

3. Ergebnisse

3.1. Die Fettzellendifferenzierung von murinen Präadipozyten in Anwesenheit von AT₁-Antagonisten

Fettzellendifferenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten

Als Grundlage vieler in Folge beschriebener Ergebnisse diente die Untersuchung der Fettzellendifferenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten. Diese Zelllinie ist ein etabliertes Modell, um Adipogenese und Fettzellfunktion zu untersuchen [68]. Die molekularen Mechanismen, welche bei der Differenzierung ablaufen, sind bezüglich wichtiger Transkriptionsfaktoren und der kaskadenhaften Aktivierung eines speziellen Differenzierungsprogrammes detailliert untersucht (siehe 1.6.5.).

Die erste Aufgabe bestand deshalb darin, die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu etablieren. Grundlage dafür bildete das unter 2.2.3.1. beschriebene Schema. Um die Differenzierung zu verfolgen, wurden in einem Vorversuch alle 24h die mRNA isoliert und auf die Expression von PPAR γ_2 als wichtigem Differenzierungsmarker und die des Fettsäurebindenden Proteins 4 (aP2) als fettzellspezifisches Gen untersucht (siehe Abbildung 3.1.). Die Expression wurde auf die mitochondriale 18s Untereinheit bezogen, die während des Differenzierungsvorganges stabil exprimiert wird.

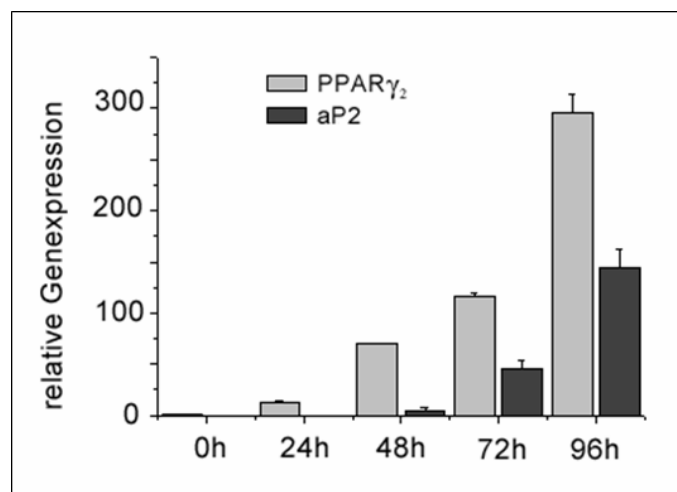


Abb. 3.1.: Markergenexpression während der Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten

x-fache Induktion der Genexpression gegenüber t= 0h, n=3

Wie ersichtlich, steigt nach Zugabe des Differenzierungsmixes zum Zeitpunkt 0h die Expression von PPAR γ_2 steil an. Mit einiger Verzögerung wird dann aP2, in dessen Promoter ein PPRE identifiziert wurde [58, 150], induziert. Auch morphologisch

können die Adipozyten leicht von undifferenzierten Zellen unterschieden werden: eine runde Form, mit eingelagerten kleinen Fetttropfchen im Gegensatz zu langgezogenen-fibroblastenähnlichen Präadipozyten. Abbildung 3.2 zeigt die mit Oil-Red O angefärbten Zellen am Tag 0 und am Tag 7 nach Induktion der Differenzierung. Die in den Adipozyten gespeicherten Triglyzeride sind als rote Tröpfchen zu erkennen.

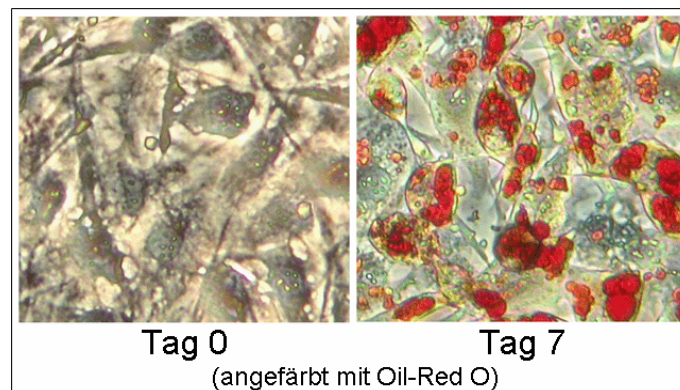


Abb. 3.2.: Vergleich Triglyzerideinlagerung

Tag 0 und 7 der Differenzierung, Phasenkontrastmikroskopie (100fach)

Für Experimente an Adipozyten wurden nur Zellkulturen verwendet, bei denen mehr als 95% der Zellen differenziert waren.

Einfluss von Irbesartan auf die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten

Um die Ergebnisse von Janke et al. [142] zu reproduzieren, wurden 3T3-L1 Präadipozyten mit dem Differenzierungsmix (Mix) behandelt und nach 4 Tagen mit Oil-Red O angefärbt, um die intrazellulären Triglyzeride sichtbar zu machen. Der gleiche Versuch wurde in Anwesenheit von 10 μ M Irbesartan durchgeführt. Anschließend wurde die Zellkulturplatten unter dem Mikroskop fotografiert und eingescannt. Bei gleich durchgeführten Versuchsbedingungen wurde die mRNA isoliert und mittels semiquantitativer PCR auf die Expression von aP2 und Hypoxanthin- Guanin-Phosphoribosyltransferase (hppt) , als konstant exprimiertes Gen, untersucht (Abbildung 3.3.).

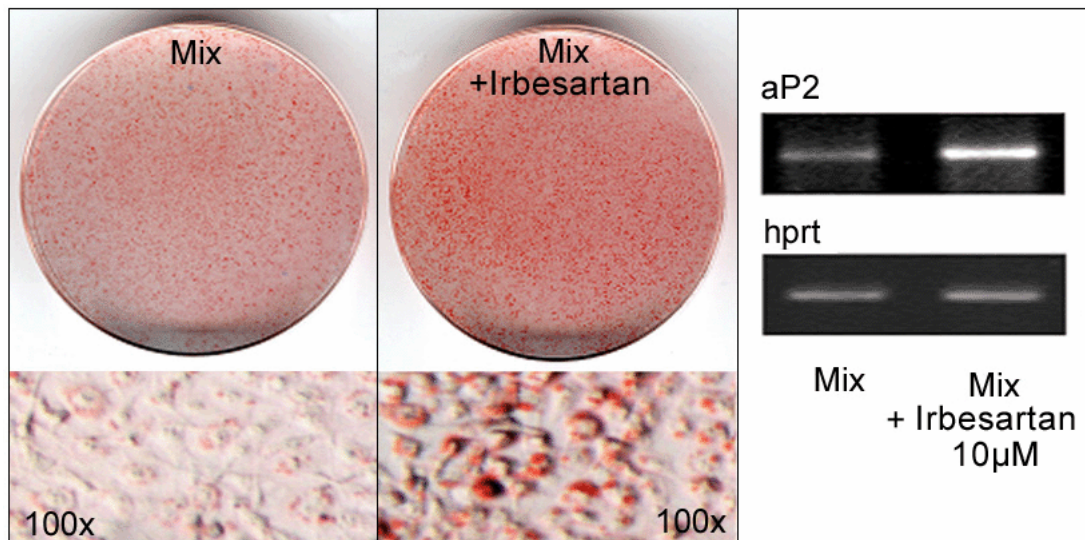


Abb. 3.3.: Einfluss von Irbesartan auf die Differenzierung

links: Oil-Red O Färbung und Phasenkontrastmikroskopie, rechts: semiquantitative PCR
(representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

In Anwesenheit von Irbesartan wurden, wie an der verstärkten Rotfärbung zu erkennen ist, mehr Triglyzeride eingelagert. Aber auch die Anzahl der Zellen, die Triglyzeride einlagerten, war erhöht, d.h. mehr Zellen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt zu Adipozyten differenziert. Bestätigt wurde diese Beobachtung auch auf Genexpressionsebene, da das fettzellspezifische aP2 in Anwesenheit von Irbesartan stärker exprimiert wurde.

Vergleich der adipogenen Wirkung verschiedener AT₁-Antagonisten

Um zu überprüfen, ob dieser adipogene Effekt von Irbesartan substanzspezifisch war, wurden weitere AT₁-Antagonisten in verschiedenen Konzentrationen (0,1-100µM) auf ihren Einfluss auf die Fettzelldifferenzierung getestet. Abweichend vom vorangegangenen Versuch wurde dazu die Expression des Markergens aP2 mit Real-Time PCR bestimmt und auf das stabil exprimierte 18s bezogen. Abbildung 3.4. zeigt den Einfluss der AT₁-Antagonisten auf die aP2 Expression gegenüber der Expression des alleinigen Mixes als 100%. Pioglitazon, als synthetischer PPAR_γ-Ligand mit adipogener Wirkung [83], wurde zum Vergleich herangezogen.

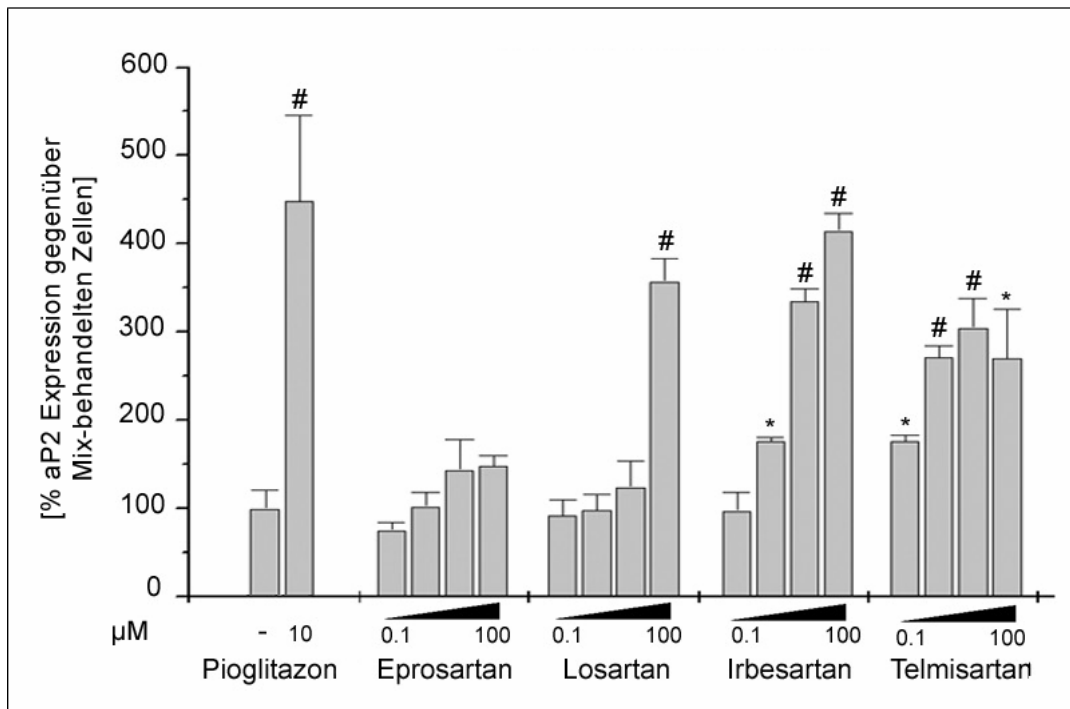


Abb. 3.4.: Dosisabhängiger Einfluss verschiedener AT₁-Antagonisten auf die aP2- Expression
aP2 als ein Markergen für die Differenzierung, bestimmt mit Real-Time PCR, Pioglitazone
als synthetischer PPAR-γ Ligand zum Vergleich, *p<0,05 #p<0,01 n=3

Überraschenderweise erwies sich die adipogene Potenz der AT₁- Antagonisten als sehr unterschiedlich. Eprosartan konnte auch in hohen Dosierungen keine zusätzliche aP2- Expression induzieren. Losartan dagegen war in der höchsten Dosierung in der Lage, die aP2- Expression auf das 3,6±0,3fache zu steigern. Die Inkubation mit Irbesartan oder Telmisartan führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der aP2-Expression, wobei Telmisartan stärkeren Einfluss in niedrigen Dosierungen hatte, die maximale Steigerung aber mit Irbesartan erreicht wurde. 10μM Pioglitazon hatte eine stärkere Induktion (4,5+1,0fach) der aP2- Expression als alle getesteten AT₁-Antagonisten zur Folge.

