Aus dem Institut für Pharmakologie, Center for Cardiovascular Research der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

## Metabolische Effekte des Estrogenrezeptors beta durch eine Inhibition des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors gamma

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Hohmann

aus Hamburg

Gutachter:

Prof. Dr. med. U. Kintscher
Prof. Dr. rer. nat. W. Raasch
Prof. Dr. med. H. Krude

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

Meinen Eltern in Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

nhaltsverzeichnis	.I
Abkürzungsverzeichnis II	Π
I. Einleitung	1
1.1 Metabolisches Syndrom	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Geschlechterspezifische Unterschiede	2
1.1.4 Die Bedeutung von Fettgewebe und Adipokinen	4
1.2 Nukleäre Rezeptoren	5
1.3 Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ	7
1.3.1 Expressionsmuster	8
1.3.2 Molekulare Funktionsweise und Mechanismus	8
1.3.3 Funktionelle Studien	9
1.3.4 Durch PPARγ regulierte Zielgene	0
1.4 Estrogenrezeptoren	1
1.4.1 Molekulare Funktionsweise und Mechanismus von ERβ1	1
1.4.2 Metabolische Funktionen von Estrogenen und Estrogenrezeptoren	2
1.4.3 Expression und Regulation von ERα und ERβ1	3
1.5 SRC-1, TIF-2 und DRIP205	3
1.5.1 Funktionelle Bedeutung von SRC-1, TIF-2 und DRIP205 für die Energiehomöostas	se
	4
1.6 Zielsetzung und Hypothese	5
2. Materialien und Methoden	6
2.1 Materialien	6
2.2 Methoden	8
2.2.1 Molekularbiologische Methoden1	8
2.2.2 Arbeiten mit kultivierten Zellen	3
2.2.3 Arbeiten mit Versuchstieren und tierischen Geweben	5
2.2.4 Übersicht über verwendete Oligonukleotidsequenzen	8
2.2.5 Übersicht über verwendete Plasmide	9
2.2.6 Übersicht über verwendete Antikörper	0
2.2.7 Statistische Berechnungen	0

3. Ergebnisse	.31
3.1 Überexpression von ER $\beta$ inhibiert ligandenunabhängig die Aktivität von PPAR $\gamma$	.31
3.2 ER $\beta$ und die Kofaktoren SRC-1 und TIF-2 beeinflussen die Aktivität von PPAR $\gamma$	im
Luziferase-Reporter-Assay	.33
3.3 ERβ vermindert PPARγ-Zielgenexpression in ERβ/PPARγ-kotransfizierten 3T3-I	L1-
Präadipozyten	.35
3.3.1 Mikroskopische Untersuchung	.36
3.3.2 Analyse der PPAR <sub>γ</sub> -Zielgenexpression	.37
3.4 ERβ vermindert PPARγ-Zielgenexpression in ERβ-transfizierten 3T3-L1-Präadipozy	ten
nach partieller Differenzierung	.40
3.4.1 PPARγ-Zielgenexpression	.40
3.5 Untersuchungen an ERβ-Knockout-Mäusen	.42
3.6 Die Bindung von SRC-1 und TIF-2 an den Adiponectin-Promotor ist in $ER\beta^{-/-}$ -Mäus	sen
stärker ausgeprägt als im Wildtyp	.44
3.6.1 ChIP mit Antikörpern gegen TIF-2 und SRC-1	.44
4. Diskussion	.49
4.1 Diskussion der Methoden	.49
4.1.1 Modellsysteme	.49
4.1.2 Transiente Transfektion und Luziferase-Assay	. 50
4.1.3 Quantitative PCR	.51
4.1.4 Chromatin-Immunopräzipitation	. 52
4.2 Diskussion der Ergebnisse	. 53
4.2.1 Interaktion zwischen ER $\beta$ und PPAR $\gamma$ in Adipozyten	. 53
4.2.2 Verminderte Zielgenexpression nach Transfektion	. 54
4.2.3 Mechanismus der Interaktion	. 57
4.2.4 Klinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	. 58
5. Zusammenfassung	.61
6. Abstract	. 62
7. Literatur	.63
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	.75
Danksagung	.76
Curriculum Vitae	.77
Publikationen	. 79
Erklärung	. 80

— II —

# Abkürzungsverzeichnis

15d-PG J <sub>2</sub>	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J <sub>2</sub>					
18S	18S-Untereinheit mitochondrialer rRNA					
Abb.	Abbildung					
AF-1, AF-2	Activation function 1 <i>bzw.</i> –2					
AHA/NHLBI	American Heart Association / National Heart, Lung and Blood Institute					
Ak	Antikörper					
ANOVA	Analysis of variance, univariate Varianzanalyse					
ap2	Adipozytenprotein 2 (=fatty acid binding protein 4)					
ArKO	Aromatase-Knockout					
BMI	Body Mass Index, Körpergewichtsindex					
BSA	Rinder-Serumalbumin					
bzw.	beziehungsweise					
CAR	Konstitutiver Androstanrezeptor					
C/EBPa	CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$					
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation					
CoA	Coenzym A					
CRP	C-reaktives Protein					
DBD	DNA-bindende Domäne					
DMEM	DULBECCO's Minimal Essential Medium					
DMSO	Dimethylsulfoxid					
DNA	Desoxyribonukleinsäure					
DPN	Diarylpropionitril (Selektiver ERβ-Ligand)					
DPBS	DULBECCO's Phosphate Buffered Saline					
DR	Direct repeat					
DRIP205	Vitamin D-interacting protein 205 (= TRAP220, thyroid hormone receptor-					
	associated protein 220)					
dsDNA	Doppelsträngige DNA					
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure					
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure					
$E_2$	Estradiol					
ERα	Estrogenrezeptor a					
ERβ	Estrogenrezeptor $\beta$					

ERE	Estrogen response element
evtl.	eventuell
FATP	Fatty acid transport protein
FBS	Fetales Rinderserum
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GLUT4	(Insulinabhängiger) Glukosetransporter 4
HbA <sub>1c</sub>	Glykiertes Hämoglobin A
HDL	High density lipoprotein
HRE	Hormone response element
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IDF	International Diabetes Federation
IP	Immunopräzipitation
IRS-1, IRS-2	Insulin receptor substrate 1 bzw. 2
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
М	mol/l
mM	mmol/l
μΜ	μmol/l
mRNA	Messenger RNA
N-CoR	Nuclear receptor corepressor
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Nonidet-P40
NR	Nukleärer Rezeptor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPARγ	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PPRE	PPAR response element
РРТ	Propylpyrazoltriol (Selektiver ERα-Ligand)
RIAD	Risk factors in Impaired Glucose Tolerance for Atherosclerosis and Diabetes
	Study
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	9-cis-Retinsäure-Rezeptor (Retinoid X Receptor)

SEM	Standard error of the mean, Standardfehler der Mittelwerte				
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator				
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors				
SPPARyM	Selektiver PPARy Modulator				
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator 1				
Tab.	Tabelle				
TIF-2	Transcription intermediary factor 2 (=GRIP-1, glutamate receptor interaction				
	protein 1)				
TNFα	Tumornekrosefaktor a				
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor				
TRAP/DRIP	P [Thyroid receptor-associated protein / Vitamin D receptor-interacting protein]-				
	Komplex				
TZD	Thiazolidindion (=Glitazon)				
WHO	Weltgesundheitsorganisation				
ZNS	Zentrales Nervensystem				

## 1. Einleitung

## 1.1 Metabolisches Syndrom

#### 1.1.1 Definition

Mit dem Begriff Metabolisches Syndrom wird eine Kombination verschiedener Stoffwechselstörungen definiert, die mit Insulinresistenz verknüpft sind und mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer und anderer Folgeerkrankungen einhergehen [1]. Schon 1923 beschrieb Kylin ein "Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom" [2] und erkannte damit erstmals die enge Verbindung eines gestörten Glukosemetabolismus mit kardiovaskulären Risikofaktoren. Reaven benannte 1988 Insulinresistenz und Hyperinsulinämie als zugrunde liegende Ursachen von Hyperlipidämie und Hypertonie [3], ein pathophysiologisches Konzept, das in der Folge als Syndrom X oder Metabolisches Syndrom bekannt wurde.

Über die genaue Definition und die enthaltenen Teilaspekte des Metabolischen Syndroms herrscht Kontroverse, doch die Definitionen von Weltgesundheitsorganisation (WHO) [4], International Diabetes Federation (IDF) [5], American Heart Association / National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI) [6] und anderer Fachgesellschaften ähneln sich darin, dass sie eine Kombination mehrerer der Faktoren Adipositas, Dyslipidämie, Hypertonie und pathologische Nüchternglukosewerte fordern. Die IDF-Definition zeigt Tab. 1.1.

Kriterium	Definition		
Zentrale Adipositas	Bauchumfang oberhalb eines Wertes entsprechend dem ethnischen Hintergrund des Patienten. Für Europäer: $\bigcirc^{1} > 94$ cm, $\bigcirc^{2} > 80$ cm		
Dyslipidämie (Triglyceride)	Triglyceride > 1,7 mmol/l oder in Behandlung für diese Störung		
Dyslipidämie (HDL-Cholesterin)	HDL-Cholesterin $\stackrel{?}{\bigcirc} \le 1,03 \text{ mmol/l}, \stackrel{\bigcirc}{=} \le 1,3 \text{ mmol/l}$ oder in Behandlung für diese Störung		
Hypertonie	Systolischer Blutdruck $\geq$ 130 mmHg oder diastolischer Blutdruck $\geq$ 85 mmHg oder in Behandlung für diese Störung		
Gestörte Glukosetoleranz	Nüchternglukose $\geq$ 5,6 mmol/l oder diagnostizierter Diabetes mellitus Typ II		
Diagnose Metabolisches Syndrom	Zentrale Adipositas und $\geq 2$ weitere Kriterien.		

Tab. 1.1: Die IDF-Definitio	n des Metabolischen	Syndroms	(2005) [5]
-----------------------------	---------------------	----------	------------

## 1.1.2 Epidemiologie

Zunehmender Wohlstand und die damit verbundene bessere Ernährungssituation sowie ein Lebensstil, der vom Einzelnen kaum körperliche Betätigung verlangt, haben in den letzten Jahrzehnten den Anteil übergewichtiger Menschen an der Gesamtpopulation dramatisch steigen lassen [7]. Ein Maß für das Körpergewicht im Verhältnis zur Körpergröße ist der Body mass index (BMI), der Quotient aus Körpergewicht und Körpergröße zum Quadrat. In den USA galten 2004 32,9% der Erwachsenen als adipös (30 kg/m<sup>2</sup>  $\leq$  BMI < 40 kg/m<sup>2</sup>), 1980 waren es noch 15,0% [8]. In Deutschland hat die Nationale Verzehrsstudie II gezeigt, dass 20,5% der Männer und 21,1% der Frauen hierzulande einen BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup> haben [9]. Die Verteilung des Übergewichts in verschiedenen Altersgruppen zeigt Abb. 1.1. Für das Metabolische Syndrom nach IDF-Definition wird in den USA eine Prävalenz von 39,1% in der allgemeinen Bevölkerung über 20 Jahre (Männer: 40,7%, Frauen: 37,1%) angegeben [10], in Deutschland haben Moebus et al. in einer Studie an 35.869 Allgemeinarztpatienten ab 18 Jahren einen Wert von 32,7% (Männer: 40,3%, Frauen: 28,0%) gefunden [11].

In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass das Metabolische Syndrom mit einem hohen Risiko kardiovaskulärer Ereignisse vergesellschaftet ist [1]. Umstritten ist allerdings, inwieweit dieses Risiko über die Summe der einzelnen etablierten Risikofaktoren hinausgeht und welche klinische Bedeutung das Syndrom hat [12,13]. Eine prospektive Populationsstudie lieferte kürzlich Hinweise darauf, dass die Diagnose des Metabolischen Syndroms im Alter von 50 Jahren ein von bekannten Risikofaktoren unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Mortalität ist [14].

#### **1.1.3 Geschlechterspezifische Unterschiede**

Die geschlechterspezifischen Prävalenzen des Metabolischen Syndroms weisen abhängig von Definition, Ethnie und Land eine beträchtliche Streuung auf, mit im Allgemeinen höheren Werten für Männer [10,11,15]. Dabei zeigen einzelne Aspekte des Syndroms deutliche Unterschiede [15]: Sowohl in einer großen Populationsstudie auf Mauritius [16] als auch in der RIAD-Studie [17] wiesen Frauen ohne manifesten Diabetes häufiger als Männer eine gestörte Glukosetoleranz auf. männliche Probanden hatten dagegen im Mittel höhere Nüchternblutzuckerwerte. Es scheint, dass bei Frauen die prädiabetische Stoffwechsellage eher durch eine frühzeitig gestörte Insulinsekretion bedingt wird, wohingegen bei Männern die Insulinresistenz führend ist [17]. Frauen neigen zudem eher zu peripherer, subkutaner, Männer eher zu zentraler, viszeraler Adipositas [18]. Insbesondere der zentrale (androide) Fettverteilungstyp ist mit vermehrten metabolischen Risikofaktoren und kardiovaskulärer Mortalität assoziiert [15,19]. Nach der Menopause verändert sich die weibliche Fettverteilung in Richtung des androiden Typs: Selbst unter Berücksichtigung von Alterseffekten auf das Körpergewicht und den Anteil von Fettgewebe steigt der Anteil intraabdominellen Fetts innerhalb weniger Jahre nach der Menopause signifikant an [20].



Im Mausmodell zeigen weibliche Tiere signifikant höhere zirkulierende Spiegel des Fettgewebshormons Adiponectin (vgl. Kap. 1.1.4) [21], ein Unterschied, der auch beim Menschen beobachtet werden konnte [22]. Dies ist im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Fettverteilung zu sehen, da die Adiponectinsekretion in subkutanem Fettgewebe im Gegensatz zu derjenigen in viszeralem Fett nicht durch Adipositas supprimiert wird [23].

Auch das Lipidprofil, ein weiterer Aspekt des Metabolischen Syndroms, unterscheidet sich

zwischen den Geschlechtern: Männer weisen einen höheren Spiegel an Triglyceriden und Lowdensity-Lipoprotein-(LDL-)Cholesterin im Blut auf als Frauen, wobei auch hier, wie schon bei der Fettverteilung, sich die Situation nach der Menopause den männlichen Verhältnissen angleicht [18]. Analog dazu sinkt der Spiegel an protektiv wirkendem High-density-Lipoprotein-(HDL-)Cholesterin, der bei prämenopausalen Frauen höher ist als bei Männern, nach der Menopause ab. Frauen mit Metabolischem Syndrom weisen zudem in einer großen Populationsstudie signifikant höhere Plasmaspiegel des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) auf [24]. Die Beobachtung, dass sich alle diese Veränderungen bei Patientinnen unter Hormonersatztherapie weniger stark ausprägen, spricht dafür, dass es sich nicht um unspezifische Alterserscheinungen handelt [18].

Schließlich entwickeln Frauen seltener eine arterielle Hypertonie als Männer, ein Effekt, der sich in höherem Alter jedoch umkehrt. Viszerales Fettgewebe ist mit der Entwicklung von Hypertonie assoziiert, so dass auch hier die unterschiedlichen Verteilungstypen eine große Rolle spielen [15].

Die genauen molekularen Ursachen dieser Geschlechterunterschiede sind noch weitgehend unklar, eine metabolische Funktion von Estrogen und Estrogenrezeptoren spielt aber eine Rolle (vgl. Kap. 1.4.2).

#### 1.1.4 Die Bedeutung von Fettgewebe und Adipokinen

Obwohl bis zu 75% der Glukoseverwertung in der Muskulatur stattfinden und das Fettgewebe nur einen kleinen Anteil daran trägt [25], ist die Bedeutung der Adipozyten für eine geordnete Regulation der Energiehomöostase nicht zu unterschätzen. Sowohl Adipositas als auch eine Dysfunktion des Fettgewebes (Lipodystrophie) führen zu Insulinresistenz und Hyperglykämie [26]. Die früher verbreitete Sicht auf Fettgewebe als einen weitgehend passiven Energiespeicher wandelte sich mit der Identifikation und Charakterisierung von Leptin [27] als erstem sogenannten Adipokin (Fettgewebshormon). Zwischenzeitlich sind weitere Adipokine entdeckt worden, von denen mehrere Einfluss auf die Insulinsensitivität in anderen Geweben ausüben. Einen ausführlichen Review bietet Ref. [28].

Besondere Beachtung verdient dabei Adiponectin, das mit vielen Aspekten des Metabolischen Syndroms in Verbindung gebracht wird. Adiponectin ist ein Protein, das überwiegend in Adipozyten exprimiert und sezerniert wird [29,30]. Die Konzentration im Plasma, immerhin etwa 0,01% des gesamten Plasmaproteins [28], nimmt mit zunehmender Körperfettmasse ab und ist bei adipösen Individuen signifikant reduziert [29]. Dabei scheint vor allem die Sekretion aus dem viszeralen Fett mit steigendem BMI zu sinken, wohingegen subkutanes Fettgewebe nicht in

dieser Weise beeinflusst wird [23].

Im Tierexperiment zeigt Adiponectin einen direkten insulinsensitivierenden Effekt: Im Mausmodell für Diabetes Typ II weisen die Tiere unter Hochfettdiät erniedrigte Serum-Adiponectinspiegel auf. Durch Gabe von rekombinantem Adiponectin lassen sich sowohl die Insulinsensitivität als auch das Lipidprofil verbessern. Adiponectin-Knockout-Mäuse zeigen einen Phänotypen mit Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Hypertonie, der dem Metabolischen Syndrom ähnelt [31]. Beim Menschen liegt eine von 9 Mutationen, die in einer japanischen Studie mit Diabetes Typ II in Verbindung gebracht wurden, im Bereich des Adiponectin-Gens [31], außerdem konnten Baratta et. al. bei 242 Patienten eine signifikante Korrelation zwischen Adiponectinspiegel und Insulinsensitivität zeigen [32].

Weiterhin ist eine niedrige Adiponectinkonzentration im Plasma ein von anderen Risikofaktoren unabhängiger Prädiktor für die die Entwicklung von Hypertonie [33] und korreliert mit Dyslipidämie [32]. Regelmäßiges körperliches Training steigert den Adiponectinspiegel [34].

Klinische Bedeutung hat diese hormonelle Aktivität des Fettgewebes vor allem im Zusammenhang mit dem Einsatz von Thiazolidindionen (TZD) als Insulinsensitizer. Diese Pharmaka sind PPARγ-Agonisten und greifen hauptsächlich in Adipozyten an. Ihre Wirkung auf die Insulinresistenz scheinen sie indirekt durch erhöhte Adiponectin-Sekretion und damit verbundene Insulinsensitivierung der Zielgewebe sowie durch verbesserte Fettgewebsfunktion und Reduktion der Lipidbelastung anderer Organe zu erzielen [35].

## 1.2 Nukleäre Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren (NR) stellen eine der größten Gruppen von Transkriptionsregulatoren in tierischen Zellen dar. Sie steuern die koordinierte Expression spezifischer Gene in Anpassung an physiologische, ontogenetische und metabolische Prozesse [36]. Die 48 im humanen Genom identifizierten NR sind Mitglieder einer phylogenetisch alten Familie von evolutionär verwandten Transkriptionsfaktoren, die durch Bindung an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Genexpression steuern. Für etwa die Hälfte dieser Rezeptoren sind physiologische oder synthetische Liganden bekannt, die an den Rezeptor binden und ihn aktivieren [37]. Dabei wurde unsere Vorstellung von der molekularen Wirkungsweise nukleärer Rezeptoren in den letzten Jahren zunehmend komplexer. Eine Fülle von Kofaktoren mit unterschiedlichen Funktionen (z.B. enzymatische Aktivitäten, Adaptorproteine) bereiten die DNA auf den Ablesevorgang vor, modulieren, unterstützen oder supprimieren die transkriptionsaktivierende Wirkung der NR oder beschränken sie auf einzelne Zielgene. Dabei dirigiert nicht nur ein NR ein ganzes Orchester von

Koregulatoren, auch ein einzelner Koregulator kann durchaus mit verschiedenen NR interagieren. Dieser Wettbewerb um Bindungsplätze und die Konkurrenz um einen Pool gemeinsam genutzter Kofaktoren bilden eine Ebene der Koordination zellulärer Abläufe, die noch vergleichsweise wenig erforscht ist [38].

NR zeigen bei aller Diversität eine typische Struktur: Das Protein besteht aus 5-6 distinkten Regionen, die beginnend am N-Terminus mit den Buchstaben A-F bezeichnet werden. Einzelne Regionen sind zwischen unterschiedlichen NR verschieden stark konserviert, die stärkste Homologie weist die DNA-bindende Domäne (DBD) in Region C auf [37].

