelt. Nach der Zellernte wurden die Co-Immunopräzipitationen mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 4.23 stellt die Co-Immunopräzipitation von p65 und PPAR $\gamma$  in An- und Abwesenheit von  $\pm$  Pioglitazon/PMA dar.



**Abbildung 4.23** Co-Immunopräzipitation von PPAR $\gamma$  mit p65

HeLa Zellen wurden mit den Konstrukten p65  $\pm$  PPAR $\gamma$  transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt anschließend erfolgte die Co-Immunopräzipitation und das Resultat wurde mittels Western Blot quantifiziert. (IP- Immunopräzipitation, IB-Immunblot)

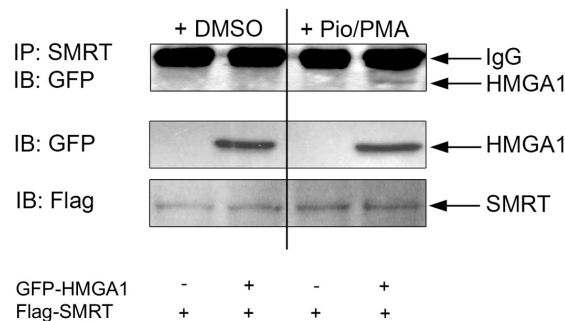
Hier zeigte sich in den Kontrollen, dass p65 in allen Ansätzen detektierbar war (mittleres Feld) und dass PPAR $\gamma$  ebenfalls in den transfizierten Ansätzen detektierbar war (unteres Feld). Zwischen den beiden Proteinen konnte allerdings sowohl basal als auch nach  $\pm$  Pioglitazon/PMA Stimulation keinerlei Interaktion sichtbar gemacht werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die p65 Untereinheit von NF $\kappa$ B und PPAR $\gamma$  nicht miteinander interagieren.

### 4.4.5 Interaktion von HMGA1 und Korepressor SMRT

Es ist bekannt, dass SMRT Korepressorkomplexe die NF $\kappa$ B Transaktivierung inhibieren können. (Lee et al., 2000; Hoberg et al., 2004; Ma et al., 2004). Dieser Mechanismus könnte auch für die PMA-induzierte MMP9-Transkription von Bedeutung sein. Aus der Literatur ist zusätzlich bekannt, dass PPAR $\gamma$  und SMRT miteinander interagieren können (Nofsinger et al., 2008). Die Hypothese, ob HMGA1 und SMRT miteinander interagieren, wurde daher mittels einer Co-Immunopräzipitation mit SMRT  $\pm$  HMGA1 überprüft. 16 Stunden nach der Transfektion mit SMRT  $\pm$  HMGA1 wurden die HeLa Zellen für 24 Stunden mit  $\pm$  Pioglitazon/PMA behandelt. Die nachfolgende Abbildung 4.24 stellt die Co-Immunopräzipitationen von HMGA1 und SMRT dar. Hierbei erkennt man zunächst in den Kontrollen, dass SMRT in allen Ansätzen (unteres

## Ergebnisse

Feld) und HMGA1 in den transfizierten Ansätzen detektierbar war (mittleres Feld). Das obere Feld zeigt die Co-Immunopräzipitation zwischen HMGA1 und SMRT.



**Abbildung 4.24** Co-Immunopräzipitation von SMRT mit HMGA1

HeLa Zellen wurden mit den Konstrukten SMRT  $\pm$  HMGA1 transfiziert und mit  $\pm$  Pio/PMA behandelt anschließend erfolgte die Co-Immunopräzipitation und das Resultat wurde mittels Western Blot quantifiziert. (IP- Immunopräzipitation, IB-Immunblot)

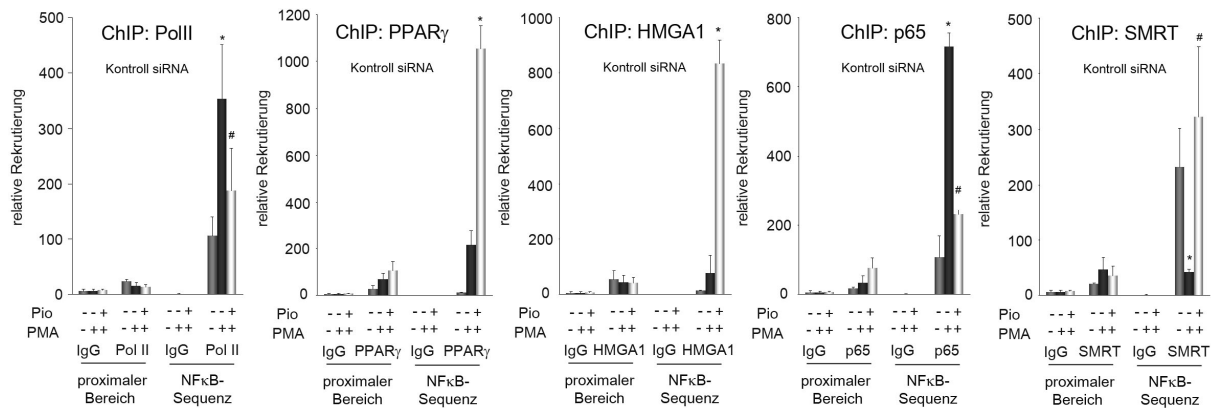
Hierbei erkennt man unter basalen Bedingungen lediglich eine schwache Interaktion, wohingegen diese Interaktion in Anwesenheit von Pioglitazon/PMA verstärkt werden konnte. In Anwesenheit des PPAR $\gamma$ -Liganden Pioglitazon bilden HMGA1 und SMRT einen Komplex.

### 4.4.6 Kofaktorrekutierung zum MMP-9 Promotor

Um den genauen molekularen Mechanismus der Liganden-abhängigen Transrepression von MMP-9 zu bestimmen wurden Chromatin Immunopräzipitationen (ChIP) Experimente in VSMCs durchgeführt. Es wurden die Rekrutierung der Kofaktoren RNA Polymerase II (PolII), einer wichtigen Komponente des Transkriptionsapparates, PPAR $\gamma$  und HMGA1, die NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 sowie der Korepressor SMRT untersucht.

VSMCs wurden vor der Stimulation zunächst mit Kontroll-siRNA transfiziert, für 36 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert, 30 Minuten mit Pioglitazon vorbehandelt und anschließend für eineinhalb Stunden selektiv mit den Komponenten PMA  $\pm$  Pioglitazon inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die DNA-Protein-Komplexe fragmentiert. Die Immunopräzipitationen mit den entsprechenden Antikörpern wurden über Nacht durchgeführt und nach Aufreinigung der Proben erfolgte die Promotoranalyse mittels Realtime-PCR. Die Abbildung 4.25 veranschaulicht die relative Anreicherung der Kofaktoren PolII, PPAR $\gamma$ , HMGA1, p65 und SMRT zum MMP-9 Promotor.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.25** Chromatin Immunopräzipitation

VSMCs wurden mit Kontroll-siRNA transfiziert, mit Pio/PMA behandelt, anschließend erfolgte ChIP. Dargestellt ist die relative Rekrutierung mittels der Realtime-PCR aus 3 unabhängigen Versuchen (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA). (ChIP- Chromatin Immunopräzipitation, IgG- Immunglobulin G)

Alle Chromatin Immunopräzipitationsergebnisse zeigen im linken Teil als Negativkontrolle die Kofaktorrekutierung zu einem MMP-9 Promotorbereich außerhalb der NFκB-Sequenz (jeweils als proximaler Bereich dargestellt) und im rechten Teil die Kofaktorrekutierung zum MMP-9 Promotorbereich mit der NFκB-Sequenz. Des Weiteren diente der Immunglobulin G (IgG)-Antikörper als Negativkontrolle für die Immunopräzipitation und ist hier ebenfalls für beide Promotorbereiche dargestellt.

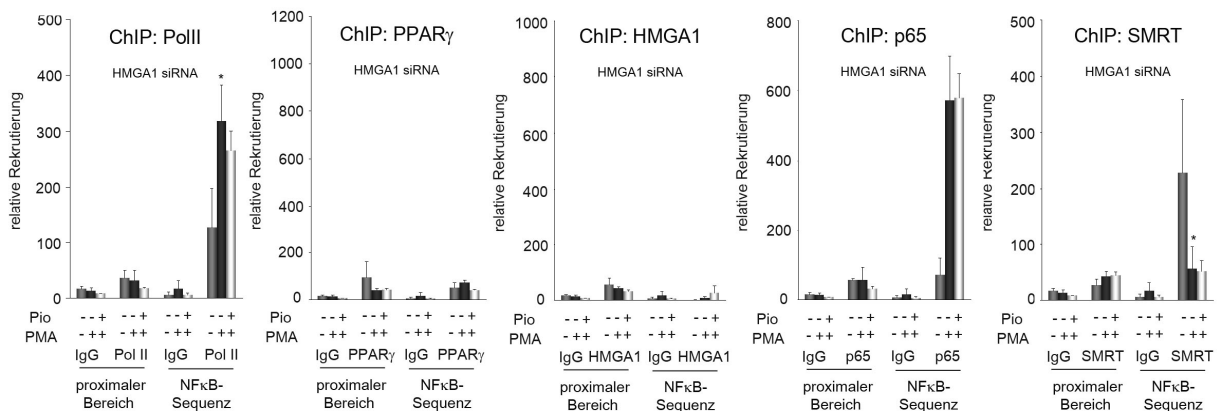
Für die Untersuchung des MMP-9 Promotor ergab sich in Abwesenheit von HMGA1 unter basalen Bedingungen keinerlei Veränderungen, dass bedeutet der Korepressor SMRT war an den MMP-9 Promotor gebunden. Hier zeigt sich also ebenfalls keine MMP-9 Promotoraktivität. Ebenso gab es kein verändertes Rekrutierungsverhalten nach Induktion der MMP-9 Transkription durch PMA Behandlung in Abwesenheit von HMGA1. Es kam zur Rekrutierung von RNA Polymerase II, p65 und einem gleichzeitigen Verlust der SMRT Bindung. Das bedeutet, dass auch in Abwesenheit von HMGA1 die PMA-Stimulation durch Rekrutierung von RNA Polymerase II und p65 sowie die Entfernung der SMRT-Bindung zur MMP-9 Promotoraktivierung führt. Aber in den Zellen, die in Abwesenheit von HMGA1 mit Pioglitazon/PMA behandelt wurden, zeigte sich ein anderes Rekrutierungsmuster. Die Bindung der PolII wurde nicht aufgehoben, PPARγ und auch HMGA1 konnten nicht zum MMP-9 Promotor rekrutiert werden, p65 blieb weiterhin mit dem MMP-9 Promotor assoziiert und der Korepressor wurde nicht gebunden. Demzufolge zeigt sich hier das gleiche Bindungsverhalten wie nach PMA-Stimulation, das bedeutet die Aktivierung von PPARγ durch den Liganden Pioglitazon hat in Abwesenheit von HMGA1 keinerlei Einfluss auf das Bindungsverhalten



transkriptionsregulierender Faktoren. Das bedeutet, dass nach Ligandenstimulation in Abwesenheit von HMGA1 die MMP-9 Promotoraktivität nicht blockiert werden konnte.

#### 4.4.7 Rolle von HMGA1 für die PPAR $\gamma$ -Rekrutierung zum MMP-9 Promotor

Zur Ermittlung der genaueren Funktion und Wirkungsweise von HMGA1 für die PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression von MMP-9 wurde die HMGA1 Expression in VSMCs mittels RNA-Interferenz gezielt unterdrückt und anschließend wurden Chromatin Immunopräzipitationen Experimente durchgeführt. Es wurde wiederum die Rekrutierung der genannten Kofaktoren untersucht. VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert, für 36 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Medium kultiviert, 30 Minuten mit Pioglitazon vorbehandelt und anschließend für eineinhalb Stunden selektiv mit den Komponenten PMA  $\pm$  Pioglitazon inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend aufgearbeitet und die Promotoranalyse durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 4.26 veranschaulicht nun die Ergebnisse der Chromatin Immunopräzipitation in Abwesenheit von HMGA1.



**Abbildung 4.26** Chromatin Immunopräzipitation

VSMCs wurden mit HMGA1-siRNA transfiziert, mit Pio/PMA behandelt, anschließend erfolgte ChIP. Dargestellt ist die relative Rekrutierung mittels der Realtime-PCR aus 3 unabhängigen Versuchen (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel #,  $p < 0.01$  vs. PMA). (ChIP- Chromatin Immunopräzipitation, IgG- Immunglobulin G)

Für die Untersuchung des MMP-9 Promotor ergab sich in Abwesenheit von HMGA1 unter basalen Bedingungen keinerlei Veränderungen, das bedeutet der Korepressor SMRT war an den MMP-9 Promotor gebunden. Hier zeigt sich also ebenfalls keine MMP-9 Promotoraktivität. Ebenso gab es kein verändertes Rekrutierungsverhalten nach Induktion der MMP-9 Transkription durch PMA Behandlung in Abwesenheit von HMGA1.

Es kam zur Rekrutierung von RNA Polymerase II, p65 und einem gleichzeitigen Verlust der SMRT Bindung. Das bedeutet, dass auch in Abwesenheit von HMGA1 die PMA-Stimulation

durch Rekrutierung von RNA Polymerase II und p65 sowie die Entfernung der SMRT-Bindung zur MMP-9 Promotoraktivierung führt. Aber in den Zellen, die in Abwesenheit von HMGA1 mit Pioglitazon/PMA behandelt wurden, zeigte sich ein anderes Rekrutierungsmuster.

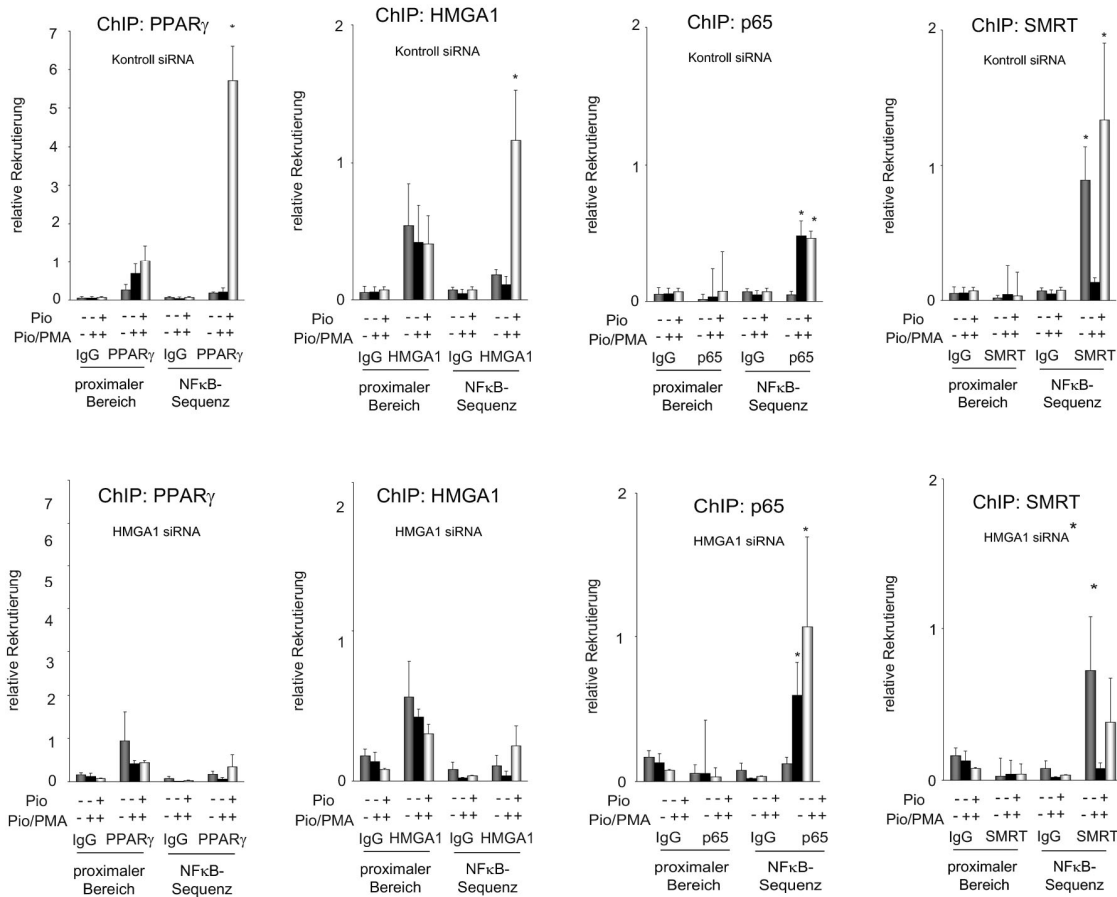
Die Bindung der PolIII wurde nicht aufgehoben, PPAR $\gamma$  und auch HMGA1 konnten nicht zum MMP-9 Promotor rekrutiert werden, p65 blieb weiterhin mit dem MMP-9 Promotor assoziiert und der Korepressor wurde nicht gebunden. Demzufolge zeigt sich hier das gleiche Bindungsverhalten wie nach PMA-Stimulation, das bedeutet die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch den Liganden Pioglitazon hat in Abwesenheit von HMGA1 keinerlei Einfluss auf das Bindungsverhalten transkriptionsregulierender Faktoren. Das bedeutet, dass nach Ligandenstimulation in Abwesenheit von HMGA1 die MMP-9 Promotoraktivität nicht blockiert werden konnte.

#### 4.4.8 Kofaktorrekutierung zu den NF $\kappa$ B-regulierten Promotoren PDGF und VCAM

Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass eine Ligand-abhängige Komplexbildung von HMGA1, PPAR $\gamma$  und Ubc-9 die Ligand-vermittelte PPAR $\gamma$  Sumoylierung vereinfacht und somit die Korepressorbindung am MMP-9 Promotor aufrechterhält. Möglicherweise ist dieser Mechanismus auch für weitere NF $\kappa$ B-regulierte Gene von Bedeutung. Deshalb wurden die Promotoranalysen für zwei weitere Gene durchgeführt. Zum einen wurde die Rekrutierung von PPAR $\gamma$ , HMGA1, p65 und SMRT zum PDGF Promotor und zum anderen zum VCAM Promotor in An- und Abwesenheit von HMGA1 ermittelt (siehe Abbildungen 4.27 und 4.28).

In Übereinstimmung mit den PDGF mRNA Expressionsdaten zeigte sich hier ein ähnliches Bindungsverhalten für PPAR $\gamma$ , HMGA1 und SMRT zum PDGF Promotor wie zum MMP-9 Promotor. Einzige Ausnahme hierbei ist die reduzierte p65 Bindung zum MMP-9 Promotor nach Pioglitazon-Behandlung in Anwesenheit von HMGA1. Für den PDGF Promotor konnte hier keine verminderte p65 Bindung nach Stimulation durch Pioglitazon/PMA in Anwesenheit von HMGA1 festgestellt werden. Die Promotorregulation in Abwesenheit von HMGA1 ist ebenfalls sehr ähnlich. Einziger Unterschied ist, dass die SMRT Bindung nach Pioglitazon/PMA Stimulation in Abwesenheit von HMGA1 nicht komplett inhibiert sondern nur vermindert wurde.

