

**Identifizierung und Charakterisierung
von AT₁- Antagonisten als PPAR_γ- Liganden**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Schupp
aus Bad Frankenhausen

Februar 2005

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Unger**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting**

Disputation am: 24.05.2005

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	REGULATION DER GLUKOSEHOMÖOSTASE	1
1.2	ADIPOSITAS UND DEREN FOLGEN	2
1.3.	INSULINRESISTENZ UND TYP-II- DIABETES	3
1.4.	DAS METABOLISCHE SYNDROM	5
1.5.	DIE ROLLE DES FETTGEWEBES	7
1.6.	PEROXISOM PROLIFERATOR AKTIVIERTE REZEPTOREN.....	8
1.6.1.	PPAR SUBTYPEN UND STRUKTUR	8
1.6.2.	MECHANISMUS.....	9
1.6.3.	EXPRESSIONSMUSTER	10
1.6.4.	FUNKTIONELLE GENETISCHE STUDIEN IM MURINEN MODELL UND IM MENSCHEN	11
1.6.5.	DIE ROLLE VON PPAR γ IN DER FETTZELLDIFFERENZIERUNG UND IM ADIPOZYTEN	12
1.6.6.	PPAR γ AUßERHALB DES FETTGEWEBES.....	13
1.6.7.	ENDOGENE/SYNTHETISCHE LIGANDEN VON PPAR γ	13
1.6.8.	TZDS ALS INSULINSENSITIZER.....	14
1.7.	AT $_1$ -ANTAGONISTEN	16
1.7.1.	HISTORISCHE ENTWICKLUNG.....	16
1.7.2.	WIRKMECHANISMUS DER AT $_1$ -ANTAGONISTEN	16
1.7.3.	STRUKTUR UND HEMMKONZENTRATIONEN DER AT $_1$ -ANTAGONISTEN.....	18
1.7.4.	DIE BLOCKADE DES RAS UND DIABETES.....	19
1.8.	HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	19
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1.	MATERIAL	22
2.1.1.	CHEMIKALIEN UND SUBSTANZEN.....	22
2.1.2.	KITS.....	23
2.1.3.	NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDE	23
2.1.4.	MOLEKULARGEWICHTSMARKER	26
2.1.5.	RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME.....	26
2.1.6.	ANTIKÖRPER	26
2.1.7.	BIOLOGISCHES MATERIAL.....	26
2.1.8.	MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTUR EUKARYOTISCHER ZELLEN	27
2.1.9.	VERSUCHSTIERE UND ZELLINIEN	27
2.1.10	AUSGEWÄHLTE ZUSATZMATERIALEN	27
2.1.11	PUFFER UND LÖSUNGEN	28
2.2.	METHODEN.....	29
2.2.1.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
2.2.1.1.	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.1.2.	Real-Time PCR	30
2.2.1.3.	RT-Reaktion zur cDNA- Synthese.....	33
2.2.1.4.	Kultivierung von Bakterien.....	33
2.2.1.5.	Isolation von Plasmid-DNA	34