In der N-terminalen Region A/B findet sich eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (activation function 1, AF-1), die allerdings im Inneren des Rezeptors verborgen ist, wenn kein Ligand gebunden ist [37]. Dieser hochvariable Bereich kann mit einigen Koaktivatoren und anderen Transkriptionsfaktoren interagieren [39]. Die DBD in Region C besteht u.a. aus 2 Zinkfingerstrukturen, deren jeweils 4 Cysteinreste ein Zink-Ion komplexieren, und einem als P-Box bezeichneten Aminosäuremotiv. Während die Zinkfinger allgemein eine Bindung an die DNA ermöglichen, bewirkt die P-Box eine Spezifität für DNA-Sequenzen, die als Hormone Responsive Element (HRE) bezeichnet werden [37]. HREs bestehen aus charakteristischen Anordnungen (d.h. Wiederholungen oder reverse Komplemente) von 2 Kopien der Hexanukleotidsequenz AGAACA oder AGGTCA, die durch eine bis fünf Basen voneinander getrennt sind [40]. Die meisten NR binden als Homodimere oder als Heterodimere an DNA [37]. Getrennt durch die scharnierähnliche D-Region folgt schließlich die Ligandenbindungsdomäne (LBD) in der Region E des Rezeptors. NR-Liganden sind prinzipiell kleine, lipophile Moleküle, die sich sterisch in die taschenförmige LBD einfügen. Die Ligandenspezifität entsteht durch günstig positionierte hydrophile Aminosäurereste in der sonst hydrophoben Bindungstasche. Es scheint, dass durch Ligandenbindung der im unbesetzten Zustand bewegliche Rezeptor stabilisiert wird und in dieser rigideren Konformation besser als Partner für Dimerisierung und Koaktivatorbindung zu Verfügung steht [41]. Die Andockstelle für Koregulatoren wird als activation function 2 (AF-2) bezeichnet. Eine charakteristische Bindungsstelle, die aus dem Aminosäuremotiv LXXLL (L=Leucin, X=beliebig) bestehende sog. NR box, ist hinreichend und notwendig für die Bindung von Koaktivatoren an NR [42].

Die Organisation genomischer DNA als Chromatin macht es erforderlich, dass der abzulesende Bereich vor dem Transkriptionsvorgang freigelegt wird. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA sind im transkriptiv inaktiven Heterochromatin elektrostatisch an positiv geladene Lysinreste der Histonproteine gebunden und damit der Transkriptionsmaschinerie nicht zugänglich. Einige Koaktivatoren wie Steroid Receptor Coactivator 1 (SRC-1) [43] und Transcription intermediary factor 2 (TIF-2) [44] acetylieren nach ihrer Rekrutierung durch NR diese Lysinreste und lösen damit die DNA von den Histonproteinen [45]. Eine andere Gruppe von Faktoren, das aus über einem Dutzend Proteinen bestehende TRAP/DRIP-Konglomerat, wird für die Anlagerung von RNA-Polymerase II an den ligandenbesetzten NR benötigt [46]. Vor allem das Vitamin D-interacting protein 205 (DRIP205) [47] spielt eine bedeutende Rolle in diesem Komplex.

Die entgegengesetzte Funktion erfüllen Korepressoren wie N-CoR oder SMRT: Sie assoziieren mit NR, wenn diese keinen Liganden gebunden haben oder durch (synthetische) Antagonisten besetzt sind und verhindern unter anderem durch Histondeacetylierung die Transkription des Zielgens [48].

## 1.3 Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor y

Als Peroxisomenproliferatoren werden eine Reihe chemisch heterogener Substanzen bezeichnet, die in der Leber von Nagern zu einer Vermehrung der Peroxisomen führen. Dazu gehören Fibrate, eine Klasse lipidsenkender Pharmaka, ebenso wie Phthalat-Ester (Weichmacher in Kunststoffen) und einige Herbizide [49]. Issemann et al. konnten 1990 zeigen, dass diese Wirkung über einen NR vermittelt wird, den sie *Peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) nannten [50]. Bald darauf wurde erst bei *Xenopus*-Fröschen [51] und anschließend auch in Säugetieren [52] eine ganze Familie von PPARs identifiziert, die mit PPAR $\alpha - \gamma$  bezeichnet wurden.

Sowohl PPAR $\alpha$  als auch PPAR $\delta$  (entspricht PPAR $\beta$ ) spielen beim Menschen eine Rolle in der Regulation der Energiehomöostase. PPAR $\alpha$  aktiviert in der Leber den Fettsäurekatabolismus und die Glukoneogenese. Die Senkung der Triglyceridspiegel im Blut durch eine Aktivierung des Rezeptors macht die Wirkung der PPAR $\alpha$ -agonistischen Fibrate aus [53]. PPAR $\delta$  steuert die adaptive Thermogenese und kontrolliert daneben Zellproliferation und –differenzierung unter anderem in der embryonalen Entwicklung des Magen-Darm-Kanals [53].

Von PPAR $\gamma$  konnten in der Maus [54,55] und später auch beim Menschen [56] zwei Isoformen (PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2) nachgewiesen werden, die durch alternatives Spleißen entstehen. PPAR $\gamma$ 2 enthält 30 zusätzliche N-terminale Aminosäuren und wird im Gegensatz zu PPAR $\gamma$ 1 exklusiv in Adipozyten exprimiert [57]. Die Aminosäuresequenzen von humanem und murinem PPAR $\gamma$  sind zu 95% identisch, unter Berücksichtigung konservativer Aminosäuresubstitutionen stimmen die Proteine sogar zu 99% überein [58]. Natürliche Liganden von PPARy sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure und Arachidonsäure sowie das Prostaglandinderivat 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PG J<sub>2</sub>). Die Rezeptoraffinitäten für diese Stoffe liegen im Bereich der Serumkonzentration, allerdings ist ihre intrazelluläre Konzentration nicht bekannt und die tatsächliche physiologische Bedeutung damit ungewiss [59]. Große klinische Bedeutung haben synthetische PPARy-Liganden, in erster Linie TZD, als Antidiabetika. PPARy-Stimulation durch Pioglitazon oder Rosiglitazon erhöht die Insulinsensitivität durch Aufnahme freier Fettsäuren aus dem Blut ins Fettgewebe und verstärkte Sekretion von insulinsensitivierenden Adipokinen wie Adiponectin. Außerdem haben sie offenbar direkte Effekte auf die Expression und Translokation von Glukosetransportern in Leber und Muskulatur [35,60]. TZD zeigen darüber hinaus jedoch auch eine Reihe von unerwünschten Arzneimittelwirkungen: Sie führen zu Gewichtszunahme und Flüssigkeitsretention und sind deshalb bei vorbestehender Herzinsuffizienz kontraindiziert [60]. Studien zeigen für Rosiglitazon außerdem ein 40% erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte und einen Trend zu kardiovaskulärer Übersterblichkeit [61]. Diese Einschränkungen haben zu einer Suche nach alternativen Liganden, sog. Selektiven PPARy Modulatoren (SPPARyM) geführt, die, in Analogie zu den Selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERM), günstigere und differenziertere Zielgenexpressionsprofile zeigen sollen. Der AT1-Blocker Telmisartan, bisher in der Hypertonietherapie etabliert, zeigt solche SPPARyM-Eigenschaften [62], weitere Substanzen befinden sich in der Entwicklung [63].

#### 1.3.1 Expressionsmuster

Beim Menschen wird PPAR $\gamma$ 2 ausschließlich im Fettgewebe exprimiert. Auch PPAR $\gamma$ 1 findet sich in erster Linie in Adipozyten, außerdem ist entsprechende Messenger RNA (mRNA) in der Darmwand, in Monozyten/Makrophagen und in geringerem Maße in Leber, Skelettmuskel, Herz, Gefäßen und Niere nachweisbar [56,58]. Im Mausmodell sieht die Verteilung ähnlich aus, außer dass hier eine geringe Menge PPAR $\gamma$ 2 auch im Skelettmuskel gefunden wird [64].

#### 1.3.2 Molekulare Funktionsweise und Mechanismus

PPAR $\gamma$  interagiert mit der DNA über ein spezifisches, als PPAR response element (PPRE) bezeichnetes Motiv: Zwei Instanzen der Basensequenz AGGTCA, getrennt durch eine beliebige Base (DR-1, direct repeat 1) [40]. Dabei bindet der Rezeptor immer als Dimer mit dem Retinsäure-Rezeptor (RXR) an diese Konsensus-Sequenz, und zwar in einer definierten Ausrichtung: PPAR $\gamma$  auf der 5'– und RXR auf der 3'-Seite [65].

Dieses Dimer ist auch in Abwesenheit eines Liganden an das PPRE gebunden, die Transkription

der regulierten Zielgene wird aber durch Assoziation mit Korepressoren wie N-CoR und SMRT verhindert [66]. Nach Bindung von Liganden dissoziieren die Korepressoren vom Rezeptor und Koaktivatoren werden rekrutiert. Wie Yang und Kollegen elegant zeigen konnten, binden dabei in einem ersten Schritt Koaktivatoren der p160-Familie (SRC-1, TIF-2 u.a.) an die AF-2 Domäne des RXR und anschließend, nach erfolgter Histon-Acetylierung und Dissoziation der p160-Kofaktoren vom Rezeptor, der DRIP/TRAP-Komplex an die PPAR $\gamma$ -Seite des Dimers [65]. In Abwesenheit von RXR wird allerdings auch eine direkte Bindung von SRC-1 und TIF-2 an PPAR $\gamma$  beobachtet [65]. Schließlich rekrutiert dieser Komplex RNA-Polymerase II und die Transkription beginnt.

#### **1.3.3 Funktionelle Studien**

PPARγ ist *der* zentrale Regulator der Adipogenese. Während eine systemische Deletion von PPARγ im Mausmodell am Tag 10 p.c. intrauterin letal ist [67], konnte die Bedeutung des Rezeptors durch einen adipozytenspezifischen PPARγ-Knockout gezeigt werden: Die Knockout-Tiere zeigen eine deutlich verminderte Fettgewebsmasse und eine reduzierte Expression von Schlüsselenzymen der Lipogenese und Lipidspeicherung. Zudem wird IRS-1, ein Element des intrazellulären Insulinsignalweges, vermindert exprimiert. Die zirkulierenden Adiponectin- und Leptin-Spiegel sind reduziert, freie Fettsäuren im Plasma dagegen erhöht. Unter Hochfettdiät zeigen die Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp stärkere Insulinresistenz [68].

Dass PPAR $\gamma$ -Expression nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Adipogenese ist, zeigt die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten nach retroviraler Expression von PPAR $\gamma$  in diesen Zellen [69].

Einblicke in die physiologische Funktion von PPARy beim Menschen liefern natürlich vorkommende Mutationen: Die häufigste Veränderung beim Menschen ist die Pro12Ala-Mutation in PPARy2. Dieser Aminosäureaustausch, der die DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung reduziert, ist mit geringerem BMI [70], aber einem etwa 25% erhöhten Risiko für Diabetes Mellitus Typ II [71] assoziiert. In Einzelfällen beschriebene vollständig transkriptionsinaktive PPARy-Mutanten, die auch die Funktionsfähigkeit des normalen Allels einschränken (sog. dominant-negative Mutationen) und damit PPARy-Aktivität global reduzieren, sind mit schwerer Insulinresistenz, reduzierter Körperfettmasse, partieller Lipodystrophie und deutlicher Dyslipidämie assoziiert, außerdem zeigen die Patienten weitere Auffälligkeiten wie Hepatosteatose und teilweise sehr früh einsetzende Hypertonie [72]. Schließlich bietet die weite klinische Verbreitung von TZD als Antidiabetika weitere Erkenntnisse über die Effekte einer PPARy-Aktivierung (Übersicht in [60] und [73]): Unter TZD

verändert sich die Morphologie der Adipozyten hin zu kleineren Zellen, die insulinsensitiver sind und vermehrt Schlüsselenzyme der Lipogenese und Lipidspeicherung exprimieren. Außerdem findet eine Umverteilung von viszeralem zu subkutanem Fett statt. Die hepatische und periphere Insulinsensitivität steigt, gleichzeitig verbessern sich Labormarker für Diabetes Mellitus wie HbA<sub>1c</sub> und Nüchternglukose. Zudem sinkt der Plasmaspiegel an freien Fettsäuren und Triglyceriden, und für Pioglitazon wurde ein Anstieg des HDL-Cholesterins beschrieben [74]. Schließlich wird über eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  in Makrophagen die subklinische Entzündung, die mit dem Metabolischen Syndrom oft einhergeht, gedämpft, außerdem verbessern PPAR $\gamma$ -Agonisten die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) im Endothel und mindern ein unerwünschtes Gefäßremodelling [60,73].

Die aufgeführten Effekte lassen erkennen, wie eng die Funktion von PPAR $\gamma$  mit den einzelnen Facetten des Metabolischen Syndroms verknüpft ist. Mit wachsendem Bewusstsein für die Mechanismen, die PPAR $\gamma$  regulieren, wird auch das Verständnis für die Ätiologie dieses Symptomenkomplexes wachsen.

#### 1.3.4 Durch PPARy regulierte Zielgene

Die meisten bekannten Zielgene, die durch PPAR $\gamma$  reguliert werden, haben seiner Rolle als "Master regulator" des Fettgewebes entsprechend eine Funktion im Rahmen der Lipidsynthese und Energiehomöostase. Einige PPAR $\gamma$ -abhängige Gene im Fettgewebe zeigt Tab. 1.2.

Gen	Regulation bei	Vermutete Funktion
	PPARγ-Aktivierung	
ap2	Verstärkte Expression	Intrazelluläre Bindung und Transport von Fettsäuren
Acyl-CoA-Synthetase	Verstärkte Expression	Lipogenese und/oder –katabolismus
Lipoproteinlipase (LPL)	Verstärkte Expression	Hydrolyse von triglyceridhaltigen Lipoproteinen
GLUT4	Repression aufgehoben [75]	Insulinabhängiger Glukosetransport
FATP-1	Verstärkte Expression	Fettsäuretransporter auf der Zelloberfläche
Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)	Verstärkte Expression	Intrazellulärer Insulinsignalweg
Adiponectin	Verstärkte Expression	Adipokin, vgl. Kap. 1.1.4
ΤΝFα	Verminderte Expression	Proinflammatorisches Zytokin
Leptin	Verminderte Expression	Anorexigenes Adipokin

Tab. 1.2: Auswahl PPARγ-regulierter Gene in weißem Fettgewebe, nach [59]

## 1.4 Estrogenrezeptoren

In den 1950er Jahren charakterisierte Jensen erstmals ein Estrogen bindendes Protein, den heute als Estrogenrezeptor a (ERa) bekannten Rezeptor [76]. Einige Jahre nachdem 1986 zwei Gruppen zeitgleich und unabhängig voneinander einen ER identifiziert und kloniert hatten [77.78], zeigte die Entwicklung einer ER( $\alpha$ )<sup>-/-</sup>-Maus durch Lubahn et al. [79], dass auch bei Ausschaltung des damals bekannten ER weiterhin Estrogenbindung im Gewebe beobachtet werden konnte. Die Gruppe um Gustafsson konnte schließlich zunächst in der Ratte einen zweiten Estrogenrezeptor (Estrogenrezeptor  $\beta$ , ER $\beta$ ) identifizieren, der kurz darauf auch bei Maus und Mensch nachgewiesen wurde [80-82]. Beide Rezeptoren werden von unabhängigen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert. Während die Homologie von humanem und murinem ERß recht groß ist (98,5% in der DBD / 91,9% in der LBD), unterscheiden sich humaner ERB und ERa voneinander vor allem in der Ligandenbindungsdomäne deutlich (Homologie: 97,0% der DBD / 59,1% der LBD) [82]. Dieser Unterschied in der LBD kann erklären, warum beide Subtypen zwar mit ähnlicher Affinität Estradiol (E<sub>2</sub>) binden, bei anderen Liganden aber deutliche Unterschiede aufweisen [83]. Substanzen wie Propylpyrazoltriol (PPT) für ERα und Diarylpropionitril (DPN) für ERβ oder die SERM Tamoxifen und Raloxifen bieten die Möglichkeit, einzelne Rezeptoren gezielt zu aktivieren [84].

#### 1.4.1 Molekulare Funktionsweise und Mechanismus von ERβ

Estrogenwirkungen können auf zellulärer Ebene auf verschiedene Weise vermittelt werden. Zum einen können ER als klassische NR nach Ligandenbindung Homodimere bilden und an Estrogen Response Elements (ERE) der DNA binden. Die Konsensussequenz eines ERE besteht aus einer palindromischen Anordnung der Halbsequenz AGGTCA, getrennt durch drei Basen [85]. Allerdings weichen viele natürliche ERE von dieser Konsensus-Sequenz mehr oder minder stark ab [86].

Neben diesem klassischen Weg können ER auch mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Fos/Jun oder Sp1 interagieren und so indirekt die Transkription von Genen ohne ERE beeinflussen [87]. Interessant ist, dass beispielsweise Raloxifen über den ERE-Weg als Antagonist wirkt, indirekt via ERβ und Fos/Jun aber als Agonist [87]. Einen dritten Signalweg stellen bislang schlecht verstandene rapide, nicht-genomische Estrogenwirkungen dar. Unklar ist, ob diese über die klassischen ER vermittelt werden oder ob gesonderte membranassoziierte Rezeptortypen existieren [87]. Schließlich können neben diesen ligandenvermittelten Mechanismen ER auch ligandenunabhängig durch Phosphorylierung aktiviert werden, eine Eigenschaft, die zum

hormonunabhängigem Wachstum von Tumoren beitragen kann [87].

Die Interaktion zwischen ER $\beta$  und Koregulatoren ist variabel und abhängig von Zielgen und Gewebe. Wie Klinge et al. zeigen konnten, bestimmen geringe Variationen in der Sequenz der ERE das Set der jeweils rekrutierten Kofaktoren und deren Wirkung als Aktivatoren oder Repressoren [86]. Unter anderem sind SRC-1 und TIF-2 in dieser Regulation involviert, außerdem die Korepressoren N-CoR und SMRT [86]. Im Gegensatz zu ER $\alpha$  bindet ER $\beta$  die Koaktivatoren SRC-1 und TIF-2 konstitutiv, d.h. auch in Abwesenheit von Liganden. Allerdings verstärkt E<sub>2</sub> diese Bindung weiter [88].

#### **1.4.2 Metabolische Funktionen von Estrogenen und**

#### Estrogenrezeptoren

Estrogene sind an einer Vielzahl physiologischer Funktionen beteiligt, unter anderem an der Entwicklung und Erhaltung reproduktiver Funktionen und geschlechterspezifischer Phänotypen, der Ausprägung männlicher wie weiblicher Sexualorgane, der Skelettentwicklung, metabolischen und kardiovaskulären Funktionen und an unterschiedlichen Leistungen des ZNS wie Lernen, Feinmotorik sowie der Steuerung der Hormonhomöostase im Gesamtorganismus [84,89,90]. Im Folgenden sollen die metabolischen Funktionen von Estrogenen näher betrachtet werden.

Wichtige Erkenntnisse über die Bedeutung von Estrogenen und ER liefern Knockoutmodelle: Das Enzym Aromatase spielt eine Schlüsselrolle in der Bildung von Estrogenen aus Testosteron. Aromatase-KO-Mäuse (ArKO) können deshalb kein  $E_2$  bilden [91]. Mit Knockouts von ER $\alpha$ [79] oder ER $\beta$  [92] lassen sich die Beiträge der beiden ER weiter aufschlüsseln.

Männliche wie weibliche ArKO-Mäuse sind signifikant schwerer als der Wildtyp und weisen einen größeren Anteil von weißem Fettgewebe am Körpergewicht auf. Das Adipozytenvolumen ist vermehrt [93]. Männliche ArKO-Tiere entwickeln im Verlauf des ersten Lebensjahres eine Insulinresistenz und pathologische Glukosetoleranz [94]. Sowohl Glukosetoleranz als auch Insulinsensitivität verbessern sich bei frühzeitiger E<sub>2</sub>-Substitution, wie auch unter Gabe von Pioglitazon [94]. Einen ähnlichen Phänotyp zeigen natürlich vorkommende Aromatasemutationen bei Männern, die bereits in jungen Jahren zu Diabetes Mellitus Typ II und Dyslipidämie führen. Auch diese metabolischen Störungen sind unter E<sub>2</sub>-Substitution reversibel [95].

ERα<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen nach der Pubertät bei normaler Diät ein erhöhtes Körpergewicht, vermehrtes Fettgewebe und erhöhte Cholesterinspiegel im Vergleich zum Wildtyp [96]. Nüchternglukose, Insulinspiegel und die Werte nach einer Glukosebelastung sind erhöht, Adiponectin im Plasma ist erniedrigt [97]. Der metabolische Phänotyp von  $ER\beta^{-/-}$ -Tieren auf Normaldiät gleicht dagegen dem Wildtyp [96], insbesondere sind Nüchternglukose, Glukosetoleranz und Insulinsekretion normal [97]. Ein Patient mit Estrogenresistenz auf Grund einer homozygoten Mutation im ER $\alpha$ -Gen wurde mit gestörter Glukosetoleranz und Hyperinsulinämie beschrieben [98].