PDGF promotor

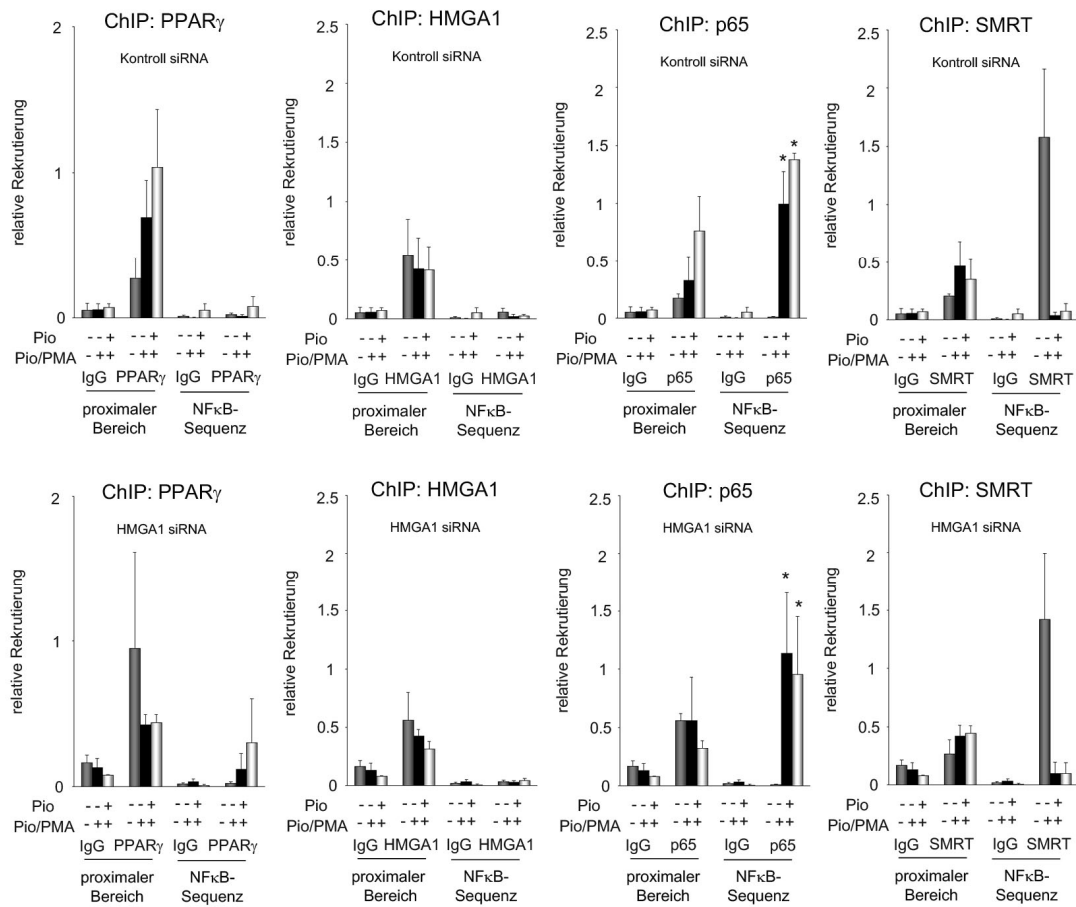


**Abbildung 4.27 Chromatin Immunopräzipitation**

VSMCs wurden mit Kontroll-/HMGA1-siRNA transfiziert, mit Pio/PMA behandelt, dann erfolgte ChIP. Dargestellt ist die relative Rekrutierung mittels der Realtime-PCR aus 3 unabhängigen Versuchen (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA). (ChIP- Chromatin Immunopräzipitation, IgG- Immunglobulin G)

Für den VCAM Promotor zeigt sich ein komplett anderes Bindungsverhalten. Die VCAM mRNA Expressionsdaten zeigten zwar ein PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression, allerdings war diese im Gegensatz zu PDGF nicht von HMGA1 abhängig. Die VCAM Promotoranalyse zeigt, dass es zu keiner Rekrutierung von PPAR $\gamma$ , HMGA1 oder SMRT nach Pioglitazon/PMA Stimulation kommt. Es wurde lediglich eine p65 Rekrutierung nach PMA und Pioglitazon/PMA Stimulation zum VCAM- Promotor detektiert und basal konnte eine SMRT Bindung ermittelt werden. Diese Daten weisen daraufhin, dass es sich hier um einen anderen Mechanismus zur Inhibierung der Gentranskription handelt. Die PPAR $\gamma$ -abhängige Inhibierung von NF $\kappa$ B-regulierten Genen erfolgt somit auch unabhängig von HMGA1 und deutet auf eine mögliche promotorspezifische Genregulation hin.

## VCAM promoter



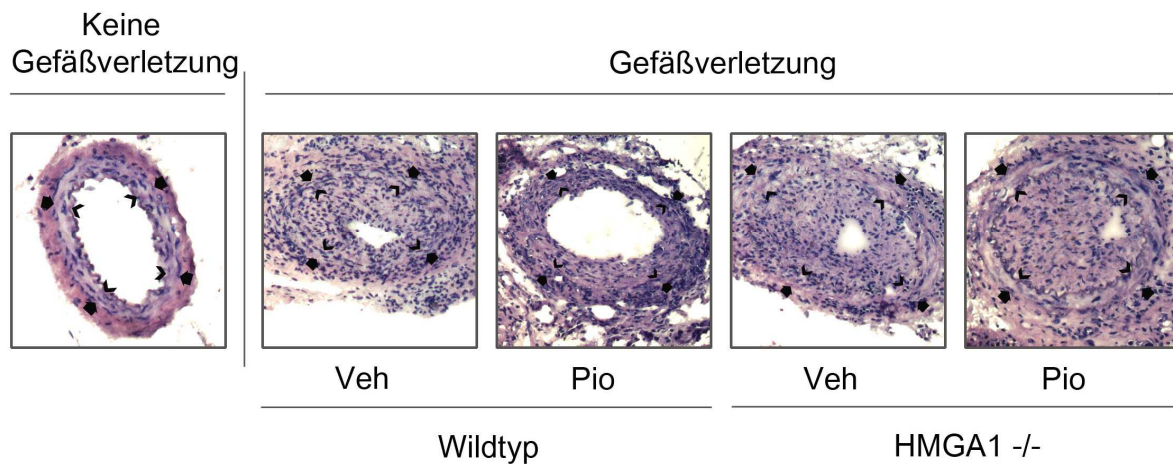
**Abbildung 4.28** Chromatin Immunopräzipitation

VSMCs wurden mit Kontroll-/HMGA1-siRNA transfiziert, mit PiO/PMA behandelt, dann erfolgte ChIP. Dargestellt ist die relative Rekrutierung mittels der Realtime-PCR aus 3 unabhängigen Versuchen (\*,  $p < 0.01$  vs. Vehikel; #,  $p < 0.01$  vs. PMA). (ChIP- Chromatin Immunopräzipitation, IgG- Immunglobulin G)

#### 4.5 Relevanz der HMGA1/PPAR $\gamma$ Interaktionen auf die gefäßschützenden Funktionen von PPAR $\gamma$ im Tiermodell

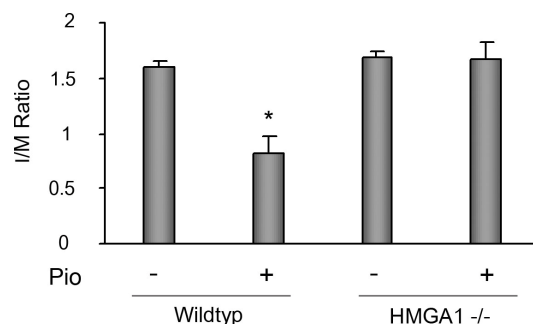
##### 4.5.1 Neointimabildung nach Dilatation der A. femoralis und Pioglitazon-Behandlung in Wildtyp- und HMGA1 $^{-/-}$ Mäusen

Zahlreiche wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass Glitazon-vermittelte PPAR $\gamma$ -Aktivierung die inflammatorische Genexpression in Gefäßmuskelzellen regulieren kann und somit die Entstehung von artherosklerotischen Läsionen in Mausmodellen für Atherosklerose inhibiert. Daher wurde in diesem Tiermodell die Bedeutung der HMGA1/PPAR $\gamma$  Interaktion für PPAR $\gamma$ -abhängige gefäßschützende Funktionen untersucht.



**Abbildung 4.29** Histologischer Vergleich der Neointimabildung in der A. femoralis

Hämatoxylin- und Eosin-Färbung einer nicht dilatierten Femoralarterie (links) und von dilatierten Femoralarterien von Wildtyp und HMGA1-defizienten Mäusen (HMGA1 $^{-/-}$ ), die mit  $\pm$  Pio behandelt worden sind. Repräsentative Gefäßquerschnitte sind abgebildet, offene Pfeilspitzen zeigen die Membrana elastica interna, geschlossene Pfeilspitzen zeigen die Membrana elastica externa.



**Abbildung 4.30** I/M Ratio der A. femoralis

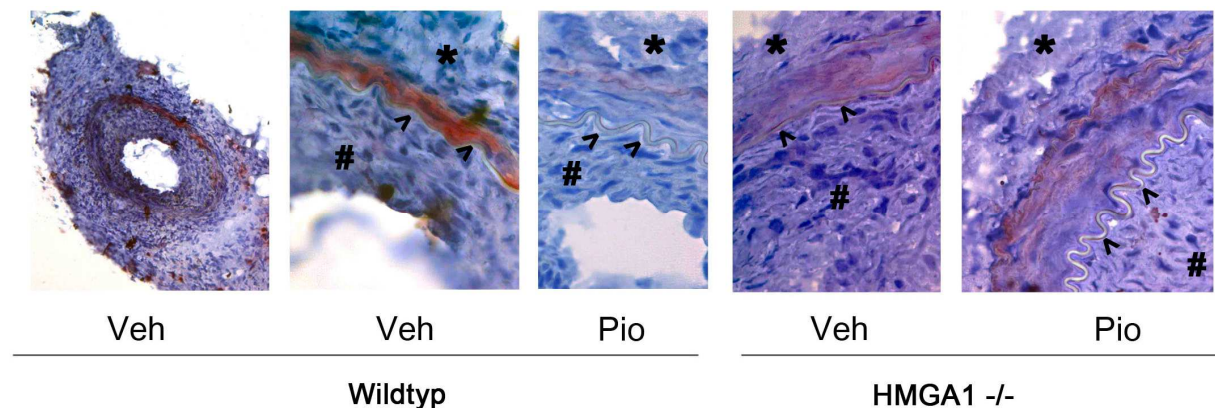
Intima/Media (I/M) Ratio 21 Tage nach der Gefäßdilatation für Wildtyp und HMGA1 $^{-/-}$  Mäuse, die mit  $\pm$  Pio behandelt worden sind (n=5 pro Gruppe) (\*, p < 0.01 vs. Wildtyp/Vehikel)

Dazu wurden C57BL/6/129SBJ Wildtyp-Mäuse und HMGA1-defiziente Mäuse 5 Tage mit Pioglitazon (10 mg/kg/d) oder Vehikel (0.9% NaCl) vorbehandelt, anschließend die A. femoralis durch Dilatation verletzt, wie im Methodenteil beschrieben, und nach 21 Tagen Weiterbehandlung mit  $\pm$  Pioglitazon die Femoralarterie entnommen. Die Abbildung 4.29 zeigt Hämatoxylin- und Eosin-gefärbte Gefäßquerschnitte der A. femoralis von Wildtyp-Mäusen und HMGA1-defiziente Mäusen und in Abbildung 4.30 ist die Neointima/Media Ratio kalkuliert.

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollgefäßen zeigte sich, dass die Dilatation der A. femoralis der Wildtyp als auch der HMGA1-defizienten Mäuse der Vehikelgruppe zu einer starken Neointimabildung führt. Die Behandlung mit Pioglitazon führte in den Wildtyptieren zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung, wohingegen die Glitazon-Behandlung in den HMGA1-defizienten Mäusen keinen Einfluss auf die Neointimaausbildung zeigte. Hier erkennt man weiterhin eine prominente Neointimaausbildung. Diese *in vivo*-Daten zeigen, dass der Pioglitazon-vermittelte Gefäßschutz die Anwesenheit von HMGA1 verlangt.

#### 4.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von MMP-9

MMP-9 ist nach einer Gefäßverletzung immunhistochemisch nachweisbar ((Godin et al., 2000; Li et al., 2011). Daher wurde als nächstes die immunhistochemische Färbung gegen MMP-9 in der A. femoralis von Wildtyp-Mäusen und HMGA1-defizienten Mäusen 21 Tage nach Gefäßdilataion durchgeführt (Abbildung 4.31).



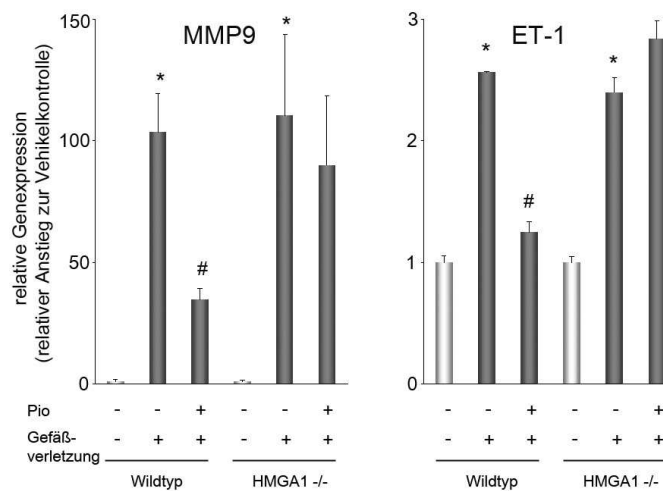
**Abbildung 4.31** Immunhistochemische Färbung gegen MMP-9

MMP-9 Färbung einer nicht dilatierten Femoralarterie (links) und von dilatierten Femoralarterien von Wildtyp und HMGA1-/- Mäusen, die mit  $\pm$  Pio behandelt worden sind. Repräsentative Gefäßquerschnitte sind abgebildet, offene Pfeilspitzen zeigen die Membrana elastica interna, Sterne kennzeichnen die Tunica adventitia, Doppelkreuze zeigen die Tunica intima

Es zeigte sich im Wesentlichen eine starke MMP-9 Färbung in der Tunica media angrenzend zur Membrana elastica interna der dilatierten Femoralarterien bei schwacher Anfärbung in der Gefäßintima. Weiterhin zeigte sich, dass in den Wildtyptieren, die mit Pioglitazon behandelt wurden, die Färbung deutlich abgeschwächt war, wohingegen in den HMGA1-defizienten Mäusen kein Unterschied in der MMP-9 Färbung zu erkennen war.

#### 4.5.3 MMP-9 und ET-1 Expressionsniveau in der A. femoralis

Zusätzlich zu den *in vivo*-MMP-9 Färbungen und den *in vitro*-mRNA Expressionsdaten in den VSMCs wurde die Expression von MMP-9 und von dem Vasokonstriktor Endothelin-1 (ET-1) in der A. femoralis 21 Tage nach Dilatation mittels Realtime-PCR quantifiziert (Abbildung 4.32).



**Abbildung 4.32** MMP-9 und ET-1 Expressionsniveau in der A. femoralis

Die Expression von MMP-9 und ET-1 wurde in der A. femoralis 21 Tage nach Dilatation, in den mit  $\pm$  Pio-behandelten Wildtyp- und HMGA1<sup>-/-</sup> Mäusen mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt (\*,  $p < 0.05$  vs. unbehandelt/Vehikel; #,  $p < 0.05$  vs. Gefäßverletzung/Vehikel).

In der A. femoralis der unbehandelten Kontrollen beider Genotypen waren sowohl MMP-9 als auch ET-1 schwach exprimiert. Durch die Dilatation der A. femoralis wurde die MMP-9 und ET-1 Expression in beiden Genotypen signifikant erhöht. Aber nur in der Pioglitazon-behandelten Wildtypgruppe konnte diese erhöhte MMP-9 und ET-1 Expression reduziert werden, wohingegen sich in den Pioglitazon-behandelten HMGA1-defizienten Tieren keine Reduktion der erhöhten MMP-9 und ET-1 Expression zeigte. Diese *in vivo*-Daten bestätigen die *in vitro*-Experimente und demonstrieren, dass die Pioglitazon-vermittelte Repression von MMP-9 und ET-1 in den HMGA1-defizienten Mäusen aufgehoben wurde.

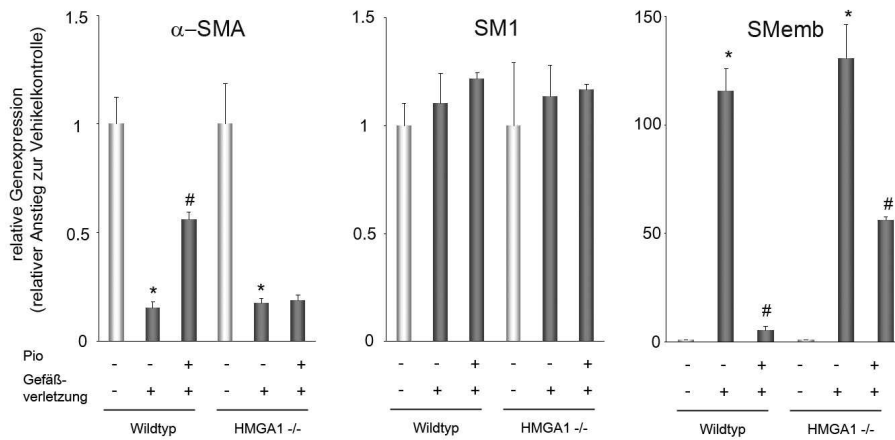
### 4.5.4 Expressionsniveau spezifischer Marker für die phänotypische VSMC-Modulation in der A. femoralis

Hauptbestandteil der Tunica media sind VSMCs, deren Funktion die Blutdruckregulation ist. Daher sind glatte Gefäßmuskelzellen im Gegensatz zu Herzmuskel- oder Skelettmuskelzellen nicht terminal differenziert. Ihr Phänotyp kann sich unter dem Einfluss verschiedener physiologischer und pathologischer Stimuli wie z.B. vaskuläre Verletzungen oder Atherosklerose vom kontraktilen hin zum de-differenzierten, proliferativen Phänotyp verändern (Owens et al., 2004). Diese Modulationsprozesse sind gekennzeichnet durch Veränderungen im Proteinexpressionsmuster. Differenzierte VSMCs zeigen eine geringe Proliferation dafür aber eine angemessene Kontraktilität. Die de-differenzierten VSMCs sind charakterisiert durch eine gesteigerte Proliferation, Migration sowie einer vermehrten Synthese extrazellulärer Matrixproteine und einer Reduktion des Expressionsniveaus kontraktiler Proteine (Kawai-Kowase and Owens, 2007). Daher wurde untersucht, inwieweit sich das Expressionsniveau spezifischer VSMC-Marker für den kontraktilen und den proliferativen Phänotyp in den Wildtyp- und HMGA1-defizienten Tieren nach der Gefäßverletzung mit  $\pm$  Pioglitazon verändert. Hierbei wurden die Marker smooth muscle alpha actin ( $\alpha$ -SMA) non-muscle myosin heavy chain B (SMemb) und smooth muscle heavy chain 1 (SM1) ausgewählt, deren Expressionsniveau in der A. femoralis quantifiziert und in Abbildung 4.33 dargestellt wurde.

Die Abbildung 4.33 zeigt, dass die Expression von  $\alpha$ -SMA, einem Marker für den kontraktilen Phänotyp, in der verletzten A. femoralis sowohl von den Wildtyp- als auch von den HMGA1-defizienten Mäusen signifikant reduziert war. Die Pioglitazon-Behandlung führte in der verletzten A. femoralis der Wildtyp-tiere zu einer abgeschwächten Reduktion durch die Verletzung, dieser Effekt war in der A. femoralis der HMGA1-defizienten Tiere nur teilweise zu beobachten. Des Weiteren zeigte sich für SMemb, einem Marker spezifisch für den proliferativen Phänotyp, eine stark erhöhte Expression in der verletzten A. femoralis beider Genotypen. In den Wildtyp-tieren, die mit Pioglitazon behandelt wurden konnte diese Expression fast vollständig inhibiert werden. Im Gegensatz dazu war in den HMGA1-defizienten Mäusen die SMemb Expression nur um die Hälfte verringert.



## Ergebnisse



**Abbildung 4.33** Expressionsniveau verschiedener Marker für die VSMC-Modulation vom kontraktilem zum proliferativen Phänotyp in der A. femoralis

Die Expression von  $\alpha$ -SMA, SM1 und SMemb wurde 21 Tage nach Dilatation der A. femoralis in den mit  $\pm$  Pio-behandelten Wildtyp- und HMGA1<sup>-/-</sup> Tiere mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt. (\*,  $p < 0.05$  vs. unbehandelt/Vehikel; #,  $p < 0.05$  vs. Gefäßverletzung/Vehikel).

