

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Substanzen

2-Deoxy-D-glukose (Sigma, Taufkirchen, D)

3-Isobutyl-1-methylxanthin (Sigma, Taufkirchen, D)

Agarosen (QA-AgaroseTM, Q-BIOgene, USA); (Seakem[®] LE agarose, FMC Bio-Products, USA)

Ampicillin (D [-]-alpha-Aminobenzylpenicillin; Sigma, Taufkirchen, D)

Benzamidin (Sigma, Taufkirchen, D)

Bovines Serumalbumin (Sigma, Taufkirchen, D)

Cytochalasin B (Sigma, Taufkirchen, D)

Deoxy-D-[2,6-³H]glukose (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

Dexamethason (Sigma, Taufkirchen, D)

Dimethylsulfoxid (Sigma, Taufkirchen, D)

DTT (0,1 M; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)

Eprosartan (Solvay, D)

Fenofibrinsäure (Bart Staels, Lille, Fr)

Glutathionsepharose (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

GW9662 (Alexis, Grünberg, D)

Insulin (Sigma, Taufkirchen, D)

Irbesartan (Sanofi-Synthelabo, Berlin, D)

Kanamycin (Sigma, Taufkirchen, D)

LB-Agar, Miller (Ausgangssubstanz, pulverisiert; Becton Dickensen, Sparks, USA)

LB-Broth, Miller (Ausgangssubstanz, pulverisiert; Becton Dickensen, Sparks, USA)

Lipofectamin[®] 2000 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)

Losartan (MSD, Haar, D)

NP40 10% (Sigma, Taufkirchen, D)

Oil-Red-O Farbstoff (Sigma, Taufkirchen, D)

PCR-Puffer und MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D oder Promega GmbH, Mannheim, D)

RT-Puffer (Promega GmbH, Mannheim, D)

Peroxidase Detektionsreagenz 1+2 (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

Pioglitazon (Takeda, Osaka, Japan)

Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics, Mannheim, D)

Real-Time Sybgreen® Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, D)

Real-Time Taqman Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, D)

Ribonukleaseinhibitor (Sigma, Taufkirchen, D)

Rosiglitazone (GSK, Brentford, UK)

S³⁵ Methionine (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

Skimmed milk powder (Roth, Karlsruhe, D)

Telmisartan (Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, D)

WY14643 (Biomol, Hamburg, D)

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma (Taufkirchen, D) und Biorad (München, D).

2.1.2. Kits

Absolutely-RNA (Stratagene Europe, Amsterdam, NL)

BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Perbio Science, Pierce, Bonn, D)

Invisorb Spin Cell Mini Kit (Invitex, Berlin, D)

Dual-Luciferas® Reporter Assay System (Promega GmbH, Mannheim, D)

ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham-Pharmacia, Freiburg D)

Nucleo-Spin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, D)

NucleoSpin Plus Plasmid Kit (PE Biosystems)

Plasmidextraktion Maxi (Qiagen, Hilden, D, Macherey-Nagel, Düren, D)

QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen, Hilden, D)

QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, D)

Superscript II Preamplification System (Gibco / Invitrogen)

Thrombin- Cleavage Capture Kit (Novagen, D)

TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega GmbH, Mannheim, D)

2.1.3. Nukleinsäuren und Nukleotide

Nukleotide

dNTP (Sigma, Taufkirchen, D; MBI Fermentas, St Leon-Rot, D; Promega GmbH, Mannheim, D)

Primer

Alle Primer wurden mit dem Programm Primerexpress 2.0 der Firma Applied Biosystems entworfen, welches optimierte Algorithmen für die Benutzung mit dem Taqman Real-Time PCR System hat. Beide Primer wurden jeweils gegen das gesamte Organismusgenom geblastet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und auf die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten hin überprüft.

Bei Real-Time PCRs wurden Systeme ohne Sonden, für die Benutzung mit dem Sybgreen® Mastermix, oder mit Sonden benutzt (siehe Tabelle). Alle Sonden wurden mit 5'-FAM als Farbstoff und 3'-TAMRA als Quencher gelabelt (XT als Verbindungsbase).

Alle Primer wurden bei Tib-MolBiol (Berlin, D) synthetisiert.

Gen	Forward 5'-3'	Revers 5'-3'	Sonde 5'-3'	Annealing-Temp. (°C)
maP2 (semi)	TggAAgACAgCTCCTC CTCg	CATAACACATTCCAC CACCAgC		60
mHPRT (semi)	CTGGTGAAAAGGACC TCT	CACAggACTAgAACAA CCTg		60
mPPAR γ_2 (semi)	TgTTgACCCAgAgCAT ggTgC	AACCCTTgCATCCTTC ACAAGC		59
rAT1R (semi)	CACCTATgTAAgATCg CTTC	gCACAATCgCCATAA TTATC		54
r β -Actin (semi)	gAgggAAACgTgCgTg ACAT	ACATCTgCTggAAggT ggACA		57
mPPAR γ_1	AgAAgCggTgAACCCAC TgATATTC	AgAggTCCACAgAgCT gATTCC	AgAgATgCCATTCTgg CCCACCAAC XT	60
mPPAR γ_2	TgggTgAAACTCTggg AgATTC	gAgAggTCCACAgAgC TgATTCC	CCCAGAgCATggTgCC TTCgCTgT XT	60
maP2	TgggTgAAACTCTggg AgATTC	AATCCCCATTTACgCT gATgATC	TgCCACAAGgAAAgtg gCAggCA XT	60
mPR	CTgCCTCTCATgATCC gAgg	gAA AAggATgAA gACCCAggg		60
mEGR-1	gAgCACCTg ACC ACAgAgTCC	CggCCAgtATAg gTgATg gg		60
mGyK	CAACACgggCCATAA gTgTg	TTAgCCAgtCggA TTACAgCAC		60
mCD36	gATTAATggCAC AgACgCAgC	TCCgAACACAgC gTAgAT AgACC		60
mFBI-1	AAg gTg ATT CAg ggT gCC g	TgT CCT gTC Tgg TgA ATC gAA C		59
mGAPDH	CTgCACCACTg CTTAgC	gTCTTCTgggTggCAg TgATg		60
m18s	ACCTggTTgATC CTgCCAgTAg	TTAATgAgCCAT TCgCAgTTTC	TgCATgTCTAAg TACgCACggCCg T XT	60
mCEBP/ α	TgggCggATCTg CgAg	TCggCTgTgCTg gAAgAgg		60

hPPAR γ	TCAAACACATCA CCCCCTg	TggCAGCCCTgA AAgATgC	AggAgCAGAgCA AAgAggTggCCA TCX T	60
hGAPDH	Applied Biosystem Assay on demand®			60
mAT2R (Genotyp)	CCACCAgCAGAA ACATTACC	gAACTACATAAg ATgCTTgCCAagg	ggCAGCgCggCT ATCgTgg (NEO-PVU)	58

Tabelle 2.1.: Verzeichnis der verwendeten Primer

(m=Maus, r=Ratte, semi=semiquantitative PCR)

Vektoren

Die benutzten Plasmide wurden freundlicherweise von kooperierenden Arbeitsgruppen überlassen. Zur Identifikation wurden Probeverdaus angefertigt bzw. Teile des Inserts sequenziert.