3.2. Die Regulation der PPARγ- Expression durch AT₁-Antagonisten

Die Induktion von aP2 durch einige AT₁-Antagonisten stellte die Frage, welche Rolle die PPARγ- Expression dabei spielte. Dafür wurde in den Proben der Differenzierung aus 3.1.1. die Expression von PPARγ₂ mittels semiquantitativer PCR bestimmt. Die

Überlegung war, dass durch eine Induzierung der PPAR γ - Expression durch die AT $_1$ -Antagonisten die Zellen stärker differenzieren und somit mehr aP2 exprimieren.

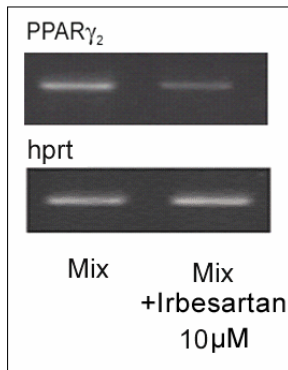


Abb. 3.5.: Einfluss von Irbesartan auf die PPAR γ_2 - Expression

Semiquantitative PCR zu Bestimmung der PPAR γ_2 -Expression
(representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

In Anwesenheit von Irbesartan während der ersten 4 Tage der Differenzierung waren mehr Zellen differenziert (siehe oben), die Expression von PPAR γ_2 war dagegen nicht erhöht, sondern erniedrigt (Abbildung 3.5.). Diese Beobachtung war zum damaligen Zeitpunkt unerwartet und schwer interpretierbar, sollte jedoch im Verlauf dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus leisten. So sind weitere Experimente zur Regulation der PPAR γ -Expression durch AT $_1$ -Antagonisten im Abschnitt 3.10.4 beschrieben.

3.3. Die Aktivierung von endogenem PPAR γ durch AT $_1$ -Antagonisten in 3T3-L1 Adipozyten

Die Expression eines ligandengesteuerten Transkriptionsfaktors gibt keine generelle Aussage über den jeweiligen Aktivierungsstatus. Neben der Expression an sich spielen auch die Anwesenheit von Dimerisierungspartnern und Kofaktoren, genauso wie die Verfügbarkeit eines PPAR γ - Liganden, eine wichtige Rolle für der Aktivierung und Bindung an RE von Zielgenen.

Zur Messung der PPAR γ - Aktivität wurde ein Vektor benutzt, der 3 Kopien eines PPRE aus einem PPAR γ - regulierten Gen (Acyl-CoA-Oxidase =AOx) enthält, die die Expression einer Luziferase steuern. Dieser Vektor wurde am Tag 4 in andifferenzierte 3T3-L1 Zellen transfiziert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein Renilla-Luziferase Vektor kotransfiziert und auf dessen stabile Aktivität normiert. Nach der Transfektion wurde mit den AT $_1$ - Antagonisten und Pioglitazon, in den gezeigten Konzentrationen, für 24 Stunden stimuliert

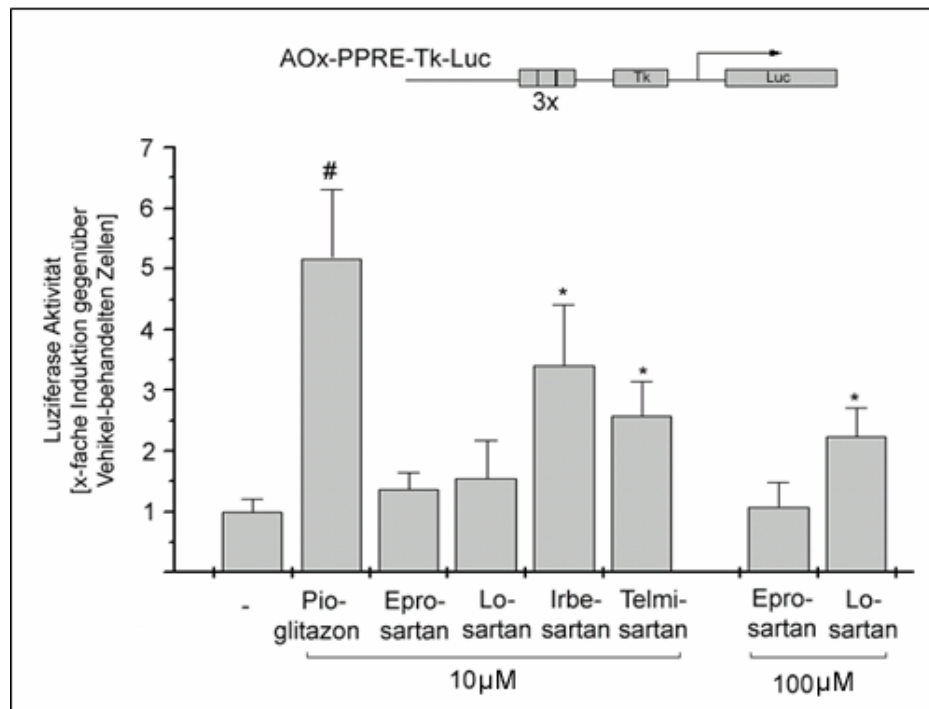


Abb. 3.6.: Aktivierung von endogenem PPAR γ durch AT $_1$ -Antagonisten
Bestimmung der endogenen PPAR γ - Aktivität mit einem Vektor, der PPRE-abhängig eine Luziferase exprimiert, *p<0,05 #p<0,01 n=3

Wie in Abbildung 3.6. ersichtlich, zeigte Eprosartan sowohl bei 10 μ M als auch bei 100 μ M keine Wirkung auf die PPAR γ -Aktivität, Losartan entsprechend nur bei 100 μ M (2,2 \pm 0,6fach). Irbesartan und Telmisartan dagegen steigerten die Aktivität von endogenem PPAR γ um das 3,4 \pm 0,9 bzw. 2,6 \pm 0,6fache bei einer Konzentration von 10 μ M. Pioglitazon, als Kontrollsubstanz, erzeugte die höchste Induktion (5,2 \pm 1,1fach). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der induzierten PPAR γ - Aktivität durch die AT $_1$ - Antagonisten in Adipozyten und der Expression von aP2 während der Differenzierung.

3.4. Die Rolle der Angiotensin- Rezeptoren für die PPAR γ -Aktivierung durch AT $_1$ -Antagonisten

3T3-L1 Präadipozyten exprimieren sowohl AT $_1$ - als auch AT $_2$ - Rezeptoren [151]. In ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten besteht die Mehrzahl der Angiotensin II Bindungsstellen aus AT $_2$ - Rezeptoren [152]. Außerdem werden auch alle anderen Komponenten des RAS im Adipozyten exprimiert [153, 154]. Es konnte somit nicht ausgeschlossen werden, dass die adipogenen Effekte bestimmter AT $_1$ - Antagonisten

durch die Blockade des AT₁- Rezeptors erzielt wurden. Zur Untersuchung der Rolle von Angiotensin II- Rezeptoren bei der Aktivierung von PPAR γ durch AT₁-Antagonisten wurden verschiedene zelluläre rezeptordefiziente Systeme benutzt.

3.4.1. PPAR γ Aktivierung durch Irbesartan und Telmisartan in Abwesenheit von AT₁-Rezeptoren

Das Vorhandensein verschiedener Subtypen von AT₁- Rezeptoren im murinen Organismus [109], machte die Verwendung von transgenen Mäusen, bei denen das Gen für nur einen Subtyp deletiert wurde, unbrauchbar.

Ein etabliertes Zellmodell zur Untersuchung der Funktion des AT₂- Rezeptors sind die PC12W Zellen [119, 155]. Diese Linie besteht aus Zellen eines Phäochromozytoms der Ratte und exprimiert in niedrigen Passagen ausschließlich den AT₂- Rezeptor [119].

In Abbildung 3.7. ist eine semiquantitative PCR gezeigt, welche negativ für den AT₁-Rezeptor in den PC12W Zellen der verwendeten Passagen (11-14) ist. Durch die Bindung der Primer an homologe Bereiche eines Exons des AT_{1a} und AT_{1b}- Subtyps konnte sichergestellt werden, dass keine der beiden Formen in den PC12W- Zellen exprimiert werden. Als Positivkontrolle diente aus Fettgewebe der Ratte isolierte mRNA, mit nachweisbarer AT₁- Rezeptorexpression.

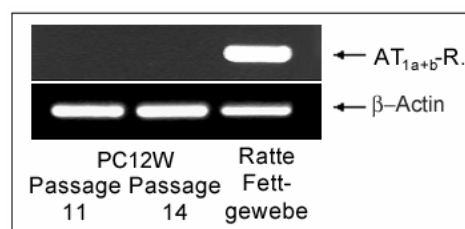


Abb. 3.7.: PC12W- Zellen der verwendeten Passagen exprimieren keine AT₁- Rezeptoren

Semiquantitative PCR mit 36 Zykluswiederholungen mit negativer Amplifikation aus PC12W- Zellen cDNA (representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

In die PC12W- Zellen wurde der PPRE- enthaltende Luziferasevektor transfiziert und anschließend mit Irbesartan, Telmisartan und Pioglitazon für 24 Stunden inkubiert. Wie in Abbildung 3.8. zu erkennen ist, kann bei alleiniger PPRE Transfektion keine Induktion der Luziferaseaktivität gemessen werden. Dies deckt sich mit der Literatur, da diese Zellen endogen kein PPAR γ exprimieren [156] und somit auch das RE nicht aktiviert werden kann.

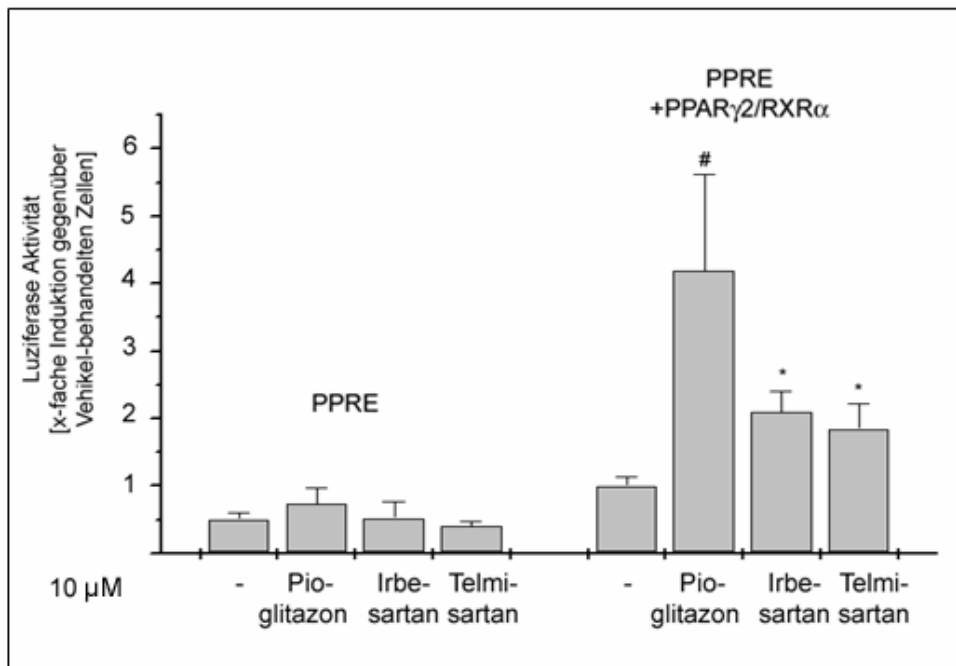


Abb. 3.8.: Induktion von PPAR γ -Aktivität in PC12W Zellen

Nach ektoptischer Expression des Heterodimers ist die Induktion von PPAR γ -Aktivität durch Irbesartan und Telmisartan auch in Zellen ohne AT $_1$ -Rezeptor funktionell, * $p < 0,05$ # $p < 0,01$ n=3

Werden jedoch zusätzlich Expressionsvektoren für die heterodimeren Partner PPAR γ_2 und RXR α kotransfiziert, dann kann Pioglitazone ($4,2 \pm 1,4$ fach), aber auch Irbesartan und Telmisartan ($2,1 \pm 0,3$ und $1,9 \pm 0,4$ fach) den Heterodimer aktivieren und gekoppelte Luziferaseaktivität induzieren. Somit spielt der AT $_1$ -Rezeptor mechanistisch keine Rolle in der PPAR γ -aktivierenden Eigenschaft bestimmter AT $_1$ -Antagonisten.