2.2.1.6.	Isolation von genomischer DNA und Genotypisierung	34
2.2.1.7.	Isolation von mRNA	35
2.2.1.8.	Kontrolle der mRNA- Qualität	35
2.2.2.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	36
2.2.2.1.	Proteinisolation aus kultivierten Zellen	36
2.2.2.2.	Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen	36
2.2.2.3.	Western- Blotting	36
2.2.2.4.	Proteinexpression in E.coli- Stämmen	37
2.2.2.5.	Aufreinigung von GST- und His- markierter Proteine	38
2.2.2.6.	Abspaltung von His-Markierungen durch Thrombin	39
2.2.2.7.	Expression von Proteinen durch in-vitro Translation mit dem TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega	40
2.2.2.8.	Partieller Protease- Verdau von PPAR γ -Protein	40
2.2.2.9.	Gluthation S-Transferase (GST) Pull- down Assay	41
2.2.2.10.	Fluoreszenz- Resonanz Energietransfer (FRET) Assay	42
2.2.3.	ZELLKULTURTECHNIKEN UND TRANSFEKTIONEN	42
2.2.3.1.	Kultivierung der Zelllinien und Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten	42
2.2.3.2.	Präparation von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	43
2.2.3.3.	Präparation und Differenzierung von humanen Präadipozyten	44
2.2.3.4.	Färbung intrazellulärer Triglyzeride mit Oil-Red O	45
2.2.3.5.	Transiente Transfektion von adheränten Zellkulturen	45
2.2.3.6.	Bestimmung der Luziferaseaktivität und β -Gal Aktivität in Reporterassays	45
2.2.4.	KRISTALLSTRUKTURANALYSE VON PPAR γ MIT GEBUNDENEM LIGAND	46
2.2.5.	BESTIMMUNG VON EXPRESSIONSMUSTERN MITTELS GENEARRAYS	47
2.2.6.	MESSUNG DER GLUKOSEAUFNAHME IN ADIPOZYTEN	47
2.2.7.	STATISTISCHE BERECHNUNGEN	48
3.	ERGEBNISSE	49
3.1.	DIE FETTZELLDIFFERENZIERUNG VON MURINEN PRÄADIPOZYTEN IN ANWESENHEIT VON AT₁-ANTAGONISTEN	49
3.2.	DIE REGULATION DER PPARγ- EXPRESSION DURCH AT₁-ANTAGONISTEN	52
3.3.	DIE AKTIVIERUNG VON ENDOGENEM PPARγ DURCH AT₁-ANTAGONISTEN IN 3T3-L1 ADIPOZYTEN	53
3.4.	DIE ROLLE DER ANGIOTENSIN- REZEPTOREN FÜR DIE PPARγ- AKTIVIERUNG DURCH AT₁-ANTAGONISTEN	54
3.4.1.	PPAR γ AKTIVIERUNG DURCH IRBESARTAN UND TELMISARTAN IN ABWESENHEIT VON AT ₁ -REZEPTOREN ...	55
3.4.2.	ADIPOGENE EFFEKTE VON IRBESARTAN UND TELMISARTAN AUF EMBRYONALE FIBROBLASTEN DER AT ₂ (-/-) MAUS	56
3.5.	DIE WIRKUNG VON AT₁- ANTAGONISTEN AUF DIE PPARγ-LIGANDENBINDUNGSDOMÄNE	58
3.6.	DER VERGLEICH DER ADIPOGENEN WIRKUNG DER AT₁-ANTAGONISTEN IN EINER PPARγ- LIGAND-ABHÄNGIGEN DIFFERENZIERUNG	60
3.7.	DER EINFLUSS EINES PPARγ- ANTAGONISTEN AUF DIE ADIPOGENEN EFFEKTE DER AT₁- ANTAGONISTEN	61
3.8.	LOSARTAN UND SEIN METABOLIT EXP3179 IM VERGLEICH DER PPARγ- AKTIVIERENDEN WIRKUNG	63
3.9.	DIE WIRKUNG VON AT₁-ANTAGONISTEN AUF PRIMÄRE HUMANE PRÄADIPOZYTEN UND ADIPOZYTEN	66
3.10.	DIE CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTIONEN ZWISCHEN AT₁-ANTAGONISTEN UND PPAR	69

3.10.1.	PARTIELLER PPAR γ - AGONISMUS.....	70
3.10.2.	WIRKUNG AUF DIE PPAR α - LIGANDENBINDUNGSDOMÄNE.....	71
3.10.3.	EINFLUSS DER AT $_1$ -ANTAGONISTEN UND ROSIGLITAZON AUF DEN PARTIELLEN PROTEASEVERDAU VON REKOMBINANTEM PPAR γ_2	73
3.10.4.	PPAR γ - AUTOREGULATION DURCH AT $_1$ -ANTAGONISTEN	76
3.10.5.	KOFAKTORREKRUTIERUNG DURCH PPAR γ - AKTIVIERENDE AT $_1$ -ANTAGONISTEN.....	81
3.10.6.	EINFLUSS DER REKRUTIERUNG VON TIF-2 AUF DIE TRANSKRIPTIONELLE AKTIVITÄT VON PPAR γ IN ABHÄNGIGKEIT DER LIGANDEN	86
3.11.	DIE UNTERSUCHUNG DER LIGANDENABHÄNGIGEN ZIELGENEXPRESSION IN 3T3-L1 ADIPOZYTEN MITTELS MICROARRAYS.....	88
3.12.	DER VERGLEICH DER GLUKOSEAUFNAHME IN 3T3-L1 ADIPOZYTEN	93
3.13	DIE KRISTALLISATION DER PPARγ-LBD MIT GEBUNDENEM LIGANDEN.....	94
4.	DISKUSSION.....	98
4.1.	DIE AUSWAHL DER ZELLMODELLE	99
4.2.	AT $_1$ - ANTAGONISTEN VERSTÄRKEN ADIPOGENESE UNABHÄNGIG VOM RAS	99
4.3.	AT $_1$ - ANTAGONISTEN BINDEN AN PPAR γ	100
4.4.	KRISTALLISATION DER PPAR γ - LBD MIT GEBUNDENEM LIGAND	102
4.5.	STRUKTUR- WIRKUNGSBEZIEHUNG BEZÜGLICH DER PPAR γ - AKTIVIERUNG.....	103
4.6.	TELMISARTAN UND IRBESARTAN SIND SELEKTIVE PPAR γ - MODULATOREN	104
4.7.	TIEREXPERIMENTE MIT AT $_1$ - ANTAGONISTEN.....	106
4.8.	KLINISCHE DATEN.....	107
4.9.	ANFORDERUNGEN AN EINEN MODERNEN PPAR γ - LIGANDEN	109
4.10.	METABOLISCHE EFFEKTE DER AT $_1$ - ANTAGONISTEN: EIN AUSBLICK.....	110
5.	ZUSAMMENFASSUNG	112
6.	ABSTRACT.....	113
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	114
8.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	129
9.	CURRICULUM VITAE.....	131