Zusätzlich wurde das Expressionsniveau des Markers SM1 bestimmt und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Daten belegen, dass die Pioglitazon-Behandlung in den Wildtyp-Tieren den phänotypischen Veränderungen der VSMCs - hervorgerufen durch die Gefäßverletzung - vorbeugen konnte. Im Unterschied dazu war dieser Effekt in den HMGA1-defizienten Mäusen stark abgeschwächt bzw. die Modulation hin zum proliferativen Phänotyp war in den verletzten A. femoralis der HMGA1-defizienten Mäuse trotz Pioglitazon-Behandlung weiter erkennbar.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression in VSMCs

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Wirkungsweise des nukleären Transkriptionsrezeptors PPAR $\gamma$  hinsichtlich der Transrepression von Zielgenen in VSMCs charakterisiert. Diese Versuche wurden in humanen VSMCs durchgeführt, da einerseits aus der Literatur bekannt war, dass PPAR $\gamma$  in verschiedenen vaskulären Zellen wie VSMCs, Endothelzellen oder Monozyten/Makrophagen exprimiert wird (Marx et al., 1998a, 1998b; Ricote et al., 1998) und die Proliferation/ Migration glatter Gefäßmuskelzellen ein entscheidender Prozess in der Entstehung der Atherosklerose ist (Libby et al., 2011), andererseits jedoch die Mechanismen der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression in VSMCs weitestgehend unbekannt sind. Differenzierte, kontraktile VSMCs exprimieren Proteine der extrazellulären Matrix wie MMP-9 nur sehr schwach, jedoch unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer unbalancierten Steigerung der MMP-9 Expression in der Gefäßwand, die sowohl zu einer Destabilisierung der atherosklerotischen Plaques als auch zur Proliferation und Migration der VSMCs führt (Newby, 2012). Im Jahr 2002 bestätigten zwei Labore unabhängig voneinander, dass MMP-9 wichtig ist für SMC Migration und für die Neointimabildung (Cho and Reidy, 2002; Galis et al., 2002).

Daher wurde zur Untersuchung der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression in VSMCs in der Regulation bedeutender Gene für die Entstehung der Atherosklerose in der Gefäßwand die Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) ausgewählt. Desweiteren ist bekannt, dass MMP-9 durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung inhibiert werden konnte, jedoch war der molekulare Mechanismus weitestgehend unbekannt (Goetze et al., 1999a, 1999b; Zahradka et al., 2006; Marx et al., 1998a; Maldonado et al., 2003). Zur Ermittlung der transkriptionellen Inhibierung von MMP-9 durch den Ligand-aktivierten Kernrezeptor PPAR $\gamma$  in VSMCs wurde zunächst das Versuchsystem etabliert. Zur Induktion der MMP-9 Expression wurde der inflammatorische Stimulus Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) verwendet und zur transkriptionellen Aktivierung von PPAR $\gamma$  wurden VSMCs mit den PPAR $\gamma$ -Liganden Pioglitazon (Pio) und Rosiglitazon (Rosi) stimuliert. Diese Vorversuche bestätigten die Angaben aus der Literatur, dass PMA die MMP-9 mRNA Expression deutlich induzieren kann (Ma et al., 2004a; Clark et al., 2008a), und dass die PPAR $\gamma$  Aktivierung durch die Glitazone Pioglitazon und Rosiglitazon diese MMP-9 Induktion signifikant inhibieren kann (Goetze et al., 1999a, 1999b; Marx et al., 1998a). Dies bedeutet, dass die Glitazon-vermittelte PPAR $\gamma$ -Aktivierung in VSMCs eine entscheidende Rolle bei der transkriptionellen Regulation der MMP-9 mRNA Expression spielt. Weiterhin wurde die

Bedeutung von PPAR $\gamma$  für diesen Transrepressionsmechanismus herausgestellt, da Glitazone auch rezeptorunabhängige Effekte vermitteln können (Luconi et al., 2010; Hu et al., 2011).

Die Untersuchung von VSMCs mit einer verminderten Expression des Kernrezeptor PPAR $\gamma$  zeigte eindeutig, dass es zu einer Aufhebung der Glitazon-Wirkung auf die PMA-induzierte MMP-9 mRNA Expression kam. Zusätzlich wurden auch MMP-9 Promotoranalysen in HEK293-Zellen durchgeführt. Auch hier zeigte sich in Übereinstimmung mit den Expressionsdaten, dass die gesteigerte MMP-9 Promotoraktivität durch PMA-Behandlung mit Pioglitazon in Anwesenheit von PPAR $\gamma$  inhibiert werden kann, nicht aber in Abwesenheit von PPAR $\gamma$ . Diese Daten belegen, dass die Wirkung der Glitazone nicht rezeptorunabhängig vermittelt wird, sondern dass die Glitazon-vermittelten Effekte für die MMP-9 Transrepression abhängig von PPAR $\gamma$  sind.

### **5.2 Identifizierung von HMGA1 als neuen PPAR $\gamma$ -Koregulator**

Ein sehr wichtiger Regulationsmechanismus in der spezifischen Wirkung eines Rezeptors ist die Interaktion mit anderen Koregulatorproteinen. Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern von PPAR $\gamma$  für die PPAR $\gamma$ -vermittelten MMP-9 Transrepression wurde ein Expressionsprofil für humane Kernrezeptoren und Koregulatoren von humanen Gefäßmuskelzellen mittels Oligo GEArray® (SuperArray®) erstellt. Dabei wurde nur das Expressionsprofil der humanen Kernrezeptoren und Koregulatoren von unbehandelten VSMCs untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine vergleichende Analyse des Expressionsprofils der humanen Kernrezeptoren und Koregulatoren zwischen Pioglitazon/PMA Behandlung und unbehandelten Zellen durchgeführt. Diese Daten würden eventuell wichtige Koregulatoren aufzeigen, deren Expression sich unter der Stimulation verändert. Diese vergleichenden Expressionsdaten lassen allerdings kaum Rückschlüsse auf die Aktivität der Kernrezeptoren und Koregulatoren zu, sie zeigen lediglich das veränderte Expressionsniveau an. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit entschieden den Array nur in unbehandelten VSMCs durchzuführen, um einen generellen Einblick zu erhalten, welche Kernrezeptoren und Kofaktoren in VSMCs exprimiert werden und somit potentielle Funktionen bei der transkriptionelle Regulation übernehmen könnten. Für die Analyse des Superarrays konnte dann das Nicht-Histon Kernprotein HMGA1 als Koregulator mit der höchsten Expression in VSMCs identifiziert werden.

Aufgrund der hohen Expression von HMGA1 in VSMCs lag die Vermutung nahe, dass HMGA1 wichtige Funktionen und Aufgaben in der Gefäßmuskelzelle übernimmt und eventuell an der Regulation der PPAR $\gamma$ -Wirkung beteiligt ist. Zusätzlich ist bekannt, dass HMGA1 mit anderen Kernrezeptoren wie beispielsweise dem Estrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) interagiert, und die Bindung des Rezeptor an Estrogen Response Elemente (ERE) sowie dessen transkriptionelle Aktivität

verstärkt (Massaad-Massade et al., 2002, Esposito et al., 2012). Die Daten von Massaad-Massade und Kollegen zeigten, dass HMGA1 dabei entweder an die N- oder an die C-terminalen Aktivierungsdomäne des Estrongenrezeptors bindet (Massaad-Massade et al., 2004). Auch für den Progesteronrezeptor konnte gezeigt werden, dass HMGA1 die Bindung des Rezeptors zum Progesteron Response Element (PRE) verstärkt. Dabei wurde vermutet, dass HMGA1 die Bindung durch strukturelle Änderungen in der Target-DNA vereinfacht (Oñate et al., 1994). Aufgrund der Funktion von HMGA1 bei der positiven und negativen Regulation der Genexpression wurde die Interaktion von HMGA1 mit einer Vielzahl von anderen Transkriptionsfaktoren beobachtet, darunter z.B. auch NF $\kappa$ B, Sp1, c-Jun (Nagpal et al., 1999; Bianchi and Agresti, 2005). Diese Arbeiten legten also die Vermutung nahe, dass der architektonische Transkriptionsfaktor HMGA1 auch mit anderen Kernrezeptoren wie PPAR $\gamma$  interagiert. Daher wurde in den nachfolgenden Versuchen der Einfluss von HMGA1 auf die PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression untersucht.

Zur Ermittlung der HMGA1-Funktion für den PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepressionsmechanismus wurde zunächst das HMGA1 Expressionniveau mittels RNA-Interferenz gezielt reduziert. Diese Daten demonstrierten, dass die HMGA1 Depletion die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression blockiert und somit zu einer Aufhebung der Pioglitazon Wirkung führten. Zur Validierung dieser Ergebnisse wurden auch Promotoranalysen mittels Luziferase-Reporter-Assay durchgeführt. Diese Daten liefern in Übereinstimmung mit den Expressionsanalysen einen zusätzlichen Beweis dafür, dass die PPAR $\gamma$ -vermittelte MMP-9 Transrepression nur in Anwesenheit von HMGA1 auf eine transkriptionelle Hemmung des MMP-9 Gens zurückgeführt werden kann. Zur weiteren Validierung wurden HMGA1-Überexpressionsstudien in VSMCs durchgeführt. Hierbei bewirkte in den mit HMGA1-überexprimierten Zellen die Pioglitazon-Stimulation eine verstärkte Reduktion der MMP-9 Expression. Diese Daten bestärken HMGA1 als neuen Koregulator der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression. Zusammenfassend charakterisieren diese Daten erstmals HMGA1 als neuen Kofaktor für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression in VSMCs und zeigen einen neuen Mechanismus inflammatorischer Genregulation durch HMGA1 und PPAR $\gamma$  in VSMCs. Der HMGA1-vermittelte Transrepressionsmechanismus von PPAR $\gamma$  zur inflammatorischen Genregulation in VSMCs ist möglicherweise auch für andere nukleäre Rezeptoren von Bedeutung. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch andere Kernrezeptoren die Proliferation und Migration von VSMCs inhibieren können. Die Arbeiten von Blaschke und Kollegen zeigten z.B. dass die Leber X Rezeptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ )-Aktivierung durch synthetische Liganden die mitogen-induzierte Zellproliferation hemmt (Blaschke et al., 2004). LXR $\alpha$ -Liganden konnten die Expression von S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2 (SKP2) und auch die Expression von Minichromosom Maintenance Protein 6 (MCM6), einem notwendigen Protein

zur DNA-Replikation, inhibieren. Daher wurde ermittelt, inwieweit der Kernrezeptor LXR $\alpha$  in Abhängigkeit von HMGA1 anti-inflammatorische Genexpression in VSMCs reguliert. Die basale Expression von SKP2 und MCM6 war sehr schwach, konnte jedoch mit PDGF/Insulin Stimulation signifikant erhöht werden. Nach Behandlung mit dem LXR $\alpha$  Liganden T1317 konnte sowohl in den Kontroll-siRNA als auch in den HMGA1-siRNA behandelten Zellen eine deutliche Reduktion der SKP2 und MCM6 Transkriptionsrate detektiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass HMGA1 keinen Einfluss hat auf die LXR $\alpha$ -vermittelte Repression von SKP2 und MCM6 hat. Als weiterer Nachweis, dass der Einfluss von HMGA1 spezifisch für den Kernrezeptor PPAR $\gamma$  ist wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Wie schon erwähnt kann der Einfluss von HMGA1 auf die Proliferation unterschiedlich sein. Beispielsweise die Daten des Proliferationsassays von Liao und Kollegen zeigen, dass die HMGA1 Expression (sowohl HMGA1 siRNA als auch die HMGA1 Überexpression) keinerlei Einfluss auf die Proliferation hat (Liao et al., 2006). Dagegen deuten andere Arbeiten daraufhin, dass HMGA1 die Proliferation induzieren kann (Reeves, 2001; Reeves and Beckerbauer, 2001; Fusco and Fedele, 2007). Unsere Daten des Proliferationsassays zeigen zunächst einen signifikanten Anstieg der Proliferation in allen FBS-behandelten Ansätzen. Es konnten aber keine Unterschiede in An- und Abwesenheit von HMGA1 ermittelt werden. Anschließend wurde zusätzlich zur Pioglitazonbehandlung zum einen mit dem LXR $\alpha$ -Liganden stimuliert und zum anderen wurde der antiproliferative Einfluss von Rapamycin in An- und Abwesenheit von HMGA1 untersucht. Rapamycin inhibiert mTOR und die dazugehörigen Signalkaskaden was unter anderem zum Zellzyklusarrest führt oder auch die Migration von VSMCs inhibiert (Poon et al., 1996; Dzau et al., 2002). Frühere Daten konnten einen Einfluss von HMGA1 auf mTOR bzw. einen Einfluss von Rapamycin auf die HMGA1 Aktivität nachweisen. Dabei wurde ermittelt, dass eine Reduktion der HMGA1 Expression mittels siRNA zur Inhibierung der mTOR Phosphorylierung führt, wohingegen die HMGA1 Überexpression einen Anstieg der Phosphorylierung ermöglicht (Liao et al., 2006). Die Arbeiten von Wang und Kollegen belegen, dass die Il-4 (Interleukin-4) induzierte Phosphorylierung von HMGA1 durch Rapamycin inhibiert werden kann und somit die DNA-Bindungsaktivität von HMGA1 verringert wird (Wang et al., 1995). Im Proliferationsassay war erkennbar, dass in den FBS/Pioglitazon-behandelten Zellen die Proliferation nach HMGA1 siRNA Transfektion nicht inhibiert werden konnte. Dagegen gibt es in den Zellen, die mit FBS/T1317 oder FBS/Rapamycin behandelt worden sind keine Unterschiede zwischen HMGA1- und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. In diesen Ansätzen zeigt die Abwesenheit von HMGA1 keinen Effekt, beide Substanzen konnten die Proliferation auch in Abwesenheit von HMGA1 inhibieren. Infolgedessen ist der Einfluss von HMGA1 spezifisch für die PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression in VSMCs.

### 5.3 Molekularer Mechanismus der HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression

#### 5.3.1 Kofaktorrekutierung zum MMP-9 Promotor

Um den genauen molekularen Mechanismus der Liganden-abhängigen Transrepression von MMP-9 zu bestimmen wurden Chromatin Immunopräzipitationen (ChIP) in VSMCs durchgeführt. Es sollte die Bindung und Rekrutierung der Kofaktoren RNA Polymerase II, PPAR $\gamma$ , HMGA1, der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 und dem Korepressor SMRT nach PMA-induzierter MMP-9-Aktivierung und nach Pioglitazon/PMA -induzierter MMP-9-Inhibierung untersucht werden. In unbehandelten Zellen konnte zunächst die Bindung des nukleären Korepressors SMRT nachgewiesen werden. Erfolgte nun die transkriptionelle Aktivierung des MMP-9 Gens durch PMA-Behandlung konnte keine SMRT-Bindung mehr detektiert werden. Allerdings kam es zur Rekrutierung der RNA Polymerase II und der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65. Zusätzlich wurde eine schwache PPAR $\gamma$ -Anreicherung detektiert. Die Entfernung der SMRT Korepressorkomplexe lässt vermuten, dass die SMRT-Bindung wichtig für die Inaktivierung des Promotors ist. Für die transkriptionelle Aktivierung des MMP-9 Gens wird also sowohl die gleichzeitige Entfernung der Korepressorkomplexe als auch die Rekrutierung der Aktivatoren benötigt.

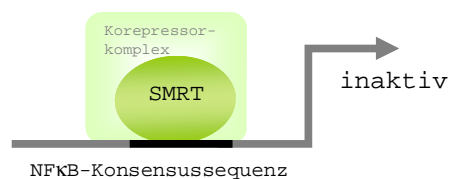
Auch Arbeiten von Ma und Kollegen zeigten in HeLa-Zellen, dass im basalen Zustand Korepressorkomplexe an den MMP-9 Promotor gebunden sind (Ma et al., 2004a). Ebenso konnte am iNOS-Promotor in Makrophagen im basalen Zustand die Assoziation von NCoR/HDAC3 Korepressorkomplexen nachgewiesen werden (Pascual et al., 2005). In diesen beiden Fällen wurden die beiden Korepressoren NCoR und HDAC3 untersucht, allerdings ist bekannt, dass die Korepressoren SMRT und NCoR in großen Proteinkomplexen mit HDAC3 vorliegen (Li et al., 2000b).

Dies wiederum lässt also vermuten, dass der Korepressor SMRT wie auch NCoR und HDAC3 die aktive Repression am MMP-9 Promotor vermittelt. Dabei entfernen HDACs Acetylgruppen von acetyliertem Lysin der Histone. Diese Deacetylierung führt zu einer erhöhten Affinität der Histone zur DNA, wodurch die DNA nur schwer zugänglich für Transkriptionsfaktoren ist. Dies führt zu einer Hemmung der Genexpression (Brehm et al., 1998). Es ist bekannt, dass HDAC3 in einer Zelle über die Deacetylase-Aktivierungsdomäne (DAD), die sowohl in NCoR als auch in SMRT-Proteinen vorhanden ist, aktiviert wird.

Dabei kann HDAC3 seine enzymatische Funktion nur erfüllen, wenn ein Korepressor vorhanden ist (Li et al., 2000b; Guenther et al., 2001; Zhang et al., 2002). Die beiden Korepressoren SMRT und NCoR bilden also mit Histondeacetylase 3 (HDAC3) und weiteren Proteinen wie TBL1 (transducin beta-like protein-1) und TBLR1 (TBL-1-related protein) einen Korepressorkomplex (siehe auch 5.3.3 Bedeutung des Korepressors SMRT) und vermitteln transkriptionelle

Repression (Li et al., 2000b; Yoon et al., 2003). Neben der DAD ist auch eine Histon-Interaktionsdomäne (HID) im HDAC3-Protein identifiziert worden. Diese verstärkt die Affinität des DAD-HDAC3 Enzymsubstrats und erhöht somit auch die Repression. Außerdem unterdrückt die HID die Aktivierung von Histonacetyltransferasen und unterstützt so zusätzlich die Hemmung der Genexpression (Yu et al., 2003).

### aktive Repression



**Abbildung 5.1** Aktive Repression

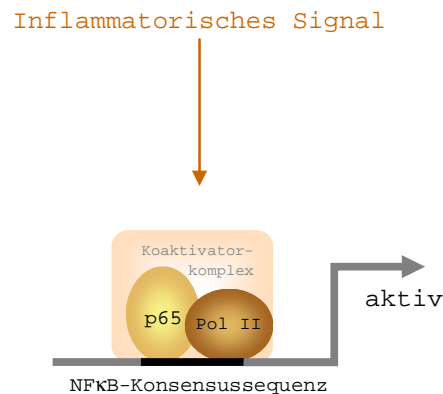
Bindung von Korepressorkomplexen wie SMRT im basalen Zustand an den Targetpromotor

Die Abbildung 5.1 zeigt, dass der Korepressor SMRT an den MMP-9 Targetpromotor im basalen Zustand bindet und somit aktive Repression vermittelt. Da die Rekrutierung der RNA Polymerase II mit der MMP-9 Promotoraktivierung korreliert, kann man vermuten, dass diese zur Initiation der Transkription zum Promotor rekrutiert wird. Die RNA Polymerase II ist ein fundamentaler Bestandteil der generellen Transkriptionsmaschinerie und ist für die Initiation der Gentranskription verantwortlich (Ma, 2011). Daten von Ma und Kollegen bestätigen, dass die Rekrutierung der RNA Polymerase II und deren Phosphorylierung am Serinrest 5 mit der MMP-9 Genaktivierung verbunden sind (Ma et al., 2004a).

Die Bindung von p65 nach der PMA-Induktion dient eventuell als verstärkendes Signal zur Promotoraktivierung oder aber der Verdrängung des Korepressors SMRT und ermöglicht bzw. vereinfacht so die Bindung der RNA Polymerase II. Ma et. al. untersuchte zusätzlich zur p65-Untereinheit auch noch die anderen NFκB-Untereinheiten p50, c-Rel und p53. Aus diesen Arbeiten geht zunächst eine schwache basale Assoziation der NFκB-Untereinheiten p65, p50, c-Rel und p53 zum MMP-9 Promotor hervor.