Immunhistologisch lässt sich zeigen, dass Muskelzellen von  $ER\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp, aber auch im Vergleich zu  $ER\beta^{-/-}$ -Mäusen weniger mRNA des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT4 exprimieren und eine reduzierte Dichte von GLUT4-Protein in der Zellmembran aufweisen [99]. Selektive ER $\beta$ -Stimulation mit DPN in ArKO-Mäusen führt zu einer deutlichen Abnahme der GLUT4-Expression sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran, ein Effekt, der mit ER $\alpha$ -selektivem PPT nicht auftritt [99].

Zusammenfassend scheint es, dass Estrogen über ER $\alpha$ -Rezeptoren einen günstigen Effekt auf die Glukose- und Lipidhomöostase ausübt. Der möglicherweise entgegengesetzte Effekt einer Aktivierung von ER $\beta$ -Rezeptoren ist weniger gut untersucht.

#### 1.4.3 Expression und Regulation von ERα und ERβ

Vor dem Hintergrund der großen metabolischen Bedeutung von Fettgewebe und dem Geschlechtsdimorphismus im Lipidmetabolismus [18] stellt sich die Frage, wie Estrogenrezeptoren in Adipozyten exprimiert und reguliert werden.

Dieudonné et al. konnten zeigen, dass sowohl viszerale als auch subkutane humane Adipozyten beider Geschlechter ER $\alpha$  und ER $\beta$  exprimieren, wobei jedoch die ER $\alpha$ -Expression diejenige von ER $\beta$  um etwa den Faktor 1000 übertrifft. In beiden Fettdepots ist die Expression von ER $\beta$ , nicht aber von ER $\alpha$ , bei Frauen im Vergleich zu Männern erhöht [100]. E<sub>2</sub> reguliert die Expression seiner Rezeptoren, doch zeigt diese E<sub>2</sub>-abhängige ER-Expression im Fettgewebe deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern und unterstreicht die qualitative Verschiedenheit von viszeralem und subkutanem Fettgewebe. Während ER $\beta$  bei Männern durch E<sub>2</sub>-Stimulation nicht induziert wird, steigt die Expression in weiblichen subkutanen Adipozyten deutlich an. In Adipozyten viszeralen Ursprungs ist diese Induktion dagegen nicht zu sehen [100].

## 1.5 SRC-1, TIF-2 und DRIP205

Seit der Klonierung des ersten Koregulators SRC-1 im Jahre 1995 [43] wurden bis heute ungefähr 300 Kofaktoren identifiziert, die in einem komplizierten Zusammenspiel eine differenzierte Genexpression durch NR ermöglichen. Transkription ist eine räumlich und zeitlich hochorganisierte Abfolge von Chromatin-Remodellierung, Transkriptionsinitiation, -elongation, Splicing und Termination. Koregulatoren stellen die hierfür benötigten Enzymaktivitäten bereit und bieten gleichzeitig neben den eigentlichen NR eine zusätzliche Anpassungsmöglichkeit der zellulären Transkriptionsaktivität in Adaption an unterschiedliche Milieus [101]. Während beim Menschen 48 NR identifiziert wurden, sind es beim Fadenwurm *C. elegans* über 270 [36]. Lonard und O'Malley vermuten, dass es die Ebene der Koregulatoren ist, die für die größere Komplexität höherer Organismen trotz der geringeren Zahl von NR und einer etwa vergleichbaren Gesamtanzahl an Genen verantwortlich ist [101].

## 1.5.1 Funktionelle Bedeutung von SRC-1, TIF-2 und DRIP205 für die Energiehomöostase

Neben ihrer Vielzahl anderer physiologischer Effekte (Review in [102]) spielen die Kofaktoren der SRC-Familie eine komplexe Rolle in der Regulation der Energiehomöostase.

TIF-2<sup>-/-</sup>-Mäuse sind vor Adipositas geschützt, außerdem haben sie einen geringeren Körperfettanteil und histologisch kleinere Adipozyten, die weniger Lipoproteinlipase (LPL), Adipozytenprotein 2 (ap2) und PPARγ exprimieren und weniger Fett einlagern [103]. *In vitro* erweist sich TIF-2 im Vergleich mit SRC-1 unter Stimulation mit Rosiglitazon als stärkerer Koaktivator von PPARγ [103].

SRC-1<sup>-/-</sup>-Mäuse unter Hochfettdiät weisen neben einer defekten adaptiven Thermogenese einen verminderten Energieumsatz und ein höheres Körpergewicht als der Wildtyp auf [103]. Ein kombinierter Knockout von SRC-1 und einem weiteren Kofaktor, SRC-3, führt dagegen zu Tieren mit einem erhöhten Grundumsatz, die auch unter Hochfettdiät schlank bleiben [104]. Allerdings wurde in dieser Studie keine Aussage über die TIF-2-Aktivität getroffen, die möglicherweise durch das Fehlen von SRC-3 ebenfalls beeinflusst wird [105].

DRIP205 ist Teil eines Kofaktor-Multimers, das der Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie dient. Die spezifische Bedeutung von DRIP205 im Hinblick auf die Adipogenese und Energiehomöostase ist verhältnismäßig wenig erforscht. Da DRIP205-Knockoutmodelle embryonal letal sind, beschränken sich die Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung auf Zellkulturstudien. Hier konnte zunächst gezeigt werden, dass DRIP205 für die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten essentiell ist: DRIP205<sup>-/-</sup>Zellen zeigen auch bei ektopischer Expression von PPARγ und Stimulation durch Rosiglitazon keine morphologische Adipogenese, zudem fehlt die Expression von PPARγ-Zielgenen wie ap2 [106]. Jüngste Arbeiten haben dieses Bild weiter ausdifferenziert und es scheint, dass schon ein kurzes N-terminales DRIP205-Fragment ohne Bindungsstellen Adipogenese ermöglicht. Außerdem konnte unter bestimmten Bedingungen auch in Abwesenheit von DRIP205 PPARγ-

Aktivität nachgewiesen werden [107]. Ob und wie in diesem Fall andere Proteine die Funktion des Koregulators übernehmen, ist noch ungeklärt.

## **1.6 Zielsetzung und Hypothese**

Estrogene üben via ER $\alpha$  einen günstigen Effekt auf metabolische Parameter wie Insulinsensitivität und Lipidhomöostase aus. Die selektive Aktivierung von ER $\beta$  in Muskelzellen supprimiert dagegen dort die Expression insulinabhängiger Glukosetransporter, was auf eine negative Beeinflussung der Glukosehomöostase durch ER $\beta$  hinweist [99].

Da in den letzten Jahren zunehmend deutlich geworden ist, welche herausragende Rolle Fettgewebe für die Regulation der Energiehomöostase und die Pathogenese von Störungen des Glukose- und Lipidhaushalts spielt, sollen in der vorliegenden Arbeit die metabolischen Effekte von ER $\beta$  in Adipozyten untersucht werden.

In Adipozyten ist PPAR $\gamma$  als zentraler Regulator der Adipogenese und Lipidspeicherung sowie als Vermittler insulinsensitivierender Effekte im Gesamtorganismus von größter Bedeutung für ein günstiges metabolisches Profil. Die Hemmung der Aktivität von PPAR $\gamma$  hätte profunde Auswirkungen auf diese Prozesse und pathogenetische Bedeutung für das Metabolische Syndrom.

Die zu prüfende Hypothese ist, dass  $ER\beta$  metabolische Effekte durch eine Inhibition von PPAR $\gamma$  entfaltet.

Ziel dieser Arbeit ist es

- 1. zu untersuchen, ob ER $\beta$  in Adipozyten einen Einfluss auf die Aktivität von PPAR $\gamma$  ausübt,
- die Relevanz eines Cross-Talks zwischen ERβ und PPARγ auf verschiedenen Ebenen zellulärer Regulation (d.h. Transkriptionsinitiation, Expression von PPARγ-Zielgenen und morphologische Effekte der Adipogenese) zu untersuchen, und
- 3. die Bedeutung nukleärer Kofaktoren bei dieser Interaktion aufzuklären.

## 2. Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

- 3T3-L1-Präadipozyten (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)
- Agarose-Pulver (Serva Electrophoresis, Heidelberg)
- Chloroform (Roth, Karlsruhe)
- Complete mini Proteinaseinhibitoren (Roche, Mannheim)
- Dexamethason 2µM (Sigma, Taufkirchen)
- DMEM-Medium (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- DMSO (Merck)
- DNAse Stop Solution [20mM EGTA] (Promega, Mannheim)
- dNTP-Mix [je 10µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP] (Promega, Mannheim)
- DPBS (PAN Biotech)
- Ethanol, 70%vol (Roth, Karlsruhe)
- Ethidium-Bromid 1% (Roth, Karlsruhe)
- FBS (Gibco / Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Formaldehyd (37%) (Roth, Karlsruhe)
- GeneRuler DNA-Ladder (MBI Fermentas, St Leon-Rot)
- H<sub>2</sub>O steril (PAN Biotech)
- HotStarTaq-DNA-Polymerase 5 U/µl (Quiagen, Hilden)
- IBMX 1mol/l (Sigma, Taufkirchen)
- Insulin 10mg/ml (SIGMA, Taufkirchen)
- Isopropanol (Roth, Karlsruhe)
- LiCl Puffer [0,25 M LiCl; 1% NP-40; 1% Natriumdesoxycholat; 1mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH=8,1]
- Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Lysepuffer [1% SDS; 4mM EDTA; 50mM Tris-HCl pH=8,1]
- MgCl<sub>2</sub> (aq.) 25 mM (PAN Biotech)
- M-MLV Buffer [250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl2 und 50mM DTT] (Promega, Mannheim)
- M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/µl (Promega, Mannheim)
- NaHCO3 1M

- OPTIMEM-Medium (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Orange-G Loading Dye
- PBS (PAN Biotech)
- PCR-Puffer [100 mM Tris-HCl pH=9,0; 500 mM KCl; 1,0% (v/v) Triton X-100] (PAN Biotech)
- Penicillin/Streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Pioglitazon (Takeda Pharmaceutical, Japan)
- Protein A Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Proteinase K (Invitek, Berlin)
- Q-Solution (Quiagen, Hilden)
- Quiagen PCR-Puffer (Quiagen, Hilden)
- Random Primers 0,5µg/µl (Promega, Mannheim)
- RIPA Puffer [50mM Tris-HCl pH=7,5; 150mM NaCl; 1% NP-40; 2,5% (v/v) Glycerol; 1mM EGTA; 50mM NaF; 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub> pH=7,5; 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 5mM MgCl<sub>2</sub>]
- RNAse Zap RNAse-Inhibitor Spray (Ambion Europe, Huntingdon, GB)
- RNAsin RNAse Inhibitor (Promega, Mannheim)
- Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe)
- RQ1 DNAse 1 U/µl (Promega, Mannheim)
- RQ1 DNAse Buffer [400mM Tris-HCl pH 8.0; 100mM MgSO<sub>4</sub>; 10mM CaCl<sub>2</sub>] (Promega, Mannheim)
- SDS 10%
- Sepharose Puffer (10mM Tris pH=8,0; 1 mM EDTA; 0,1% BSA; 0,1% NaN<sub>3</sub>)
- Sonifizierte Hering Sperma-DNA (10mg/ml) (SIGMA, Taufkirchen)
- Stickstoff, flüssig (Messer, Griesheim)
- SYBR-Green<sup>®</sup>-PCR-Mastermix [100 mM KCl; 20 mM Tris-HCl; 13 mM MgCl<sub>2</sub>; je 0,4 mM dNTP; 0,02% (v/v) SYBR-Green; 4% (v/v) DMSO; 0,01% (v/v) NP40; 0,01% (v/v) Tween 20; 2% (v/v) ROX-Solution] (Jörg Isensee, Berlin)
- TAE-Puffer [40 mM Tris-Azetat; 1 mM EDTA] (Sigma, Taufkirchen)
- Taq-DNA-Polymerase 5 U/µl (PAN Biotech)
- TE Puffer (10mM Tris-HCl pH=8,0; 1mM EDTA)
- TRIzol Reagent (Ivitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA)
- TSE-150 Puffer [1% Triton X-100; 0,1% SDS; 2mM EDTA; 20mM Tris-HCl pH=8,1; 150mM NaCl]

- TSE-500 Puffer [1% Triton X-100; 0,1% SDS; 2mM EDTA; 20mM Tris-HCl pH=8,1; 500mM NaCl]
- Verdünnungspuffer [0,01% SDS; 1,1% Triton X-100; 1,2mM EDTA; 16,7mM Tris-HCl pH=8,1; 167mM NaCl]
- Dual-Luciferase Reporter Assay System<sup>®</sup> (Promega, Mannheim)
- NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel, Düren)
- ChemiDoc UV-Imaging-System (BioRad München)
- MX3000p Realtime PCR Cycler (Stratagene Europe, Amsterdam, NL)
- Sterilfilter Stericup 0,22µm, GP express plus membrane (Millipore, Schwalbach)
- Thermocycler (BioRad, München)
- Ultraschall-Sonotrode SONOPULS HD 2070 (Bandelin electronic, Berlin)

## 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (Standardprotokoll)

Pro Ansatz wurden

- 2,5µl PCR-Puffer
- 2µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung
- 0,5 µl dNTP-Mix
- 0,125µl Taq-DNA-Polymerase
- je 0,5µl Primer 20µM (Forward und Reverse, vgl. Tab. 2.1)
- ggf. 1µl DMSO
- ad 25µl steriles Wasser

gemischt.

In PCR-Tubes wurde dieser Ansatz vorgelegt und anschließend 0,5µl der zu amplifizierenden DNA-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch im Thermocycler (BioRad iCyler bzw. BioRad myCycler) folgendem Temperaturregime unterzogen: (Zeitangaben in min:sec)

4:00 95°C

0:30 94°C (Schmelzen der dsDNA)  $\checkmark$ 

0:45 Annealing Temperatur (vgl.Tab. 2.1)

30-40 Zyklen

→ 0:30 72°C (Elongation) \_\_\_\_\_ 7:00 72°C

# 2.2.1.2 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (Protokoll für schwierige Amplifikationen)

Pro Ansatz wurden

- 2,5µl Quiagen PCR-Puffer
- 5 µl "Q-Solution"
- 0,5 µl dNTP-Mix
- 0,125µl HotStarTaq-Polymerase
- je 0,5µl Primer 20µM (Forward und Reverse, vgl. Tab. 2.1)
- ad 25µl steriles Wasser

gemischt.

In PCR-Tubes wurde dieser Ansatz vorgelegt und anschließend 0,5µl der zu amplifizierenden DNA-Lösung hinzugegeben.

Anschließend wurde der Ansatz im Thermocycler folgendem Temperaturregime unterzogen: (Zeitangaben in min:sec)

15:00 95°C (Aktivierung der HotStarTaq)

- ─ 0:30 94°C (Schmelzen der dsDNA) ←
  - 0:30 Annealing Temperatur (vgl. Tab. 2.1)

30-40 Zyklen

→ 0:30 72°C (Elongation) \_\_\_\_\_
10:00 72°C

#### 2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

#### 2.2.1.3.1 Vorbereitung des Gels

2% Agarose-Pulver wurden in TAE-Puffer gelöst und die Lösung einmal zum Sieden erhitzt. Unter stetigem Rühren wurden 0,001% (1μl auf 100ml) Ethidium-Bromid-Lösung hinzu gegeben. Die Lösung wurde anschließend bei 60°C im Wasserbad gelagert.

Kurz vor Gebrauch wurde ein Gel von etwa 0,8 cm Dicke gegossen.

#### 2.2.1.3.2 Elektrophorese

In die beiden äußersten Taschen des Gels wurden je 4µl GeneRuler DNA-Ladder als Größenstandard gegeben, in die anderen Taschen jeweils 10µl PCR-Produkt mit 10% Orange-G-Loading Dye. Unter stetiger Überwachung der Loading Dye-Front wurde die Elektrophorese mit 110V (Feldstärke ca. 600V/m) gefahren und das Gel anschließend mit dem ChemiDoc Imaging System ausgewertet und dokumentiert. Gegebenenfalls wurden daraufhin die Intensitäten der dokumentierten Banden (Fläche unter der Intensitätskurve des Peaks) mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, USA) in der Version 1.38 analysiert.

#### 2.2.1.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion ("realtime-PCR")

#### 2.2.1.4.1 Messung

Pro Ansatz wurden

- 15µl SYBR-Green<sup>®</sup>-PCR-Mastermix
- je 0,5µl Primer 20µM (Forward und Reverse, vgl. Tab. 2.1)
- ggf. 1µl DMSO
- 0,075µl Taq-Polymerase
- ad 25µl steriles Wasser

in einer 96-Well-Platte vorgelegt und dann 5 $\mu$ l der zu analysierenden DNA-Lösung (~ 2 ng/ $\mu$ l) hinzugegeben.

Anschließend wurde der Ansatz im Realtime-PCR-Thermocycler folgendem Temperaturregime unterzogen: (Zeitangaben in min:sec)

	4:00	95°C	
<b></b>	0:30	94°C (Schmelzen der dsDNA)	l
	0:45	Annealing Temperatur (vgl. Tab. 2.1), am Ende dieses	10 Zuklen
Schrittes Messung der Fluoreszenz im Gerät.			40 Zykich
	0:30	72°C (Elongation)	
	1:00	95°C	

Anschließend Messung der Dissoziationskurve im Temperaturbereich zwischen 55°C und 95°C.

#### 2.2.1.4.2 Auswertung

Nach jedem Annealing-Schritt wurde im Gerät die Fluoreszenz von Sybr-Green (als Indikator der Menge an doppelsträngiger DNA) und von ROX (konstante Fluoreszenz zur Normalisierung des Signals) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der zum Gerät gehörigen Software in der Version 2.0.



Bestimmt wurde die Zyklenzahl  $C_t$ , bei der die gemessene Fluoreszenz erstmals einen definierten Schwellenwert überschreitet. Dieser Schwellenwert wurde für jede Platte individuell festgelegt und so gewählt, dass er sich deutlich vom Rauschen abhebt und gleichzeitig noch im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurven liegt. Aus jeweils drei technischen Replika wurde das arithmetische Mittel berechnet und für die weiteren Berechnungen verwendet.

#### 2.2.1.5 Extraktion von RNA aus Gewebe

An einem RNAse-freien Arbeitsplatz wurden die zuvor bei -80°C gelagerten Gewebeproben in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend unter flüssigem Stickstoff zermörsert. Portionen von etwa 100µg Gewebegranulat wurden anschließend in vorbereitete Aliquots à 1ml TRIzol Reagent gegeben und unter Schütteln die völlige Lyse des Gewebes angestrebt.

Um verbleibende Gewebereste zu entfernen, wurden die Proben 2 Minuten bei 4°C mit 5.000 rpm (2.240x g) zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Anschließend wurden zu jedem Aliquot 200µl Chloroform hinzugefügt und nach vollständiger Durchmischung 15 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm (12.900x g) zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen.

Um die in der wässrigen Oberphase gelöste RNA auszufällen, wurde diese anschließend mit 500µl Isopropanol versetzt und nach vollständiger Durchmischung 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm (12.900x g) zentrifugiert. Abschließend wurde das entstandene Pellet zweimal in 1ml Ethanol gewaschen und schließlich nach dem Trocknen in RNAse-freiem Wasser aufgenommen.

#### 2.2.1.6 Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit eiskaltem DULBECCO's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen und anschließend pro Well 1ml TRIzol Reagent hinzu gegeben.

Um verbleibende Gewebereste zu entfernen, wurde das entstandene Zelllysat daraufhin 2 Minuten bei 4°C mit 5.000 rpm (2.240x g) zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Anschließend wurden zu jedem Aliquot 200µl Chloroform hinzugefügt und nach vollständiger Durchmischung 15 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm (12.900x g) zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen.

Um die in der wässrigen Oberphase gelöste RNA auszufällen, wurde diese anschließend mit 500µl Isopropanol versetzt und nach vollständiger Durchmischung 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm (12.900x g) zentrifugiert. Abschließend wurde das entstandene Pellet zweimal in 1ml Ethanol gewaschen und schließlich nach dem Trocknen in RNAse-freiem Wasser aufgenommen.

## 2.2.1.7 Kontrolle der RNA-Qualität

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten RNA wurde der Absorptionsquotient photometrisch bestimmt. Das Verhältnis der Extinktionen bei  $\lambda$ =260nm zu  $\lambda$ =280nm wurde errechnet und nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet.

Ein kleineres Verhältnis weist auf Verunreinigungen mit Proteinen oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol aus der TRIzol-Extraktion) hin, die dann beim Umschreiben in cDNA und bei Real-Time PCRs zu Ungenauigkeiten führen können.

#### 2.2.1.8 Umschreiben von RNA in cDNA

1μg RNA in Wasser wurde mit sterilem Wasser auf 13,5μl aufgefüllt und mit je 1μl RQ1 DNAse Buffer und RQ1 DNAse versetzt. Daraufhin wurde der Ansatz 30min bei 37°C inkubiert, um eventuelle Kontaminationen durch genomische DNA zu beseitigen.

