

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Einfluss nukleärer Östrogenrezeptoren
auf die Expression der
Adipozytären Triglyceridlipase**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt der medizinischen Fakultät der
Charité - Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von
Annekatriin Schwanstecher
aus Göttingen

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abstract in deutscher Sprache | 6 |
| Abstract in englischer Sprache..... | 7 |
| 1 Einleitung | 11 |
| 1.1 Allgemeines: Fettsäuren im Organismus..... | 11 |
| 1.2 Das Fettgewebe | 12 |
| 1.2.1 Funktionelle Einteilung: Braunes und weißes Fettgewebe..... | 12 |
| 1.2.1.1 Braunes Fettgewebe..... | 12 |
| 1.2.1.2 Weißes Fettgewebe..... | 12 |
| 1.2.2 Einteilung der Fettgewebstypen nach Lokalisation | 13 |
| 1.2.2.1 Subkutanes Fettgewebe | 13 |
| 1.2.2.2 Viszerales Fettgewebe | 13 |
| 1.2.2.3 Pathophysiologische Bedeutung von Subkutan- und Viszeralfett | 14 |
| 1.2.2.4 Mechanismen der Initiation inflammatorischer Prozesse..... | 14 |
| 1.2.3 Akkumulation von Fettreserven..... | 15 |
| 1.2.3.1 Die Aufnahme, Speicherung und Verstoffwechslung von Nahrungsfetten..... | 15 |
| 1.2.3.2 Lipid Droplets | 16 |
| 1.2.4 Die Enzyme des Fettgewebes | 16 |
| 1.2.4.1 Die Adipozytäre Triglyceridlipase | 17 |
| 1.2.4.1.1 <i>Gen.....</i> | <i>17</i> |
| 1.2.4.1.2 <i>Protein: Struktureller Aufbau und funktionelle Domänen.....</i> | <i>18</i> |
| 1.2.4.1.3 <i>Metabolische Regulation der ATGL.....</i> | <i>18</i> |
| 1.2.4.1.4 <i>Transkriptionelle Regulation.....</i> | <i>20</i> |
| 1.2.4.1.5 <i>Mausmodelle</i> | <i>20</i> |
| 1.2.4.2 Die hormonsensitive Lipase (HSL)..... | 21 |
| 1.2.4.2.1 <i>Metabolische Regulation.....</i> | <i>22</i> |
| 1.2.4.2.2 <i>Transkriptionelle Regulation.....</i> | <i>22</i> |
| 1.2.4.3 Die Monoacylglyceridlipase | 22 |
| 1.2.4.4 Zusammenfassung: Regulation des Triglyceridabbaus | 23 |
| 1.2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede in Fettgewebsverteilung und Fettsäuremetabolismus | 23 |
| 1.3 Östrogenrezeptoren | 24 |
| 1.3.1 Nukleäre Wirkung..... | 26 |
| 1.3.2 Primär extranukleäre Wirkung..... | 27 |
| 1.4 Knock-out-Modelle | 27 |
| 1.4.1 ER α -Knockout..... | 27 |
| 1.4.2 ER β -Knockout | 28 |
| 1.4.3 Aromatase-Knock-out Mäuse | 28 |
| 1.4.4 Ovariectomierte Mäuse | 28 |
| 2 Herleitung der Aufgabenstellung | 31 |

3 Material 33

| | |
|--|-----------|
| 3.1 Zellen und Mikroorganismen..... | 33 |
| 3.2 Arbeitsmaterialien | 33 |
| 3.3 Laborgeräte | 33 |
| 3.4 Kits..... | 34 |
| 3.5 Chemikalien und Substanzen..... | 34 |
| 3.6 Konstrukte | 35 |
| 3.7 Industrielle hergestellte Fertig-Medien und –Lösungen | 36 |
| 3.8 Selbsthergestellte Lösungen und Puffer..... | 36 |
| 3.9 Computerprogramme..... | 38 |
| 3.10 Primer | 38 |
| 3.11 Antikörper..... | 38 |

4 Methoden..... 40

| | |
|---|-----------|
| 4.1 Zellkultur | 40 |
| 4.1.1 Zelllinie..... | 40 |
| 4.1.2 Medien und Lösungen | 40 |
| 4.1.2.1 Vollmedium | 41 |
| 4.1.2.2 Phenolfreies gestripptes Medium | 41 |
| 4.1.2.3 Phenolfreies gestripptes Hungermedium..... | 41 |
| 4.1.2.4 Opti-MEM® Reduced Serum Medium | 41 |
| 4.1.2.5 PBS | 41 |
| 4.1.3 Auftauen von Zellen..... | 41 |
| 4.1.4 Passagieren von Zellen..... | 42 |
| 4.1.5 Ausplattieren von Zellen | 42 |
| 4.1.6 Transfektion von Zellen..... | 43 |
| 4.1.7 Stimulation von Zellen | 44 |
| 4.2 Luciferaseversuche | 44 |
| 4.2.1 Vorarbeiten | 44 |
| 4.2.1.1 Transformation von E.coli mit ATGL-Luc und pGL2-Luc..... | 44 |
| 4.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus den Probekulturen | 45 |
| 4.2.1.3 Restriktionsenzymverdau der Plasmid-Proben | 45 |
| 4.2.1.4 Sequenzierung der Proben | 46 |
| 4.2.1.5 Präparation einer größeren Plasmid-Menge für Transfektionsexperimente | 47 |
| 4.2.2 Gewinnung der Proben..... | 47 |
| 4.2.3 Luciferasemessung..... | 47 |
| 4.3 Promotoranalyse | 48 |
| 4.4 Quantitative Real-Time-PCR-Versuche | 50 |
| 4.4.1 Gewinnung der Proben..... | 50 |
| 4.4.2 Präparation der mRNA..... | 51 |
| 4.4.3 Synthese der cDNA | 51 |
| 4.4.4 Durchführung der Real-time-PCR | 52 |
| 4.4.5 Auswertung der Real-Time-PCR | 53 |
| 4.5 Western-Blot-Versuche | 55 |
| 4.5.1 Gewinnung der Proben..... | 55 |
| 4.5.2 Messung der Probenkonzentration | 56 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.5.3 | Herstellung der Gele..... | 57 |
| 4.5.4 | Blotten der Proteine..... | 58 |
| 4.5.4.1 | Vorbereitung der Proben..... | 58 |
| 4.5.4.2 | Gelelektrophoretische Auftrennung | 58 |
| 4.5.4.3 | Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran | 58 |
| 4.5.4.4 | Ansetzen des Blocking-Puffers und Blocken der Membran..... | 59 |
| 4.5.4.5 | Aufbringen des ersten Antikörpers..... | 59 |
| 4.5.4.6 | Waschen der Membran und Aufbringen des zweiten Antikörpers | 59 |
| 4.5.4.7 | Zweiter Waschschriff und Vorbereitungen der Arbeit in der Dunkelkammer.. | 59 |
| 4.5.4.8 | Arbeiten in der Dunkelkammer und Entwicklung des Films..... | 60 |
| 4.5.4.9 | Stripping der Membranen | 60 |
| 4.6 | Statistische Analyse..... | 60 |
| 5 | Ergebnisse | 61 |
| 5.1 | Analyse der ATGL-Expression auf Promotorebene (Luciferasemessung) | 61 |
| 5.1.1 | Vorversuche mit Östrogen Responsiven Elementen (EREs)..... | 61 |
| 5.1.2 | Ergebnisse der ER-Überexpressionsversuche | 61 |
| 5.1.2.1 | Überexpression von ER α | 62 |
| 5.1.2.2 | Überexpression vor ER β | 63 |
| 5.1.3 | Zusammenfassung und Vergleich von ER α und ER β | 64 |
| 5.2 | Promotoranalyse | 65 |
| 5.2.1 | Screening auf mögliche Östrogen Responsive Elemente | 65 |
| 5.2.2 | Vergleich der murinen und humanen Sequenzen | 66 |
| 5.2.2 | Promotorregionen. | 66 |
| 5.2.2.2 | Erstes Intron | 67 |
| 5.3 | Analyse der ATGL-Regulation auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) | 67 |
| 5.3.1 | Messungen der ATGL-mRNA-Menge | 68 |
| 5.3.1.1 | ER α -Versuchsreihe | 68 |
| 5.3.1.2 | ER β -Versuchsreihe..... | 69 |
| 5.3.1.3 | Vergleich zwischen ER α und ER β | 70 |
| 5.3.2 | Messungen der HSL-mRNA-Menge..... | 71 |
| 5.3.2.1 | ER α -Versuchsreihe | 71 |
| 5.3.2.2 | ER β -Versuchsreihe..... | 71 |
| 5.3.2.3 | Vergleichende Betrachtung..... | 72 |
| 5.4 | Analyse der ATGL-Regulation auf Proteinebene (Western Blot)..... | 72 |
| 5.4.1 | ER α | 73 |
| 5.4.2 | ER β | 74 |
| 6 | Diskussion | 75 |
| 6.1 | Kritische Diskussion der Methoden..... | 75 |
| 6.1.1 | Luciferasemessung..... | 75 |
| 6.1.2 | Bioinformatische Promotoranalyse | 77 |
| 6.1.3 | Quantitative Real-Time-PCR..... | 78 |
| 6.1.4 | Western Blot | 79 |
| 6.2 | Kritische Diskussion der Ergebnisse..... | 80 |
| 6.2.1 | Zusammenfassende Ergebnisdarstellung..... | 80 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 6.2.2 | Ergebnisdiskussion..... | 81 |
| 6.2.3 | Diskussion der Ergebnisse im Kontext aktueller Publikationen..... | 84 |
| 6.3 | Abschließende Ergebnisbetrachtung und Perspektiven | 88 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 90 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 96 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 97 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 98 |
| | Lebenslauf | 99 |
| | Publikationsliste | 100 |
| | Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen..... | 101 |
| | Danksagung | 102 |

Abstract in deutscher Sprache

Die Regulation der Expression der Adipozytären Triglyzerid Lipase (ATGL) durch nukleäre Östrogenrezeptoren

Ziele:

Östrogenrezeptoren (ERs) spielen eine wichtige Rolle bei metabolischen Prozessen im Fettgewebe. Es existieren geschlechtspezifische Unterschiede bezüglich der Lipolyse. Beispielsweise ist bekannt, dass weibliche Mäuse unter körperlicher Belastung männlichen Artgenossen gegenüber vermehrt Energie aus der Oxidation von Lipiden gewinnen. Weiterhin ist bekannt, dass Veränderungen der Fettverteilung und der metabolischen Aktivität des Fettgewebes während der Menopause mit einem steigenden Risiko für metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen assoziiert sind. Die Charakterisierung molekularer Mechanismen der Östrogenwirkung im Fettgewebe könnten daher zum Verständnis und der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in der Behandlung metabolischer Erkrankungen beitragen. Diese Arbeit untersucht den Einfluss der nukleären Östrogenrezeptoren (α and β) auf die Expression der Adipozytären Triglyzerid Lipase (ATGL), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym im Prozess des Triglyzeridabbaus.

Methoden und Ergebnisse:

Der regulatorische Einfluss von ER α and ER β auf die Expression der ATGL wurde in 3T3L1-Prädipozyten auf Promotor-, mRNA- und Proteinlevel untersucht. Die Zellen wurden transient mit ER α /ER β oder PSG5 transfiziert und mit Vehikel vs. selektivem ER α /ER β Agonisten PPT/DPN (c=100nM) über 24h stimuliert.

Die Promotoraktivität der Sequenz 3000bp upstream des ersten Exons des ATGL-Gens wurde mittels Luziferase-Assay untersucht. Die Transkription stieg sowohl ligandenunabhängig unter der Überexpression von ER α /ER β (1.6-/2.5-fach, $p < 0.05$ vs. PSG5-Kontrolle), als auch unter Rezeptorüberexpression bei gleichzeitiger Stimulation mit dem jeweiligen selektiven Agonisten an (2.7-/3.3-fach, $p < 0.05$ vs. Vehikel).

Die bioinformatische Promotoranalyse zeigte in Einklang mit diesen Ergebnissen 7 putative ER β - und nur 1 putatives ER α - Bindungsmotiv.

Die quantitative Real-time PCR zeigte einen signifikanten Anstieg der ATGL-mRNA-Menge um den Faktor 1,3 unter Vehikel- und den Faktor 1,5 unter PPT-Stimulation für ER α überexprimierte Zellen gegenüber PSG5-Kontrollen (both $p < 0.05$). Entsprechende Experimente für die Überexpression von ER β zeigten einen signifikanten Anstieg der ATGL-Menge um den Faktor 3,5 in DPN-stimulierten Zellen gegenüber PSG5-Kontrollen ($p < 0.05$). Außerdem konnte in ER β -überexprimierten Zellen ein signifikanter Anstieg um den Faktor 2.3 in DPN-stimulierten Zellen gegenüber Vehikelstimulierten Zellen gezeigt werden ($p < 0.05$). Es wurde ein signifikanter 2-facher Anstieg der ATGL-mRNA in PSG5-Kontroll-Zellen beobachtet ($p < 0.05$), der am ehesten auf einen geringen endogenen ER β -Besatz zurückzuführen ist.

Western Blot Versuche zeigten unter Stimulation mit DPN einen Anstieg der ATGL Menge sowohl in Kontrollzellen, als auch in ER β -überexprimierten Zellen. Unter PPT Stimulation zeigten sich keine überzeugenden entsprechenden Effekte für Kontroll- oder ER α -überexprimierte Zellen.

Schlussfolgerungen:

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass beide ERs die Expression der ATGL steigern. Der Einfluss von ER β auf die ATGL-Promotoraktivität, -mRNA-Expression und -Proteinmenge war in den vorliegenden Experimenten starker ausgeprägt, als derjenige von ER α . In weiterführenden Experimenten ist die Bedeutung dieser Beobachtungen für eine ER-spezifische Regulation der Lipolyse zu klären.

Abstract in englischer Sprache

Regulation of Adipose Triglycerid Lipase (ATGL) expression by nuclear Estrogen Receptors

Aims:

Estrogen Receptors (ERs) are known to play an important role in the metabolic functions of adipose tissue (AT). Gender specific differences concerning lipolysis have been reported. For instance, female mice are known to mobilize energy from fat more efficiently than male littermates under exercise conditions. Also, changes in fat distribution and metabolic activity of adipose tissue during menopause are associated with an increasing risk for metabolic and cardiovascular complications in humans. The characterization of molecular mechanisms of estrogen-action in AT might help understand and treat metabolic disorders in the future.

This study investigates the impact of nuclear ERs (α and β) on the expression of the Adipose Triglycerid Lipase (ATGL), the rate-limiting lipolytic enzyme in the process of triglyceride-degradation.

Methods and Results:

The regulatory impact of ER α and ER β on the expression of ATGL was investigated in 3T3L1-preadipocytes on promoter-, and mRNA level. Cells were transiently transfected with ER α /ER β or PSG5 and stimulated with vehicle vs. selective ER α /ER β agonists PPT/DPN (c=100nM) for 24h.

Promoter-activity of the sequence 3000bp upstream of the first exon of the ATGL-gene was assessed by performing luciferase assay. Transcription increased both ligand-independently under the overexpression of ER α /ER β (1.6-/2.5-fold, p<0.05 vs. PSG5-control), as well as under receptor-overexpression and stimulation with the respective ER-agonist (2.7-/3.3-fold, p<0.05 vs. vehicle).

In accordance, bioinformatical promoter analysis performed on the murine sequence revealed 7 putative ER β - and only 1 putative ER α -binding site.

qRT-PCR-analysis demonstrated a significant increase in the amount of ATGL-mRNA by factor 1.3 under vehicle- and factor 1.5 under PPT-stimulation for cells overexpressing ER α vs. PSG5-control (both p<0.05). Similar experiments for the overexpression of ER β showed a significant increase in ATGL-mRNA-amount by factor 3.5 in DPN-stimulated cells vs. PSG5-control (p<0.05). Additionally, in cells overexpressing ER β a significant increase by factor 2.3 could be observed between vehicle- and DPN-stimulation (p<0.05). Most likely attributable to endogenous ER β , a significant 2-fold increase of ATGL-mRNA could be observed under DPN-stimulation in PSG5-control-cells (p<0.05).

Western Blot showed an increase in the amount of ATGL for both control-cells, as well as cells overexpressing ER β when stimulated with DPN. PPT stimulation did not show conclusive corresponding effects in control-cells or cells overexpressing ER α .

Conclusions:

The present study demonstrates that both ERs exert positive regulatory actions on the expression of ATGL. The impact of ER β on ATGL promoter-activity, mRNA-expression and protein amount appears to be stronger when compared to ER α . Further experiments will be required to determine the importance of these finding for an ER isoform-specific regulation of lipolysis.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| AF1 | Activation Function 1 |
| AF2 | Activation Function 2 |
| AMPK | Adenosinemonophosphatkinase |
| α -MSH | α -melanozytenstimulierendes Hormon |
| ANP | Atrial natriuretic peptide |
| AP-1 | Activation Protein 1 |
| Apo... | Apolipoprotein |
| ATGL | Adipozytäre Triglyceridlipase |
| ATGL-Luc | ATGL-Luciferase-Konstrukt |
| AUC | Area under the curve; Fläche unter der Kurve |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BAT | Brown Adipose Tissue |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| β ERKO | ER β -Knockout Maus |
| BMI | Body Mass Index |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CD... | Cluster of differentiation, Oberflächenmarker |
| cDNA | Complementary DNA |
| CE | Cholesterolester |
| CGI58 | Comparative gene identification 58 |
| cGMP | Zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CREB | cAMP response element-binding protein |
| D2M | Typ II Diabetes |
| DAG | Diacylglycerol |
| DGAT | Diacylglyceroltransferase |
| DMEM | Dulbeccos modified eagle medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraethylsäure |
| eGFP | Enhanced green fluorescent peptide |
| ER/ESR | Östrogenrezeptor |
| ERE | Estrogen Responsives Element |
| ERE-Luc | Estrogen Responsives Element-Luciferase Konstrukt |
| ERKO | ER α -Knockout Maus |
| FATP | Fatty Acid Transporting Protein |
| FBS | Fetal Bovine Serum, Fetales Kälberserum |
| FFS | Freie Fettsäuren |
| G0S2 | G0/G1 switch gene 2 |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| GLUT-4 | Glukosetransporter 4 |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HFD | HFD, High Fat Diet Western diet: 5-15% Kohlenhydrate, 40-60% Fett, 30-45% Protein |

| | |
|---------|---|
| HRT | Hormone Replacement Therapy |
| IL... | Interleukin ... |
| IRS | Insulin Receptor Substrat |
| JNK | c-Jun NH(2)-terminal kinase |
| kDA | Kilodalton |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| KO | Knck Out |
| LD | Lipid Droplet |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Mean | Mittelwert |
| M-MLV | Moloney-Murine Leukemia Virus |
| MAG | Monoacylglycerol |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |
| Mean | Mittelwert |
| MGL | Monoacylglyceridlipase |
| MM | Mastermix |
| mTOR | Mammalian Target of Rapamycin |
| mRNA | Messenger RNA |
| n | Anzahl |
| NaCl | Natiumchlorid |
| NCD | NCD, Normal Chow Diet; 60-70% Kohlenhydrate, 5-15% Fett, 20-30% Protein |
| NFAT | Nuclear factor of activated T-cells |
| nFκB | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NTC | No Template Control |
| OVX | Ovariectomierte Knockoutmäuse |
| pAVK | Periphere Arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | Phosphate buffered Saline |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PI3/AKT | Phosphoinositid-3-Kinase//Proteinkinase B |
| Plin1 | Perilipin 1 |
| PPARγ | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma |
| PNPLA2 | Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2A 2, ATGL-Gen |
| PROCAM | Prospective Cardiovascular Münster Studie |
| kDA | Kilodalton |
| qRT-PCR | Quantitative Real Time PCR |
| RE | Retinlester |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RQ | Respiratory Quotient |
| rpm | Revolutions per minute |
| rT-PCR | Real Time- Polymerasekettenreaktion |
| RXRα | Retinoid X Receptor alpha |
| SEM | Standard Error of the Mean |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TG | Triglycerid |
| TLR4 | Toll Like Receptor 4 |

| | |
|--------------|----------------------------------|
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| TSH | Thyroidea Stimulierendes Hormon |
| UCP1 | Uncoupling Protein 1, Themogenin |
| UPW | Ultra Pure Water |
| Veh | Vehikel |
| WAT | White Adipose Tissue |
| WB | Western Blot |
| WHO | World Health Organisation |
| WT | Wildtyp |

1 Einleitung

Die vorliegende Promotionsarbeit beschäftigt sich mit der Frage nach einer möglichen Expressionsregulation der Adipozytären Triglyceridlipase (ATGL) durch die nukleären Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$. Die ATGL katalysiert den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Oxidation von Triglyceriden und besitzt damit eine zentrale Funktion im Metabolismus.

Im Rahmen der Einleitung wird zunächst ein Überblick über die Eigenschaften unterschiedlicher Fettgewebstypen in murinen und humanen Organismen und deren physiologische sowie pathophysiologische Bedeutung gegeben. Anabole und katabole Stoffwechselprozesse im Fettgewebe werden beschrieben und die von der ATGL katalysierten Reaktionen unter variablen Bedingungen in den metabolischen Kontext eingeordnet.

Im Folgenden werden strukturelle und funktionelle Eigenschaften der bislang charakterisierten Östrogenrezeptoren aufgezeigt.

Abschließend wird an Hand phänomenologischer Beobachtungen zu geschlechtsspezifischen Aspekten des Fettsäuremetabolismus im Mausmodell und epidemiologischen Studien zur alters- und geschlechtsspezifischen Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen beim Menschen die Fragestellung nach einem putativen Zusammenhang zwischen Östrogenrezeptoren und der ATGL-Expression hergeleitet.

1.1 Allgemeines: Fettsäuren im Organismus

Fettsäuren und ihre Derivate erfüllen im Organismus mannigfaltige Funktionen. Sie dienen unter anderem als Vorstufen intrazellulärer Signalmoleküle, sind essentielle Strukturbausteine aller Biomembranen (u.a. intrazellulärer Vesikel, des endoplasmatischen Retikulums, mitochondrialer Membranen sowie der Kernmembran) und dienen als strukturelle Bestandteile von Glycosylphosphatidylinositolankern beispielsweise der dauerhaften Fixierung von Enzymen wie der Acetylcholinesterase oder komplement- regulierender Faktoren an der Membran. Neben diesen und zahlreichen anderen Aufgaben in der funktionellen und strukturellen Erhaltung von Zelle und Gesamtorganismus stehen sie als Energiesubstrate für den Zellstoffwechsel zur Verfügung und werden als langfristige Energiereserven in Form von Neutralfetten im Fettgewebe eingelagert.¹

1.2 Das Fettgewebe

1.2.1 Funktionelle Einteilung: Braunes und weißes Fettgewebe

Morphologisch und funktionell voneinander abzugrenzen sind das braune (Brown Adipose Tissue, BAT) und das weiße Fettgewebe (White Adipose Tissue, WAT): Sie liegen ihrer Funktion entsprechend (s. Abschnitte 1.2.1.1 und 1.2.1.2) alters- und größenabhängig in den verschiedenen Säugerspezies in unterschiedlichem Masseverhältnis vor.

1.2.1.1 Braunes Fettgewebe

BAT ist im Wesentlichen um Organe und Leitungsbahnen herum lokalisiert und dient mit einer erhöhten Expression des atmungskettenentkoppelnden Proteins Thermogenin (UCP1) der Wärmeproduktion.²⁻⁴ In Adipozyten des braunen Fettgewebes liegen zahlreiche Lipidspeichervakuolen vor. Dies gewährleistet eine große Angriffsfläche für Lipasen und bietet bei Bedarf die Möglichkeit zu schnellem Katabolismus der gespeicherten Lipide zwecks endogener Wärmeerzeugung. Entsprechend ist bei sehr kleinen Säugern mit hoher Wärmeabgabe durch ein ungünstiges Oberfläche/Volumen-Verhältnis und solchen, die in sehr kalten Erdregionen leben, der Quotient $m_{\text{BAT}}/m_{\text{WAT}}$ erhöht.⁵ Im murinen Organismus ist der relative Anteil braunen Fettgewebes gegenüber dem humanen Organismus entsprechend größer. Entgegen der früheren Annahme, im menschlichen Organismus seien braune Adipozyten nur in der Neugeborenenperiode von Relevanz, geht man mittlerweile davon aus, dass weiße Fettzellen unter bestimmten Bedingungen zum sog. „Browning“, i.e. der Transformation bestehenden WATs hin zu einem metabolischen Profil, das sich dem des BATs annähert, fähig sind.⁶ Die ATGL spielt bei der Thermogenese durch vermehrte Lipidoxidation im BAT eine entscheidende Rolle. Ahmadian et al. konnten zeigen, dass der fettgewebsspezifische Knock-out der ATGL zu einer Transformation von BAT zu WAT führte.⁷

Von großem Interesse ist die Aufdeckung von Möglichkeiten, den relativen Anteil des braunen Fettgewebes am Körpergesamtfett durch „Life-Style-Interventions“, vor allem aber auch pharmakologisch zu erhöhen.

1.2.1.2 Weißes Fettgewebe

Die größte Speicherkapazität für Triglyceride besitzt im Säugerorganismus das WAT.⁶ Während die Lipidspeicher der Organe ausschließlich der energetischen Eigenversorgung dienen, werden aus dem WAT als Folge länger andauernder Nahrungskarenz oder physischer Belastung mit Anstieg des Sympathikotonus und konsekutiver katecholaminerger Stimulation Lipide in Form

von Lipoproteinen und in geringem Maße Freien Fettsäuren (FFS) in die Zirkulation abgegeben. Diese tragen zur Deckung des Energiebedarfs der Organe und der peripheren Gewebe bei.⁸

1.2.2 Einteilung der Fettgewebstypen nach Lokalisation

1.2.2.1 Subkutanes Fettgewebe

Subkutanes Fettgewebe lässt sich in am Oberkörper lokalisiertes, abdominelles und gluteal/femoral lokalisiertes WAT einteilen.

Im Subkutanfett adipöser Individuen befinden sich größere Mengen an adipozytären Vorläuferzellen als im Viszeralfett. Zellen im subkutanen Fett adipöser Patienten besitzen eine größere Proliferationskapazität als Adipozyten im Viszeralfett. Dies könnte einer der Mechanismen sein, die zur Hypertrophie viszeraler Adipozyten mit konsekutiver Nekrose und Fettgewebsinflammation unter Substratüberschuss führen. (s. Abschnitt 1.2.2.3).⁹

Sowohl in murinen als auch humanen weiblichen Individuen ist das Verhältnis von subkutanem zu viszeralem Fettgewebe deutlich höher als in männlichen. Die lipolytische Aktivität der subkutanen Fettdepots ist dabei heterogen. Im Subkutanfett der oberen Extremität und im Abdominalbereich werden unter Östrogeneinfluss deutlich höhere Lipolyseraten beobachtet als im subkutanen Glutealfett. Diese Beobachtung steht in Einklang mit einer unter Östrogenentzug stattfindenden Umverteilung der typischen prämenopausalen gynoiden hin zu einer postmenopausalen androiden Fettverteilung.¹⁰

1.2.2.2 Viszerales Fettgewebe

Intraabdominelles (auch: viszerales) Fettgewebe umgibt die Organe des Verdauungstraktes. Es setzt sich zusammen aus dem Mesenterialfett, das die Verdauungsorgane umgibt, dem omentalen Fett, das das große Netz (lat. „Omentum majus“) bildet und die mit dem Colon assoziierten sog. „Appendices epiploicae“.¹¹

Die basale Lipolyserate der intraabdominellen Fettdepots ist niedriger als die der subkutanen. Unter adrenerger Stimulation sind die Verhältnisse umgekehrt: Viszerales Fett kann in Stress- und Belastungssituationen effektiver mobilisiert werden als subkutanes. Morphologisches Korrelat dieser Beobachtung ist vermutlich ein im Vergleich zum Subkutanfett höherer Besatz mit lipolytisch wirksamen β -Adrenorezeptoren bei gleichzeitig niedrigerem Besatz mit antilipolytisch wirkenden α 2-Adrenorezeptoren.¹² Weiterhin scheint die insulinabhängige Hemmung der Lipolyse im omentalen Fettgewebe weniger stark ausgeprägt zu sein als im subkutanen.

1.2.2.3 Pathophysiologische Bedeutung von Subkutan- und Viszeralfett

Die Masse des zentralen, abdominell-subkutanen, insbesondere aber des viszeralen Fettgewebes korreliert eng mit dem Risiko, ein metabolisches Syndrom (s. Abbildung 1) zu entwickeln. Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie beispielsweise die Koronare Herzkrankheit (KHK) und periphere Gefäßerkrankungen (pAVK) sowie die Entstehung eines Diabetes Mellitus Typ 2 (D2M) werden wesentlich durch die Akkumulation viszeralen Fettgewebes protrahiert.

Diagnosekriterien des metabolischen Syndroms nach der WHO:

- 1) Diabetes mellitus**
- 2) Gestörte Glucosetoleranz**
- 3) Insulinresistenz, bzw. gestörter Nüchternblutglucosewert**

Sowie **zwei der folgenden Parameter:**

- Arterieller Hypertonus $\geq 140/90$ mmHg
- Dyslipidämie: Triglyceride $> 1,695$ mmol/l und HDL $\leq 0,9$ mmol/l (bei Männern) bzw. $\leq 1,0$ mmol/l (bei Frauen)
- Viszerale Adipositas: Verhältnis von Taillen- zu Hüftumfang $> 0,9$ (Männer) bzw. $> 0,85$ (Frauen) und/oder BMI > 30 kg/m²

Abbildung 1: Diagnosekriterien des metabolischen Syndroms nach der World Health Organisation

Für die enge Verbindung zwischen dysfunktionaler Regulation der Lipogenese sowie Lipolyse im Viszeralfett und dem kardiovaskulären Risiko gibt es mehrere Erklärungsansätze. Wesentlicher Faktor scheint eine durch adipozytäre Hypertrophie ausgelöste Entzündungsreaktion zu sein. Auf die Entstehung der Entzündungsreaktion im Fettgewebe und deren detrimentalen Auswirkungen auf Insulinsensitivität und den zellulären Substratmetabolismus wird im Folgenden eingegangen.

1.2.2.4 Mechanismen der Initiation inflammatorischer Prozesse

Durch massive Hypertrophie der Adipozyten bei ihrer Überladung mit Triglyceriden werden die Diffusionswege länger und eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff ist nicht mehr in jedem Fall gewährleistet.¹³ So kommt es im adipösen Fettgewebe vereinzelt zum hypoxiebedingten Zelluntergang. Die von den nekrotischen Adipozyten freigesetzten Zytokine attrahieren Gewebsmakrophagen und fördern deren Polarisation zu proinflammatorisch wirksamen M1-Makrophagen. Im histologischen Bild ist dieser Prozess an der Bildung kronenförmiger Strukturen aus Makrophagen um untergegangene Fettzellen zu erkennen. M1-Makrophagen dienen an dieser Stelle der Abräumung von Zellüberresten, exprimieren zusätzlich aber auch Zytokine wie Interleukin 1 β (IL1 β), Interleukin 6 (IL6) und

Tumornekrosefaktor α (TNF α), durch die nach und nach weitere Zellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr angelockt werden.^{13,14}

Als weiteres mögliches primäres Ereignis der Fettgewebsinflammation wird die Aktivierung des membranständigen Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) der Adipozyten und der stromal-vaskulären Fraktion durch hohe Konzentrationen gesättigter freier Fettsäuren im Blutplasma und Interstitialraum vorgeschlagen. Physiologische Aktivatoren von TLR4 sind Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellmembran gramnegativer Bakterien. Die hier durch freie Fettsäuren anstatt von LPS ausgelöste Aktivierung der TLRs „suggeriert“ der Fettzelle also eine bakterielle Bedrohung. Im Rahmen der angeborenen Abwehr führt die durch Rezeptorbindung ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „Activation Protein 1“ (AP1) und „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF κ B). Nach der Translokation dieser Transkriptionsfaktoren in den Zellkern bewirken sie die Expression von Genen, die für Makrophagen- und Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (z.B. I-CAM, V-CAM, E-Selektin und P-Selektin) sowie Entzündungsmediatoren (z.B. TNF α , IFN γ , IL1 β , IL2, IL4, IL8, IL10 und IL12) codieren.¹⁵

Auch in den Endothelzellen der Fettgewebkapillaren wird die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen ausgelöst, sodass nach und nach Zellen der angeborenen und spezifischen Abwehr dem Endothel anheften und diapedetisch in das Fettgewebe einwandern.¹⁶

1.2.3 Akkumulation von Fettreserven

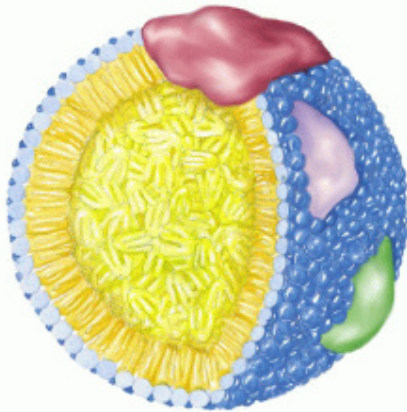
Angesichts der herausragenden Bedeutung, die die Fettgewebsakkumulation in der Pathogenese zahlreicher, u.a. durch die in Abschnitt 1.2.2.4 beschriebenen inflammatorischen Prozesse ausgelöster und vorrangetriebener, metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen besitzt, fokussieren große Bereiche der medizinischen Forschung auf mögliche Interventionsmöglichkeiten im Lipid-Metabolismus. Die Identifizierung potentieller Targets für pharmakologische Intervention setzt genaue Kenntnisse über anabole und katabole Prozesse im Fettgewebe voraus. Im Folgenden soll ein Überblick über die ständig ablaufende Lipidaufnahme und -speicherung sowie den Fettsäureabbau gegeben werden.