Nach PMA-Behandlung wurde nach 2-4 h eine starke Bindung von p50 und p65 detektiert und nach 4-6 h veränderte sich scheinbar die NFκB-Zusammensetzung und es kam zur verstärkten Assoziation von c-Rel und p52. Re-ChIP-Versuche bestätigten, dass die Transkriptionsfaktoren p50 und p65 gleichzeitig als Komplex an den MMP-9 Promotor binden (Ma et al., 2004a). Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt nun die Vermutung nahe, dass PMA den Zusammenbau

eines Enhanceosoms initiiert, um so die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie zu ermöglichen. Weiterhin kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Rekrutierung von p65 zum MMP-9 Promotor zur Verdrängung der SMRT-Korepressoren führt. Abbildung 5.2 stellt die Bindung der Koaktivatoren zum MMP-9-Promotor nach transkriptioneller Aktivierung dar.



**Abbildung 5.2** *Transkriptionelle Aktivierung*

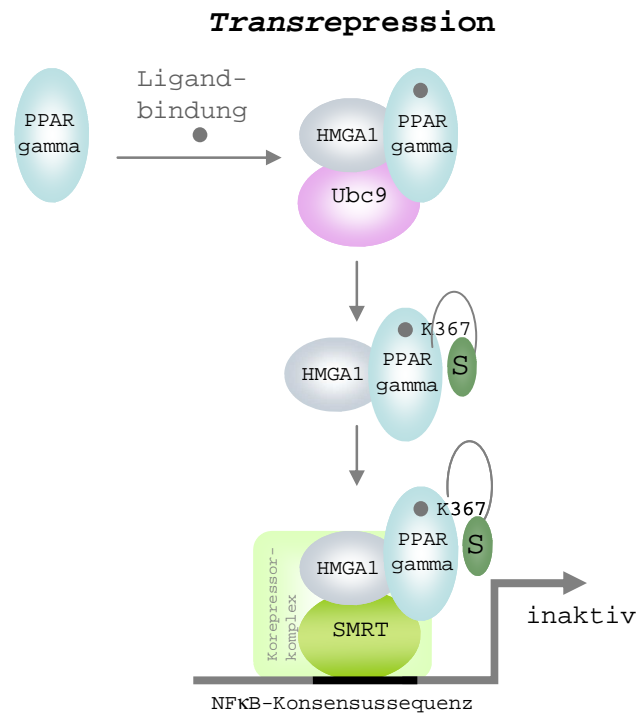
Bindung der Koaktivatoren RNA Polymerase II (Pol II) und der NFκB-Untereinheit p65 nach transkriptioneller Aktivierung durch PMA, Entfernung von Korepressorkomplexen

Untersuchte man nun Zellen, die mit Pioglitazon/PMA behandelt wurden, stellte sich eine verstärkte Bindung von PPAR $\gamma$  und HMGA1 an den MMP-9 Promotor dar. Ebenso kam es zu einer verminderten, wenn auch nicht vollständigen Entfernung von p65 vom MMP-9 Promotor. Im Gegensatz dazu blieb die SMRT-Bindung erhalten. Diese Daten unterstreichen zunächst, dass die ligand-abhängige Aktivierung von PPAR $\gamma$  die Rekrutierung von PPAR $\gamma$  und HMGA1 zum MMP-9 Promotor induziert. Desweiteren führte die Bindung von PPAR $\gamma$  dazu, dass der SMRT-Korepressor nicht mehr vom MMP-9 Promotor entfernt wurde.

Weiterhin lassen diese Daten vermuten, dass durch die Aufrechterhaltung der SMRT-Bindung die Rekrutierung der RNA Polymerase II und der NFκB-Untereinheit p65 verhindert wird und es somit zur Inhibierung der Transkription kommt. Die Daten von Pascual et. al. bestätigen ebenfalls, dass die Glitazon-vermittelte PPAR $\gamma$ -Aktivierung zur Rekrutierung von PPAR $\gamma$  zum iNOS-Promotor und zur Aufhebung der Entfernung der Korepressorkomplexe führte. Auch hier kam es zur Inhibierung der iNOS-Promotoraktivität (Pascual et al., 2005).

Die Arbeiten von Jennewein und Kollegen belegten diesen Transrepressionsmechanismus. Sie wiesen ebenfalls in Makrophagen nach, dass die Sumoylierung von PPAR $\gamma$  zur Verhinderung der LPS-induzierten Entfernung des Korepressors NCoR von der NFκB-Konsensussequenz des TNF $\alpha$ -Promotors führte (Jennewein et al., 2008). Es könnte sich also vielleicht um einen generellen Mechanismus zur Transrepression inflammatorischer Gene handeln, der in Abbildung 5.3 dargestellt wird.





**Abbildung 5.3** *Transrepression*

Die ligand-abhängige Aktivierung von PPAR $\gamma$  führt zur PPAR $\gamma$  Sumoylierung und zur Rekrutierung von PPAR $\gamma$  und HMGA1 zum MMP-9 Promotor. Desweiteren führte die Bindung von PPAR $\gamma$  zur Aufrechterhaltung der SMRT-Korepressor Bindung zum MMP-9 Promotor und es kommt somit zur Inhibierung der Transkription.

Im Gegensatz zu den p65-Daten am MMP-9 Promotor konnten Pascual und Kollegen am iNOS-Promotor keine abgeschwächte Bindung von p65 detektieren, hier blieb das Signal gleich stark und zeigte keinerlei Einfluss auf die Glitazon-Behandlung (Pascual et al., 2005). Die Vermutung, dass Korepressoren p65 vom Promotor bei Inhibierung verdrängen bzw. dass p65 Korepressorkomplexe bei Promotoraktivierung verdrängen ist für den iNOS-Promotor nicht zutreffend. Wahrscheinlich dient hier NFκB als Enhanceosom und verstärkt so die Transkription. Dieser Unterschied in der Bindung von p65 zeigt, dass obwohl es sich hierbei scheinbar um einen generellen Mechanismus zur Transrepression inflammatorischer Gene handelt, immernoch zell- und promotorspezifische Unterschiede auftreten.

### 5.3.2 Einfluss von HMGA1 auf die Kofaktorrekutierung zum MMP-9 Promotor

Um die Funktion und Bindung von HMGA1 an den MMP-9 Promotor herauszuarbeiten, wurde zusätzlich die Kofaktor-Rekrutierung in Abwesenheit von HMGA1 untersucht. Unter basalen Bedingungen ergab sich in Abwesenheit von HMGA1 keinerlei Veränderungen im

Rekrutierungsverhalten der untersuchten Kofaktoren. Dies bedeutete, dass unabhängig von HMGA1 der Korepressor SMRT mit dem MMP-9 Promotor assoziiert war. Diese Bindung führte also auch in Abwesenheit von HMGA1 zur aktiven Repression des MMP-9 Gens.

Diese Daten bestätigen somit die bisher erhaltenen mRNA Expressionsanalysen sowie die Promotorstudien mittels Luziferaseassay. Ebenso gab es kein verändertes Rekrutierungsverhalten nach Induktion der MMP-9 Transkription durch PMA-Behandlung in Abwesenheit von HMGA1. Es kam zur Rekrutierung der RNA Polymerase II und der NFκB-Untereinheit p65 und zur Entfernung der SMRT-Bindung. Die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 durch PMA wird also nicht von HMGA1 beeinflusst. Jedoch in den Zellen, die in Abwesenheit von HMGA1 mit Pioglitazon/PMA behandelt wurden, zeigte sich ein anderes Rekrutierungsmuster. Wie erwartet wurde das HMGA1 Protein nicht zum Promotor rekrutiert und bestätigt somit - zusätzlich zu den mRNA Expressionsdaten - dass die Herunterregulation mittels HMGA1-siRNA erfolgreich war. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die RNA Polymerase II und die NFκB-Untereinheit p65 mit dem MMP-9 Promotor assoziiert blieben. Wohingegen der Kernrezeptor PPARγ nicht mehr zum MMP-9 Promotor rekrutiert wurde. Auch der Korepressor SMRT war nicht mehr an den Promotor gebunden. Hier ist also deutlich zu erkennen, dass die Abwesenheit von HMGA1 Einfluss auf die Pioglitazon/PMA Behandlung hat. Es zeigte sich, dass die Glitazon-Behandlung in Abwesenheit von HMGA1 zur Aufhebung der Inhibierung der MMP-9 Promotoraktivität führte. Wie diese Ergebnisse verdeutlichen kann PPARγ ohne HMGA1 nicht mehr an den MMP-9 Promotor binden. Demzufolge ist HMGA1 entscheidend für die Transrepression durch PPARγ. Wobei das HMGA1 Protein vermutlich in die PPARγ Sumoylierung involviert ist.

Daraus lässt sich nun schlussfolgern, dass sumoyliertes PPARγ für die Bindung an den MMP-9 Promotor notwendig ist und somit auch notwendig ist um die Transrepression zu vermitteln. Auch Pascual und Kollegen zeigten, dass die PPARγ Sumoylierung ein entscheidender Schritt für die Transrepression des iNOS-Gens in Makrophagen ist (Pascual et al., 2005). Der Verlust der PPARγ-Bindung geht nun einher mit einem Bindungsverlust des Korepressors SMRT. Auch diese Daten konnten am iNOS-Promotor ebenfalls beobachtet werden (Pascual et al., 2005). Wie bereits beschrieben führte nun also die Entfernung des Korepressors zur Rekrutierung der RNA Polymerase II als auch zur Bindung der NFκB-Untereinheit p65, so dass die Transkription nicht inhibiert wurde, sondern weiterhin aktiviert war trotz Glitazon-Stimulation. Diese Daten belegen eindeutig die Bedeutung des neu identifizierten Kofaktors HMGA1 in der PPARγ-vermittelten Transrepression inflammatorischer Gene wie MMP-9 und geben somit wichtige Hinweise auf den Wirkungsmechanismus von PPARγ.

### 5.3.3 Bedeutung des Korepressors SMRT

Kernrezeptoren interagieren mit einer Vielzahl von Korepressoren. Korepressoren erfüllen dabei genau die gegenteilige Rolle der Koaktivatoren. Sie binden hauptsächlich an den unligierten Kernrezeptor und reprimieren die Transkription (Watson et al., 2012). Die zwei beststudierten Korepressoren sind die beiden homologen Proteine SMRT und NCoR, die durch die Interaktion mit anderen Kernrezeptoren in Abwesenheit eines Liganden entdeckt wurden (Chen and Evans, 1995; Hörlein et al., 1995; Watson et al., 2012).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in Abwesenheit eines Signals Korepressorkomplexe wie NCoR oder SMRT benötigt werden, um die Inhibierung einiger inflammatorischer Gene aufrechtzuerhalten (Hoberg et al., 2004; Ogawa et al., 2004; Perissi et al., 2004; Pascual et al., 2005; Ghisletti et al., 2009). Es ist bekannt, dass SMRT Korepressorkomplexe die NF $\kappa$ B Transaktivierung inhibieren können (Lee et al., 2000; Hoberg et al., 2004; Ma et al., 2004b). Dieser Mechanismus könnte auch für die PMA-induzierte MMP9-Transkription von Bedeutung sein. Ghisletti et. al. zeigten, dass die Korepressoren NCoR und SMRT selektiv rekrutiert werden und es somit promotorabhängige Unterschiede gibt (Ghisletti et al., 2009). Für den MMP-9 Promotor wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, ob dieser nun ein SMRT-spezifischer oder NCoR/SMRT-abhängiger Promotor ist. Aus den ChIP-Daten geht lediglich hervor, dass SMRT im basalen Zustand und nach Pioglitazon/PMA Behandlung zum MMP-9 Promotor rekrutiert wurde. Die Anwesenheit des Korepressormoleküls NCoR wurde bisher nicht untersucht und kann somit auch nicht ausgeschlossen werden.

Es ist bekannt, dass Korepressorkomplexe die Transkription inhibieren, indem sie Chromatin-modifizierende Eigenschaften beinhalten oder sich mit Chromatin-modifizierenden Enzymen assoziieren (Jones and Shi, 2003; Stewart and Wong, 2009; Watson et al., 2012). Dazu zählen unter anderem Histon-Deactetylasen, Histon-Demethylasen, Histon-Methyltransferasen und ATP-abhängige Chromatin-Remodeling Faktoren (Jones and Shi, 2003). Aus der Literatur geht hervor, dass die Modulation der Chromatinstruktur eine wichtige Rolle für die SMRT- und NCoR-vermittelte transkriptionelle Repression von Kernrezeptoren spielt (Jones and Shi, 2003).

Weiterhin konnten wir nachweisen, dass die Stimulation mit PMA zur Entfernung des Korepressormoleküls SMRT vom MMP-9 Promoter führt. Hierbei ist aus früheren Studien bekannt, dass nicht nur die Entfernung der Korepressoren und die Rekrutierung der Koaktivatoren durch Stimulation induziert werden kann, sondern auch der schnelle Abbau der Korepressormoleküle reguliert werden kann (McNally et al., 2000; Shang et al., 2000; Reid et al., 2003). Dabei erfolgt die Entfernung der Korepressormoleküle mithilfe der Ubiquitinierung und dem proteosomalen Abbau (Yan et al., 2003).

Interessanterweise haben viele Transkriptionsfaktoren innerhalb ihrer Aktivierungsdomänen auch Elemente für die Degradierung, was vermuten lässt, dass es eine generelle Korrelation zwischen Aktivierung und Abbau gibt (Murakami et al., 1999; Salghetti et al., 2000). Das Ubiquitin-Proteasom-System wird dabei häufig verwendet, um den Abbau regulatorischer Proteine zu kontrollieren, wobei Ubiquitin-Moleküle an ein Protein gekoppelt werden und dieses damit zum Abbau markiert. Die Übertragung des Ubiquitins auf ein anderes Protein erfolgt auf katalytischen Wege im Rahmen einer Kaskade an welcher drei Enzymfamilien beteiligt sind. In einem ATP-abhängigen Prozess wird Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 aktiviert. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin mittels Transesterifizierung auf das Ubiquitin-konjugierende E2-Enzym übertragen. Ubiquitin-E3-Ligasen vermitteln dann die Übertragung des Ubiquitins auf das für den Abbau bestimmte Protein. Im letzten Schritt wird das Ubiquitin-markierte Protein dem Proteasom zugeführt, welches das markierte Protein abbaut. (Liakopoulos et al., 1998). Wie schon im Abschnitt 5.3.1. erwähnt konnten zusätzlich zu HDAC3, TBL1 (Transducin  $\beta$ -like 1) und TBLR1 (TBL-related protein 1) als weitere Bestandteile des NCoR/SMRT Korepressorkomplexes identifiziert werden (Li et al., 2000b; Guenther et al., 2001; Zhang et al., 2002). Inzwischen ist auch bekannt das TBL1/TBLR1 dabei als spezifische Adaptoren für die Rekrutierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems fungieren und somit den Austausch der Korepressoren NCoR und SMRT durch Koaktivoren vermitteln. TBLR1 übernimmt dabei die Rolle der E3 Ligase (Perissi et al., 2004).

Auch die Arbeiten von Pascual und Kollegen konnten belegen, dass NCoR, HDAC3, TBL1 und TBLR1 unter basalen Bedingungen am iNOS-Promotor gebunden sind. Weiterhin bestätigen diese Daten, dass für die LPS-abhängige Entfernung von NCoR und HDAC3 vom iNOS-Promotor TBL1 und TBLR1 zur Ubiquitinierung benötigt werden (Pascual et al., 2005).

Aufgrund dieser Daten könnte man nun vermuten, dass auch die Entfernung der SMRT-Korepressormoleküle vom MMP-9 Promotor durch die PMA-Stimulation mithilfe der Ubiquitinierung und dem proteosomalen Abbau erfolgt.

Weiterhin ist bekannt, das HMGA1 als architektonischer Transkriptionsfaktor viele Funktionen in der Modulation der Chromatinstruktur übernimmt und somit auch mit SMRT-Korepressorkomplexen interagieren könnte. Die Überlegung, ob es zur einer Interaktion zwischen HMGA1 und SMRT kommt, wurde daher mittels Co-Immunopräzipitation überprüft. Diese Daten zeigten unter basalen Bedingungen lediglich eine schwache Interaktion, wohingegen diese Interaktion in Anwesenheit von Pioglitazon/PMA verstärkt werden konnte. D.h. in Anwesenheit des PPAR $\gamma$ -Liganden Pioglitazon interagierten HMGA1 und SMRT miteinander. Diese Daten deuten darauf hin, dass HMGA1 nicht an der SMRT-vermittelten aktiven Repression beteiligt ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass PPAR $\gamma$  und SMRT

miteinander interagieren können (Nofsinger et al., 2008). Vermutlich interagieren zunächst HMGA1 und PPAR $\gamma$  und vermitteln die Transrepression, so dass die Korepressormoleküle SMRT weiterhin an den MMP-9 Promotor binden und die Gentranskription gestoppt werden kann.

### 5.3.4 Einfluss von NF $\kappa$ B

PMA kann die MMP-9 mRNA Expression über den NF $\kappa$ B-Signalweg induzieren (Mercurio and Manning, 1999; Hah and Lee, 2003; Ma et al., 2004a; Clark et al., 2008b). Vermutlich erfolgt also auch der Transrepressionsmechanismus über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B. Um diese Überlegungen zu untersuchen, wurde zunächst ein anderer inflammatorischer Stimulus, der ebenso den NF $\kappa$ B -Signalweg aktiviert verwendet.

Wie die Daten von Cho und Kollegen zeigten, kann der Wachstumsfaktor TNF $\alpha$  die MMP-9 Aktivität und das MMP-9 mRNA Expressionsniveau in Ratten-VSMCs erhöhen (Cho et al., 2000). Weiterhin wurde ergänzend zu den bisherigen Daten im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von HMGA1 auf die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression nach TNF $\alpha$ -Behandlung ermittelt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass TNF $\alpha$  die MMP-9 Expression signifikant induzieren konnte und zeigen weiterhin, dass die PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression von MMP-9 auch nach TNF $\alpha$ -Behandlung von HMGA1 abhängig ist. Dies bedeutet, dass PPAR $\gamma$  in Abhängigkeit von HMGA1 die MMP-9 Expression inhibieren konnte. Vermutlich erfolgt die Inhibierung auch durch Inhibierung des NF $\kappa$ B-Signalweges und könnte bedeuten, dass es sich um einen generellen Transrepressionmechanismus NF $\kappa$ B-abhängiger Targetgene handelt. Für den MMP-9 Promotor ist ein *cis*-regulatorisches NF $\kappa$ B-Element ca. 600 bp aufwärts des Transkriptionsstarts beschrieben worden. An diese Konsensus-Sequenz bindet nun NF $\kappa$ B als Dimer, welche sich meistens aus den zwei Untereinheiten p50 und p65 zusammensetzt. Im inaktiven Zustand ist dieses Dimer im Zytoplasma lokalisiert und erst nach Aktivierung gelangt es in den Zellkern und kann dort zur Aktivierung von NF $\kappa$ B-abhängigen Targetgenen wie MMP-9 führen (Chen and Greene, 2004). Arbeiten von Delerive und Kollegen zeigten, dass der Kernrezeptor PPAR $\alpha$  in VSMCs die Interleukin-6 (IL-6) Promotoraktivität abhängig von AP-1 und NF $\kappa$ B inhibieren kann. Die Interaktion findet allerdings promotorunabhängig statt und es sich vielmehr um eine physikalische Interaktion zwischen PPAR $\alpha$  und c-Jun/p65 Komplexen (Delerive et al., 1999).

Zur Klärung der Fragestellung, ob nun PPAR $\gamma$  und p65 auch durch physikalische Interaktion in die Transrepression von MMP-9 involviert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Co-Immunopräzipitation mit p65 und PPAR $\gamma$  durchgeführt. Zwischen den beiden Proteinen konnte allerdings sowohl basal als auch nach Pioglitazon/PMA Stimulation keinerlei Interaktion sichtbar

gemacht werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die p65 Untereinheit von NFκB und PPARγ nicht promotorunabhängig miteinander interagieren. Moon und Kollegen konnten dagegen zeigen, dass TNFα die MMP-9 Expression über die NFκB-Konsensussequenz des Promotors induziert (Moon et al., 2004). Demzufolge wäre auch ein Inhibierungsmechanismus über die Konsensussequenz denkbar. Es sollte daher die Beteiligung verschiedener MMP-9-Promotorbereiche an der PPARγ-vermittelten MMP-9 Regulation untersucht werden.