Nachdem der DNAse-Verdau durch die Zugabe von 1µl DNAse Stop Solution und 10minütige Denaturierung bei 65°C beendet wurde, wurden die Proben bei 4°C gelagert und zu jedem Ansatz 1µl Random Primers hinzu gegeben. Bei 70°C wurden die Primer anschließend für 5 Minuten denaturiert und dann erneut auf 4°C abgekühlt. Zu jeder Probe wurden

- 5µl 5x M-MLV Buffer
- 1µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0,5 µl RNAsin RNAse Inhibitor
- 1µl M-MLV Reverse Transkriptase bzw. Steriles Wasser für die RT- Negativkontrolle hinzugefügt und anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Zur Qualitätskontrolle der cDNA wurde eine PCR auf die ubiquitär exprimierten Gene Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder  $\beta$ -Actin durchgeführt, die gleichmäßige Konzentrationen der entsprechenden Sequenz über alle Proben ergeben musste. Verunreinigungen durch genomische DNA wurden durch die Untersuchung der mitgeführten Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase ausgeschlossen.



#### 2.2.2 Arbeiten mit kultivierten Zellen

#### 2.2.2.1 Kultur von 3T3-L1 Präadipozyten

Die 3T3-L1 Präadipozyten wurden nach Standardprotokollen in DULBECCO's Minimal Essential Medium (DMEM) mit 10% Fetalem Rinderserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Standard-L1-Medium) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen jeweils vor Erreichen der Konfluenz passagiert.

#### 2.2.2.2 Partielle Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten

Zu etwa 80% konfluente Präadipozyten wurden je nach Ansatz transfiziert und anschließend bei 100% Konfluenz mit einem Differenzierungsmedium, bestehend aus Standard-L1-Medium mit 5 $\mu$ M Dexamethason, 10 $\mu$ g/ml Insulin und 10mM IMBX, versetzt und 48-72 Stunden inkubiert. Die Zellen begannen, mikroskopisch sichtbar Lipide einzulagern und sich morphologisch im Vergleich zu undifferenzierten Präadipozyten zu verändern. Für eine vollständige Differenzierung, die hier jedoch nicht angestrebt wurde, wären mindestens 5-7 Tage notwendig, wie in der Literatur beschrieben [108].

#### 2.2.2.3 Transiente Transfektion von 3T3-L1-Präadipozyten

In einem ersten Ansatz wurde zunächst die zu transfizierende Plasmid-DNA in OPTIMEM verdünnt. In einem weiteren Ansatz gleichen Volumens wurde für je 1µg zu transfizierende DNA 2µl Lipofectamin-Reagenz in OPTIMEM verdünnt, daraufhin beide Ansätze gemischt und 20min inkubiert. In jedem Well wurden 1,5 ml OPTIMEM vorgelegt, 500µl der Transfektionslösung hinzugegeben und die Zellen 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium wieder durch Standard-L1-Medium ersetzt und nach 12 Stunden ggf. die Stimulation durchgeführt.

#### 2.2.2.4 PPARy-Luziferase-Reporter-Assay

3T3-L1-Zellen wurden in 12-Well-Platten kultiviert und nach Protokoll unter Verwendung von Lipofectamin 2000 und OPTIMEM mit folgendem PPARγ-Luziferase-Reportersystem transfiziert [109] (Plasmide vgl. Tab. 2.2):

- 100ng pGal4-hPPARγDEF
- 400ng pG5TkGL3
- 5ng pRL-CMV

Dazu wurden je nach Ansatz eines oder mehrere der folgenden Plasmide transfiziert: hER $\beta$ -pSG5,  $\Delta$ -AF1-hER $\beta$ -pSG5, hER $\alpha$ -pSG5, hPPAR $\gamma$ 2-pSG5, hRXR $\alpha$ -pCDNA, TIF2-pSG5, DRIP205-pSG5, hSRC1-pSG5 und mit pSG5 ad 1000ng DNA aufgefüllt.

Anschließend wurden die Zellen für 12 Stunden in serumarmem Medium (0,5% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert und daraufhin 24 Stunden mit 10µM Pioglitazon und/oder 100nM Estradiol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle behandelt. Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität von Reportergenen wurde das Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System den Herstellerangaben gemäß verwendet. 36 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Lysepuffer aufgenommen und kurz zentrifugiert. Parallel wurden gemäß Protokoll

je eine Substratlösung für Firefly-Reporterluziferase (zur Aktivitätsmessung) und für Renilla-Luziferase (zur Normierung) hergestellt. Nach Messung der Proben im Luminometer wurde der Quotient beider Luziferaseaktivitäten gebildet.

Die Luziferase-Reporter-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Anna Foryst-Ludwig durchgeführt. Alle Ansätze wurden als Tripletts ausgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

#### 2.2.3 Arbeiten mit Versuchstieren und tierischen Geweben

#### 2.2.3.1 Tierhaltung und Verarbeitung der Gewebe

Sowohl weibliche ERβ<sup>-/-</sup>-Mäuse (J-Å Gustafsson, Karolinska Institutet, Huddinge, Schweden) als auch weibliche Wildtyptiere wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften und Richtlinien der Charité Universitätsmedizin in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus bei 25°C gehalten. (Tierversuchsvorhaben vom 22.12.2004 bis 09.09.2008, behördliche Genehmigung Az. G0282/04). Beginnend im Alter von 4-5 Wochen wurden die Tiere 12 Wochen mit einer Hochfettdiät (60% kcal aus Fett, Research Diets Inc., New Brunswick, New Jersey, USA) gefüttert und anschließend getötet. Die entnommenen Gewebe für die RNA-Analyse wurden in flüssigem Stickstoff konserviert, für ChIP-Untersuchungen wurde gonadales Fett in eiskaltem PBS-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und unmittelbar wie unten aufgeführt weiter verarbeitet.

#### 2.2.3.2 Genotyping der ERβ<sup>-/-</sup>-Mäuse

Ein etwa 5mm langes Stück des Schwanzes der Tiere wurde abgetrennt und die genomische DNA daraus mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitek, Berlin) nach Herstellerprotokoll extrahiert. Auf 1µl des DNA-Eluats wurde mit den Primern für das Genotyping (Tab. 2.1) eine PCR durchgeführt und das Produkt elektrophoretisch untersucht.

Analog zur in [92] beschriebenen Methode bindet der Forward-Primer an eine Sequenz, die sowohl in  $\text{ER}\beta^+$ - als auch  $\text{ER}\beta^-$ -Genomen vorhanden ist, während die Reverse-Primer jeweils spezifisch für die eingefügte Neo-Kassette bzw. ein dahinter liegendes Exon ist. Durch die unterschiedliche Länge der entsprechenden Amplikons lassen sich  $\text{ER}\beta^{+/+}$ -,  $\text{ER}\beta^{+/-}$ - und  $\text{ER}\beta^{-/-}$ -Genome unterscheiden.

#### 2.2.3.3 Chromatin Immunopräzipitation in murinem Fettgewebe

Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) ist eine Methode zur direkten Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen. Abb. 2.3 zeigt schematisch das Prinzip.



#### 2.2.3.3.1 Zubereitung des 50% Protein A-Sepharose-Slurrys

0,5g Protein A-Sepharose CL-4B wurden mit ca. 400ml bidestilliertem Wasser versetzt und 5min geschwenkt, um Konservierungsstoffe und Additive auszuwaschen. Anschließend wurde die Mischung steril filtriert und die feuchten Sepharose-Beads von der Membran in 7ml steriles Wasser überführt. Nach Zentrifugation (1min bei 800x g) wurde der wässrige Überstand entfernt und die Beads 1:1 (v/v) mit Sepharose Puffer versetzt.

#### 2.2.3.3.2 Vorbereitung der Proben

Das Gewebe wurde sofort nach Entnahme in PBS überführt, auf Eis in kleine Stücke geschnitten und dann in einer Lösung von 1% Formaldehyd in PBS und Proteinaseinhibitoren aufgenommen. Um eine ausreichende Vernetzung zwischen DNA und Proteinen zu erreichen, wurden die Proben anschließend über Nacht bei 4°C auf einem Rotator gemischt. Anschließend wurde das Gewebe zweimal in eiskaltem PBS mit Proteinaseinhibitoren gewaschen, mit RIPA Lysepuffer versetzt und einmal auf -80°C eingefroren. Anschließend wurde dasselbe Volumen RIPA Puffer hinzugegeben und die Probe zur weiteren Lyse 20min bei 4°C rotiert.

Das weitgehend lysierte Gewebe wurde dann 4 x 10sec mit 100% Leistung auf Eis sonifiziert und zwischen den Pulsen jeweils eine Minute gekühlt.

Anschließend wurden durch Zentrifugation (25min mit 29.000x g bei 4°C) die Lipide abgeschieden und die wässrige Phase weiterverwendet.

Wenn nötig, wurden die unterschiedlichen Proben mit Verdünnungspuffer auf gleiche Volumina aufgefüllt und anschließend auf die gewünschte Anzahl der IPs aufgeteilt. Um unspezifische Bindungen an die Sepharose abzufangen, wurden zu jedem Ansatz 200µl des 50% Protein A-Sepharose-Slurrys gegeben und die Proben für eine Stunde bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (Abzentrifugieren der Sepharose-Beads, wenn nicht anders angegeben, generell mit 3200x g für 1min bei 4°C) und verworfen.

#### 2.2.3.3.3 Immunopräzipitation

Von jeder Probe wurde 1% des Volumens abgenommen und bis auf weiteres bei 4°C gelagert. Diese Aliquots dienen später als Referenz der eingesetzten DNA-Menge ("Total") vor der Immunopräzipitation (IP).

Dann wurden die Proben mit dem interessierenden Antikörper (vgl. Tab. 2.3) versetzt und über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz eine Mischung aus 300µl Protein A-Sepharose und 10µl sonifizierter Hering Sperma DNA (zur Absättigung eventueller unspezifischer DNA-Bindungen an die Beads) hinzugegeben und für 1 Stunde rotiert. Nach dem Abzentrifugieren der Beads wurden diese mit den folgenden Puffern gewaschen:

- 1ml TSE-150-Puffer
- 1ml TSE-500-Puffer
- 1ml LiCl-Puffer
- 2x 1ml TE-Puffer
- 3x 1ml RIPA-Puffer

und jeweils 5min auf dem Rotor aufgeschlämmt.

#### 2.2.3.3.4 Elution und Reinigung der DNA

Für jede IP und für jedes Total wurden 200µl Elutionspuffer (1% SDS; 100mM NaHCO<sub>3</sub>) frisch angesetzt. Zu jeder IP wurden zunächst 100µl des Puffers hinzugegeben und für 15min unter leichtem Schütteln bei 65°C inkubiert. Die Probe wurde dann bei Raumtemperatur 1min mit 3200x g zentrifugiert und der überstehende Elutionspuffer abgenommen. Anschließend wurden diese Schritte mit weiteren 100µl Puffer wiederholt und die Eluate kombiniert.

Zu den Total-Proben wurden 200µl Elutionspuffer hinzugefügt und die Proben zunächst bei Raumtemperatur gelagert.

Anschließend wurde jede Probe (IP und Total) mit 8µl 5M NaCl versetzt und über Nacht bei 65°C inkubiert, um die DNA-Protein-Crosslinks zu lösen.

Zur Proteinentfernung wurden daraufhin 4µl 0,5M EDTA, 8µl 1M Tris-HCl und 1µl Proteinase K hinzugegeben und die Mischung für 1-2 Stunden bei 45°C inkubiert.

Abschließend wurde die DNA mit 200µl Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Zentrifugation 20min mit 17500x g bei 4°C) extrahiert und mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II-Kits nach Herstellerprotokoll ("PCR clean-up") gereinigt.

#### 2.2.4 Übersicht über verwendete Oligonukleotidsequenzen

Alle Gensequenzen wurden in der Genomdatenbank ENSEMBL [110,111] gesucht und anschließend mit dem Programm Primer3 [112,113] Primer entworfen. Bei cDNA-Primern wurde nach Möglichkeit darauf geachtet, intron-überspannende Bereiche zu amplifizieren, um zusätzliche Sicherheit gegenüber genomischen Kontaminationen zu gewinnen. Alle Sequenzen wurden mit dem BLAST-Algorithmus gegen das gesamte Organismusgenom abgeglichen [114]. Alle Primer wurden entweder bei TIB-MOLBIOL, Berlin, SIGMA Genosys, Steinheim, oder operon, Köln, synthetisiert.

Gen (murin)	Primer	rimer Sequenz		Annealing-
			länge	Temperatur
18S mitochond.	fwd	ACC TGG TTG ATC CTG CCA GTA G	103 bp	55-60°C
INNA	rev	TTA ATG AGC CAT TCG CAG TTT C		
Adiponectin cDNA	fwd	TCC GGG ACT CTA CTA CTT CTC TTA CCA C	199 bp	60°C
	rev	GTC CCC ATC CCC ATA CAC CTG		
ap2 cDNA	fwd	TGG AAG ACA GCT CCT CCT CG	177 bp	60°C
	rev	AAT CCC CAT TTA CGC TGA TGA TC		
LPL cDNA	fwd	AGT AGA CTG GTT GTA TCG GG	280 bp	60°C
	rev	AGC GTC ATC AGG AGA AAG G		
ERβ cDNA	fwd	ACT AGT CCA AGC GCC AAG AG	105 bp	60°C
--------------------------	--------	-------------------------------------	------------	------
	rev	AAA GGC CTT ACA TCC TTC ACA		
PPARγ cDNA	fwd	TTG ACA GGA AAG ACA ACG GA	246 bp	60°C
	rev	GAG CAG AGT CAC TTG GTC ATT		
SRC-1 cDNA	fwd	TTT CAA GAA GTG ATG ACT CGT GG	204 bp	60°C
	rev	CCA GGA TTG ACT GAG GGA TT		
GAPDH cDNA	fwd	ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC	179 bp	60°C
	rev	GCC TTG ACT GTG CCG TTG AAT		
GAPDH Promotor	fwd	CAC CCT GGC ATT TTC TTC CA	211 bp	58°C
(genomisch)	rev	GAC CCA GAG ACC TGA ATG CTG		
Adiponectin	fwd	TGT TGT TGA CTC TCC AGG AC	190 bp	55°C
(genomisch)	rev	TAG AGC TTC TGT CAA GCC AT		
ER $\beta$ genomisch für	fwd	GGA GTA GAA ACA AGC AAT CCA GAC ATC	ko: 500 bp	66°C
Genotyping	rev ko	GCA GCC TCT GTT CCA CAT ACA CTT C	wt: 665 bp	
	rev wt	AGA ATG TTG CAC TGC CCC TGC TGC T	1	

#### Tab. 2.1: Primer

fwd: Forward-Primer, rev: Reverse-Primer, rev ko: Bindet an die (Knockout-spezifische) Neo-Kassette, rev wt: Bindet an das (nur im Wildtyp erhaltene) Exon 3, bp: Basenpaare.

#### 2.2.5 Übersicht über verwendete Plasmide

Gen	Plasmid	Hersteller bzw.	Anmerkung
		Kooperationspartner	
PPARγ- Luziferase- Reporter-	pGal4-hPPARyDEF	B. Staels, Institut Pasteur de Lille, Lille, Frankreich	Chimäre aus Gal4 und der (Liganden bindenen) DEF- Domain von PPARγ [115].
system	pG5TkGL3	B. Staels, Institut Pasteur de Lille, Lille, Frankreich	Reporter,bestehendaus5KopienderGal4-Bindungssequenz,demHSV-ThymidinkinasepromoterundFirefly Luziferase [115].
	pRL-CMV	Promega, Mannheim	Renilla Luziferase Reporter als Transfektionskontrolle
Leervektor	pSG5	Stratagene, La Jolla, USA	
PPARγ	hPPARγ2-pSG5	Stratagene, La Jolla, USA	
RXRa	hRXRa-pCDNA	Stratagene, La Jolla, USA	
ERβ	hERβ-pSG5	P. Chambon, Institut Clinique de la Souris, Illkirch Cedex, Frankreich	
ERβ-Δ-AF1	Delta-AF1-hERβ-pSG5	A. Foryst-Ludwig, Center for Cardiovascular Research, Berlin	
ERα	hERα-pSG5	P. Chambon, Institut Clinique de la Souris, Illkirch Cedex, Frankreich	

TIF-2	TIF2-pSG5	B. Staels, Institut Pasteur de Lille, Lille, Frankreich	
DRIP	DRIP205-pSG5	B. Staels, Institut Pasteur de Lille, Lille, Frankreich	
SRC-1	hSRC1-pSG5	M. Parker, Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, UK	

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

#### 2.2.6 Übersicht über verwendete Antikörper

Zielprotein	Bezeichnung, Lot	Herkunft	Hersteller
RNA-Polymerase II (C-18)	sc-5943, Lot D2606	goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnolo- gy, Heidelberg
PPARγ (H-100)	sc-7196X, Lot L2302	rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnolo- gy, Heidelberg
SRC-1 (M-20)	sc-6096X, Lot C2905	goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnolo- gy, Heidelberg
GRIP-1 (C-20) =TIF-2	sc-6976X, Lot C0205	goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnolo- gy, Heidelberg
HA-Probe (Y-11)	sc-805, Lot J0302	rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnolo- gy, Heidelberg
FLAG-Tag	ANTI-FLAG <sup>®</sup> M2 F3165	mouse monoclonal IgG	SIGMA, Taufkirchen

Tab. 2.3: Verwendete Antikörper

#### 2.2.7 Statistische Berechnungen

Untersuchungsergebnisse wurden durch univariate, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und entsprechende Post-Hoc-Vergleiche auf Signifikanz geprüft. Diese ergab sich für p<0,05. Die grafische und textliche Darstellung erfolgt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Als Programm zur Berechnung der ANOVA diente Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmont, USA).

# 3. Ergebnisse

# 3.1 Überexpression von ERβ inhibiert ligandenunabhängig die Aktivität von PPARγ

Um die Beeinflussung der PPARγ-Aktivität durch ERβ in einem relevanten Modellsystem zu untersuchen, wurden 3T3-L1-Präadipozyten mit einem PPARγ-Luziferase-Reportersystem (pGal4-hPPARγDEF, pG5TkGL3, Renilla) transfiziert [109] und mit 10µM Pioglitazon stimuliert. Das Reporterkonstrukt basiert auf dem Gal4-Transkriptionsfaktor aus Hefe, der dort die Expression des Gens von Galaktosidase reguliert. Der erste Vektor kodiert ein Fusionsprotein aus Gal4 und der PPARγ-Ligandenbindungsdomäne. Wird die LBD aktiviert, bindet Gal4 an ein charakteristisches DNA-Motiv, das sog. 17mer oder Gal5, und initiiert die Transkription [116]. Der zweite Vektor kodiert für Gal5 in Verbindung mit dem Thymidinkinase-Promotor und der Firefly-Luziferase [115]. Nur bei ligandenabhängiger Aktivierung der PPARγ-Gal4-Chimäre wird das Luziferase-Gen auf dem zweiten Vektor transkribiert. Als endogene Kontrolle dient eine weitere Luziferase, die konstitutiv exprimiert wird.

Nach Stimulation mit Pioglitazon wurde erwartungsgemäß eine deutliche Steigerung der PPAR $\gamma$ -Aktivität gegenüber der unstimulierten Kontrolle beobachtet (Abb. 3.1, Säulen 1+2), die durch Gabe von Estradiol (E<sub>2</sub>) nicht beeinflusst wurde (Säule 3).

Gleichzeitige Transfektion von ER $\beta$  in steigender Menge (Abb. 3.1, Säulen 4,6,8) führte dagegen zu einem signifikant verminderten Ansprechen auf die PPAR $\gamma$ -Stimulation: 7,2±0,35 Einheiten bei Überexpression von 250ng ER $\beta$  gegenüber 15,2±0,76 ohne diese Kotransfektion. Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit eines ER $\beta$ -Liganden nicht beeinflusst, wie durch die Zugabe von 100nM E<sub>2</sub> gezeigt werden konnte (Säulen 5,7,9).

Damit ist prinzipiell gezeigt, dass ER $\beta$  mit PPAR $\gamma$  interagiert und die Aktivität des Rezeptors negativ beeinflusst. Ein möglicher Mechanismus einer solchen Interaktion ist die Konkurrenz um gemeinsam genutzte nukleäre Kofaktoren. Um die Wechselwirkung zwischen ER $\beta$  und PPAR $\gamma$ genauer zu charakterisieren, wurde statt ER $\beta$  auch eine modifizierte Form des Rezeptors überexprimiert:  $\Delta$ AF1-ER $\beta$  ist ein Protein, dem die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion AF-1 fehlt. Diese Domäne ist als Bindungsstelle für Kofaktoren bekannt. Eine Ligandenbindung an  $\Delta$ AF1-ER $\beta$  ist dagegen weiterhin möglich, da die LBD erhalten ist.