Plasmid	Herkunft
AOx-PPRE-TK-LUC	Ronald Law, UCLA, Los Angeles, USA
DR1-6AS-TkpG13	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pCMX-RXRalpha	Ronald Law, UCLA, Los Angeles, USA
pSG5-mPPAR γ_2	Ronald Law, UCLA, Los Angeles, USA
pSG5-TIF-2	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pSG5-leer	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pSG5-hPPAR γ_2	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pRenilla-Luc-CMV	Promega GmbH, Mannheim, D
pET-28a(+)-His-hPPAR γ_2 -LBD	Stefan Kauschke, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
pET-28c-His-RXRalpha-LBD	Stefan Kauschke, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
pGal-Tk-pG13	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pGal4-hPPAR α -DEF	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pGal4-hPPAR γ -DEF	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pCMV- β Gal	Bart Staels, Institut Pasteur, Lille, F
pRSETA-hTIF-2 (AS 412-813)	GENFIT, Parc Eurasante, Loos, F
pRSETA-hDRIP205 (AS 529-790)	GENFIT, Parc Eurasante, Loos, F

pRSETA-NCOR (AS 1990-2310)	GENFIT, Parc Eurasante, Loos, F
pGEX4T1-hPPAR γ (AS 209-505)	GENFIT, Parc Eurasante, Loos, F

Tabelle 2.2.: Verzeichnis aller verwendeten Plasmide

2.1.4. Molekulargewichtsmarker

Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Gene RulerTM 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Precision Protein Standard (Bio-Rad, München, D)

2.1.5. Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

Die für die Experimente verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden wahlweise von den Firmen Qbiogene (Heidelberg, D) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D) gekauft: *HinDIII*, *EcoRI*, *XbaI*, *XmaI*, *BamHI*, *EcoRV* (synonym *Eco32I*), *SmaI* (synonym *Cfr9I*).

DNase (Promega, Mannheim, D)

M-MLV RT RNase H Minus (Promega, Mannheim, D)

AMV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim, D)

RNasin (Promega, Mannheim, D)

Superscript-II-Reverse-Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, D)

Taq-Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D und Invitex, Berlin, D)

Lysozym (ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA)

2.1.6. Antikörper

GAPDH Antikörper rabbit, polyklonal ab9485 (abcam, Cambridge, UK)

PPAR γ Antikörper, Maus monoklonal (E-8) sc7273 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)

Adiponektin Antikörper, Maus monoklonal (Chemicon, Temecula, USA)

Anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase linked (Amersham-Pharmacia, Freiburg D)

Anti-mouse Ig, Horseradish Peroxidase linked (Amersham-Pharmacia, Freiburg D)

2.1.7. Biologisches Material

Bakterienstämme, *Escherichia coli*

- XL1-Blue** [F'xTn10 proA+B+lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r)thi hsdR17(rKmK+)supE44relA1 lac]; Stratagene, La Jolla, USA
- BL21** [DE3 pLysS^(a)F⁻, ompT, hsdS_B (r_B-r_B⁻), dcm, gal, (DE3), pLysS, Cm^r]; (Promega, Mannheim, D)

2.1.8. Medien und Zusätze für die Kultur eukaryotischer Zellen

Dulbecco's Minimal Essential Medium = DMEM (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)

PBS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom, Berlin, D und Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)

OPTIMEM (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)

AlphaMEM (Sigma, Taufkirchen, D)

2.1.9. Versuchstiere und Zelllinien

Mus musculus, Stämme:

129/B16 (gemischt), AT2R- Knock-out (Michael Bader, Berlin, D) [143]

Mus musculus, Zelllinie:

3T3-L1 (ATCC-LGC Promochem, Wesel, D)

Rattus norvegicus, Zelllinien:

PC12W (Serge Bottari, Grenoble, France)

Cercopithecus aethiops, Zelllinien:

COS-7 (ATCC-LGC Promochem, Wesel, D)

2.1.10 Ausgewählte Zusatzmaterialien

Filmmaterial

BioMax Light-1 (18 x 24; Kodak, Rochester, New York, USA)

Hyperfilm (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany)

Fotochemikalien: Entwickler, Fixierer (AGFA, Köln, D)

Membranen und Filter

Hybond-P PVDF Membran (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany)

Hybond-C extra Nitrozellulose Membran (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany)

Sterilfilter 0,2µm (Schleicher&Schuell, Nürnberg, D)

Operationszubehör

Diverse Scheren und Pinzetten (Becton Dickensen, Sparks, USA)

Zellkulturzubehör

Zellkulturplatten in diversen Größen (Becton Dickensen, Sparks, USA und nunc, Wiesbaden, D)

2.1.11 Puffer und Lösungen

Für gebräuchliche molekularbiologische Techniken wurden, sofern nicht extra erwähnt, Puffer und Lösungen nach Standardprotokollen [144] hergestellt. Hierfür wurde ausnahmslos gereinigtes Wasser (Millipore) verwendet.

Glucoseaufnahme:

KRPH (Krebs-Ringer Puffer):	NaCl	130 mM
	KCL	5 mM
	CaCl ₂	2,5 mM
	NaH ₂ PO ₃	2,5 mM
	MgCl ₂	1,2 mM
	HEPES	10mM

Erlangung der chemischen Kompetenz von E.coli-Stämmen:

Inkubationsmix (IMT):	5%	DMSO
	10mM	MgSO ₄
	10mM	MgCl ₂
	10%	PEG 6000 [w/v]

In 1x LB-Medium

Transformationsmix (KCM 5x):	500mM	KCL
	150 mM	CaCl ₂
	250mM	MgCl ₂

Proteingewinnung :

Proteinlysepuffer :	20mM	Tris-Base (pH7,5)
	150mM	NaCl
	1mM	EDTA
	1mM	EGTA
	2,5mM	1% Triton-X
	2,5mM	Natriumpyrophosphat
	1mM	Natriumorthovanadat
	1 Tablette	Protease-Inhibitoren
		Complete Mini auf 1,5ml

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Gebräuchliche molekularbiologische Techniken, wie Restriktionsverdau und diverse Hybridisierungstechniken wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, nach [144] durchgeführt.

DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von Herrn Dr. Meixner, Institut für Mikrobiologie der Charité an einem ABI 373/377 BigDye-Terminator-Chemie durchgeführt.

2.2.1.1. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

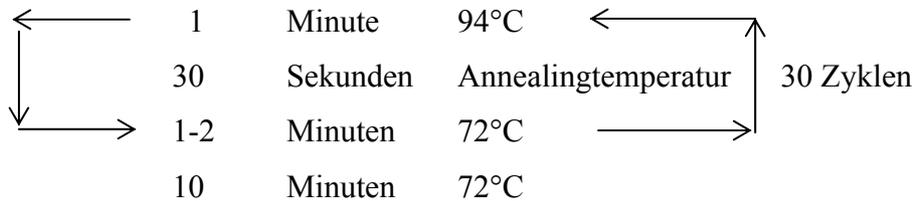
PCR- Ansätze erfordern eine individuelle Anpassung der Reaktionsbedingungen. Die hier dargestellten Inkubationszeiten und Komponentenkonzentrationen sind Richtwerte, die je nach Optimierungsbedarf verändert wurden.

Standard-PCR-Reaktionsansatz:

~ 50 ng	cDNA / ~ 500 ng genomische DNA
5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	10 mM dNTPs
1 µl	50 mM MgCl ₂ ,
0,5 µl	20 µM Forward-Primer

0,5 µl 20 µM Reverse-Primer
0,25 µl Taq-Polymerase (2 Units)
 ddH₂O ad 50 µl

PCR-Programm:



Die Elongationszeit wurde entsprechend den Amplikonlängen angepasst. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde vor der eigentlichen Probenvermessung eine Zyklusreihe aus einem Pool aller Proben erstellt, um sicherzugehen, dass die Amplifikation in einem linear verlaufenden Bereich beendet wurde (siehe Abbildung 2.1). Diese Prozedur wurde für jedes semiquantitativ zu vermessende Gen erstellt. Alle im Ergebnissteil gezeigten semiquantitativen PCRs wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten bestätigt.