Die Ergebnisse der MMP-9 Promotorstudien zeigten, dass die NFκB-Sequenz des MMP-9 Promotors an der PPARγ induzierten Inhibierung beteiligt ist. Demzufolge gibt es keine physikalische Interaktion zwischen p65 und PPARγ, dennoch ist die NFκB-Konsensussequenz beteiligt an der PPARγ-vermittelten Transrepression.

Zur Klärung der Fragestellung, inwieweit weitere NFκB-regulierte Gene in VSMCs, in Abhängigkeit von HMGA1 durch PPARγ inhibiert werden, wurden weitere Gene untersucht, die proinflammatorische Mediatoren, die in die Pathogenese der Atherosklerose involviert sind und die ein putatives NFκB-Element in ihrer Promotorsequenz besitzen, untersucht. Dafür wurde zunächst Endothelin-1 (ET-1) ausgewählt. ET-1, ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, gilt als stärkster bisher bekannter Vasokonstriktor (Yanagisawa et al., 1988) und nach Aktivierung zur Kontraktion, Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen beiträgt, welches die wichtigsten Charakteristika der Atherosklerose darstellen (Alberts et al., 1994). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von ET-1 kann durch mechanische Faktoren bzw. durch lokale und zirkulierende Mediatoren induziert werden kann (Yanagisawa et al., 1988; Boulanger and Lüscher, 1990; Emori et al., 1991).

Zunächst zeigte sich, dass ET-1 basal schwach exprimiert ist und nach PMA-Stimulation zu einer gesteigerten ET-1 Expression führt. Die Pioglitazon-Stimulation führte in Anwesenheit von HMGA1 zu einer signifikanten Reduktion der ET-1 Expression, nicht aber in Abwesenheit von HMGA1. Diese Daten charakterisieren HMGA1 als neuen Kofaktor für die PPARγ-abhängige Transrepression sowohl für das MMP-9 Gen als auch für das ET-1 Gen in VSMCs. Die Ergebnisse zeigten, dass beide NFκB-regulierten Gene in Abhängigkeit von HMGA1 und PPARγ inhibiert werden können. Daher lässt sich vermuten, dass es sich um einen neuen generellen Mechanismus inflammatorischer Genregulation durch HMGA1 und PPARγ in VSMCs handelt.

Um diese Hypothese zu untersuchen wurden daher weitere NFκB-regulierte Gene ausgewählt und deren Expression nach siRNA-vermittelter HMGA1 Deletion und anschließender Pioglitazon/PMA Behandlung untersucht. Folgende Gene wurde dabei ausgewählt: das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (VCAM), der Interferon-regulierende Faktor (IRF2), der Chemokin-Ligand (CCL2), der Wachstumsfaktor (PDGF), das Intermediärfilament Vimentin (VIM) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF).

Generell zeigten alle diese untersuchten Gene eine Induktion der Genexpression durch PMA-Stimulation. Dies läßt vermuten, dass bei diesen Genen die Genaktivierung über den NFκB-Signalweg erfolgt. Desweiteren war zu erkennen, dass die Gene VCAM, IRF2 und CCL2 trotz HMGA1-siRNA Transfektion weiterhin eine Reduktion der PMA-induzierte Erhöhung des Expressionsniveaus aufzeigen. Dagegen wurde in den Genen PDGF, VIM und VEGF ähnlich wie ET-1 und MMP-9 durch die Suppression von HMGA1 keine verringerte Expression durch Pioglitazon-Stimulation erreicht.

Die Untersuchung dieser NFκB-regulierten Gene zeigte nun, dass tatsächlich nur einige Gene in Abhängigkeit von HMGA1 durch PPARγ-Aktivierung supprimiert werden können, jedoch eben nicht alle NFκB-regulierten Gene inhibiert werden können. Dies impliziert, dass hier verschiedene Regulationsmechanismen Einfluss nehmen und es keinen generellen Transrepressionsmechanismus für alle NFκB-regulierten Gene durch HMGA1 und PPARγ gibt. Zusätzlich zu den Expressionsanalysen wurde für den PDGF-Promotor und für den VCAM-Promotor die Rekrutierung von PPARγ, HMGA1, p65 und SMRT in An- und Abwesenheit von HMGA1 untersucht.

In Übereinstimmung mit den PDGF mRNA Expressionsdaten zeigte sich hier ein ähnliches Bindungsverhalten für PPARγ, HMGA1 und SMRT zum PDGF Promotor wie zum MMP-9 Promotor. Einzige Ausnahme hierbei ist die reduzierte p65 Bindung zum MMP-9 Promotor nach Pioglitazon-Behandlung in Anwesenheit von HMGA1. Ebenso wie Pascual und Kollegen am iNOS-Promotor keine abgeschwächte Bindung von p65 detektieren konnten (Pascual et al., 2005), konnte für den PDGF Promotor auch keine verminderte p65 Bindung nach Stimulation durch Pioglitazon/PMA in Anwesenheit von HMGA1 festgestellt werden. Die Rekrutierung von p65 scheint promotorabhängig reguliert zu sein, dies wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Promotorregulation in Abwesenheit von HMGA1 ist ebenfalls sehr ähnlich. Einziger Unterschied hierbei war, dass die SMRT Bindung nach Pioglitazon/PMA Stimulation in Abwesenheit von HMGA1 schwächer vermindert wurde.

Für den VCAM Promotor zeigt sich ein komplett anderes Bindungsverhalten. Die VCAM mRNA Expressionsdaten zeigten zwar eine PPARγ-vermittelte Transrepression, allerdings war diese im Gegensatz zu PDGF nicht von HMGA1 abhängig. Die VCAM Promotoranalyse zeigt, dass es zu keiner Rekrutierung von PPARγ, HMGA1 oder SMRT nach Pioglitazon/PMA Stimulation kommt. Es wurde lediglich eine p65 Rekrutierung nach PMA und Pioglitazon/PMA Stimulation zum VCAM-Promotor detektiert. Im basalen Zustand konnte ebenso eine SMRT Bindung ermittelt werden. Aber weder PPARγ noch HMGA1 wurden zum VCAM-Promotor rekrutiert. Diese Daten demonstrieren, dass es hier um verschiedene Mechanismen zur Inhibierung der Gentranskription handelt.

Arbeiten von Leung und Kollegen beschreiben, dass ein Unterschied von einem Nukleotid in dem NFκB-Element in verschiedenen Zielpromotoren ausreicht um eine Veränderung der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren hervorzurufen. Zum einen kann der Sequenzunterschied unterschiedliche Mitglieder der NFκB-Familie rekrutieren und zum anderen kann die Sequenz die Dimerbindung beeinflussen. Somit kann die Sequenz eben auch darauf Einfluss nehmen, welche Koaktivatoren an das NFκB-Dimer gebunden werden können. Dies lässt vermuten, dass die Bindungsstelle entscheidend ist für eine spezifische Konfiguration von gebundenen Transkriptionsfaktoren (Leung et al., 2004).

Vermutlich gibt es innerhalb der verschiedenen NFκB-Targetpromotoren eine hohe Promotorspezifität. Dies könnte ebenso für den Transrepressionsmechanismus relevant sein und somit eine mögliche Erklärung für die hier dargestellten Daten sein.

Weiterhin ist es möglich, dass die PPARγ-vermittelte Inhibierung von NFκB-regulierten Promotoren auch in Abwesenheit von PPARγ und HMGA1 am Zielpromotor stattfindet. Hierbei ist aus früheren Arbeiten bekannt, dass indirekte Mechanismen wie die Phosphorylierung von Histondeacetylasen entscheidend für die transkriptionelle Regulation sind (Jeyakumar et al., 2007). Weitere Studien wären also notwendig, um chemische Modifikationen und deren funktionelle Bedeutung zu analysen.

### 5.3.5 MMP-9 und ET-1 mRNA Expression in der A. femoralis

Zusätzlich zu den *in vivo*-MMP-9 Färbungen und den *in vitro*-mRNA Expressionsdaten in den VSMCs wurde die Expression der mRNAs von MMP-9 und ET-1 in der A. femoralis 21 Tage nach Dilatation ermittelt, da sowohl ET-1 als auch MMP-9 bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt sein kann. Immunhistochemische Studien demonstrieren, dass ET-1 aus atherosklerotischen Gefäßen sich nicht nur in Endothelzellen, sondern auch in der Gefäßmuskulatur nachweisen lässt (Monge, 1998). Gerade glatte Gefäßmuskelzellen, die im Begriff sind, in die Intima zu migrieren, produzieren Endothelin (Lüscher and Barton, 1997). Desweiteren stellt es eine chemotaktische Substanz für Makrophagen und Schaumzellen dar (Lüscher and Barton, 1997). Die biologische Wirkung des ET-1 erfolgt durch die Aktivierung von spezifischen Rezeptoren und führt zur Kontraktion, Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen. (Alberts et al., 1994). Aufgrund dieser Kenntnisse wurde in einem weiteren Versuchsansatz auch der Einfluss von PPARγ und HMGA1 auf die ET-1 Expression *in vivo* in der A. femoralis untersucht. Dabei zeigte sich, dass in der A. femoralis der unbehandelten Kontrollen beider Genotypen sowohl MMP-9 als auch ET-1 schwach exprimiert war. Durch die Dilatation der A. femoralis wurde die Expression von MMP-9 und ET-1 wiederum in beiden Genotypen signifikant erhöht. Aber nur in der Pioglitazon-behandelten Wildtypgruppe konnte

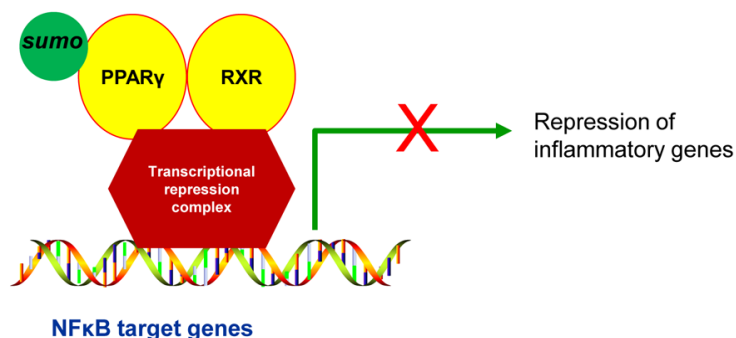


diese erhöhte Expression von MMP-9 und ET-1 reduziert werden, wohingegen sich in den Pioglitazon-behandelten HMGA1-defizienten Tieren keine Reduktion der erhöhten MMP-9 und ET-1 Expression zeigte. Diese *in vivo*-Daten bestätigen einerseits die *in vitro*-Experimente und demonstrieren andererseits deutlich, dass die Pioglitazon-vermittelte Repression sowohl von MMP-9 als auch von ET-1 in den HMGA1-defizienten Mäusen aufgehoben wurde. Diese Daten verdeutlichen die enorme Wichtigkeit des HMGA1/ PPAR $\gamma$  Signalweges für die gefäßschützenden Funktionen von PPAR $\gamma$ .

### 5.4 Methodische Diskussion

#### 5.4.1 HMGA1 und die Sumoylierung von PPAR $\gamma$

Die Ligand-abhängige Transrepression ist ein bedeutender Mechanismus für die Inhibierung inflammatorischer Gene durch PPAR $\gamma$ . Dabei konnte als bedeutender Mechanismus, dargestellt in Abbildung 5.4 für die anti-inflammatorischen Effekte von PPAR $\gamma$  die Sumoylierung von PPAR $\gamma$  gezeigt werden (Anbalagan et al., 2012).



**Abbildung 5.4** PPAR $\gamma$  Sumoylierung und transkriptionelle Repression inflammatorischer Gene

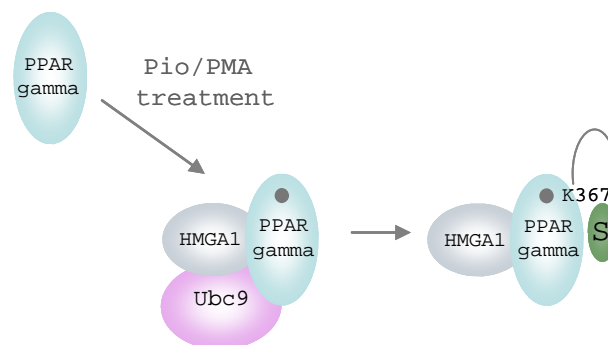
PPAR $\gamma$  Sumoylierung unterstützt die Interaktion mit Korepressorkomplexen auf NF $\kappa$ B-regulierten Promotoren und verhindert dadurch den Abbau und die Degradierung von Korepressorkomplexen und erhält somit die Inhibierung der inflammatorischen Gene, verändert nach Anbalagan et al., 2012

In Makrophagen inhibiert PPAR $\gamma$  den induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) Promotor durch PPAR $\gamma$  Sumoylierung und erhält dadurch die Korepressorbindung zum iNOS-Promotor aufrecht (Pascual et al., 2005). Ebenfalls in Makrophagen konnte gezeigt werden, dass der sumoylierte PPAR $\gamma$ -Rezeptor zur Verhinderung der LPS-induzierten Entfernung des Korepressors NCoR von der NF $\kappa$ B-Konsensussequenz des TNF $\alpha$ -Promotors führt (Jennwein et al., 2008). Weitere Arbeiten von Haschemi und Kollegen zeigten, dass Kohlenmonoxid die Sumoylierung von PPAR $\gamma$  auslöst und damit die LPS-induzierte Expression des proinflammatorischen Gens Egr-1 (early growth response-1) in Makrophagen durch die PPAR $\gamma$ -

Aktivierung inhibiert (Haschemi et al., 2011). Unsere bisherigen Daten konnten belegen, dass HMGA1 in die PPAR $\gamma$ -vermittelte Transrepression involviert ist. Desweiteren konnten Pascual und Kollegen zeigen, dass die SUMO E2 Ligase Ubc9 die PPAR $\gamma$  Sumoylierung vermittelt. Zusätzlich dazu konnte im Jahr 2007 Ubc9 als HMGA1 interagierendes Protein von Li und Kollegen identifiziert werden (Li et al., 2007).

Aufgrunddessen sollte nun eine Beteiligung der Ubc9-Sumoylierung an der HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten MMP-9 Regulation mittels Co-Immunopräzipitation zwischen den beteiligten Kofaktoren HMGA1, Ubc9 und PPAR $\gamma$  untersucht werden. Wir konnten zeigen, dass in Anwesenheit des PPAR $\gamma$ -Liganden Pioglitazon HMGA1 und Ubc9 einen Komplex bilden und dass zwischen PPAR $\gamma$  und HMGA1 eine Komplexbildung detektierbar ist. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass PPAR $\gamma$  nach Aktivierung durch seinen Liganden einen Komplex mit HMGA1 und Ubc9 bildet. Ergänzend zu den Interaktionsstudien wurde die PPAR $\gamma$  Sumoylierung untersucht. Diese Daten zeigten, dass PPAR $\gamma$  in Anwesenheit von HMGA1 sumoyliert wurde.

Um die Relevanz der PPAR $\gamma$  Sumoylierungsstellen für den HMGA1/PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepressionsmechanismus zu ermitteln, wurden zwei PPAR $\gamma$  Konstrukte PPAR $\gamma^{K97R}$  und PPAR $\gamma^{K367R}$  mit mutierten Sumoylierungsstellen zur Bestimmung der Promotoraktivität des humanen MMP-9 Promotors in An- und Abwesenheit von HMGA1 verwendet. Diese Daten zeigten, dass das Konstrukt PPAR $\gamma^{K97R}$  keinerlei Einfluss auf die MMP-9 Promotoraktivität hat. Dagegen ist das Konstrukt PPAR $\gamma^{K367R}$  entscheidend für die Glitazon-vermittelten Effekte von PPAR $\gamma$  und HMGA1 auf die MMP-9 Promotoraktivität, denn hierbei konnte keine Inhibierung der PMA-induzierten MMP-9 Promotoraktivität detektiert werden. In der nachfolgenden Abbildung 5.5 ist die PPAR $\gamma$  Sumoylierung dargestellt.



**Abbildung 5.5** PPAR $\gamma$  Sumoylierung mit HMGA1 und Ubc9

PPAR $\gamma$  bildet nach Aktivierung durch seinen Liganden einen Komplex mit HMGA1 und Ubc9 und wird in Anwesenheit von HMGA1 sumoyliert.

In den Arbeiten von Haschemi et. al. wurden zwei vergleichbare PPAR $\gamma$  Sumoylierungskonstrukte zur weiteren Untersuchung der PPAR $\gamma$  Sumoylierung verwendet. Das sumoylierungsdefekte Konstrukt in der Region K367 hob die Kohlenmonoxid-vermittelte Inhibierung der LPS-induzierten Egr-1 Promotoraktivität auf, wohingegen das Konstrukt mit Modifikation den Kohlenmonoxid-Effekt nicht beeinflusste (Haschemi et al., 2011).

Diese Daten bestätigen, dass die Sumoylierung der PPAR $\gamma$  Ligandbindungsdomäne am Lysinrest K367 für die Transrepression verantwortlich ist (Pascual et al., 2005; Haschemi et al., 2011), wohingegen weitere Daten zeigten, dass die Sumoylierung innerhalb der AF1-Domäne von PPAR $\gamma$  in die Genaktivierung involviert ist (Floyd and Stephens, 2004; Ohshima et al., 2004). Hiermit konnten diese Daten verdeutlichen, dass sowohl der neu identifizierten Kofaktor HMGA1 als auch die PPAR $\gamma$  Sumoylierung, welche von der SUMO E2 Ligase Ubc9 vermittelt wird, für die Transrepression in VSMCs notwendig ist.

Für den vollständigen Nachweis, dass die Sumoylierungsstelle K365R entscheidend ist für die anti-inflammatorischen Effekte von PPAR $\gamma$ , müßte man mit den mutierten PPAR $\gamma$ -Konstrukten PPAR $\gamma^{K97R}$  und PPAR $\gamma^{K367R}$  die Sumoylierung mittels Co-Immunopräzipitation nachweisen. Die Versuche für die Co-Immunopräzipitation wurde in HeLa-Zellen etabliert. Demzufolge müßten für diese Versuche HeLa-Zellen mit den PPAR $\gamma$ -Konstrukten überexprimiert werden und anschließend die Co-Immunopräzipitation durchgeführt werden. Diese Daten konnten leider nicht generiert werden, da die Überexpression der mutierten PPAR $\gamma$ -Konstrukte in HeLa-Zellen nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Überexpression konnte nur in HEK-Zellen erreicht werden, aber für diese Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Co-Immunopräzipitation nicht etabliert werden.

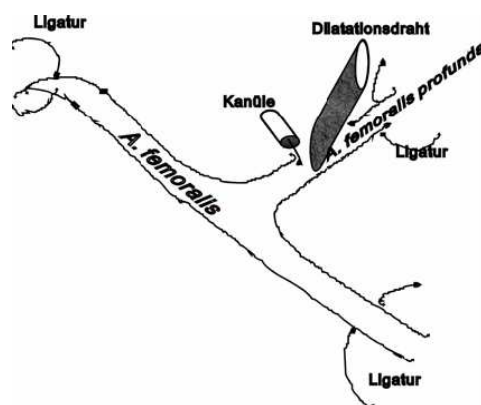
Das bedeutet, dass der vollständige Nachweis, dass die Sumoylierungsstelle K365R sumoyliert wird, nicht erbracht werden konnte, dennoch deuten die Ergebnisse aus den durchgeführten Versuchen stark darauf hin.