Es zeigte sich, dass die AF-1-Domäne von ERß für die beobachtete Regulation der PPARy-

Aktivität notwendig ist. Die Überexpression von  $\Delta$ AF1-ER $\beta$  führte nicht zu einer signifikanten Suppression von PPAR $\gamma$  (Abb. 3.1, Säule 10).

Schließlich sollte noch untersucht werden, inwieweit die genannten Effekte Isoform-spezifisch für ER $\beta$  sind. Die Überexpression von 1µg ER $\alpha$  zeigte keine Beeinflussung der PPAR $\gamma$ -Aktivität in unserem System (Abb. 3.1, Säule 11).



Abb. 3.1: ER $\beta$  inhibiert liganden unabhängig die Aktivität von PPAR $\gamma$ .

3T3-L1-Präadipozyten wurden mit dem PPAR $\gamma$ -Luziferase-Reportersystem sowie den angegebenen Plasmiden transfiziert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 10 $\mu$ M Pioglitazon (Pio) bzw. 100nM Estradiol (E2), einzeln oder in Kombination (Plasmide vgl. Tab. 2.2).

# p<0.05 vs. pSG5(unstimuliert); \* p<0.05 vs. pSG5(Pio); **ns** nicht signifikant; **ns**<sub>pSG5</sub> nicht signifikant vs. pSG5(Pio). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

# 3.2 ERβ und die Kofaktoren SRC-1 und TIF-2 beeinflussen die Aktivität von PPARγ im Luziferase-Reporter-Assay

Die Beobachtung, dass die AF-1-Domäne von ER $\beta$  für die Regulation von PPAR $\gamma$  notwendig ist, stützt die Vermutung, das Kofaktoren an dieser Regulation beteiligt sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in dem oben beschriebenen Modellsystem 500ng ER $\beta$  und unterschiedliche Mengen eines Kofaktors (SRC-1, TIF-2 oder DRIP205) kotransfiziert und die ligandenabhängige PPAR $\gamma$ -Aktivität gemessen.



Durch Überexpression von SRC-1 (Abb. 3.2) und TIF-2 (Abb. 3.3) konnte die Inhibition von PPAR $\gamma$  durch ER $\beta$  gemindert werden. Nach Transfektion von 500ng SRC-1 erreicht die PPAR $\gamma$ -Aktivität nahezu wieder das Niveau der ER $\beta$ -freien Zellen (9,88 ± 0,50 vs. 10,24 ± 0,49; Säule 2+6 in Abb. 3.2). Dabei unterscheiden sich die Gendosis-Wirkungsbeziehungen einer Transfektion von SRC-1 bzw. TIF-2: Während schon 100ng TIF-2 einen maximalen, nicht mehr

steigerbaren "Rescue-Effekt" zeigen, stellt dieser sich erst bei deutlich höheren Dosen von SRC-1 ein.



Die gleichzeitige Überexpression von DRIP205, einem Kofaktor, der sich in seiner molekularen Wirkungsweise von den p160-Faktoren SRC-1 und TIF-2 unterscheidet, hat keine Auswirkung auf die ER $\beta$ -abhängige PPAR $\gamma$ -Inhibition (Abb. 3.4). Das Aktivierungsniveau im Luziferase-Assay mit und ohne Expression von DRIP205 unterscheidet sich nicht signifikant (Säulen 3-6 in Abb. 3.4).



# 3.3 ERβ vermindert PPARγ-Zielgenexpression in ERβ/PPARγkotransfizierten 3T3-L1-Präadipozyten

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit eine Überexpression von ER $\beta$  auch in komplexeren physiologischen Umgebungen in die PPAR $\gamma$ -abhängige Genregulation und zellbiologische Funktionen eingreift. Insbesondere sollte in diesem Fall die tatsächliche Expression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen und die histologische Einlagerung von Lipiden als Marker der PPAR $\gamma$ -Aktivität genutzt werden.

3T3-L1-Präadipozyten wurden entsprechend der folgenden Übersicht (vgl. Tab. 3.1) transient mit humanen PPAR $\gamma$ , RXR und ggf. ER $\beta$  transfiziert und daraufhin 48 Stunden unter Pioglitazon-Stimulation bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch auf morphologische Zeichen von Adipogenese untersucht und RNA extrahiert. Die Expression der PPAR $\gamma$ -Zielgene ap2, LPL und Adiponectin wurde mittels RT-realtime-PCR gemessen.

Transfizierte D	NA			Stimulation	n
1,25µg Vektor				keine (DMSO)	3
1,25µg Vektor				10µM Pioglitazon	3
0,75µg Vektor	0,5μg ERβ			10µM Pioglitazon	6
0,5µg Vektor		0,5µg PPARγ	0,25µg RXR	10µM Pioglitazon	3 bzw. 6 <sup>*</sup>
	0,5μg ERβ	0,5µg PPARγ	0,25µg RXR	10µM Pioglitazon	6

Tab. 3.1: Übersicht der Transfektionsansätze

#### 3.3.1 Mikroskopische Untersuchung

Undifferenzierte 3T3-L1-Präadipozyten exprimieren selbst kein oder nur wenig PPAR $\gamma$  [117,118], so dass die zu erwartenden Effekte einer Pioglitazon-Stimulation für Zellen ohne PPAR $\gamma$ -Transfektion gering sind. Nach Transfektion von PPAR $\gamma$  und RXR dagegen beginnen die Zellen unter Stimulation nach 48 Stunden, mikroskopisch sichtbar Fetttröpfchen einzulagern. (Abb. 3.5, Bild 1). Bei gleichzeitiger Transfektion von ER $\beta$  ist dieser Effekt erkennbar gemindert (Abb. 3.5, Bild 2).



Abb. 3.5: Erscheinungsbild der transfizierten Zellen nach Stimulation.
1. PPARγ + RXR, stimuliert mit Pioglitazon
2. PPARγ + RXR + ERβ, stimuliert mit Pioglitazon
gezeigt sind jeweils typische mikroskopische Gesichtsfelder in mittlerer Vergrößerung

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup> Für die Messung von Adiponectin-mRNA wurde diese Transfektion in 3 weiteren Wells wiederholt, so dass sich für Adiponectin eine Gesamtzahl von n=6 ergibt

#### 3.3.2 Analyse der PPARγ-Zielgenexpression

Bei der Analyse der mRNA-Expression der PPARγ-Zielgene ap2, LPL und Adiponectin konnten die mikroskopischen Eindrücke bestätigt werden.

Während die Expression von ap2-mRNA unter Stimulation mit Pioglitazon in den mit PPAR $\gamma$  + RXR transfizierten Zellen auf 145±37 ansteigt (normiert auf den unstimulierten Vektor = 1), erhöht sich die ap2-Expression bei gleichzeitiger Kotransfektion von ER $\beta$  nur auf 64±12 (p<0,05) (Abb. 3.6, Säule 2+3).



313-L1-Präadipozyten wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und 48 Stunden mit 10μM Pioglitazon stimuliert. Quantitative PCR auf Gesamt-RNA. 18s-normierte Anzahl der Kopien, bezogen auf pSG5(unstimuliert)=1.

\* p<0.05 vs. pSG5(unstimuliert); # p<0.05 vs. PPAR $\gamma$ +RXR(Pio). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Die Induktion von LPL unter Pioglitazon-Stimulation fällt nach 48 Stunden deutlich geringer aus als diejenige von ap2. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beschreibung von Gerhold et al. für Präadipozyten unter TZD-Stimulation [118].

Nach Transfektion von PPAR $\gamma$  + RXR und Stimulation mit Pioglitazon steigt die Expression an LPL-mRNA auf das 7,3±0,97-fache der unstimulierten, vektortransfizierten Kontrolle. Bei Kotransfektion von ER $\beta$  zeichnet sich ein Trend zu niedrigerer Expression von LPL ab, der jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 3.7).



\* p<0.05 vs. pSG5(unstimuliert); **ns** nicht signifikant. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Auch die Expression von Adiponectin wird unter Pioglitazon nur vergleichsweise moderat induziert. Nach Transfektion von PPAR $\gamma$  + RXR und 48 Stunden Stimulation weisen die Zellen einen Anstieg auf das 6,2±0,65-fache des unstimulierten Wertes auf. Hier senkt die Kotransfektion von ER $\beta$  die Adiponectin-Expression signifikant (3,0±0,9; p<0,05) (Abb. 3.8).



3T3-L1-Präadipozyten wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und 48 Stunden mit 10μM Pioglitazon stimuliert. Quantitative PCR auf Gesamt-RNA. 18s-normierte Anzahl der Kopien, bezogen auf pSG5(unstimuliert)=1.

\* p<0.05 vs. pSG5(unstimuliert); # p<0.05 vs. PPAR $\gamma$ +RXR(Pio). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

# 3.4 ERβ vermindert PPARγ-Zielgenexpression in ERβtransfizierten 3T3-L1-Präadipozyten nach partieller Differenzierung

In Vorversuchen zur Etablierung der ER $\beta$ -PPAR $\gamma$ -Kotransfektion hatte sich gezeigt, dass auch undifferenzierte Präadipozyten in geringem Maße auf die Stimulation mit Pioglitazon reagieren. Gleichzeitig ist bekannt, dass Pioglitazon selbst die Expression von PPAR $\gamma$  beeinflusst [117]. In der Absicht, diese Einflussfaktoren zu eliminieren, wurde für das letzte Zellkulturexperiment ein Design gewählt, das sich eng an der physiologischen Adipogenese orientiert. Im Verlaufe der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten steigt die Aktivität von endogenem PPAR $\gamma$  auch ohne pharmakologische Beeinflussung stark an [54], so dass der Effekt einer Kotransfektion mit ER $\beta$  sichtbar werden müsste.

3T3-L1-Präadipozyten wurden mit ER $\beta$  oder dem Leervektor transfiziert und anschließend für 48 Stunden in Differenzierungsmedium nach Protokoll inkubiert. Eine vollständige Differenzierung ist in dieser Zeit nicht möglich, allerdings beginnt nach etwa 48 Stunden die Wirksamkeit der transienten Transfektion nachzulassen. Eine längere Inkubationszeit ist also nicht sinnvoll, wenn man den Effekt des transfizierten ER $\beta$  bestmöglich beobachten möchte. Die einzelnen Transfektionsansätze beschreibt Tab. 3.2.

Transfizierte	DNA	Medium	n
1,5µg Vektor (pSG5)		Differenzierungsmedium	3
	1,5μg ERβ	Differenzierungsmedium	3

Tab. 3.2: Übersicht der Transfektionsansätze, partielle Differenzierung

Anschließend wurde die RNA extrahiert und analog zum vorherigen Versuch die Expression der PPARγ-Zielgene gemessen.

### 3.4.1 PPARy-Zielgenexpression

Es zeigte sich, dass die Transfektion von ER $\beta$  auch auf die endogene PPAR $\gamma$ -Aktivität einen signifikanten Einfluss hat.

ERβ-transfizierte Zellen zeigen nach 48 Stunden Differenzierung eine um 50% im Vergleich zur Kontrolle verminderte ap2-Expression (Abb. 3.9), die Expression von LPL sinkt immerhin auf knapp 66% der Kontrolle (Abb. 3.10). Für Adiponectin konnte nach 48 Stunden kein Expressionsunterschied nachgewiesen werden. (Abb. 3.11).





## 3.5 Untersuchungen an ERβ-Knockout-Mäusen

Wie andere Mitglieder unserer Arbeitsgruppe parallel zu diesen Zellkultur-Experimenten zeigen konnten, ist eine Interaktion zwischen ER $\beta$  und PPAR $\gamma$  auch im Mausmodell wirksam. ER $\beta$ -Knockout-(ER $\beta^{-/-}$ )-Mäuse, die mit einer zu 60% aus Fett bestehenden Diät gefüttert werden, nehmen stärker an Gewicht zu als der Wildtyp, zeigen aber gleichzeitig eine bessere Insulinsensitivität und Glukosetoleranz sowie eine verstärkte Expression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen wie LPL und Adiponectin [119].

Um den Mechanismus dieser Interaktion *in vivo* weiter aufzuklären bzw. die Hypothese einer Kofaktoren-Konkurrenz auf eine weitere Weise zu prüfen, wurde gonadales (weißes) Fettgewebe der ERβ<sup>-/-</sup>-Mäuse bzw. der Wildtyp-Kontrollen untersucht.

Zur Vorbereitung der weiteren Versuche am Tiermodell wurde zunächst die Genexpression im gonadalen Fett sowohl der Wildtyptiere als auch der  $ER\beta^{-/-}$ -Mäuse analysiert. Mittels RT-PCR



konnte im Fettgewebe beider Varianten sowohl PPARγ- als auch SRC-1-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.12).

ERβ fand sich dagegen erwartungsgemäß nur im Fettgewebe der Wildtyp-Tiere (Abb. 3.13).



# 3.6 Die Bindung von SRC-1 und TIF-2 an den Adiponectin-Promotor ist in ER $\beta^{-/-}$ -Mäusen stärker ausgeprägt als im Wildtyp

Die *in vitro*-Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich bei der negativen Beeinflussung von PPAR $\gamma$  durch ER $\beta$  um eine Konkurrenz um die Kofaktoren SRC-1 und TIF-2 handelt. Im Folgenden soll nun mittels Chromatin Immunopräzipitation im gonadalem Fettgewebe von ER $\beta^{-1}$ - und Wildtyp-Mäusen geprüft werden, ob sich die Menge von Kofaktoren, die an den Promoter von PPAR $\gamma$ -Zielgenen gebunden sind, unterscheidet.

Als Zielgen wurde Adiponectin gewählt, weil Daten aus dem Tierversuch zeigen, dass  $ER\beta^{-/-}$ Tiere sowohl einen signifikant höheren Adiponectin-Plasmaspiegel als auch eine stärkere mRNA-Expression in gonadalem Fett als der Wildtyp aufweisen [119]. Falls tatsächlich eine Konkurrenz um SRC-1 und TIF-2 dieser Abhängigkeit zugrunde liegt, dann sollten die Promotorregionen von Adiponectin in Abwesenheit von funktionierendem ER $\beta$  stärker mit diesen Kofaktoren besetzt sein.

Die Anwendung der von uns etablierten ChIP-Methode in Fettgewebe erwies sich dabei als große Herausforderung. Der äußerst geringe Proteingehalt von Fettzellen und das geringe absolute Gewicht des aus einem einzelnen Tier gewonnenen Gewebes machten ein Pooling der verschiedenen Individuen einer Gruppe (Wildtyp bzw. Knockout) unvermeidbar. Aus diesem Grund sind quantitative statistische Auswertungen der vorgenommenen Experimente nicht möglich.

#### 3.6.1 ChIP mit Antikörpern gegen TIF-2 und SRC-1

Von 5 Wildtyp- und 6 ERβ<sup>-/-</sup>-Mäusen, die 12 Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert worden waren, wurde das gonadale Fettgewebe der beiden Gruppen gepoolt, nach Protokoll lysiert und eine ChIP mit Antikörpern gegen Polymerase II (Positivkontrolle), PPARγ, SRC-1 und TIF-2 durchgeführt, außerdem auf zusätzlichem Material eine Negativkontrolle mit Antikörpern gegen FLAG und Influenza-Hämagglutinin. Als Referenz für die eingesetzte DNA-Menge dienten jeweils 0,1% der entsprechenden Probe.

#### 3.6.1.1 DNA-Fragmentlänge

Zunächst wurde die Länge der DNA-Fragmente, die bei der Sonifikation des lysierten Gewebes entstehen, geprüft. Der Grad der Fragmentation hängt von der Dauer und Energie der Sonifikation ab, unterscheidet sich aber auch von Gewebe zu Gewebe. Eine DNA- Fragmentlänge von 200-1000 Basenpaaren ist ideal, um einerseits einen späteren Nachweis der DNA-Sequenzen mittels PCR zu ermöglichen und gleichzeitig die Spezifität für die entsprechende Protein-Bindungsstelle nicht zu verlieren [120]. Wie Abb. 3.14 zeigt, wird dieser Bereich mit unserem Protokoll erreicht.



#### 3.6.1.2 Kontrolle (Polymerase II / GAPDH)

Zur Kontrolle wurde anschließend eine ChIP mit Antikörpern gegen die DNA-abhängige RNA-Polymerase II durchgeführt und auf die Bindung der Polymerase an den Promotor der konstitutiv exprimierten GAPDH überprüft. Wie Abb. 3.15 zeigt, ist sowohl in den Wildtyp- als auch den  $ER\beta^{-/-}$ -Tieren die DNA-Proteinvernetzung und die anschließende Isolierung der DNA gelungen: Die Sequenz des GAPDH-Promotors lässt sich nicht nur vor der ChIP (in den "total"-Proben), sondern auch in den Immunopräzipitaten nachweisen.



Als Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen an Antikörper oder Beads bzw. Verunreinigungen wurde eine ChIP mit Antikörpern gegen nicht vorhandene Zielproteine mitgeführt: Das synthetische FLAG-Tag, das üblicherweise zur Markierung von (Fusions-)-Proteinen verwendet wird, und Influenza-Hämagglutinin. Zusätzlich wurde eine ChIP in Abwesenheit von Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.16. Ersichtlich ist, dass die Menge unspezifischer DNA-Kontaminationen in allen 3 Ansätzen vernachlässigbar ist.



#### 3.6.1.3 Bindung nukleärer Faktoren an den Adiponectin-Promotor

Zunächst wurde auch für die PCR des Adiponectin-Promotors eine Negativkontrolle durchgeführt, die keine unspezifischen DNA-Antikörperbindungen oder DNA-Kontaminationen ergab. (Abb. 3.17)



Wie eine ChIP mit Antikörpern gegen PPAR $\gamma$  zeigt, gibt es keinen deutlichen Unterschied zwischen ER $\beta^{-/-}$  und Wildtyp-Tieren in der Bindung von PPAR $\gamma$  an den Adiponectin-Promotor (Abb. 3.18). Es ist bekannt, dass das PPAR $\gamma$ -RXR-Dimer auch in inaktiver Konformation an DNA gebunden sein kann und in diesem Zustand Korepressoren rekrutiert [66]. Eine Differenz in der PPAR $\gamma$ -Bindung an den Adiponectin-Promotor wäre also nicht zu erwarten gewesen, die unterschiedliche PPAR $\gamma$ -Aktivität muss durch Faktoren bedingt werden, die weiter "downstream" in der Transkriptions-Initiation liegen.



Tatsächlich wird sowohl SRC-1 (Abb. 3.19) als auch vor allem TIF-2 (Abb. 3.20) in den ERβ<sup>-/-</sup> Tieren gegenüber dem Wildtyp deutlich verstärkt an den Adiponectin-Promotor angelagert. Während die eingesetzte DNA-Menge in beiden ChIPs ("total") gleich ist, ist nach Immunopräzipitation im Fettgewebe der Knockout-Tiere das Signal der Adiponectin-Promotor-Sequenz deutlich stärker als im Wildtyp.





Es zeigt sich also, dass durch Ausschaltung von ER $\beta$  *in vivo* die Kofaktoren SRC-1 und TIF-2 stärker an PPAR $\gamma$  und damit mittelbar an den Adiponectin-Promotor rekrutiert werden. Diese Beobachtung bestätigt die zuvor *in vitro* gewonnenen Ergebnisse und demonstriert so die Relevanz der Kofaktoren-Konkurrenz in einem physiologischen System.

## 4. Diskussion

Während die metabolische Funktion von ER $\alpha$  in den letzten Jahren Gegenstand mehrerer Veröffentlichungen war [96-99], ist der Effekt von ER $\beta$  auf die Energiehomöostase bislang deutlich weniger untersucht. So wurden ER $\beta^{-/-}$ -Mäuse unter Normaldiät als metabolisch unauffällig beschrieben [96,97], gleichzeitig führte aber die selektive Stimulation von ER $\beta$  in Muskelgewebe zu einer Abnahme der Expression des GLUT4-Glukosetransporters [99]. GLUT4 ist der wichtigste Transporter für insulinabhängige Glukoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe und wird durch PPAR $\gamma$  reguliert [75], allerdings ist die PPAR $\gamma$ -Expression in Skelettmuskulatur im Vergleich zu der in Adipozyten nur gering ausgeprägt [56]. Vor dem Hintergrund der großen Bedeutung von Fettgewebe in der Ätiopathogenese des metabolischen Syndroms haben wir die Beeinflussung von PPAR $\gamma$  durch ER $\beta$  in Adipozyten und deren Vorläufern untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von ER $\beta$  in Präadipozyten die ligandenabhängige Aktivität von PPAR $\gamma$  negativ reguliert. Dabei spielt eine Aktivierung von ER $\beta$  durch Liganden keine Rolle. Diese Interaktion konnte sowohl auf der Ebene der ligandenabhängigen Transaktivierung von PPAR $\gamma$  gezeigt werden, als auch durch Analyse der Expression ausgewählter PPAR $\gamma$ -Zielgene und schließlich im mikroskopischen Aspekt der sich differenzierenden Präadipozyten.