3.4.2. Adipogene Effekte von Irbesartan und Telmisartan auf embryonale Fibroblasten der AT $_2$ (-/-) Maus

Durch eine Blockade der Bindungsstelle des Angiotensin II am AT $_1$ -Rezeptor und durch einen erhöhten Angiotensin II-Spiegel kann es beim Einsatz von AT $_1$ -Antagonisten zu einer Hyperstimulation des AT $_2$ -Rezeptors kommen [157]. In diesem Experiment sollte daher geklärt werden, ob auch in Abwesenheit des AT $_2$ -Rezeptors die adipogene Wirkung bestimmter AT $_1$ -Antagonisten erhalten blieb. Dazu wurden embryonale Fibroblasten von AT $_2$ (-/-)-Mäusen generiert und die verwendeten Passagen zur Kontrolle genotypisiert (siehe 2.2.1.7.). Diese pluripotenten Zellen können durch Zugabe des Differenzierungsmixes zu Adipozyten differenziert werden. Durch eine leichte Modifizierung des Mixes, ein PPAR γ -Ligand anstelle von IBMX, wurde

getestet, inwieweit Telmisartan und Irbesartan das Potential zur Differenzierung, im Vergleich zu Pioglitazon, besaßen. Die embryonalen Fibroblasten wurden nach diesem Protokoll für 9 Tage differenziert und anschließend im Phasenkontrastmikroskop fotografiert bzw. mRNA isoliert und die Expression von aP2 analysiert. Getestet wurden die Konzentrationen der AT₁- Antagonisten, welche zuvor in den 3T3-L1 Zellen die stärkste adipogene Wirkung gezeigt hatten

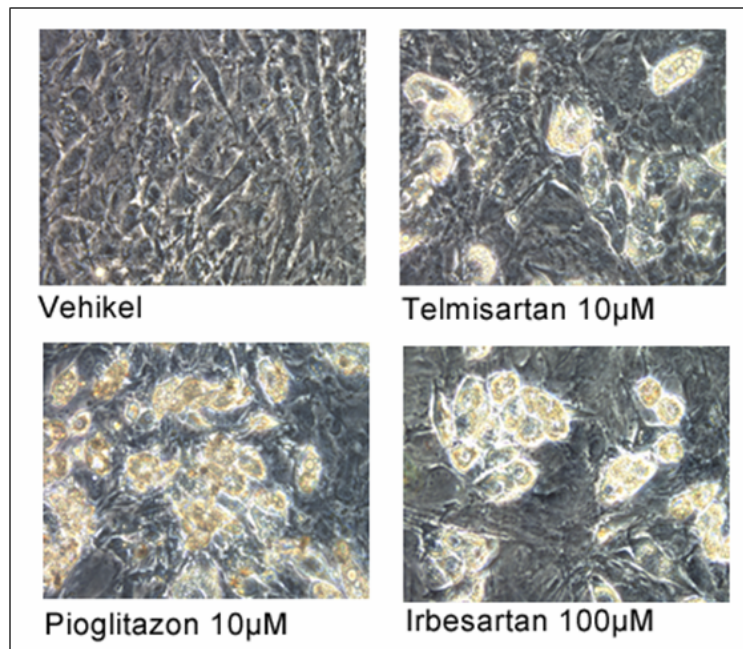


Abb. 3.9.: Adipogener Effekt von Irbesartan, Telmisartan und Pioglitazon auf AT₂(-/-) MEFs
Alle Zellen wurden mit Dexamethason und Insulin behandelt (Vehikel), nur in Gegenwart der AT₁-Antagonisten oder Pioglitazon differenzieren sie zu Adipozyten, Phasenkontrastmikroskopie 100fach (representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

Durch die Inkubation mit Dexamethason und Insulin konnten mikroskopisch keine Adipozyten nachgewiesen werden. Nur in Gegenwart von Irbesartan, Telmisartan und Pioglitazon differenzierten tiglyzeridhaltige Adipozyten aus, wobei deren Anzahl in der Reihenfolge: Pioglitazone 10µM > Irbesartan 100µM > Telmisartan 10µM abnahm. Abbildung 3.10 zeigt die Induktion der aP2- Expression durch Inkubation mit den verschiedenen Substanzen.

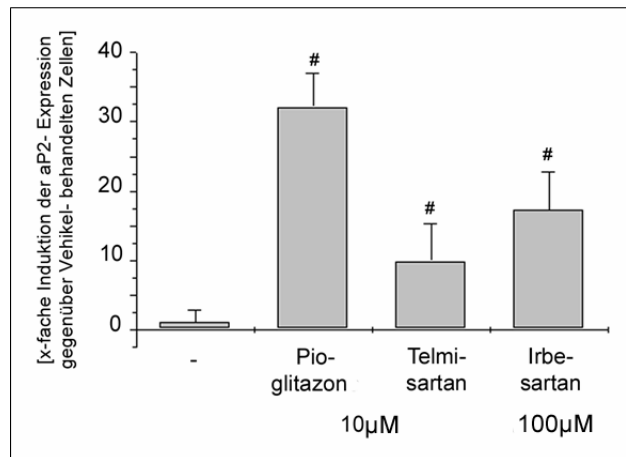


Abb. 3.10.: Induzierte aP2-Expression in AT₂(-/-) MEFs

Real-Time PCR Messung des Markergens und dessen Induktion gegenüber Vehikel behandelten Zellen (Vehikel= Dexamethason, Insulin und DMSO), *p<0,05 #p<0,01 n=3

Auch in den AT₂(-/-) MEFs führt die Inkubation mit Telmisartan und Irbesartan zu einer Induktion der aP2- Expression (9,8±5,4 bzw. 12,2±5,5fach). Somit ist auch der AT₂-Rezeptor nicht für die adipogene Wirkung der AT₁- Antagonisten verantwortlich.

3.5. Die Wirkung von AT₁- Antagonisten auf die PPAR_γ-Ligandenbindungsdomäne

Da die Angiotensin II- Rezeptoren keine Rolle bei der Aktivierung von PPAR_γ spielten, stellte sich die Frage, welcher Mechanismus zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch diese Substanzen führte. Wie bereits beschrieben, kann PPAR_γ entweder durch eine Interaktion eines Liganden mit der LBD oder auch ligandenunabhängig, durch eine Beeinflussung der AF-1 Domäne, aktiviert werden. Außerdem wäre es auch möglich, dass durch eine Interaktion der AT₁- Antagonisten mit dem heterodimeren Partner RXR_α eine Aktivierung des Komplexes stattfindet. Wie in verschiedenen Arbeiten beschrieben [158, 159], kann ein RXR_α- Ligand verschiedene Funktionen downstream von PPAR_γ induzieren. Genauso wird von der Aktivierung von PPREs durch RXR- Homodimere berichtet [160].

Um genauere mechanistische Einblicke in die Aktivierung durch AT₁- Antagonisten zu bekommen, wurden ein Aktivierungssystem basierend auf dem Gal4-Transkriptionsfaktor aus der Hefe benutzt. Dort steuert dieser Transkriptionsfaktor die Expression des Galaktosidasegens. Der Gal4- Transkriptionsfaktor kommt nur in der Hefe vor und beeinflusst die Genexpression bei der Transfektion in Säugerzellen nicht

[161]. Der Vektor kodiert ein Fusionsprotein aus der PPAR γ -Ligandenbindungsdomäne und dem Gal4-Transkriptionsfaktor. Ein weiterer Vektor besteht aus der Gal4-DBD und einer Luziferase. Nur bei einer direkten Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne erhält der Gal4-Transkriptionsfaktor die Fähigkeit zur Bindung an seine DBD und damit zur Expression der Luziferase. Dieses Vektorsystem und der Renilla-Luziferasevektor zur Normierung wurden in PC12W Zellen transfiziert und anschließend mit verschiedenen Dosierungen von AT $_1$ -Antagonisten bzw. Pioglitazon für 36 Stunden stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11. dargestellt.

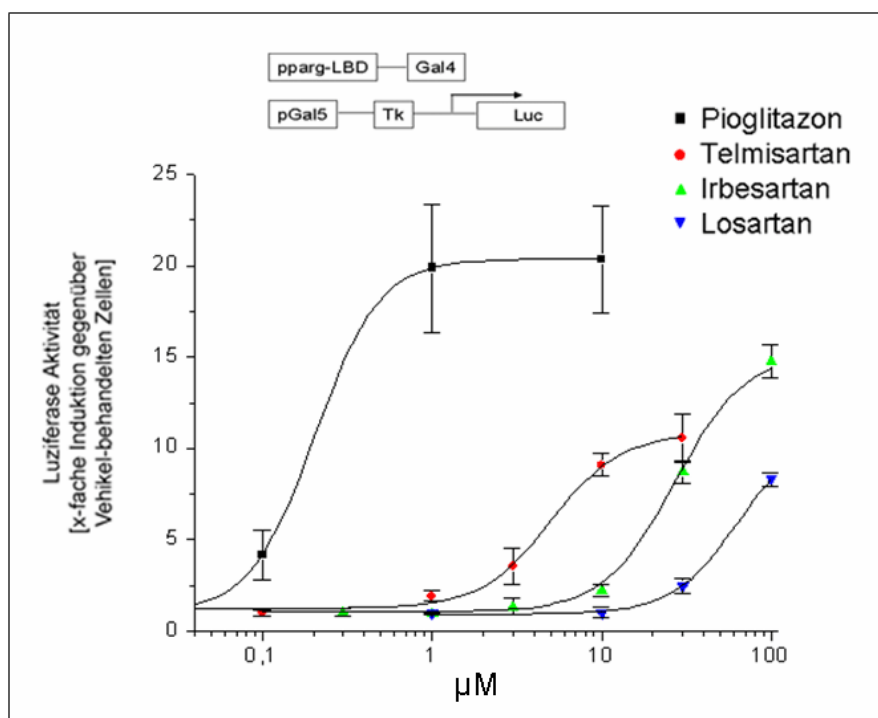


Abb. 3.11.: Aktivierung der PPAR γ -LBD in transient transfizierten PC12- Zellen

Dosisabhängige Aktivierung der PPAR γ -LBD durch AT $_1$ -Antagonisten und Pioglitazon nach 36 Stunden Inkubation. n=3

Pioglitazon aktiviert die PPAR γ -LBD bereits bei 0,1 μM und erreicht die maximale Auslenkung mit ca. 1 μM. Die AT $_1$ -Antagonisten aktivieren in der Reihenfolge Telmisartan > Irbesartan > Losartan die PPAR γ -LBD, benötigen aber dafür wesentlich höhere Dosierungen als Pioglitazon. Außerdem führt die Inkubation nicht zu einer vollen Aktivierung, sondern erreicht nur etwa 50-70% des Pioglitazonniveaus. In Tabelle 3.1. sind die EC $_{50}$ -Werte und Effizienzen der getesteten Substanzen dargestellt.