1.2.3.1 Die Aufnahme, Speicherung und Verstoffwechslung von Nahrungsfetten

Nahrungslipide werden im Gastrointestinaltrakt postprandial durch hydrolytische Enzyme, wie die Pankreaslipase, in Acylreste und 2-Monoacylglycerol (MAG) zerlegt. Diese können über spezifische Fettsäuretransporter (FattyAcidTransPorters, FATPs) von den Enterozyten

aufgenommen, dort durch die Diacylglycerol-Acyltransferase (DGAT) erneut mit α -Glycerophosphat zu Triglyceriden (TGs) verestert und damit in der Zelle gebunden werden.¹⁷ Im Enterozyten wird durch die „Lipidation“ des Apolipoproteins B48 die Formation sogenannter Chylomikronen initiiert. Diese werden über den Golgiapparat auf der basolateralen Seite der Mukosazellen durch Exozytose abgegeben und gelangen über das lymphatische System und dessen Anschluss an das venöse System in die Blutbahn. Durch den Austausch bestimmter Apolipoproteine (z.B. ApoCII und ApoE) mit in der Leber synthetisierten High Density Lipoproteinen (HDL), werden die Chylomikronen zur Bindung von Lipoproteinlipase (LPL) auf den Endothelzellen der Zielgewebe befähigt. Nach der Hydrolyse der in den Chylomikronen verpackten Triglyceride durch die LPL werden sie, ebenfalls durch FATPs, in die Zelle transportiert und dort metabolisiert oder erneut durch die DGAT mit α -Glycerophosphat zu TGs verestert¹⁷. Insbesondere in Zellen des weißen und braunen Fettgewebes, zu geringerem Maße aber auch in nicht-adipozytär differenzierten Zellen anderer Organe, werden die veresterten Fettsäuren in zytoplasmatischen „Lipid droplets“ (LDs) (s. Abbildung 2) gelagert.

1.2.3.2 Lipid Droplets



Im Zentrum der LDs befinden sich TGs zusammen mit Sterolestern. Vom Zytoplasma werden sie durch einen Phospholipidmonolayer abgegrenzt, der zahlreiche die Lipidspeicherung und Lipolyse regulierende Enzyme enthält (s. Abschnitt 1.2.4). Durch Veresterung zu Neutralfetten wird so unter physiologischen Bedingungen ein exzessiver, zellschädigender („lipotoxischer“) Konzentrationsanstieg der FFS im Plasma und intrazellulär verhindert.^{16,18}

Abbildung 2: Lipid Droplet (Quelle: http://www.mpibpc.mpg.de/groups/jaeckle/pages/Project_Beller/project_Beller.html)

1.2.4 Die Enzyme des Fettgewebes

Im Rahmen der Lipolyse in Adipozyten sowohl des weißen als auch des braunen Fettgewebes sind nach aktuellem Kenntnisstand drei Lipasen quantitativ relevant, die sich durch ihre Substratspezifität, die Lokalisation innerhalb der Zelle und ihre Aktivitäts- und Expressionsregulation unterscheiden.¹⁹

Diese in Abbildung 3 gezeigten Enzyme des Triglyceridabbaus werden im Folgenden charakterisiert. Der Schwerpunkt liegt auf der ATGL als erster, geschwindigkeitsbestimmender Lipase des dreistufigen Prozesses.

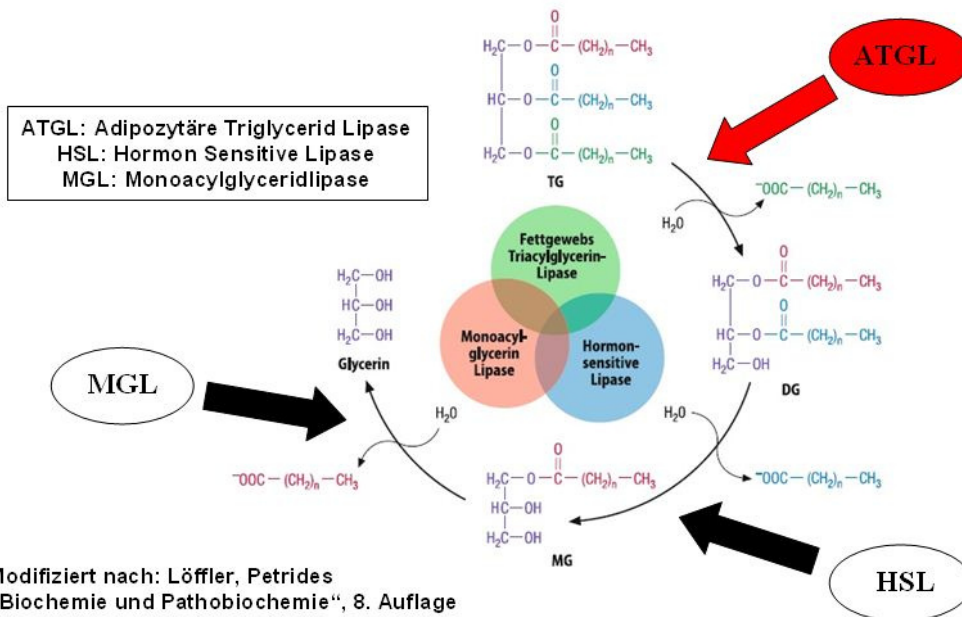


Abbildung 3: Der dreistufige Prozess der Lipolyse

1.2.4.1 Die Adipozytäre Triglyceridlipase

Erster Schritt der Degradation von Triglyceriden ist deren Spaltung in einen Acylrest und ein Diacylglycerol (DAG) durch die ATGL. Sie besitzt eine hohe Substratspezifität für TGs. Dementsprechend werden die in genannter Reaktion als Spaltprodukte entstehenden DAGs von ihr nicht, bzw. nur in sehr geringem Umfang, metabolisiert.

Die ATGL wird in zahlreichen Geweben in messbarem Ausmaß, am stärksten jedoch im braunen und weißen Fettgewebe exprimiert.^{20,21}

Sie ist fest mit dem Phospholipidmonolayer der LDs assoziiert und besitzt eine basale lipolytische Aktivität, die sich im Zustand energetischer Homöostase mit der Triglyceridsynthese und -einlagerung in die LDs die Waage hält.

1.2.4.1.1 Gen

Das für die murine ATGL codierende Gen PNPLA2 befindet sich auf dem Chromosomen 7 (7F5) und umfasst 9 Exons. Sein humanes Pendant liegt auf dem kurzen Arm des Chromosomen 11 (11p15.5) und umfasst 10 Exons.

Die Promotorregion des Gens ist bislang unzureichend charakterisiert; beschrieben sind für murine Präadipozyten, bzw. Adipozyten die regulatorische Bindung von einem Komplex aus „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma“ (PPAR γ) und „Retinoid X Receptor α “ (RXR α) zusammen mit dem insulinabhängigen Transkriptionsfaktors FoxO1.²²⁻²⁴

1.2.4.1.2 Protein: Struktureller Aufbau und funktionelle Domänen

Die murine ATGL umfasst 486 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von c.a. 54kDa. Ihr humanes Analogon besteht bei einem Molekulargewicht von c.a. 55kDA aus 504 Aminosäuren.¹⁹ Speziesübergreifende, hochkonservierte Teildomäne der ATGL ist ein Lipidhydrolase-Element, das zunächst in der Kartoffel identifiziert wurde und deshalb den Namen „Patatine“ (lat. Patatus - Kartoffel) erhielt.²⁵ Proteine mit analogen Strukturmotiven wurden auf Grund der (tatsächlich keinesfalls bei allen Vertretern der Enzymfamilie) beobachteten Phospholipase-Aktivität als „PatatiNe like PhosphoLipases A“ bezeichnet und mit aktuell 9 Vertretern von 1 bis 9 durchnummeriert. (PNPLA1-9). Der Name „ATGL“ steht synonym für PNPLA2.

Die Patatin Domäne umfasst 180 Aminosäuren und wird von einer 254 Aminosäuren umfassenden N-terminalen α - β - α -Faltblattstruktur umgeben. Sie enthält die katalytische Region des Enzyms und enthält gleichzeitig die Bindungsregionen für den Coaktivator „Comparative gene identification 58“ (CGI-58) und den Inhibitor GOS2 (s. Abschnitt 1.2.4.1.3.1).^{22,26} Die mit 74 Aminosäuren verbleibende C-terminale Domäne besitzt eine hydrophobe Region, deren Depletion in vitro die Unfähigkeit zur Bindung von Lipid Droplets zur Folge hat.²⁷

Die murine und humane ATGL stimmen zu 84% in ihrer Aminosäuresequenz überein. Dabei finden sich die beschriebene hochkonservierte „Patatin Domäne“ und weniger stark konservierte Bereiche C-terminal und im Bereich um die Aminosäure 260. Über die funktionelle Bedeutung der gehäuften Sequenzunterschiede in diesen Regionen ist bislang nichts bekannt.²⁰

1.2.4.1.3 Metabolische Regulation der ATGL

Die Aktivität der ATGL ist durch zahlreiche Mediatoren reguliert, die im Folgenden vorgestellt werden.

1.2.4.1.3.1 Katecholamine

Die Aktivität der ATGL wird wesentlich durch das sympathische Nervensystem beeinflusst. So führt erhöhte Sympathikusaktivität, die physiologisch zwecks Steigerung körperlicher Leistungsfähigkeit unter Belastung, aber auch im Rahmen bestimmter Krankheitsbilder wie der

Hyperthyreose, auftritt, zu katecholaminerger Stimulation von β -Adrenorezeptoren. Aktiviert werden auf den Adipozyten sowohl β 1- und β 2-Rezeptoren, die ubiquitär im Säugerorganismus vertreten sind, als auch die vor allem im weißen und braunen Fettgewebe exprimierten β 3-Rezeptoren.²⁸ Intrazellulär wird nach beta-adrenerger Stimulation Gs-Protein-gekoppelt die Adenylatzyklase stimuliert. Das von dieser im Folgenden synthetisierte cAMP aktiviert die Proteinkinase A. Diese wiederum phosphoryliert Perilipin A (auch: Plin1), das unter Ruhebedingungen das Protein CGI-58 bindet.²⁹ Beide Proteine liegen, wie die ATGL, an den Lipid-Droplet-Phospholipidmonolayer gebunden vor.

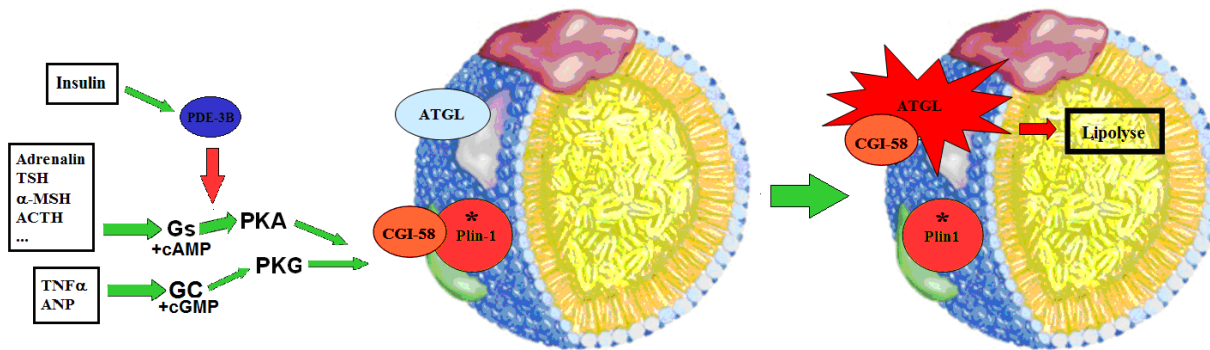


Abbildung 4: Molekulare Mechanismen der hormonellen ATGL-Aktivierung (modifiziert nach

http://www.mpibpc.mpg.de/groups/jaeckle/pages/Project_Beller/project_Beller.html)

Die Phosphorylierung von Perilipin (Plin-1, rot dargestellt, * als Zeichen für Aktivierung) durch diverse Stimuli (schwarz umrandete Kästen; TSH: Thyroidea Stimulierendes Hormon; α -MSH: α -Melanozyten Stimulierendes Hormon; ACTH: Adrenocorticotropes Hormon; TNF α : Tumornekrosefaktor α ; ANP: Atriales Natriuretisches Peptid) mit konsekutiver Aktivierung von Gs-Proteinen/ der Guanylylcyclase (GC), der Produktion von cAMP (cyklisches Adenosinmonophosphat) und cGMP (cyklisches Guanosinmonophosphat) und Aktivierung von Proteinkinase G und A (PKG/PKA) führt zur Freigabe von CGI-58, das seinerseits zu einer Steigerung der hydrolytischen Aktivität der ATGL führt

Durch die Phosphorylierung des Perilipin A sinkt dessen Affinität zu CGI-58.³⁰ Dieses wird aus seiner Bindung freigegeben und geht daraufhin Wechselwirkungen mit der ATGL ein, deren genaue molekulare Mechanismen zu diesem Zeitpunkt ungeklärt sind.²⁰ Durch die Assoziation mit CGI-58 steigt die hydrolytische Aktivität der ATGL an. Das Ausmaß dieses koaktivatorischen Effekts von CGI-58 ist säugetierspeziesabhängig. So steigt unter CGI-58-Bindung die Aktivität der murinen ATGL um den Faktor 20, die der humanen hingegen um etwa den Faktor 4.^{31,32}

1.2.4.1.3.2 Weitere Mediatoren

Weitere Mediatoren, für die eine stimulatorische Wirkung auf die Lipolyse gezeigt werden konnte, sind Thyroidea Stimulierendes Hormon (TSH) (PKA-vermittelter Mechanismus), die Melanocortine α -Melanozyten Stimulierendes Hormon (α -MSH) und Adrenocortikotropes Hormon (ACTH) (Gs-Protein-vermittelt)^{33,34}, Atriales Natriuretisches Peptid (ANP)³⁵ (cGMP-

vermittelt) sowie $\text{TNF}\alpha$ ³⁶ (cGMP-abhängig). Sowohl durch ANP als auch $\text{TNF}\alpha$ wird nach Rezeptorbindung die Guanylylzyklase aktiviert, die cGMP-Produktion steigt und es kommt durch die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) analog zur Gs-cAMP-PKA-getriggerten Lipolyse zu einer aktivierenden Phosphorylierung von Perilipin1 (s. Abbildung 4).³⁵⁻³⁷

Insulin bewirkt durch Bindung an seinen Rezeptor die Aktivierung der Phosphodiesterase 3B (PDE3B). Diese katalysiert den vermehrten Abbau von cAMP und mindert so direkt die prolipolytische zelluläre PKA-Aktivität.³⁷

Neben dieser endo-, para- und autokrinen Regulation der ATGL durch diverse Mediatoren, wird der zellinterne Mechanismus einer aktivierenden Phosphorylierung der ATGL durch die Adenosinmoophosphatkinase (AMPK) beschrieben.⁷ Die AMPK-Aktivität steigt unter erhöhtem zellulärem Energieverbrauch, der mit einem Anstieg des ADP/ATP-Verhältnisses einhergeht.³⁸ Es resultiert also vermehrte lipolytische Aktivität bei gesteigertem zellulärem Energiebedarf.

1.2.4.1.4 Transkriptionelle Regulation

Neben der metabolischen, schnellen Regulation der ATGL findet auch eine Modulation ihrer Expression auf transkriptioneller Ebene statt.

Ein Expressionsanstieg des Enzyms wurde bislang unter Stimulation mit Glukokortikoiden und „Peroxisome Proliferative Receptor γ “ (PPAR γ) Agonisten, wie freien Fettsäuren (FFS), Prostaglandinen oder synthetischen Agonisten, beobachtet.²⁰ Villena et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass die Expression der ATGL (möglicherweise sirtuinvermittelt³⁹) unter Nahrungskarenz ansteigt.⁴⁰ In Einklang mit dieser Beobachtung steht eine Downregulation der Enzymexpression über durch Nahrungsaufnahme getriggerte Aktivierung des mTOR-Pathways. Diese geschieht beispielsweise durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor.²⁰

Einflüsse weiterer Mediatoren, die möglicherweise expressionsregulatorisch aktiv sind, wie des Fettgewebshormons Leptin, sind Gegenstand aktueller Forschung und werden kontrovers diskutiert.⁴¹

1.2.4.1.5 Mausmodelle

Homozygote ATGL-KO-Mäuse zeigen gegenüber dem Wildtyp (WT) sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen des braunen und weißen Fettgewebes. Ihre Körperfettgesamtmasse ist bei äquivalenter ad-libitum-Nahrungs- und damit Energieaufnahme doppelt so hoch, wie die des Wildtyps. Morphologische Analysen zeigen eine Vergrößerung der LDs des weißen Fettgewebes in KO-Tieren. Ebenfalls auffällig ist das Fehlen der gewebstypischen multilokulären LD-Strukturen im braunen Fettgewebe. Dieser histologische

Befund bietet einen Erklärungsansatz für die ausgeprägte Kältesensitivität der homozygoten ATGL-KO-Mäuse.⁴²

Nicht nur im weißen und braunen Fettgewebe, sondern auch in nicht-adipozytär differenzierten Geweben zahlreicher Organe zeigt sich für ATGL-KO-Mäuse eine ausgeprägte Lipideinlagerung.⁴² Als Folge der stark eingeschränkten Fähigkeit zum initialen Schritt der Lipolyse steigt die Menge an Triglyceriden intrazellulär mit steigendem Alter der Mäuse sukzessive an und führt zu Funktionseinbußen des jeweiligen Organs. In homozygot ATGL-defizienten Mäusen sind insbesondere das Herz, die Gonaden und die Nieren von einem gegenüber dem Wildtyp mehr als 10-fachen Anstieg der Konzentration eingelagerter Triglyceride betroffen.⁴²

Limitierend für die Lebenserwartung sowohl hetero- als auch homozygoter ATGL-KO-Mäuse ist zumeist eine kardiale Dysfunktion. Sie versterben bereits ab einem Alter von 12 Wochen an mechanischem Pumpversagen durch massive myokardiale Lipideinlagerungen, ohne nachweisbare assoziierte Entzündungsreaktion.⁴² Während der Triglyceridgehalt der meisten Gewebe heterozygot defizienter Mäuse dem des Wildtyps entspricht, ist er im Herzen auf das Doppelte gesteigert. Diese Beobachtungen deuten drauf hin, dass die ATGL möglicherweise insbesondere bei der Metabolisierung von Triglyceriden durch Kardiomyozyten von Relevanz ist.

Um Erkenntnisse über den relativen Anteil von Fetten und Kohlenhydraten an der Substratmetabolisation zu gewinnen, führten Haemmerle et al. Analysen des respiratorischen Quotienten (RQ) durch. Unmittelbar postprandial und innerhalb der ersten zwei Stunden nach Nahrungsaufnahme unterschieden sich die respiratorischen Quotienten von Wildtyp- und ATGL-KO-Mäusen nicht.⁴² Mit länger andauernder Nahrungskarenz fiel der RQ der Wildtyp-Mäuse im Rahmen des vermehrten Lipidmetabolismus unter Nahrungskarenz ab, während der RQ der ATGL-KO Mäuse sich auf einem konstanten Niveau hielt.

Die genannten Beobachtungen zeigen, dass die ATGL im murinen Organismus die Lipolyserate bestimmt und dass ihr funktioneller Ausfall nicht durch andere Fettgewebslipasen kompensiert werden kann.

1.2.4.2 Die hormonsensitive Lipase (HSL)

Die Hydrolyse der in der Initialreaktion der Lipolyse entstandenen Diacylglyceriden (DAGs) wird von der „Hormonsensitiven Lipase“ (HSL) katalysiert. Diese besitzt mit der Fähigkeit zur Hydrolyse von TAGs, DAGs, Monoacylglyceriden (MAGs), Cholesterol- und Retinolestern (CE und RE) im Verhältnis von 1:10:1:4:2 (in vitro) sowie kurzkettigen Fettsäuren ein breiteres

Substratspektrum als die ATGL.²⁰ Ob sie unter physiologischen Bedingungen in vivo an der Spaltung von TAGs und MAGs in quantitativ relevantem Maße beteiligt ist, ist zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Bei der Spaltungsreaktion von DAGs in jeweils ein MAG und einen Acylrest hingegen ist sie das umsatzbestimmende Enzym. Die HSL findet sich sowohl LD-gebunden als auch frei im Zytoplasma.²⁰

1.2.4.2.1 Metabolische Regulation

Das Spektrum der metabolischen Regulatoren der HSL-Aktivität ähnelt dem der ATGL. Durch die Aktivierung Gs-Protein gekoppelter Rezeptoren (beispielsweise durch Katecholamine und TSH, s. Abschnitt 0) kommt es durch Aktivierung der Adenylatzyklase, gesteigerter Produktion von zyklischem AMP (cAMP) und Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung zytoplasmatischer HSL.⁴³ Als Folge dieser Phosphorylierung wird die HSL an den LD-Phospholipidmonolayer rekrutiert. Dort wird sie durch das ebenfalls PKA-abhängig phosphorylierte Perilipin 1 gebunden. Perilipin 1 ermöglicht der HSL durch einen bisher molekular ungeklärten Mechanismus den Zugang zu Lipidsubstraten im Kern der LDs und steigert somit deren hydrolytische Aktivität. Im Gegensatz zur ATGL wird die HSL nicht über die Phosphorylierung von zwischengeschalteten Mediatoren reguliert, sondern direkt über die Phosphorylierung einer oder mehrerer regulatorischen Domänen, von denen bislang fünf bekannt sind.¹⁹

HSL-KO-Mäuse akkumulieren weder im Fettgewebe, noch in anderen Geweben TGs, aber größere Mengen DAGs.⁴⁴

1.2.4.2.2 Transkriptionelle Regulation

Analog zur ATGL wird eine gesteigerte HSL-Expression unter Fastenbedingungen und unter der Aktivierung von PPAR γ beobachtet.⁴⁵

1.2.4.3 Die Monoacylglyceridlipase

Den letzten Schritt des Triglyceridabbaus katalysiert die Monoacylglyceridlipase (MGL). Sie ist substratspezifisch und katalysiert die Spaltung von MAGs zu alpha-Glycerophosphat und dem letzten Acylrest des ursprünglichen Triglycerides.⁴⁶ Über den (möglicherweise gewebsspezifischen) quantitativen Anteil, den die MAG an der Spaltung der DAGs hat, ist wenig bekannt. Von Taschler et al. konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der MAGs im Fettgewebe bei genetischer Depletion der MGL im Mausmodell um das Vier- bis Fünffache ansteigen. Nach Applikation eines spezifischen Inhibitors der MGL konnte eine Reduktion der DAG-Hydrolyse um 69%, bei zusätzlicher Inhibition der HSL um nahezu 100% bestimmt

werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass an der DAG-Hydrolyse in vivo im Wesentlichen die MGL und mit geringerem Anteil auch die HSL beteiligt sind.⁴⁷

Zum jetzigen Zeitpunkt ist weder eine Regulation der MGL auf transkriptioneller, noch auf hormoneller Ebene bekannt. Sie wird vor allem im Fettgewebe, der Leber und im Muskel konstitutiv exprimiert, scheint aber auch im Gehirn im Rahmen des Endocannabinoidstoffwechsels von Bedeutung zu sein.²⁰

1.2.4.4 Zusammenfassung: Regulation des Triglyceridabbaus

Das Ausmaß an Triglyceriddegradation durch die genannten Enzyme ist von zahlreichen lokalen und systemischen Mediatoren abhängig. Die Aktivitäten der ATGL und HSL werden, im Gegensatz zur MGL, für die kein metabolischer Regulationsmechanismus bekannt ist, dem energetischen Status der Zelle angepasst. Dies geschieht durch die Bindung diverser Hormone und Mediatoren, wie beispielsweise von Katecholaminen, Glucocorticoiden, ANP, Leptin, Resistin, TNF α oder Adiponektin an ihre spezifischen Rezeptoren und die anschließend ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden.^{18,19,48} Dabei spielen sowohl die Aktivierung der PKA als auch der PKC mit indirekter ATGL-Aktivierung und direkter, aktivierende Phosphorylierung der HSL eine Rolle.¹⁹

Neben einer Modulation der Enzymaktivitäten werden zudem für die ATGL und die HSL eine transkriptionelle Regulation beispielsweise durch PPAR γ -Aktivatoren, Glucocortikoide und Insulin beschrieben.^{19,39,41}

1.2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede in Fettgewebsverteilung und Fettsäuremetabolismus

Der relative Körperfettanteil von prämenopausalen Frauen ist im Mittel höher als derjenige von gleichaltrigen Männern. Auch bezüglich der Fettverteilung gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Während Frauen vor allem subkutanes Fettgewebe im Bereich der unteren Extremität akkumulieren („gynoid“ Verteilung), werden bei Männern bevorzugt viszerale und subkutan-abdominelle Speicher gefüllt („androide“ Verteilung).⁴⁹

Da, wie bereits in Abschnitt 1.2.2.3 diskutiert, die viszerale, nicht aber die subkutane Fettgewebsmasse maßgeblich an der Pathogenese metabolischer Erkrankungen beteiligt ist, ist unter prämenopausalen Frauen eine deutlich geringere Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen und des metabolischen Syndroms zu beobachten als unter Männern.⁵⁰

Interessanterweise wird in der Menopause, die im Zuge der hormonellen Umstellung des weiblichen Organismus mit fallenden Östrogenspiegeln einhergeht, eine deutliche Zunahme des

relativen Körperfettanteils und speziell des Viszeralfetts beobachtet, die unabhängig von einer Gewichtszunahme ist.⁵¹ Damit einher geht eine deutliche Zunahme der Inzidenz des metabolischen Syndroms (s. Abbildung 1) und damit auch von assoziierten Erkrankungen, wie T2D, kardiovaskulären Ereignissen und Arteriosklerose. In der „Prospective Cardiovascular Münster Studie“ (PROCAM) wurden bei perimenopausalen Frauen signifikante Anstiege der Plasmatriglyceride, des LDL-Cholesterins, ein Abfall des HDL-Cholesterins und damit die Verschiebung hin zu einem deutlich pro-atherogenen Lipidprofil beobachtet.⁵²

Unter Hormonersatztherapie (HRT) ist es möglich, diese adversen Effekte auf den Fettstoffwechsel zu verhindern, bzw. teilweise zu revidieren und die Inzidenz des metabolischen Syndroms und der genannten Erkrankungen zu senken.⁵³ Der Nutzen der HRT wurde zwar in den letzten Jahren vermehrt in Frage gestellt, weil große randomisiert-kontrollierte Studien keine positiven Effekte der Östrogenapplikation zeigen konnten - diese Beobachtung ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass das gewählte Patientenkollektiv ein mittleres Alter über 60 Jahren besaß. In dieser Gruppe konnte vermutlich deshalb kein protektiver Effekt der HRT nachgewiesen werden, weil die negativen metabolisch/kardiovaskulären Effekte des Östrogenentzugs sich bereits irreversibel manifestiert hatten. Für Frauen, die vor dem 60. Lebensjahr mit der HRT begannen, zeigten sich hingegen signifikant positive Effekte auf Lipidprofil, Fettgewebsverteilung und Blutdruck.⁵³

Während für das Myometrium eine perimenopausale Verschiebung des Mengenverhältnisses von α - zu β - Rezeptoren beobachtet wurde, scheint sich dieses im Subkutan-, bzw. Viszeralfett nicht maßgeblich zu verändern.^{54,55}

1.3 Östrogenrezeptoren

Östrogenrezeptoren sind im Säugerorganismus ubiquitär vorhanden. Als klassische Steroidhormonrezeptoren fungieren sie als Transkriptionsfaktoren und sind in ihren Zielorganen und -geweben an der Zellproliferation, -differenzierung und der Expression zahlreicher Gene im Rahmen der Zellhomöostase beteiligt.^{56,57}

Von entscheidender Bedeutung sind die Östrogenrezeptoren beispielsweise im Calcium-/Phosphat-Haushalt und damit dem Knochenstoffwechsel. Sie sind in allen Organen des Reproduktionstraktes beider Geschlechter, insbesondere aber des weiblichen Organismus repräsentiert. Dort sind sie maßgeblich an der Regulation des weiblichen Zyklus und damit der Fertilität beteiligt. Über zentrale Mechanismen sind sie in die Regulation des Energieumsatzes und der Nahrungsaufnahme involviert.^{10,49,58} Im evolutiven Kontext legt ihre zentrale Rolle in der Steuerung der reproduktiven Funktionen nahe, dass sie, beispielsweise im Rahmen der

Thermoregulation, auch auf die Regulation des Energieverbrauchs sowie die Homöostase körpereigener Energiespeicher Einfluss nehmen. So beeinflussen die Östrogenrezeptoren beispielsweise die Insulinsynthese durch das endokrine Pankreas und die Insulinsensitivität von Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe. Neben ihren Funktionen im Glucosestoffwechsel nehmen sie Einfluss auf die Lipogenese und die Lipolyse in Leber, Fettgewebe und auch in anderen Geweben, wie beispielsweise dem Myokard.^{48,59,60}

| | ER α | ER β |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| ZNS | Energieumsatz \uparrow | Energieumsatz \uparrow |
| | Nahrungsaufnahme \downarrow | Nahrungsaufnahme \downarrow |
| Pankreas | Insulinfreisetzung \uparrow | Insulinfreisetzung \uparrow |
| | Insulinsynthese \uparrow | |
| Leber | Glucoseproduktion \downarrow | Triglyceridakkumulation \downarrow |
| | Insulinsensitivität \uparrow | |
| Skelettmuskel | Insulinsensitivität \uparrow | Insulinsensitivität \uparrow |
| | Lipidoxidation \downarrow | |
| Fettgewebe | Körpergesamtfett \downarrow | Körpergesamtfett \downarrow |
| | Adipogenese \downarrow | Adipogenese \downarrow |
| | Lipogenese \downarrow | Lipogenese \downarrow |
| | Aufnahme FFS \downarrow | |
| | SC/Vis-Quotient \uparrow | |

Abbildung 5: Östrogenwirkungen im metabolischen Kontext

ZNS: Zentrales Nervensystem, SC/Vis-Quotient: Masse_{Subkutanfett}/ Masse_{Viszeralfett})

Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der aktuell bekannten metabolischen Östrogenwirkungen. Sie differenziert dabei zwischen den Wirkungen von ER α und ER β , den beiden großen Unterfamilien der nukleären Östrogenrezeptoren (s. Abschnitt 0). Nach aktuellem Kenntnisstand können diese, je nach ihrem Mengenverhältnis, Zelltyp und -differenzierung in den unterschiedliche Geweben sowohl synergistische als auch antagonistische Wirkung entfalten.