Abkürzungsverzeichnis

18s	18s Untereinheit mitochondriale mRNA
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin- konvertierendes Enzym
AF-1/-2	Aktivierungsfunktion- 1 bzw 2
aP2	Adipozytenprotein 2 (=fatty acid binding protein 4)
AS	Aminosäure
AT ₁	Angiotensin- II Typ- 1 Rezeptor
AT ₂	Angiotensin- II Typ- 2 Rezeptor
BMI	<i>Body Mass Index</i> in kg/m ² (Gewicht in kg pro Körpergröße ²) BMI ≥ 30 entspricht Adipositas BMI 25-30 entspricht Übergewicht
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBPs	<i>CCAAT/enhancer-binding proteins</i>
CAP	<i>c-Cbl-associated protein</i> (=Sorbs1)
DBD	DNA- Bindungsdomäne
DR	<i>Direct Repeat</i>
DRIP205	<i>Vitamin D-interacting protein 205</i> (=Trap220; PPARBP)
DTT	1,4-Dithio-L-threitol
EC ₅₀	Konzentration eines Agonisten, die 50% seiner maximalen Aktivierung produziert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR-1	<i>Early growth response protein</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
Gal4- System	Transaktivierungssystem basierend auf dem Hefe Gal4- Transkriptionsfaktors
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glut4	Glukosetransporter Subtyp 4
GST	Glutathion-S- Transferase
GyK	Glyzerolkinase
HAT	Histonacetyltransferase
HbA _{1c}	glykosiliertes Hämoglobin A1, Zielwert < 6%
HDAC	Histondeacetylasen
HDL	<i>High-density-lipoprotein</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
IBMX	3- Isobutyl 1-methylxanthin
IC ₅₀	Inhibierende Konzentration: Konzentration, die spezifisch 50% des gebundenen Liganden verdrängt
IGF-1	<i>Insulin- like growthfactor -1</i>
IMT	Inkubationsmix für E.Coli für chemische Kompetenz
Ko	<i>Knock- out</i>

KRPH	Krebs-Ringer Puffer
LB	<i>Luria- Broth</i> Nährmedium
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDL	<i>Low-density-lipoprotein</i>
Log D	Log P bei einem bestimmten pH- Wert
Log P	Log des Oktanol- Wasser- Verteilungskoeffizienten
LxxLL	Erkennungsmotiv für Proteininteraktionen bei nukleären Rezeptoren, L= Lysin, x= beliebige AS
MAPK	Mitogen- aktivierte Proteinkinasen
MEFs	Maus- embryonale Fibroblasten
NCoR	<i>Nuclear receptor corepressor 1</i>
ND	Interaktionsdomäne mit nukleären Rezeptoren
NF kappa B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
nM	Nanomolar
NP40	Tergitol [®]
OD	Optische Dichte
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
ÖR	Östrogenrezeptor
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PDK4	Pyruvat- Dehydrogenase Kinase 4
PEG	Polyethylenglykol
PEPCK	Phosphoenolpyruvat- Carboxykinase
PGJ ₂	Prostaglandin- J ₂
PPAR	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor (=NR1C3)
PPRE	PPAR γ <i>Response Element</i>
PR	Prostazyklinrezeptor
Pro115Gln	Punktmutation PPAR γ Prolin zu Glutamin an AS- Position 115
Pro12Ala	Punktmutation PPAR γ Prolin zu Alanin an AS- Position 12
RAS	Renin- Angiotensin- System
RE	<i>Response Element</i>
RXR	Retinoid-Rezeptor
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor- Modulator
SPPARM	Selektiver PPAR γ - Modulator
TIF-2	<i>Transcriptional intermediary factor 2 (= nuclear receptor coactivator 2)</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TZD	Thiazolidindione (=Glitazone)
UCP 1-3	<i>Uncoupling Proteins 1-3</i>
UKPDS	<i>UK Prospective Diabetes Study</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