	EC ₅₀ (µM)	Effizienz, relativ zu Pioglitazon
Pioglitazon	0,20	100%
Telmisartan	5,02	53%
Irbesartan	36,97	ca. 70%
Losartan	>50	nicht bestimmbar

Tabelle 3.1.: Vergleich von EC₅₀-Werten und Effizienzen der PPAR γ - LBD Aktivierung

EC₅₀: Konzentration des Agonisten, der 50% der maximal möglichen Aktivierung (Effizienz) induziert.

Genauere Werte konnten für Losartan nicht ermittelt werden, da bei 100µM noch nicht die volle Aktivierung erreicht war. Höhere Konzentrationen sind aber zum einen irrelevant bezüglich der möglichen Plasmaspiegeln, und andererseits mit toxischen Effekten für die Zellen, verbunden.

3.6. Der Vergleich der adipogenen Wirkung der AT₁-Antagonisten in einer PPAR γ - Ligand- abhängigen Differenzierung

Ähnlich wie unter 3.4.2. beschrieben, wurde auch in diesem Experiment ein Differenzierungsmix ohne IBMX verwendet, d.h. die Differenzierung zu Adipozyten findet nur in Gegenwart eines PPAR γ - Liganden statt. Im Gegensatz zu den unter 3.1.2. beschriebenen Experimenten, bei denen die AT₁- Antagonisten zusätzlich zur adipogenen Wirkung des Mixes wirken, hängt hier der Differenzierungsgrad von der Potenz der PPAR γ - Aktivierung ab. Abbildung 3.12. zeigt die mit Oil-Red O angefärbten Zellen am Tag 9.

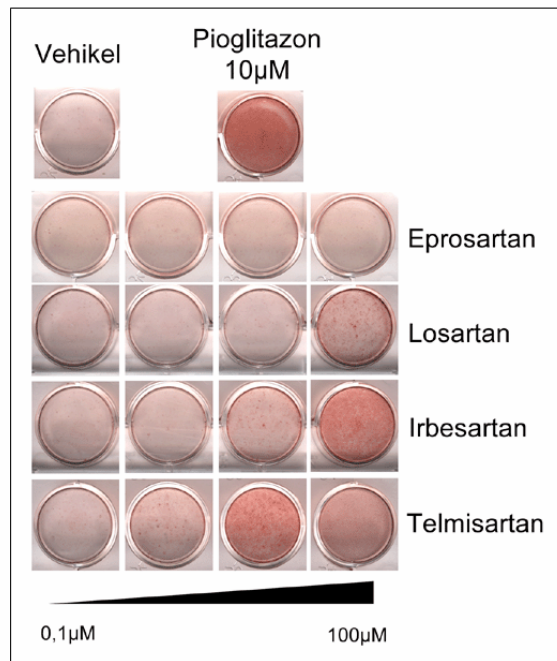


Abb. 3.12.: PPAR γ - Liganden- abhängige Differenzierung von 3T3-L1 Zellen

Nur in Gegenwart eines PPAR γ - Liganden differenzieren die Zellen zu Adipozyten (Tag 9), die mit Oil-Red O danach angefärbt wurden, Vehikel: Dexamethason, Insulin und DMSO (representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

Ohne Zusatz der Liganden (Vehikel) differenzierten keine Adipozyten aus. Auch in Gegenwart von Eprosartan (0,1 – 100 μ M) konnten keine rot- angefärbten Adipozyten identifiziert werden, was sich mit den Ergebnissen aller vorherigen Experimente deckte. In der Reihenfolge Telmisartan >Irbesartan >Losartan induzierten die AT $_1$ -Antagonisten Fettzellendifferenzierung, was das adipogene Potential der AT $_1$ -Antagonisten bestätigte. Die Inkubation mit 10 μ M Pioglitazone hatte wiederum den stärksten Effekt, wobei die maximale Wirkung der AT $_1$ -Antagonisten weit unter dessen Niveau lag (vgl. Intensität der Rotfärbungen).

Diese Ergebnisse korrelierten sehr gut mit der Aktivierung der PPAR γ - LBD aus 3.5. Die vergleichsweise starke Aktivierung der Differenzierung durch Irbesartan unter den Bedingungen aus 3.1.2. könnte auf zusätzliche Effekte dieser Substanz hinweisen.

3.7. Der Einfluss eines PPAR γ - Antagonisten auf die adipogenen Effekte der AT $_1$ - Antagonisten

Durch die Identifizierung der direkten Interaktion zwischen AT $_1$ - Antagonisten und der PPAR γ - LBD stellte sich die Frage, ob ein PPAR γ -Antagonist den Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung antagonisieren kann. Dazu wurden 3T3-L1 Zellen mit dem

Differenzierungsmix ohne IBMX behandelt und mit den Liganden in Konzentrationen, die in vorangegangenen Experimenten die effektivsten Wirkungen zeigten, inkubiert. Es wurde jeweils 30 Minuten mit dem PPAR γ - Antagonisten GW9662 [162] vorbehandelt, ehe die AT $_1$ -Antagonisten bzw. Pioglitazon zugesetzt wurden. GW9662 bindet kovalent an den Cystein (285)- Rest von PPAR γ und führt zum irreversiblen Verlust der Agonistenbindung [162]. Nach 6 Tagen wurden die Zellen mikroskopisch im Phasenkontrast fotografiert (Abbildung 3.13) und mRNA isoliert.

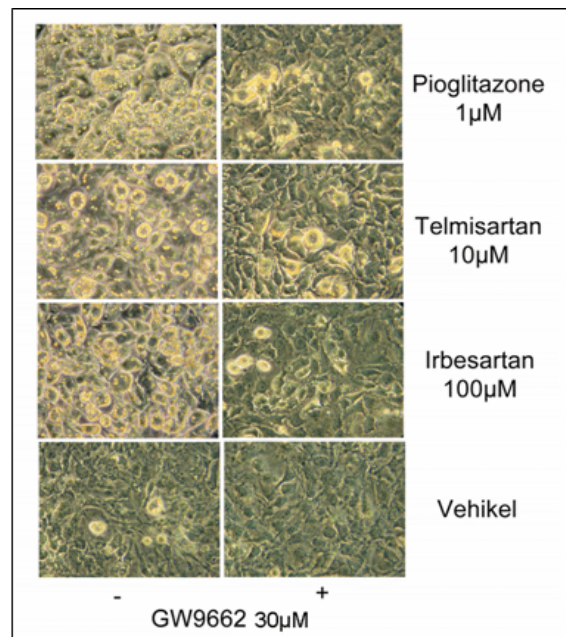


Abb. 3.13.: Inhibition durch einen PPAR γ - Antagonisten (GW9662)

30 μ M GW9662 blockten die Differenzierung induziert durch Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan, Tag 6, Phasenkontrastmikroskopie (100fach), Vehikel: Dexamethason, Insulin und DMSO (representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

Eine Vorbehandlung mit GW9662 blockt die Fettzellendifferenzierung, welche durch Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan induziert wird. Mikroskopisch können nur wenige Adipozyten nach 6 Tagen Differenzierung in Anwesenheit von GW9662 identifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden mit der Bestimmung der aP2- Expression mittels Real-Time PCR (Abbildung 3.14.) bestätigt.

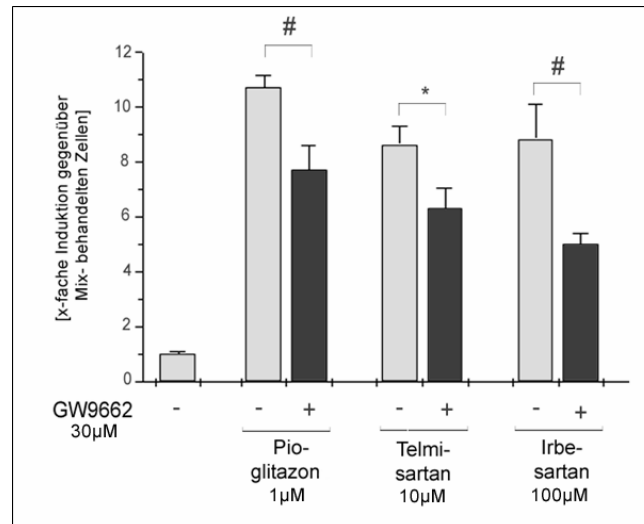


Abb. 3.14.: Partielle Inhibierung der induzierten $\alpha 2$ -mRNA Expression mit GW9662

30 μ M GW9662 inhibierten partiell die $\alpha 2$ - mRNA Expression, welche durch Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan in den angegebenen Konzentrationen induziert wurde, Tag 6, bestimmt mit Real-Time PCR, * $p < 0,05$ # $p < 0,01$ $n = 3$

Mit den verwendeten Konzentrationen ergaben sich Induktionen von $10,6 \pm 0,4$, $8,6 \pm 0,6$ und $8,8 \pm 1,2$ fach für Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan. Durch die Vorinkubation mit GW9662 konnte die $\alpha 2$ -Expression auf ca. 72% für Pioglitazon und Telmisartan und auf ca. 57% für Irbesartan gesenkt werden.

Die vergleichbare Wirkung von GW9662 auf die adipogenen Effekte von einerseits Pioglitazon und andererseits Telmisartan und Irbesartan war ein Indiz für den gemeinsamen Mechanismus dieser Substanzen und schloss Regulationen downstream von PPAR durch AT_1 - Antagonisten aus.

3.8. Losartan und sein Metabolit EXP3179 im Vergleich der PPAR γ - aktivierenden Wirkung

Wie bereits unter 1.4.3. beschrieben, ist Losartan ein Prodrug. Durch den Cytochrom-P450 Enzymkomplex wird Losartan während der ersten Leberpassage mikrosomal zu EXP3179 und weiter zu EXP 3174 oxidiert, verantwortlich dafür ist das Isoenzym CYP2C9 [163, 164]. Die Arbeitsgruppe von Theodore W. Kurtz (San Francisco) untersuchte den Metaboliten EXP3174 bezüglich PPAR γ - Aktivität und konnte bis 50 μ M keine Aktivierung messen (PPAR γ -LBD Aktivierung im Gal4- System) [165]. Interessanterweise wird dem Intermediärmetaboliten EXP3179 eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben [128]. Die hierfür benötigten

Konzentrationen entsprechen den in Patienten gemessenen Plasmaspiegel für EXP3179 [128]. In Abbildung 3.15. sind die Strukturen von Losartan und seinen Metaboliten dargestellt.

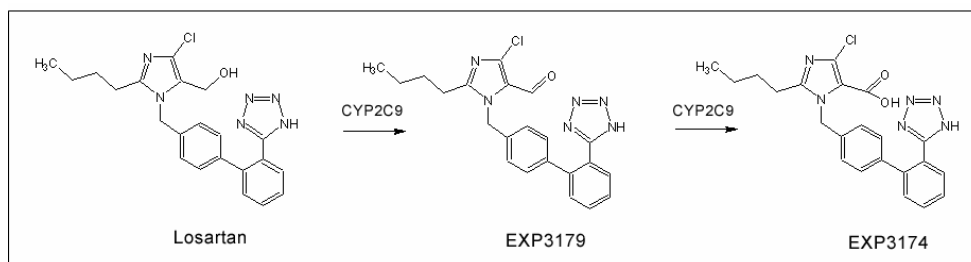


Abb. 3.15.: Losartan und seine Metaboliten

Durch CYP2C9 wird Losartan im ersten Schritt zum Aldehyd (EXP3179) und im zweiten Schritt zur Säure (EXP3174) oxidiert.