Neben der Gruppe der nukleären Östrogenrezeptoren, die ihre Wirkung über die Induktion oder Inhibition von Genen entfalten, existiert die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptoren (GPERs). Sie entfalten ihre Wirkungen durch die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, wie beispielsweise des „Mitogen activated protein kinase“-Pathways (MAPK), bzw. des PI3K/AKT-Pathways und vermitteln so schnelle metabolische Effekte.^{58,61}

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Experimente konzentrieren sich auf die Wirkung der nukleären Rezeptortypen, die im Folgenden charakterisiert werden. Strukturdomänen und Funktionen der nukleären Östrogenrezeptoren

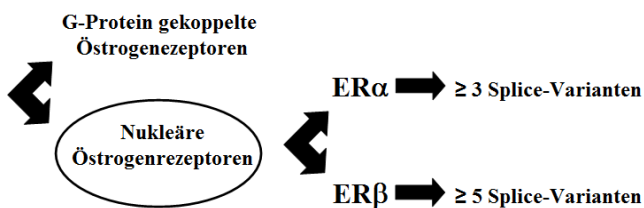


Abbildung 6: Einteilung der Östrogenrezeptoren

Die Familien der humanen wie murinen nukleären Östrogenrezeptoren werden derzeit in α - und β -Rezeptoren eingeteilt, die mindestens drei, bzw. fünf Subgruppen mit strukturellen Unterschieden besitzen. Die Rezeptorsubtypen entstehen posttranskriptionell durch alternatives Splicing.^{62,6}

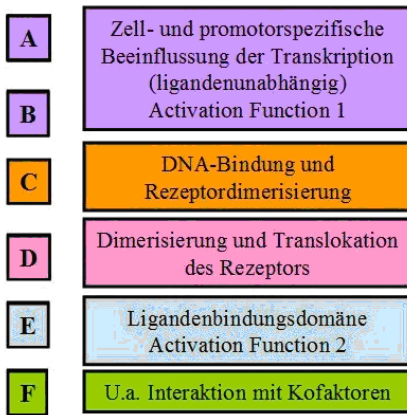


Abbildung 7: Strukturdomänen der nukleären Östrogenrezeptoren und ihre Funktion

Sowohl α - als auch β -Rezeptoren besitzen 6 Domänen, die mit den Buchstaben A bis F bezeichnet werden. Die A/B-Domäne besitzt ligandenunabhängige Aktivität, die zell- und promotorspezifisch die Transkription ihrer jeweiligen Zielgene beeinflusst. Von der C-Domäne werden die DNA-Bindung und die Rezeptordimerisierung vermittelt und die D-Domäne ist neben ihrer Beteiligung an der Dimerisierung für die Translokation des Rezeptors in den Zellkern verantwortlich. Die E-Domäne enthält eine Ligandenbindungsstelle. Diese wird von 17 β -Östradiol an α - und β -Rezeptoren mit gleicher Affinität gebunden, weist jedoch mit einer Sequenzabweichung von 41% Strukturunterschiede auf, die eine selektive Beeinflussung der Subtypen ermöglichen, beispielsweise durch die selektiven α -, bzw. β -Agonisten Propyl-Pyrazol-Thiol (PPT) und Diarylpropionitril (DPN).^{57,58,62}

1.3.1 Nukleäre Wirkung

Beide nukleären Östrogenrezeptorsubtypen besitzen durch die Activation-Function-1 (AF1) der A/B-Domäne ligandenunabhängige, intrinsische Aktivität. Volle Aktivität des Rezeptors wird jedoch nur durch Ligandenbindung an der Activation-Function-2 (AF2) der E-Domäne erreicht, die zu einer Rezeptordimerisierung mit konsekutiver Translokation des Rezeptorkomplexes in den Kern führt. Dort beeinflussen die ER-Dimere die Transkription sowohl direkt durch Bindung spezifischer DNA-Struktur motive (Östrogen-responsive Elemente, EREs) als auch indirekt durch Wechselwirkung („Cross talk“) mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, nF κ B und

PPAR γ und vermitteln so die langfristigen Östrogenwirkungen.^{58,61,64} Dabei hängt in den unterschiedlichen Geweben das Genexpressionsmuster einerseits entscheidend vom Rezeptorbesatz und andererseits von den Konzentrationen der jeweiligen Kofaktoren ab.⁵⁶

1.3.2 Primär extranukleäre Wirkung

G-Protein-gekoppelt aktivieren Östrogenrezeptoren neben ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren zytoplasmatische Signalkaskaden, wie den Ras/Raf-, den MAP-Kinase- und den Mek/Erk-Pathway.⁶⁵ Sie beeinflussen so akute zelluläre Prozesse, wie die Freisetzung von NO, bewirken aber auch sekundär eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB oder NFAT und nehmen damit Einfluss auf die Genexpression.^{62,66-68}

1.4 Knock-out-Modelle

Um die Funktionen von Östrogenrezeptoren zu untersuchen, sind unterschiedliche Mausmodelle etabliert. Im Folgenden werden die metabolischen Charakteristika von selektiven ER α - und ER β -Knockout-Mäusen (ERKO, bzw. β ERKO), Aromatase-Knockout-Mäusen sowie ovariektomierten (OVX) Mäuse beschrieben.

1.4.1 ER α -Knockout

Der dichteste Besatz mit ER α -Rezeptoren findet sich in Knochen, Uterus, Leber und Fettgewebe.^{57,60} ER α -Knockout (ERKO) Mäuse zeigen Wildtyp (WT) Mäusen gegenüber eine höhere Körperfettmasse bei gesteigerter Adipogenese, Lipogenese und verminderter Lipolyse. Ihre Insulinsensitivität sowohl im Skelettmuskel als auch der Leber sind beeinträchtigt und die muskuläre Glucoseaufnahme vermindert. Die pankreatische Insulinsynthese und -freisetzung sind vermindert. Die ERKO Mäuse zeigen dem WT gegenüber bei äquivalenter Nahrungsaufnahme einen verminderten Energieumsatz (s. Abbildung 8 und Abbildung 9).^{58,69}

Kritikpunkt an konventionellen Östrogenrezeptor-Knockout-Modellen, der ihre Aussagekraft einschränkt, ist, dass ER α in der Regel komplett und nicht gewebspezifisch ausgeknockt wird. Für die metabolische Forschung bedeutet dies vor allem eine Überlagerung lokaler Effekte im Fettgewebe, der Leber, dem Pankreas und weiteren Bauchorganen mit auch zentralen Alterationen von Energieverbrauch und Nahrungsaufnahme. Neue Studien beziehen Mäuse ein, die einen selektiven ER α -Knockout für das Fettgewebe besitzen und sind somit eher für differenzierte Experimente zur Bedeutung des Rezeptors im Fettgewebe geeignet.^{70,71}

Zusätzlicher Kritikpunkt sowohl am unselektiven, als auch dem selektiven ER α -Knockout-Modell ist die Tatsache, dass Östrogenrezeptoren nicht nur Homo-, sondern auch Heterodimere

bilden und zahlreiche Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren eingehen. So können die beobachteten Effekte nicht zwangsläufig nur auf das Fehlen von ER α , sondern auch auf eine Beeinträchtigung genregulatorischer Vorgänge zurückgeführt werden, die die Anwesenheit von ER α und ER β gleichermaßen erfordern. Weiterer konfundierender Faktor ist eine mögliche kompensatorische Überexpression von ER β (sowie evtl. anderer Östrogenrezeptorunterformen) und deren konzentrationsabhängige Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren.

1.4.2 ER β -Knockout

ER β ist vorherrschender Östrogenrezeptor im Ovar und Verdauungstrakt.⁵⁷

ER β -Knockout-Mäuse zeigen unter einer High Fat Diet (HFD)*, nicht aber unter Normal Chow Diet (NCD)[†] dem WT gegenüber eine erhöhte Körperfettmasse, gesteigerte Adipogenese und Lipogenese.⁶⁴ Die Skelettmuskulatur zeigt unabhängig von der Fütterung eine gesteigerte Insulinsensitivität und die Leber eine dem WT gegenüber gesteigerte Triglyceridakkumulation.⁵⁸

Weibliche β ERKO-Mäuse zeigen weiblichen WT-Mäusen gegenüber unter HFD einen signifikant erhöhten respiratorischen Quotienten, der auf eine beeinträchtigte β -Oxidation hindeutet (s. Abbildung 8 und Abbildung 9).⁶⁴

Die Kritik am ER β -Knockout-Modell ergibt sich analog zum ER α -Knockout-Modell (s. Abschnitt 1.4.1). Daten zu selektivem ER β -Knockout im Fettgewebe sind bislang nicht publiziert.

1.4.3 Aromatase-Knock-out Mäuse

Aromatase-Knock-out-Mäuse zeigen bei dem WT gegenüber unveränderter Nahrungsaufnahme und unverändertem Energieverbrauch eine beeinträchtigte Insulinproduktion und -freisetzung. Ihre periphere Insulinsensitivität ist vermindert und sie fallen durch vermehrte Triglyceridakkumulation in der Leber sowie gesteigerte Mengen an Körperfett und vermehrte Lipogenese und Adipogenese auf.⁵⁸

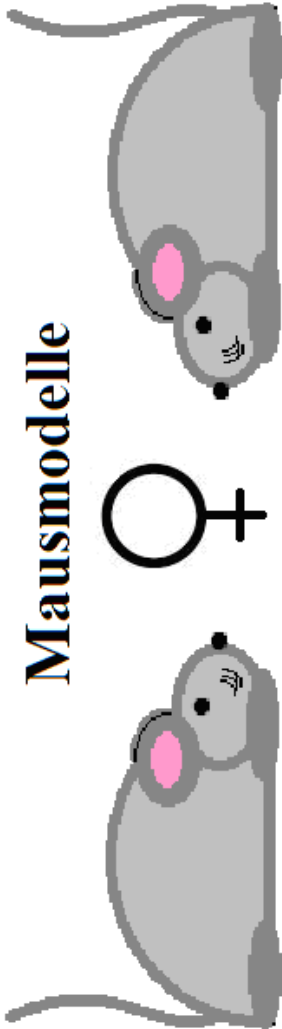
1.4.4 Ovariectomierte Mäuse

Ovariectomierte Mäuse (OVX) zeigen Sham-operierten Tieren gegenüber eine erhöhte Energieaufnahme sowie ein signifikant höheres Körpergewicht und mehr Körpergesamtfett. Zusätzlich sind sie insulinresistent mit entsprechend beeinträchtigter Glucosetoleranz und dyslipidämisch.^{57,72,73} Durch die externe Applikation von Östradiol (E2) können diese adversen Effekte revidiert, bzw. verbessert werden.⁷⁴⁻⁷⁶

* HFD, High Fat Diet Western diet: 5-15% Kohlenhydrate, 40-60% Fett, 30-45% Protein

[†] NCD, Normal Chow Diet; 60-70% Kohlenhydrate, 5-15% Fett, 20-30% Protein

Mausmodelle



| | ER α -Knockout | ER β -Knockout | Aromatase-Knockout | Ovariectomierte Mäuse |
|----------------------|---|--|---|---|
| Fettgewebe | Körpergesamtfett Adipogenese Lipogenese Lipolyse | <i>Unter HFD:</i> Körpergesamtfett Adipogenese Lipogenese Lipolyse | Körpergesamtfett Adipogenese Lipogenese | Körpergesamtfett Adipogenese Lipogenese Lipolyse |
| Leber | Insulinsensitivität | TG -Akkumulation | TG -Akkumulation Insulinsensitivität | TG -Akkumulation Insulinsensitivität ? |
| Pankreas | Insulinproduktion Insulinfreisetzung | Insulinfreisetzung | Insulinproduktion Insulinfreisetzung | Insulinproduktion Insulinfreisetzung ? |
| Skelettmuskel | Insulinsensitivität GLUT4 | Insulinsensitivität GLUT4 | Insulinsensitivität | Insulinsensitivität GLUT4 |
| ZNS | Nahrungsaufnahme Energieumsatz | Nahrungsaufnahme Energieumsatz | Nahrungsaufnahme Energieumsatz | Nahrungsaufnahme Energieumsatz |
| Blut | HDL VLDL/LDL | HDL VLDL/LDL ? | HDL VLDL/LDL | HDL VLDL/LDL |

Abbildung 8: Phänotypen weiblicher Knockout-Mäuse

GLUT4: Glucosetransporter 4; HDL: High Density Lipoprotein, VLDL/LDL Very Low Density Lipoprotein/Low Density Lipoprotein; HFD: High Fat Diet, TG: Triglycerid; Zu den mit ? gekennzeichneten Merkmalen liegen bislang keine Daten vor

Mausmodelle



| | ER α -Knockout | ER β -Knockout | Aromatase-Knockout | Orchidektomierete Mäuse |
|----------------------|--|---|---|---|
| Fettgewebe | Körpergesamtfett Adipogenese Lipogenese Lipolyse ↕ ↕ ↕ ↕ ? | <i>Unter HFD:</i> Körpergesamtfett Adipogenese Lipogenese ↕ ↕ ↕ ↕ ↕ | Gonadalfett Adipogenese Lipogenese ↕ ↕ ↕ ↕ ↕ | Körpergesamtfett Adipogenese Lipogenese Lipolyse ↕ ↕ ↕ ↕ |
| Leber | Insulinsensitivität Glucoseproduktion ↕ ↕ | TG -Akkumulation ↕ | TG -Akkumulation Insulinsensitivität ↕ ↕ | TG -Akkumulation Insulinsensitivität ? |
| Pankreas | Insulinproduktion Insulinfreisetzung ↕ ↕ | Insulinproduktion ↕ | Insulinproduktion Insulinfreisetzung ↕ ↕ | Insulinproduktion Insulinfreisetzung ? |
| Skelettmuskel | Insulinsensitivität GLUT4 ↕ ↕ | Insulinsensitivität GLUT4 ↕ ↕ | Insulinsensitivität GLUT4 ↕ ↕ | Insulinsensitivität GLUT4 ↕ ↕ |
| ZNS | Nahrungsaufnahme Energieumsatz = ↕ | Nahrungsaufnahme Energieumsatz = = | Nahrungsaufnahme Energieumsatz = ↕ | Nahrungsaufnahme Energieumsatz = ↕ |
| Blut | HDL VLDL/LDL ↕ ↕ | HDL VLDL/LDL ? ? | HDL VLDL/LDL ↕ ↕ | HDL VLDL/LDL ↕ ↕ |

Abbildung 9: Phänotypen männlicher Knockout-Mäuse

GLUT4: Glucosetransporter 4; HDL: High Density Lipoprotein, VLDL/LDL Very Low Density Lipoprotein/Low Density Lipoprotein; HFD: High Fat Diet; TG: Triglycerid; NFD: Normal Fat Diet; zu den mit ? gekennzeichneten Merkmalen liegen bislang keine Daten vor

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Die vorliegende Promotionsarbeit untersucht die Östrogenabhängigkeit der ATGL-Expression. Sowohl tierexperimentell als auch in randomisierten, kontrollierten Studien an humanen Patientenkollektiven gewonnene Daten und Beobachtungen unserer, aber auch zahlreicher anderer Gruppen, ließen einen Zusammenhang zwischen Östrogenstimulation und ATGL-Expression vermuten. So konnte in tierexperimentelle Studien beobachtet werden, dass weibliche Mäuse unter körperlicher Belastung ihren myokardialen Energiebedarf zu einem signifikant höheren Anteil aus der Metabolisierung von Lipiden decken als gleichaltrige Männchen.⁵⁹ Gemessen wurden in beiden Geschlechtern jeweils sowohl die Plasmakonzentrationen der FFA und der TGs als auch der RQ unter körperlicher Aktivität im Laufrad. Vor der Laufradaktivität waren die Konzentrationen der FFA und auch der TGs im Plasma männlicher Mäuse signifikant höher als bei gleichaltrigen, unter entsprechenden Bedingungen gehaltenen und ernährten weiblichen Mäusen.⁵⁹ Plasmatriglyceridlevel und FFA-Konzentrationen stiegen bei weiblichen Mäusen unter der physischen Belastung an, während sie bei männlichen Individuen absanken. Der RQ war bei weiblichen Mäusen im Vergleich mit männlichen Mäusen deutlich erniedrigt.^{59,77} Diese Befunde deuten auf eine bei weiblichen Mäusen in Relation zu männlichen Tieren unter catecholaminerger Stimulation erhöhte Lipolyse mit gesteigerter Metabolisierung von Fettsäuren im Verhältnis zu Glucose hin. In Einklang mit den genannten experimentellen Beobachtungen ist im gonadalen Fettgewebe von Weibchen eine signifikant höhere Konzentration der ATGL messbar als bei Männchen.⁷⁷ Weiterhin wird für sowohl für Östrogenrezeptor-KO-Mäuse als auch Mäuse, denen die Fähigkeit zur Östrogensynthese fehlt (Aromatase-KO-Mäuse), als auch ovariektomierte Mäuse eine Erhöhung des Körpergewichts- und –gesamtetts gegenüber Kontrollen beobachtet.⁵⁸ (s. Abbildung 8 und Abbildung 9). Wie in Abschnitt 1.2.5 beschrieben, können während des perimenopausalen Östrogenentzuges ähnliche Beobachtungen für den humanen Organismus getroffen werden. So wird eine deutliche Zunahme des relativen Körperfettanteils, insbesondere des Viszeralfetts beobachtet, die mit einer Zunahme der Inzidenz des metabolischen Syndroms und damit T2D, kardiovaskulären Ereignissen und Arteriosklerose einhergeht.^{51,52} Die Prävention und Behandlung des metabolischen Syndroms und seiner Folgeerkrankungen ist global, zwar insbesondere in den westlichen Industrienationen, mit zunehmender Inzidenz aber auch in Entwicklungsländern ein zentrales Anliegen medizinischer Praxis und Forschung. Von entsprechend großem Interesse ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen metabolischer Prozesse, deren Dysregulation an der Entstehung der genannten „Zivilisationskrankheiten“ und

ihrer Folgeschäden beteiligt ist. Zentral sind dabei vor allem der Glucosestoffwechsel mit den Mechanismen der Insulinresistenz und der Fettstoffwechsel mit allen sich durch ein gestörtes Verhältnis von Lipidspeicherung und -metabolisierung ergebenden pathophysiologischen Konsequenzen. Gegenstand pharmakologischer Forschungsprojekte im Rahmen der „Metabolic Research“ ist entsprechend die Findung von Möglichkeiten, möglichst spezifisch regulatorisch in Prozesse wie die Lipogenese, Adipogenese, FFS-Aufnahme oder die Lipolyse einzugreifen um positive Wirkung auf das „metabolische Profil“ des Gesamtorganismus zu erzielen.

Konkretes Ziel dieser Arbeit ist es nun, einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung nukleärer Östrogenrezeptoren und gesteigerter Transkription des ATGL-Gens nach Bindung aktivierter ERs an EREs im ATGL-Promotor zu bestätigen. Die separate Untersuchung der ERs vom Typ „Alpha“ ($ER\alpha$) und „Beta“ ($ER\beta$) mittels selektiver Agonisten ermöglicht die Differenzierung der Effekte unterschiedlicher Rezeptortypen auf die Transkriptionsregulation.

3 Material

3.1 Zellen und Mikroorganismen

3T3L1 Präadipozyten

ATCC (Wesel, Germany)

E. Coli

ATCC (Wesel, Germany)

3.2 Arbeitsmaterialien

Eppendorfhütchen

Eppendorf (Hamburg, D)

Falkons 15ml, 50ml

Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Handschuhe Micro Touch

Ansell (München, D)

Parafilm

American National Can (Mensaha, USA)

Luciferase Tubes

Sarstedt (Newton, USA)

Zellkulturflaschen

Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Zellkulturplatten (6-, 12-Well)

Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Zellscraper

Sarstedt (Newton, USA)

3.3 Laborgeräte

Analysewaage Alt 220-5DAM

Kern (Balingen, D)

BioHit Proline elektrische Pipetten

Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, D)

Centrifuge 5810R

Eppendorf, (Hamburg, D)

CO2-Inkubator HeraCell 150

Heraeus, (Hanau, D)

Curix 60 Entwicklungsmaschine

AGFA, (Köln, D)

Eisschrank Comfort o Frost

Liebherr, (Biberach, D)

Elektronische Pipettierhilfe Rota-Filler 3000

Heathrow Scientific (Northgate, UK)

Elektrophorese Spannungsversorgung: Power Pac 300

Bio-Rad (München, D)

Fluoreszenzmikroskop

KEYENCE (Neu-Isenburg, D)

Grobwaage BL-1500S

Sartorius (Göttingen, D)

Inkubator Hera Cell 150

Thermo Scientific (Rockford, USA)

Ikamag RCT Heizplatte/Magnetrührer

Th. Karow GmbH, (Berlin, D)

Laminar-Flow-Arbeitsbank LaminAir 1.2

Heto-Holten, (Allerød, DK)

Mastercycler gradient

Eppendorf, (Hamburg, D)

Mikro 20 und 22R Zentrifuge

Hettich, (Hanau, D)

pH-Meter PH-211

Hanna Instruments (Kehl, D)

| | |
|--|--|
| Pipettenspitzen für diverse Volumina | VWR International (Darmstadt, D) |
| Promax 120 Schüttler | Heidolph Instruments, (Schwabach, D) |
| Real-Time Device Strategene® MX3000P | Stratagene, (Amsterdam, NL) |
| Schwingschüttler KS 260 basic | IKA (Staufen, D) |
| Sirius Luminometer | Berthold Detection Systems (Pforzheim, D) |
| Typ MRL 280, Electrolux Medical Refrigerator | Morton Medical Ltd. (Cirencester, UK) |
| Unitron Inkubationsschüttler | INFORS, (Basel, CH) |
| Vortex Genie 2, Scientific Industries | Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, D) |
| Waage BL 1500S | Sartorius AG, (Göttingen, D) |
| Wasserbad | Memmert GmbH, (Schwabach, D) |
| Western-Blot Kammer und Zubehör | Bio-Rad (München, D) |
| Zentrifuge Mikro22R | Hettich (Tuttlingen, D) |

3.4 Kits

| | |
|---|-----------------------------------|
| BCA Protein Assay Reagent Kit | Thermo Scientific (Rockford, USA) |
| Dual-Luciferase® Reporter Assay System | Promega (Mannheim, D) |
| ECLTM Western Blotting Detection Reagents | Amersham (Buckinghamshire, UK) |
| Nucleo Spin RNA II | Machery-Nagel (Düren, D) |
| Maxi-Präp Plasmid | Machery-Nagel (Düren, D) |
| Mini-Präp Plasmid | Machery-Nagel (Düren, D) |

3.5 Chemikalien und Substanzen

| | |
|--------------------------------------|--|
| Acrylamid/Bis (30%) | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D |
| Agarose | Biozym Scientific GmbH, (Hess. Oldendorf, D) |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, D) |
| Descosept® | Dr. Schumacher (Malsfeld, D) |
| Desoxy-dinukleotiddiphosphate (dNTP) | Promega, (Mannheim, D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, D) |
| Dithiothreitol (DTT) | Serva Electrophoresis GmbH, (Heidelberg, D) |
| DPN | Tocris Bioscience (Bristol, UK) |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, D) |
| Ethanol 100% | J.T. Baker (Phillipsburg, USA) |
| Ethanol 70% | J.T. Baker (Phillipsburg, USA) |

| | |
|---------------------------------------|--|
| GeneRuler 100bp DNA | Fermentas, (St. Leon-Rot, D) |
| Glycerol | VWR, (Darmstadt, D) |
| Glycin | Roth, (Karlsruhe, D) |
| Kaliumchlorid (KCl) | Roth, (Karlsruhe, D) |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Roth, (Karlsruhe, D) |
| Methanol | Merck, (Darmstadt, D) |
| Milchpulver, Blotting Grade | Roth, (Karlsruhe, D) |
| M-MLV Reverse Transkriptase | Promega, (Mannheim, D) |
| M-MLV RT 5x Buffer | Promega, (Mannheim, D) |
| M-MLV Reverse Transkriptase (RT) | Promega (Mannheim, D) |
| Pioglitazon | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, D) |
| Power SYBR Green PCR Master Mix | Applied Biosystems, (Darmstadt, D) |
| PPT | Tocris Bioscience (Bristol, UK) |
| Proteinladder | Fermentas, (St. Leon-Rot, D) |
| Random Primers | Promega, (Mannheim, D) |
| Restriktionsendonucleasen | Promega, (Mannheim, D) |
| RNAsin | Promega, (Mannheim, D) |
| Salzsäure (HCl) | Merck, (Darmstadt, D) |
| Skimmed Mild Powder | Roth (Karlsruhe, D) |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva Electrophoresis GmbH, (Heidelberg, D) |
| Taq Polymerase | Fermentas, (St. Leon-Rot, D) |
| TaqMan Gene Expression Master Mix | Applied Biosystems, (Darmstadt, D) |
| Tris | Roth, (Karlsruhe, D) |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, D) |
| TRIZol Reagent | Invitrogen Life Technologies, (Karlsruhe, D) |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe, D |
| Ultra Pure Water | Biochrom AG, (Berlin, Deutschland) |

3.6 Konstrukte

| | |
|-------------|---|
| pGL2 | Promega, (Mannheim, D) |
| pSG5 | Agilent Technologies (Santa Clara CA, USA) |
| ERE-Luc | X. Wang (College of Medicine, Lexington, USA) |
| ER α | Pierre Chambon (Collège de France, Paris, FR) |

| | |
|----------|---|
| ERβ | Pierre Chambon (Collège de France, Paris, FR) |
| ATGL-Luc | Cynthia Smads (MU Ohio, USA) |
| Renilla | Promega (Mannheim, D) |

3.7 Industrielle hergestellte Fertig-Medien und –Lösungen

| | |
|--|---|
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D) |
| Fetal Bovine Serum (FBS) | Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D) |
| Opti-MEM® | Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D) |
| LB-Agar, Miller (Ausgangssubstanz pulverisiert) | Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| LB-Broth, Miller (Ausgangssubstanz, pulverisiert) | Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| Lipofectamin® 2000 | Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D) |
| Passive Lysis Buffer 5x | Promega (Mannheim, D) |
| Penicillin / Streptomycin 10.000 U/mL / 10.000 µg/mL | Biochrom AG (Berlin, D) |
| Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7,4 | Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D) |
| Trypsin-EDTA | PAA Laboratories (Pasching, AT) |

3.8 Selbthergestellte Lösungen und Puffer

(Alle Puffer und Lösungen wurden nach etablierten Protokollen des Institutes für Pharmakologie der Charité (Berlin, D) hergestellt.

| | |
|--|--|
| Elektrophorese Puffer (10x, Stammlösung) | 30,3 g Tris 144 g Glycin 100 mL 10 % SDS Lösung ad 1000 mL H ₂ O; pH 8,3 |
| Protein-Lyse-Puffer (RIPA) | 20 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 2,5 mM 1 % Triton X-100 2,5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ |

| | |
|---------------------------------|--|
| | <p>1 mM Na₃VO₄</p> <p>1 Tablette Proteaseinhibitoren Complete-mini® in 50 ml Stammlösung</p> |
| Proben Puffer (4x, Stammlösung) | <p>303 mg Tris</p> <p>800 mg SDS</p> <p>4 mL Glycerol</p> <p>2 mL β-Mercaptoethanol</p> <p>50 µL Bromphenolblau</p> <p>ad 10 mL H₂O ; pH 6,8</p> |
| Sammelgel (pro Gel) | <p>2,5ml 0,5 M Tris-HCL pH 8,8</p> <p>100µl 10% SDS Stammlösung</p> <p>1,3ml 30% Bis-Acrylamid</p> <p>100µl 10% Ammoniumpersulfat</p> <p>12µl TEMED</p> <p>6,1ml dd H₂O</p> |
| TBS Puffer (10x) | <p>24,2 g Tris</p> <p>80 g NaCl</p> <p>ad 1000 mL H₂O; pH 7,6</p> |
| TBS-T Puffer (10x) | <p>100 mL TBS 10x Puffer</p> <p>1000 µL Tween® 20</p> <p>ad 1000ml H₂O</p> |
| Towbin Puffer | <p>5,82 g Tris</p> <p>2,93 g Glycin</p> <p>200 mL Methanol</p> <p>3,75 mL 10 % SDS Lösung</p> <p>ad 1000 mL H₂O; pH 9,0</p> |
| Trenngel (pro 10% Gel) | <p>5ml 1,5 M Tris-HCL pH 8,8</p> <p>200µl 10% SDS Stammlösung</p> <p>6,6ml 30% Bis-Acrylamid</p> |

| | |
|--|--|
| | 100µl 10% Ammoniumpersulfat 10µl TEMED 9,1ml dd H ₂ O |
|--|--|

3.9 Computerprogramme

| | |
|--------------------|--|
| Graph Pad Prism® 5 | GraphPad Software (La Jolla CA, USA) |
| FB12SirSoft | Berthold Detection Systems (Pforzheim,D) |
| MXPro 4.10 | Applied Biosystems (Darmstadt, D) |
| Office® 2003 | Microsoft (Redmond, USA) |
| ImageJ | National Institutes of Health, USA |

3.10 Primer

| | |
|----------|--|
| 18S | For 5' ACC TGG TTG ATC CTG CCA GTA G Rev 5' TTA ATG AGC CAT TCG CAG TTT C |
| mβ-Actin | For 5' ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC Rev 5' GCC TTG ACT GTG CCG TTG AAT |
| mERα | For 5' gCC CTC CCg CCT TCT ACA Rev 5' CCC TCC TCg gCg gTC TTT |
| hERα | For 5' TTC TTC AAg AgA AgT ATT CAA Rev 5' ATCAT TCC CAC TTC gTA gCA TTT |
| mERβ | For 5' gCC AAT CAT CgC TTC TCT AT Rev 5' CCC TCT TTg CTC TTA CTg TCC TCT |
| hERb | For 5' TCA CAT CTg TAT gCg gAAA CC Rev 5' CTA Tag TAT CCC TCC TCg gAA CC |
| ATGL | For 5' CAA CgC CAC TCA CAT CTA C Rev 5' gTT gAA ggA ggg ATg CAg A |
| HSL | For 5' CAC CCA TAg TCAA CCC CCT TC Rev 5' TCT ACC ACT TTC AgC gTC ACC G |

3.11 Antikörper

| | |
|-------|-----------------------|
| GAPDH | Abcam (Cambridge, GB) |
|-------|-----------------------|

ER α sc-544

Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

ER β sc-53494

Santa Cruz Biotechnology (SCBT), Dallas,
Texas

ATGL-Ak ab109251

Abcam (Cambridge, GB)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die im Folgenden geschilderten Arbeitsabläufe erfolgten in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 unter einer sterilen Werkbank. Alle verwendeten Materialien und Arbeitsgegenstände wurden vor ihrer Nutzung autoklaviert, bzw. mit 70%-igem Ethanol gereinigt.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 5% CO₂, 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 95%.

4.1.1 Zelllinie

In sämtlichen Experimenten wurde mit adhärenenten, murinen 3T3L1-Präadipozyten embryonalen Ursprungs gearbeitet. Die 3T3L1-Zelllinie ist seit mehr als 30 Jahren als Modell in der Aufklärung molekularer Mechanismen der Pathophysiologie und Therapie metabolischer Erkrankungen etabliert.⁷⁸

Im undifferenzierten, präadipozytären Zustand besitzen die 3T3L1-Zellen eine fibroblastische Morphologie mit länglichen Zellausläufern. (s. Abbildung 10) Sie zeigen nicht die für differenzierte Adipozyten typische Triglyceridakkumulation in intrazellulären Lipid Droplets und sind entsprechend für transiente Transfektionen gut geeignet.

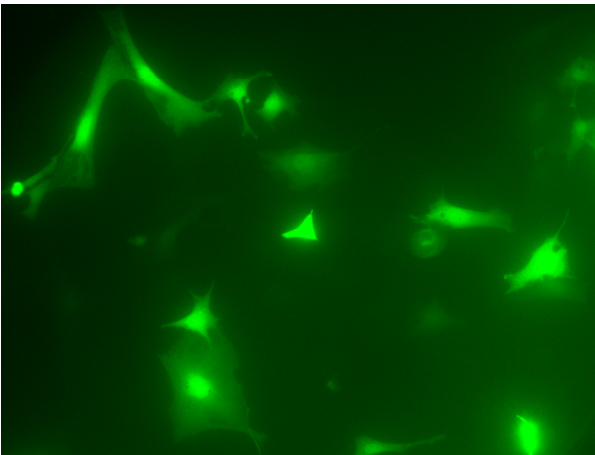


Abbildung 10 Fluoreszenzmikroskopisches Bild von eGFP-transfizierten 3T3L1 Präadipozyten

4.1.2 Medien und Lösungen

Die Herstellung aller verwendeten Medien erfolgte unter der Sterilbank nach einer Mindestvorlaufzeit von 20 Minuten. Hände, Unterarme, und alle Substanzen sowie Hilfsmittel (Pipettenspitzen, Falkons, Zellkulturflaschen etc.) wurden vor jeder Nutzung unter der Bench gründlich mit 70% Alkohol desinfiziert.

4.1.2.1 Vollmedium

Unter den in 4.1 geschilderten Bedingungen wurden in 445ml DMEM-Medium[‡] 50ml FBS[§] und 5ml Penicillin/Streptomycin gelöst. Das Full Medium wurde bei 4°C gelagert und vor Nutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

4.1.2.2 Phenolfreies gestripptes Medium

Es wurden 50 ml aktivkohlegereinigtes FBS mit 5ml Penicillin/Streptomycin in 445ml phenolfreiem DMEM-Medium gelöst.

Aktivkohlegereinigtes FBS wurde genutzt, um durch östrogenhaltiges Nährmedium verursachte Effekte zu minimieren. Da auch Phenolrot eine agonistische Wirkung am Östrogenrezeptor besitzt, wurde phenolfreies DMEM-Medium genutzt.