### 5.4.2 Relevanz des Tiermodells

Zur Untersuchung der Proliferation und Migration der Gefäßmuskelzellen wurde das von Sata et. al. im Jahr 2000 publizierte Mausmodell der Dilatation der Femoralarterie verwendet (Sata et al., 2000). Dabei kommt es nach mechanischer Verletzung der Gefäßwand zum Heilungsprozess im Gefäß, der Restenose. Die Restenose beinhaltet zwei wesentliche Schlüsselprozesse zum einen die neointimale Hyperplasie (VSMC Migration und Proliferation, extrazelluläre Matrixablagerung) und das Gefäßremodeling (Sata et al., 2000). Daneben existieren weitere Modelle. So die von Lindner et al. entwickelte Methode, bei der anhand des intraluminalen Einführen eines Drahtes in die Karotis die Entstehung von intimalen Läsionen nach zwei

Wochen erzielt wurde (Lindner et al., 1993). Diese Läsionen bedeckten allerdings eher eine kleine Fläche und erreichten nur eine Dicke von zwei bis drei Zellschichten (Kumar and Lindner, 1997). Zusätzlich ist die Entstehung von Läsionen in diesem Mausmodell erheblich vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig (Carmeliet et al., 1998). Aufgrund des technischen Anspruchs und der geringen Zellantwort besitzt diese Methode also deutliche Nachteile. Eine weitere Alternative wäre die Arbeit mit Ratten gewesen. Der eindeutige Vorteil ist, dass man durch die größeren Gefäße eine Ballonangioplastie durchführen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich dennoch für das Arbeiten am Mausmodell entschieden, da hierdurch die Möglichkeit bestand, die Experimente auch in Knockout-Tieren durchführen zu können. So konnten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten an HMGA1-defizienten Mäusen verifiziert werden.

Die hier gewählte Methode zur Dilatation der murinen Femoralarterie ist einer Ballonangioplastie nachempfunden. Der Blutfluss wird hierbei durch Ligation am distalen und proximalen sichtbaren Ende der Femoralarterie unterbrochen. An dem abgehenden Ast der Femoralarterie (Arteria profunda femoralis) wird das Gefäß eröffnet und ein Draht in die Femoralarterie eingeführt. Nach etwa einer Minute wird der Draht wieder entfernt, das eröffnete abgehende Gefäß ligiert und der Blutfluss wieder hergestellt (Abbildung 5.6). Das Gefäßlumen bleibt nun dauerhaft erweitert, als Folge der Überdehnung durch den Draht, ist die Tunica media ausgedünnt. Während die externe Lamina des Gefäßes erweitert ist, verringert sich das Gefäßlumen durch eine fortschreitende Hyperplasie der SMCs in der Regel über den gesamten Bereich der Dilatation. Als Zeitpunkt für die Analysen wurden 21 Tage nach der Operation gewählt, da nach 21 Tagen die Proliferation und Migration der VSMCs abgeschlossen ist.



**Abbildung 5.6** Zeichnung der endovaskulären Verletzung der Femoralarterie modifiziert nach Sata et al., 2000

Das hier verwendete Verletzungsmodell untersucht somit die Mechanismen der Atherogenese, wobei die Proliferation und Migration der VSMCs dabei sehr gut analysiert werden kann. Jedoch kommen heutzutage neben den Verletzungsmodellen noch weitere verschiedene Mausmodelle zur Erforschung der Atherosklerose zum Einsatz. Gut validierte und international eingesetzte Mausmodelle sind dabei die ApoE-defiziente Maus, die LDL-Rezeptor-defiziente Maus oder es wird eine Kombination aus beiden verwendet (Breslow, 1996). ApoE-defizient bedeutet, dass hier eine Blockade in der Apolipoprotein E Synthese vorliegt. ApoE ist ein wichtiges Strukturprotein der Chylomikronen, der VLDL (very low density lipoprotein) und HDL (high density lipoprotein) und stellt einen hochaffinen Liganden für Lipoproteinpartikel dar, der sich am Transport und an der Beseitigung von Lipiden aus dem Plasma beteiligt und antiatherogen wirkt. Durch die Ausschaltung des ApoE-Gens entwickeln die Mäuse bereits unter einer Standarddiät eine spontane Hyperlipidämie mit dadurch bedingten schweren atherosklerotischen Läsionen (Zhang et al., 1992; Reddick et al., 1994; Breslow, 1996; Mahley and Rall, 2000).

Bei der LDL-Rezeptor-defizienten Maus ist der Rezeptor für das Low Density Lipoprotein (LDL), welches zum Transport von Fettsäuren, Cholesterin sowie fettlöslichen Vitaminen in die Zellen dient, blockiert. Als Folge davon reichert sich LDL im Plasma an und es kommt zu Ablagerungen im Gewebe (Plump et al., 1992; Mori et al., 1999; Tomkin, 2010). Die Tiere entwickeln eine Hypercholesterinämie und es kommt zu atherosklerotischen Veränderungen in der Gefäßwand. In Abhängigkeit von der jeweiligen Diät verhält sich der Cholesterinspiegel. Durch eine hohe Zufuhr von Lipiden und Cholesterin kann man das Auftreten atherosklerotischer Läsionen fördern und bereit nach einigen Wochen eine Hypercholesterinämie beobachten. (Paigen et al., 1985; Ishibashi et al., 1994; Plump and Breslow, 1995) Dabei durchlaufen die Gefäße der Maus ähnliche Stadien der Atherosklerose wie sie in humanen Gefäßen zu beobachten sind (Plump and Breslow, 1995). Tiere mit einem ApoE/LDL-Rezeptor-Doppelknockout entwickeln dann trotz normaler Ernährung schwere Hyperlipidämie sowie Atherosklerose, aufgrund der zusätzlichen Erhöhung des LDL und VLDL Cholesterins durch den LDL-Rezeptor-Knockout (Breslow, 1996). Auch die Wirkung verschiedener PPAR $\gamma$ -Aktivatoren wurde in diesen Mausmodellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beispielsweise in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen die Atheroskleroseentwicklung durch Glitazonbehandlung erfolgreich verringert werden konnte (Law et al., 1996; Li et al., 2000a; Collins et al., 2001). Dennoch haben wir uns im Rahmen dieser Arbeit für ein Verletzungsmodell entschieden, denn im Focus dieser Arbeit sollten die Mechanismen zur Proliferation und Migration von VSMCs unter dem Einfluss einer Glitazonbehandlung analysiert werden.

### 5.4.3 Nachweis von MMP-9

Eine der gefäßschützenden Funktionen von PPAR $\gamma$  ist die Inhibierung der Neointimabildung und MMP-9 ist ein entscheidender Mediator in der Neointimaausbildung von verletzten Gefäßen (Marx et al., 1998a; Cho and Reidy, 2002).

MMP-9 beeinflusst dabei nicht nur die Migration der Gefäßmuskelzellen von der Tunica media in die Tunica intima, sondern reguliert auch die VSMC-Proliferation in den verletzten Gefäßen (Cho and Reidy, 2002). Daher wurde eine immunhistochemische Färbung gegen MMP-9 in der A. femoralis von Wildtyp-Mäusen und HMGA1-defiziente Mäusen 21 Tage nach Gefäßdilatation durchgeführt. Nach einer Gefäßverletzung ist die MMP-9 Färbung sowohl in der Tunica media als auch in der Tunica intima detektierbar (Godin et al., 2000; Li et al., 2011).

Diese Daten konnten im verwendeten Mausmodell nur teilweise bestätigt werden. In den Vehikel-behandelten dilatierten Femoralarterien der Wildtyp- und HMGA1-defizienten Tiere zeigte sich im wesentlichen eine MMP-9 Färbung in der Tunica media und eine eher schwache Färbung in der Tunica intima. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte der untersuchte Zeitpunkt, das Niveau der MMP-9 Aktivität oder das Stadium der Plaquentwicklung sein. Wie schon zu Beginn dieser Arbeit erwähnt ist, kann man in normalen, gesunden Gefäßen die MMP-9 Expression nur sehr schwach nachweisen. Erfolgt aber eine Gefäßverletzung in der Maus ist bekannt, dass die MMP-9 Expression nach 12 Stunden ansteigt (Cho and Reidy, 2002). Direkt im Anschluss beginnt die Proliferation der VSMCs in der Media und erreicht ihr Maximum nach 2 Tagen (Bendeck et al., 1994). Dies bedeutet, dass MMP-9 zunächst vor der VSMC-Migration nachweisbar ist. Außerdem ist bekannt, dass MMP-9 für etwa sieben Tage verstärkt exprimiert wird (Cho and Reidy, 2002). Die ersten VSMCs gelangen nach ungefähr vier Tagen in die Intima und haben ihre maximale Proliferationsrate ebenfalls nach ungefähr sieben Tagen erreicht (Bendeck et al., 1994; Zempo et al., 1994). Die ansteigende Zahl der VSMCs und die neu synthetisierte extrazelluläre Matrix führen dann zu einer verdickten Intima, wobei die maximale Intimadicke nach 3-4 Wochen erreicht wird (Bendeck et al., 1994). Arbeiten von Bendeck und Kollegen aus dem Jahre 1996 zeigten, dass die Inhibierung der MMP-Aktivität die VSMC-Migration, aber nicht neointimale Verdickung des verletzten Gefäßes hemmt (Bendeck et al., 1996). Es könnte also möglich sein, dass die verstärkte MMP-9 Expression nur für Initiierung der Migration und für die Proliferation in der Media verantwortlich ist und dass nach erfolgter Einwanderung in die Intima der MMP-9 Expressionsspiegel wieder abgebaut wird. Dies würde die starke Färbung der Media und die deutlich schwächere Färbung der Intima erklären können. Weiterhin konnte in den Wildtyptieren, die mit Pioglitazon behandelt worden sind beobachtet werden, dass die MMP-9 Färbung schwächer war, wohingegen in den HMGA1-defizienten Mäusen kein Unterschied in der MMP-9 Färbung zu erkennen war.

### 5.4.4 Phänotypische VSMC-Modulation

Während der Neointimabildung verändert sich der Phänotyp der VSMCs vom kontraktilen hin zum dedifferenzierten, proliferativen Phänotyp (Owens et al., 2004). Diese Modulationsprozesse sind gekennzeichnet durch Veränderungen im Proteinexpressionsmuster. (Kawai-Kowase and Owens, 2007). Als Nachweis für den veränderten Phänotyp der VSMCs wären immunhistochemische Färbungen gegen spezifische VSMC-Markerproteine in der A. femoralis von Wildtyp-Mäusen und HMGA1-defiziente Mäusen 21 Tage nach Gefäßdilataion am besten geeignet gewesen. Allerdings war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich immunhistochemische Färbungen mit den entsprechend verwendeten Antikörpern zu etablieren. Daher wurde das mRNA Expressionsniveau spezifischer VSMC-Marker für den kontraktilen und den proliferativen Phänotyp in den Wildtyp- und HMGA1-defizienten Tieren nach der Gefäßverletzung mit  $\pm$  Pioglitazon untersucht. Diese Expressionsdaten zeigen, dass die Behandlung mit Pioglitazon in den Wildtyp-Tieren den phänotypischen Veränderungen der VSMCs - hervorgerufen durch die Gefäßverletzung - vorbeugen konnte. Im Unterschied dazu war dieser Effekt in den HMGA1-defizienten Mäusen stark abgeschwächt bzw. die Modulation hin zum proliferativen Phänotyp war in den verletzten A. femoralis, der mit Pioglitazon-behandelten HMGA1-defizienten Mäuse erkennbar. Diese Expressionsdaten in den Pioglitazon-behandelten HMGA1-defizienten Mäusen deuteten auf eine gesteigerte Proliferation und Migration von VSMCs hin und bestätigten somit die enorme Relevanz des HMGA1-Proteins für den PPAR $\gamma$ -vermittelten Gefäßschutz.

### 5.5 Ausblick

Das Verständnis der zellulären Interaktionen in der Gefäßwand bei der Atherosklerose hat sich zwar in den letzten Jahren stark erweitert, dennoch stellt die Erkrankung trotz Entwicklung neuer invasiver und medikamentöser Therapieformen weiterhin ein schwerwiegendes Problem dar (WHO). Die Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima sind dabei wesentliche Pathomechanismen der Erkrankung (Ross, 1995). Ein Eingriff in diese Regulationsmechanismen stellt neben einem anti-inflammatorischen Ansatz auch eine vielversprechende Therapiestrategie zur Prävention und Behandlung der Atherosklerose dar.

Vor allem die Aktivierung des Kernrezeptors PPAR $\gamma$  mittels spezifischer Liganden könnte sich dabei als wirksamer Ansatz für die Prävention und Therapie vaskulärer Umbauprozesse erweisen. Eine Reihe von Arbeiten konnten zeigen, dass die Glitazon-vermittelte Aktivierung von PPAR $\gamma$  entscheidende gefäßschützende Effekte ausübt (siehe Einleitung 1.2.4 Vaskuläre Effekte von PPAR $\gamma$ ). Die zugrundeliegende Mechanismen sind dabei allerdings weitestgehend

unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der molekulare Signalweg für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression mit dem HMGA1-Protein als entscheidenden neuen Kofaktor in Gefäßmuskelzellen charakterisiert. Dabei konnte am Beispiel der Matrixmetalloproteinase 9 gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  zusammen mit dem Kofaktor HMGA1 die Dissoziation des Korepressors SMRT inhibiert und somit die Genexpression verhindert. Der neu identifizierte Kofaktor HMGA1 als auch die PPAR $\gamma$  Sumoylierung sind dabei entscheidend für die Transrepression in VSMCs.

Der Kernrezeptor PPAR $\gamma$  stellt eine vielversprechende Zielstruktur zur Prävention und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen dar. Allerdings sind die derzeit klinisch verwendeten Glitazone häufig durch die auftretenden Nebenwirkungen wie Körpergewichtszunahme, Flüssigkeitsretention und Ödeme limitiert und zeigen sogar ein potentiell erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Nesto et al., 2003; Dormuth et al., 2009; Bourg and Phillips, 2012). Durch die Entwicklung von neuen Liganden, die eine selektive Bindung von Kofaktoren induzieren, könnten die Nebenwirkungen reduziert werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung dieser Liganden ist aber ein fundiertes Verständnis der Interaktion von PPAR $\gamma$  und dem entsprechenden Kofaktor.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Informationen könnten dazu benutzt werden, um neue selektive PPAR $\gamma$ - Modulatoren - sogenannte SPPARMS - mit einem spezifischen Kofaktorbündungsprofil zu entwickeln. Das bedeutet, dass man mit Hilfe des neu identifizierten Kofaktors HMGA1 Liganden entwickelt, die PPAR $\gamma$  gezielt in der Gefäßwand aktivieren. Durch die direkte Wirkung im Gefäß könnte man die klinische Wirksamkeit erhöhen. Zusätzlich könnte man das Nebenwirkungsprofil abschwächen und Nebenwirkungen wie Ödeme und Gewichtszunahme würden dann keine bzw. eine geringere Rolle spielen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern somit eventuell neue therapeutische Ideen und Ansätze zur Entwicklung von SPPARMS, die gezielt in der Gefäßwand anti-inflammatorische Effekte ausüben könnten.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### 6.1 Zusammenfassung

Der Kernrezeptor Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ist verantwortlich für die Genregulation von vaskulären Zellen und übt so entscheidende gefäßschützende Effekte aus. In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Wirkungsweise von PPAR $\gamma$  in der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression in humanen Gefäßmuskelzellen (VSMCs) charakterisiert. Zur Erforschung der PPAR $\gamma$ -abhängigen Transrepression in der Regulation bedeutender Gene für die Entstehung der Atherosklerose in der Gefäßwand wurde die Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) exemplarisch ausgewählt, welche eine wesentliche Funktion bei den pathologischen Gefäßwandumbauprozessen einnimmt.

Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern von PPAR $\gamma$  wurde ein Expressionsprofil für humane Kernrezeptoren und Koregulatoren von humanen Gefäßmuskelzellen mittels Oligo GEArray® (SuperArray®) erstellt, wobei das Nicht-Histon Kernprotein High Mobility Group Protein A1 (HMGA1) als ein neuer Koregulator von PPAR $\gamma$  in der Gefäßwand identifiziert werden konnte. Die Ermittlung der HMGA1-Funktion für den PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepressionsmechanismus zeigte einerseits, dass die HMGA1 Depletion die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression blockiert und somit zu einer Aufhebung der Pioglitazon-Wirkung führt und andererseits, dass in den mit HMGA1-überexprimierten Zellen die Pioglitazon-Stimulation zu einer verstärkten Reduktion der MMP-9 Expression führt. Diese Daten charakterisieren erstmals HMGA1 als neuen Kofaktor für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression in VSMCs und zeigen einen neuen Mechanismus anti-inflammatorischer Genregulation durch HMGA1 und PPAR $\gamma$  in VSMCs.

Ein bedeutender Mechanismus für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression inflammatorischer Gene ist die Sumoylierung von PPAR $\gamma$ . Interaktionsstudien zeigten, dass PPAR $\gamma$  in Anwesenheit von HMGA1 sumoyliert wurde, wobei die Sumoylierungsstelle K367R entscheidend ist. Weiterhin konnte mittels Co-Immunopräzipitation bestätigt werden, dass es nach PPAR $\gamma$ -Aktivierung zur Komplexbildung von HMGA1 und SUMO E2 Ligase Ubc9 kommt. Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) Experimente belegen, dass die ligand-abhängige PPAR $\gamma$ -Aktivierung zur Rekrutierung von PPAR $\gamma$  und HMGA1 zum MMP-9 Promotor führt. Desweiteren führte die Bindung von PPAR $\gamma$  dazu, dass der SMRT-Korepressor nicht mehr vom MMP-9 Promotor entfernt wurde und es somit zur Inhibierung der Transkription kommt. Zusätzlich wurde die Kofaktor-Rekrutierung in Abwesenheit von HMGA1 untersucht.

Der Kernrezeptor PPAR $\gamma$  und auch der Korepressor SMRT waren nicht mehr an den MMP-9 Promotor gebunden, jedoch die RNA Polymerase II und die NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 blieben mit dem MMP-9 Promotor assoziiert, so dass die Abwesenheit von HMGA1 zur Aufhebung der Inhibierung der MMP-9 Promotoraktivität führte. Diese Daten verdeutlichen, dass sowohl der neu identifizierten Kofaktor HMGA1 als auch die PPAR $\gamma$  Sumoylierung, welche von der SUMO E2 Ligase Ubc9 vermittelt wird für die Transrepression in VSMCs notwendig ist.

Weiterhin wurde die Relevanz der HMGA1/PPAR $\gamma$ -Interaktionen auf die gefäßschützenden Funktionen von PPAR $\gamma$  im Tiermodell bestätigt. Die Dilatation der A. femoralis der Wildtyp als auch der HMGA1-defizienten Mäuse der Vehikelgruppe führte zu einer starken Neointimabildung. Die Behandlung mit Pioglitazon führte in den Wildtyptieren zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung, wohingegen die Glitazon-Behandlung in den HMGA1-defizienten Mäusen keinen Einfluss auf die Neointimaausbildung zeigte. Diese *in vivo*-Daten zeigten, dass der Pioglitazon-vermittelte Gefäßschutz in den HMGA1-defizienten Mäusen aufgehoben wurde und bestätigen somit die *in-vitro*-Versuche und die Bedeutung des HMGA1 Proteins in der PPAR $\gamma$ -vermittelten Transrepression.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit der molekulare Signalweg für die PPAR $\gamma$ -abhängige Transrepression mit dem HMGA1-Protein als entscheidenden neuen Kofaktor in Gefäßmuskelzellen charakterisiert. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern neue Informationen zum besseren Verständnis der anti-inflammatorischen Effekte von PPAR $\gamma$  in der Gefäßwand und bieten somit eventuell neue therapeutische Möglichkeiten.

### 6.2 Summary

The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is an important regulator of gene transcription in vascular cells and mediates the vascular protection observed with antidiabetic glitazones. We focused on the molecular mechanism of ligand-dependent transrepression in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and their impact on the vascular protective actions of PPAR $\gamma$ . Here, we report a molecular pathway in VSMCs by which ligand-activated PPAR $\gamma$  represses transcriptional activation of the matrix-degrading matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene, a crucial mediator of vascular injury.