In Kooperation mit Sumaira Umbreen und Dr. Boris Schmidt, TU Darmstadt, wurde EXP3179 in einer katalytischen Oxidation mittels RuCl_3 und H_2O_2 in der dortigen Arbeitsgruppe synthetisiert und mit einer LC- basierenden Methode aufgereinigt, und dann in Differenzierungs- und Transaktivierungsassays auf $\text{PPAR}\gamma$ - Aktivität untersucht.

Einfluss von EXP3179 auf die Fettzellendifferenzierung

3T3-L1 Zellen wurden mit der gleichen Methode wie unter 3.6. differenziert. Nur in Anwesenheit eines $\text{PPAR}\gamma$ - Liganden differenzieren die Zellen zu Adipozyten aus. Abbildung 3.16. zeigt Oil-Red O angefärbte Zellen nach 9 Tagen Differenzierung im Phasenkontrast, inkubiert mit einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ Ligand.

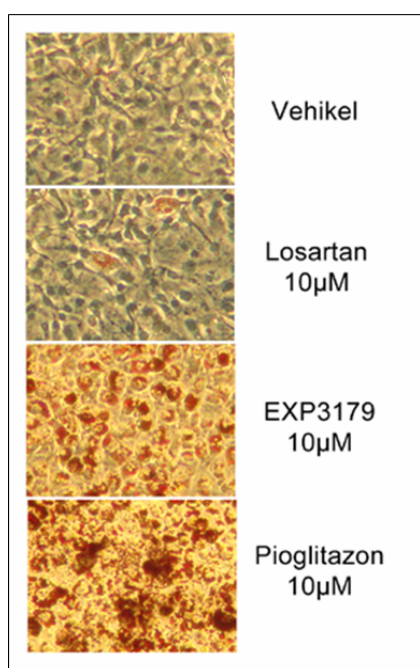


Abb. 3.16.: Differenzierung von 3T3-L1

Vergleich der adipogenen Wirkung von Losartan, EXP3179 und Pioglitazone (alle $10\mu\text{M}$), Tag 9, Oil-Red O- Färbung, Phasenkontrastmikroskopie 100fach Vehikel: Dexamethason, Insulin und DMSO (representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

EXP3179 kann im Gegensatz zu Losartan wesentlich mehr Adipogenese induzieren, wie an der stärkeren Rotfärbung und an der Zellmorphologie zu erkennen ist. In Abbildung 3.17. ist ein Dosisverlauf dargestellt, wiederum nach 9 Tagen Differenzierung in Anwesenheit der Liganden.

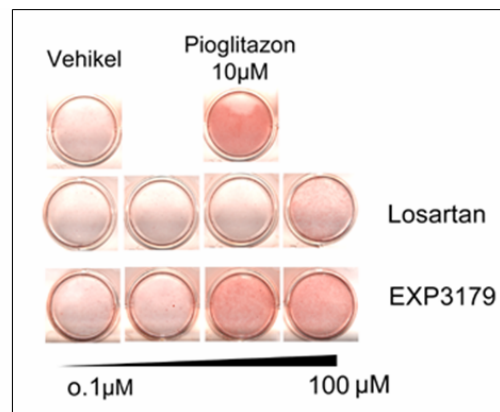


Abb. 3.17.: PPAR γ - Liganden- abhängige Differenzierung mit Losartan und EXP3179

3T3-L1 Zellen nach 9 Tagen Differenzierung mit Oil-Red O angefärbt, Vehikel: Dexamethason, Insulin und DMSO (representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

EXP3179 zeigte bei 1 μ M leichte, bei 10 μ M eine potente Wirkung in Bezug auf Fettzellendifferenzierung, wie an der Oil-Red O Färbung zu erkennen ist. Losartan besitzt nur bei 100 μ M adipogene Wirkung. Damit ist EXP3179 in diesem Experiment mindestens 10fach potenter als Losartan.

EXP3179 und Losartan im Vergleich der Aktivierung der PPAR γ -LBD

Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurde die Aktivierung der PPAR γ -LBD durch EXP3179, durch transiente Transfektionen – wie unter 3.5. beschrieben, untersucht. Abbildung 3.18. zeigt die Aktivierungskurven von Losartan und EXP3179 im Vergleich zu Pioglitazon.

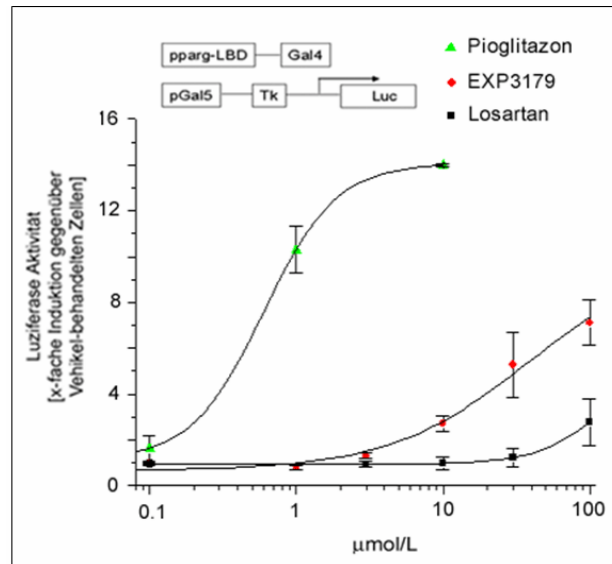


Abb. 3.18.: Aktivierung der PPAR γ -LBD in transient transfizierten PC12W-Zellen

Dosisabhängige Aktivierung der PPAR γ -LBD durch Losartan, EXP3179 und Pioglitazon, n=3

Auch in diesem Experiment hatte EXP3179 eine ca. 10fach stärkere Potenz als Losartan in der Aktivierungsfähigkeit der PPAR γ -LBD. Eine Berechnung der EC₅₀ war aufgrund des Fehlens eines Plateaus in der Aktivierung durch EXP3179 nicht möglich.

3.9. Die Wirkung von AT₁-Antagonisten auf primäre humane Präadipozyten und Adipozyten

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die beschriebenen Regulationen über die Modellzelllinie 3T3-L1 hinausgehen und auf menschliche Zellen übertragbar sind. Dazu wurden Experimente an primären humanen Adipozyten durchgeführt. Die klinische Relevanz wäre beträchtlich, wenn ähnliche Wirkungen auf humane Zellen beobachtet werden könnten. Alle Experimente wurden, wie unter 2.2.3.3. beschrieben, in Kooperation mit Herrn Dr. Jürgen Janke, Helios Klinik, Charité, Berlin-Buch, durchgeführt.

Differenzierungen von humanen Präadipozyten in Anwesenheit der AT₁-Antagonisten

Primäre humane Präadipozyten wurden mit dem humanen Differenzierungsmix für 12 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Adipozyten mit Oil-Red O angefärbt, unter dem Mikroskop fotografiert (Abbildung 3.14.) und dann der wieder herausgelöste

Farbstoffgehalt photometrisch bestimmt. Abbildung 3.19. zeigt den relativen Lipidgehalt der Zellen in Anwesenheit der AT₁- Antagonisten, die effektivsten Konzentrationen wurden in Vorexperimenten bestimmt. Bei einer Konzentration von 10µM Telmisartan zeigten sich toxische Effekte auf die Zellen, deshalb wurden 1µM verwendet.

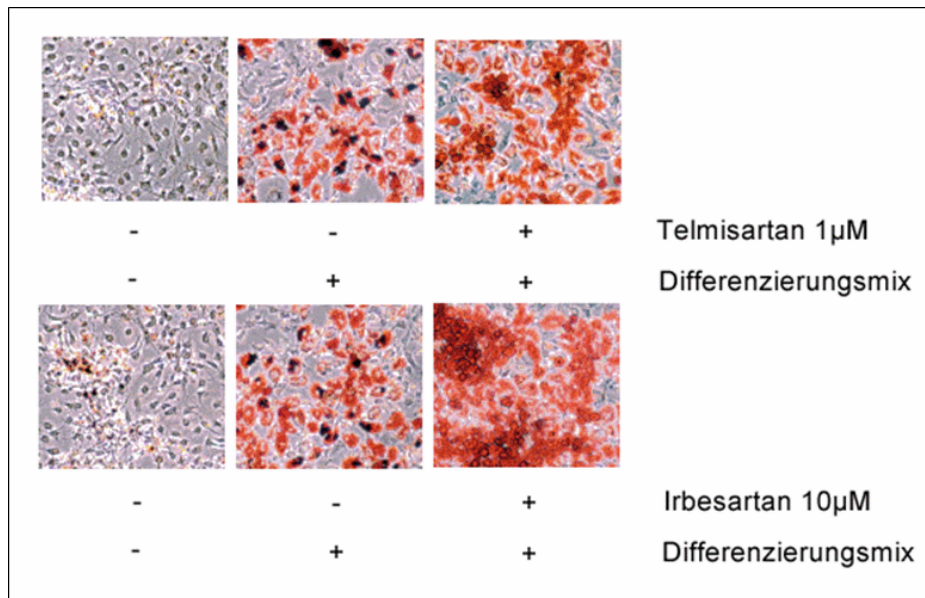


Abb. 3.19.: Differenzierung humaner Präadipozyten mit Telmisartan und Irbesartan

Die Zellen wurden mit/ohne Differenzierungsmix und den AT₁-Antagonisten über 12 Tage behandelt, anschließend wurden die Zellen mit Oil-Red O angefärbt, Phasenkontrastmikroskopie, 100fach (representative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten)

Entsprechend den Differenzierungsexperimenten mit 3T3-L1 Präadipozyten führen Telmisartan und Irbesartan auch im humanen System zu einer verstärkten Fettzellendifferenzierung, wie an der verstärkten Rotfärbung der Adipozyten zu erkennen ist. Im Vergleich der Menge an eingelagerten Lipiden, durch die Inkubation mit den AT₁-Antagonisten, ergab sich folgendes Bild (Abbildung 3.20.).