4.1.2.3 Phenolfreies gestripptes Hungermedium

Es wurden 5ml aktivkohlegereinigtes FBS mit 5ml Penicillin/Streptomycin in 490 ml phenolfreiem DMEM-Medium gelöst.

4.1.2.4 Opti-MEM® Reduced Serum Medium

Für die Transfektion mit Lipofectamine 2000 empfohlen ist die Nutzung des FBS-reduzierten, antibiotikafreien Opti-MEM-Mediums. Die genaue Zusammensetzung des Transfektionsmediums gibt die Fa. Invitrogen nicht bekannt.

4.1.2.5 PBS

Zum Waschen der Zellen wurde isotone phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered Saline, PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 genutzt.

4.1.3 Auftauen von Zellen

Die in Cryotubes und flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend sofort in vorbereitete Tubes mit Vollmedium pipettiert. Die Suspensionen wurden 5 Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 12ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator gelagert. Am folgenden Tag wurde die Adhärenz der 3T3L1-Zellen

[‡] Dulbeccos modified Eagle Medium: http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/Classical_Media/dmem.html

[§] Fetal Bovine Serum: <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/fbs.html>

unter dem Lichtmikroskop geprüft und bei gutem Wachstum am darauffolgenden Tag passagiert.
(s. Abschnitt 4.1.4)

4.1.4 Passagieren von Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei 40-60% Konfluenz alle zwei bis drei Tage. Hierzu wurden die adhärennten Zellen nach Absaugen des Nährmediums aus einer 75 cm² Zellkulturflasche zunächst mit 12ml 37°C warmem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden 2ml Trypsin/Ethylendiamintetraethylsäure (EDTA) zugegeben, das durch Eiweißdenaturierung sowohl Zell/Zell als auch Zell/Boden-Kontakte löste. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Zeitpunkt abgepasst, an dem der Großteil der Zellen eine kugelige Morphologie angenommen und sich von der Bodenplatte gelöst hatte. Um eine Schädigung der Membranproteine durch das Trypsin/EDTA zu verhindern, wurden nun 4ml Vollmedium zugegeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension an der Bodenplatte der Zellkulturflasche wurden die letzten adhärennten Zellen gelöst. Je nach experimenteller Planung der nächsten Tage wurden nun zwei bis vier frische 75 cm² Zellkulturflaschen, die jeweils 12ml Vollmedium enthielten, mit 0,5-2ml der Zellsuspension beimpft und nach gründlicher Suspension im Brutschrank inkubiert.

4.1.5 Ausplattieren von Zellen

Für die Luciferaseversuche wurden 12-Well- und für die Real-time-, bzw. Western Blot-Versuche 6-Well Platten mit jeweils 1ml, bzw. 2ml gestripptem Vollmedium unter der sterilen Bench präpariert.

Anschließend wurden die Zellen bei 40-60% Konfluenz aus dem Brutschrank entnommen und analog zur Vorgangsbeschreibung in Abschnitt 4.1.4 mittels Trypsin/EDTA in Lösung gebracht. Bei einem Zeitintervall von 18 bis 20 Stunden zwischen Aussaat der Zellen und ihrer Transfektion, entsprach die Anzahl der verwendeten Kulturflaschen dabei der Anzahl der für den geplanten Versuch benötigten Zellkulturplatten. Die Zellsuspensionen wurden in einer Zellkulturflasche gesammelt und mit jeweils 1ml (12-Well-plates im Luciferaseversuch), bzw. 2ml (6-Well-plates im Real-time und Western Blot-Versuch) gestripptem Full Medium pro zu befüllendem Well verdünnt.

Anschließend wurden 1ml, bzw. 2ml der durch Auf- und Ab- Pipettieren möglichst homogenen Zellsuspension in kreisenden Bewegungen tropfenweise auf die Wells verteilt, die Zellkulturplatten wurden gemäß der Pipettierschemata für die geplante Transfektion und Stimulation beschriftet über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.1.6 Transfektion von Zellen

Die Transfektion der am Vortag ausgesäten Zellen erfolgte mit Lipofectamine 2000 nach Herstellerangaben (Fa. Invitrogen) bei 90-95% Konfluenz.⁷⁹ Das Transfektionsmedium OptiMem wurde auf 37°C im Wasserbad erwärmt und Lipofectamine 2000 aus dem 4°C Kühlschrank entnommen und auf Eis gelagert. Die jeweils zu transfizierenden DNA-Plasmide wurden aus dem -20° C Kühlfach entnommen und auf Eis aufgetaut.

Zunächst wurden die Mastermixe 1 und 2 (MM1 und MM2) erstellt (s. Abbildung 11 und Abbildung 12) und MM2 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde MM1 entsprechend der Anzahl zu transfizierender Wells auf 15ml-Falkons aufgeteilt und zusätzlich ein 500ng DNA entsprechendes Volumen der jeweiligen DNA-Konstrukte zupipettiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu jeder Lösung das entsprechende Volumen MM2 zupipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurden die 12- bzw. 6-Well-Platten aus dem Brutschrank entnommen, das Wachstumsmedium mittels Saugpumpe und Pasteurpipette von jeder Platte einzeln abgesaugt, um den Zeitraum ohne Medium möglichst kurz zu halten, jedes Well durch vorsichtiges Zupipettieren am Rand mit 37°C warmem OptiMem gewaschen und erneut abgesaugt. Im Folgenden wurden in gleicher Weise OptiMem und anschließend, nach gründlicher, vorsichtiger Resuspension durch wiederholtes Invertieren des Falkons, die einzelnen Mixe pipettiert.

Nach 4 bis 6 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und Stripped Full Medium (s. Abschnitt 4.1.2.1) zupipettiert. Die Zellen wurden bis zum nächsten Morgen bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

| | |
|--|---|
| Master Mix 1: 0,25ml OptiMem 2,3µl Lipofectamine 2000 pro 1000ng DNA | Master Mix 2: 0,25 ml OptiMem 500 ng ER α /ER β /PSG5 5 ng Renilla |
|--|---|

Abbildung 11: Transfektions-Mastermixe für die Luciferaseversuche
(Alle Angaben pro Well; Lipofectamine 2000 entsprechend der Menge zu transfizierender DNA)

| | | |
|--|--|---|
| Master Mix 1: 0,25ml OptiMem 2,3µl Lipofectamine 2000 pro 1000ng DNA | Master Mix 2: 0,25 ml OptiMem 1000 ng ER α /ER β /PSG5 | Kontrollmix: 0,25ml OptiMem 500ng eGFP |
|--|--|---|

Abbildung 12: Transfektions-Mastermixe für die mRNA-Versuche/Western Blot Versuche
(Alle Angaben pro Well; Lipofectamine 2000 entsprechend der Menge zu transfizierender DNA)

Um die Transfektionseffizienz vor RNA-Präparation und cDNA-Synthese im Rahmen der Real-Time-PCR, bzw. vor der Probenvorbereitung und Durchführung des Western Blots abschätzen

zu können, wurden jeweils zwei Kontroll-Wells mit eGFP transfiziert. Fluoreszenzmikroskopisch betrachtete Versuchsansätze, deren Transfektionseffizienz in den eGFP-Wells unter 70% lag, wurden verworfen.

4.1.7 Stimulation von Zellen

Nach einer nächtlichen Erholungsphase in östrogenfreiem Vollmedium wurden die Zellen mit in gestripptem phenolfreiem Hungermedium gelöstem PPT, DPN, bzw. Ethanol (jeweils 100nM, experimentell etablierte Konzentration⁸⁰⁻⁸³) stimuliert.

Die Luciferaseversuche wurden zunächst in drei unterschiedlichen Versuchsansätzen mit ein-, zwei- oder dreimaliger Stimulation und Lyse 24, 48, bzw. 72 Stunden nach der ersten Stimulation durchgeführt, um eine Versuchsdauer zu bestimmen, die bei ausreichend langer Stimulationszeit und gleichzeitig erhaltener Vitalität der Zellen möglichst klare Ergebnisse förderte. Entsprechend der Messdaten wurde ein Stimulationszeitraum von 24 Stunden gewählt.

4.2 Luciferaseversuche

Erster Teil der Untersuchungen zum Einfluss selektiver Östrogenrezeptoragonisten auf die Expression der ATGL war die Analyse auf Promotorebene mittels eines Dual Luciferase Assays (Promega).⁸⁴

Grundlage der Luciferase-Messung ist die Erstellung eines DNA-Vektor, der ein dem ATGL-Promotor nachgeschaltetes Luciferase-Gen enthält. Das aus Leuchtkäfern stammende Luciferase-Protein fluoresziert und seine Expression in einer bestimmten Zelllinie unter definierten Bedingungen kann nach der Lyse der Zellen quantitativ bestimmt werden.⁸⁴

Dr. Cynthia Smas (University of Ohio) hatte im Rahmen ihrer Experimente mit PPAR γ bereits in 2006 einen entsprechenden Vektor synthetisiert und stellte diesen freundlicherweise zur Verfügung.²³

4.2.1 Vorarbeiten

Zur Durchführung der geplanten Versuche wurde zunächst eine größere Menge des ATGL-Luciferase-Konstruktes und des pGL2-Kontrollvektor-Konstruktes in E.coli amplifiziert und aufgereinigt.

4.2.1.1 Transformation von E.coli mit ATGL-Luc und pGL2-Luc

Zur Herstellung des LB-Mediums (0,25%) wurden zunächst jeweils 10g LB-Medium-Pulver in 400 ml Ultra Pure Water (UPW) mittels Rührmagneten in einem Autoklaviergefäß gelöst. Für den LB-Agar (0,35%) wurden 14g LB-Agar-Pulver in 400 ml UPW in einem weiteren

Autoklaviergefäß suspendiert. Anschließend wurden beide Gefäße 15 min bei 121°C autoklaviert.

Untransformierte E.coli-Kulturen wurden über Nacht auf einer LB-Agar-Starterplatte inkubiert. Mittels einer sterilen Öse wurde am Folgetag jeweils eine einzelne Bakterienkultur von der Starterplatte abgelöst und in 1ml LB-Medium gelöst. Um die Bakterienmembran für DNA-Plasmide permeabel zu machen, wurde 100µl KCM-Lösung (20%) zugegeben. Anschließend wurde 1µg des pGL2-, bzw. des ATGL-Luc-Konstruktes zupipettiert, die Suspension kurz gevortext und 20 Minuten auf Eis und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde nach Zupipettieren von 1ml LB-Medium kurz gevortext und bei 37°C im Schüttler für 60min inkubiert. Nach der Inkubation wurden auf vier ampicillinhaltigen Agarplatten jeweils 30µl, bzw. 130µl der Inkubate aufgebracht und mittels eines sterilen Glasspatels verteilt. Das im Basisvektor und im pGL2-Vektor befindliche Resistenzgen gegen Ampicillin sorgte für ein selektives Wachstum der E.coli-Kulturen, die erfolgreich transformiert wurden. Am Folgetag wurden fünf der Einzelkulturen auf den ATGL-Agarplatten und eine Einzelkultur auf den pGL2-Platten zufällig ausgewählt. Diese wurde auf eine neue Agarplatte aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus den Probekulturen

Mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid-Miniprep-Kits von Machery Nagel wurde aus allen 6 Kulturen DNA isoliert und deren Reinheit spektrometrisch bestimmt.²²

4.2.1.3 Restriktionsenzymverdau der Plasmid-Proben

Anschließend wurde ein Restriktionsenzymverdau der DNA-Konstrukte mit darauffolgender Gelelektrophorese vorgenommen, um vor der Probensequenzierung feststellen zu können, ob sich der ATGL-Promotor wirklich im Konstrukt befindet. Für den Verdau wurden die Restriktionsenzyme NheI, KpuI und HIND III ausgewählt, die an den Basen-Motiven GCTAGC, AAGCTT, bzw. TCCGGA angreifen. Zunächst wurden jeweils 1 µl der Enzyme Nhe I und HIND III in einer 1µg der Plasmid-DNA entsprechenden Anzahl µl sowie 5µl des Puffers Tango I suspendiert und die Lösung mit UPW auf ein Gesamtvolumen von jeweils 50µl gebracht. Hierbei sollte ein c.a. 3000 bp langes DNA-Fragment entstehen. In einem weiteren Kontrollverdau wurden analog 1 µl der Enzyme Kpn I und HIND III mit einem 1µg der Plasmid-DNA entsprechendem Probenvolumen sowie 5µl des Puffers Tango I suspendiert und die Lösung mit UPW auf ein Gesamtvolumen von jeweils 50µl gebracht. Das Genprodukt, das hierbei entstehen sollte, umfasst c.a. 370bp. (s. Abbildung 13).

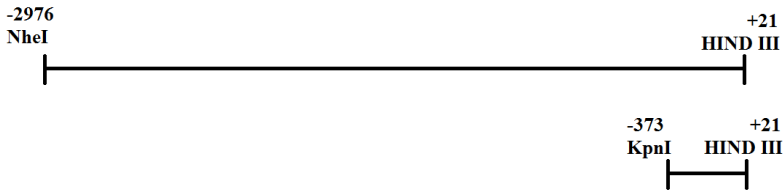


Abbildung 13: Erwartete Fragmentgrößen für den Restriktionsenzymverdau mit HIND III KpnI und NheI

Als Negativkontrolle wurde in einem weiteren Experiment nur mit HIND III verdaut und damit ein zwar nicht mehr zirkuläres, aber nicht in kleinere Fragmente aufgespaltenes Plasmid erhalten. Alle Verdau-Suspensionen wurden bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Es wurden gemäß der erwarteten Größe der Verdauprodukte passende Gele gegossen (2% für Kpn I und 1% für Nhe I) und in jede der Geltaschen 10µl Probe und 1,75µl Orange G aufgetragen und bei 120V für 45 Minuten gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmentgrößen für den Verdau mit HINDIII und NheI waren, wie in Abbildung 14 erkenntlich, mit einer Größe von etwa 6000 bp für das „Rest-Konstrukt“ und 3000bp für das spezifische Spaltprodukt in allen 5 ATGL-Luc-Proben erwartungsgemäß. Für den KpnI-Verdau zeigten die Proben neben dem „Rest Konstrukt“ ein weiteres unspezifisches Spaltprodukt und jeweils eine schwach zu erkennende Bande für das erwartete Spaltprodukt von etwa 370bp. (Bande auf dem Scan des Gels schlecht erkennbar und daher in Abbildung 14 nachgezeichnet).

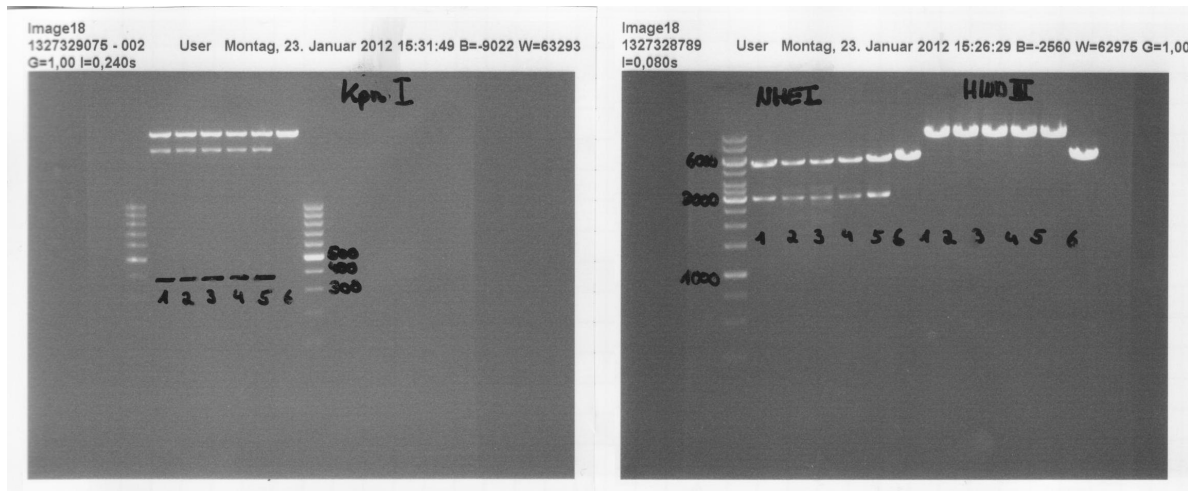


Abbildung 14: Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese der ATGL-Luc Konstrukte 1-5

4.2.1.4 Sequenzierung der Proben

Die Sequenzierung der Konstrukte ATGL-Luc 1-5 erfolgte durch SMB Services in Molecular Biology (Rüdersdorf, DE). Anschließend wurden die Sequenzen mit der murinen ATGL-

Promotor-Sequenz⁸⁵ (s. Abschnitt 4.3) verglichen und die Probe mit der größten Sequenz-Übereinstimmung für den Maxi Präp ausgewählt.

4.2.1.5 Präparation einer größeren Plasmid-Menge für Transfektionsexperimente

Mittels einer Pipettenspitze wurden einige Kulturen der Bakterien, die den ausgewählten ATGL-Luc-Typ, bzw. PGL2 synthetisieren in einen Erlenmeyerkolben mit Nährmedium eingebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für spätere Präparationen wurden am nächsten Morgen 800µl der Bakterienlösung entnommen, diese mit 200µl autoklaviertem Glycerol suspendiert und bei -80°C eingefroren.

Die verbliebene Übernachtkultur wurde in ein Ultraschallzentrifugengefäß überfüllt und 15 Minuten lang bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid gemäß des Nucleo-Bond Maxi Kits der Firma Machery-Nagel aufgereinigt.⁴⁸ Anschließend wurden die Konzentrationen der ATGL-Luc- und der PGL2-Probe spektrometrisch am Nanodrop bestimmt und diese bei -20°C für spätere Transfektionen im Rahmen der Luciferase-Versuche eingefroren.

4.2.2 Gewinnung der Proben

Zunächst wurden 3T3L1-Präadipozyten gemäß der Beschreibung in den Abschnitten 4.1.4 bis 4.1.7 transfiziert und mit den selektiven Östrogenrezeptoragonisten PPT oder DPN, bzw. Ethanol als Kontrolle stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulation wurde mittels Saugpumpe und Pasteurpipette vorsichtig das Medium am Rand jedes Wells abgesaugt. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mittels 5-fach konzentriertem Lysepuffer (Passive Lysis 5X Buffer, Fa. Promega). Es wurden pro Well (12-Well-Plates) 200 µl des 1:4 mit UPW verdünnten Lysepuffers aufpipettiert und Deckel und Boden der 12-Well-Platte mittels Laboratory Film aneinander fixiert. Die so präparierten Platten wurden für 15 Minuten bei 200 rpm geschüttelt und anschließend der Überstand jedes Wells jeweils in ein Eppendorfhütchen überfüllt und bei 13.000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Der die zytoplasmatischen Proteine und Moleküle enthaltende Überstand wurde in ein weiteres, analog beschriftetes Eppendorfhütchen überfüllt und das Pellet aus Zelldebris verworfen.

4.2.3 Luciferasemessung

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte luminometrisch mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Fa. Promega und der Software FB12SirSoft.

Die Reagenzien „Stop+Glo“ und „LARII“ wurden nach Herstellerangaben durch gründliche Suspension des jeweiligen Substrates in der entsprechenden Pufferlösung in mit Alufolie umwickelten Falkons vorbereitet. Beide Reagenzien befanden sich während der Messung auf Raumtemperatur und wurden nach ihrer Nutzung im -80°C-Eisschrank gelagert. Es wurden keine Reagenzien verwendet, die länger als ein Jahr gelagert oder mehr als drei Mal aufgetaut und wieder eingefroren worden waren.

Die Plastikschläuche, die während des Messvorganges der Zuführung der Reagenzien zum Luminometer dienen, wurden zunächst mit Aqua dest. gespült. Um die lichtempfindlichen Reagenzien zu schützen, wurde das Labor vor der Messung abgedunkelt. Es erfolgte jeweils eine Dreifachmessung der Aktivitäten der Renilla Luciferase als Bezugsparameter und der Firefly Luciferase, dem Genprodukt des genutzten ATGL-Luc Vektors. Die Messwerte wurden digitalisiert und jeweils ein Mittelwert der Aktivitäten sowie der Quotient aus Firefly-Luciferase-Aktivität zu Renilla-Luciferase-Aktivität berechnet. Die Daten wurden in Excel importiert.

4.3 Promotoranalyse

Sowohl das murine als auch das humane Genom sind komplett sequenziert und in der NCBI Gen-Datenbank^{**} zugänglich. Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen das murine, bzw. das humane PNPLA2-Gen. Neben den mit Exons und Introns dargestellten Genen zeigen die Abbildungen die jeweilige putative PNPLA2-Promotorsequenz. Die Genabschnitte von Interesse (Promotorsegment und erstes Intron) wurden angewählt und die zugehörigen Basensequenzen als Textdokument angezeigt. Diese wurden mittels eines Scan-Analyse-Tools (bereitgestellt durch die JASPAR-Datenbank^{††}) auf das Vorhandensein spezifischer Sequenzmotive von Transkriptionsfaktoren untersucht. Putative transkriptionsfaktorbindende Sequenzen wurden mittels Übereinstimmungsanalyse bekannter spezifischer Sequenzmotiven identifiziert. Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen eine grafische Darstellung der möglichen Bindungsmotive für ER α (ESR1) und ER β (ESR2). Auf der Abszisse aufgetragen sind die 20, bzw. 18 Basen des ESR1-, bzw. ESR2-Motives. Die Größe der Buchstaben steht dabei für die Spezifität der jeweiligen Stelle im Motiv für eine bestimmte Base. Der Ordinatenwert 0 bedeutet, dass keine Basenpräferenz besteht, 2 bedeutet, dass in jedem als den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor bindend bekanntes Motiv an dieser bestimmten Stelle genau eine bestimmte Base steht. Alle Werte dazwischen sind an als bindend bekannten Motiven empirisch erhobene

^{**} <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

^{††} <http://jaspar.genereg.net/>

Daten, die die Häufigkeit des Auftretens einer bestimmten Base an der jeweiligen Stelle angeben.⁸⁶

In Abbildung 17 und Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die Bindungsmotive für ER α und ER β sich zwar ähneln, diese jedoch in Abhängigkeit von der genauen Basenfolge mit unterschiedlicher Spezifität gebunden werden. Der Schwellenwert, ab der eine mögliche Bindungssequenz als solche registriert wird, liegt i.d.R. bei 80%.

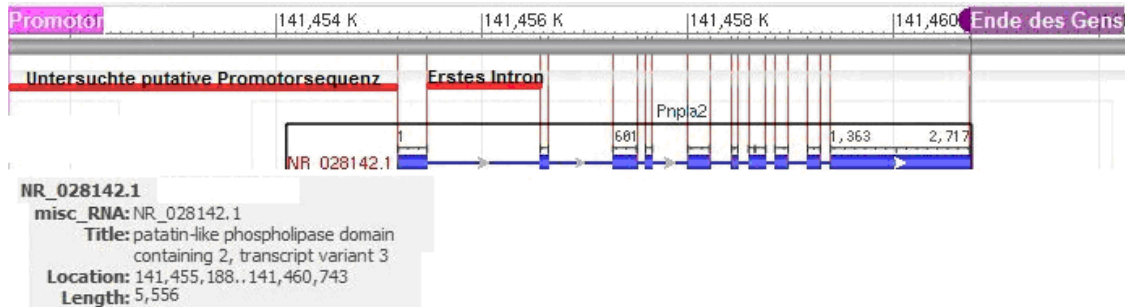


Abbildung 15: Murines PNPLA2-Gen mit putativer Promotorregion

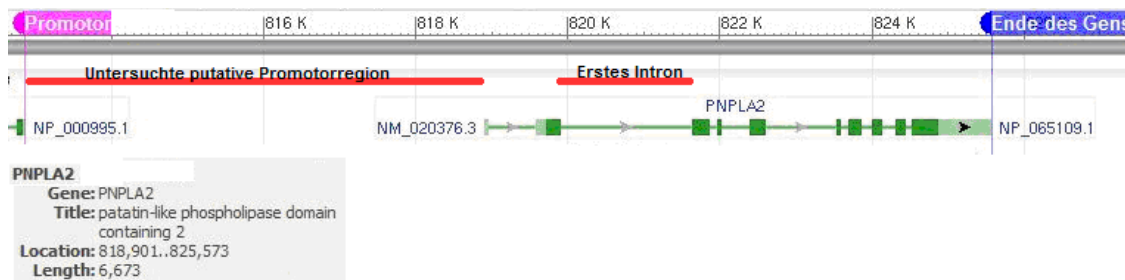


Abbildung 16: Humanes PNPLA2-Gen mit putativer Promotorregion

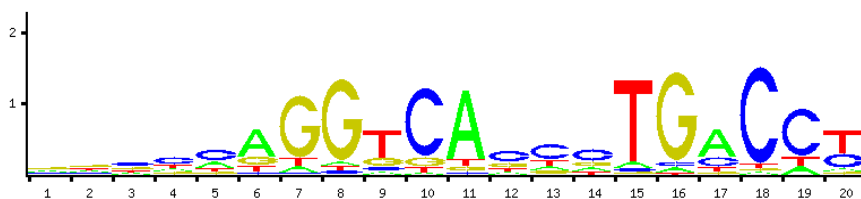


Abbildung 17: Bindungsmotiv ER α (ESR1)

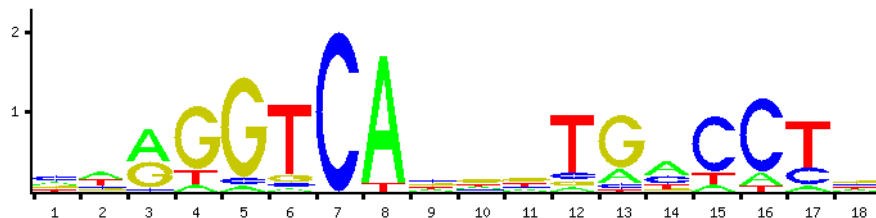


Abbildung 18: Bindungsmotiv ER β (ESR2)

4.4 Quantitative Real-Time-PCR-Versuche

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine Methode, die es erlaubt, kleinste Mengen eines bestimmten (c)DNA-Motives oder -Transkriptes in einer Probe zu detektieren. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) wird durch die Zugabe spezifischer Primer ein Genabschnitt repliziert. Dieser Vorgang wiederholt sich durch thermisch gesteuerte Zyklen. Bei Temperaturen um 60°C findet eine Anlagerung der Primer an die DNA statt, sodass die Taq-Polymerase die Replikation initiieren kann. Das darauffolgende Erhitzen der Proben über 80°C bewirkt die Abdissoziation der Primer. Dieser Vorgang wiederholt sich pro qRT-PCR 30-40 Mal. Prinzip der Messmethode ist dabei die Detektion der Fluoreszenzzunahme in jedem Replikationszyklus mittels der interkalierenden Substanz SybrGreen. SybrGreen fluoresziert in gelöstem Zustand nur sehr wenig, an Doppelstrang-DNA gebunden jedoch stark. Trägt man die Ergebnisse der Fluoreszenzzunahme in einem halb logarithmisch skalierten Diagramm auf, kann dieses im mittleren Bereich einer linearen Funktion angenähert werden. Wie in Abschnitt 4.4.5 erläutert, kann aus diesen Daten auf die Menge an initial in den Proben vorhandenem, spezifischem mRNA-Replikat relativ zu einem konstitutiv exprimierten Housekeeper rückgeschlossen werden.

Im Rahmen der Experimente zur östrogenmodulierten Expressionsregulation der ATGL sollte mittels qRT-PCR der Einfluss der Applikation von PPT/DPN auf die zelluläre Menge an ATGL-mRNA untersucht werden. Es wurden zunächst vorgegangen wie in den Abschnitten 4.1.5 bis 4.1.7 dargelegt. 24 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen lysiert, die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und schließlich quantitativ mittels qRT-PCR bestimmt. (s. Abschnitte 4.4.1 bis 4.4.5)

4.4.1 Gewinnung der Proben

Bis zum Zeitpunkt der Zellyse erfolgte die Versuchsdurchführung analog zu den Luciferaseversuchen. 24 Stunden nach der Stimulation mit PPT, DPN oder Ethanol wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und 900µl 4°C kaltes PBS in jedes Well der 6-Well-Platten gegeben. Mit einem Zellkratzer wurde der Zellfilm gründlich vom Boden jedes Wells gelöst, mittels einer 1000µl Pipette in ein zuvor beschriftetes Eppendorfhütchen überfüllt und bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Bei 4°C und 13000 rpm wurden die Proben für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Während des Zentrifugationsvorganges wurden pro Probe 353,5µl Lysepuffer aus dem NucleoSpin® RNA II Kit (Fa. Machery Nagel) vorbereitet.

Nach der Zentrifugation wurde unter dem Abzug der Lysepuffer aufpipettiert. Die Proben wurden durch gründliches Vortexen 1,5 Minuten im Lysepuffer suspendiert. Im Anschluss erfolgte bei sofortiger mRNA-Präparation die Lagerung der Proben auf Eis oder für die Präparation zu einem späteren Zeitpunkt im -20°C-Eisfach.

4.4.2 Präparation der mRNA

Vor der mRNA-Präparation erfolgten eine sorgfältige Säuberung und Desinfektion des Laborarbeitsplatzes und aller verwendeten Geräte und Hilfsmittel. Während der Präparation wurden mehrmals die Handschuhe gewechselt.

Die Präparation erfolgte gemäß dem NucleoSpin[®] RNA II Protokoll der Firma Machery Nagel.⁸⁷ Die Proben wurden nach der Präparation sofort auf Eis gelagert und nach quantitativer photometrischer Bestimmung ihrer Reinheit und des mRNA-Gehaltes entweder direkt in cDNA umgeschrieben oder bei -80°C eingefroren.

4.4.3 Synthese der cDNA

Die im vorangegangenen Arbeitsschritt isolierte mRNA wurde 1:1 in cDNA umgeschrieben, um ihre Quantifikation mittels qRT-PCR zu ermöglichen.

Neben den bei -80°C gelagerten Proben wurden für die cDNA Synthese aus dem -20°C-Eisfach eine Reverse Transkriptase mit zugehörigem Puffer (M-MLV RT 5x Puffer), Random Primers, dNTP's und Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor genutzt.

Die Proben, M-MLV RT 5x Puffer, Random Primers und dNTP's wurden auf Eis aufgetaut und die beiden Enzyme kurz vor Gebrauch aus dem Eisfach entnommen. Der Thermoblock wurde auf 70°C vorgeheizt und alle zu verwendenden Geräte und Arbeitswerkzeuge sowie der Arbeitsplatz sorgfältig gesäubert und desinfiziert. Das Pipettieren aller Teilschritte erfolgte auf Eis.

Eppendorfhütchen für jede cDNA Probe und drei Negativkontrollen ohne Reverse-Transkriptase wurden vorbereitet.

Aus den photometrisch bestimmten Probenkonzentrationen wurde ein 1µg DNA entsprechendes Volumen berechnet und in ein beschriftetes Eppendorfhütchen pipettiert. Das jeweilige Probenvolumen wurde mit Ultra Pure Water (UPW) aufgefüllt. Anschließend wurden Random Primer zugegeben. Bei 70°C wurden die Proben im Thermoblock 5 Minuten lang inkubiert um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurden zwei Mastermixe erstellt, die 5x M-MLV Reaktionspuffer, dNTP's, Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor und entweder M-MLV-RT oder UPW für die Negativkontrollen enthielten.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben sofort wieder auf Eis gelagert und der Thermoblock auf 37°C gekühlt. Zu jeder Probe wurden Mastermix pipettiert (s. **Abbildung 20**) und es erfolgte eine 60-minütige Inkubation im Thermoblock bei 37°C.

| | Mastermix pro Probe |
|--------------------------|---------------------|
| 5x M-MLV Reaktionspuffer | • 10 µl |
| dNTP's | • 1 µl |
| RNasin | • 0,25 µl |
| M-MLV-RT | • 0,25 µl |
| Finalvolumen | Final: 11,5 µl |

Abbildung 20: Mastermix für die cDNA-Synthese

Die Konzentration der Proben betrug nach der cDNA-Synthese 20ng/µl. Da die üblicherweise für die Realtime-PCR pro Well eingesetzte DNA-Menge 10-20ng beträgt, wurden mit UPW 10-fach Verdünnungen aller Proben vorbereitet, deren Konzentration entsprechend bei 2ng/µl lag. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte im -20°C-Eisfach.

4.4.4 Durchführung der Real-time-PCR

Die cDNA-Proben wurden aus dem -20°C-Eisfach entnommen und auf Eis aufgetaut.