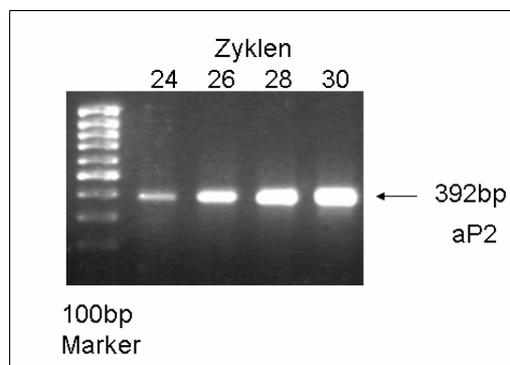


Abb. 2.1.: Zyklusverlauf zur Ermittlung des linearen Bereiches am Bsp. von aP2

Zur Messung der Proben wurden später 25 Zyklen benutzt

2.2.1.2. Real-Time PCR

Im Gegensatz zur semiquantitativen PCR kann bei der Real-Time PCR der gesamte Amplifikationsprozeß verfolgt werden. Mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunimmt, kann so direkt auf die enthaltene Menge einer Nukleotidsequenz geschlossen werden. Es wurden, wie oben bereits erwähnt, unspezifische Detektionssysteme (Sybrgreen®) und spezifisch markierte Sonden eingesetzt. Die höhere Genauigkeit und Sensitivität dieser SONDENSYSTEME resultiert aus der sequenzspezifischen Abhängigkeit des

Fluoreszenzsignals. Die Sondensysteme erhalten durch Hybridisierung an die Zielsequenz und Trennung der räumlichen Nähe des Quenchers vom Farbstoff durch die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der Polymerase die Fähigkeit zur Fluoreszenz. Sybrgreen® dagegen wird zur Fluoreszenz durch Einlagerung in Doppelstränge befähigt, was unspezifisch mit dem Amplifikationsprozeß korreliert.

Zur Messung wurde ein ABI7000 Sequence Detection System verwendet, ausgerüstet mit der firmeneigenen Software in der Version 2.0.

Alle Gene wurden mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen (siehe Abbildung 2.2.), die Annealingtemperatur wurde entsprechend den Primereigenschaften angepasst.

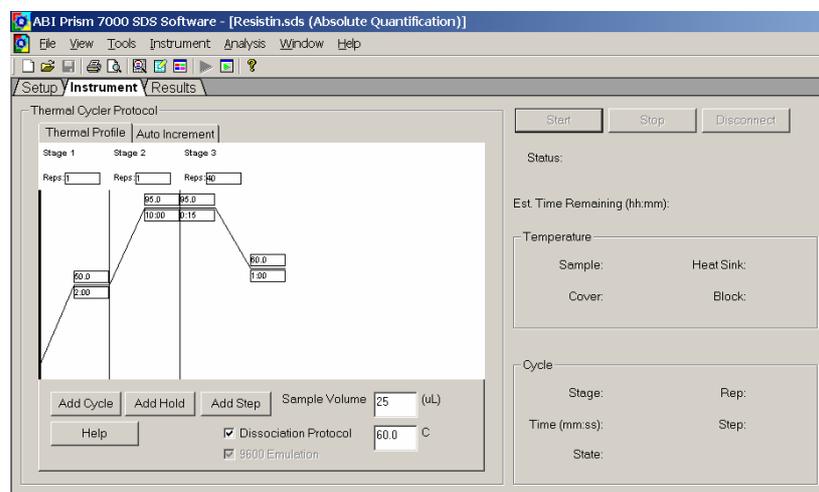


Abb. 2.2.: Zyklusprogramm einer Standard Real-Time

Zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse wurde für jedes Gen eine Standardkurve erstellt, welche die Effizienz der Amplifikation widerspiegelt und zur Berechnung des Gehaltes notwendig ist. Abbildung 2.3. zeigt eine Amplifikation am Beispiel von Resistin, bestimmt mit einem Sybrgreen® Mastermix und entsprechenden Primern, von sich halbierenden Mengen eines cDNA-Pools aller Proben. Wie erwartet beträgt der Abstand zwischen den Amplifikationssignalen ca. einen Zyklus. Die zwei untersten Kurven zeigen einen Ansatz ohne cDNA. Die durch den linear verlaufenden Bereich der Amplifikation gehende Linie wird als Schwellenwert = "treshold" bezeichnet, der zum Erhalt eines Zahlenwertes zum Vergleich der Proben herangezogen (ct- Wert) wird. Links oben ist dann die mit Excel erstellte Standardkurve zu sehen, bei der die ct- Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen wird. Eine extrapolierte Gerade wird dann zur Berechnung der Proben verwendet, wenn R^2 als Fehlerindikator größer als 0,99 ist.

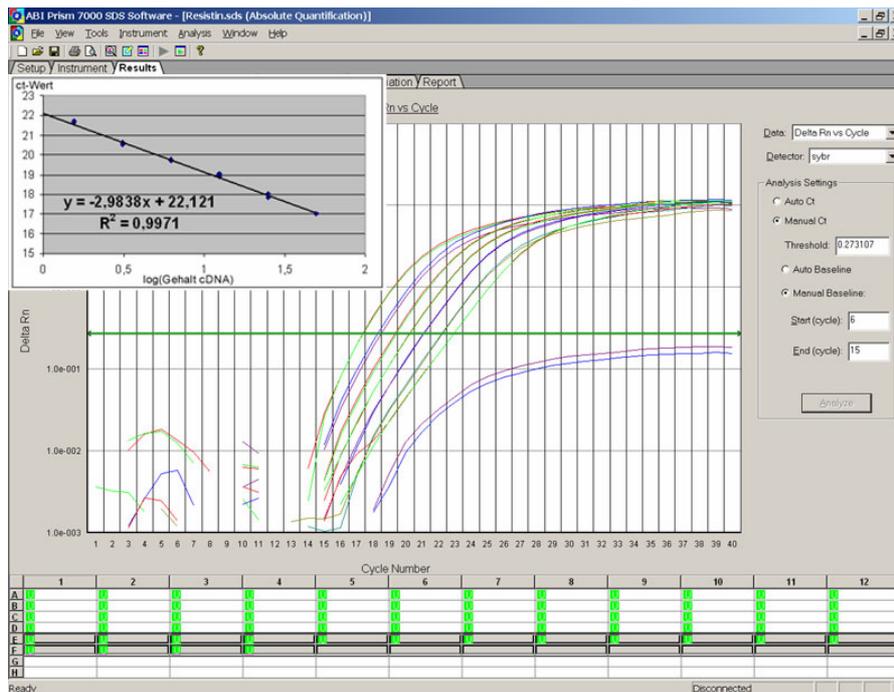


Abb. 2.3.: Real-Time Standardkurvenamplifikation und berechnete Kurve

Diese Prozedur wurde für jedes gemessene Gen angewendet. Bei stark streuenden Messwerten wurden die Proportionen von forward- zu reverse- Primer variiert, bis sich reproduzierbare Standardkurven ergaben. Die Amplikons wurden jeweils mittels Agarosegelen auf die richtige Größe kontrolliert und zusätzlich bei Sybrgreen® PCRs durch die Analyse der Schmelzkurve identifiziert.