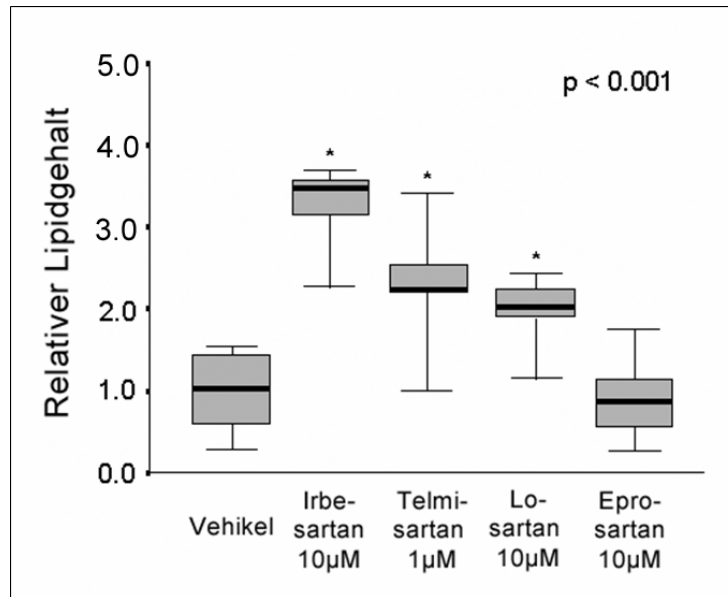


Abb. 3.20.: Lipidgehalt der Zellen, differenziert in Anwesenheit der AT₁-Antagonisten

Photometrische Bestimmung der Oil-Red O Gehalts der Zellen nach Färbung am Tag 12 der Differenzierung in Anwesenheit der AT₁-Antagonisten, Vehikel: MIX + DMSO, Mann-Whitney Test: * $p < 0,05$; n= Zellen aus 7 verschiedenen Patienten

Auch die Lipideinlagerung korrelierte mit den Ergebnissen der Experimente mit 3T3-L1 Zellen. Außer Eprosartan hatten alle AT₁- Antagonisten das Potenzial zur Verstärkung der Differenzierung (Irbesartan 10 µM 3,32fach, Telmisartan 1 µM 2,13fach, Losartan 10 µM 2,01fach). In diesen Experimenten konnte durch Losartan bereits bei 10 µM signifikant mehr Lipid einlagert werden, in 3T3-L1 Zellen war dagegen ein Effekt auf die $\alpha P2$ - Expression und Differenzierung erst bei 100 µM auszumachen (vgl. 3.1.2 und 3.6.).

Einfluss der AT₁- Antagonisten auf Zielgenexpression in *in-vitro* differenzierten humanen Adipozyten

Die Aktivierung von PPAR γ in Adipozyten führt zur verstärkten Expression von Zielgenen [37]. Adiponektin, produziert und sezerniert von Adipozyten, korreliert negativ mit dem Plasmainsulinspiegeln und zeigt eine verminderte Expression in adipösen Patienten [166]. TZDs induzieren die Expression von Adiponektin in murinen und humanen Adipozyten [167].

Primäre humane Präadipozyten wurden für 12 Tage zu Fettzellen differenziert und für 24 Stunden mit den AT₁- Antagonisten und Pioglitazon behandelt. Anschließend

wurden die Proteine isoliert und mittels Western-blotting auf die Expression von Adiponektin und GAPDH untersucht. Abbildung 3.21. zeigt die repräsentativen Blots der *in-vitro* differenzierten und behandelten Zellen eines Patienten. In 3 weiteren Preparationen anderer Patienten wurden die Ergebnisse reproduziert.

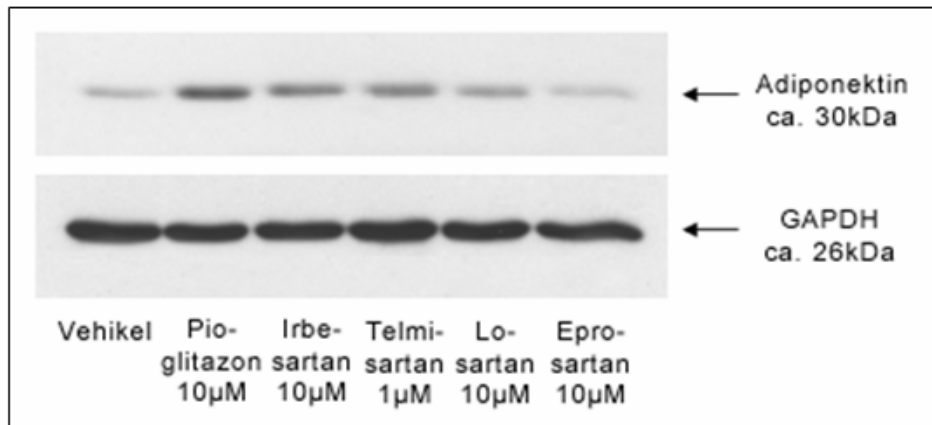


Abb. 3.21.: Regulation der Adiponektin- Expression in humanen Adipozyten

Western-blotting der Proteine nach 24 Stunden Inkubation der *in-vitro* differenzierten humanen Adipozyten mit AT₁- Antagonisten und Pioglitazon

Alle AT₁-Antagonisten, die eine PPAR γ - Aktivierung erzeugten, verstärkten auch die Proteinexpression von Adiponektin in humanen Adipozyten. Die Reihenfolge Irbesartan > Telmisartan > Losartan war die gleiche wie in den vorhergehenden Experimenten. Eprosartan zeigt keine Auswirkung auf die Adiponektinexpression.

3.10. Die Charakterisierung der Interaktionen zwischen AT₁-Antagonisten und PPAR

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Interaktionen der AT₁- Antagonisten mit PPAR γ beschrieben. PPAR γ - abhängige Zellfunktionen, wie die Fettzellendifferenzierung, wurden sowohl durch klassische PPAR γ - Liganden wie auch durch einige AT₁- Antagonisten beeinflusst. Es galt, die Ähnlichkeit der Interaktion zwischen den beiden Substanzgruppen aufzuzeigen und zu belegen, dass die Effekte auf die Fettzellendifferenzierung durch PPAR γ vermittelt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Angiotensin- Rezeptoren dabei keine Rolle spielten.

Im weiteren Ergebnisteil soll nun die Aktivierung der PPAR γ - LBD durch AT₁-Antagonisten mechanistisch aufgeklärt werden. Außerdem werden Unterschiede

zwischen der PPAR γ -Aktivierung einerseits durch TZDs, und andererseits durch AT $_1$ -Antagonisten, näher charakterisiert.

3.10.1. Partieller PPAR γ - Agonismus

Wenn man die α P2- Zielgenexpression (3.1.2.) und die Triglyzerideinlagerung (3.6.) zwischen den AT $_1$ -Antagonisten und der Referenzsubstanz Pioglitazon vergleicht, so wird deutlich, dass Irbesartan und Telmisartan auch in hohen Konzentrationen nicht die Effizienz von Pioglitazon erreichen. Folgerichtig kann dann in der Transaktivierung im Gal4- Assay (3.5.) nur ca. 53% (Telmisartan) und 70% (Irbesartan) der Aktivität des vollen Agonisten Pioglitazon induziert werden. Somit besitzt vor allem Telmisartan eine partielle agonistische Aktivität.

Die Definition eines partiellen Agonisten besagt außerdem, dass er in Anwesenheit eines vollen Agonisten auch antagonistisch wirken kann. Der Beweis sollte erbracht werden, indem im Gal4- Assay die Ligandenbindungsdomäne maximal mit Pioglitazon aktiviert wird. Gleichzeitig wurde mit ansteigenden Konzentrationen Telmisartan inkubiert und die Luziferaseaktivität des Reporterkonstruktes bestimmt.

Im Gegensatz zu 3.5. wurden in diesem Experiment leichter zu transfizierende COS-7 Zellen benutzt. Abbildung 3.22. zeigt die Luziferaseaktivitäten abhängig von der Konzentration der eingesetzten Liganden. Die gemessene Luziferaselumineszenz wurden ins Verhältnis zur Aktivität eines kotransfizierten β -Galvektors gesetzt.

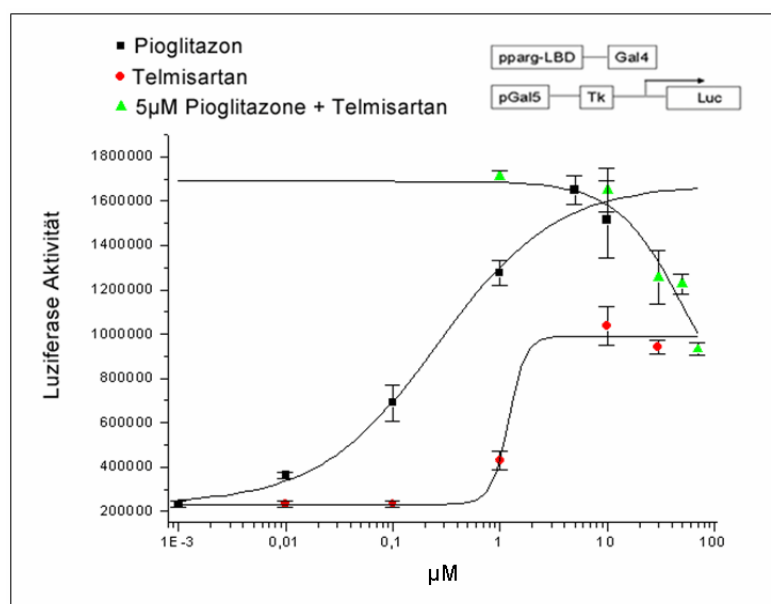


Abb. 3.22.: Telmisartan besitzt partielle agonistische Aktivität

Telmisartan antagonisiert in hohen Dosierungen die volle Aktivierung der PPAR γ -LBD durch Pioglitazon, transient transfizierte COS-7 Zellen, n=3

Werden 5 μ M Pioglitazon mit ansteigenden Konzentrationen von Telmisartan inkubiert, so sinkt die gemessene Luziferaseaktivität vom hohen Pioglitazonniveau auf das von Telmisartan (ca. 55%) ab. Einfluss hat Telmisartan nur oberhalb seiner EC₅₀-Konzentration, die in diesem Experiment 1,19 μ M betrug.

3.10.2. Wirkung auf die PPAR α -Ligandenbindungsdomäne

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Studien veröffentlicht, in denen die Wirkung von Telmisartan auf die Lipidparameter bei Diabetikern untersucht wurden. Telmisartan, aber nicht Eprosartan, senkte das Gesamtcholesterol, das LDL-Cholesterol und die Triglyzeridwerte bei diesen Patienten, gemessen nach 12monatiger Behandlung [168]. Auch im Vergleich zu Nifedipin sanken die Gesamtcholesterol- und LDL-Spiegel in einer ähnlich durchgeführten Studie mit Telmisartan [169].

Auch die Behandlung diabetischer Patienten mit Pioglitazon und Rosiglitazon hat Einflüsse auf die Lipidparameter, mit einer stärkeren Senkung der Triglyzeridspiegel durch Pioglitazon [170-172]. Der wichtigste Regulator des Triglyzerid- und Cholesterinstoffwechsels ist jedoch PPAR α , das stark in der Leber exprimiert wird und verschiedene Apolipoproteine reguliert [173]. Fibrate entfalten ihre lipidsenkende Wirkung über eine Aktivierung von PPAR α [174].

In Hinblick auf die beschriebenen Ergebnisse der Studien mit Telmisartan sollte überprüft werden, inwieweit AT₁-Antagonisten die PPAR α -LBD aktivieren können. Als Referenzsubstanzen wurden die PPAR α -Liganden Fenofibrinsäure (der aktive Metabolit von Fenofibrat) [175] und WY14643 [173] verwendet. Fenofibrat wird zur Behandlung von Hypertriglyzeridämie und zur Senkung des LDL-Cholesterins verwendet, WY14643 ist eine rein experimentell angewandte Substanz. COS-7 Zellen wurden mit dem gleichen Gal4-Assay transfiziert, wie für die Bestimmung der Aktivität bezüglich der PPAR γ -LBD, mit dem Unterschied, dass die PPAR γ -LBD durch einen Plasmid mit der PPAR α -LBD ausgetauscht wurde. Anschließend wurde mit den beiden PPAR α -Liganden und den AT₁-Antagonisten in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 36h wurde die Luziferaseaktivität vermessen und

gegen die Aktivität eines kotransfizierten β -Galvektors abgeglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.23. dargestellt.