Pro zu bestimmendem Gen erfolgte jeweils eine dreifache Bestimmung jeder Probe, drei Proben ohne Forward- und Reverse-Primer als Negativkontrolle und einer H2O-Kontrolle (s. **Abbildung 21**).

| |
|---|
| <p>Beispielhafte Berechnung für 12 Proben: 12 x 3 Wells Proben 3 x 3 Wells RT- 1x 3 Wells H2O-Kontrolle (NoTemplateControl) = 48 Wells</p> |
|---|

| |
|--|
| <p>12,5 µl Power Mix (SybrGreenMix) 0,25 µl Forward-Primer (20 µM) 0,25 µl Reverse-Primer (20 µM) 7 µl H₂O</p> |
|--|

Abbildung 21: Berechnung der benötigten Wells

Abbildung 22: Zusammensetzung des Mastermixes

Der Mastermix wurde gemäß **Abbildung 21** für das jeweilige Gen hergestellt. Das Auftauen des House, bzw. Power Mixes sowie der Primer, die Lagerung der Taq-Polmerase außerhalb des -20°C-Kühlfaches sowie die Herstellung der Mastermixe und alle folgenden Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Die Lagerung der Taq-Polymerase erfolgte in kleinen Volumina und jedes Aliquot wurde maximal dreimal aufgetaut, um Funktionseinbußen des Enzyms zu minimieren. In jedes Well wurden nun Mastermix und ein 20ng DNA entsprechendes Probenvolumen, bzw. H₂O pipettiert.

Abschließend wurde die Platte mit einer hitzebeständigen Real-time-PCR-Folie abgedichtet und bei 4000 rpm und 4°C 3 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Platte in die PCR-Maschine eingesetzt und das Programm Mx3000P gestartet. Unter „New Experiment Options“ wurde ein für das genutzte Primerpaar und die Taq-Polymerase passendes thermales Profil eingestellt. (s. Abbildung 23) Im Plate-Setup wurden die genutzten Wells markiert, SYBR und ROX als zu messende Fluoreszenzfarbstoffe und ROX als Bezugswert („Reference dye“) angewählt. Die H₂O-Wells wurden angewählt und als NoTemplateControls (NTCs) gekennzeichnet.

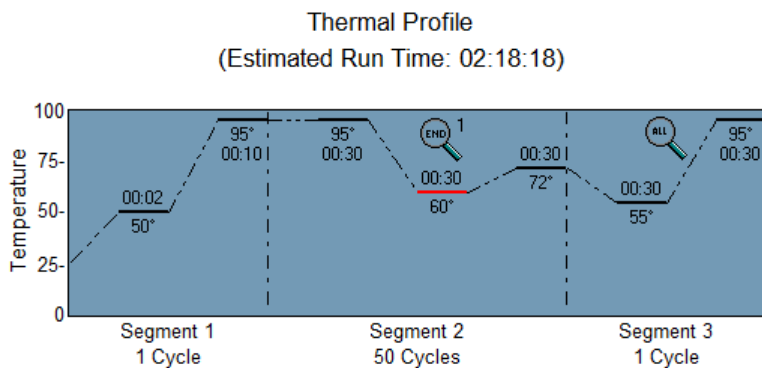


Abbildung 23: Thermisches Profil für die Messung mit Power-Mix

4.4.5 Auswertung der Real-Time-PCR

Die Auswertung der Real-Time-PCR erfolgte zunächst im Programm Mx3000Pro und nach Export der Daten in Microsoft Excel 2003, bzw. für die statistische Analyse mittels TWO-WAY-ANOVA und Bonferroni-Post-Test in Graph Pad Prism (s. Abschnitt 4.6).

Einzelheiten zur Auswertung der Real-Time-PCR und eine kritische Reflexion der Methode und Ergebnisse finden sich in Abschnitt 6.1.3.

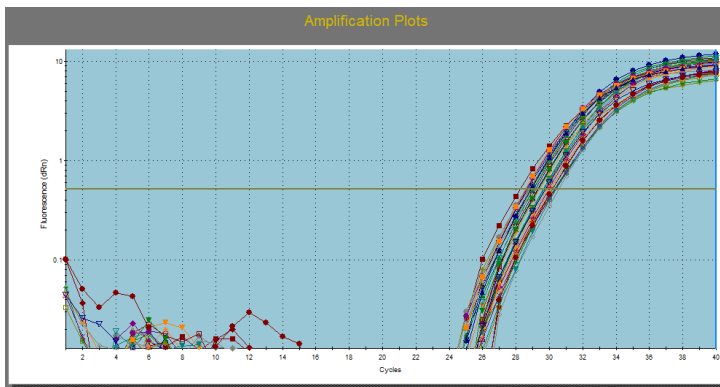


Abbildung 24: Halblogarithmische Auftragung der Amplifikationskurven. Aufgetragen ist die Fluoreszenz (Ordinate) in Abhängigkeit von der Anzahl abgelaufener Amplifikationszyklen (Abszisse)

Die Dissoziationskurven wurden geprüft, um die Spezifität der Primer sowie deren Interaktionsfähigkeit mit der Taq-Polymerase und damit die Verwertbarkeit und Validität der Messergebnisse einschätzen zu können. Versuche, bei denen breite, unsaubere Schmelzkurven zu sehen oder mehrere Schmelzpunkte vorhanden waren, wurden verworfen (s. Abbildung 25). Ebenfalls verworfen wurden Versuche, bei denen zwar saubere Schmelzpunktcurven, aber Schmelztemperaturen vorlagen, die auf unspezifische Wechselwirkungen der Primer im Sinne einer Primerdimerisierung hindeuteten. Abbildung 26 zeigt eine Schmelzkurve, die keinen Anlass gab, den Versuch zu verwerfen.

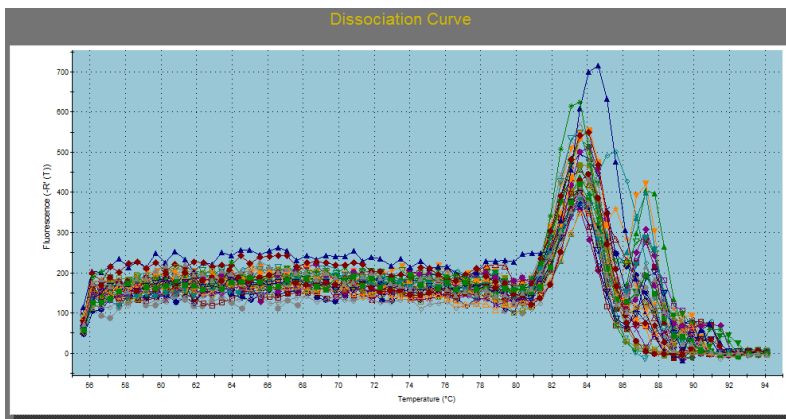


Abbildung 25: Unsaubere Schmelzkurve aus der ersten ATGL-Messung mit ungeeignetem Primerpaar
 Aufgetragen ist die Fluoreszenz (Ordinate) in Abhängigkeit von der Temperatur (Abszisse)

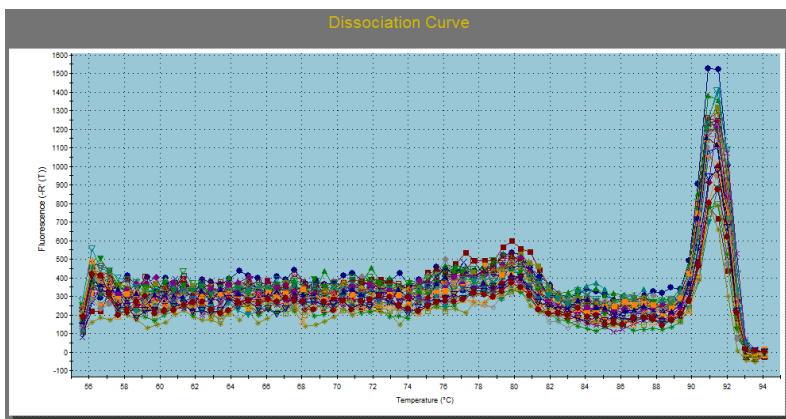


Abbildung 26: Saubere Schmelzkurve der ATGL-Messung der selben Proben wie in Abbildung 24 bei Nutzung geeigneter Primer
 Aufgetragen ist die Fluoreszenz (Ordinate) in Abhängigkeit von der Temperatur (Abszisse)

Zudem wurde überprüft, ob auch in den NTCs eine Amplifikation zu beobachten war. War dies der Fall, wurden die Schmelzkurve und der Ct-Wert der NTCs überprüft, um einschätzen zu können, ob die Bindung der Primer unspezifisch erfolgte und die Messergebnisse damit ebenfalls zu verwerfen waren.

Gab es keinen Anlass, die Messwerte anzuzweifeln, wurde ein Punkt im linearen Bereich der Amplifikationskurve als Fluoreszenzschwellenwert ausgewählt. Der sogenannte Ct-Wert bezeichnet den Wert der Anzahl an abgelaufenen Amplifikationszyklen zu dem Zeitpunkt, an dem das Fluoreszenzsignal diesen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Der Ct-Wert der Proben erlaubt Rückschlüsse auf die Menge an Ausgangs-cDNA und damit letztendlich die Menge an initial in der Probe vorhandenen spezifischen mRNA. Ein Vergleich der Ct-Werte der Proben untereinander ermöglicht so relative Aussagen über die synthetisierte Menge des mRNA-Transkriptes des Zielgens in den unterschiedlichen experimentellen Ansätzen. Zur Normalisierung der Messwerte wurden zusätzlich zum Zielgen zwei sog. House-Keeping-Gene als Bezugsparameter gemessen. Die Bestimmung mehrerer Gene (hier 18S und β -Actin) und deren Vergleich erfolgte, um auszuschließen, dass die beobachteten Messeffekte durch eine Induktion oder Hemmung des gewählten House-Keeping-Gens verursacht wurden.⁸⁸

4.5 Western-Blot-Versuche

Der Western-Blot dient dem semiquantitativen Nachweis spezifischer Proteine in einer Probe. Prinzip der Methode ist die Auftrennung des im Ansatz enthaltenen Gesamtproteins mittels Gelelektrophorese, der Transfer der Proteine auf eine Membran und der abschließende Nachweis der Zielproteine mittels spezifischer Antikörper. .

4.5.1 Gewinnung der Proben

Bis zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Stimulation erfolgte die Versuchsdurchführung wie in den Abschnitten 4.1.5 bis 4.1.7 beschrieben.

Zum geplanten Lysezeitpunkt wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS erfolgte die Ablösung und Lyse der adhären Zellen mittels Zellkratzer und „Radioimmunoprecipitation assay buffer“ (RIPA-Puffer).

Um eine für den Western Blot ausreichend konzentrierte Proteidlösung zu erhalten, wurden jeweils drei identisch behandelte Wells zu einer Probe zusammengefasst und zusammen in 2ml Eppendorfhütchen überfüllt. Um eine gründliche Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurden die Proben im Sonifikator (Bandelin Sono Plus) bei 50% Power jeweils 30 Sekunden lang sonifiziert. Die Spitze des Sonifikators wurde nach jedem Zyklus mit 70% Ethanol gereinigt, um eine Verunreinigung der Proben untereinander zu verhindern.

Im Anschluss wurden die Proben 30 Minuten lang bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde verworfen, der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorfhütchen überfüllt und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.5.2 Messung der Probenkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Bicinchoninsäure (BCA). Prinzip dieser Methode ist zunächst die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch dessen Chelatbildung mit Proteinen in alkalischer Umgebung. Dieser, auch als Biuret-Reaktion bekannte Prozess, führt zur Bildung hellblauer Komplexe. Zweiter Schritt der Detektionsreaktionen ist die Chelation zweier Moleküle BCA mit dem im ersten Teilschritt entstandenen einwertigen Kupferion. Bei 562nm ist die Lichtabsorption des löslichen BCA/Kupfer-Komplex linear von dessen Konzentration abhängig. Die Detektion durch das BCA-Reagenz ist etwa 100-mal sensitiver als die Biuret-Reaktion.⁸⁹

Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden zunächst, je nach Probenmenge, „Prot Assay B“ (4% Kupfersulfat) und „BCA Prot Assay A“ (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA und Natrimtartrat in 0,1M Natronlauge) miteinander suspendiert.

Auf einer 96-Well-Platte erfolgte das Pipettieren einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen mit Rinderserum (BSA) Standart-Reagenz (2mg/ml in 0.9% NaCl und 0.05% Natriumcarbonat) zwecks Eichung der zu messenden Probenkonzentrationen (s. Abbildung 27).

| | | | | | | | | | | | | |
|---|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|----|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 0.544 | 0.443 | 0.322 | 0.206 | 0.139 | 0.104 | 0.086 | 0.07 | | | 0.083 | 0.089 |
| B | 0.567 | 0.452 | 0.342 | 0.212 | 0.144 | 0.105 | 0.087 | 0.072 | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.312 | 0.307 | 0.313 | | | | | | | | | |
| E | 0.362 | 0.361 | 0.335 | | | | | | | | | |
| F | 0.351 | 0.359 | 0.342 | | | | | | | | | |
| G | 0.345 | 0.332 | 0.321 | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | mean | mean-L | | | | | | | |
| L | 0.07 | 0.072 | 0.071 | | | | | | | | | |
| | 0.0625 | 0.086 | 0.087 | 0.087 | 0.016 | | | 0.0625 | 0.016 | | | |
| | 0.125 | 0.104 | 0.105 | 0.105 | 0.034 | | | 0.125 | 0.034 | | | |
| | 0.25 | 0.139 | 0.144 | 0.142 | 0.071 | | | 0.25 | 0.071 | | | |
| | 0.5 | 0.206 | 0.212 | 0.209 | 0.138 | | | 0.5 | 0.138 | | | |
| | 1 | 0.322 | 0.342 | 0.332 | 0.261 | | | 1 | 0.261 | | | |
| | 1.5 | 0.443 | 0.452 | 0.448 | 0.377 | | | 1.5 | 0.377 | | | |
| | 2 | 0.544 | 0.567 | 0.556 | 0.485 | | | 2 | 0.485 | | | |

Abbildung 27: Pipettierschema einer 96-Well-Platte zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Methode Orange: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichkurve, Blau: Proben in Dreifachbestimmung, Lila: H_2O

5 μl einer willkürlich ausgewählten Probe aus 4.5.1 wurden auf 100 μl des BCA-Mixes gegeben, um zu testen, ob die zu erwartenden Konzentrationen der Proben mit den Konzentrationen der Eichreihe vergleichbar waren. Färbte sich das Test-Well spontan tiefblau, wurde 10-fach verdünnt, färbte es sich hingegen nur leicht an und glich einem der Wells innerhalb der Standartreihe, wurde die Ursprungskonzentration beibehalten.

Nun erfolgte das Pipettieren der Proben. Anschließend wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie überklebt und 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit Hilfe des Programmes „Microplate Manager“ die Absorption der Proben spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen.

Anschließend wurde eine Eichgerade erstellt und mittels der durch lineare Regression erhaltenen Steigung m der Gleichung $y=m*x+b$ (wobei $b=0$, da es sich nach Herausrechnen des Leerwertes um eine Ursprungsgerade handelt) die Konzentrationen der Proben berechnet.

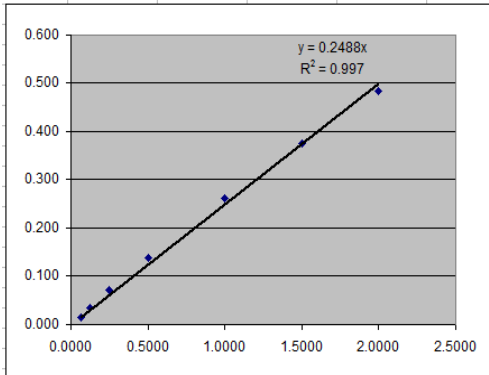


Abbildung 28: Eichgerade

Aufgetragen ist die Absorption (Ordinate) in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration (mg/ml)

4.5.3 Herstellung der Gele

Die zuvor mit 70% Ethanol gereinigten Glasplatten zur Gelherstellung wurden zusammen mit den für sie vorgesehenen Haltevorrichtungen in Plexiglasständer eingespannt.

Trenngel (Mengenangaben für ein Gel à 10ml):

Sammelgel (Mengenangaben für ein Gel à 20ml):

| | 5% | 10% | 15% |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| 1,5 M Trenngelpuffer | 2.5ml | 2.5ml | 2.5ml |
| 10% SDS | 100µl | 100µl | 100µl |
| Acrylamid Bis 30% | 1.66ml | 3.3ml | 4.95ml |
| 10% APS | 50µl | 50µl | 50µl |
| TMED | 5µl | 5µl | 5µl |
| H2O | 5.69ml | 4.05ml | 2.4ml |

| | |
|------------------------------|-------|
| 0,5 M Sammelgelpuffer | 2.5ml |
| 10% SDS | 100µl |
| Acrylamid Bis 30% | 1.3ml |
| 10% APS | 100µl |
| TMED | 12µl |
| H2O | 6.1ml |

Abbildung 29: Rezepte für Trenn- und Sammelgel

Trenngel und Sammelgel wurden bis auf Tetramethylethylendiamin (TEMED) nach Rezept (s. Abbildung 29) in Falkons pipettiert. Im folgenden Schritt wurde das die Polymerisation auslösende TEMED zum Trenngel pipettiert, dieses zwischen die Glasplatten gegossen und anschließend Isopropanol aufpipettiert. Nach etwa 45 Minuten wurde das Isopropanol vom ausgehärteten Gel abgekippt und dessen Oberfläche mit destilliertem Wasser gespült. Die Restflüssigkeit zwischen den Platten wurde, ohne die Gele zu berühren, mittels eines saugfähigen Tuches entfernt. TEMED wurden zu dem vorbereiteten Sammelgel zugegeben und

dieses mit Hilfe einer Pipette luftblasenfrei auf das Trenngel pipettiert. Je nach Probenanzahl wurde ein Plastikkamm zur Formung von 6, 12 oder 24 Taschen in das Sammelgel eingebracht. Nach 45 Minuten war die vollständige Polymerisation des Sammelgels erfolgt. Über Nacht wurde das Gel in ein mit Aqua dest. befeuchtetes Tuch gewickelt, mit Alufolie eingeschlagen, beschriftet und bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um eine Austrocknung zu verhindern.

4.5.4 Blotten der Proteine

4.5.4.1 Vorbereitung der Proben

Zunächst wurden die isolierten Proteine (s. Abschnitt 4.5.1) in den am Vortag hergestellten Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde ein 38.5µg entsprechendes Volumen Protein mit 8µl 6xProbenpuffer und einer entsprechenden Menge RIPA-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 48µl gebracht (s. Tabelle 1).

| Probe Nr. | Ad | Treatment | Mean Protein | Conc (Prot.) | 38.5µg | ad 48µl Ripa | 6x PP 6µl |
|-----------|------|-----------|--------------|--------------|--------|--------------|-----------|
| 1 | PSG5 | Veh | 0.311 | 0.924 | 41.7 | 0.3 | 6 |
| 2 | ERa | Veh | 0.353 | 1.086 | 35.4 | 6.6 | 6 |
| 3 | PSG5 | PPT | 0.351 | 1.078 | 35.7 | 6.3 | 6 |
| 4 | Era | PPT | 0.333 | 1.009 | 38.2 | 3.8 | 6 |

Tabelle 1: Exemplarische Darstellung der zu pipettierenden Volumina

Die Proben wurden gevortext, anschließend 1 Minute lang zentrifugiert, 5 Minuten lang bei 95°C und 300 rpm im Thermomixer erhitzt und abschließend erneut 1 Minute zentrifugiert.

4.5.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung

Nach Einspannen der am Vortag gegossenen Gele in die Halterungsvorrichtung der Elektrophoresekammer wurden vorsichtig die der Formung der Taschen dienenden Kämmen aus dem Gel gezogen und der Raum zwischen den Platten der Kammer mit 10fach verdünntem Elektrophoresepuffer befüllt. Jeweils 48µl Probe wurden in jede Tasche pipettiert. Die erste und letzte Tasche wurden jeweils mit Ladder gefüllt. Die Elektroden wurden an die Kammer angeschlossen und zunächst für 20 Minuten eine Spannung von 120 Volt, danach bis zur vollständigen Auftrennung eine Spannung von 150 Volt angelegt.

4.5.4.3 Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran

Die zuvor zugeschnittenen Membranen wurden zunächst 1 Minute lang in Methanol aktiviert. Die Gele aus Abschnitt 4.5.4.2 wurden der Kammer entnommen, die oberen rechten Ecken als Markierung mittels eines Plastikspatels abgetrennt und in Towbin Puffer vorsichtig von der Glasplatte abgelöst. Es wurden in der Reihenfolge von unten nach oben geschichtet:

Untersatzplatte, schwarzes Metallnetz (spätere Anode), 3x Filter, Gel mit aufgetrennten Proteinproben auf der nach oben gerichteten Seite, 3x Filter, weißes Metallnetz (spätere Kathode). Alle Komponenten wurden in die dafür vorgesehene Klemme eingespannt und in die Western Blot Kammer eingesetzt. Diese wurde mit Towbin-Puffer gefüllt und mittels eines Eis-Elementes gekühlt.

Die Elektroden wurden an die Kammer angeschlossen und die Proteine mittels angelegter Spannung von 100V innerhalb einer Stunde von den Gelen auf die Membranen transferiert.

4.5.4.4 Ansetzen des Blocking-Puffers und Blocken der Membran

Pro Membran wurden 3,5g Milchpulver 40 Minuten lang auf dem Magnetmixer homogen in 50ml TBST suspendiert (7% Milchpulverlösung). Um unspezifische Wechselwirkungen des ersten Antikörpers mit den Proteinen auf den Membranen zu verhindern wurden diese eine Stunde lang bei Raumtemperatur in mit der Milchpulversuspension gefüllten, abgedeckten Sarstedt-Tupfern inkubiert (sog. „Blocking“).

4.5.4.5 Aufbringen des ersten Antikörpers

Aus dem -20°C-Kühlfach wurden zunächst der ER α -Antikörper und der ATGL-Antikörper entnommen und jeweils in einem Falcon mit 5%-TBST-Milchpulver-Suspension verdünnt (Gesamtverdünnung 1:50000 für ER α und 1:25000 für ATGL). Die Membranen wurden mit der proteinbeladenen Seite nach innen gerichtet in die Falkons eingebracht diese über Nacht bei 4°C auf der Rollmaschine bewegt.

4.5.4.6 Waschen der Membran und Aufbringen des zweiten Antikörpers

Am nächsten Morgen erfolgte zunächst das Waschen der Membranen vom Vortag. Diese wurde mit einer Pinzette aus dem Falcon entnommen und in TBST auf dem Schüttler insgesamt 2 mal 5 Minuten und 2 mal 10 Minuten in jeweils frischem TBST gewaschen.

Zunächst wurden nun Falkons wegen der Lichtempfindlichkeit des zweiten Antikörpers mit Aluminium umschlagen und anschließend, analog zum Vorgehen in Abschnitt 4.5.4.5, anti-Fc-Maus-Antikörper auf die Membranen aufgebracht. Die Falkons wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur geschüttelt.

4.5.4.7 Zweiter Waschschritt und Vorbereitungen der Arbeiten in der Dunkelkammer

Analog zum Vorgehen in Abschnitt 4.5.4.5 wurden die Membranen in einem mit Alufolie umschlagenen, überdeckelten Plastikästchen gewaschen.

Jeweils 1ml der „Detection Reagenzien 1 + 2“ wurden in ein gemeinsames Tuppergefäß gefüllt und die Membranen für 30 Sekunden darin aktiviert. Anschließend wurden die Membranen abgetropft und luftblasenfrei zwischen den Innenfolien jeweils einer Foto-Cassette positioniert.

4.5.4.8 Arbeiten in der Dunkelkammer und Entwicklung des Films

Der durch lichtundurchlässige Aluminiumfolie und eine Fotobox geschützte Fotofilm wurde dem 4°C-Kühlschrank entnommen, in der Dunkelkammer passend zugeschnitten, in die Fotokassetten eingelegt und je nach Antikörper zwischen 10 und 600s belichtet. Der Fotofilm wurde anschließend mittels des in der Dunkelkammer befindlichen Entwicklergerätes belichtet. Im Anschluss wurde der belichtete Film nochmals auf die Membranen gelegt und zur Orientierung der Ladder eingezeichnet.

4.5.4.9 Stripping der Membranen

Die Entfernung des Antikörpers von den Membranen mittels „Stripping Buffer“ ermöglicht das Aufbringen anderer Antikörper und damit das Sichtbarmachen weiterer in der ursprünglichen Probe vorhandener Proteine. Prinzipiell wäre dies auch ohne Stripping der Membran möglich, bei ähnlichen Molekulargewichten der nachzuweisenden Proteine wären jedoch durch Überlagerung der von Antikörpern markierten Bereiche keine klaren Banden mehr zu erkennen. Zur Entfernung des Antikörpers wurden die Membranen zunächst mit Stripping-Buffer 10 Minuten lang bei 200 rpm geschüttelt und anschließend zwei mal 5 Minuten und zwei mal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Im Anschluss wurden die in den Abschnitten 4.5.4.5 bis 4.5.4.9 beschriebenen Schritte erneut für GAPDH als Housekeeping-Gen durchgeführt.

4.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Graph Pad Prism 5.

Alle Experimente wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen mit einem n von jeweils ≥ 3 durchgeführt. Die Prüfung der Messergebnisse auf statistische Signifikanz erfolgte beim Vergleich von mehr als zwei Behandlungsgruppen mittels TWO-WAY-ANOVA und anschließendem Bonferroni Post-Test, bei Vergleich zweier Behandlungsgruppen mittels ungepaartem t-Test. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ angenommen. Die angegebenen Daten sind grafisch als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der ATGL-Expression auf Promotorebene (Luciferasemessung)

5.1.1 Vorversuche mit Östrogen Responsiven Elementen (EREs)

Um zu prüfen, ob selektive ER α -, bzw. ER β -Agonisten in diesem experimentellen in-vitro-Setup ER-abhängige Genexpression stimulieren, wurden zunächst Kontrollmessungen mit einem etablierten Estrogen-Responsive-Element-Luciferase-Konstrukt (ERE-Luc) in 3T3L1-Zellen durchgeführt (s. Abbildung 30). Zusätzlich zu ERE-Luc wurde entweder ein ER α - oder ein ER β -Konstrukt transfiziert. Die Messungen wurden in 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 durchgeführt. Es zeigte sich für die Überexpression sowohl von ER α als auch von ER β ein signifikanter Anstieg der Promotoraktivität unter der Stimulation mit PPT (Faktor 2,0), bzw. DPN (Faktor 1,8) (s. Abbildung 30), der die Funktionsfähigkeit beider Agonisten belegt.

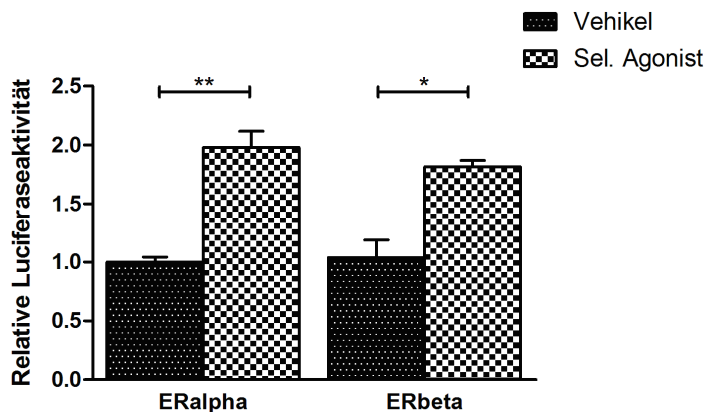


Abbildung 30: Luciferaseaktivität in ERE-Luc/ER-überexprimierten Zellen

Die Luciferase-Aktivität ERE-Luc/ER-kotransfizierter Zellen steigt unter der Stimulation mit dem jeweiligen selektiven ER-Rezeptoragonisten

** p<0,01 vs. Vehikel; * p<0,05 vs. Vehikel, Untersuchung in 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3

5.1.2 Ergebnisse der ER-Überexpressionsversuche

Um die Abhängigkeit der ATGL-Luc-Promotoraktivität von der Östrogenrezeptor-Überexpression und der Stimulation mit jeweils selektiven Liganden zu untersuchen, wurden Messungen unterschiedlicher Versuchsansätze durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 31 dargestellt sind.

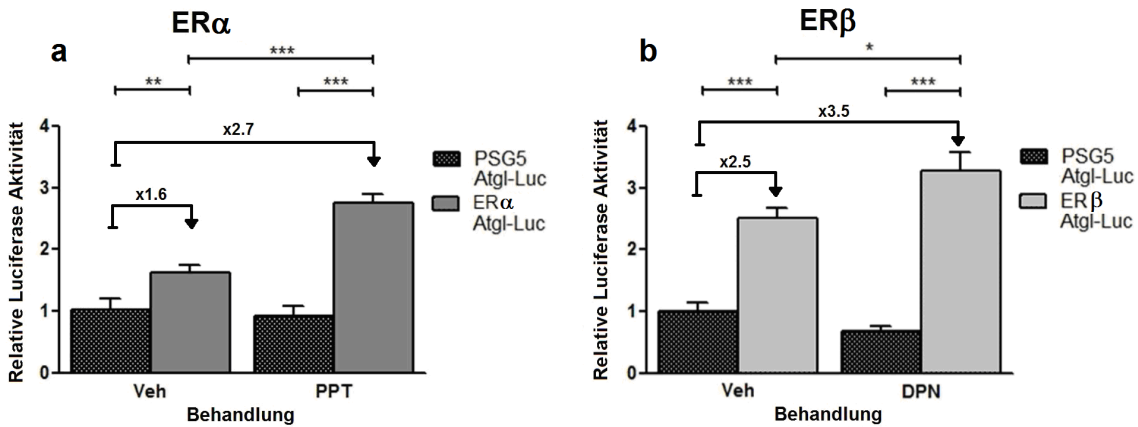


Abbildung 31: Relative Luciferase Aktivität (verglichen mit PSG5/ATGL-Luc_{Vehikel})

Die Überexpression von sowohl ER α als auch ER β steigerte in beiden Behandlungsgruppen die gemessene Luciferaseaktivität. Die Behandlung mit selektivem Agonisten steigerte die Luciferaseaktivität der ER-überexprimierten Proben

*** $p < 0,001$ vs. Vehikel; ** $p < 0,01$ vs. Vehikel, * $p < 0,05$ vs. Vehikel; Untersuchung in 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens $n=3$

5.1.2.1 Überexpression von ER α

In den Proben ohne Luciferasekonstrukt (ER α /pGL2) wurde erwartungsgemäß nur eine geringe, unspezifische Lumineszenz nachgewiesen. Sie betrug 5-7% der der basalen Aktivität des ATGL-Luc-Konstruktes, die durch Versuchsansätze mit PSG5/ATGL-Luc unter Vehikel- und PPT-Stimulation bestimmt wurde.

Abbildung 31a zeigt die Luciferaseaktivität in ATGL-Luc-transfizierten Zellen unter Vehikel-, bzw. PPT-Stimulation jeweils für Kontrollen und ER α -überexprimierte Zellen. Es ergab sich für beide Behandlungsgruppen ein signifikanter Anstieg der Lumineszenz durch Überexpression von ER α und zudem durch PPT-Stimulation gegenüber Vehikel-Stimulation in ER α überexprimierten Zellen.

| | + PSG5 | + ER α | Signifikanz |
|--------------------|--------|---------------|-------------|
| Veh | 1 | 1.6 | ** |
| PPT | 0.9 | 2.7 | *** |
| Signifikanz | ns | *** | |

Tabelle 2: Relative Promotoraktivität und Signifikanz überexpressionsabhängiger (horizontal) und stimulationsabhängiger Effekte (vertikal) unter Überexpression des ATGL-Luciferase-Konstrukts

Tabelle 2 zeigt die Signifikanzen der ligandenunabhängigen, ER α -überexpressionsabhängigen Luciferaseaktivitätsunterschiede zwischen den Konstruktgruppen jeweils für Vehikel- und PPT-Stimulation. Weiterhin dargestellt sind die Signifikanzen der ligandenabhängigen Luciferaseaktivitätsunterschiede für die genannten Konstruktombinationen. Die Ergebnisse des Bonferroni Posttests sind in Abbildung 31a als Signifikanzbalken aufgetragen.

Folgende Beobachtungen zur ER α -Versuchsreihe sind hervorzuheben:

- 1) Die Überexpression von ER α bewirkte **ligandenunabhängig einen signifikanten Anstieg der ATGL-Luc-Promotoraktivität** gegenüber der jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$). Unter Vehikelstimulation war durch ER-Überexpression ein Anstieg der Promotoraktivität um den Faktor 1,6, unter PPT-Stimulation ein Anstieg um den Faktor 2,7 gegenüber PSG5/Veh zu beobachten (s. Abbildung 31a).
- 2) ER α /ATGL-Luc-transfizierte Zellen zeigten **unter PPT-Stimulation** eine um den Faktor 1,7 **signifikant höhere Promotoraktivität** als unter Vehikel-Stimulation ($p < 0,05$)
- 3) Der mit **Faktor 2,7 größte beobachtete Anstieg der ATGL-Luc-Promotoraktivität** gegenüber der Basalaktivität des Luciferase-Promotor-Konstruktes (PSG5/ATGL-Luc Veh) wurde in ER α -überexprimierten Zellen unter PPT-Stimulation registriert.