Standard-Real-Time Reaktionsansatz:

~ 10 ng cDNA

12,5 µl 2x Mastermix (mit oder ohne Sybrgreen®, von Applied Biosystem)

0,25 µl 20 µM Forward-Primer

0,25 µl 20 µM Reverse-Primer

0,25 µl 20 µM Sonde (bei Sondensystemen ohne Sybrgreen®)

ddH₂O ad 25 µl

Jede Probe wurde mindestens doppelt gemessen und dann auf die Expression eines stabil exprimierten Genes (=housekeeping-Gen), meist auf die mitochondriale Untereinheit 18s, bezogen.

2.2.1.3. RT-Reaktion zur cDNA- Synthese

1. 1µg mRNA wurde mit 1µg Random-Primern in einem Volumen von 13,5µl versetzt und die Mixtur 5 Minuten bei 70°C denaturiert.
2. Die Probe wurde sofort in Eis überführt und nach Abkühlung dort mit den folgenden Reagenzien versetzt:
 - 0,5 µl RNasin (Promega)
 - 4 µl 5x First strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂)
 - 1 µl 10 mM dNTP-Mix
 - 1 µl M-MLV RT RNase H Minus (Promega)
 - 20 µl Gesamtvolumen
3. Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluß erfolgte die Analyse der cDNA durch PCR.

2.2.1.4. Kultivierung von Bakterien

Die Herstellung und Transformation von Bakterienzellen erfolgte durch eine Polyethylenglykol abhängige chemische Kompetenz des E.coli Stamms XL1-blue [145]. Diese wurde wie folgt erreicht:

- mit 1ml Übernachtskultur 100ml LB animpfen, bis OD 0,3-0,6 wachsen lassen
- 10 Minuten mit 2500g abzentrifugieren
- Resuspendieren in 7,5ml IMT, dann 1 Stunde auf Eis inkubieren
- Aliquotieren und wegfrieren in flüssigen Stickstoff

Der eigentliche Transformationsvorgang wird nach folgendem Protokoll induziert:

- 20µl KCM 5x mit 80 µl Plasmidlösung (20-100ng Plasmid) verdünnen
- 20 Minuten auf Eis – 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 1ml LB- Medium zugeben und 1 Stunde bei 37 Grad leicht schütteln
- auf eine antibiotikahaltige Platte ausstreichen und über Nacht bei 37 Grad wachsen lassen

Die durch die Transformation erworbene Antibiotikaresistenz erlaubt die Selektion der positiven Kolonien, welche dann zu präparativen Zwecken in LB-Medium überführt wurden.

2.2.1.5. Isolation von Plasmid-DNA

Midi- und Maxi-Präparation zu präparativen Zwecken

Zur Isolation von Plasmid- DNA zu präparativen Zwecken wurden die Kits zur Plasmidextraktion „Maxi“ verwendet und die Präparation nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Mini-Präparation zu analytischen Zwecken

Hierfür wurde der NucleoSpin Plasmid-Kit verwendet und die Präparation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt

2.2.1.6. Isolation von genomischer DNA und Genotypisierung

Zur Genotypisierung erforderliche genomische DNA wurde mit Hilfe des Invisorb Spin Cell Mini Kit (Invitek, Berlin, D) nach Angaben des Herstellers aus kultivierten Zellen gewonnen.

Die AT₂- Rezeptor defizienten embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurden durch Verpaarung von homozygoten Tieren erzeugt. Zu Kontrolle wurden die kultivierten Zellen genotypisiert, als Referenz diente gDNA aus (-/-), (-/+) und (+/+) Tieren. Durch den Einsatz zwei verschiedener reverse- Primern und Spezifität zu der NEO-Kassette kann zwischen (+/+) und den (-/-) unterschieden werden.

Die Amplifikationen der PCR sind in Abbildung 2.4. dargestellt.

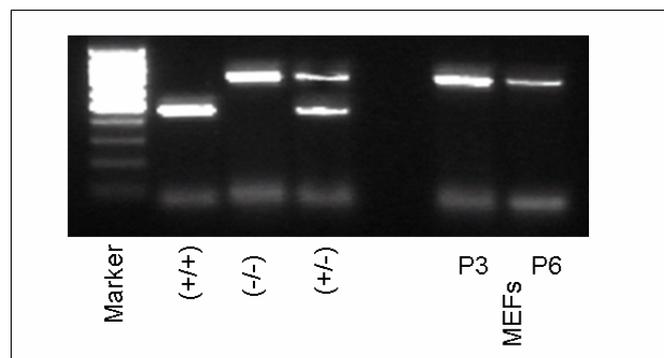


Abb. 2.4.: Genotypisierung der AT2R defizienten MEFs

Es werden ein 455bp Fragment der (+/+) und ein 834 bp Fragment der (-/-) amplifiziert, alle benutzten Passagen der MEFs (P3 und P6) zeigen nur das längere Fragment

2.2.1.7. Isolation von mRNA

Die Isolation von mRNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Absolutely-RNA (Stratagene Europe, Amsterdam, NL) oder des Nucleo-Spin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, D) Kits gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers. Beide Kits bedienen sich der Bindung von mRNA an Polymere, die dann gewaschen werden und mit polarem Lösungsmittel die mRNA wieder freisetzen.

2.2.1.8. Kontrolle der mRNA- Qualität

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten mRNA wurde der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis von 260nm zu 280nm wurde errechnet und nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet. Ein kleineres Verhältnis weist auf Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzrückständen hin, die dann beim Umschreiben in cDNA und bei Real-Time PCRs zu möglichen Ungenauigkeiten führen können. Als weitere Kontrolle diente ein TBE-Agarose Gel, auf das 1µg mRNA aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Die prominenten mitochondrialen Untereinheiten 18 und 28s sollten dann als Banden durch Ethidiumbromideinlagerung sichtbar sein, so wie in Abbildung 2.5. gezeigt wird. Degradation bzw. Rückstände von genomischer DNA- Verunreinigung in den Auftragstaschen können auf diese Weise visuell identifiziert werden.

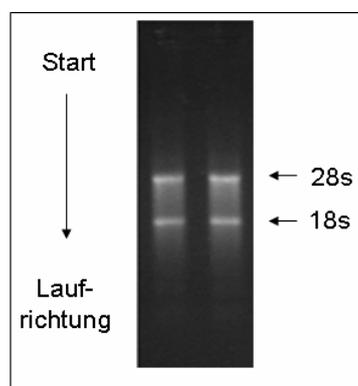


Abb. 2.5.: mRNA- Qualitätskontrolle mittels eines TBE-Agarosegels

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Proteinisolation aus kultivierten Zellen

Nach entsprechender Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Schabers oder mit Trypsin abgelöst und in ein Eppendorftube überführt. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 2000g wurde der Überstand an PBS entfernt und das Pellet in Proteinlysepuffer aufgenommen. Nach Behandlung mit Ultraschall (6-10 Impulse mit einer Sekunde Länge bei mittlerer Frequenz) zur vollständigen Freisetzung der Proteine, wurde das Gemisch 30 Minuten bei höchster g-Zahl zentrifugiert und der Überstand (gelöste Proteine) in ein neues Eppendorftube überführt und bei -80°C bis zur Gehaltsbestimmung gelagert.