PPAR $\gamma$ -mediated transrepression of the MMP-9 gene was dependent on the presence of the high-mobility group A1 (HMGA1) protein, a gene highly expressed in vascular smooth muscle cells, newly identified by oligonucleotide array expression analysis. Using siRNA against HMGA1 in VSMCs completely prevented MMP-9 inhibition by glitazone-activated PPAR $\gamma$  and HMGA1 overexpression resulted in strongly pioglitazone-induced MMP-9 repression supporting the importance of HMGA1.

The Role of PPAR $\gamma$  SUMOylation was determined by transactivation assays. PPAR $\gamma^{K367R}$  did not inhibit the MMP-9 promoter, whereas PPAR $\gamma^{K77R}$  retained full transrepression activity. To further support the involvement of SUMOylation we studied the interaction between HMGA1 and the SUMO E2 ligase Ubc9 by immunoprecipitation experiments and we could show that after PPAR $\gamma$ -ligand stimulation PPAR $\gamma$  forms a complex with HMGA1-Ubc9 which likely facilitates its SUMOylation. ChIP experiments demonstrate that after PPAR $\gamma$  ligand stimulation, HMGA1 and PPAR $\gamma$  were recruited to the MMP-9 promoter, which facilitated binding of the silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT), a nuclear corepressor involved in transrepression. ChIP assays using siRNA against HMGA1 show a complete loss of PPAR $\gamma$  binding to the MMP-9 promoter.

Consistent with these findings, HMGA1's relevance for vascular PPAR $\gamma$  signalling was underlined by the complete absence of vascular protection through a PPAR $\gamma$ -ligand in HMGA1 $^{-/-}$  mice after arterial wire-injury.

To conclude, our data suggest that ligand-dependent formation of HMGA1-Ubc9-PPAR $\gamma$  complexes facilitates PPAR $\gamma$  SUMOylation, which results in the prevention of SMRT corepressor clearance and induction of MMP-9 transrepression. These data provide new information on PPAR $\gamma$ -dependent vascular transcriptional regulation and help us to understand the molecular consequences of therapeutic interventions with PPAR $\gamma$  ligands in the vasculature.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Akiyama, T.E., Sakai, S., Lambert, G., Nicol, C.J., Matsusue, K., Pimprale, S., Lee, Y.-H., Ricote, M., Glass, C.K., Brewer, H.B., Jr, et al. (2002). Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2607–2619.

Alberts, G.F., Peifley, K.A., Johns, A., Kleha, J.F., and Winkles, J.A. (1994). Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 269, 10112–10118.

Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., and Rowan, B.G. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal* 10, e001.

Armoni, M., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Milo, S., and Karnieli, E. (2005). Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. *J. Biol. Chem.* 280, 34786–34795.

Attema, J.L., Reeves, R., Murray, V., Levichkin, I., Temple, M.D., Tremethick, D.J., and Shannon, M.F. (2002). The human IL-2 gene promoter can assemble a positioned nucleosome that becomes remodeled upon T cell activation. *J. Immunol.* 169, 2466–2476.

Bagga, R., Michalowski, S., Sabnis, R., Griffith, J.D., and Emerson, B.M. (2000). HMG I/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology. *Nucleic Acids Res.* 28, 2541–2550.

Baldassarre, G., Battista, S., Belletti, B., Thakur, S., Pentimalli, F., Trapasso, F., Fedele, M., Pierantoni, G., Croce, C.M., and Fusco, A. (2003). Negative regulation of BRCA1 gene expression by HMGA1 proteins accounts for the reduced BRCA1 protein levels in sporadic breast carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2225–2238.

Bendeck, M.P., Irvin, C., and Reidy, M.A. (1996). Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ. Res.* 78, 38–43.

Bendeck, M.P., Zempo, N., Clowes, A.W., Galardy, R.E., and Reidy, M.A. (1994). Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ. Res.* 75, 539–545.

Berger, J., and Moller, D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409–435.

Bianchi, M.E., and Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 496–506.

Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 197–250.

Bishop-Bailey, D., Hla, T., and Warner, T.D. (2002). Intimal smooth muscle cells as a target for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand therapy. *Circ. Res.* 91, 210–217.

- Blaschke, F., Bruemmer, D., Yin, F., Takata, Y., Wang, W., Fishbein, M.C., Okura, T., Higaki, J., Graf, K., Fleck, E., et al. (2004). C-reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells. *Circulation* 110, 579–587.
- Bond, M., Fabunmi, R.P., Baker, A.H., and Newby, A.C. (1998). Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 435, 29–34.
- Boulanger, C., and Lüscher, T.F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 85, 587–590.
- Bourg, C.A., and Phillips, B.B. (2012). Rosiglitazone, myocardial ischemic risk, and recent regulatory actions. *Ann Pharmacother* 46, 282–289.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597–601.
- Breslow, J.L. (1996). Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272, 685–688.
- Brinckerhoff, C.E., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 207–214.
- Bruemmer, D., Berger, J.P., Liu, J., Kintscher, U., Wakino, S., Fleck, E., Moller, D.E., and Law, R.E. (2003). A non-thiazolidinedione partial peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Eur. J. Pharmacol.* 466, 225–234.
- Bruemmer, D., Blaschke, F., and Law, R.E. (2005). New targets for PPARgamma in the vessel wall: implications for restenosis. *Int J Obes (Lond)* 29 Suppl 1, S26–30.
- Bustin, M. (1999). Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5237–5246.
- Bustin, M., and Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 54, 35–100.
- Calnek, D.S., Mazzella, L., Roser, S., Roman, J., and Hart, C.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 52–57.
- Carmeliet, P., Moons, L., and Collen, D. (1998). Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc. Res.* 39, 8–33.
- Catez, F., Yang, H., Tracey, K.J., Reeves, R., Misteli, T., and Bustin, M. (2004). Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4321–4328.
- Chau, K.-Y., Keane-Myers, A.M., Fedele, M., Ikeda, Y., Creusot, R.J., Menozzi, L., Cousins, D.J., Manfioletti, G., Feigenbaum, L., Fusco, A., et al. (2005). IFN-gamma gene expression is controlled by the architectural transcription factor HMGA1. *Int. Immunol.* 17, 297–306.

- Chau, K.Y., Patel, U.A., Lee, K.L., Lam, H.Y., and Crane-Robinson, C. (1995). The gene for the human architectural transcription factor HMGI-C consists of five exons each coding for a distinct functional element. *Nucleic Acids Res.* 23, 4262–4266.
- Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., et al. (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* 7, 161–171.
- Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457.
- Chen, L.-F., and Greene, W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 392–401.
- Chiappetta, G., Avantaggiato, V., Visconti, R., Fedele, M., Battista, S., Trapasso, F., Merciai, B.M., Fidanza, V., Giancotti, V., Santoro, M., et al. (1996). High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene* 13, 2439–2446.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Torra, I.P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., et al. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* 7, 53–58.
- Cho, A., Graves, J., and Reidy, M.A. (2000). Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2527–2532.
- Cho, A., and Reidy, M.A. (2002). Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ. Res.* 91, 845–851.
- Chung, S.W., Kang, B.Y., Kim, S.H., Pak, Y.K., Cho, D., Trinchieri, G., and Kim, T.S. (2000). Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 275, 32681–32687.
- Clark, I.M., Swingler, T.E., Sampieri, C.L., and Edwards, D.R. (2008a). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1362–1378.
- Clark, I.M., Swingler, T.E., Sampieri, C.L., and Edwards, D.R. (2008b). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1362–1378.
- Cleynen, I., and Van de Ven, W.J.M. (2008). The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int. J. Oncol.* 32, 289–305.
- Collins, A.R., Meehan, W.P., Kintscher, U., Jackson, S., Wakino, S., Noh, G., Palinski, W., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (2001). Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 365–371.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9, 899–909.

Cominacini, L., Garbin, U., Fratta Pasini, A., Campagnola, M., Davoli, A., Foot, E., Sighieri, G., Sironi, A.M., Lo Cascio, V., and Ferrannini, E. (1998). Troglitazone reduces LDL oxidation and lowers plasma E-selectin concentration in NIDDM patients. *Diabetes* 47, 130–133.

Delerive, P., Martin-Nizard, F., Chinetti, G., Trottein, F., Fruchart, J.C., Najib, J., Duriez, P., and Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ. Res.* 85, 394–402.

Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K., Derijard, B., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., et al. (2001). Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* 193, 827–838.

Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649–688.

De Dios, S.T., Bruemmer, D., Dilley, R.J., Ivey, M.E., Jennings, G.L.R., Law, R.E., and Little, P.J. (2003). Inhibitory activity of clinical thiazolidinedione peroxisome proliferator activating receptor-gamma ligands toward internal mammary artery, radial artery, and saphenous vein smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 107, 2548–2550.

Disney, J.E., Johnson, K.R., Magnuson, N.S., Sylvester, S.R., and Reeves, R. (1989). High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes. *J. Cell Biol.* 109, 1975–1982.

Dolde, C.E., Mukherjee, M., Cho, C., and Resar, L.M.S. (2002). HMG-I/Y in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 71, 181–191.

Dormandy, J.A., Charbonnel, B., Eckland, D.J.A., Erdmann, E., Massi-Benedetti, M., Moules, I.K., Skene, A.M., Tan, M.H., Lefèbvre, P.J., Murray, G.D., et al. (2005). Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 366, 1279–1289.

Dormuth, C.R., Carney, G., Carleton, B., Bassett, K., and Wright, J.M. (2009). Thiazolidinediones and fractures in men and women. *Arch. Intern. Med.* 169, 1395–1402.

Dowell, P., Ishmael, J.E., Avram, D., Peterson, V.J., Nevriy, D.J., and Leid, M. (1999). Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J. Biol. Chem.* 274, 15901–15907.

Drori, S., Girnun, G.D., Tou, L., Szwaya, J.D., Mueller, E., Xia, K., Kia, X., Shivdasani, R.A., and Spiegelman, B.M. (2005). Hic-5 regulates an epithelial program mediated by PPARgamma. *Genes Dev.* 19, 362–375.

Duan, S.Z., Usher, M.G., and Mortensen, R.M. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ. Res.* 102, 283–294.

Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C., and Sedding, D.G. (2002). Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 8, 1249–1256.

Edberg, D.D., Bruce, J.E., Siems, W.F., and Reeves, R. (2004). In vivo posttranslational modifications of the high mobility group A1a proteins in breast cancer cells of differing metastatic potential. *Biochemistry* 43, 11500–11515.

Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M., and Marumo, F. (1991). Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 18, 165–170.

Esposito, F., Boscia, F., Gigantino, V., Tornincasa, M., Fusco, A., Franco, R., and Chieffi, P. (2012). The high-mobility group A1-oestrogen receptor  $\beta$  nuclear interaction is impaired in human testicular seminomas. *Journal of Cellular Physiology*.

Evans, A., Lennard, T.W.J., and Davies, B.R. (2004a). High-mobility group protein 1(Y): metastasis-associated or metastasis-inducing? *J Surg Oncol* 88, 86–99.

Evans, J.N., Zajicek, J., Nissen, M.S., Munske, G., Smith, V., and Reeves, R. (1995).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments and molecular modelling of a minor groove DNA-binding peptide from the HMG-I protein. *Int. J. Pept. Protein Res.* 45, 554–560.

Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.

Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.-X. (2004b). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10, 355–361.

Fajas, L., Auboeuf, D., Raspé, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., et al. (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J. Biol. Chem.* 272, 18779–18789.

Farina, A.R., Tacconelli, A., Vacca, A., Maroder, M., Gulino, A., and Mackay, A.R. (1999). Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ.* 10, 353–367.

Fedele, M., Fidanza, V., Battista, S., Pentimalli, F., Klein-Szanto, A.J.P., Visone, R., De Martino, I., Curcio, A., Morisco, C., Del Vecchio, L., et al. (2006). Haploinsufficiency of the Hmga1 gene causes cardiac hypertrophy and myelo-lymphoproliferative disorders in mice. *Cancer Res.* 66, 2536–2543.

Flohr, A.M., Rogalla, P., Bonk, U., Puettmann, B., Buerger, H., Gohla, G., Packeisen, J., Wosniok, W., Loeschke, S., and Bullerdiek, J. (2003). High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade. *Histol. Histopathol.* 18, 999–1004.

Floyd, Z.E., and Stephens, J.M. (2004). Control of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 stability and activity by SUMOylation. *Obes. Res.* 12, 921–928.

Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., and Evans, R.M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803–812.



Foti, D., Chiefari, E., Fedele, M., Iuliano, R., Brunetti, L., Paonessa, F., Manfioletti, G., Barbetti, F., Brunetti, A., Croce, C.M., et al. (2005). Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat. Med.* 11, 765–773.

Fredenrich, A., and Grimaldi, P.A. (2005). PPAR delta: an uncompletely known nuclear receptor. *Diabetes Metab.* 31, 23–27.

Friedmann, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y., and Reeves, R. (1993). Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res.* 21, 4259–4267.

Fusco, A., and Fedele, M. (2007). Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 899–910.

Fuster, V. (1994). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 90, 2126–2146.

Galis, Z.S., Johnson, C., Godin, D., Magid, R., Shipley, J.M., Senior, R.M., and Ivan, E. (2002). Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ. Res.* 91, 852–859.

Galis, Z.S., and Khatri, J.J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* 90, 251–262.

Gervois, P., Torra, I.P., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2000). Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 3–11.

Ghisletti, S., Huang, W., Jepsen, K., Benner, C., Hardiman, G., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2009). Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev.* 23, 681–693.  
Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121–141.

Godin, D., Ivan, E., Johnson, C., Magid, R., and Galis, Z.S. (2000). Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 102, 2861–2866.

Goetze, S., Kintscher, U., Kim, S., Meehan, W.P., Kaneshiro, K., Collins, A.R., Fleck, E., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38, 909–921.

Goetze, S., Xi, X.P., Graf, K., Fleck, E., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (1999a). Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 452, 277–282.

Goetze, S., Xi, X.P., Kawano, H., Gotlibowski, T., Fleck, E., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (1999b). PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 33, 798–806.

- Goetze, S., Xi, X.P., Kawano, Y., Kawano, H., Fleck, E., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (1999c). TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension* 33, 183–189.
- Goodwin, G.H., and Johns, E.W. (1973). Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* 40, 215–219.
- Guenther, M.G., Barak, O., and Lazar, M.A. (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6091–6101.
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D.D., and Kelly, D.P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11012–11016.
- Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J.H., Sato, H., Seiki, M., and Boyd, D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J. Biol. Chem.* 271, 10672–10680.
- Haffner, S.M., Greenberg, A.S., Weston, W.M., Chen, H., Williams, K., and Freed, M.I. (2002). Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106, 679–684.
- Hah, N., and Lee, S.-T. (2003). An absolute role of the PKC-dependent NF-kappaB activation for induction of MMP-9 in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 428–433.
- Hansson, G.K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1685–1695.
- Harrer, M., Lührs, H., Bustin, M., Scheer, U., and Hock, R. (2004). Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J. Cell. Sci.* 117, 3459–3471.
- Haschemi, A., Chin, B.Y., Jeitler, M., Esterbauer, H., Wagner, O., Bilban, M., and Otterbein, L.E. (2011). Carbon monoxide induced PPAR $\gamma$  SUMOylation and UCP2 block inflammatory gene expression in macrophages. *PLoS ONE* 6, e26376.
- Hetzel, J., Balletshofer, B., Rittig, K., Walcher, D., Kratzer, W., Hombach, V., Häring, H.-U., Koenig, W., and Marx, N. (2005). Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1804–1809.
- Hill, D.A., and Reeves, R. (1997). Competition between HMG-I(Y), HMG-1 and histone H1 on four-way junction DNA. *Nucleic Acids Res.* 25, 3523–3531.
- Himmelstein, B.P., Lee, E.J., Sato, H., Seiki, M., and Muschel, R.J. (1997). Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene* 14, 1995–1998.
- Hoberg, J.E., Yeung, F., and Mayo, M.W. (2004a). SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol. Cell* 16, 245–255.

- Hoberg, J.E., Yeung, F., and Mayo, M.W. (2004b). SMRT derepression by the I $\kappa$ B kinase alpha: a prerequisite to NF- $\kappa$ B transcription and survival. *Mol. Cell* 16, 245–255.
- Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T., and Bustin, M. (2007). HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.* 17, 72–79.
- Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., and Glass, C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397–404.
- Hou, M., Xia, M., Zhu, H., Wang, Q., Li, Y., Xiao, Y., Zhao, T., Tang, Z., Ma, J., and Ling, W. (2007). Lysophosphatidylcholine promotes cholesterol efflux from mouse macrophage foam cells via PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1-dependent pathway associated with apoE. *Cell Biochem. Funct.* 25, 33–44.
- Hu, X., and Lazar, M.A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93–96.
- Hu, Y., Liu, H.B., Simpson, R.W., and Dear, A.E. (2011). PPAR $\gamma$ -independent thiazolidinedione-mediated inhibition of NUR77 expression in vascular endothelial cells. *J. Endocrinol.* 208, R1–7.
- Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D., and Glass, C.K. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR- $\gamma$  ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400, 378–382.
- Hwang, S.J., Ballantyne, C.M., Sharrett, A.R., Smith, L.C., Davis, C.E., Gotto, A.M., Jr, and Boerwinkle, E. (1997). Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 96, 4219–4225.
- Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1994). The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4431–4435.
- Issemann, I., and Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645–650.
- Jay, M.A., and Ren, J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 3, 33–39.
- Jennwein, C., Kuhn, A.-M., Schmidt, M.V., Meiladec-Jullig, V., Von Knethen, A., Gonzalez, F.J., and Brüne, B. (2008). Sumoylation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by apoptotic cells prevents lipopolysaccharide-induced NCoR removal from kappaB binding sites mediating transrepression of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 181, 5646–5652.
- Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T.M., Gleiberman, A.S., Lunyak, V., McEvelly, R.J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., et al. (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 102, 753–763.
- Jeyakumar, M., Liu, X., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Bagchi, M.K. (2007). Phosphorylation of thyroid hormone receptor-associated nuclear receptor corepressor

holocomplex by the DNA-dependent protein kinase enhances its histone deacetylase activity. *J. Biol. Chem.* 282, 9312–9322.

Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82–86.

Jones, P.L., and Shi, Y.B. (2003). N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 274, 237–268.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., et al. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403–414.

Kawai-Kowase, K., and Owens, G.K. (2007). Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 292, C59–69.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (1993a). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2160–2164.

Keller, H., Mahfoudi, A., Dreyer, C., Hihi, A.K., Medin, J., Ozato, K., and Wahli, W. (1993b). Peroxisome proliferator-activated receptors and lipid metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 684, 157–173.

Kersten, S., Desvergne, B., and Wahli, W. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421–424.

Kihara, S., Ouchi, N., Funahashi, T., Shinohara, E., Tamura, R., Yamashita, S., and Matsuzawa, Y. (1998). Troglitazone enhances glucose uptake and inhibits mitogen-activated protein kinase in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 136, 163–168.

Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7355–7359.

Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813–819.

Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., and Kato, S. (2000). Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.* 275, 33201–33204.

Kumar, A., and Lindner, V. (1997). Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2238–2244.

Law, R.E., Goetze, S., Xi, X.P., Jackson, S., Kawano, Y., Demer, L., Fishbein, M.C., Meehan, W.P., and Hsueh, W.A. (2000). Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101, 1311–1318.