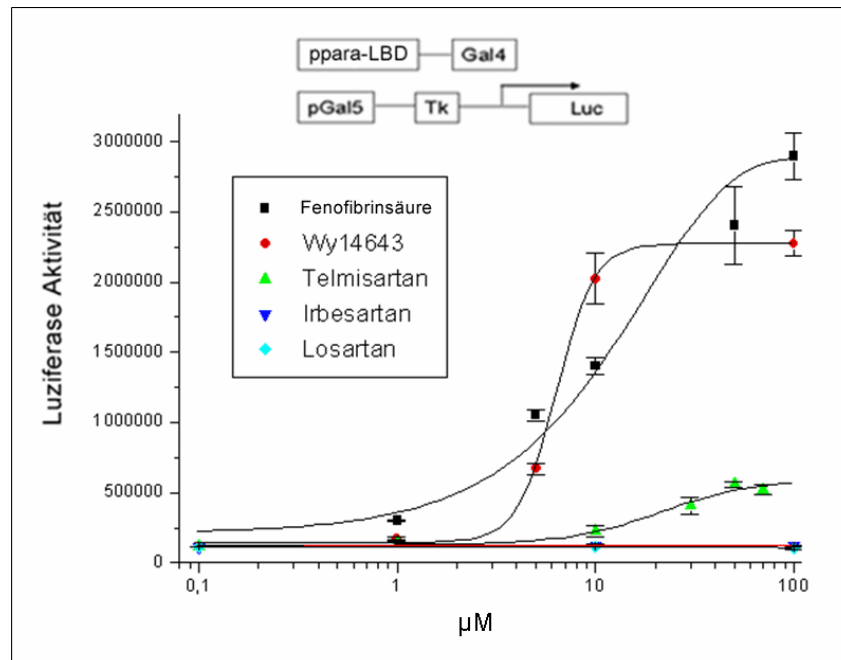


Abb. 3.23.: Telmisartan aktiviert schwach die PPAR α - LBD

Telmisartan, nicht aber Irbesartan und Losartan aktivieren die PPAR α - LBD in transient transfizierten COS-7 Zellen, n=3

Fenofibrinsäure und WY13643 aktivierten die PPAR α - LBD im μ M- Bereich, ähnlich wie in der Literatur beschrieben [176]. Telmisartan zeigte im Bereich oberhalb von 10 μ M eine leichte Aktivierung. Sowohl Irbesartan als auch Losartan zeigten keine Interaktion mit der PPAR α - LBD. Die EC₅₀- Werte und Effizienzen der Aktivierung sind in Tabelle 3.2. zusammengefasst.

	EC ₅₀ (μ M)	Effizienz, relativ zu Pioglitazon
Fenofibrinsäure	18,2	100%
WY13643	6,4	80%
Telmisartan	21,8	18%
Losartan u. Irbesartan	-	-

Tabelle 3.2.: Vergleich von EC₅₀-Werten und Effizienzen der PPAR α - LBD Aktivierung

Telmisartan aktiviert die PPAR α - LBD mit nur ca. 18% der Effizienz von Fenofibrinsäure.

3.10.3. Einfluss der AT $_1$ -Antagonisten und Rosiglitazon auf den partiellen Proteaseverdau von rekombinantem PPAR γ_2

Als Folge der Bindung eines Liganden an PPAR γ kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteines, was im Fall von z.B. TZDs dann die Heterodimerisierung mit RXR, die Dissoziation von Korepressoren und die Rekrutierung von Koaktivatoren induziert.

Experimentell kann rekombinantes PPAR γ - Protein durch Proteasen wie Trypsin partiell verdaut werden, wobei ein typisches Muster von resistenten Fragmenten entsteht. Diese können durch Markierung des Proteins mit [35 S] auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Durch Bindung eines TZDs wie Rosiglitazon, und die dadurch bedingte Änderung hin zu einer kompakteren Konformation des Proteins, kommt es zur Stabilisierung eines 27kDa-Fragmentes [177, 178]. Somit kann durch diese Methode eine substanzinduzierte Änderung der Konformation von PPAR γ nachgewiesen werden. Es wurde untersucht, ob die Aktivierung der PPAR γ - LBD durch eine direkte Interaktion von AT $_1$ -Antagonisten mit dem PPAR γ - Protein hervorgerufen wird.

Humanes PPAR γ_2 - Protein wurde in einer gekoppelten Transkriptions/Translationsreaktion in Anwesenheit von [35 S]- Methionin hergestellt und mit den verschiedenen Substanzen für 1 Stunde inkubiert. Nach Zugabe von Trypsin wurden nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen und sofort denaturiert. Abbildung 3.24. zeigt den zeitabhängigen partiellen Verdau von hPPAR γ_2 im Vergleich von Rosiglitazon mit DMSO. Durch 2 verschiedene Translationsstartstellen entsteht eine PPAR γ_2 - Doppelbande in der Autoradiographie.

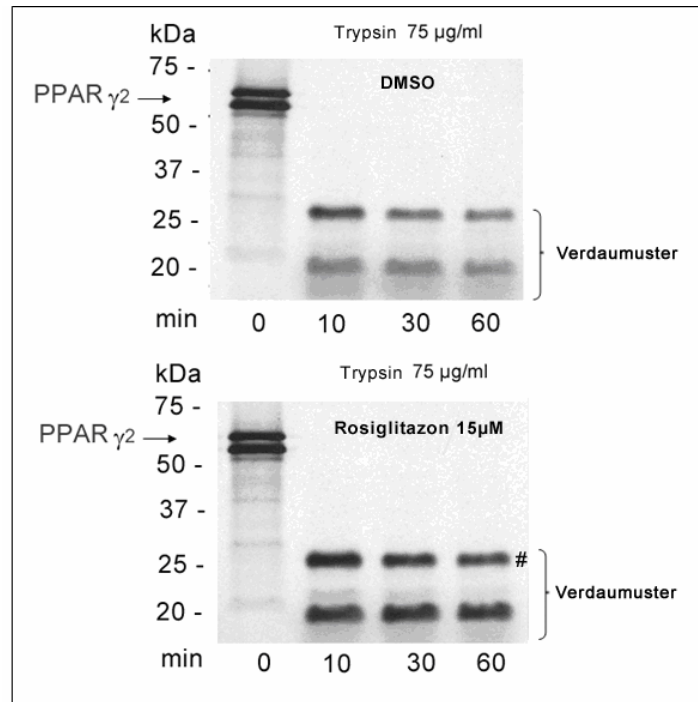


Abb. 3.24.: Vergleich der partiellen Proteaseverdau von rekomb. [³⁵S]-hPPAR_{γ2} durch Trypsin
 Ein 27kDa- Fragment (#) wird in Anwesenheit von Rosiglitazon gegenüber dem Proteaseverdau durch Trypsin resistent

Die Vorinkubation mit Rosiglitazon führte zu einer Stabilisierung des 27kDa-Fragments (markiert durch ein #), mit einer intensiveren Bande bei der gleichen Menge an eingesetztem PPAR_{γ2}, entsprechend der Literatur. Abbildung 2.25. zeigt die partiellen Verdau in Gegenwart von Telmisartan und Irbesartan unter gleichen Bedingungen.

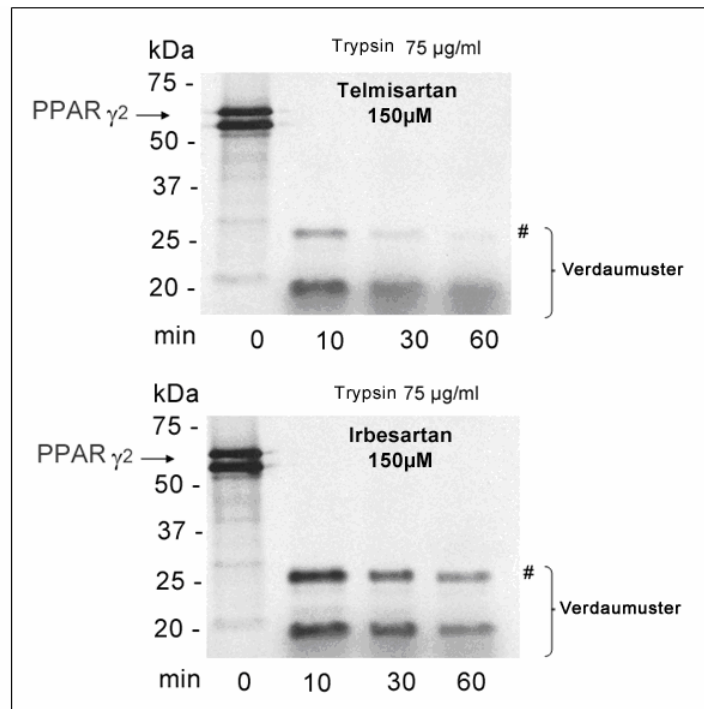


Abb. 3.25.: Partielle Proteaseverdau in Anwesenheit von Telmisartan und Irbesartan

Das 27kDa- Fragment (#) wird nach Vorinkubation mit 150µM Telmisartan schneller verdaut durch Trypsin im Vergleich zu DMSO (vgl. Abb. 3.24.), Irbesartan hatte keinen Einfluss auf die Stabilität des Fragements

Das 27kDa- Fragment wird durch die Anwesenheit von Telmisartan schneller verdaut, was an der schwächeren Bandenintensität zu erkennen ist. Irbesartan hatte keinen Einfluss auf das Verdaumuster nach Trypsinbehandlung. Um zu überprüfen, bei welcher Konzentration Telmisartan diese verminderte Resistenz gegenüber dem partiellen Proteaseverdau induziert, wurde ein Konzentrationsverlauf, bei einer festen Zeit von 40 Minuten Verdau, durchgeführt, und in Abbildung 3.26. dargestellt.

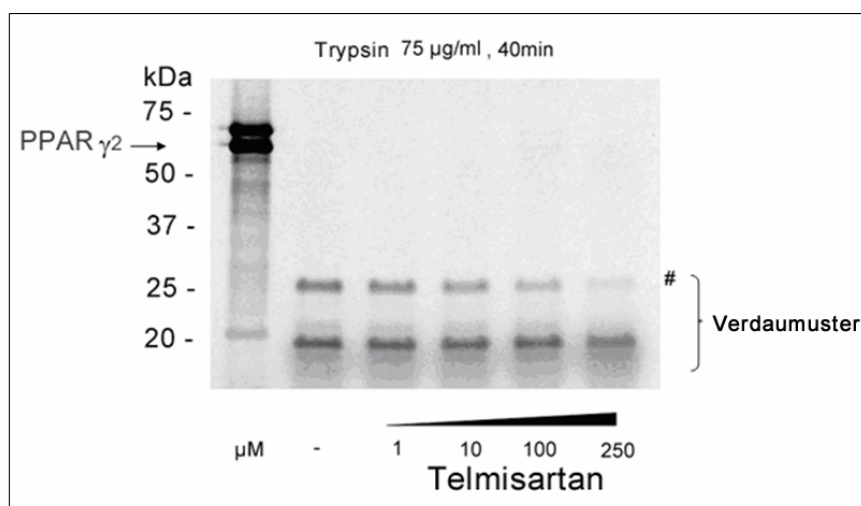


Abb. 3.26.: Konzentrationsverlauf von Telmisartan im partiellen [³⁵S]-hPPAR_{γ2}- Verdau

Das 27kDa- Fragment (#) wird nach Vorinkubation bei Konzentrationen >10μM Telmisartan nach 40 Minuten stärker durch Trypsin verdaut

Durch Inkubation von [³⁵S]-hPPAR_{γ2} mit Telmisartan $\geq 10\mu\text{M}$ wird die Stabilität des 27kDa- Fragments verringert. Dies weist auf eine direkte Interaktion von Telmisartan mit dem PPAR_γ- Protein hin. Eine Beeinflussung der Proteinkonformation durch Irbesartan konnte nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zum partiellen Verdau in Anwesenheit von Rosiglitazon, welche zu einer Stabilisierung des 27kDa- Fragments führt, hat die Inkubation mit Telmisartan den gegenteiligen Effekt. Die Bindung von Telmisartan scheint somit eine unterschiedliche Proteinkonformation von PPAR_γ zu induzieren, als die durch Bindung von Rosiglitazon.