2.2.2.2. Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Gehaltsbestimmung von Proteinen wurde entweder das BCATM Protein Assay Reagent Kit (Perbio Science, Pierce, Bonn, D) oder das Bradford Reagenz verwendet [146], je nach Kompatibilität der Puffer, indem die Proteine aufgenommen wurden. Bei beiden Methoden wurden durch Standardkurven lineare Bereiche zwischen Proteingehalt und Absorption des Farbkomplexes ermittelt und für die Berechnung des Gehalts der Proben herangezogen.

2.2.2.3. Western- Blotting

Je nach Zielprotein wurden 10-50µg Gesamtprotein mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen, versehen mit einer 1cm Schicht eines niedrigprozentigen Sammelgels. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Laemmli [147]. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine unter Verwendung einer „semi-dry blottig“ Apparatur (Biorad) oder einer Naßblottkammer (Biorad) auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Transferpuffer diente Towbinpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol und 0,07% SDS). Die Transferbedingungen des Blot-Apparaturherstellers wurden befolgt.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine wurden die Membranen mit Ponceaufarbstoff und die Gele mit einer Coomassielösung gefärbt. Die Membran wurde anschliessend kurz in TBS-Puffer gewaschen und in TBS-Puffer mit 5 % Blockingreagenz für 90 Minuten geblockt. Der Erstantikörper wurde 1:200 (PPAR γ), 1:10000 (Adiponektin) oder 1:5000 (Glyceraldehyde-3-Phosphat- Dehydrogenase

(GAPDH)) mit 2,5 bzw 5 % Blockingreagenz (Milchpulver) in TBS verdünnt und mit der Membran bei Raumtemperatur (1 Stunde) oder bei 4°C (über Nacht) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit TBS-T-Puffer entfernt. Der Zweitantikörper (Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen- bzw Anti-Maus Antikörper) wurde 1:1000 verdünnt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte die Peroxidasereaktion mit ECL (Amersham Pharmacia) als Chemilumineszenz und die Auflage eines Filmes. Nach entsprechender Expositionszeit (30s bis 2 Stunden) wurde der Film entwickelt und gescannt.

TBS-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl

TBS-T-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 500 mM NaCl ; 0,05% Tween 20 (v/v)

2.2.2.4. Proteinexpression in E.coli- Stämmen

Zur Proteinexpression wurde der E.coli Bakterienstamm BL21 verwendet. Nach der Erlangung der chemischen Kompetenz durch die unter 2.2.1.4. beschriebene Prozedur, wurden die Plasmide mit funktionellem T7-Promoter, aufgelistet in Tabelle 2.3., transformiert:

Name	Markierungs-Taq	Anwendung
pGEX4T1-hPPAR γ	GST	GST-Pulldown Assay
pET-28a(+)-His-hPPAR γ 2 -LBD	His	Kristallisation
pET-28c-His-RXRalpha-LBD	His	Kristallisation

Tabelle 2.3.: Bakteriell exprimierte Proteine und Anwendung
(GST= Gluthation S-Transferase)

Eine transformierte Kolonie wurde über Nacht in 4ml LB-Medium vorinkubiert. Anschließend wurden 20-3000ml LB-Medium angeimpft und beim OD von 0,6 mit 0,2 – 1mM Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG) versetzt und bei 25°C für 4 Stunden geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 4000g wurde das Pellet gegebenenfalls portioniert und bei -20°C eingefroren.

Zur Kontrolle wurden stündlich Aliquots genommen, um die Expression zu überwachen. Nach Lyse in 2x Laemmli-Puffer wurden das Proteingemisch auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und nach der Auftrennung mit einer Coomassielösung, wie in Abbildung 2.6. zu sehen ist, zur Proteindetektion gefärbt.

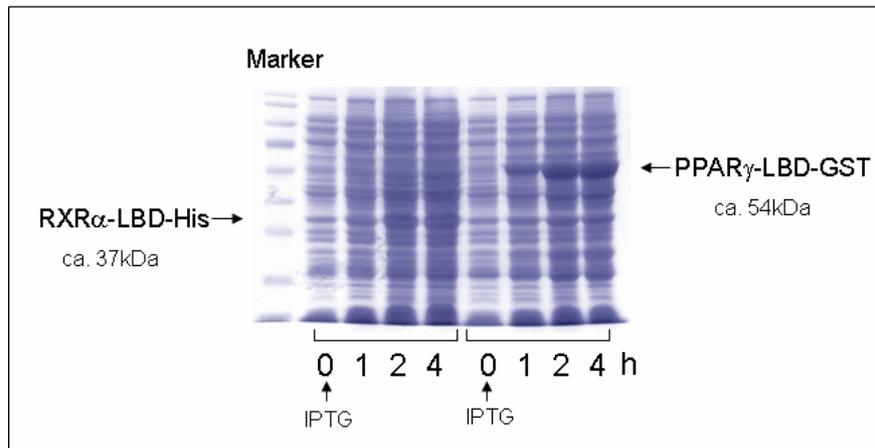


Abb. 2.6.: Proteinexpression am Beispiel eines His-markierten RXR α und eines PPAR γ -GST
(Coomassiefärbung)

2.2.2.5. Aufreinigung von GST- und His- markierter Proteine

Als Vorlage der Aufreinigung dienten Protokolle aus „The QIAexpressionist, August 2002“ von QIAGEN. Durch Zugabe von Lysepuffer (siehe The QIAexpressionist) und Inkubation mit Lysozym (1 mg/ml) wurden durch 10mal 10 Sekunden Ultraschall die Proteine freigesetzt. Zur Abtrennung von His-markierten Proteinen wurden die Bakterienlysate mit Ni-NTA- Agarose für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Durch eine Komplexbildung des His-Proteinrestes mit dem an der Agarose gebundenen Nickels werden die Proteine immobilisiert. Nach Überführung in eine Säule und mehrerer Waschvorgänge wurde dann durch Zugabe eines Puffers mit hoher Imidazolkonzentration dieser Komplex verdrängt und das Eluat gesammelt.

Ähnlich ist der Vorgang für GST-Fusionsproteine, die an Glutathionsepharose gebunden werden. Die so immobilisierten Proteine werden mehrmals gewaschen und können als Sepharoseaufschlammung direkt im GST-Pull down eingesetzt werden. Abbildung 2.7. zeigt beispielhaft eine PPAR γ -LBD-His Aufreinigungen.

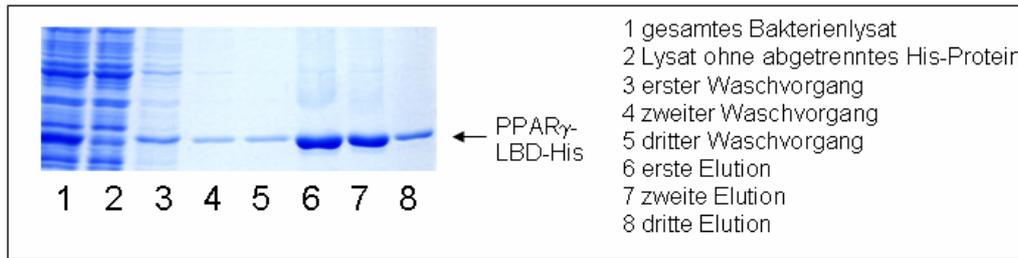


Abb. 2.7.: Aufreinigung eines His-markierten Proteines

(Coomassiefärbung)

Bei Abwesenheit von anderen Banden in den verschiedenen Elutionsfraktionen wurden diese vereint und entsprechend weiterbearbeitet. Bei der quantitativen Gewinnung der Proteine für die Kristallisation konnten aus 3 Litern LB- Medium ca. 20mg Protein aus BL21 isoliert werden.