- Law, R.E., Meehan, W.P., Xi, X.P., Graf, K., Wuthrich, D.A., Coats, W., Faxon, D., and Hsueh, W.A. (1996). Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 98, 1897–1905.
- LeBrasseur, N.K., Kelly, M., Tsao, T.-S., Farmer, S.R., Saha, A.K., Ruderman, N.B., and Tomas, E. (2006). Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E175–181.
- Lee, S.K., Kim, J.H., Lee, Y.C., Cheong, J., and Lee, J.W. (2000). Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *J. Biol. Chem.* 275, 12470–12474.
- Lefkowitz, R.J., and Willerson, J.T. (2001). Prospects for cardiovascular research. *JAMA* 285, 581–587.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995a). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270, 12953–12956.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995b). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270, 12953–12956.
- Lehrke, M., and Lazar, M.A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell* 123, 993–999.
- Leung, T.H., Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2004). One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell* 118, 453–464.
- Li, A.C., Brown, K.K., Silvestre, M.J., Willson, T.M., Palinski, W., and Glass, C.K. (2000a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 106, 523–531.
- Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J., and Wong, J. (2000b). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J.* 19, 4342–4350.
- Li, L., Zhang, H.-N., Chen, H.-Z., Gao, P., Zhu, L.-H., Li, H.-L., Lv, X., Zhang, Q.-J., Zhang, R., Wang, Z., et al. (2011). SIRT1 acts as a modulator of neointima formation following vascular injury in mice. *Circ. Res.* 108, 1180–1189.
- Li, Y., Lu, J., and Prochownik, E.V. (2007). Dual role for SUMO E2 conjugase Ubc9 in modulating the transforming and growth-promoting properties of the HMGA1b architectural transcription factor. *J. Biol. Chem.* 282, 13363–13371.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., and Jentsch, S. (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J.* 17, 2208–2214.
- Liau, S.-S., Jazag, A., and Whang, E.E. (2006). HMGA1 is a determinant of cellular invasiveness and in vivo metastatic potential in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 66, 11613–11622.

- Libby, P. (2001a). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104, 365–372.
- Libby, P. (2001b). What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am. J. Cardiol.* 88, 3J–6J.
- Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317–325.
- Lindner, V., Fingerle, J., and Reidy, M.A. (1993). Mouse model of arterial injury. *Circ. Res.* 73, 792–796.
- Luconi, M., Cantini, G., and Serio, M. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? *Steroids* 75, 585–594.
- Lüscher, T.F., and Barton, M. (1997). Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20, II–3–10.
- Ma, J. (2011). Transcriptional activators and activation mechanisms. *Protein Cell* 2, 879–888.
- Ma, Z., Shah, R.C., Chang, M.J., and Benveniste, E.N. (2004a). Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5496–5509.
- Ma, Z., Shah, R.C., Chang, M.J., and Benveniste, E.N. (2004b). Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5496–5509.
- Mahley, R.W., and Rall, S.C., Jr (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1, 507–537.
- Maldonado, A., Game, B.A., Song, L., and Huang, Y. (2003). Up-regulation of matrix metalloproteinase-1 expression in U937 cells by low-density lipoprotein-containing immune complexes requires the activator protein-1 and the Ets motifs in the distal and the proximal promoter regions. *Immunology* 109, 572–579.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.
- Marx, N., Bourcier, T., Sukhova, G.K., Libby, P., and Plutzky, J. (1999). PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 546–551.
- Marx, N., Duez, H., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ. Res.* 94, 1168–1178.
- Marx, N., Mach, F., Sauty, A., Leung, J.H., Sarafi, M.N., Ransohoff, R.M., Libby, P., Plutzky, J., and Luster, A.D. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J. Immunol.* 164, 6503–6508.

- Marx, N., Schönbeck, U., Lazar, M.A., Libby, P., and Plutzky, J. (1998a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 83, 1097–1103.
- Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P., and Plutzky, J. (1998b). Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am. J. Pathol.* 153, 17–23.
- Marx, N., and Walcher, D. (2007). Vascular effects of PPARgamma activators - from bench to bedside. *Prog. Lipid Res.* 46, 283–296.
- Marx, N., Wöhrle, J., Nusser, T., Walcher, D., Rinker, A., Hombach, V., Koenig, W., and Höher, M. (2005). Pioglitazone reduces neointima volume after coronary stent implantation: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial in nondiabetic patients. *Circulation* 112, 2792–2798.
- Massaad-Massade, L., Navarro, S., Krummrei, U., Reeves, R., Beaune, P., and Barouki, R. (2002). HMGA1 enhances the transcriptional activity and binding of the estrogen receptor to its responsive element. *Biochemistry* 41, 2760–2768.
- Massaad-Massade, L., Tacine, R., Dulauroy, S., Reeves, R., and Barouki, R. (2004). The functional interaction between HMGA1 and the estrogen receptor requires either the N- or the C-terminal domain of the receptor. *FEBS Lett.* 559, 89–95.
- Masure, S., Nys, G., Fiten, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1993). Mouse gelatinase B. cDNA cloning, regulation of expression and glycosylation in WEHI-3 macrophages and gene organisation. *Eur. J. Biochem.* 218, 129–141.
- McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465–474.
- McNally, J.G., Müller, W.G., Walker, D., Wolford, R., and Hager, G.L. (2000). The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287, 1262–1265.
- Meirhaeghe, A., and Amouyel, P. (2004). Impact of genetic variation of PPARgamma in humans. *Mol. Genet. Metab.* 83, 93–102.
- Mercurio, F., and Manning, A.M. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 226–232.
- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., et al. (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 726–741.
- Monge, J.C. (1998). Neurohormonal markers of clinical outcome in cardiovascular disease: is endothelin the best one? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32 Suppl 2, S36–42.
- Moon, S.-K., Cha, B.-Y., and Kim, C.-H. (2004). ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J. Cell. Physiol.* 198, 417–427.

- Mori, N., Horie, Y., Gerritsen, M.E., and Granger, D.N. (1999). Ischemia-reperfusion induced microvascular responses in LDL-receptor  $-/-$  mice. *Am. J. Physiol.* 276, H1647–1654.
- Murakami, T., Mizuno, S., Ohsato, K., Moriuchi, I., Arai, Y., Nio, Y., Kaku, B., Takahashi, Y., and Ohnaka, M. (1999). Effects of troglitazone on frequency of coronary vasospastic-induced angina pectoris in patients with diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 84, 92–94, A8.
- Nagpal, S., Ghosn, C., DiSepio, D., Molina, Y., Sutter, M., Klein, E.S., and Chandraratna, R.A. (1999). Retinoid-dependent recruitment of a histone H1 displacement activity by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 22563–22568.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., and Evans, R.M. (1998a). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229–240.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., and Evans, R.M. (1998b). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229–240.
- Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nuñez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P., and Lowe, S.W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503–514.
- Nesto, R.W., Bell, D., Bonow, R.O., Fonseca, V., Grundy, S.M., Horton, E.S., Le Winter, M., Porte, D., Semenkovich, C.F., Smith, S., et al. (2003). Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. October 7, 2003. *Circulation* 108, 2941–2948.
- Newby, A.C. (2005). Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol. Rev.* 85, 1–31.
- Newby, A.C. (2006). Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.* 69, 614–624.
- Newby, A.C. (2012). Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascular Pharmacology*.
- Nofsinger, R.R., Li, P., Hong, S.-H., Jonker, J.W., Barish, G.D., Ying, H., Cheng, S.-Y., Leblanc, M., Xu, W., Pei, L., et al. (2008). SMRT repression of nuclear receptors controls the adipogenic set point and metabolic homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20021–20026.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137–143.
- Noro, B., Licheri, B., Sgarra, R., Rustighi, A., Tessari, M.A., Chau, K.-Y., Ono, S.J., Giancotti, V., and Manfioletti, G. (2003). Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry* 42, 4569–4577.



Ogawa, S., Lozach, J., Jepsen, K., Sawka-Verhelle, D., Perissi, V., Sasik, R., Rose, D.W., Johnson, R.S., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2004). A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14461–14466.

Ohshima, T., Koga, H., and Shimotohno, K. (2004). Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* 279, 29551–29557.

Oñate, S.A., Prendergast, P., Wagner, J.P., Nissen, M., Reeves, R., Pettijohn, D.E., and Edwards, D.P. (1994). The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3376–3391.

Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* 84, 767–801.

Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., and Holmes, P. (1985). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57, 65–73.

Pajvani, U.B., Hawkins, M., Combs, T.P., Rajala, M.W., Doebber, T., Berger, J.P., Wagner, J.A., Wu, M., Knopps, A., Xiang, A.H., et al. (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 279, 12152–12162.

Pasceri, V., Wu, H.D., Willerson, J.T., and Yeh, E.T. (2000). Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101, 235–238.

Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759–763.

Pedulla, M.L., Treff, N.R., Resar, L.M., and Reeves, R. (2001). Sequence and analysis of the murine Hmg1y (Hmg1) gene locus. *Gene* 271, 51–58.

Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116, 511–526.

Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev.* 13, 3198–3208.

Plump, A.S., and Breslow, J.L. (1995). Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 495–518.

Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343–353.

Poon, M., Marx, S.O., Gallo, R., Badimon, J.J., Taubman, M.B., and Marks, A.R. (1996). Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J. Clin. Invest.* 98, 2277–2283.

- Prymakowska-Bosak, M., Misteli, T., Herrera, J.E., Shirakawa, H., Birger, Y., Garfield, S., and Bustin, M. (2001). Mitotic phosphorylation prevents the binding of HMGN proteins to chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5169–5178.
- Ptasinska, A., Wang, S., Zhang, J., Wesley, R.A., and Danner, R.L. (2007). Nitric oxide activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma through a p38 MAPK signaling pathway. *FASEB J.* 21, 950–961.
- Rangwala, S.M., and Lazar, M.A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 331–336.
- Reddick, R.L., Zhang, S.H., and Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler. Thromb.* 14, 141–147.
- Reddy, M.K., Hollenberg, P.F., and Reddy, J.K. (1980). Partial purification and immunoreactivity of an 80 000-molecular-weight polypeptide associated with peroxisome proliferation in rat liver. *Biochem. J.* 188, 731–740.
- Reeves, R. (2001). Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277, 63–81.
- Reeves, R., and Beckerbauer, L. (2001). HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1519, 13–29.
- Reeves, R., and Nissen, M.S. (1993). Interaction of high mobility group-I (Y) nonhistone proteins with nucleosome core particles. *J. Biol. Chem.* 268, 21137–21146.
- Reeves, R., and Wolffe, A.P. (1996). Substrate structure influences binding of the non-histone protein HMGI(Y) to free nucleosomal DNA. *Biochemistry* 35, 5063–5074.
- Reid, G., Hübner, M.R., Métivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol. Cell* 11, 695–707.
- Ricote, M., and Glass, C.K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 926–935.
- Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J.L., Auwerx, J., Palinski, W., and Glass, C.K. (1998a). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7614–7619.
- Ricote, M., Huang, J.T., Welch, J.S., and Glass, C.K. (1999). The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J. Leukoc. Biol.* 66, 733–739.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. (1998b). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79–82.

- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. (1998c). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79–82.
- Rogalla, P., Drechsler, K., Frey, G., Hennig, Y., Helmke, B., Bonk, U., and Bullerdiek, J. (1996). HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am. J. Pathol.* 149, 775–779.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20, 1405–1428.
- Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 791–804.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115–126.
- Ross, R., and Glomset, J.A. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180, 1332–1339.
- Salghetti, S.E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B., and Tansey, W.P. (2000). Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3118–3123.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Sasaki, M., Jordan, P., Welbourne, T., Minagar, A., Joh, T., Itoh, M., Elrod, J.W., and Alexander, J.S. (2005). Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiol.* 5, 3.
- Sata, M., Maejima, Y., Adachi, F., Fukino, K., Saiura, A., Sugiura, S., Aoyagi, T., Imai, Y., Kurihara, H., Kimura, K., et al. (2000). A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 2097–2104.
- Sato, H., Kita, M., and Seiki, M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 268, 23460–23468.
- Schopfer, F.J., Lin, Y., Baker, P.R.S., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y.E., and Freeman, B.A. (2005). Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2340–2345.
- Schulman, I.G., Shao, G., and Heyman, R.A. (1998). Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3483–3494.
- Schwartz, S.M., Virmani, R., and Rosenfeld, M.E. (2000). The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2, 422–429.

- Scott, N.A., Cipolla, G.D., Ross, C.E., Dunn, B., Martin, F.H., Simonet, L., and Wilcox, J.N. (1996). Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 93, 2178–2187.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843–852.
- Sidhu, J.S., Cowan, D., and Kaski, J.-C. (2003). The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 1757–1763.
- Smas, C.M., and Sul, H.S. (1995). Control of adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 309 ( Pt 3), 697–710.
- Spiegelman, B.M. (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47, 507–514.
- Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., and Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 375–536.
- Stemme, S., Faber, B., Holm, J., Wiklund, O., Witztum, J.L., and Hansson, G.K. (1995). T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3893–3897.
- Stewart, M.D., and Wong, J. (2009). Nuclear receptor repression: regulatory mechanisms and physiological implications. *Prog Mol Biol Transl Sci* 87, 235–259.
- Széles, L., Töröcsik, D., and Nagy, L. (2007). PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1014–1030.
- Tallini, G., and Dal Cin, P. (1999). HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors. *Adv Anat Pathol* 6, 237–246.
- Tomkin, G.H. (2010). Atherosclerosis, diabetes and lipoproteins. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8, 1015–1029.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994a). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224–1234.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994b). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241–252.
- Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul. Pharmacol.* 45, 19–28.
- Verma, S., Buchanan, M.R., and Anderson, T.J. (2003). Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 108, 2054–2059.

Verrier, E., Wang, L., Wadham, C., Albanese, N., Hahn, C., Gamble, J.R., Chatterjee, V.K.K., Vadas, M.A., and Xia, P. (2004). PPARgamma agonists ameliorate endothelial cell activation via inhibition of diacylglycerol-protein kinase C signaling pathway: role of diacylglycerol kinase. *Circ. Res.* 94, 1515–1522.

Wakino, S., Kintscher, U., Kim, S., Yin, F., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1-> S transition in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275, 22435–22441.

Walcher, T., Walcher, D., Hetzel, J., Mielke, C., Rau, M., Rittig, K., Balletshofer, B., Schwedhelm, E., Hombach, V., Böger, R.H., et al. (2010). Rapid effect of single-dose rosiglitazone treatment on endothelial function in healthy men with normal glucose tolerance: data from a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Diab Vasc Dis Res* 7, 178–185.

Wang, D.Z., Ray, P., and Boothby, M. (1995). Interleukin 4-inducible phosphorylation of HMG-I(Y) is inhibited by rapamycin. *J. Biol. Chem.* 270, 22924–22932.

Wang, N., Verna, L., Chen, N.-G., Chen, J., Li, H., Forman, B.M., and Stemerma, M.B. (2002). Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 34176–34181.

Watson, P.J., Fairall, L., and Schwabe, J.W.R. (2012). Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348, 440–449.

Willson, T.M., Lambert, M.H., and Kliewer, S.A. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 341–367.

Xu, H.E., Stanley, T.B., Montana, V.G., Lambert, M.H., Shearer, B.G., Cobb, J.E., McKee, D.D., Galardi, C.M., Plunket, K.D., Nolte, R.T., et al. (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415, 813–817.

Yan, F., Gao, X., Lonard, D.M., and Nawaz, Z. (2003). Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. *Mol. Endocrinol.* 17, 1315–1331.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415.

Yang, X.Y., Wang, L.H., Chen, T., Hodge, D.R., Resau, J.H., DaSilva, L., and Farrar, W.L. (2000). Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J. Biol. Chem.* 275, 4541–4544.

Yie, J., Liang, S., Merika, M., and Thanos, D. (1997). Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3649–3662.

Yie, J., Merika, M., Munshi, N., Chen, G., and Thanos, D. (1999). The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *EMBO J.* 18, 3074–3089.

- Yoon, H.-G., Chan, D.W., Huang, Z.-Q., Li, J., Fondell, J.D., Qin, J., and Wong, J. (2003). Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J.* 22, 1336–1346.
- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M.G., and Lazar, M.A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J.* 22, 3403–3410.
- Yu, S., and Reddy, J.K. (2007). Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 936–951.
- Zahradka, P., Wright, B., Fuerst, M., Yurkova, N., Molnar, K., and Taylor, C.G. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands differentially affect smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 651–659.
- Zempo, N., Kenagy, R.D., Au, Y.P., Bendeck, M., Clowes, M.M., Reidy, M.A., and Clowes, A.W. (1994). Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J. Vasc. Surg.* 20, 209–217.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol. Cell* 9, 611–623.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468–471.
- Zingarelli, B., Sheehan, M., Hake, P.W., O'Connor, M., Denenberg, A., and Cook, J.A. (2003). Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J. Immunol.* 171, 6827–6837.

## 8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### 8.1 8.1 Originalarbeiten

Bloch, M., Prock, A., Paonessa, F., Benz, V., Bähr, I.N., Herbst, L., Witt, H., Kappert, K., Spranger, J., Stawowy, P., Unger T, Fusco A, Sedding D, Brunetti A, Foryst-Ludwig A, Kintscher U. (2012). High-mobility group A1 protein: a new coregulator of peroxisome proliferator-activated yreceptor-mediated transrepression in the vasculature. *Circ. Res.* 110, 394–405.

Ko-Autorschaften:

Benz, V., Bloch, M., Wardat, S., Böhm, C., Maurer, L., Mahmoodzadeh, S., Wiedmer, P., Spranger, J., Foryst-Ludwig, A., and Kintscher, U. (2012). Sexual dimorphic regulation of body weight dynamics and adipose tissue lipolysis. *PLoS ONE* 7, e37794.

Winkler, R., Benz, V., Clemenz, M., Bloch, M., Foryst-Ludwig, A., Wardat, S., Witte, N., Trappiel, M., Namsolleck, P., Mai, K., Spranger J, Matthias G, Roloff T, Truee O, Kappert K, Schupp M, Matthias P, Kintscher U. (2012). Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an essential modifier of glucocorticoid-induced hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 61, 513–523.

### 8.2 Kongressbeiträge

Bloch M., Foryst-Ludwig A., Unger T., Kintscher U.: **PPARgamma-mediated MMP-9 gene regulation and nuclear cofactor recruitment in human vascular smooth muscle cells.** 2nd International Conference on Exploring the Future of Vascular and Inflammatory Mediators – Kinin, Berlin, Juni 2007 (POSTER)

Bloch M., Foryst-Ludwig A., Unger T., Kintscher U.: **HMGA1 ein neuer Regulator der PPARgamma vermittelten Gentranskription in humanen glatten Gefäßmuskelnzellen.** 43. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), München, Mai 2008 (VORTRAG)

Bloch M., Foryst-Ludwig A., Unger T., Kintscher U.: **High Mobility Group A1 Protein –a new regulator for PPARgamma transcriptional repression in human aortic smooth muscle cells.** Hypertension, Berlin, Juni 2008 (POSTER)

Bloch M., Foryst-Ludwig A., Unger T., Kintscher U.: **The High Mobility Group A1 Protein - A New Regulator of PPARgamma-dependent gene transcription in Vascular Smooth Muscle Cells.** 13th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR), Nizza, Okt 2008 (VORTRAG)

Bloch M., Foryst-Ludwig A., Unger T., Kintscher U.: **High Mobility Group A1 Protein – a new regulator for peroxisome proliferator- activated receptor gamma transcriptional repression in human aortic smooth muscle cells.** American Heart Association (AHA) Scientific Sessions, New Orleans, Nov 2008 (VORTRAG)

Bloch M., Foryst-Ludwig A., Unger T., Kintscher U.: **HMGA1 - a central regulator of PPARgamma-mediated transrepression in human aortic smooth muscle cells.** 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, April 2009 (VORTRAG)

## Publikationsverzeichnis

---

*Bloch M., Prock A. Paonessa F., Foryst-Ludwig A., Kappert K., Spranger J., Unger T., Fusco A., Sedding D., Brunetti A., Kintscher U.:* **High Mobility Group A1 Protein – a new regulator for PPARgamma mediated transrepression in human aortic smooth muscle cells.** EMBO Conference on Nuclear Receptors, Dubrovnik, Kroatien, Sept 2009 (POSTER)

*Bloch M., Prock A. Paonessa F., Foryst-Ludwig A., Kappert K., Spranger J., Unger T., Fusco A., Sedding D., Brunetti A., Kintscher U.:* **HMGA1 - a new regulator of PPARgamma-mediated transrepression in the vasculature.** 33. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL, Lübeck, Nov, 2009 (VORTRAG)

*Bloch M., Prock A. Paonessa F., Benz V., Bähr I., Herbst L., Witt H., Kappert K., Spranger J., Stawowy P., Unger T., Fusco A., Sedding D., Brunetti A., Foryst-Ludwig A. and Kintscher U.:* **HMGA1 and PPARgamma SUMOylation are required for PPARgamma-mediated transrepression in the vasculature.** 35. Wissenschaftlichen Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL, Köln, Nov, 2011 (POSTER)