5. Zusammenfassung

Der nukleäre Transkriptionsfaktor Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptor gamma (PPAR γ) spielt eine wichtige Rolle im Glukose- und Lipidstoffwechsel. Synthetische Liganden für PPAR γ , die Thiazolidindione, besitzen eine insulinsensitivierende Wirkung und können die Entstehung und Progression von Typ-II- Diabetes verhindern. Angiotensin Typ I- Rezeptor (AT₁)- Antagonisten senken die Inzidenz von Typ-II- Diabetes über einen bisher unbekanntem Mechanismus. Es sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit überprüft werden, welchen Einfluß AT₁- Antagonisten auf die PPAR γ - vermittelte Fettzellendifferenzierung haben und ob molekulare Interaktionen mit dem nukleären Transkriptionsfaktor bestehen.

AT₁- Antagonisten verstärkten konzentrationsabhängig die Differenzierung von 3T3-L1 und humanen Präadipozyten, wobei Telmisartan und Irbesartan die potenteste Wirkung aufwiesen. Eprosartan zeigte keine adipogenen Effekte. Eine Aktivitätssteigerung von endogenem PPAR γ durch AT₁- Antagonisten war unabhängig von der AT₁- Rezeptorblockade und von der Anwesenheit des AT₂- Rezeptors. Die Aktivitätssteigerung kam durch eine direkte Interaktion dieser Substanzen mit der PPAR γ - LBD zustande und deren Aktivierung korrelierte mit den Einflüssen auf die Fettzellendifferenzierung, wobei AT₁- Antagonisten als partielle Agonisten im Vergleich zu den Thiazolidindionen wirkten. Durch Untersuchung von Protein- Protein Interaktionen konnte eine direkte Bindung dieser Substanzen an die PPAR γ - LBD und eine selektive Kofaktorrekutierung gezeigt werden. Genexpressionsstudien identifizierten neben vielen gleichartig regulierten PPAR γ - Zielgenen, auch unterschiedlich regulierte Gene in Adipozyten. Entsprechend der PPAR γ - Aktivierung, erhöhten AT₁- Antagonisten die Insulin- unabhängige/abhängige Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten.

Diese Arbeit identifizierte bestimmte AT₁- Antagonisten als partielle PPAR γ - Agonisten. Die PPAR γ - Aktivierung demonstriert neue pleiotrope Effekte dieser Substanzen und ist ein möglicher Mechanismus für ihre insulinsensitivierende Wirkung. Weiterhin stellen sie eine Leitstruktur für die Entwicklung neuer PPAR γ - Modulatoren dar.

6. Abstract

The nuclear transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a central regulator of insulin- and glucose metabolism. PPAR γ activation by synthetic ligands, the thiazolidinediones, results in insulin sensitization, thereby preventing and improving the diabetic condition. Angiotensin type 1 receptor (AT₁) antagonists have been shown to reduce the incidence of type 2 diabetes mellitus by an unknown molecular mechanism. We investigated the regulation of PPAR γ - mediated fat cell differentiation by AT₁- antagonists and characterized interactions of these compounds with the transcription factor.

AT₁- antagonists enhanced the differentiation of 3T3- L1 and human preadipocytes in a concentration dependent manner. Telmisartan and irbesartan exhibited the most potent impact whereas eprosartan failed to show any effects. An increase in the transcriptional activity of PPAR γ induced by these compounds was independent of their AT₁- blocking property and of the presence of the AT₂- receptor. The induction was achieved by a direct interaction of AT₁- antagonists with the PPAR γ - ligand binding domain, which correlated with the impact on fat cell differentiation rendering these compounds as partial agonists in comparison with the thiazolidinediones. Studying protein- protein interactions showed a direct binding of AT₁- antagonists to the PPAR γ - ligand binding domain and a selective recruitment of cofactors. Analysis of gene expression profiles revealed a large overlap of similar regulated genes, but also a subset of differentially regulated genes in regard to fat cell function. Consistent to their PPAR γ - activating efficacy, they increased the insulin dependent and independent glucose uptake in 3T3- L1 adipocytes.

This work identified certain AT₁- antagonists as partial PPAR γ - agonists. The activation of PPAR γ demonstrates new pleiotropic actions of certain AT₁- antagonists providing a potential mechanism for their insulin-sensitizing/ anti-diabetic effects. Furthermore, they exhibit a lead structure to develop new PPAR γ - modulators.