5.1.2.2 Überexpression vor ER β

Analog zu den in Abschnitt 5.1.2.1 für ER α gezeigten Daten wurde der Einfluss der Überexpression und der selektiven Aktivierung von ER β auf die ATGL-Expression untersucht und in Abbildung 31b dargestellt.

In den Proben ohne Luciferasekonstrukt (ER β /pGL2) wurde erwartungsgemäß nur eine geringe, unspezifische Lumineszenz nachgewiesen. Sie betrug 15% der der basalen Aktivität des ATGL-Luc-Konstruktes, die durch Versuchsansätze mit PSG5/ATGL-Luc unter Vehikel- und DPN-Stimulation bestimmt wurde.

Abbildung 31b zeigt die Luciferaseaktivität in ATGL-Luc-transfizierten Zellen unter Vehikel-, bzw. DPN-Stimulation jeweils für Kontrollen und ER β -überexprimierte Zellen. In beiden Behandlungsgruppen wurde ein signifikanter Anstieg der Lumineszenz durch Überexpression von ER β beobachtet. Weiterhin wurde, analog zur in Abschnitt 5.1.2.1 beschriebenen ER α -Versuchsreihe, ein signifikanter Lumineszenzanstieg durch DPN Stimulation gegenüber Vehikel-Stimulation in ER β -überexprimierten Zellen beobachtet.

| | + PSG5 | + ERβ | Signifikanz |
|--------------------|---------------|-------------------------------|--------------------|
| Veh | 1 | 2.5 | *** |
| PPT | 0.68 | 3.3 | *** |
| Signifikanz | ns | * | |

Tabelle 3: Relative Promotoraktivität und Signifikanz überexpressionsabhängiger (horizontal) und stimulationsabhängiger Effekte (vertikal) unter Überexpression des ATGL-Luciferase-Konstrukts

Tabelle 3 zeigt die Signifikanzen der ligandenunabhängigen, ER β -überexpressionsabhängigen Luciferaseaktivitätsunterschiede zwischen den Konstruktgruppen jeweils für Vehikel- und DPN-Stimulation. Weiterhin dargestellt sind die Signifikanzen der ligandenabhängigen

Luciferaseaktivitätsunterschiede für die genannten Konstruktkombinationen. Die Ergebnisse des Bonferroni Posttests sind in Abbildung 31b als Signifikanzbalken dargestellt.

Folgende Beobachtungen für die ER β -Versuchsreihe sind festzuhalten:

- 1) **Ligandenunabhängig zeigte sich eine signifikante Steigerung der ATGL-Luc-Promotoraktivität** gegenüber der jeweiligen Kontrolle (s. Abbildung 31b). Unter Vehikelstimulation war in ER β -überexprimierten Zellen ein Anstieg der Promotoraktivität um den Faktor 2,5, unter DPN-Stimulation ein Anstieg um den Faktor 3,3 gegenüber PSG5/Veh zu beobachten (s. Abbildung 31b).
- 2) In ER β /ATGL-Luc transfizierten, **DPN-stimulierten Zellen** wurde ein **signifikanter Anstieg der Promotoraktivität** um den Faktor 1,3 gegenüber ER β /ATGL-Luc-transfizierten, Vehikel-stimulierten Zellen beobachtet.
- 3) Der mit **Faktor 3,3 größte beobachtete Anstieg der ATGL-Luc-Promotoraktivität** gegenüber der Basalaktivität des Luciferase-Promotor-Konstruktes (PSG5/ATGL-Luc Veh) wurde in ER β -überexprimierten Zellen unter DPN-Stimulation beobachtet.

5.1.3 Zusammenfassung und Vergleich von ER α und ER β

Sowohl für die Überexpression von ER α als auch von ER β ließ sich stimulationsunabhängig eine signifikant höhere Promotoraktivität zeigen als in Kontrollzellen (s. Tabelle 4). Ebenfalls für beide Rezeptoren nachweisbar war in ER-überexprimierten Zellen ein Anstieg der Promotoraktivität unter Stimulation mit selektivem Agonisten gegenüber Vehikelbehandlung (s. Tabelle 5).

| | ER α | ER β |
|--|-------------|------------|
| Steigerung der Promotoraktivität bei Überexpression des jeweiligen Rezeptors und Vehikelstimulation (<i>relativ zu PSG5/Veh</i>) | 1,6 | 2,5 |
| Steigerung der Promotoraktivität bei Überexpression des jeweiligen Rezeptors und Stimulation mit selektivem Agonisten (PPT/DPN) (<i>relativ zu PSG5/Veh</i>) | 2,7 | 3,3 |

Tabelle 4: ER-Überexpressionsabhängiger Anstieg der Luciferaseaktivität

| | ER α | ER β |
|---|-------------|------------|
| Steigerung der Promotoraktivität durch Agonistenstimulation in ER-überexprimierten Zellen (<i>relativ zu ER/Veh</i>) | 1,7 | 1,3 |

Tabelle 5 Ligandenabhängiger Anstieg der Luciferaseaktivität in ER-überexprimierten Zellen

5.2 Promotoranalyse

5.2.1 Screening auf mögliche Östrogen Responsive Elemente

Die Analyse der putativen Promotorregion vor dem PNPLA2-Gen wurde sowohl in murinen als auch im humanen Genom durchgeführt. Untersucht wurden jeweils die Sequenzen zwischen dem Ende des vorrausgehenden Gens bis zum ersten Exon des PNPLA2-Gens (s. Abbildung 15 und Abbildung 16, Abschnitt 4.3).

Für die 3846bp umfassende murine Sequenz konnten 7 mögliche Bindungsmotive für ER β (ESR2, s. Abbildung 18) und ein mögliches Bindungsmotiv für ER α (ESR1, s. Abbildung 17) identifiziert werden.

| Model ID | Model name | Score | Relative score | Start | End | Strand | predicted site sequence |
|----------|------------|--------|-------------------|-------|------|--------|-------------------------|
| MA0258.1 | ESR2 | 11.067 | 0.83627302306186 | 932 | 949 | -1 | CCAGCTCAGTAGGACCTC |
| MA0112.2 | ESR1 | 13.190 | 0.814071216431325 | 1437 | 1456 | 1 | GTTCGAGGTCAGCCTGGTCT |
| MA0258.1 | ESR2 | 11.874 | 0.847810795255178 | 1440 | 1457 | 1 | CGAGGTCAGCCTGGTCTA |
| MA0258.1 | ESR2 | 11.372 | 0.840633643283622 | 1441 | 1458 | -1 | GTAGACCAGGCTGACCTC |
| MA0258.1 | ESR2 | 10.635 | 0.830096669173987 | 2244 | 2261 | 1 | ATGGGACATTGTGACTTT |
| MA0258.1 | ESR2 | 11.360 | 0.840462077897848 | 2245 | 2262 | -1 | TAAAGTCACAATGCCCA |
| MA0258.1 | ESR2 | 10.259 | 0.824720953753061 | 3051 | 3068 | -1 | CAGTGTCTTTTGCCAG |
| MA0258.1 | ESR2 | 10.818 | 0.832713041307044 | 3168 | 3185 | -1 | CTGGGTAATGTACCCTC |

Abbildung 32: Putative ER-Bindungselemente im murinen ATGL-Promotor

Das durch den roten Kasten markierte ER-Sequenzmotiv befindet sich innerhalb eines phylogenetisch hochkonservierten Bereiches

Die entsprechende humane Sequenz beinhaltet, wie in Abbildung 33 gezeigt, bei einer Sequenzlänge von 6025bp 6 mögliche ER β -Bindungsmotive und keine für ER α .

| Model ID | Model name | Score | Relative score | Start | End | Strand | predicted site sequence |
|----------|------------|--------|-------------------|-------|------|--------|-------------------------|
| MA0258.1 | ESR2 | 9.266 | 0.810523918080243 | 1865 | 1882 | 1 | TCGGCTCACTGCAACCTC |
| MA0258.1 | ESR2 | 9.266 | 0.810523918080243 | 2145 | 2162 | 1 | TCGGCTCACTGCAACCTC |
| MA0258.1 | ESR2 | 13.213 | 0.866954632884486 | 3264 | 3281 | -1 | CTGGGTCAGGCTGTTTTG |
| MA0258.1 | ESR2 | 9.736 | 0.8172435623564 | 4978 | 4995 | -1 | GAGAGTCACTGAACCCG |
| MA0258.1 | ESR2 | 9.710 | 0.81687183735389 | 5166 | 5183 | 1 | ATGGGCCACTGTGCCCGG |
| MA0258.1 | ESR2 | 9.531 | 0.814312653682757 | 5242 | 5259 | 1 | TCAGCTCACTGCAACCTC |

Abbildung 33: Putative ER-Bindungselemente im humanen ATGL-Promotor

Das durch den roten Kasten markierte ER-Sequenzmotiv befindet sich innerhalb eines phylogenetisch hochkonservierten Bereiches

Analog zur Analyse der vermuteten murinen und humanen Promotorregionen wurden die Sequenzen des jeweils ersten Introns analysiert. Im 1789bp umfassenden ersten murinen Intron konnten zwei ESR2- und ein ESR1-Motiv identifiziert werden.

Im ersten humanen Intron befanden sich bei einer Sequenzlänge von 1722 bp 7 ESR2-Motive und ein ESR1-Motiv .

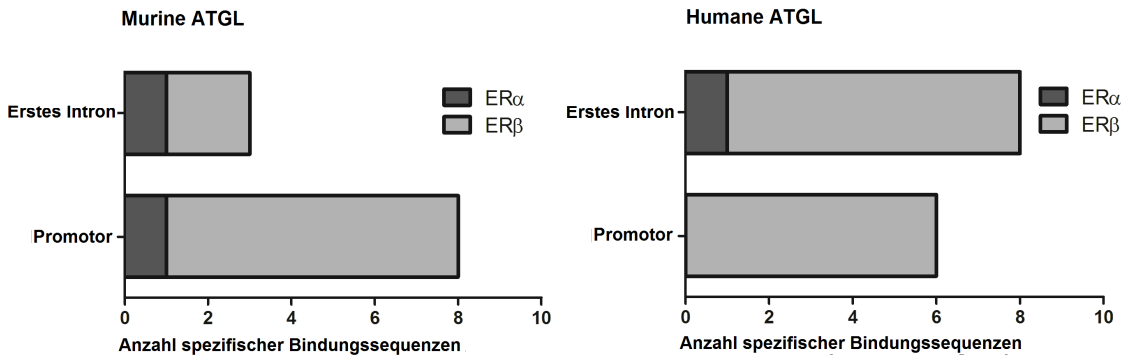


Abbildung 34: Ergebnisse der bioinformatischen Promotoranalyse und der Analyse des ersten Introns
 Es zeigt sich sowohl für die putative Promotorregion, als auch das erste Intron des PNPLA2-Gens in beiden Spezies ein deutliches Überwiegen ER β -responsiver Elemente gegenüber ER α -responsiven Elementen

Abbildung 34 fasst jeweils die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der Promotor- sowie Intron-Sequenz für den murinen und den humanen Organismus zusammen. Beide Spezies zeigen ein deutliches Überwiegen ER β - gegenüber ER α -spezifischen Elementen mit einer Verhältnis ERE β /ERE α von 11:2, bzw. 14:1.

5.2.2 Vergleich der murinen und humanen Sequenzen

Um Indizien für eine mögliche physiologische Relevanz der putativen ER-Bindungs-elemente in vivo zu sammeln, wurde für die betreffende DNA-Sequenz zusätzlich zur Suche nach passenden Struktur-motiven ein Sequenz-vergleichendes Alignment durchgeführt. Regionen ab 50bp, die eine Übereinstimmung >70% aufwiesen, wurden als phylogenetisch hochkonservierte Regionen identifiziert und auf ihren Gehalt an EREs geprüft.

5.2.2.1 Promotorregionen

Der in im Kontext der kompletten Promotorsequenz selektiv dargestellte Bereich umfasst den Abschnitt zwischen den Basenpaaren 822 und 957 der murinen Sequenz und den Basenpaaren 3179 bis 3324 der humanen Sequenz (s. schwarze Kästen). Bei Abgleich mit den zuvor ermittelten Lagen der Sequenz-motive ließen sich die in jeweils in Abbildung 32 und Abbildung 33. rot hervorgehobenen Motive in dieser hochkonservierten Region lokalisieren.

Sequenzalignment des putativen murinen und humanen Promotorsegments



Abbildung 35: Untersuchung der humanen und murinen Promotorsequenzen auf das Vorliegen phylogenetisch hochkonservierte Bereiche

5.2.2.2 Erstes Intron

Das jeweils erste murine und humane Intron umfassen 1789, bzw. 1722 Basenpaare und sind im Vergleich zur Promotorregion wesentlich stärker konserviert. In weiten Bereichen ergeben sich Übereinstimmungen von über 50%. Zwei Bereiche mit einer Übereinstimmung von c.a 72%, bzw. 74% konnten identifiziert werden, die sich über 95, bzw. 222 Basen erstrecken (s. Abbildung 36). Eine Lagekorrelation der mittels JASPAR identifizierten murinen und humanen Sequenzmotive für ER α oder ER β konnte allerdings nicht gefunden werden. (s. und Abbildung 36).

Sequenzalignment des jeweils ersten murinen und humanen Introns

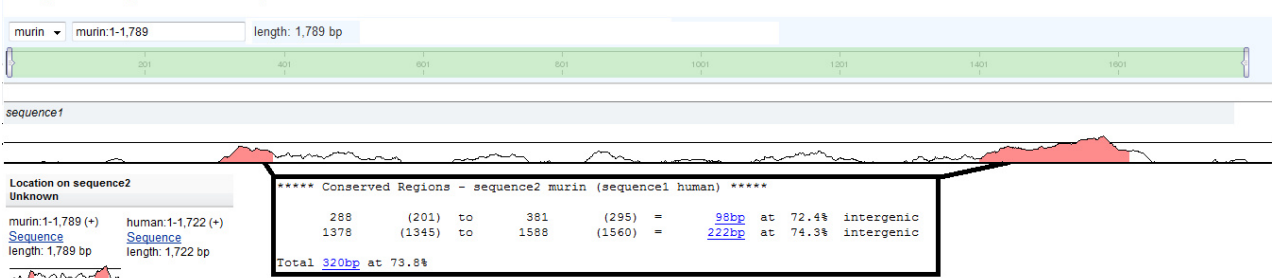


Abbildung 36: Untersuchung des jeweils ersten humanen und murinen Introns auf das Vorliegen phylogenetisch hochkonservierte Bereiche

5.3 Analyse der ATGL-Regulation auf mRNA-Ebene (qRT-PCR)

Um den Einfluss der Überexpression von ER α , bzw. ER β sowie der Stimulation mit jeweils selektivem Agonisten auf die ATGL-mRNA-Menge zu untersuchen, wurden gemäß Abschnitt 4.4 quantitative Real Time PCR- Messungen durchgeführt.

Zusätzlich wurde in denselben Probenansätzen die Menge an HSL-mRNA bestimmt (s. Abschnitt 1.2.4.2)

5.3.1 Messungen der ATGL-mRNA-Menge

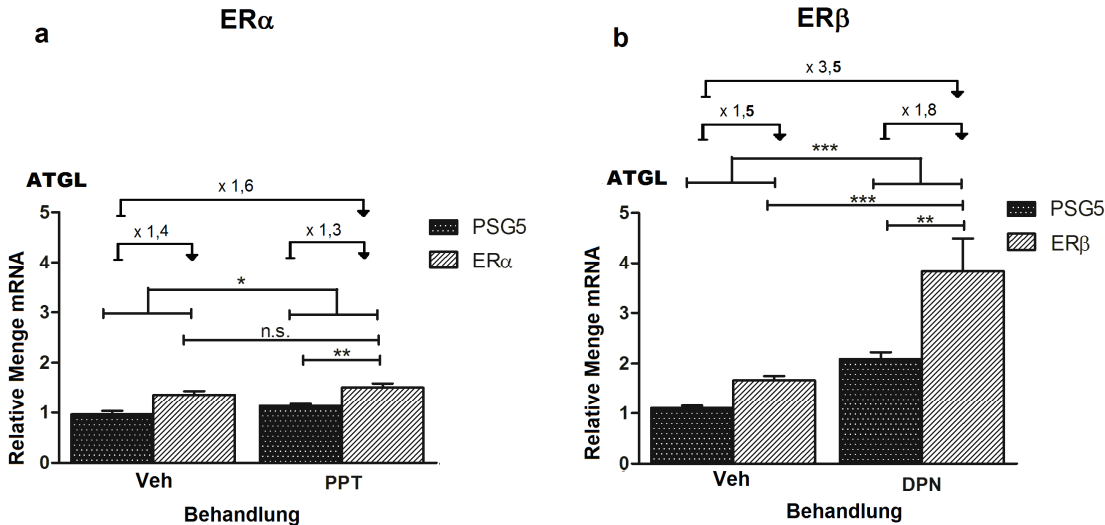


Abbildung 37: Anstieg der ATGL-mRNA-Menge für ER α /ER β , bzw. PSG5-transfizierte Zellen unter Vehikel- vs. Stimulation mit sel. Agonisten

Die Überexpression von sowohl ER α als auch ER β steigerte in beiden Behandlungsgruppen die gemessene Luciferaseaktivität. Die Behandlung mit selektivem Agonisten steigerte die Luciferaseaktivität der ER-überexprimierten Proben. *** p<0,001 vs. Vehikel; ** p<0,01 vs. Vehikel, * p<0,05 vs. Vehikel; Untersuchung in 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens n=3

5.3.1.1 ER α -Versuchsreihe

ER α -überexprimierte Zellen enthielten in beiden Behandlungsgruppen (Vehikel und PPT) zum Zeitpunkt der Lyse um den Faktor 1,4 (Vehikel-behandelte Zellen), bzw. 1,3 (PPT-behandelte Zellen) signifikant höhere Mengen ATGL-mRNA als Zellen, die anstatt von ER α mit PSG5 transfiziert worden waren (s. Abbildung 37a). Die Beobachtung dieses ligandenunabhängigen, ER-überexpressionsabhängigen Effekts ist kongruent mit den in 1.1.1 dargestellten Ergebnissen der Promotoraktivitätsanalyse.

Ein Anstieg der ATGL-mRNA-Menge unter PPT-Stimulation gegenüber der jeweiligen Vehikel-Stimulation belief sich auf den Faktor 1,2 in PSG5- und 1,1 in ER α -transfizierten Zellen und war im Gruppenvergleich mittels TWO-WAY-ANOVA statistisch signifikant (p<0,05) (s. Abbildung 37a, Tabelle 6).

| Source of Variation | P value summary | Significant? |
|---------------------|-----------------|--------------|
| Interaction | ns | No |
| Treatment | * | Yes |
| Plasmid transfected | *** | Yes |

Tabelle 6: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER α -Versuchsreihe

Folgende Beobachtungen sind festzuhalten:

- 1) Unter **ER α -Überexpression** stieg die ATGL-mRNA-Menge ligandenunabhängig signifikant um den **Faktor 1,4 für Vehikel-**, bzw. **1,3 für PPT-**Stimulation, an.
- 2) Stimulation mit **PPT** bewirkte in PSG5 und ER α -überexprimierten Zellen gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle einen signifikanten Anstieg der ATGL-mRNA-Menge um den **Faktor 1,2, bzw. 1,1**.
- 3) Bei **Überexpression und gleichzeitiger Simulation** wurde mit dem Faktor **1,6 die größte Zunahme** der mRNA-Menge gegenüber dem Basalwert (PSG5/Vehikel) beobachtet.

5.3.1.2 ER β -Versuchsreihe

Unter der Überexpression von ER β konnte ein signifikanter Anstieg der ATGL-mRNA um den Faktor 1,5 (Vehikel-Stimulation), bzw. 1,8 (DPN-Stimulation) gegenüber den jeweiligen PSG5-Kontrollen beobachtet werden. (s. Abbildung 37b) Zudem wurde unter DPN-Stimulation der Vehikelkontrolle gegenüber ein signifikanter Anstieg der ATGL-mRNA um den Faktor 1,9 für PSG5-, bzw. 2,3 für ER β -transfizierte Zellen beobachtet. (s. Abbildung 37b)

In PSG5-transfizierten Kontrollzellen konnte unter DPN-Stimulation ein signifikanter Anstieg der ATGL-mRNA-Menge um den Faktor 1,9 beobachtet (T-Test $p < 0,001$). PPT Stimulation hingegen bewirkte keine signifikante Steigerung der ATGL-mRNA-Menge.

| Source of Variation | P value summary | Significant? |
|----------------------------|-----------------|--------------|
| Interaction | ns | No |
| Plasmid Transfected | *** | Yes |
| Treatment | *** | Yes |

Tabelle 7: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER β -Versuchsreihe

Wie für entsprechende ER α -Versuche zeigte sich auch für die ER β -Versuchsreihe keine signifikante Interaktion zwischen transfiziertem Plasmid und Behandlung (s. Tabelle 7).

Folgende Beobachtungen sind für die mRNA-Messungen der ER β -Versuchsreihe festzuhalten:

- 1) Unter **ER β -Überexpression** stieg die ATGL-mRNA-Menge ligandenunabhängig signifikant um den **Faktor 1,5 bis 1,8** für Vehikel-, bzw. DPN-Stimulation, an.

- 2) Stimulation mit **DPN** bewirkte in PSG5 und ER β -überexprimierenden Zellen gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle einen signifikanten Anstieg der ATGL-mRNA-Menge um den **Faktor 1,9, bzw. 2,3**.
- 3) Bei **Überexpression und gleichzeitiger Simulation** wurde mit dem Faktor **3,5 die größte Zunahme** der mRNA-Menge gegenüber dem Basalwert (PSG5/Vehikel) beobachtet.

5.3.1.3 Vergleich zwischen ER α und ER β

Sowohl für ER α - als auch für ER β -Überexpression zeigte sich ein stimulationsunabhängiger Anstieg der mRNA-Menge gegenüber der den jeweiligen Kontrollen.

Ebenfalls für beide Östrogenrezeptoren steigerte die Stimulation mit jeweils selektivem Agonisten signifikant die ATGL-mRNA Menge. Während sich der Anstieg für ER α auf einen Faktor von 1,2 für PSG5-transfizierte, bzw. 1,1 für rezeptorüberexprimierte Zellen beschränkte, zeigte sich ein Anstieg um den Faktor 2,3 für ER β überexprimierte Zellen und 1,9 für PSG5-transfizierte Zellen.

Sowohl für die Überexpression als auch unter der Stimulation mit selektivem Agonisten wurden relativ zur PSG5/Vehikel-Kontrolle für ER β größere Effekte beobachtet als für ER α .

Die maximale Steigerung der mRNA-Menge gegenüber der PSG5/Veh Kontrollgruppe lag für ER α bei Faktor 1,6 (ER α /PPT), für ER β bei einem Faktor von 3,5 (ER β /DPN). (s. Tabelle 8)

| | ER α - Versuchsreihe | | ER β - Versuchsreihe | |
|--|--------------------------------|-------------|-------------------------------|------------|
| | Vehikel | PPT | Vehikel | DPN |
| Anstieg der mRNA-Menge bei Überexpression des jeweiligen Rezeptors bezogen auf die jeweilige PSG5-Kontrolle | 1,3 | 1,3 | 1,5 | 1,8 |
| | PSG5 | ER α | PSG5 | ER β |
| Anstieg der mRNA-Menge bei Stimulation mit jeweils selektivem Agonisten bezogen auf die jeweilige Vehikel-Kontrolle | 1,2 | 1,1 | 1,9 | 2,3 |
| Maximaler beobachteter Effekt (PSG5/Veh vs. ER/sel.Agonist) | 1,6 | | 3,5 | |

Tabelle 8: Anstieg der ATGL-mRNA-Menge

5.3.2 Messungen der HSL-mRNA-Menge

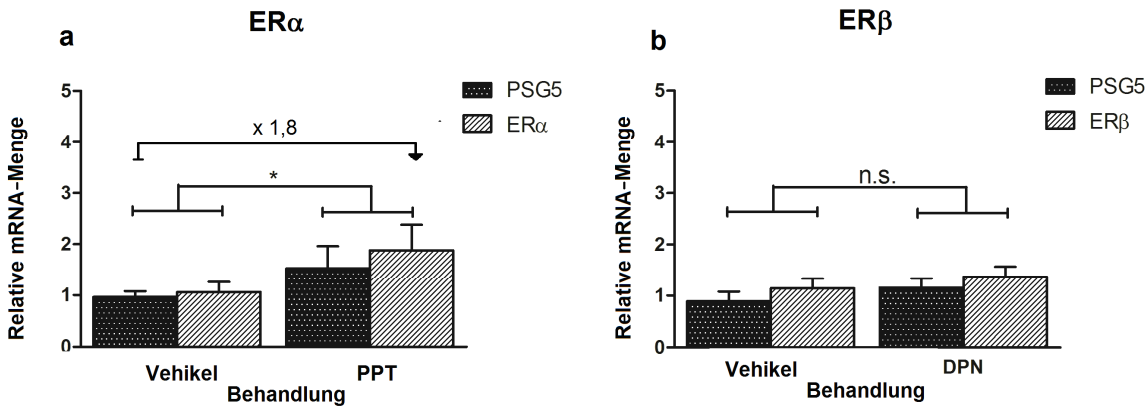


Abbildung 38: Anstieg der HSL-mRNA-Menge für ER, bzw. PSG5-transfizierte Zellen unter Vehikel- vs. PPT/DPN-Stimulation

Die gemessene HSL-mRNA-Menge stieg im Gruppenvergleich mit vehikelstimulierten Zellen unter der Stimulation mit PPT in Kontrollzellen und ER α überexprimierten Zellen signifikant an (a). Für entsprechende ER β Versuche (b) zeigte sich kein signifikanter Anstieg der HSL-mRNA-Menge.

* $p < 0,05$ vs. Vehikel, Untersuchung in 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens $n=3$

5.3.2.1 ER α -Versuchsreihe

| Source of Variation | P value summary | Significant? |
|---------------------|-----------------|--------------|
| Interaction | Ns | No |
| Treatment | Ns | No |
| Plasmid transfected | * | Yes |

Tabelle 9: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER α -Versuchsreihe

ER α -überexprimierte Zellen enthielten in beiden Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt der Lyse keine signifikant höhere Menge HSL-mRNA als Kontrollzellen. In den entsprechenden Proben der ER β -Versuchsreihe wurden unter Überexpression ebenfalls keine signifikant höheren HSL-mRNA Mengen gemessen (s. Abbildung 38a, Tabelle 9).

Ein Anstieg der ATGL-mRNA-Menge unter PPT-Stimulation gegenüber der jeweiligen Vehikel-Stimulation belief sich auf den Faktor 1,6 in PSG5- und 1,8 in ER α -transfizierten Zellen und ist im Gruppenvergleich mittels TWO-WAY-ANOVA statistisch signifikant ($p < 0,05$).

5.3.2.2 ER β -Versuchsreihe

| Source of Variation | P value summary | Significant? |
|---------------------|-----------------|--------------|
| Interaction | Ns | No |
| Plasmid Transfected | Ns | No |
| Treatment | Ns | No |

Tabelle 10: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER β -Versuchsreihe

Weder für die Rezeptorüberexpression, noch für die Stimulation mit DPN konnten signifikante Effekte auf die Menge an HSL-mRNA gezeigt werden (s. Abbildung 38b, Tabelle 10).

5.3.2.3 Vergleichende Betrachtung

| | ER α -Versuchsreihe | | ER β -Versuchsreihe | |
|---|----------------------------|-------------|---------------------------|------------|
| | Vehikel | PPT | Vehikel | DPN |
| Anstieg der mRNA-Menge bei Überexpression des jeweiligen Rezeptors bezogen auf die jeweilige PSG5-Kontrolle | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,2 |
| | PSG5 | ER α | PSG5 | ER β |
| Steigerung der Promotoraktivität bei Stimulation mit selektivem Agonisten bez. auf die jeweilige Vehikel-Kontrolle | 1,6 | 1,8 | 1,3 | 1,2 |

Tabelle 11: Anstieg der HSL-mRNA-Menge

Die Datenauswertung rot eingefärbter Versuchsansätze zeigte keine statistische Signifikanz

Folgende Beobachtungen sind festzuhalten:

- 1) Für die Stimulation mit selektivem Agonisten zeigte sich in der **ER α** -Versuchsreihe im Gruppenvergleich ein signifikanter **Anstieg der HSL-mRNA-Menge um den Faktor 1,7**, wohingegen kein signifikanter überexpressionsabhängiger Effekt beobachtet wurde.
- 2) **Weder die Überexpression, noch die selektive Stimulation von ER β** bewirkte einen signifikanten Anstieg der HSL-mRNA-Menge.

5.4 Analyse der ATGL-Regulation auf Proteinebene (Western Blot)

Mittels Western Blot wurde der Einfluss der Überexpression von ER α /ER β und der Stimulation mit dem jeweiligen Agonisten auf die letztendlich vorhandene ATGL-Proteinmenge untersucht. Zudem wurden ER α und ER β nachgewiesen, um das Transfektionsergebnis sowie den endogenen Rezeptorgehalt beurteilen zu können.

Analog zu den mRNA-Versuchen (s. Abschnitt 5.3) wurden für die Proteinbestimmung vier Probenansätze gewählt:

- 1) PSG5-transfizierte Zellen unter Vehikelstimulation
- 2) ER α /ER β -transfizierte Zellen unter Vehikelstimulation
- 3) PSG-transfizierte Zellen unter PPT/DPN-Stimulation
- 4) ER α /ER β -transfizierte Zellen unter PPT/DPN-Stimulation

Die WB-Membranen wurden gemäß Abschnitt 4.5 hergestellt. Anschließend erfolgte mittels spezifischer Antikörper zunächst der Nachweis von ER α /ER β , bzw. der ATGL. Im Anschluss wurden die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper mittels Stripping-Buffer von den Membranen entfernt und es erfolgte der Nachweis von GAPDH als in allen Proben konstitutiv (nahezu) gleichstark exprimierter Bezugsparameter.

5.4.1 ER α

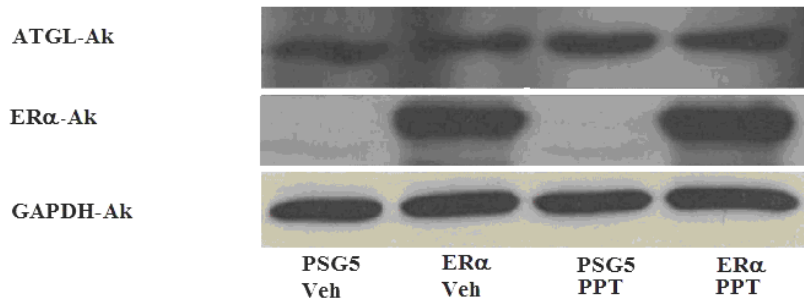


Abbildung 39: Repräsentativer Western Blot für ER α -Überexpressionsversuche

Die GAPDH Proteinexpression diente als Kontrollen für die Güte der Auftrennung der Fraktionen sowie als Ladekontrolle, die ER α -Proteinexpression als Kontrolle des Transfektionserfolges und der Quantifizierung des endogenen Rezeptorbesatzes, die Darstellung erfolgte exemplarisch für jeweils 3 voneinander unabhängige Versuchsansätze dargestellt

Abbildung 39 zeigt die Antikörperbanden von ATGL, ER α und GAPDH.

Folgende Beobachtungen ergaben sich:

- 1) Die Banden für GAPDH als Housekeeper waren erwartungsgemäß alle etwa gleich stark ausgeprägt.
- 2) Für ER α waren in PSG5-transfizierten Zellen keine Banden und für Rezeptor überexprimierte Zellen stark ausgeprägte Banden erkennbar. Diese Beobachtungen korrelierten mit den Ergebnissen der mRNA-Messungen. Sie bestätigten eine gegenüber dem endogenen Rezeptorgehalt der 3T3L1-Zellen in überexprimierten Zellen stark erhöhte Menge an ER α .
- 3) Für die ATGL ließen sich keine offensichtlichen Differenzen in Größe oder Intensität der Banden zwischen den Proben erkennen.