2.2.2.6. Abspaltung von His- Markierungen durch Thrombin

Bei bestimmten Anwendungen der in E.coli erzeugten Proteine kann eine Markierung durch einen His-Rest stören. Deshalb wurden bei der Konstruktion des Vektors verschiedene Motive für Proteaseschnittstellen zwischen das eigentliche Protein und den His- Rest gelegt, sodass nachträglich dieser Rest enzymatisch entfernt werden kann. Dazu wurde das Thrombin- Cleavage Capture Kit (Novagen, D) benutzt. Mit Hilfe eines Testproteins können die optimalen Bedingungen, die je nach Puffer und Protein variieren, ermittelt werden. Danach wurde das gewünschte Protein für 5-10 Stunden mit Thrombin bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Streptavidin- Agarose inkubiert, um das Thrombin wieder aus der Reaktion zu entfernen. Durch Zentrifugation durch eine filterhaltige Säule kann das gebundene Thrombin entfernt werden. Abbildung 2.8. zeigt einen Zeitverlauf der Abspaltung, indem nach bestimmten Zeitintervallen Aliquots entnommen und auf einem SDS- Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden.

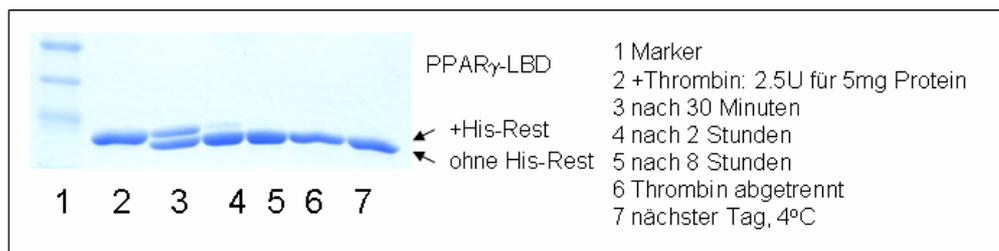


Abb. 2.8.: Zeitverlauf der Abspaltung eines His-Restes

(Coomassiefärbung)

Wie in Abbildung 2.8. zu erkennen ist, kann die um ca. 2kDa kürzere verdaute Proteinform von der ungeschnittenen Form unterschieden werden. Nach ca. 2h ist fast das gesamte Protein verdaut wurden.

2.2.2.7. Expression von Proteinen durch in-vitro Translation mit dem TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega

Um Proteine in kleineren Mengen herzustellen kann dieses System der in-vitro Translation benutzt werden. Außerdem kann durch Zugabe von ³⁵S-Methionin ein radioaktiv markiertes Protein erzeugt werden, welches dann leicht detektierbar ist. Das Kit wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden fertige Reaktionsgemische aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Benutzt wurden so synthetisierte Proteine für den Trypsinverdau von PPAR γ und für GST- Pulldown Assays zur Erzeugung der radioaktiv markierten Kofaktoren.

Eine Standardreaktion wurde wie folgt erstellt:

8,5 μ l TNT Reaktionsmix
1 μ l ³⁵S Methionin (Amersham, Freiburg, D)
0,5 μ l Plasmid mit T7 Promoter
10 μ l Reaktionsansatz

Je nach Bedarf wurde dieses Volumen vervielfacht. Dieser Reaktionsmix wurde für 2 Stunden bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.2.8. Partieller Protease- Verdau von PPAR γ -Protein

In-vitro translatiertes, ³⁵S markiertes hPPAR γ_2 wurde in einem Verdaupuffer (10mM Tris-HCl, 25mM KCL und 10mM DDT) für 1 Stunde mit den verschiedenen Liganden (1-150 μ M) vorinkubiert. Danach wurde Trypsin zugegeben (75 μ g/ml) und nach 0, 10, 40 und 60 Minuten Proben entnommen. Nach Zugabe von 2x Laemmli-Puffer und sofortigem Erhitzen auf 95°C wurden die Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde im Vakuum und 60°C für 30 Minuten getrocknet, in einer Filmkassette justiert und ein Film (Expositionszeit: 2h bis 14h) aufgelegt. Nach der Entwicklung wurde der Film getrocknet und eingescannt.

2.2.2.9. Gluthation S-Transferase (GST) Pull- down Assay

Die Experimente wurden in Kooperation mit dem Institut Pasteur, Lille bzw. mit GENFIT, Parc Eurasante, Loos durchgeführt. Zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen wurde die PPAR γ -LBD als GST Fusionsprotein in E.coli exprimiert und aufgereinigt (siehe 2.2.2.4. und 5.). Im finalen Lysepuffer (DTT 1mM, Benzamidin 1mM, NP40 0,1%, 1 Tablette Proteaseinhibitoren in 1x PBS) konnte das Protein, gebunden an Glutathionsepharose, ca. 1 Woche bei 4°C gelagert und entsprechend verwendet werden. Mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe und eines Coomasiegefärbten Geles wurde der ungefähre Gehalt der an die Sepharose gebundenen Proteine bestimmt.

Vor der Interaktionsprüfung wurden die Kofaktorproteine (NCoR, DRIP205 und TIF-2) mit Hilfe des TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega als ³⁵S markierte Proteine hergestellt.

Das an die Sepharose gebundene PPAR γ - LBD Protein wurde 3x mit Interaktionspuffer (Tris-HCL 20mM, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0,1% Tween 20, 1 Tablette Proteaseinhibitoren auf 50ml und 150 μ g/ml BSA) gewaschen. Anschließend wurden beide Proteine im Interaktionsmix wie folgt zusammengegeben:

3 μ l GST-Beads + Protein (ca. 10 μ g)
27 μ l GST-Beads auf 30 μ l
4 μ l im TNT erzeugtes markiertes Protein (Kofaktoren)
166 μ l Interaktionspuffer
200 μ l Ansatz

Dieser Ansatz wurde für jede experimentelle Bedingung hergestellt, die Liganden im Interaktionspuffer in DMSO vorgelegt. Die Inkubation betrug unter leichtem schütteln 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Sepharosesebeads 5x vorsichtig mit Interaktionspuffer (ohne BSA, aber mit der entsprechenden Konzentration an Ligand) gewaschen und in 2xLaemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde im Vakuum für 30 Minuten bei 60°C getrocknet, in einer Filmkassette justiert und ein Film (Expositionszeit: 5h bis 1 Woche) aufgelegt. Nach der Entwicklung wurde der Film

getrocknet und eingescannt. Die Entwicklung erfolgte alternativ auch mit Hilfe eines Phosphoimagers.

2.2.2.10. Fluoreszenz- Resonanz Energietransfer (FRET) Assay

Fluoreszenz-Bioassays dienen dem sensitiven Nachweis biomolekularer Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand, Antikörper und Antigen oder DNA und DNA. Für den Nachweis der spezifischen Bindung von einem Protein an ein anderes eignet sich der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Der FRET ist stark abstandsabhängig (1-10 nm). Der Energietransfer erfolgt zwischen zwei fluorophoren Gruppen, die an das jeweilige Protein gekoppelt sind, wenn eine biomolekulare Erkennung erfolgt: in diesem Fall eine Interaktion von Kofaktor mit Nukleärem Rezeptor (= räumliche Nähe der beiden Proteine) in Abhängigkeit der Liganden.