Anschließend wurde ein möglicher Mechanismus dieser negativen Regulation untersucht. Es konnte dargelegt werden, dass eine Konkurrenz um nukleäre Kofaktoren der p160-Familie eine zentrale Rolle in der Interaktion zwischen ER $\beta$  und PPAR $\gamma$  spielt.

Im Folgenden werden zunächst einige ausgewählte methodische Fragestellungen diskutiert und anschließend die Ergebnisse kritisch gewertet und mit anderen Arbeiten in Beziehung gesetzt. Den Abschluss bildet ein Ausblick auf die klinischen Konsequenzen der gewonnenen Erkenntnisse.

## 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 Modellsysteme

Für die *in vitro*-Experimente zur Regulation der PPAR $\gamma$ -Aktivität wurden murine 3T3-L1-Zellen ausgewählt, weil sie gut zu transfizieren sind und als Modell für Adipozyten und Adipogenese etabliert sind [121]. Dabei wird in undifferenzierten 3T3-L1-Präadipozyten nahezu kein natürliches PPAR $\gamma$  exprimiert [117,122], weshalb sich diese Zellen besonders für die kontrollierte Transfektion eignen. Mögliche Einschränkungen bestehen darin, dass es sich um murine Zellen handelt, die transfizierten Plasmide aber für humane Proteine kodieren. Insbesondere diejenigen Experimente, in denen keine humanen Kofaktoren transfiziert wurden und daher die endogenen murinen Proteine mit humanem PPARγ und ERβ interagieren mussten, könnten von dieser Limitation betroffen sein. Allerdings sind muriner und humaner SRC-1 bzw. TIF-2 zu 92% bzw. 94% homolog [123,124]. Die Tatsache, dass eine PPARγ-Aktivierung möglich war, zeigt, dass die Speziesschranke kein relevantes Hindernis darstellte.

Für die *in vivo*-Experimente bzw. die Untersuchung von weißem Fettgewebe wurden  $\text{ER}\beta^{-/-}$ -Mäuse gewählt, die schon früher erfolgreich zur Untersuchung metabolischer Effekte von  $\text{ER}\beta$  verwendet worden sind [97,99].

#### 4.1.2 Transiente Transfektion und Luziferase-Assay

Zur Transfektion kultivierter Zellen gibt es eine Reihe etablierter Methoden, unter anderem durch Verwendung von Viren [125], durch Nutzung von Endozytose-Rezeptoren an der Zelloberfläche [126] oder durch die Verwendung kationischer Lipide [127] wie Lipofectamin. Der Vorteil der von uns genutzten Lipofectamin-Methode liegt darin, dass die zu transfizierende DNA nicht spezifisch verändert, d.h. in ein Virus kloniert oder mit bestimmten Rezeptorliganden verknüpft werden muss. Die Methode nutzt kationische Liposomen, die durch elektrostatische Wechselwirkungen Komplexe mit der DNA bilden, an die Zelloberfläche binden und schließlich mit der Zellmembran verschmelzen, wobei die DNA ins Zytoplasma eingeschleust wird. Denkbare Fehlerquellen wie eine Beeinflussung zellulärer Abläufe durch Viren oder sterische Hinderung von DNA-Interaktionen durch Endozytose-Liganden sind auf diese Weise ausgeschlossen.

In den Transaktivierungsversuchen mittels eines Luziferase-Reportersystems wurden ein induzierbarer und ein konstitutiv exprimierter Reporter und die PPARγ-GAL4-Chimäre in die Zellen eingebracht. Durch die Transfektion der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase war eine Kontrolle der Transfektionseffizienz möglich. Die Aktivität der PPARγ-GAL4-induzierten Firefly-Luziferase wurde dabei mit der Renilla-Kontrolle ins Verhältnis gesetzt, um robuste Ergebnisse auch bei unterschiedlichem Transfektionserfolg zu erhalten. Eine Beschränkung des Modells besteht darin, dass der Luziferase-Reporter, der sich im Zytosol befindet, nur eingeschränkt mit der chromatin-gebundenen DNA im Nukleus vergleichbar ist. Gerade Effekte durch Kofaktoren, die über Chromatin-Acetylierungen ihre Wirkung entfalten, werden in diesem System möglicherweise nicht vollständig korrekt modelliert. Auch sind weitere Unterschiede zwischen dem zytosolischen und dem nukleären Milieu denkbar, die Einfluss auf die Transaktiverung haben. GAL4 enthält zwar eine nukleäre Lokalisationssequenz, diese ist aber

nicht wirksam, um den Transkriptionsfaktor zusammen mit DNA in den Zellkern zu schleusen [128]. Die Konsistenz der im Luziferase-Assay gewonnenen Ergebnisse mit Daten der Expressionsanalysen zeigt aber, dass diese theoretischen Limitationen in der Praxis offenbar keine Rolle spielen.

#### 4.1.3 Quantitative PCR

Diese Methode ermöglicht die absolute Quantifikation der Kopienzahl in einem PCR-Ansatz. Sie beruht darauf, dass ein Farbstoff (SYBR-Green<sup>®</sup>) mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkaliert und dabei seine photochemischen Eigenschaften verändert. SYBR-Green<sup>®</sup> emittiert auch in ungebundenem Zustand Licht nach Anregung durch einen geeigneten Lichtblitz. Diese Fluoreszenz verstärkt sich jedoch nach Bindung des Moleküls an dsDNA etwa um den Faktor 1500 [129]. Durch Messungen nach jedem Amplifikationszyklus lässt sich aus der ansteigenden Fluoreszenzintensität auf die zunehmende Menge von dsDNA schließen. Je größer diese zu Beginn war, desto früher tritt das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen hervor (der sog. C<sub>t</sub>-Wert, *threshold cycle*).

Dort gilt in guter Nährung die Beziehung

 $Kopienzahl_{(C)} = 2^{C} * Kopienzahl_{(0)}$  und damit  $Kopienzahl_{(0)} = Kopienzahl_{(C)} * 2^{-C_{t}}$ .

Um Ungleichmäßigkeiten der Gesamtmenge an cDNA zwischen einzelnen Proben auszugleichen, wurde die gemessene Kopienzahl grundsätzlich auf ein nicht reguliertes Housekeeping-Gen, die 18S-Untereinheit mitochondrialer rRNA [130], normalisiert und die Differenz  $C_t(Zielgen)-C_t(18S)$  für die Berechnung der Kopienzahl eingesetzt.

Verglichen wurden also letztlich jeweils die Quotienten  $\frac{Kopienzahl_0(Zielgen)}{Kopienzahl_0(housekeeping)}$  für

#### einzelne Zielgene.

Da das SYBR-Green<sup>®</sup>-Signal im Gegensatz zu sondenbasierten System wie TaqMan<sup>®</sup> nicht sequenzspezifisch ist, kommt der Analyse der Dissoziationskurve große Bedeutung zu. Hier kann indirekt über den Schmelzpunkt der dsDNA die Fragmentlänge abgeschätzt werden. Die Dissoziationskurve ( $\frac{-dF}{dT}$ aufgetragen über T) zeigt bei einer spezifischen Temperatur T ein Maximum. Dort fällt also die Fluoreszenz F schneller ab als in anderen Temperaturbereichen, was darauf schließen lässt, dass eine signifikante Menge dsDNA in der Lösung dissoziiert. Da diese Temperatur u.a. von der Fragmentlänge abhängig ist, lässt sich so recht gut zwischen dem eigentlichen Amplikon und etwaigen Nebenprodukten unterscheiden.

Bei sehr geringen Kopienzahlen ist die klassische semiquantitative PCR mit ihren distinkten Banden der SYBR-Green-realtime-PCR jedoch nach wie vor überlegen. Sehr schwache Templates gehen in der realtime-PCR regelmäßig im Rauschen der Nebenprodukte (Primer-Primer-Dimere u.ä.) unter.

#### 4.1.4 Chromatin-Immunopräzipitation

Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) ist eine Methode zur direkten Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen. Ausgehend von früheren Experimenten, in denen DNA und Histonproteine durch Formaldehyd vernetzt wurden (einen Überblick über die Entwicklung gibt [131]), publizierten Orlando et al. 1997 erstmals ein Protokoll, das als direkter Vorläufer heutiger ChIP-Verfahren gelten kann [120]. Allerdings gehen die meisten Publikationen von Zellkulturen und großen Mengen Material, oft Millionen von Zellen pro Ansatz, aus [132]. Insbesondere in Fettgewebe gab es bislang keine etablierten Protokolle. In umfangreichen Vorversuchen wurde deshalb das in Kapitel 2.2.3.3 beschriebene Verfahren entwickelt.

Methodische Probleme bestanden in der äußerst geringen absoluten Menge an Proteinen und DNA in den untersuchten Fettgewebsproben. Der größte Anteil eines Adipozyten besteht aus Lipiden, die vor der IP abgeschieden werden müssen, um nicht mit der Antikörperbindung zu interferieren. Zugleich ist die DNA-Ausbeute und damit die Sensitivität relativ gering, da in einem dynamischen Zellsystem nicht in allen Zellen der entsprechende Promotor zum Zeitpunkt des Crosslinking mit Protein besetzt ist, die Bruchstellen der Sonifikation unvorhersehbar sind und schließlich nicht jedes Zielprotein von Antikörpern gebunden und an die Beads adsorbiert wird. Um überhaupt eine Aussage treffen zu können und ein ausreichendes Signal zu erzeugen, waren wir gezwungen, die Tiere der beiden Gruppen jeweils zusammenzufassen. Auch ließ sich das Signal in der realtime-PCR nicht von unspezifischen Primer-Dimeren u.ä. differenzieren, so dass nur eine semiquantitative Auswertung mittels Gel-Elektrophorese in Betracht kam.

Alle diese Limitationen schränken die Aussagekraft der ChIP-Ergebnisse für sich alleine genommen ein, in der Zusammenschau mit den übrigen Resultaten ergibt sich jedoch ein konsistentes Bild. Die ChIP muss hier als ein weiterer Hinweis auf den Mechanismus einer Kofaktoren-Konkurrenz gesehen werden.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1 Interaktion zwischen ER $\beta$ und PPAR $\gamma$ in Adipozyten

#### 4.2.1.1 Inhibition der PPARy-Aktivität

Bereits früher sind Interaktionen zwischen Estrogenrezeptoren und PPARγ beschrieben worden. Erstmals konnten Keller et al. 1995 zeigen, dass PPARs an verschiedene Estrogen responsive elements (ERE) auf der DNA binden und in einem Fall sogar die Transkription eines ER-Zielgens, Vitellogenin A2, initiieren können [133]. An den anderen ERE wirkte der gebundene PPAR/RXR-Komplex als Transkriptionsinhibitor [133].

In einer anderen Arbeit wird berichtet, dass PPAR $\gamma$ -Agonisten, nicht aber Liganden der übrigen PPARs, in einem Mausmodell für estrogenabhängige Uterusmyome deren Wachstum hemmen. Dieser Effekt basiert auf einer Inhibition der ER-Aktivität, allerdings unterscheiden die Autoren nicht zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  [134].

Die Modulation der Aktivität von PPAR $\gamma$  durch ERs wurde von Wang und Kilgore untersucht: Sie konnten in zwei Zelllinien humaner Mammakarzinome zeigen, dass dort ERs die ligandenabhängige PPAR $\gamma$ -Aktivierung inhibieren. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ist diese Inhibition von der Anwesenheit eines ER-Liganden unabhängig. Im Gegensatz zu unserer Arbeit konnte Wang allerdings auch durch ER $\alpha$  eine Inhibitionswirkung nachweisen, wenngleich diese schwächer war als diejenige von ER $\beta$  [135].

Die Aktivität von PPARy variiert in hohem Maße zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben [58]. Die stärkste Aktivität des Rezeptors und damit die höchste Expression PPARyregulierter Zielgene wurde in Adipozyten gemessen, ein Umstand, der die zentrale Rolle von PPARy in der Adipogenese unterstreicht. Man geht davon aus, dass in Adipozyten das Kofaktormilieu und andere molekulare Voraussetzungen weitgehend optimiert sind [54]. Während in 3T3-L1-Adipozyten nach Stimulation mit Pioglitazon die Aktivität von PPARy typischerweise um den Faktor 10 bis 20 ansteigt, war in Mammakarzinom-Zellen nur knapp eine Verdopplung der Aktivität messbar [135]. Die Inhibition der PPAR $\gamma$ -Aktivität durch ER $\alpha$  mag der verhältnismäßig geringen Expression und schwachen Aktivität des Rezeptors in Mammakarzinom-Zelllinien geschuldet sein. Es ist plausibel, dass die ungleich potentere PPARy-Aktivierung unter optimalen Bedingungen in Adipozyten eine stärkere Inhibition erfordert, um einen Effekt zu beobachten. Durch Überexpression von ERα, auch bei Wang et al. schwächerer als ERβ, offenbar eine hinreichende ein PPARγ-Inhibitor konnte Suppressionswirkung in Adipozyten nicht erreicht werden.

#### 4.2.1.2 Unabhängigkeit des Effekts von ERβ-Liganden

Die Hemmung der PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch ER $\beta$  ist unabhängig von ER $\beta$ -Liganden, diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten [135]. Insbesondere hat die Überexpression von  $\Delta$ AF1-ER $\beta$ , einer verkürzten Form von ER $\beta$  ohne die AF1-Funktion, keinen inhibitorischen Effekt. Die N-terminal gelegene AF1-Funktion von nukleären Rezeptoren wird als wichtige Bindungsstelle für Kofaktoren gesehen und ist gewöhnlich nicht direkt von der Bindung eines Liganden abhängig [37,39]. ER $\alpha$  und ER $\beta$  weisen im Bereich der AF1-Domain die größten Sequenzunterschiede auf, gleichzeitig ist dieser Bereich bei den ER $\beta$  von Mensch, Maus und Ratte hoch konserviert [136]. Beides deutet auf eine distinkte, evolutionär bedeutsame Funktion dieses Teils der jeweiligen Rezeptoren hin.

In einer Reihe eleganter Experimente konnte die Gruppe um Hawse kürzlich zeigen, dass sowohl SRC-1 als auch TIF-2 an die AF-1-Funktion von ER $\beta$  gebunden werden. Mit Hilfe von Chimären aus ER $\beta$ -AF1 und  $\Delta$ AF1-ER $\alpha$  bzw. ER $\alpha$ -AF1 und  $\Delta$ AF1-ER $\beta$  haben die Forscher demonstriert, dass einerseits die Kofaktorbindung isotypspezifisch ist und zum anderen das Vorhandensein der ER $\beta$ -AF1 hinreichend und notwendig für die Anlagerung von SRC-1 und TIF-1 an den DNA-gebundenen Rezeptor ist. Eine Bindung an die Er $\alpha$ -AF1 wurde in der Arbeit nicht beobachtet [137]. Obwohl diese Experimente unter Stimulation mit E<sub>2</sub> durchgeführt wurden, spricht viel dafür, dass ER $\beta$  die p160-Kofaktoren generell an die AF1 rekrutiert. Tremblay et al. haben schon 2001 nachgewiesen, dass zur Aktivierung der ER $\beta$ -AF1 ligandenunabhängig SRC-1 gebunden wird [138].

Dass  $\Delta AF1$ -ER $\beta$  in unseren Experimenten nicht inhibitorisch wirksam war, ist also als Hinweis darauf zu sehen, dass die Bindung der Kofaktoren an ER $\beta$  notwendig ist für die Suppression der PPAR $\gamma$ -Aktivität.

#### 4.2.2 Verminderte Zielgenexpression nach Transfektion

Expressionsanalysen von PPARγ-Zielgenen *in vitro* haben gezeigt, dass der im Luziferase-Assay beobachtete Inhibitionseffekt auch physiologisch relevant ist.

Präadipozyten exprimieren selbst nur geringe Mengen PPAR $\gamma$  [117,122]. Es ist daher nachvollziehbar, dass entweder erst nach der Transfektion von PPAR $\gamma$  und RXR oder nach einer beginnenden Differenzierung zu Adipozyten signifikante Inhibitionseffekte von ER $\beta$  sichtbar wurden. Nach der gewählten Differenzierungszeit von 48 Stunden ist mit einer PPAR $\gamma$ -Expression zu rechnen [121,139].

Die Beobachtung, dass sowohl nach PPARγ-Transfektion und Stimulation als auch im Zuge der Differenzierung ap2 stark exprimiert wird, deckt sich mit früheren Beobachtungen [118]. ap2 ist

ein Protein, das bisher exklusiv in Adipozyten nachgewiesen wurde und durch PPAR $\gamma$  reguliert wird [140]. Der dramatische Anstieg der Expression nach TZD-Stimulation ist dabei für dieses Gen typisch [118]. Erwartungsgemäß zeigt sich die Inhibition der PPAR $\gamma$ -Aktivität bei Kotransfektion von ER $\beta$  in einer signifikant verminderten Expression von ap2.

Anders verhält es sich mit LPL, einem weiteren PPAR $\gamma$ -Zielgen: Die Reaktion auf Pioglitazon fällt deutlich milder aus als bei ap2. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die LPL-Expression nur schwach auf TZD-Stimulation reagiert [118], aber im Laufe der Differenzierung nach 24-48 Stunden nennenswert ansteigt [141]. Die bestätigt sich in unseren Ergebnissen: Durch Stimulation mit Pioglitazon konnte die LPL-Expression zwar gesteigert und durch Kotransfektion mit ER $\beta$  auch wieder gemindert werden, die Effekte waren jedoch nicht ausreichend groß, um statistische Signifikanz zu erreichen. Wurde dagegen durch partielle Differenzierung eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung erreicht, ergaben sich hinreichend stabile und signifikante LPL-Expressionen und Inhibitionseffekte. Über die natürlichen Liganden von PPAR $\gamma$ , die während der Differenzierung den Rezeptor aktivieren, ist wenig bekannt [59], es ist jedoch davon auszugehen, dass diese sich in Struktur und molekularen Eigenschaften von den synthetischen TZD unterscheiden. Möglicherweise induzieren die natürlichen Liganden eine von der TZD-induzierten Form abweichende Konformation des Rezeptors, die andere Affinitäten zu einzelnen PPREs aufweist. Ein ähnlicher Effekt wurde in der Vergangenheit für unterschiedliche SERM und ihre Wirkung auf Estrogenrezeptoren gezeigt [86,142].

Die signifikante ERβ-abhängige Inhibition von Adiponectin in dem Pioglitazon-stimulierten Ansatz und das Ausbleiben eines solchen Effekts nach 48 Stunden Differenzierung ist im Kontext der komplexen Regulation diese Gens zu sehen. Die Beobachtung, dass die Expression von Adiponectin-mRNA unter Stimulation mit TZD ansteigt, steht in Übereinstimmung mit früheren *in vitro* und *in vivo*-Studien [143,144]. Der Adiponectin-Promotor weist ein funktionelles PPRE auf [145], damit ist eine Regulation durch PPAR $\gamma$  zu erwarten. Tatsächlich exprimieren Mäuse mit einem fettgewebsspezifischen PPAR $\gamma$ -Knockout signifikant weniger Adiponectin in den Adipozyten und weisen im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringere zirkulierende Plasmaspiegel des Proteins auf [68]. Allerdings wird die Expression von Adiponectin zusätzlich durch CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) reguliert, einen Transkriptionsfaktor, der neben PPAR $\gamma$  eine zentrale Rolle in der Adipogenese spielt [146]. C/EBP $\alpha$  steigt in 3T3-L1-Zellen nach etwa 48 Stunden Differenzierung an [146] und aktiviert die Transkription von Adiponectin über verschiedene Bindungsstellen im Enhancer-Bereich des Gens [147-149]. Dabei scheint PPAR $\gamma$  notwendig für die Expression von Adiponectin zu sein, C/EBP $\alpha$  kann die Transkription aber unabhängig davon noch deutlich steigern [148,150]. Offenbar wird in unserem Experiment nach 48 Stunden Differenzierung der größte Teil der Adiponectin-Expression von C/EBP $\alpha$  reguliert und entzieht sich damit einer Inhibition durch ER $\beta$ . Zusätzlich könnte die fehlende Regulation in methodischen Limitierungen begründet sein. Die geringe Expression von Adiponectin in den ersten 48 Stunden der Differenzierung [151] erschwert die Detektion eines inhibitorischen Effekts durch ER $\beta$ .

Wie andere Mitglieder unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, weisen  $ER\beta^{-/-}$ -Mäuse dagegen nicht nur eine verstärkte PPAR $\gamma$ -Aktivität, sondern auch signifikant erhöhte Adiponectin-Expression in weißem Fettgewebe sowie höhere Adiponectin-Plasmaspiegel auf [119]. Somit konnte die Relevanz der ER $\beta$ -vermittelten Regulation von Adiponectin *in vivo* eindeutig belegt werden.

Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahren sind wir von einem vollständigen Verständnis der intrikaten Regulationsmechanismen im Zuge der Adipogenese noch weit entfernt [152]. Zukünftige Arbeiten werden eventuell die unterschiedlich enge Kopplung zwischen PPARγ-Aktivität und Adiponectin in den einzelnen Phasen der Adipogenese weiter aufklären können.

Unsere *in vitro*-Ergebnisse zur Suppression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen durch ER $\beta$  werden durch molekularbiologische und physiologische Untersuchungen an ER $\beta^{-/-}$ -Mäusen bestätigt: Konsistent mit einer verstärkten PPAR $\gamma$ -Aktivierung bei fehlendem ER $\beta$  sind die Knockout-Tiere unter einer Hochfettdiät im Vergleich zum Wildtyp schwerer und haben einen höheren Körperfettanteil bei gleichzeitig besserer Insulinsensitivität [119]. Dieser Phänotyp entspricht den Wirkungen, die auch bei klinischer Anwendung von PPAR $\gamma$ -Agonisten beobachtet werden [153]. Außerdem werden mehrere PPAR $\gamma$ -Zielgene, unter anderem LPL und Adiponectin, in weißem Fettgewebe der ER $\beta^{-/-}$ -Tiere verstärkt exprimiert [119].

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass die metabolischen Effekte von ER $\beta$ durch eine Inhibition von PPAR $\gamma$  vermittelt werden. Unabhängig von einer Estrogenbindung führt die Expression von ER $\beta$  zu verminderter PPAR $\gamma$ -Aktivität und supprimierter Expression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen. Im Tiermodell bewirkt der Knock-out von ER $\beta$  eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung, die der Wirkung von pharmakologischen PPAR $\gamma$ -Agonisten beim Menschen ähnelt.

#### 4.2.3 Mechanismus der Interaktion

#### 4.2.3.1 Disinhibition durch Kofaktoren im Luziferase-Assay

Eine Kompetition um Kofaktoren wurde zwischenzeitlich für eine Vielzahl von Interaktionen zwischen nukleären Rezeptoren nachgewiesen. ERα und der Schilddrüsenhormonrezeptor (TR) stehen im Wettbewerb um SRC-1 und TIF-2 und inhibieren sich wechselseitig [154]. Auch zwischen ERα und dem konstitutiven Androstanrezeptor (CAR) wurde eine ähnliche Interaktion beobachtet, die sich durch Titration von Kofaktoren aufheben lässt [155].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch die Interaktion zwischen ER $\beta$  und PPAR $\gamma$  auf einem solchen oft als *squelching* bezeichneten Mechanismus beruht. Im Luziferase-Reporter-Assay konnte die Inhibition von PPAR $\gamma$  durch Kotransfektion mit SRC-1 oder TIF-2 ganz oder teilweise rückgängig gemacht werden. Dass TIF-2 dabei, bezogen auf die transfizierte DNA-Menge, PPAR $\gamma$  effektiver aktiviert als SRC-1, steht im Einklang mit früheren *in vitro*-Studien unter Rosiglitazon-Stimulation [103].

Tremblay et al. haben nachgewiesen, dass ER $\beta$  nach einer Phosphorylierung ligandenunabhängig SRC-1 rekrutiert und auf diese Weise aktiviert wird [156]. Auch TIF-2 wird in Abwesenheit von Ligand an ER $\beta$  gebunden, nicht aber an ER $\alpha$ , wie Klinge und Mitarbeiter zeigen konnten [86]. Die unterschiedlichen Kofaktor-Präferenzen und –Bindungskonstanten von ER $\beta$  und ER $\alpha$  [157] machen vor diesem Hintergrund verständlich, dass die beobachtete Interaktion isotypspezifisch für ER $\beta$  ist. ER $\alpha$  bindet in Abwesenheit von Liganden die Kofaktoren SRC-1 und/oder TIF-2 nicht mit ausreichend hoher Affinität, um sie von PPAR $\gamma$  abzuziehen.

#### 4.2.3.2 Verstärkte Kofaktorbindung an Adiponectin in ER $\beta^{--}$ -Mäusen

Durch Chromatin Immunopräzipitation konnten wir zeigen, dass sowohl SRC-1 als auch TIF-2 im weißen Fettgewebe von  $ER\beta^{-/-}$ -Mäusen stärker an den Adiponectin-Promotor gebunden sind als im Wildtyp. Das Fehlen von  $ER\beta$  ermöglicht, dass die freien Kofaktoren vermehrt durch PPAR $\gamma$  rekrutiert werden und PPAR $\gamma$ -Zielgene wie Adiponectin verstärkt exprimiert werden. Unseres Wissens ist es das erste Mal, dass Protein-DNA-Interaktionen auf diese Weise in tierischem Fettgewebe untersucht wurden. Die physiologischen Implikationen dieser verstärkten Kofaktor-Rekrutierung zeigen sich in den erhöhten Adiponectin-Spiegeln und letztlich in der verbesserten Insulinsensitivität der  $ER\beta^{-/-}$ -Tiere [119]. Wie oben erläutert, wirkt eine erhöhte PPAR $\gamma$ -Aktivität im Fettgewebe auf zweierlei Wegen anti-diabetogen: Zum Einen durch Aufnahme und Speicherung von Lipiden in den Adipozyten und eine damit verminderte Lipidbelastung von Leber und Muskulatur und zum Anderen durch eine ausgewogene, regelrechte Sekretion von Adipokinen wie u.a. Adiponectin, die bedeutende Mediatoren der Insulinsensitivität im Gesamtorganismus sind [35].

DRIP205 interagiert als Teil des DRIP/TRAP-Komplexes direkter als die Chromatin-Remodelling-Faktoren SRC-1 und TIF-2 mit der RNA-Polymerase und weiteren basalen Transkriptionsfaktoren [158]. Dabei spielt DRIP205 eine zentrale Rolle für die Transkriptionsinitiation durch eine Vielzahl weiterer NR neben PPAR $\gamma$  und ER $\beta$  [106,159,160]. Eine Knappheit von DRIP205 als Voraussetzung einer Konkurrenz hätte bei dieser Vielzahl an Interaktionspartnern unabsehbare Konsequenzen. Unabhängig davon haben Ge et al. kürzlich berichtet, dass in gewissen Situationen auch in Abwesenheit von DRIP205 eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung möglich ist [107]. Dies steht im Einklang mit unseren Beobachtungen, dass die Überexpression von DRIP205 im Luziferase-Assay die Inhibition nicht aufhebt und der Kofaktor offenbar nicht Objekt einer Konkurrenz zwischen ER $\beta$  und PPAR $\gamma$  ist.

#### 4.2.4 Klinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

#### 4.2.4.1 Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien zeigt bei Männern im Vergleich zu Frauen eine höhere Prävalenz des Metabolischen Syndroms [10,11,15]. Prämenopausale Frauen ohne manifesten Diabetes sind im Allgemeinen weniger insulinresistent als Männer entsprechenden Alters [16,17]. Die klinischen Daten von TZD zeigen, dass die PPAR $\gamma$ -Aktivität im Fettgewebe für die Insulinsensitivität des Organismus von großer Bedeutung ist [60]. Daher stellt sich die Frage, wie sich der von uns beobachtete Cross-Talk zwischen ER $\beta$  und PPAR $\gamma$  in klinischpathophysiologische Parameter übersetzt. Sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  werden in humanen Adipozyten exprimiert, ER $\alpha$  allerdings etwa um den Faktor 1000 stärker als ER $\beta$ . Dabei ist die Expression von ER $\beta$  in weiblichen Adipozyten signifikant stärker als in männlichen, wie Dieudonné und Kollegen zeigen konnten [100].

Da Estrogene über eine Aktivierung von ERα insulinsensitivierend wirken [97], ist es wahrscheinlich, dass Frauen von höheren Estradiolspiegeln auch metabolisch profitieren. Vor der Menarche und nach der Menopause sind dagegen die weiblichen und männlichen Plasmaspiegel weitestgehend gleich [90,161]. Tatsächlich sind Mädchen sowohl im Alter von 5 Jahren [162] als auch in der frühen Pubertät [163] intrinsisch insulinresistenter als gleichaltrige Jungen. In einer anderen Studie wurden Frauen mit klinisch normaler Glukosetoleranz unmittelbar postmenopausal mit gleichaltrigen Männern verglichen: Die Insulinsensitivität der

Frauen nimmt nicht nur perimenopausal signifikant ab und die Insulinresistenz zu, die postmenopausalen Frauen sind auch signifikant insulinresistenter als Männer des entsprechenden Alters [164].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeichnen im Zusammenspiel mit den angeführten epidemiologischen Daten ein Bild des weiblichen Metabolismus, in dem die diabetogenen Eigenschaften von ER $\beta$  während eines Großteils des Lebens durch Estrogenwirkungen via ER $\alpha$  überkompensiert werden. Erst bei Wegfall der protektiven E<sub>2</sub>-Wirkung kommen die PPAR $\gamma$ -inhibierenden Effekte von ER $\beta$ , welche E<sub>2</sub>-unabhängig sind, physiologisch zum Tragen. Nicht nur Insulinresistenz, sondern auch die übrigen Faktoren des Metabolischen Syndroms treten nach der Menopause vermehrt auf [165].

#### 4.2.4.2 Konsequenzen für die Entwicklung von ERβ-Agonisten

Die PPAR $\gamma$ -inhibierenden, potentiell diabetogenen ER $\beta$ -Effekte sind auch für die weitere pharmazeutische Forschung und Entwicklung bedeutsam. So ist für den SERM Raloxifen zwischenzeitlich beschrieben worden, dass er nicht nur die Bindung von SRC-1 und TIF-2 an ER $\beta$  inhibiert, sondern auch tatsächlich im Zellkulturexperiment PPAR $\gamma$ -aktivierend wirkt [166,167]. ER $\beta$ -Agonisten, die im Gegensatz zu Raloxifen die Kofaktorbindung verstärken, sind unter diesem Aspekt bislang nicht untersucht worden.

Gegenwärtig befindet sich eine Vielzahl neuer Substanzen mit ER $\beta$ -selektiver Wirkung in der Entwicklung. Erfolgsversprechende Anwendungen liegen unter anderem in einer ER $\beta$ vermittelten Immunmodulation bei Rheumatoider Arthritis [168] oder in der Therapie des septischen Schocks [169,170]. Auch gegen benigne Prostatahyperplasie [171] oder psychische Erkrankungen [172] werden ER $\beta$ -spezifische SERMs erprobt. Dabei haben Cvoro et al. gezeigt, dass die verschiedenen selektiven ER $\beta$ -Agonisten sehr effektiv TIF-2 an den Estrogenrezeptor rekrutieren [173]. Trotz der hohen Gewebeselektivität solcher Verbindungen und der Tatsache, dass die in unserer Arbeit beobachteten Wechselwirkungen ligandenunabhängig waren, besteht damit theoretisch die Gefahr unerwünschter metabolischer Nebenwirkungen. Vor einer eventuellen Zulassung von ER $\beta$ -Agonisten sollte man sich der möglichen negativen Auswirkungen von ER $\beta$  auf Insulinsensitivität und Glukosestoffwechsel bewusst sein. Insbesondere wenn ER $\beta$ -Agonisten zur längerfristigen Therapie chronischer Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis angewandt werden, ist eine sorgfältige Kontrolle metabolischer Parameter angezeigt. Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass ER $\beta$  in Adipozyten eine negative Regulation auf PPAR $\gamma$  ausübt und als Mechanismus dabei eine Konkurrenz um die Kofaktoren SRC-1 und TIF-2 zum Tragen kommt. Diese *in vitro*-Ergebnisse haben zusammen mit Beobachtungen aus Tierversuchen und Daten epidemiologischer Studien nicht nur unser Verständnis für die metabolischen Effekte von Estrogen und die komplexe Regulation nukleärer Rezeptoren erweitert, sondern bedingen auch unmittelbar Konsequenzen für die zukünftige Entwicklung ER $\beta$ -selektiver Pharmaka.

# 5. Zusammenfassung

Peroxisomen-Proliferator-aktiverter Rezeptor gamma (PPAR $\gamma$ ) und Estrogenrezeptor beta (ER $\beta$ ) sind ligandenaktivierte nukleäre Rezeptoren, die die Transkription von Zielgenen steuern. PPAR $\gamma$  reguliert dabei in erster Linie Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels. Das weibliche Geschlechtshormon Estradiol übt einen positiven Einfluss auf das Lipidprofil und die Insulinsensitivität des Gesamtorganismus aus, dieser Effekt wird durch Estrogenrezeptor alpha (ER $\alpha$ ) vermittelt. Die selektive Aktivierung von ER $\beta$  führt dagegen in Muskelzellen dazu, dass der Glukosetransporter GLUT4, ein PPAR $\gamma$ -Zielgen, vermindert exprimiert wird. Das Metabolische Syndrom ist eine Kombination von Adipositas, Insulinresistenz und weiteren Störungen, in deren Pathogenese das Fettgewebe eine zentrale Rolle spielt. PPAR $\gamma$ -Aktivierung kann verschiedenen Aspekten des Syndroms wie Insulinresistenz und Hyperlipidämie entgegenwirken, dieser Effekt wird auch therapeutisch genutzt.

In dieser Arbeit haben wir untersucht, ob ER $\beta$  in Adipozyten metabolische Effekte durch eine Inhibition von PPAR $\gamma$  entfaltet.

Im Gal4-Luziferase-Assay konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ER $\beta$  in 3T3-L1-Präadipozyten die Aktivität von PPAR $\gamma$  hemmt. Dieser Effekt ist unabhängig von ER $\beta$ -Liganden und isotypspezifisch für den Rezeptor; ER $\alpha$  zeigt eine solche Inhibition nicht. Durch Kotransfektion der nukleären Kofaktoren SRC-1 oder TIF-2 lässt sich die Inhibitionswirkung aufheben. In Präadipozyten, die mit PPAR $\gamma$  transfiziert wurden, mindert die gleichzeitige Transfektion von ER $\beta$  signifikant die mRNA-Expression der PPAR $\gamma$ -Zielgene ap2 und Adiponectin nach 48 Stunden Inkubation mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon, außerdem lagern die Zellen histologisch weniger Fetttröpfchen ein. Präadipozyten, die mit ER $\beta$  transfiziert wurden, weisen im Vergleich zu ER $\beta$ -freien Kontrollen nach einer partiellen Differenzierung zu Adipozyten geringere Expressionen der PPAR $\gamma$ -Zielgene ap2 und LPL auf. Im Fettgewebe von ER $\beta$ -Knockout-Mäusen konnte mittels Chromatin-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass in den Knockout-Tieren mehr SRC-1 und TIF-2 an den Adiponectin-Promotor gebunden ist als im Wildtyp.

Zusammenfassend zeigen die gewonnenen Daten, dass ERβ über eine Konkurrenz um nukleäre Kofaktoren PPARγ inhibiert und damit potentiell ungünstige Effekte auf Insulinsensitivität und Lipidprofil ausübt. Dies hat Konsequenzen für unser Verständnis von Geschlechterunterschieden des Metabolischen Syndroms und die Entwicklung zukünftiger selektiver ERβ-Agonisten.

# 6. Abstract

Peroxisome-proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) are ligand activated transcription factors acting through the activation of specific target genes. PPAR $\gamma$  primarily regulates genes involved in lipid and glucose metabolism. The female sex hormone estradiol exerts beneficial effects on the lipid profile and insulin sensitivity, these effects are mediated by estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). In contrast, selective activation of ER $\beta$  in muscle cells leads to reduced expression of the PPAR $\gamma$  target gene GLUT4, a glucose transporter. The metabolic syndrome is defined as a combination of obesity, insulin resistance and other symptoms. Adipose tissue plays an important role in the pathogenesis of the metabolic syndrome and PPAR $\gamma$  activation ameliorates several aspects of the syndrome like insulin resistance or dyslipidemia.

The present study investigates whether  $ER\beta$  exerts metabolic effects in adipocytes through inhibition of PPAR $\gamma$ .

In the Gal4 transactivation assay we were able to show that ER $\beta$  overexpression in 3T3-L1preadipocytes inhibits PPAR $\gamma$  activity. This effect is ligand independent and specific for ER $\beta$ ; no significant inhibition is seen with ER $\alpha$ . By addition of the nuclear coregulators SRC-1 or TIF-2 the PPAR $\gamma$  inhibition is attenuated. When PPAR $\gamma$  transfected preadipocytes are stimulated with the PPAR $\gamma$  agonist Pioglitazone for 48 h, mRNA expression of the PPAR $\gamma$  target genes ap2 and adiponectin is reduced in cells cotransfected with ER $\beta$  and these cells show reduced lipid storage. ER $\beta$  transfected preadipocytes express reduced levels of the PPAR $\gamma$  target genes ap2 and LPL after partial differentiation when compared to ER $\beta$ -free cells. Using chromatin immunoprecipitation we demonstrated that SRC-1 and TIF-2 binding to the adiponectin promotor in white adipose tissue of ER $\beta$  knockout mice is enhanced in knockout animals compared to their wild type littermates.

Collectively, this study demonstrates that  $ER\beta$  inhibits PPAR $\gamma$  activity in adipocytes through a competition for nuclear coregulators. This inhibition has potentially deleterious effects on insulin sensitivity and the lipid profile. The present data have significant implications for our understanding of gender differences in the metabolic syndrome and are important for the development of selective ER $\beta$  agonists for therapeutic use.

# 7. Literatur

- 1. Batsis JA, Nieto-Martinez RE, Lopez-Jimenez F. (2007) *Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine.* Clin Pharmacol Ther 82:509-524
- 2. **Kylin E**. (1923) *Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom*. Zentralblatt für Innere Medizin 44:105-127
- 3. **Reaven GM**. (1988) *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.* Diabetes 37:1595-1607
- 4. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO\_NCD\_NCS\_99.2.pdf (Stand 1.3.2008)
- 5. International Diabetes Federation. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. http://www.idf.org/webdata/docs/Metab\_syndrome\_def.pdf (Stand 1.3.2008)
- 6. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation 112:2735-2752
- 7. **Hill JO, Peters JC**. (1998) *Environmental contributions to the obesity epidemic*. Science 280:1371-1374
- 8. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. (2007) The epidemiology of obesity. Gastroenterology 132:2087-2102
- 9. **Rechkemmer G**. *Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht, Teil 1*. http://www.wasesse-ich.de/uploads/media/NVS\_II\_Ergebnisbericht\_Teil\_1.pdf (Stand 5.1.2009)
- 10. Ford ES. (2005) Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. Diabetes Care 28:2745-2749
- 11. Moebus S, Hanisch JU, Aidelsburger P, et al. (2007) Impact of 4 different definitions used for the assessment of the prevalence of the Metabolic Syndrome in primary healthcare: The German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS). Cardiovasc Diabetol 6:22
- 12. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. (2005) The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. Diabetes Care 28:2289-2304
- 13. Clemenz M, Kintscher U, Unger T. (2006) *The metabolic syndrome: cluster with a self-fulfilling loop?* J Hypertens 24:257-258
- 14. Sundström J, Riserus U, Byberg L, et al. (2006) Clinical value of the metabolic syndrome for long term prediction of total and cardiovascular mortality: prospective, population based cohort study. BMJ 332:878-882

- 15. Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO. (2006) Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. Clin Res Cardiol 95:136-147
- 16. Williams JW, Zimmet PZ, Shaw JE, et al. (2003) Gender differences in the prevalence of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance in Mauritius. Does sex matter? Diabet Med 20:915-920
- 17. Hanefeld M, Koehler C, Fuecker K, et al. (2003) Insulin secretion and insulin sensitivity pattern is different in isolated impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose: the risk factor in Impaired Glucose Tolerance for Atherosclerosis and Diabetes study. Diabetes Care 26:868-874
- 18. Williams CM. (2004) Lipid metabolism in women. Proc Nutr Soc 63:153-160
- 19. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. (2007) Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. Circulation 116:39-48
- 20. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. (2000) Menopause-related changes in body fat distribution. Ann N Y Acad Sci 904:502-506
- 21. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, et al. (2003) Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. Diabetes 52:268-276
- 22. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, et al. (2004) Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. Circ J 68:975-981
- 23. Motoshima H, Wu X, Sinha MK, et al. (2002) Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. J Clin Endocrinol Metab 87:5662-5667
- 24. Rogowski O, Shapira I, Berliner S. (2008) Exploring the usefulness of inflammationsensitive biomarkers to reveal potential sex differences in relation to low-grade inflammation in individuals with the metabolic syndrome. Metabolism 57:1221-1226
- 25. Klip A, Paquet MR. (1990) Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. Diabetes Care 13:228-243
- 26. Rosen ED, Spiegelman BM. (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. Nature 444:847-853
- 27. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372:425-432
- 28. Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. (2007) The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. Trends Cardiovasc Med 17:275-283
- 29. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. J Biol Chem 271:10697-10703
- 30. **Trujillo ME, Scherer PE**. (2006) *Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease*. Endocr Rev 27:762-778
- 31. Kadowaki T, Yamauchi T. (2005) *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev 26:439-451
- 32. Baratta R, Amato S, Degano C, et al. (2004) Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and intervention studies. J Clin Endocrinol Metab 89:2665-2671
- 33. Chow WS, Cheung BM, Tso AW, et al. (2007) Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. Hypertension 49:1455-1461
- 34. Blüher M, Bullen JW, Jr., Lee JH, et al. (2006) Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. J Clin Endocrinol Metab 91:2310-2316
- 35. Kintscher U, Law RE. (2005) *PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab 288:E287-E291
- 36. Robinson-Rechavi M, Escriva GH, Laudet V. (2003) The nuclear receptor superfamily. J Cell Sci 116:585-586
- 37. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. Pharmacol Rev 58:685-704
- 38. McKenna NJ, O'Malley BW. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. Cell 108:465-474
- 39. Wärnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JÅ. (2003) Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. Mol Endocrinol 17:1901-1909
- 40. Khorasanizadeh S, Rastinejad F. (2001) Nuclear-receptor interactions on DNAresponse elements. Trends Biochem Sci 26:384-390
- 41. Nagy L, Schwabe JW. (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. Trends Biochem Sci 29:317-324
- 42. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. Nature 387:733-736
- 43. Oñate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. Science 270:1354-1357
- 44. Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. (1996) *TIF2*, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. EMBO J 15:3667-3675