5.4.2 ER β

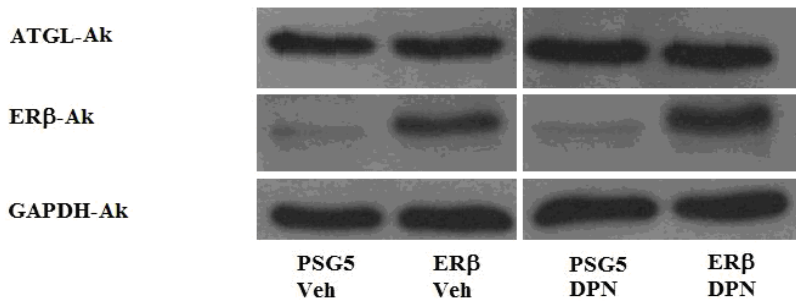


Abbildung 40: Repräsentativer Western Blot für ER β -Überexpressionsversuche

Repräsentativer Bolt für PSG5-/ER β -transfizierte Zellen jeweils unter Vehikel-, bzw. DPN-Stimulation: die GAPDH Proteinexpression diente als Kontrollen für die Güte der Auftrennung der Fraktionen sowie als Ladekontrolle, die ER β -Proteinexpression als Kontrolle des Transfektionserfolges und der Quantifizierung des endogenen Rezeptorbesatzes, die Darstellung erfolgte exemplarisch für n=3 voneinander unabhängige Versuchsansätze

Abbildung 40 zeigt die Proteinbanden von ATGL, ER β und GAPDH.

Folgende Beobachtungen ergaben sich:

- 1) Die Banden für GAPDH als Housekeeper waren erwartungsgemäß alle etwa gleich stark ausgeprägt
- 2) Für ER β waren in PSG5-transfizierten Zellen schwache Banden und für ER β -überexprimierte Zellen stark ausgeprägte Banden erkennbar. Diese Beobachtungen waren kongruent mit den Ergebnissen der mRNA-Messungen. Sie bestätigten eine gegenüber dem endogenen Rezeptorgehalt stark erhöhte Menge an ER β in überexprimierten Zellen bei geringer, aber detektierbarer Expression des endogenen ER β in 3T3L1 Präadipozyten.
- 3) Zwischen Bande 1 (PSG5/Veh) und Bande 2 (ER β /Veh) ließen sich keine Unterschiede in Intensität und Dicke der Banden erkennen. Bande 3 (PSG5/DPN) und Bande 4 (ER β /DPN) schienen ebenfalls vergleichbar. Betrachtete man jedoch die Banden der Vehikel-behandelten Proben (Banden 1+2) im Vergleich mit denen der DPN-behandelten Proben (Banden 3+4), erschienen letztere dicker und intensiver.

6 Diskussion

Im Folgenden findet zunächst eine kritische Reflexion der genutzten experimentellen Methoden im Hinblick auf die Fragestellung statt. Anschließend werden die gewonnenen Daten und Ergebnisse diskutiert, bewertet und in den Kontext aktueller Publikationen eingeordnet.

6.1 Kritische Diskussion der Methoden

6.1.1 Luciferasemessung

Die Luciferasemessung ist eine sehr sensitive Methode, um den Einfluss der Applikation spezifischer Substanzen (i.e. der selektiven Östrogenrezeptoragonisten PPT, bzw. DPN) auf die Promotoraktivität von Genen zu untersuchen.

Die Normalisierung der für das Konstrukt gemessenen Lumineszenz erfolgt mittels einer zusätzlich zum Luciferasekonstrukt transfizierten Firefly-Renilla, die (unabhängig von der Substanzapplikation) konstitutiv exprimiert wird. Die Kotransfektion von Renilla schafft damit einen Bezugsparameter für die Messergebnisse des spezifischen Promotor-Luciferase-Konstruktes und gewährleistet so eine Vergleichbarkeit der Versuche untereinander sowie gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Weiterhin kann die Expression der Renilla als Surrogatparameter sowohl für die Transfektionseffizienz als auch das Maß an Proteinbiosynthese und damit die Vitalität der Zellen gesehen werden.⁸⁴

Das untersuchte Luciferasekonstrukt liegt zirkulär und nicht in nativer Konfiguration vor. In vivo besitzt die DNA in „inaktiver“ Form eine dicht gepackte Chromatinstruktur und liegt auch in „aktiver“, entpackter Form gegebenenfalls als dreidimensionale Struktur vor. Unter diesen Bedingungen sind potentielle ER- und Kofaktorbindungsstellen unterschiedlich gut für Transkriptionsfaktoren und damit die RNA-Polymerase zugänglich und gegebenenfalls nur unter bestimmten zellulären Aktivierungszuständen relevant.⁹⁰ Auf dem zirkulären Promotorkonstrukt binden Transkriptionsfaktoren möglicherweise auch Sequenzmotive, die unter nativen Bedingungen gegebenenfalls nicht, schwach oder nur bei Interaktion mehrerer Transkriptionsfaktoren (beispielsweise in sog. cis-regulatorischen Elementen) relevant sind.^{90,91}

Die Luciferase-Messung ermöglicht entsprechend Aussagen über das Bindungsverhalten des Promotors als unmodifiziertes, zirkuläres Plasmid außerhalb seiner natürlichen „DNA-Umgebung“, es können jedoch keine Angaben über die Auswirkung und die quantitative Relevanz der beobachteten Effekte in bestimmten Zelltypen, Zelldifferenzierungsstadien und auf makroskopischer Ebene in Organen und Gewebetypen gemacht werden.

Diese Einschränkung schafft zwar einerseits artifizielle Versuchsbedingungen, die die Aussagekraft des Luciferase-Assays bezüglich in-vivo-Bedingungen einschränken, gewährleistet

aber auch weitgehende Unabhängigkeit von zellulären Störfaktoren, wie dem DNA-Methylierungs/Acetylierungs-Status, der wesentlich vom Differenzierungsstand der Zelle beeinflusst wird.^{92,93}

Neben dem DNA-Abschnitt unmittelbar upstream ist für die Expressionregulation vieler Gene ihr erstes Intron von Bedeutung.⁹⁴⁻⁹⁶ Zudem können auch vom eigentlichen Gen sehr weit entfernte Genabschnitte von möglicher Relevanz für die Transkriptionsinitiation sein.⁹⁶ Diese Aspekte machen deutlich, dass der gemessene Anstieg der Luciferaseaktivität des Promotorkonstruktes ein unvollständiges Bild bietet, was die Transkriptionsregulation durch Agonistenstimulation unter nativen Bedingungen angeht. Lediglich qualitativ wird beobachtet, dass der zirkuläre 3000bp-Promotor des murinen ATGL-Gens durch beide selektiven Agonisten positiv reguliert ist.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die Luciferasemessung eine adäquate Methode ist, genregulatorische Effekte durch Substanzapplikation nachzuweisen. Da sie aber die Aktivität eines nicht im Genom der Zelle lokalisierten, zirkulären und unmodifizierten Plasmides misst und mögliche transkriptionsregulatorisch aktive Bereiche des Genoms nicht berücksichtigt, gibt sie nur Indizien für eine Bedeutung der ERs bei der Expressionsregulation der ATGL in vivo. Nachdem ER-vermittelte Effekte auf die Promotoraktivität nachgewiesen wurden, sind deshalb Anschlussexperimente notwendig, in denen der Promotor in seiner nativen, genomischen Umgebung vorliegt.

| | Vorteile | Nachteile |
|---|---|---|
| Allgemeines | Hohe Sensitivität für mögliche regulatorische Einflüsse durch Substanzapplikation | Geringe Spezifität bezüglich der Relevanz der beobachteten Effekte in vivo |
| Messverfahren und Normalisierung | Zuverlässige Lumineszenzmessung, gute Normalisierung und damit Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse | |
| Abhängigkeit von Störfaktoren | Weitgehende Unabhängigkeit von zelltyp- und differenzierungsstandsabhängigem DNA-Methylierungsstatus | Artifizielle Versuchsbedingungen, keine Aussage über Relevanz der Effekte in unterschiedlichen Zellen/Geweben/Differenzierungsstadien und metabolischen Aktivierungszuständen |
| Weitere Aspekte | | Neben dem gewählten Promotorabschnitt Existenz weiterer expressionsregulatorisch aktiver Regionen, die nicht berücksichtigt werden |

Tabelle 12: Charakteristika der Luciferasemessung

6.1.2 Bioinformatische Promotoranalyse

Die bioinformatische Promotoranalyse vermag potentielle ER-Bindungsstellen zuverlässig zu identifizieren. Ihre Sensitivität und Spezifität können reguliert werden, indem die verlangte Übereinstimmung mit bislang als ERE identifizierten Sequenzmotiven vor der Analyse festgelegt wird.

In der Promotoranalyse werden Sequenzen identifiziert, die ihrer Basenabfolge nach mögliche Bindungsstellen für ERs darstellen. Der Promotor liegt, wie bereits in Abschnitt 6.1.1 beschrieben, aber in vivo nicht linear, sondern dreidimensional und in in Abhängigkeit vom zellulären Differenzierungsstand und der Stoffwechselsituation in unterschiedlichen Konfigurationen vor. Entsprechend ist die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren innerhalb des Promotors heterogen und variiert mit dem metabolischen Status der Zelle. So kann lediglich das Vorhandensein möglicher Bindungsmotive detektiert werden, während deren Relevanz unter nativen Bedingungen nicht abschätzbar ist.⁹⁷⁻¹⁰⁰

Weiterhin binden Östrogenrezeptoren, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, die DNA nicht zwangsläufig selber, sondern fungieren auch als Coaktivatoren/Corepressoren für andere Transkriptionsfaktoren, wie AP1 und PPAR γ .^{49,73,78} Die alleinige Analyse des vermuteten Promotorsegments auf EREs ergibt also ein unvollständiges Bild, was die (positiven, aber auch möglicherweise negativen) regulatorischen Effekte der ERs angeht.

Ohne den Kontext experimenteller Methoden besitzt die bioinformatische Promotoranalyse folglich wenig Aussagekraft. Hier vermag sie jedoch die Ergebnisse der durchgeführten Luciferase-, qRT-PCR- und Western Blot- Versuche zu ergänzen und zu untermauern.

| | Vorteile | Nachteile |
|------------------------|--|---|
| Allgemeines | Hohe Sensitivität für mögliche Östrogenrezeptorbindungsstellen | Geringe Spezifität für funktionelle Relevanz von Bindungsstellen |
| Weitere Aspekte | Ergebnisse nicht nur für einen bestimmten Zelltyp gültig | Keine Berücksichtigung möglicher Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren |

Tabelle 13: Charakteristika der bioinformatischen Promotoranalyse

6.1.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real Time PCR ist eine Methode mit deren Hilfe Veränderungen der Menge einer bestimmten Ziel-mRNA in Relation zur Menge an mRNA unterschiedlicher Housekeeping-Gene (bspw. 18S oder β -Actin) genau und reproduzierbar bestimmt werden kann.¹⁰¹

Dadurch, dass zur Herstellung der für die Messung genutzten cDNA zahlreiche Zwischenschritte nötig sind und unter anderem die Präparation der sehr empfindlichen mRNA durchgeführt werden muss, ist die qRT-PCR aufwendig und bietet viele potentielle Fehlerquellen. Der Begriff „quantitativ“ ist zudem irreführend, da eine genaue Bestimmung der in der Zelle vorhandenen Ausgangsmenge an mRNA-Kopien nicht möglich ist. Die gemessenen Ct-Werte sind von zahlreichen Faktoren, wie beispielsweise der Spezifität der Primer, der Aktivität der genutzten Taq-Polymerase und ggf. dem genutzten House-, bzw. Power-Mix abhängig. Angegeben und quantifiziert werden können also letztendlich relative Unterschiede in der ATGL-, bzw. ER-mRNA-Menge zwischen den unterschiedlichen Probenansätzen bezogen auf die Menge an Housekeeper-mRNA, nicht aber die absolute Menge an primär vorhandenen mRNA-Transkripten.

Im Gegensatz zur Luciferasemessung (s. Abschnitt 6.1.1) wird nicht die Expression eines durch Transfektion in die Zelle eingebrachten ATGL-Luciferase-Vektors, sondern die Menge an ATGL-mRNA gemessen. Methodische Stärke der mRNA-Messung mittels qRT-PCR ist also die Nutzung eines weniger artifiziellen Systems als in der Luciferasemessung. Die Einflussnahme der Östrogenrezeptoren auf die Expressionsregulation ist nicht auf einen bestimmten putativen Promotorsequenzbereich beschränkt, sondern bezieht mögliche Einflüsse des ersten Introns und weiter entfernter regulatorischer Abschnitte des Genoms mit ein. Während bei der Luciferasemessung die Zelle also nur als „Medium“ für den zu untersuchenden Vektor genutzt wird und vergleichsweise geringen Einfluss auf die Promotoraktivität nimmt, wird sie hier als Gesamtsystem genutzt. Dies schafft zwar einerseits weniger artifizielle Bedingungen, impliziert aber auch die Beeinflussung der Experimente durch den gewählten Zelltyp (3T3L1), die aktuelle metabolische Situation der Zelle und auch deren Differenzierungsstand (Prädipozyten) durch Methylierung/Acetylierung der DNA und Histonmodifikationen.^{102,103} Es können entsprechend mögliche, in bestimmten Organen und Geweben vorhandene und auch physiologisch relevante Effekte so im Zellkulturversuch verschleiert werden. Andererseits können Effekte, die in vivo

keine Rolle spielen, im Zellkulturversuch messbare Ergebnisse produzieren und eine Relevanz der Regulation vortäuschen.

| | Vorteile | Nachteile |
|---|---|--|
| Allgemeines | Sehr sensitive und spezifische Methode, die bei hochaffinen, spezifischen Primern auch die Detektion von geringen Mengen an mRNA ermöglicht | |
| Messverfahren und Normalisierung | Gute Normalisierung durch Housekeeper; Relative Unterschiede zwischen den Probenansätzen zuverlässig und reproduzierbar messbar | Keine Quantifizierung der Ausgangsmenge an mRNA, da Messung abhängig von Versuchskomponenten (Power-Mix, Taq-Polymerase, Primer) |
| Abhängigkeit von Störfaktoren | | Viele potentielle Fehlerquellen, vor allem im Schritt der mRNA-Isolation |

Tabelle 14: Charakteristika der qRT-PCR

6.1.4 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht den Nachweis selbst geringer Proteinmengen, wenn ein Antikörper mit hoher Affinität zum Zielprotein zur Verfügung steht, der dieses möglichst spezifisch bindet.

Er ist damit gut geeignet, das Vorhandensein eines bestimmten Proteins im Zellysat qualitativ nachzuweisen, während eine Quantifizierung der Ergebnisse schwierig und nur ungenau möglich ist. Es kann versucht werden, mittels analytischer Programme wie Image J aus der Vermessung und dem Vergleich von Größe und Intensität der Banden Rückschlüsse auf die vorhandene Proteinmenge zu ziehen. Die sich durch Versuche der Quantifizierung ergebenden Verhältnisangaben suggerieren jedoch falsche Genauigkeit.¹⁰⁴ Bereits das Digitalisieren des Blots kann, beispielsweise durch (vom Experimentator nicht beeinflussbare) automatische Kontrastverstärkung des Scanners, alle darauffolgenden Messungen und Quantifikationsversuche verfälschen.¹⁰⁴

Abgesehen von dieser grundsätzlichen Problematik beim Digitalisieren des Blots muss die Belichtungszeit für jeden der untersuchten Probenansätze in dem Zeitfenster liegen, in dem die Dichtezunahme der Banden proportional zur Menge an vorliegendem AK-markiertem Protein ist. Eine Probe, in der sehr hohe Proteinkonzentrationen vorliegen geht bei zu langer Belichtung in den „Sättigungsbereich“ über, das heißt, dass die Dichte der Bande nicht mehr proportional zur Belichtungszeit ansteigt. Für die Proben, in denen weniger des zu messenden Proteins vorhanden ist, steigt sie hingegen weiterhin proportional an und deren Proteingehalt wird entsprechend relativ überschätzt. In der praktischen Umsetzung ist es daher schwierig, bzw. nicht möglich, die

ideale Entwicklungszeit zu finden, wenn der Zielproteingehalt der Proben sich sehr stark unterscheidet. Während die Proben bezüglich ihres ATGL-Gehaltes relativ nah beieinander liegen und so möglicherweise ein optimaler Belichtungszeitraum gefunden werden kann, ist dies für den Nachweis des Östrogenrezeptors problematisch. So werden mit großer Wahrscheinlichkeit die Banden der überexprimierten Proben in den gesättigten Bereich übergehen, wenn die Banden in den untransfizierten Proben gerade sicher mit bloßem Auge erkennbar sind. Entsprechend wird die ER-Menge in den überexprimierten Zellen relativ zu den Kontrollen unterschätzt.

Weiterhin stellt das „Hintergrundrauschen“, das heißt, die mitunter unvermeidliche unregelmäßige „Graufärbung“ des belichteten Films, gerade bei diskreten Unterschieden in der Proteinmenge der Proben, wie sie für die ATGL vorliegen, einen erheblichen Störfaktor für die genaue Bestimmung der AUC dar.

Der Western Blot kann an dieser Stelle als weiteres experimentelles Element gesehen werden, das die These einer Expressionsregulation der ATGL durch ER β stützt, quantitative Schlussfolgerungen bezüglich der beobachteten Effekte werden jedoch aus o.g. Gründen nicht gezogen.

| | Vorteile | Nachteile |
|---|---|---|
| Allgemeines | Bei spezifischem, hochaffinem Antikörper sensitiver Proteinnachweis | Qualität der experimentellen Ergebnisse stark von der Antikörperqualität abhängig |
| Messverfahren und Normalisierung | | Sehr eingeschränkte quantitative Aussagekraft |

Tabelle 15: Charakteristika des Western Blots

6.2 Kritische Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Zusammenfassende Ergebnisdarstellung

Die vorliegende Arbeit analysiert die östrogenrezeptorabhängige ATGL-Regulation auf Promotor-, mRNA- und Proteinebene. Folgende sieben Beobachtungen ergaben sich experimentell:

- 1) Eine ligandenunabhängige transkriptionelle Aktivität konnte auf Promotor- und mRNA-Ebene sowohl für ER α als auch für ER β nachgewiesen werden.
- 2) In den Luciferase-Messungen waren die beobachteten Effekte für die Überexpression beider Rezeptorsubtypen von vergleichbarer Größe.

- 3) Die mRNA-Messung zeigte für die Überexpression beider Rezeptoren geringere Effekte als die Promotor-Analyse, dabei allerdings eine deutlich stärkere Induktion der Transkription durch ER β als durch ER α .
- 4) Die mRNA- und insbesondere die Western-Blot-Versuche zeigten einen deutlichen Anstieg der ATGL-mRNA-, bzw. -Proteinmenge unter der Stimulation mit DPN unabhängig von einer ER β -Überexpression; für PPT-Stimulation wurde kein vergleichbarer Effekt beobachtet.
- 5) In den Western-Blot-Versuchen zeigte sich weder ein ligandenunabhängiger Anstieg der ATGL-Menge für ER β -, noch für ER α -Überexpression.
- 6) In der HSL-mRNA-Messung zeigte sich ein geringer, aber signifikanter Anstieg der HSL-mRNA unter Stimulation mit PPT in ER α überexprimierten Zellen, nicht aber unter Stimulation mit DPN in ER β überexprimierten Zellen.
- 7) Die bioinformatische Promotoranalyse sowie die Analyse des ersten PNPLA2-Introns, zeigten ein deutliches Überwiegen putativer ER β -responsiver Elemente sowohl für die murine als auch die humane ATGL-Promotorregion gegenüber ER α -responsiven Elementen.

6.2.2 Ergebnisdiskussion

Die Luciferasemessung zeigte einen deutlichen, ausschließlich durch die Überexpression des jeweiligen Östrogenrezeptors bestimmten Anstieg der Promotoraktivität (s. Abschnitt 5.1). Es ist zu folgern, dass sowohl ER α als auch ER β die Transkription des Konstruktes ligandenunabhängig zu stimulieren vermögen. Diese ligandenunabhängige Aktivität von Östrogenrezeptoren, bzw. deren Aktivierbarkeit durch Kofaktoren und Signalmoleküle, wie cAMP, wurde bereits von zahlreichen Autoren beobachtet und kongruiert mit dem in Abschnitt 0 dargestellten Modell des strukturellen Aufbaus nukleärer Östrogenrezeptoren, das u.a. die ligandenunabhängige DNA-Bindungsdomänen A und B beschreibt.^{105,106} Mehrere Gruppen konnten in der Vergangenheit zudem eine Aktivierung von Östrogenrezeptoren durch Phosphorylierung der N-terminalen AF1-Domäne in Abwesenheit von Östradiol demonstrieren.^{61,64,107,108}

Die Tatsache, dass die in der Promotoraktivitätsmessung beobachteten Effekte für die Überexpression beider Rezeptoren annähernd gleich groß waren, (s. Abbildung 37) ist, wie bereits in Abschnitt 6.1.1 diskutiert, der Tatsache geschuldet, dass der Promotor in diesem Setup als „nacktes“, lineares Konstrukt und nicht in nativer Konfiguration vorliegt. Folglich lassen sich

zwar nur sehr begrenzt Schlussfolgerungen bezüglich der in-vivo-Promotoraktivität ziehen, festzustellen ist jedoch, dass prinzipiell beide Rezeptoren dazu in der Lage sind, die Promotorregion zu binden und die Transkription zu facilitieren. Im experimentellen Setup der mRNA-Messungen, das im Gegensatz zur Luciferase-Messung den ATGL-Promotor in nativer Konfiguration einbezieht, waren deutlich größere Effekte durch ER β -Überexpression und DPN Stimulation zu beobachten als für entsprechende Versuche mit ER α und PPT. Dies lässt darauf schließen, dass der Promotor in seiner nativen Konfiguration ER α mit weniger hoher Affinität bindet als ER β .

Zusammenfassend erlauben die beobachteten ligandenunabhängigen Effekte zwei Annahmen, die zukünftig weiter zu verfolgen sind: Einerseits deuten sie auf eine Rolle der Östrogenrezeptoren in der basalen ATGL-Expression unabhängig von Östrogen hin. Ein entsprechender ligandenunabhängiger Effekt von Östrogenrezeptoren auf die Expression von PPAR γ konnte bereits gezeigt werden.^{61,64,107,108} Andererseits zeigen sie die Fähigkeit des ATGL-Promotors sowohl ER α als auch ER β zu binden. Die Versuche auf mRNA- und Proteinebene legen zwar ein deutliches Überwiegen der Expressionsmodulation durch ER β nahe, eine Steigerung der positiven Expressionsregulation durch ER α in Abhängigkeit von der Anwesenheit anderer Chromatin-bindender Proteine, bzw. Kofaktoren, scheint jedoch plausibel und bedarf weiterer Investigation.⁹⁰

Während die Luciferaseversuche nur für die Östrogenrezeptor-überexprimierten Proben einen signifikanten Anstieg der Promotoraktivität unter Agonistenstimulation zeigten, wurde bei Messung der mRNA-Menge auch in Kontrollzellen unter DPN-Stimulation ein signifikanter Anstieg beobachtet. Western-Blot Versuche zeigten für nicht-überexprimierte Zellen ebenfalls einen Anstieg der Proteinmenge unter DPN-Stimulation. Diesen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene beobachtbaren Effekt in nicht-überexprimierten Zellen unter DPN-Stimulation führten wir auf einen, wenn auch im Vergleich zu überexprimierten Zellen geringen, endogenen Rezeptorbesatz der 3T3L1-Präadipozyten zurück, der mittels Western Blot nachgewiesen werden (s. Abschnitt 5.4) und bereits zuvor durch Foryst-Ludwig et al. beobachtet werden konnte.⁶⁴

Die Tatsache, dass der ligandenabhängige Effekt insbesondere auf Proteinebene deutlich ausgeprägt war, deutet in Kongruenz mit der Beobachtung, dass ein sehr geringer zellulärer Rezeptorbesatz für eine messbare Mehrexpression der ATGL unter Agonistenstimulation ausreicht, auf die Beteiligung in geringem Maße ER α -, insbesondere aber ER β -vermittelter

promotorunabhängiger expressionsregulatorischer Mechanismen hin. Es könnten u.a. posttranskriptionale und posttranslationale Prozesse sowie die Modulation proteasomaler Degradation beteiligt sein. Einfluss von Östrogenen auf die Stabilität von mRNA-Transkripten wurde in der Vergangenheit bereits von zahlreichen Gruppen beschrieben. Sie können die Degradation von Transkripten sowohl begünstigen als auch hemmen.^{109,110} Regulatorische Einflüsse der Östrogenrezeptoren auf die posttranslationale Stabilität konnten in der Vergangenheit bereits für diverse Proteine, wie z.B. den Glukokortikoidrezeptor und auch das hypophysäre Hormon Prolaktin gezeigt werden.^{111,112} Auch eine Regulation der proteasomalen Degradation nukleärer Rezeptoren durch Östrogenrezeptoren konnte gezeigt werden.¹¹¹ Allerdings wurden in bislang erschienenen Arbeiten nicht die für die nukleären Östrogenrezeptoren spezifischen Substanzen PPT und DPN, sondern 17 β -Östradiol als Agonist genutzt. Eine Beteiligung G-Protein gekoppelter Östrogenrezeptoren ist in diesen Versuchansätzen daher nicht auszuschließen und die Rolle von ER α /ER β bedarf weiterer Klärung durch analoge Versuche mit selektiven Agonisten.

Unabhängig davon, welche der ligandenabhängigen, ER-vermittelten Mechanismen im Einzelnen die letztendlich in der Zelle vorhandene Proteinmenge bestimmen, kann die Tatsache, dass durch Agonistenstimulation bei einem niedrigen endogenen ER β -Rezeptorgehalt ein deutlicher Anstieg der ATGL-Menge detektierbar ist, als Indiz für eine mögliche physiologische Relevanz der gezeigten Daten gewertet werden.

Sowohl im Luciferaseassay als auch in den qRT-PCR-Experimenten wurden die ausgeprägtesten Effekte auf ATGL-Promotoraktivität und -mRNA-Menge unter Rezeptorüberexpression bei gleichzeitiger Agonistenstimulation beobachtet. Eine Stimulation mit PPT/DPN konnte entsprechend die Östrogenrezeptoraktivität und Transkription bei höherer Rezeptormenge weiter steigern. Diese Beobachtungen schließen aus, dass die beobachteten Effekte unspezifisch, oder nicht durch Östrogenrezeptoren vermittelt sein könnten.

Zusätzlich zur ATGL-mRNA-Messung wurde in den entsprechenden Proben eine HSL-mRNA-Messung durchgeführt, um den Einfluss der Substanzapplikation auf die Expression der den DAG-Abbau katalysierenden Lipase zu bestimmen (s. Abschnitt 1.2.4.2). Es zeigte sich ein positiver transkriptionsregulatorischer Effekt von ER α , nicht aber von ER β , der insgesamt deutlich geringer ausgeprägt war als für die ATGL (s. Abschnitt 5.3.2). Die zur HSL erhobenen Versuchsdaten fügen sich damit als weiterer Baustein in das Konzept gesteigerter lipolytischer

Aktivität durch Östrogenrezeptoraktivierung ein, sind aber, in Anbetracht der Tatsache, dass nicht die HSL, sondern die ATGL „Schrittmacherenzym“ des Triglyceridabbaus ist, möglicherweise von untergeordneter Bedeutung.

Eine transkriptionelle Kontrolle der ATGL-Expression durch die Sequenz des ersten Introns wird in der Promotoraktivitätsmessung des Luciferasekonstruktes nicht, wohl aber in der Messung der mRNA- und Proteinmenge erfasst. Entsprechend wurde auch für das erste Intron eine Promotoranalyse durchgeführt, deren Ergebnisse in Abschnitt 5.2 dargestellt sind. Um durch die phylogenetische Konservierung von Sequenzmotiven Hinweise auf deren mögliche funktionelle Relevanz zu erhalten, wurden jeweils die murinen und humanen Promotor- und Intron-Sequenzen verglichen. Das in Abschnitt 5.2 beschriebene Sequenzalignment ergab innerhalb der Promotorregionen eine hochkonservierte Region, die sowohl für den murinen als auch den humanen Promotor EREs für ER β enthielt. Bei genauem Sequenzvergleich korrespondierten diese allerdings nicht. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern Lin et al.: Sie beobachteten in ihrer das gesamte Genom umfassenden Kartographie von ER α -Bindungssequenzen insgesamt wenig phylogenetische Konservierung unter Vertebraten und führen dies auf ein relativ großes Spektrum an ER-responsiven Motiven zurück. Die sich im Laufe der Evolution häufig ergebenden Spontanmutationen führen zur Entstehung neuer bzw. der Modifikation vorhandener Bindungsstellen.⁹⁶ Fehlende phylogenetische Konservierung ist entsprechend nicht als Hinweis auf eine fehlende physiologische Relevanz der detektierten EREs zu werten, sondern im Kontext eines breiten Bindungs- und Affinitätsspektrums der ERs zu sehen.

6.2.3 Diskussion der Ergebnisse im Kontext aktueller Publikationen

Zahlreiche Arbeitsgruppen weltweit beschäftigen sich mit geschlechtsspezifischen Aspekten des Metabolismus. Dies geschieht unter anderem im Hinblick auf die Erforschung von Risikofaktoren in der Pathogenese kardiovaskulärer und maligner Erkrankungen, mögliche geschlechtsspezifische Präventionsansätze und gezielte Pharmakotherapie. In der Vergangenheit wurden bereits von zahlreichen Autoren substantielle Unterschiede zwischen dem Metabolismus von weiblichen und männlichen Organismen beschrieben. So konnten beispielsweise Foryst-Ludwig et al. in weiblichen gegenüber männlichen Mäusen eine unter körperlicher Aktivität signifikant erhöhte Lipolyseaktivität bei korrespondierend erniedrigtem respiratorischem Quotienten zeigen. Dieser Befund lässt auf eine in Weibchen gegenüber Männchen vermehrte Utilisation von Fettsäuren durch β -Oxidation schließen.⁵⁹ Weiterhin konnte im Fettgewebe weiblicher Mäuse eine den Männchen gegenüber um etwa den Faktor 1,7 signifikant erhöhte Menge an ATGL-, interessanterweise aber nicht an HSL-mRNA nachgewiesen werden.⁵⁹

Die im Rahmen dieser Arbeit in Zellkulturversuchen an Präadipozyten erhobenen qRT-PCR-Daten zeigten vor allem eine positive Regulation der ATGL-mRNA-Menge, in geringerem Maße allerdings auch der HSL-mRNA-Menge, durch die nukleären ERs. Die beobachtete Zunahme der ATGL-mRNA-Menge kongruiert gut mit den in-vivo gewonnenen Daten von Foryst-Ludwig et al.⁵⁹. Eine diskrete positive Regulation der HSL-mRNA-Menge erscheint vor dem beschriebenen theoretischen Hintergrund sehr plausibel, erreichte aber bei Messung von Gewebeproben keine statistische Signifikanz. Dies könnte zumindest anteilig der Tatsache geschuldet sein, dass es sich bei den Messungen von Foryst-Ludwig et al. um einen Vergleich der relativen Protein-Expression zwischen Gewebeproben von Männchen und Weibchen und nicht, wie in den hier beschriebenen Experimenten, um den direkten Effekt der ER-Stimulation durch selektive Rezeptoragonisten im Zellkulturversuch handelt. Entsprechend groß ist im Gegensatz zu dem sehr engen, hier vorliegenden Setup in vivo die Menge an Faktoren, die die Transkription sowohl der HSL als auch der ATGL beeinflussen. Beispielsweise wurden in der Vergangenheit negative Einflüsse von Progesteron und auch Dihydrotestosteron auf die HSL-Expression beschrieben, wohingegen die ATGL-Konzentration von einer Progesteronapplikation unbeeinflusst blieb.^{113,114} Bei der Analyse der Gewebeproben wird ein Nettoeffekt aus allen die Transkription beeinflussenden metabolischen und hormonellen Einflüssen gemessen, sodass allenfalls Mutmaßungen über die quantitative Beteiligung einzelner Faktoren anzustellen sind. Festzuhalten ist, dass die hier im Zellkulturversuch beobachtete ER-abhängige Regulation der ATGL gut mit den Daten von Foryst Ludwig et al. korreliert und damit als möglicherweise maßgeblich zum in vivo beobachteten Effekt beitragender Faktor in Frage kommt.

Weiterhin konnte von Foryst-Ludwig et al. beobachtet werden, dass ein negativer Cross-Talk zwischen ER β und PPAR γ stattfindet. So führte die Überexpression von ER β , nicht aber von ER α , in Zellkulturversuchen an 3T3L1-Präadipozyten zu einer Inhibition des PPAR γ -Signalling und damit zur Inhibition ihrer Differenzierung zu reifen Adipozyten. Diese Beobachtungen konnten im Mausmodell bestätigt werden. HFD-gefütterte β ERKO-Mäuse zeigten eine vermehrte Fettgewebsakkumulation bei gleichzeitig gesteigerter Insulinsensitivität des WAT.⁶⁴ Diese Beobachtungen weisen auf eine besondere Bedeutung von ER β in Prozessen der Fettgewebsdifferenzierung sowie -homöostase hin und stehen in Kongruenz mit der hier gezeigten Regulation der ATGL-Expression durch ER β .