Die Experimente wurden in Kooperation mit GENFIT, Parc Eurasante, Loos durchgeführt. Gemessen wird die durch Interaktion angeregte Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration über der Hintergrundfluoreszenz (A/B).

2.2.3. Zellkulturtechniken und Transfektionen

2.2.3.1. Kultivierung der Zelllinien und Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten

Kulturmedien:	3T3-L1 Präadipozyten und COS-7 Zellen	DMEM 10% FBS 1% Pen./Strep.
	PC12W	DMEM 10% Horse Serum 5% FBS 1% Pen./Strep.
	Embryonale Fibroblasten	AlphaMEM 10% FBS 1% Pen./Strep. 200mM Glutamin

Die Zellen wurden standardmäßig kultiviert. Die Medien wurden alle 2 Tage erneuert.

Differenzierung:

3T3-L1 Präadipozyten bzw. MEFs wurden kultiviert, ohne vor der nächsten Passage eine volle Konfluenz zu erreichen, um die Differenzierungskapazität der Zellen zu erhalten. Für Differenzierungen wurden die Zellen dicht ausgesät und sobald Konfluenz erreicht war, als Tag -2 deklariert. 2 Tage später (Tag 0) wurde ein Differenzierungsmix (Mix) bestehend aus: Dexamethason $1\mu\text{M}$, 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) $500\mu\text{M}$ und Insulin $1\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Am Tag 2 wurde dieser Mix mit Insulin ausgetauscht. Ab Tag 4 wurde Medium ohne Zusätze verwendet. Abbildung 2.9. zeigt ein Schema dieses Zeitplanes.

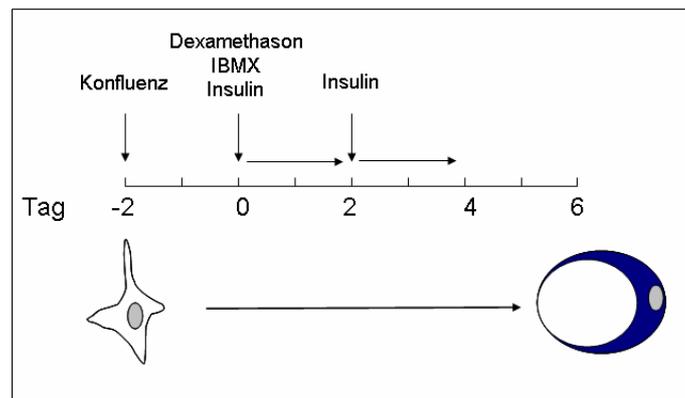


Abb. 2.9.: Zeitschema der Fettzeldifferenzierung in 3T3-L1 Präadipozyten

Nach dieser Prozedur differenzieren die Zellen innerhalb von 5-7 Tagen zu lipidbeladenen Fettzellen. Differenzierungen, die abhängig vom Zusatz eines $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden sind, wurden ohne Zusatz von IBMX durchgeführt [72]. Diese Art der Differenzierung läuft durch die suboptimalen Bedingungen langsamer ab.

Zum Einfluß der Liganden auf die Differenzierung wurden die AT_1 - Antagonisten bzw. Pioglitazon, wenn nicht anders beschrieben, während der gesamten Differenzierung dem Medium hinzugefügt.

2.2.3.2. Präparation von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Präparation:

1. Murine Embryonen am Tag 12,5 bis 14,5 ihrer Embryonalentwicklung wurden in PBS gewaschen. Sowohl die Abtrennung von Kopf und Extremitäten vom Rumpf als auch das Entfernen von Leber, Herz und anderen bereits differenzierten inneren Organen dienen dazu, die Primärzellkultur mit einem möglichst großen Anteil embryonaler Fibroblasten anzureichern und andere bereits differenzierte Zelltypen zu vermeiden.
2. Die verbleibenden Gewebe wurden in 2 ml PBS mit Hilfe einer 5 ml Spritze, auf die eine 18 G Kanüle aufgesetzt war, zerkleinert bis keine größeren Gewebestücke mehr erkennbar waren.
3. 20 ml AlphaMEM + 10% FBS und Penicillin/Streptomycin wurden hinzugefügt und die Zellsuspension in einer Kulturflasche ausgesät.
4. Im Inkubator setzten sich die Zellen schnell am Boden ab und begannen sich zu teilen, sodass am dritten Tag nach der Isolation die Kulturflasche fast konfluent bewachsen war.
5. Die Kultur wurde mit PBS gewaschen, trypsiniert, 1:3 auf neue Kulturflaschen ausgesät und vor Erreichen der Konfluenz mit Einfriermedium eingefroren.

<u>Einfriermedium:</u>	AlphaMEM
	10% FBS
	1% Pen./Strep.
	10 % Dimethylsulfoxid

Die Zellen wurden aufgetaut und für 6 Passagen in Differenzierungsexperimenten verwendet.

2.2.3.3. Präparation und Differenzierung von humanen Präadipozyten

Die Experimente mit humanen Präadipozyten wurden in Kooperation mit Dr. Jürgen Janke, Helios Klinik, Charité, Berlin-Buch durchgeführt. Fettgewebe wurde von Frauen, die sich einer Brustverkleinerungsoperation unterzogen, gewonnen. Nach einem speziellen Protokoll mit diversen Zentrifugationsschritten und einem Trypsinverdau werden die Präadipozyten abgetrennt und in Kulturflaschen ausgesät. Isolierung und Differenzierung dieser Adipozyten sind in [142] beschrieben.

Die Differenzierung erfolgte in serumfreien Medium mit 1µmol/L Insulin, 1 nmol/L Triiodthyronin (T3) und 100 nmol/L Hydrocortison für 8-12 Tage. Unter diesen Bedingungen differenzieren ca. 60-80% der Zellen zu Adipozyten.

2.2.3.4. Färbung intrazellulärer Triglyzeride mit Oil-Red O

Um intrazelluläre Triglyzeride anzufärben wurde die Zellen 2x mit PBS gewaschen, danach mit einer Oil-Red-O Färbelösung (0,5% in 60% Isopropanol, gefiltert) für 4 Stunden bei Raumtemperatur, unter leichtem schütteln, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Die angefärbte Platte wurde direkt eingescannt.

Zur quantitativen Bestimmung wurde der Farbstoff wieder mit 60% Isopropanol herausgelöst und photometrisch bei 510nm vermessen [142]. Dabei diente der Lipidgehalt undifferenzierter Zellen als Hintergrund und wurde subtrahiert.

2.2.3.5. Transiente Transfektion von adheränten Zellkulturen

Zur transienten Differenzierung der Zellen wurde das Lipofectamin® 2000 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D) Reagenz benutzt. In Vorversuchen unserer Gruppe wurde dieses als effizientes und schonendes Verfahren bestätigt. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. In einem ersten Ansatz wurde die Plasmid-DNA in OPTIMEM verdünnt, in einem zweiten Ansatz Lipofectamin® 2000 in OPTIMEM für 5 Minuten inkubiert. Nach dem Vereinigen der beiden Ansätze und 20 Minuten Inkubation wurde diese Mischung vorsichtig auf die Zellen verteilt, die zuvor mit PBS gewaschen und auf DMEM ohne Antibiotika gesetzt wurden. Die Transfektionszeit betrug zwischen 3 und 4 Stunden. Anschließend wurde wieder serumhaltiges Medium zugegeben und entsprechend stimuliert.