- 45. McKenna NJ, O'Malley BW. (2002) Nuclear receptor coactivators--an update. Endocrinology 143:2461-2465
- 46. **Rosenfeld MG, Glass CK**. (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by *nuclear receptors*. J Biol Chem 276:36865-36868
- 47. Drané P, Barel M, Balbo M, Frade R. (1997) Identification of RB18A, a 205 kDa new p53 regulatory protein which shares antigenic and functional properties with p53. Oncogene 15:3013-3024
- 48. **Privalsky ML**. (2004) *The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors.* Annu Rev Physiol 66:315-360
- 49. Motojima K. (1993) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): structure, mechanisms of activation and diverse functions. Cell Struct Funct 18:267-277
- 50. **Issemann I, Green S**. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347:645-650
- 51. Dreyer C, Krey G, Keller H, et al. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell 68:879-887
- 52. Chen F, Law SW, O'Malley BW. (1993) Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. Biochem Biophys Res Commun 196:671-677
- 53. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. Pharmacol Rev 58:726-741
- 54. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. (1994) *mPPAR gamma* 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. Genes Dev 8:1224-1234
- 55. Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK. (1993) Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. J Biol Chem 268:26817-26820
- 56. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR, Jr. (1997) Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. J Biol Chem 272:8071-8076
- 57. Lazar MA. (2005) PPAR gamma, 10 years later. Biochimie 87:9-13
- 58. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, et al. (1997) *The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene.* J Biol Chem 272:18779-18789
- 59. Berger J, Moller DE. (2002) *The mechanisms of action of PPARs.* Annu Rev Med 53:409-435
- 60. **Staels B, Fruchart JC**. (2005) *Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists*. Diabetes 54:2460-2470

- 61. Nissen SE, Wolski K. (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. N Engl J Med 356:2457-2471
- 62. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. (2004) Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. Circulation 109:2054-2057
- 63. Gelman L, Feige JN, Desvergne B. (2007) Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. Biochim Biophys Acta 1771:1094-1107
- 64. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, et al. (1996) *Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents*. J Clin Invest 97:2553-2561
- 65. Yang W, Rachez C, Freedman LP. (2000) Discrete roles for peroxisome proliferatoractivated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. Mol Cell Biol 20:8008-8017
- 66. Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. (2005) Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. Genes Dev 19:453-461
- 67. Lee CH, Olson P, Evans RM. (2003) *Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors.* Endocrinology 144:2201-2207
- 68. He W, Barak Y, Hevener A, et al. (2003) Adipose-specific peroxisome proliferatoractivated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 100:15712-15717
- 69. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell 79:1147-1156
- 70. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al. (1998) A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. Nat Genet 20:284-287
- 71. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, et al. (2000) The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. Nat Genet 26:76-80
- 72. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, et al. (2006) Non-DNA binding, dominantnegative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. Cell Metab 4:303-311
- 73. Sharma AM, Staels B. (2007) Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. J Clin Endocrinol Metab 92:386-395
- 74. Szapary PO, Bloedon LT, Samaha FF, et al. (2006) Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:182-188

- 75. Armoni M, Kritz N, Harel C, et al. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptorgamma represses GLUT4 promoter activity in primary adipocytes, and rosiglitazone alleviates this effect. J Biol Chem 278:30614-30623
- 76. Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, et al. (1968) A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc Natl Acad Sci U S A 59:632-638
- 77. Green S, Walter P, Kumar V, et al. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. Nature 320:134-139
- 78. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, et al. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. Science 231:1150-1154
- 79. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, et al. (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90:11162-11166
- 80. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A 93:5925-5930
- 81. **Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, et al.** (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. Mol Endocrinol 11:353-365
- 82. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, et al. (1997) Human estrogen receptor betagene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab 82:4258-4265
- 83. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139:4252-4263
- 84. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, et al. (2006) International Union of *Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors.* Pharmacol Rev 58:773-781
- 85. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. (2008) Estrogen receptor beta: an overview and update. Nucl Recept Signal 6:e003
- 86. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. (2004) Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. J Mol Endocrinol 33:387-410
- 87. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. (2007) *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets.* Physiol Rev 87:905-931
- 88. **Bai Y, Giguere V**. (2003) *Isoform-selective interactions between estrogen receptors and steroid receptor coactivators promoted by estradiol and ErbB-2 signaling in living cells*. Mol Endocrinol 17:589-599
- 89. Nilsson S, Gustafsson JÅ. (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. Breast Cancer Res 2:360-366

- 90. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. (2002) Production and actions of estrogens. N Engl J Med 346:340-352
- 91. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 95:6965-6970
- 92. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, et al. (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15677-15682
- 93. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, et al. (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. Proc Natl Acad Sci U S A 97:12735-12740
- 94. Takeda K, Toda K, Saibara T, et al. (2003) Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. J Endocrinol 176:237-246
- 95. Simpson E, Jones M, Misso M, et al. (2005) Estrogen, a fundamental player in energy homeostasis. J Steroid Biochem Mol Biol 95:3-8
- 96. Ohlsson C, Hellberg N, Parini P, et al. (2000) Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. Biochem Biophys Res Commun 278:640-645
- 97. Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, et al. (2006) Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. Diabetologia 49:588-597
- 98. Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. (1994) *Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man.* N Engl J Med 331:1056-1061
- 99. Barros RP, Machado UF, Warner M, Gustafsson JÅ. (2006) Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. Proc Natl Acad Sci U S A 103:1605-1608
- 100. **Dieudonné MN, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R**. (2004) Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. Am J Physiol Cell Physiol 286:C655-C661
- 101. Lonard DM, O'Malley BW. (2007) Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. Mol Cell 27:691-700
- 102. Xu J, Li Q. (2003) Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. Mol Endocrinol 17:1681-1692
- 103. **Picard F, Gehin M, Annicotte J, et al.** (2002) *SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues.* Cell 111:931-941
- 104. Wang Z, Qi C, Krones A, et al. (2006) Critical roles of the p160 transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 in energy balance. Cell Metab 3:111-122

- 105. Zhang H, Yi X, Sun X, et al. (2004) *Differential gene regulation by the SRC family of coactivators*. Genes Dev 18:1753-1765
- 106. Ge K, Guermah M, Yuan CX, et al. (2002) Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. Nature 417:563-567
- 107. Ge K, Cho YW, Guo H, et al. (2008) Alternative mechanisms by which mediator subunit MED1/TRAP220 regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma-stimulated adipogenesis and target gene expression. Mol Cell Biol 28:1081-1091
- 108. Frost SC, Lane MD. (1985) Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem 260:2646-2652
- 109. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, et al. (2005) Molecular Characterization of New Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} Modulators With Angiotensin Receptor Blocking Activity. Diabetes 54:3442-3452
- 110. Birney E, Andrews TD, Bevan P, et al. (2004) An overview of Ensembl. Genome Res 14:925-928
- 111. EMBL. Ensembl Genome Browser. http://www.ensembl.org/ (Stand 1.6.2006)
- 112. Rozen S, Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132:365-386
- 113. Whitehead Institute for Biomedical Research, Rozen S, Skaletsky H. Primer3. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi (Stand 1.6.2006)
- 114. **National Center for Biotechnology Information**. *NCBI BLAST*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ (Stand 1.3.2008)
- 115. **Raspe E, Madsen L, Lefebvre AM, et al**. (1999) *Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPARalpha activation.* J Lipid Res 40:2099-2110
- 116. Webster N, Jin JR, Green S, Hollis M, Chambon P. (1988) The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 transactivator. Cell 52:169-178
- 117. **Takamura T, Nohara E, Nagai Y, Kobayashi K**. (2001) Stage-specific effects of a thiazolidinedione on proliferation, differentiation and PPARgamma mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes. Eur J Pharmacol 422:23-29
- 118. Gerhold DL, Liu F, Jiang G, et al. (2002) Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. Endocrinology 143:2106-2118
- 119. Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, et al. (2008) Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. PLoS Genet 4:e1000108

- 120. Orlando V, Strutt H, Paro R. (1997) Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. Methods 11:205-214
- 121. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE, Jr. (1999) Molecular regulation of adipocyte differentiation. Semin Cell Dev Biol 10:3-10
- 122. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. Endocrinology 135:798-800
- 123. Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM. (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. Proc Natl Acad Sci U S A 93:10626-10631
- 124. Hong H, Kohli K, Garabedian MJ, Stallcup MR. (1997) *GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors.* Mol Cell Biol 17:2735-2744
- 125. Ali M, Lemoine NR, Ring CJ. (1994) The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. Gene Ther 1:367-384
- 126. Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. (1990) Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87:3410-3414
- 127. Gao X, Huang L. (1995) Cationic liposome-mediated gene transfer. Gene Ther 2:710-722
- 128. Chan CK, Hubner S, Hu W, Jans DA. (1998) Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. Gene Ther 5:1204-1212
- 129. Cosa G, Focsaneanu KS, McLean JR, McNamee JP, Scaiano JC. (2001) Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. Photochem Photobiol 73:585-599
- 130. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods 46:69-81
- 131. **Kuo MH, Allis CD**. (1999) *In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment*. Methods 19:425-433
- 132. Collas P, Dahl JA. (2008) Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. Front Biosci 13:929-943
- 133. Keller H, Givel F, Perroud M, Wahli W. (1995) Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. Mol Endocrinol 9:794-804

- 134. Houston KD, Copland JA, Broaddus RR, et al. (2003) Inhibition of proliferation and estrogen receptor signaling by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in uterine leiomyoma. Cancer Res 63:1221-1227
- 135. Wang X, Kilgore MW. (2002) Signal cross-talk between estrogen receptor alpha and beta and the peroxisome proliferator-activated receptor gammal in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol 194:123-133
- 136. Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JÅ. (2000) Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. Mol Pharmacol 58:584-590
- 137. Hawse JR, Subramaniam M, Monroe DG, et al. (2008) Estrogen receptor beta isoform-specific induction of transforming growth factor beta-inducible early gene-1 in human osteoblast cells: an essential role for the activation function 1 domain. Mol Endocrinol 22:1579-1595
- 138. **Tremblay A, Giguere V**. (2001) Contribution of steroid receptor coactivator-1 and *CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta*. J Steroid Biochem Mol Biol 77:19-27
- 139. Burton GR, Nagarajan R, Peterson CA, McGehee RE, Jr. (2004) Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. Gene 329:167-185
- 140. MacDougald OA, Lane MD. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. Annu Rev Biochem 64:345-373
- 141. Hackl H, Burkard TR, Sturn A, et al. (2005) Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation. Genome Biol 6:R108
- 142. Kraichely DM, Sun J, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. (2000) Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. Endocrinology 141:3534-3545
- 143. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. (2001) PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes 50:2094-2099
- 144. Combs TP, Wagner JA, Berger J, et al. (2002) Induction of adipocyte complementrelated protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. Endocrinology 143:998-1007
- 145. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, et al. (2003) Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. Diabetes 52:1655-1663
- 146. Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. (1999) *Role of the CCAAT enhancer binding proteins* (*C/EBPs*) *in adipocyte differentiation*. Biochem Biophys Res Commun 266:677-683

- 147. Park SK, Oh SY, Lee MY, et al. (2004) CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor-Y regulate adiponectin gene expression in adipose tissue. Diabetes 53:2757-2766
- 148. Qiao L, Maclean PS, Schaack J, et al. (2005) C/EBPalpha regulates human adiponectin gene transcription through an intronic enhancer. Diabetes 54:1744-1754
- 149. Koshiishi C, Park HM, Uchiyama H, Tanaka Y. (2008) Regulation of expression of the mouse adiponectin gene by the C/EBP family via a novel enhancer region. Gene 424:141-146
- 150. Gustafson B, Jack MM, Cushman SW, Smith U. (2003) Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha: Evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. Biochem Biophys Res Commun 308:933-939
- 151. Welsh GI, Griffiths MR, Webster KJ, Page MJ, Tavare JM. (2004) Proteome analysis of adipogenesis. Proteomics 4:1042-1051
- 152. **Farmer SR**. (2006) *Transcriptional control of adipocyte formation*. Cell Metab 4:263-273
- 153. **Picard F, Auwerx J**. (2002) *PPAR(gamma) and glucose homeostasis*. Annu Rev Nutr 22:167-197
- 154. Lopez GN, Webb P, Shinsako JH, et al. (1999) Titration by estrogen receptor activation function-2 of targets that are downstream from coactivators. Mol Endocrinol 13:897-909
- 155. Min G, Kim H, Bae Y, Petz L, Kemper JK. (2002) Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits ER-mediated signaling pathway by squelching p160 coactivators. J Biol Chem 277:34626-34633
- 156. **Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V**. (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. Mol Cell 3:513-519
- 157. Wong CW, Komm B, Cheskis BJ. (2001) Structure-function evaluation of ER alpha and beta interplay with SRC family coactivators. Biochemistry 40:6756-6765
- 158. Ito M, Roeder RG. (2001) *The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function*. Trends Endocrinol Metab 12:127-134
- 159. Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, et al. (1999) Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. Nature 398:824-828
- 160. Kang YK, Guermah M, Yuan CX, Roeder RG. (2002) The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 99:2642-2647

- 161. **Petrides PE**. Endokrine Funktionen IV: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. In: Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage Berlin: Springer, 2003:865-908
- 162. Murphy MJ, Metcalf BS, Voss LD, et al. (2004) Girls at five are intrinsically more insulin resistant than boys: The Programming Hypotheses Revisited--The EarlyBird Study (EarlyBird 6). Pediatrics 113:82-86
- 163. Moran A, Jacobs DR, Jr., Steinberger J, et al. (1999) Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. Diabetes 48:2039-2044
- 164. Schianca GP, Castello L, Rapetti R, Limoncini A, Bartoli E. (2006) Insulin sensitivity: gender-related differences in subjects with normal glucose tolerance. Nutr Metab Cardiovasc Dis 16:339-344
- 165. **Carr MC**. (2003) *The emergence of the metabolic syndrome with menopause*. J Clin Endocrinol Metab 88:2404-2411
- 166. Iannone MA, Consler TG, Pearce KH, et al. (2001) Multiplexed molecular interactions of nuclear receptors using fluorescent microspheres. Cytometry 44:326-337
- 167. Murase Y, Kobayashi J, Nohara A, et al. (2006) *Raloxifene promotes adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells*. Eur J Pharmacol 538:1-4
- 168. Follettie MT, Pinard M, Keith JC, Jr., et al. (2006) Organ messenger ribonucleic acid and plasma proteome changes in the adjuvant-induced arthritis model: responses to disease induction and therapy with the estrogen receptor-beta selective agonist ERB-041. Endocrinology 147:714-723
- 169. Cristofaro PA, Opal SM, Palardy JE, et al. (2006) WAY-202196, a selective estrogen receptor-beta agonist, protects against death in experimental septic shock. Crit Care Med 34:2188-2193
- 170. **Opal SM, Palardy JE, Cristofaro PA, et al**. (2005) *The activity of pathway-selective estrogen receptor ligands in experimental septic shock.* Shock 24:535-540
- 171. Norman BH, Dodge JA, Richardson TI, et al. (2006) Benzopyrans are selective estrogen receptor beta agonists with novel activity in models of benign prostatic hyperplasia. J Med Chem 49:6155-6157
- 172. Walf AA, Rhodes ME, Frye CA. (2004) Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. Pharmacol Biochem Behav 78:523-529
- 173. Cvoro A, Tatomer D, Tee MK, et al. (2008) Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of proinflammatory genes. J Immunol 180:630-636

# 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### Abbildungen

Abb. 1.1: Adipositas in Deutschland	3
Abb. 2.1: Beispielhafte Amplifikationskurven von 18s und ap2	21
Abb. 2.2: Beispiel für eine cDNA-Qualitätskontrolle	23
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Chromatin-Immunopräzipitation	
Abb. 3.1: ERβ inhibiert ligandenunabhängig die Aktivität von PPARγ	
Abb. 3.2: Effekt einer Kotransfektion mit SRC-1	
Abb. 3.3: Effekt einer Kotransfektion mit TIF-2.	
Abb. 3.4: Effekt einer Kotransfektion mit DRIP205.	35
Abb. 3.5: Erscheinungsbild der transfizierten Zellen nach Stimulation	
Abb. 3.6: mRNA-Expression von ap2 in transfizierten Zellen	
Abb. 3.7: mRNA-Expression von LPL in transfizierten Zellen	
Abb. 3.8: mRNA-Expression von Adiponectin in transfizierten Zellen	
Abb. 3.9: Effekt einer ERβ-Überexpression auf die ap2-Expression in einem Adipozy	ytogenese-
Modell.	41
Abb. 3.10: Effekt einer ERβ-Überexpression auf die LPL-Expression in einem Adipozy	ytogenese-
Modell.	41
Abb. 3.11: Effekt einer ERβ-Überexpression auf die Adiponectin-Expression	in einem
Adipozytogenese-Modell.	
Abb. 3.12: Expression von PPARγ und SRC-1 in gonadalem Fett der Maus	43
Abb. 3.13: Expression von ER $\beta$ in gonadalem Fett weiblicher Mäuse	43
Abb. 3.14: DNA-Gelelektrophorese von sonifiziertem Fettgewebe.	45
Abb. 3.15: Positivkontrolle auf GAPDH-Promotor.	46
Abb. 3.16: Negativkontrolle auf GAPDH-Promotor.	
Abb. 3.17: ChIP FLAG-Ak / Adiponectin.	
Abb. 3.18: ChIP PPARγ-Ak / Adiponectin	
Abb. 3.19: ChIP SRC-1-Ak / Adiponectin.	
Abb. 3.20: ChIP TIF-2-Ak / Adiponectin.	

#### Tabellen

Tab. 1.1: Die IDF-Definition des Metabolischen Syndroms	1
Tab. 1.2: Auswahl PPARγ-regulierter Gene in weißem Fettgewebe	10
Tab. 2.1: Primer	
Tab. 2.2: Verwendete Plasmide	
Tab. 2.3: Verwendete Antikörper	
Tab. 3.1: Übersicht der Transfektionsansätze	
Tab. 3.2: Übersicht der Transfektionsansätze, partielle Differenzierung	40

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Kintscher für die Überlassung des Themas und das damit entgegengebrachte Vertrauen sowie insbesondere für die exzellente Betreuung in allen Phasen der Dissertation bedanken. Seine konstruktive Kritik und die Bereitschaft, Fragen und Probleme jederzeit gemeinsam zu erörtern, haben das Projekt immer wieder entscheidend stimuliert.

Herzlich danken möchte ich auch meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Anna Foryst-Ludwig, die mich nicht nur in die Thematik eingeführt und in molekularbiologische Methoden eingearbeitet hat, sondern mir auch sonst mit ihrer großen Expertise, ihrer Hilfsbereitschaft und ihrem unerschütterlichen Optimismus stets zur Seite stand.

Nikolaj Frost, Martin Hartge, Jana Reinemund, Markus Clemenz und Frau Sprang danke ich für ihre Unterstützung in methodischen Detailfragen und darüberhinaus allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kintscher und Unger für die allzeit kollegiale Zusammenarbeit und das äußerst angenehme Arbeitsklima im Institut.

Tief empfundener Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich all die Jahre unterstützt haben, sowie meiner Schwester und allen Freuden, die diese Zeit zu etwas ganz Besonderem haben werden lassen. Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### Publikationen

Teile der Arbeit wurden in folgender Veröffentlichung publiziert:

Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, Krikov M, Bhanot S, Barros R, Morani A, Gustafsson JÅ, Unger T, Kintscher U. (2008) Metabolic Actions of Estrogen Receptor Beta (ERbeta) are Mediated by a Negative Cross-Talk with PPARgamma. PLoS Genet 4:e1000108

### Erklärung

"Ich, Stephan Hohmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Metabolische Effekte des Estrogenrezeptors beta durch eine Inhibition des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors gamma* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Berlin, den 22. Juli 2009

Stephan Hohmann