Weigt et al. konnten in ihren Experimenten an ovariektomierten, adipösen Wistar-Ratten zeigen, dass es unter Einzelapplikation von sowohl 17 β -Östradiol als auch von selektiven ER α -, bzw.

ER β -Agonisten zu einer Abnahme der Lipogenese und der Adipogenese im Fettgewebe kam. Sie bestätigten den von Foryst-Ludwig et al. demonstrierten negativen Einfluss von ER β auf die Lipogenese und Adipogenese in Zusammenhang mit einer Down-Regulation des PPAR γ -Signalling im weißen Fettgewebe, interessanterweise aber nicht für Leber und Muskel.⁷⁶ In Einklang mit diesen Daten beobachteten Weigt et al. eine Verschiebung der Relation von Muskel- und Fettgewebsmasse für mit selektivem ER β -Agonisten behandelte ovariektomierte Ratten. Diese zeigten Kontrollen gegenüber bei relativ verminderter Fettmasse eine höhere Muskelmasse mit im Durchmesser signifikant größeren Muskelfasern der Musculi Solei. Die Experimente von Weigt et al. machen deutlich, dass Östrogenrezeptoren nicht nur in den Fettgewebsmetabolismus eingreifen und das Verteilungsmuster der Lipiddepots im Organismus beeinflussen, sondern auch auf Trophik und Energiehomöostase der Skelettmuskulatur Einfluss nehmen.

Die Bedeutung der ATGL im Muskelgewebe lässt sich an Hand einer kürzlich durch Pennisi et al. beschriebenen Myopathie durch eine Mutation im PNPLA2-Gen ableiten.¹¹⁵ Betroffene Patienten weisen bei verminderter sportlicher Belastbarkeit Krämpfe und eine milde muskuläre Schwäche auf. Pennisi et al. beobachteten histologisch keine vermehrte muskuläre Lipidakkumulation, sodass sie die Myopathie nicht auf eine Verfettung der Muskulatur durch ATGL-Mangel, sondern auf eine metabolische Funktionsbeeinträchtigung zurückführen.

In dieser Arbeit wird der positive regulatorische Einfluss der ER β -Aktivierung auf den ATGL-Promotor an Hand von Luciferasemessungen nachgewiesen. Die Messung der Promotoraktivierung ist zwar vom genutzten Zelltyp unabhängig, aus o.g. Gründen aber nur bedingt aussagekräftig bezüglich in vivo zu erwartender Effekte. Versuche zur mRNA- und Protein-Menge weisen die positive Regulation der ATGL-Menge in dieser Arbeit in Präadipozyten nach. Eine Übertragbarkeit der Daten auf reife Adipozyten sowie Zellen anderer Differenzierungsreihen, wie Myozyten, ist damit nicht zwangsläufig gegeben. Die experimentellen Beobachtungen von Weigt et al. sowie auch von Pennisi et al. in Gewebeproben, bzw. anhand klinischer Beobachtungen, ermöglichen zwar keine Aussagen über die im Einzelnen beteiligten molekularen Mechanismen, komplementieren aber die hier beschriebenen Daten zur positiven Expressionsregulation der ATGL durch ER β und deuten damit auf eine Relevanz der ER β -abhängigen Steigerung der ATGL-Expression im Fettgewebe und auch der Skelettmuskulatur hin.

Wie von Irwin et al. demonstriert, wird durch die östrogenrezeptorvermittelte Stimulation der mitochondrialen Atmungsaktivität über eine Steigerung des Energieumsatzes Einfluss auf den

Fettsäuremetabolismus genommen.¹¹⁶ Messungen der Atmungskettenaktivität zeigten, dass sowohl ER α als auch ER β unabhängig vom jeweils anderen Rezeptor positiven Einfluss auf die respiratorische Aktivität, damit die ATP-Produktion und so die Bereitstellung von Energie für Stoffwechselforgänge nehmen. Unter Aktivierung von ER β konnten dabei größere Effekte beobachtet werden als unter ER α -Aktivierung.^{116,117} Auch in diesen Kontext fügen sich die hier dargestellten Daten ein: Die bei einer im Vergleich mit Glucose (4,1 kcal/g) und Proteinen (4,1 kcal/g) sehr effektive ATP-Synthese mittels bei der Degradation von Triglyceriden (9,3 kcal/g) gewonnenem NADH⁺+H⁺ und FADH₂ geschieht aerob größtenteils in der Mitochondrienmembran. Entsprechend plausibel erscheint im Rahmen einer möglichst effektiven Energiegewinnung durch vermehrte Lipolyse und Utilisation von Fettsäuren die gleichzeitige Steigerung der mitochondrialen Atmungsaktivität und die positive Regulation der ATGL-Menge durch Östrogenrezeptoren.

Neben peripher lokalisierten Mechanismen der Regulation von Energiehomöostase und Fettgewebismetabolismus durch Östrogenrezeptoren konnte von Xu et al. gezeigt werden, dass durch die Deletion von ER α in hypothalamischen SF-1-Neuronen der Gesamt-Energieumsatz des Organismus sinkt. Diese Beobachtung weist auf eine herausragende Bedeutung der Östrogenrezeptoren in der Energiehomöostase des Organismus hin, bei der lokale und zentrale Regulationsmechanismen ineinandergreifen.

Randomisierte, kontrollierte, klinische Studien zur Hormonersatztherapie in früh postmenopausalen Frauen konnten zeigen, dass die Supplementation von Östrogenen eine im Rahmen der hormonellen Umstellung stattfindende Fettgewebsakkumulation und insbesondere die Umverteilung der Fettdepots von subkutaner hin zu viszeraler Lokalisation verhindern konnte.^{56,118-120} Wie in Abschnitt 1.2.2.3 beschrieben, wirkt sich die unter Östrogeneinfluss bestehende, durch subkutane, v.a. gluteal lokalisierte Fettdepots charakterisierte, „gynoiden“ Fettverteilung im Gegensatz zur „androgenen“ Konstitution mit zentral betonter Fettgewebsakkumulation positiv auf das metabolische Risikoprofil und damit die kardiovaskuläre Gesundheit aus.

Östrogene beeinflussen Fettgewebsakkumulation, -distribution und -degradation. Für diverse an der Adipozytendifferenzierung beteiligte Gene wurde eine östrogenabhängige Expressionsregulation beschrieben.¹²¹⁻¹²³ Zudem besteht eine östrogenabhängige Modulation der adipozytären Zytokinexpressionsmuster.^{9,123} Genaue Mechanismen der durch Östrogene beeinflussten depot- und geschlechtsspezifischen Lipolyseaktivitäten sind zurzeit noch

weitgehend ungeklärt. Eine depotspezifische Expression der HSL und der LPL sind beschrieben, während es zur Expression der ATGL keine Daten gibt, die zwischen den unterschiedlichen Fettdepots differenzieren.^{124,125}

Alles in allem ergänzen und untermauern die in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsergebnisse aktuelle Daten zum metabolischen Einfluss von Östrogenen und Östrogenrezeptoren auf die Fettgewebshomöostase. Sie bieten die positive Regulation der ATGL als einen an der durch Östrogene stimulierten Lipolyse beteiligten Mechanismus an und geben diesbezüglich Hinweise auf eine besondere Bedeutung von ER β im Fettgewebe.

6.3 Abschließende Ergebnisbetrachtung und Perspektiven

Die Lipidhomöostase ist ein komplexes Zusammenspiel von TGA-Degradation, -Akkumulation, der Aufnahme freier Fettsäuren, Lipogenese und Adipogenese. Die Fülle an gleichgewichtsmodulierenden Faktoren, die bei den genannten metabolischen Prozessen eine Rolle spielen, macht es unmöglich, aus der Beobachtung einzelner Faktoren Schlussfolgerungen über das Gesamtverhalten des Systems zu ziehen.^{126,127} So führt eine vermehrte Degradation von Speicherfetten nicht zwangsläufig auch zu einer Verminderung der zellulären Lipidbeladung oder gar des Gesamtorganismus, wenn sie beispielsweise an eine vermehrte Aufnahme von Fettsäuren aus dem Blutstrom gekoppelt ist (Option 1), oder nicht durch eine vermehrte Utilisation oder zelluläre Freisetzung der entstandenen FFA (Option 2) begleitet wird. Erstere Option würde bei möglicherweise gleicher zellulärer TGA-Gesamtmenge mit einem höheren Gesamtequilibriumszustand des Systems einhergehen, der eine effektive Mobilisation von Lipid-Speichern bei Bedarf ermöglicht. Letztere Option würde zu im Equilibriumszustand vergleichsweise hohen intrazellulären FFA-Konzentrationen führen, die durch die in Abschnitt 1.2.2.3 beschriebenen Mechanismen zu einer Störung der zellulären Integrität mit einer Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden führen und so zur Entstehung des metabolischen Syndroms (s. Abbildung 1) mit seinen Folgeerkrankungen beitragen könnten.¹³⁻¹⁵ Diese beispielhaften Überlegungen zeigen, wie delikat und gleichzeitig vielversprechend eine mögliche pharmakologische Intervention mittels selektiver Östrogenrezeptormodulatoren im Fettgewebe, aber auch in der Skelettmuskulatur und der Leber sein könnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt auf Transkriptions- und Translationsebene erstmalig eine ausgeprägte, subtypspezifische Modulation der ATGL-Expression durch ER α und β . Genannte Beobachtung könnte in Verbindung mit zukünftigen Untersuchungen zur ER-Subtyp-Abhängigkeit der Expression weiterer zentraler metabolischer Enzyme Baustein auf dem Weg zu

einem gezielten Drug Modelling/Targeting selektiver Östrogenrezeptormodulatoren sein. Mögliche Zielsetzung wäre dabei eine Steigerung der Lipolyse bei gleichzeitiger vermehrter Metabolisierung der freigesetzten Fettsäuren, die einen starken Anstieg der intrazellulären, aber auch der im Plasma vorliegenden Konzentration an FFA verhindert. Selektive Östrogenrezeptormodulatoren könnten damit therapeutisch an das Konzept der PPAR γ -Agonisten anknüpfen, die durch eine Stimulation der Adipogenese und Deposition von Triglyceriden im Fettgewebe bei gesteigerter Insulinsensitivität und Glukosetoleranz im Skelettmuskel eine Verbesserung des Lipidprofils, dabei aber auch eine Gewichtszunahme des Patienten als adversem Effekt der Therapie bewirkten. Möglicherweise bieten selektive Östrogenrezeptormodulatoren damit durch Beeinflussung des negativen Crosstalk von ER β mit PPAR γ auf der einen Seite und ihre die Lipolyseaktivität und den Energieumsatz regulierende Wirkung auf der anderen Seite ein interessantes pharmakologisches Zielmolekül. Beispielsweise könnte eine Substanz, die im Fettgewebe als Agonist/Partialagonist auf ER α /ER β wirkt, also die Lipolyse bei gleichzeitiger Hemmung der Lipo- und Adipogenese steigert, in Kombination mit einem Skelettmuskel-selektiven Antagonisten/Partialagonisten von ER β , der den negativen Einfluss von ER β auf die PPAR γ -Aktivität hemmt und so eine gesteigerte Insulinsensitivität- und Glukosetoleranz der Skelettmuskulatur bewirkt, zu einem gesteigerten Gesamtlipidumsatz bei verbessertem Lipidprofil führen.

7 Literaturverzeichnis

1. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S9-14.
2. Ravussin E, Galgani JE. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr* 2011;31:33-47.
3. Barneda D, Frontini A, Cinti S, Christian M. Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:924-33.
4. Cinti S. The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech* 2012;5:588-94.
5. Tews D, Wabitsch M. Renaissance of brown adipose tissue. *Horm Res Paediatr* 2011;75:231-9.
6. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* 2012;13 Suppl 2:83-96.
7. Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, et al. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab* 2011;13:739-48.
8. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:209-14.
9. White UA, Tchoukalova YD. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta* 2013.
10. Gavin KM, Cooper EE, Raymer DK, Hickner RC. Estradiol Effects on Subcutaneous Adipose Tissue Lipolysis in Premenopausal Women are Adipose Tissue Depot Specific and Treatment Dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013.
11. Benninghoff D. *Anatomie*; 2002.
12. Leibel RL, Edens NK, Fried SK. Physiologic basis for the control of body fat distribution in humans. *Annu Rev Nutr* 1989;9:417-43.
13. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:219-46.
14. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 2009;9:26-32.
15. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801.
16. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:281-7.
17. Hassing HC, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdorp M, Dallinga-Thie GM. Pathophysiology of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:826-32.
18. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest* 2011;121:2102-10.
19. Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R. Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:333-40.
20. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 2011;50:14-27.
21. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004;306:1383-6.
22. NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid). In: Machery Nagel.
23. Kim JY, Tillison K, Lee JH, Rearick DA, Smas CM. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E115-27.
24. Chakrabarti P, Kandror KV. FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 2009;284:13296-300.

25. Rydel TJ, Williams JM, Krieger E, et al. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 2003;42:6696-708.
26. Cornaciu I, Boeszoermerenyi A, Lindermuth H, et al. The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and GOS2, respectively. *PLoS One* 2011;6:e26349.
27. Duncan RE, Wang Y, Ahmadian M, Lu J, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Characterization of desnutrin functional domains: critical residues for triacylglycerol hydrolysis in cultured cells. *J Lipid Res* 2010;51:309-17.
28. Carpen C, Bousquet-Melou A, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1998;839:186-9.
29. Chaves VE, Frasson D, Kawashita NH. Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie* 2011;93:1631-40.
30. Yamaguchi T. Crucial role of CGI-58/alpha/beta hydrolase domain-containing protein 5 in lipid metabolism. *Biol Pharm Bull* 2010;33:342-5.
31. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 2006;3:309-19.
32. Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2006;281:15837-44.
33. Boston BA. The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:75-84.
34. Kiwaki K, Levine JA. Differential effects of adrenocorticotrophic hormone on human and mouse adipose tissue. *J Comp Physiol B* 2003;173:675-8.
35. Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H, et al. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 2003;278:48617-26.
36. Lien CC, Au LC, Tsai YL, Ho LT, Juan CC. Short-term regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes is mediated through the inducible nitric oxide synthase/nitric oxide-dependent pathway. *Endocrinology* 2009;150:4892-900.
37. Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;66:241-77.
38. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011;472:230-3.
39. Chakrabarti P, English T, Shi J, Smas CM, Kandrór KV. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* 2010;59:775-81.
40. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2004;279:47066-75.
41. Li YC, Zheng XL, Liu BT, Yang GS. Regulation of ATGL expression mediated by leptin in vitro in porcine adipocyte lipolysis. *Mol Cell Biochem* 2010;333:121-8.
42. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 2006;312:734-7.
43. Greenberg AS, Shen WJ, Muliro K, et al. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 2001;276:45456-61.

44. Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 2002;277:4806-15.
45. Laurin NN, Wang SP, Mitchell GA. The hormone-sensitive lipase gene is transcribed from at least five alternative first exons in mouse adipose tissue. *Mamm Genome* 2000;11:972-8.
46. Tornqvist H, Belfrage P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 1976;251:813-9.
47. Taschler U, Radner FP, Heier C, et al. Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem* 2011;286:17467-77.
48. NucleoBond® Xtra Maxi. In: Machery Nagel.
49. Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med* 2009;6 Suppl 1:60-75.
50. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:143-52.
51. Zamboni M, Armellini F, Milani MP, et al. Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables and their inter-relationships. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16:495-504.
52. Assmann G, Schulte H. The importance of triglycerides: results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study. *Eur J Epidemiol* 1992;8 Suppl 1:99-103.
53. Grodstein F, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC. The discrepancy between observational studies and randomized trials of menopausal hormone therapy. *Ann Intern Med* 2004;140:764-5; author reply 5-6.
54. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T. Expression of estrogen receptor alpha and beta in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 2003;68:11-9.
55. Shin JH, Hur JY, Seo HS, et al. The ratio of estrogen receptor alpha to estrogen receptor beta in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids* 2007;72:592-9.
56. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561-70.
57. Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;122:74-81.
58. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol* 2012;212:3-12.
59. Foryst-Ludwig A, Kreissl MC, Sprang C, et al. Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H115-22.
60. Leitman DC, Paruthiyil S, Yuan C, et al. Tissue-specific regulation of genes by estrogen receptors. *Semin Reprod Med* 2012;30:14-22.
61. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270:1491-4.
62. Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA. Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4:19-28.
63. Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JA. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol* 2000;58:584-90.
64. Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, et al. Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet* 2008;4:e1000108.

65. Liu S, Le May C, Wong WP, et al. Importance of extranuclear estrogen receptor-alpha and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. *Diabetes* 2009;58:2292-302.
66. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 2008;70:165-90.
67. Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 2005;28:436-45.
68. Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, Arterburn JB. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109:350-3.
69. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12729-34.
70. Wend K, Wend P, Drew BG, Hevener AL, Miranda-Carboni GA, Krum SA. ERalpha regulates lipid metabolism in bone through ATGL and perilipin. *J Cell Biochem* 2013;114:1306-14.
71. Hewitt SC, Li Y, Li L, Korach KS. Estrogen-mediated regulation of Igf1 transcription and uterine growth involves direct binding of estrogen receptor alpha to estrogen-responsive elements. *J Biol Chem* 2010;285:2676-85.
72. Laudenslager ML, Wilkinson CW, Carlisle HJ, Hammel HT. Energy balance in ovariectomized rats with and without estrogen replacement. *Am J Physiol* 1980;238:R400-5.
73. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism* 2009;58:38-47.
74. Gao H, Bryzgalova G, Hedman E, et al. Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* 2006;20:1287-99.
75. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 2009;150:2109-17.
76. Weigt C, Hertrampf T, Kluxen FM, et al. Molecular effects of ER alpha- and beta-selective agonists on regulation of energy homeostasis in obese female Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol* 2013;377:147-58.
77. Benz V, Bloch M, Wardat S, et al. Sexual dimorphic regulation of body weight dynamics and adipose tissue lipolysis. *PLoS One* 2012;7:e37794.
78. Zen-bio.com. 3T3-L1 Cell Care Manual. In.
79. Invitrogen. Lipofectamine 2000 Reagent.
80. Morales A, Gonzalez M, Marin R, Diaz M, Alonso R. Estrogen inhibition of norepinephrine responsiveness is initiated at the plasma membrane of GnRH-producing GT1-7 cells. *J Endocrinol* 2007;194:193-200.
81. Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S, et al. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . *J Mol Endocrinol* 2010;44:237-46.
82. Baruscotti I, Barchiesi F, Jackson EK, et al. Estradiol stimulates capillary formation by human endothelial progenitor cells: role of estrogen receptor- α / β , heme oxygenase 1, and tyrosine kinase. *Hypertension* 2010;56:397-404.
83. Ohshiro K, Schwartz AM, Levine PH, Kumar R. Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via non-genomic signaling. *PLoS One* 2012;7:e30725.
84. Promega. Dual-Luciferase® Reporter Assay System Technical Manual. In.

85. NCBI. Genetic Database.
86. Schneider TD, Stephens RM. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6097-100.
87. MacheryNagel. NucleoSpin® RNA II Protokoll.
88. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999;75:291-5.
89. Piercenet. Western Blot Instructions.
90. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* 2003;65:261-311.
91. Picard D. Estrogen receptor alpha interactors. 2013.
92. Irvine RA, Lin IG, Hsieh CL. DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. *Mol Cell Biol* 2002;22:6689-96.
93. Briones V, Muegge K. The ghosts in the machine: DNA methylation and the mystery of differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819:757-62.
94. Bruhat A, Tourmente S, Chapel S, Sobrier ML, Couderc JL, Dastugue B. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the beta 3 tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in *Drosophila* Kc cells. *Nucleic Acids Res* 1990;18:2861-7.
95. Liu D, Deschamps A, Korach KS, Murphy E. Estrogen-enhanced gene expression of lipoprotein lipase in heart is antagonized by progesterone. *Endocrinology* 2008;149:711-6.
96. Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, et al. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet* 2007;3:e87.
97. Wasserman WW, Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat Rev Genet* 2004;5:276-87.
98. Robinson R. Bursting with randomness: a simple model for stochastic control of gene expression. *PLoS Biol* 2013;11:e1001622.
99. Ohashi K, Yamashino T, Mizuno T. Molecular basis for promoter selectivity of the transcriptional activator OmpR of *Escherichia coli*: isolation of mutants that can activate the non-cognate kdpABC promoter. *J Biochem* 2005;137:51-9.
100. The genome's 3-D structure shapes how genes are expressed. *Science Daily*.
101. Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online* 2001;3:19-25.
102. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 2001;278:25-31.
103. Geiman TM, Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J Cell Biochem* 2002;87:117-25.
104. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 2009;30:1845-55.
105. El-Tanani MK, Green CD. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997;11:928-37.
106. Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 2005;5:343-57.
107. Lahooti H, White R, Danielian PS, Parker MG. Characterization of ligand-dependent phosphorylation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1994;8:182-8.
108. Glaros S, Atanaskova N, Zhao C, Skafar DF, Reddy KB. Activation function-1 domain of estrogen receptor regulates the agonistic and antagonistic actions of tamoxifen. *Mol Endocrinol* 2006;20:996-1008.
109. Weiss IM, Liebhaber SA. Erythroid cell-specific determinants of alpha-globin mRNA stability. *Mol Cell Biol* 1994;14:8123-32.

110. Staton JM, Thomson AM, Leedman PJ. Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. *J Mol Endocrinol* 2000;25:17-34.
111. Kinyamu HK, Archer TK. Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol Cell Biol* 2003;23:5867-81.
112. Torner L, Nava G, Duenas Z, et al. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J Endocrinol* 1999;161:423-32.
113. Stelmanska E, Szrok S, Swierczynski J. Progesterone-induced down-regulation of hormone sensitive lipase (Lipe) and up-regulation of G0/G1 switch 2 (G0s2) genes expression in inguinal adipose tissue of female rats is reflected by diminished rate of lipolysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;147C:31-9.
114. Anderson LA, McTernan PG, Harte AL, Barnett AH, Kumar S. The regulation of HSL and LPL expression by DHT and flutamide in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* 2002;4:209-13.
115. Pennisi EM, Missaglia S, DiMauro S, Bernardi C, Akman HO, Taviani D. A myopathy with unusual features caused by PNPLA2 gene mutations. *Muscle Nerve* 2014.
116. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 2008;149:3167-75.
117. Irwin RW, Yao J, To J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *J Neuroendocrinol* 2012;24:236-48.
118. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci* 2000;904:502-6.
119. Toth KS. [Menopause and hormone replacement therapy]. *Orv Hetil* 2000;141:547-56.
120. Bassuk SS, Manson JE. Menopausal hormone therapy and cardiovascular disease risk: utility of biomarkers and clinical factors for risk stratification. *Clin Chem* 2014;60:68-77.
121. Heid IM, Jackson AU, Randall JC, et al. Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat Genet* 2010;42:949-60.
122. Lindgren CM, Heid IM, Randall JC, et al. Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution. *PLoS Genet* 2009;5:e1000508.
123. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:1020-7.
124. Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, Kilgore M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase--possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:101-7.
125. Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med* 1995;27:435-8.
126. Manteiga S, Choi K, Jayaraman A, Lee K. Systems biology of adipose tissue metabolism: regulation of growth, signaling and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2013;5:425-47.
127. Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2008;32 Suppl 7:S39-51.

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Diagnosekriterien des metabolischen Syndroms nach der WHO | 14 |
| Abbildung 2: Lipid Droplet | 16 |
| Abbildung 3: Der dreistufige Prozess der Lipolyse | 17 |
| Abbildung 4: Molekulare Mechanismen der hormonellen ATGL-Aktivierung..... | 19 |
| Abbildung 5: Östrogenwirkungen im metabolischen Kontext | 25 |
| Abbildung 6: Einteilung der Östrogenrezeptoren | 25 |
| Abbildung 7: Strukturdomänen der nukleären..... | 26 |
| Abbildung 8: Phänotypen weiblicher Knockout-Mäuse | 29 |
| Abbildung 9: Phänotypen männlicher Knockout-Mäuse | 30 |
| Abbildung 10 Fluoreszenzmikroskopie eGFP-transfizierter 3T3L1 Präadipozyten..... | 40 |
| Abbildung 11: Transfektions-Mastermixe für die Luciferaseversuche..... | 43 |
| Abbildung 12: Transfektions-Mastermixe für die mRNA-Versuche/Western Blot Versuche.... | 43 |
| Abbildung 13: Erwartete Fragmentgrößen für den Restriktionsenzymverdau | 46 |
| Abbildung 14: Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese | 46 |
| Abbildung 15: Murines PNPLA2-Gen mit putativer Promotorregion..... | 49 |
| Abbildung 16: Humanes PNPLA2-Gen mit putativer Promotorregion | 49 |
| Abbildung 17: Bindungsmotiv ER α (ESR1) | 49 |
| Abbildung 18: Bindungsmotiv ER β (ESR2) | 49 |
| Abbildung 20: Mastermix für die cDNA-Synthese..... | 52 |
| Abbildung 21: Berechnung der benötigten Wells..... | 52 |
| Abbildung 22: Zusammensetzung des Mastermixes..... | 52 |
| Abbildung 23: Thermisches Profil für die Messung mit Power-Mix..... | 53 |
| Abbildung 24: Halblogarithmische Auftragung der Amplifikationskurven..... | 53 |
| Abbildung 25: Unsaubere Schmelzkurve | 54 |
| Abbildung 26: Saubere Schmelzkurve | 54 |
| Abbildung 27: Pipettierschema einer 96-Well-Platte zur Proteinkonzentrationsbestimmung | 56 |
| Abbildung 28: Eichgerade | 57 |
| Abbildung 29: Rezepte für Trenn- und Sammelgel | 57 |
| Abbildung 30: Luciferaseaktivität in ERE-Luc/ER-überexprimierten Zellen..... | 61 |
| Abbildung 31: Relative Luciferase Aktivität (verglichen mit PSG5/ATGL-Luc _{vehikel}) | 62 |
| Abbildung 32: Putative ER-Bindungselemente im murinen ATGL-Promotor | 65 |
| Abbildung 33: Putative ER-Bindungselemente im humanen ATGL-Promotor | 65 |
| Abbildung 34: Ergebnisse der bioinformatischen Promotoranalyse und der Analyse des ersten Introns..... | 66 |
| Abbildung 35: Untersuchung der humanen und murinen Promotorsequenzen auf das Vorliegen phylogenetisch hochkonservierte Bereiche | 67 |
| Abbildung 36: Untersuchung des jeweils ersten humanen und murinen Introns auf das Vorliegen phylogenetisch hochkonservierte Bereiche | 67 |
| Abbildung 37: Anstieg der ATGL-mRNA-Menge | 68 |
| Abbildung 38: Anstieg der HSL-mRNA-Menge | 71 |
| Abbildung 39: Repräsentativer Western Blot für ER α -Überexpressionsversuche..... | 73 |
| Abbildung 40: Repräsentativer Western Blot für ER β -Überexpressionsversuche | 74 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Exemplarische Darstellung der zu pipettierenden Volumina..... | 58 |
| Tabelle 2: Relative Promotoraktivität und Signifikanz überexpressionsabhängiger und stimulationsabhängiger Effekte unter Überexpression des ATGL-Luciferase-Konstrukts..... | 62 |
| Tabelle 3: Relative Promotoraktivität und Signifikanz überexpressionsabhängiger und stimulationsabhängiger Effekte unter Überexpression des ATGL-Luciferase-Konstrukts..... | 63 |
| Tabelle 4: ER-Überexpressionsabhängiger Anstieg der Luciferaseaktivität..... | 64 |
| Tabelle 5: Ligandenabhängiger Anstieg der Luciferaseaktivität in ER-überexprimierten Zellen. | 65 |
| Tabelle 6: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER α -Versuchsreihe..... | 68 |
| Tabelle 7: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER β -Versuchsreihe | 69 |
| Tabelle 8: Anstieg der ATGL-mRNA-Menge | 70 |
| Tabelle 9: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER α -Versuchsreihe | 71 |
| Tabelle 10: TWO WAY ANOVA für die Daten der ER β -Versuchsreihe | 71 |
| Tabelle 11: Anstieg der HSL-mRNA-Menge | 72 |
| Tabelle 12: Charakteristika der Luciferasemessung | 76 |
| Tabelle 13: Charakteristika der bioinformatischen Promotoranalyse | 77 |
| Tabelle 14: Charakteristika der qRT-PCR..... | 79 |
| Tabelle 15: Charakteristika des Western Blots | 80 |

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Annekatrin Schwanstecher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Einfluss nukleärer Östrogenrezeptoren auf die Expression der Adipozytären Triglyceridlipase“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

Vorträge

Schwanstecher A, Benz V, Kirsch S, Kintscher U, Foryst Ludwig A: Influence of Estrogen Receptors ERalpha and ERbeta on the expression of Adipose Triglycerid Lipase (ATGL). Diabetes Kongress 2013 – 48. Jahrestagung der DDG, Leipzig 2013 (*Diabetologie und Stoffwechsel Supplement 1 FV42 S16, Mai 2013*)

Poster

Schwanstecher A, Benz V, Kirsch S, Kintscher U, Foryst Ludwig A: Transcriptional regulation of Adipose Triglycerid Lipase (ATGL) by estrogen receptors alpha and beta. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2013 (*Perfusion, Jahrgang 26, Heft 2 S.69, April 2013*)

Schwanstecher A, Benz V, Kirsch S., Kintscher U, Foryst-Ludwig A: Transcriptional regulation of Adipose Triglycerid Lipase (ATGL) expression by Estrogen Receptors α and β . Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2014

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Annekatriin Schwanstecher hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Vorträge

Schwanstecher A, Benz V, Kirsch S, Kintscher U, Foryst Ludwig A: Influence of Estrogen Receptors ERalpha and ERbeta on the expression of Adipose Triglycerid Lipase (ATGL). Diabetes Kongress 2013 – 48. Jahrestagung der DDG, Leipzig 2013 (*Diabetologie und Stoffwechsel Supplement 1 FV42 S16, Mai 2013*)

Erstautorin und Referentin

Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Ausarbeitung und Präsentation des Vortrages

Poster

Schwanstecher A, Benz V, Kirsch S, Kintscher U, Foryst Ludwig A: Transcriptional regulation Adipose Triglycerid Lipase (ATGL) by estrogen receptors alpha and beta. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2013 (*Perfusion, Jahrgang 26, Heft 2 S.69, April 2013*)

Erstautorin und Referentin

Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Ausarbeitung und Präsentation des Posters

Schwanstecher A, Benz V, Kirsch S., Kintscher U, Foryst-Ludwig A: Transcriptional Regulation of Adipose Triglycerid Lipase (ATGL) expression by Estrogen Receptors α and β . Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2014

Erstautorin und Referentin

Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Ausarbeitung und Präsentation des Posters

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Ulrich Kintscher für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe zu einem sehr aktuellen, spannenden Thema zu forschen und meine Ergebnisse auf diversen wissenschaftlichen Kongressen und Tagungen vorzustellen. Neben exzellenter fachlicher Betreuung half mir insbesondere die Flexibilität, die er mir bei der zeitlichen Planung und Umsetzung der Experimente einräumte, parallel zum Studium zu promovieren.

Frau Dr. Anna Foryst-Ludwig danke ich insbesondere für die fachlich hervorragende, engmaschige Betreuung, anregende Diskussionen, ihre Geduld bei meiner Einarbeitung in Zellkultur und Laborarbeit und die Tatsache, dass ich mich bei Fragen und Problemen jederzeit an sie wenden konnte. Bessere Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und der Vorbereitung von Vorträgen und Posterpräsentation hätte ich mir nicht wünschen können!

Ein großer Dank für die tolle Unterweisung in Arbeitstechniken und Laborarbeit gebührt insbesondere der immer geduldigen und hilfsbereiten Beata Höft, aber auch Sebastian Kirsch, Verena Benz und Sabrina Klages.

Vielen Dank an die unermüdliche Jana Grune, die während der Zeit im CCR zu einer guten Freundin für mich geworden ist. Danke dafür, dass ich dich immer um Hilfe bitten und Fragen stellen durfte, (auch sonntagsmorgens!), danke für unsere zahlreichen Mensa-Dates, unsere Koch-Abende, gemeinsames Yoga und alles, was dazu beigetragen hat, dass die (bei zähem Gynäkologie, Urologie und Chirurgie Lernen zwischen den Experimenten) stressige Zeit so viel Spaß gemacht hat.

Danke an meine Eltern und meine Großmutter, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt haben und die offenes Ohr hatten, wenn Studium und Promotion mir über den Kopf zu wachsen schienen.

Danke an Aneeta und Claus für die Auszeiten auf dem Ponyhof, die mir geholfen haben, Studium und Laborarbeit ein bisschen gelassener und mit Distanz zu betrachten.