2.2.3.6. Bestimmung der Luziferaseaktivität und β -Gal Aktivität in Reporterassays

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität von Reportergenen wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega GmbH, Mannheim, D) benutzt. Die Anwendung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Nach der Inkubation von 24-48h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, im passiven Lysepuffer aufgenommen und kurz anzentrifugiert. Parallel wurden zwei verschiedene Substratlösungen hergestellt, die zum einen für die Firefly- Reporterluziferase und zum anderen für die Renilla-Luziferase, als Normierung, zur Aktivitätsbestimmung dienten. Nach Messung der Proben im Luminometer wurde aus den beiden Luziferasemessungen der Quotient gebildet.

Alternativ erfolgte die Normierung mittels der Koexpression von β -Galaktosidase, deren Aktivität photometrisch nachgewiesen werden kann (spaltet 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) zu Galaktose und dem gelbem 2-Nitrophenol).

Dafür wurden 20 μ l Zelllysate mit Substratpuffer (80mM Na₂HPO₄, 8mM KCL, 0,8mM MgSO₄, 2,65mM ONPG und 4,08 μ l Mercaptoethanol pro ml Puffer) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend die Absorption bei 405nm photometrisch vermessen.

2.2.4. Kristallstrukturanalyse von PPAR γ mit gebundenem Ligand

Die Kristallisation von PPAR γ bzw. des PPAR γ /RXR α -Dimers erfolgt in enger Kooperation mit Frau Feske und Herrn Dr. Jürgen Müller aus der Gruppe von Herrn Prof. Heinemann am MDC in Berlin Buch. Dabei wurden die Expression und Isolierung der benötigten Proteine selber, das Ansetzen der Kristallisationsscreens und alle kristallografischen Arbeiten durch die kooperierende Arbeitsgruppe durchgeführt.

Nach der Aufreinigung der Proteine (siehe 2.2.2.4. und 2.2.2.5.), wurden von einem Teil des Proteins die His-Reste abgespalten (siehe 2.2.2.6.), da sie die Faltungsfähigkeit des Proteins negativ beeinflussen können. Nach mehreren Reinigungs- und Konzentrierungsschritten wurde, in Anwesenheit des Liganden, eine Vielzahl von Lösungsmittelkombinationen für die Kristallisation getestet, um im „hängenden Tropfen“ eine Kristallbildung zu erreichen.

Die verschiedenen Bedingungen dafür waren:

+/- His-Rest

Proteinpuffer: 8,10,14 mg/ml

Umgepuffert in: 50 mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 2mM EDTA

Wachstum: 21°C, hanging drop

Sättigungspuffer:

(1) Hampton Screen I+II (näher beschrieben in [148])

(2) 0,1M HEPES, pH7.5, 1,4(1,5; 1,6)M Na-citrate

In Anwesenheit des Liganden (Pioglitazon und Telmisartan):

Komplexformation: 1:5 bzw. 1:10 molarer Ratio

Sättigungspuffer

17%PEG4000, 0,2M Na-acetate, 0,1M Tris, pH8.5

Die Auswertung erfolgte mittels einen Vergleiches der Elektrtronendichten durch ein „Molecular Replacement“ mit veröffentlichten Daten zu PPAR γ und einer Identifizierung des gebundenen Liganden.

2.2.5. Bestimmung von Expressionsmustern mittels Genearrays

Für die Analyse spezieller Expressionsmuster wurden Oligochips der Firma Agilent verwendet. Alle Arbeiten erfolgten in Kooperation mit Henning Witt (AG Ruiz, Max Planck Institut) und Markus Clemenz (AG Unger, CCR), die die Hybridisierung und Detektion durchführten. 3T3-L1 Adipozyten wurden für 24h mit den verschiedenen Liganden behandelt und aus 3 Ansätzen jeweils ein Pool der isolierten mRNA gebildet. Dieser Pool wurde 4x hybridisiert. Änderungen in der Expression wurden als Vielfaches gegenüber den DMSO (=Vehikel) behandelten Zellen errechnet. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden 7 Gene ausgewählt und mit Real-Time PCR validiert.

Mit Hilfe eines “Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit “(Agilent) wurden 1 μ g mRNA amplifiziert und mit Cyanin 3- oder Cyanin 5- CTP (Perkin Elmer/NEN Life Science) als cRNA markiert. Der Gehalt an cRNA wurde dann mit Ultraviolett Spektroskopie bestimmt (NanoDrop ND1000). 1,2 μ g der markierten cRNA wurden auf Agilent mouse oligo microarrays (Agilent, G4121A), gemäß den Instruktionen des Herstellers, hybridisiert. Nach dem waschen der Mikroarrays wurden die Chips mit einem Agilent Microarray Scanner (G2565BA) gescannt und mit Feature Extraction software 7.1.1(Agilent) ausgewertet.

2.2.6. Messung der Glukoseaufnahme in Adipozyten

Zur Bestimmung der Insulin- abhängigen und unabhängigen Glukoseaufnahme wurde eine Methode nach [149] modifiziert. 3T3-L1 Adipozyten, kultiviert in 12 well Platten, wurden für 72 Stunden mit den Liganden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit purem DMEM gewaschen und für 2 Stunden gehungert. Danach wurden die Zellen auf KRPH- Puffer gesetzt und \pm Insulin (100nM) für 30 Minuten behandelt. Für die letzten 6 Minuten wurde 0,1 mM 2-Deoxy-D-glukose (mit darin enthaltener 0,5 μ Ci/ml Deoxy-D-[2,6- 3 H]glukose) hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von

kaltem PBS, der 20µg/ml Cytochalasin B enthielt (Blockade aller Glukosetransporter), gestoppt. Nach 2 zusätzlichen Waschvorgängen mit PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml 1N NaOH lysiert. Von diesem Lysat wurden je 100µl je zweifach vermessen, indem 1ml Scintillationsflüssigkeit (Optiphase Supermix, Wallac, Leeds, GB) zugegeben und die Counts (Microbeta Trilux, Perkin Elmer, Wellesley, USA) für eine Minute gezählt wurden.

Die unspezifische Glukoseaufnahme wurde in der Anwesenheit von 10µg/ml Cytochalasin B bestimmt. Die Werte wurden von den gemessenen Glukoseaufnahmen am Ende abgezogen.

2.2.7. Statistische Berechnungen

Die Zellkulturexperimente mit murinen Zellen und Transfektionsexperimente wurden mit Hilfe des parametrischen Student- t- Tests analysiert, da durch bisherige Erfahrungen von einer Normalverteilung dieser Werte auszugehen ist. Gemäß den Anforderungen der wissenschaftlichen Journale wurden Genexpressionen der genetisch uniformen Zelllinien und Luziferaseaktivitäten in dieser Weise einer konfirmatorischen Datenanalyse auf Signifikanz hin untersucht und in $p < 0,05$ (signifikant) und $p < 0,01$ (hoch signifikant) in. Die grafische Darstellung erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Bei Ergebnissen, die durch Experimente mit Zellen aus verschiedenen Patienten generiert wurden, kamen nichtparametrische Tests zur Anwendung, der Kruskal-Wallis- (Vergleiche multipler Gruppen) und der Mann-Whitney-Test (Vergleich zweier Gruppen) mit den gleichen Signifikanzgrenzen wie bei den parametrischen Tests. Die Darstellung erfolgte als Box- Whisker Plots (mit Median, den 25 und 75 Perzentilen und den Extremen). Programme zur Berechnung der Statistik und EC_{50} -Werte und für die grafische Darstellung der Daten waren Excel 2000, SPSS 12.0 und Origin 7.0. Zur Berechnung der logD Werte wurde das Programm ACD Chems sketch benutzt.