3.10.4. PPAR_γ- Autoregulation durch AT₁-Antagonisten

Wie unter 3.2. beschrieben, führte die Inkubation mit Irbesartan während der Differenzierung zwar zu einer stärkeren Adipogenese, jedoch nicht zu einer verstärkten PPAR_{γ2}- Expression (vgl. Abbildung 3.5). Allein die größere Anzahl von entstandenen Fettzellen würde eine vermehrte PPAR_{γ2}- Expression implizieren. Wie sollten also die verminderte PPAR_{γ2}- Expression mit der verstärkten Adipogenese vereinbar sein?

Interessanterweise wurde in mehreren Arbeiten von einer negativen Autoregulation von ligandengaktivierten nukleären Rezeptoren durch deren Agonisten berichtet, wie z.B. über den Östrogenrezeptor [179], den RAR/RXR- Rezeptor [180, 181], den Progesteronrezeptor [182], den Glukokortikoidrezeptor [183] und auch PPAR_γ [181, 184, 185]. Die Bindung eines Liganden führt neben der transkriptionellen Aktivierung des Rezeptors somit auch zur Beeinflussung der Menge an verfügbarem Rezeptor. Wahrscheinlich stellt diese negative Autoregulation einen Schutzmechanismus der Zelle gegen eine Überaktivierung des Rezeptors durch Liganden dar [181]. Im Falle von PPAR_γ führt die Bindung eines Liganden zu vermehrter Ubiquitinierung und proteosomaler Degradation des Proteins [181] sowie zu einer verminderten Transkription [185].

Zur weiteren Charakterisierung der PPAR_γ- aktivierenden AT₁-Antagonisten, wurde deren Wirkung auf die PPAR_γ- Expression untersucht.

Verringerte PPAR γ - mRNA Expression in 3T3-L1 Adipozyten durch PPAR γ - aktivierende AT $_1$ - Antagonisten

Um die Einflüsse der generell ansteigenden PPAR γ - Expression während der Differenzierung auszuschließen, wurden die folgenden Experimente in ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt. In Abbildung 3.27. ist die Expression von PPAR γ_2 und γ_1 nach 24 Stunden Inkubation mit Pioglitazon und den AT $_1$ - Antagonisten dargestellt.

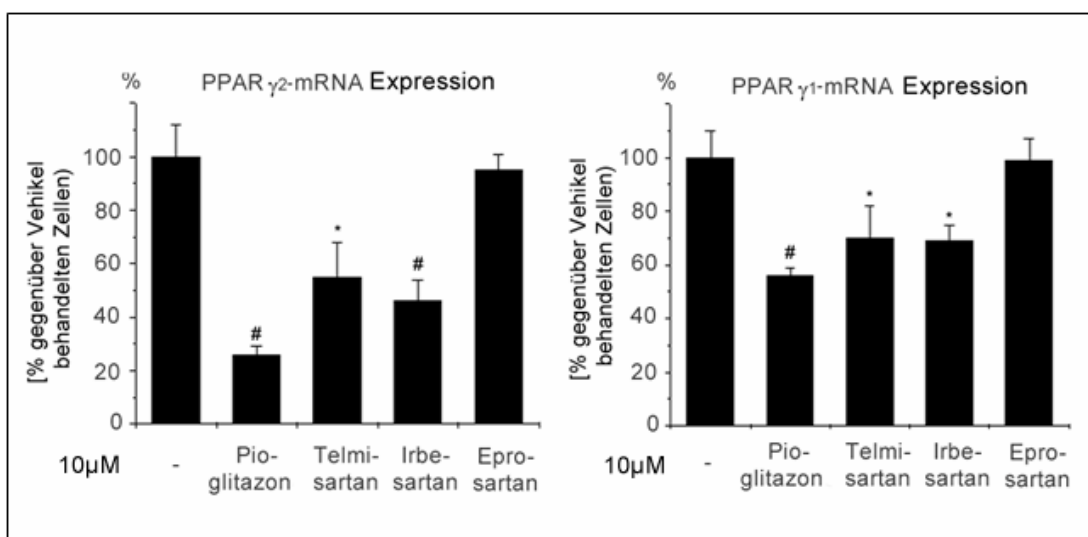


Abb. 3.27.: Einfluss von Pioglitazone und den AT $_1$ - Antagonisten auf die PPAR γ - Expression in 3T3-L1 Adipozyten nach 24 Stunden Inkubation

Nur Pioglitazone und PPAR γ - aktivierende AT $_1$ -Antagonisten vermindern die Expression von PPAR γ_1 und γ_2 in Adipozyten, nicht jedoch Eprosartan, Real-Time PCR, *p<0,05 #p<0,01 n=3

Pioglitazon verminderte am stärksten die PPAR γ_2 und γ_1 Expression (auf 26 \pm 4,1% bzw. 56 \pm 2,9%). Aber auch Telmisartan und Irbesartan senkten die mRNA- Expression von PPAR γ_2 und γ_1 (auf 55,5 \pm 13% bzw. 70,0 \pm 11,7% und auf 45,9 \pm 8,3% bzw. 69,2 \pm 6,0%). Eprosartan, als nicht PPAR γ - aktivierender AT $_1$ - Antagonist, hatte keinen Einfluss auf die PPAR γ - Expression.

Die Zeit, nach der in vorherigen Arbeiten die maximale Suppression der PPAR γ - Expression durch TZDs gemessen wurde, begann zwischen 4 und 6 Stunden nach Inkubationsstart und hielt für mindestens 24 Stunden an [185, 186]. Mit Irbesartan wurde ein Zeitverlauf durchgeführt, um die Kinetik der AT $_1$ - Antagonisten bezüglich

der PPAR γ - Expression zu untersuchen. Abbildung 3.28. zeigt die γ_2 - Expressionen in Anwesenheit des Vehikels, verglichen mit 10 μ M Irbesartan.

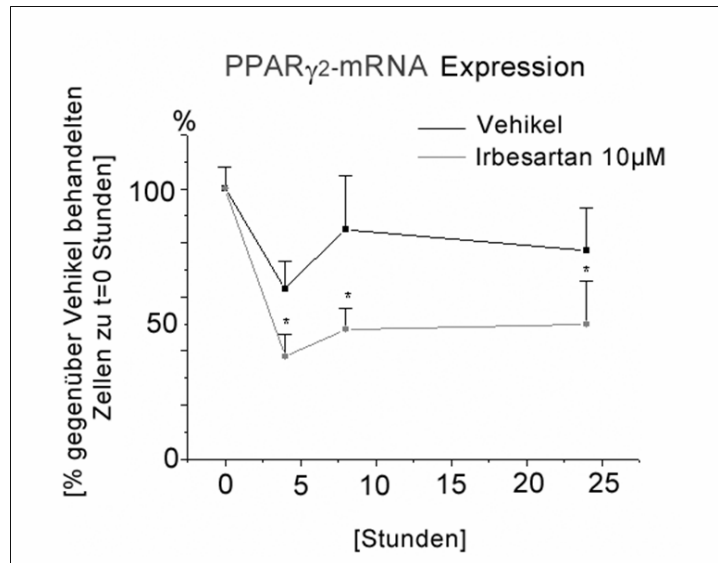


Abb. 3.28.: Zeitverlauf der Supression der PPAR γ_2 - Expression durch Irbesartan in Adipozyten

Irbesartan verringert die PPAR γ_2 - Expression zu 4, 12 und 24 Stunden im Vergleich zu Vehikel behandelten Zellen, Real-Time PCR, *p<0,05 #p<0,01 n=3

Ähnlich wie für die TZDs beschrieben, verringerte Irbesartan bereits nach 4 Stunden die PPAR γ_2 - Expression, was dann für mindestens 24 Stunden anhielt. Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist noch nicht bekannt. PPAR γ kann jedoch an seinen eigenen Promoter binden [53], und so inhibitorische Effekte, abhängig von der Anwesenheit eines Liganden, auf die eigene Transkription ausüben.

Verringerte PPAR γ - Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten durch PPAR γ - aktivierende AT $_1$ - Antagonisten

Wie bereits erwähnt, führt die Bindung eines Agonisten an PPAR γ zur Degradation des Proteins durch Enzyme des Proteasoms. Dieser Vorgang ist mit einer Ubiquitinierung des Proteins verbunden, was dann die Degradation initiiert, so auch im Falle von PPAR γ [181]. Neben diesem Mechanismus spielt längerfristig auch die oben beschriebene verminderte Transkription für die Proteinmenge eine Rolle.

Um die Einflüsse der AT₁- Antagonisten auf die Proteinexpression von PPAR γ zu überprüfen, wurden 3T3-L1 Adipozyten für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert und mittels Western- blotting auf die PPAR γ - Expression untersucht (Abbildung 3.29.).

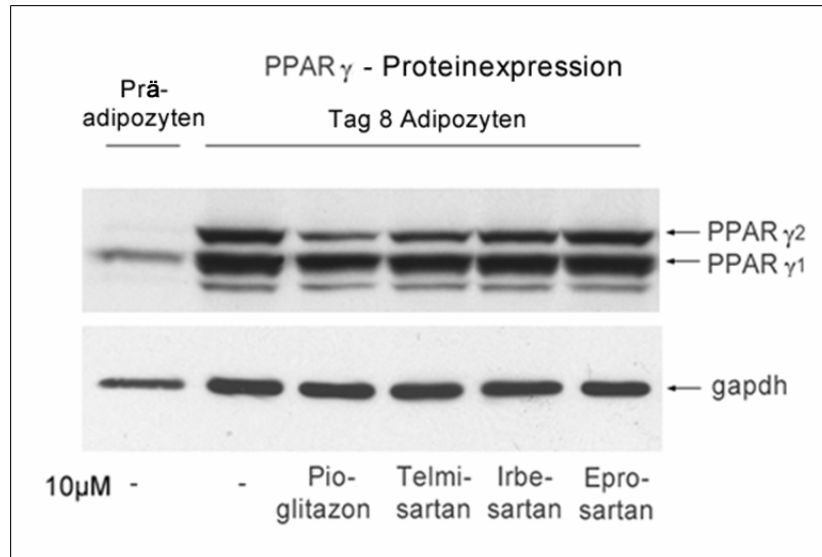


Abb. 3.29.: AT₁- Antagonisten vermindern PPAR γ - Proteinexpression

Irbesartan und Telmisartan, aber nicht Eprosartan, verminderten die PPAR γ - Expression, Präadipozyten exprimieren geringe Mengen an PPAR γ ₁ als Negativkontrolle, Western- blotting

Im Proteinlysat von Präadipozyten lassen sich geringe Mengen von PPAR γ ₁, jedoch kein PPAR γ ₂, nachweisen. Im Gegensatz dazu sind bei den Adipozyten die Banden von PPAR γ ₂ und PPAR γ ₁ zu erkennen. Pioglitazon verminderte die Expression beider Isoformen, jedoch war der Einfluss auf PPAR γ ₂ stärker, als auf PPAR γ ₁. Auch durch die Inkubation mit Telmisartan und Irbesartan wurde die PPAR γ ₂- Expression herunterreguliert, der Einfluss auf die PPAR γ ₁- Expression war gering. Eprosartan, als nicht PPAR γ - aktivierender AT₁- Antagonist, beeinflusste die Proteinexpression von PPAR γ nicht. Die Vergleichbarkeit der geladenen Proteinmengen wurde durch die Bestimmung der stabil exprimierten GAPDH überprüft.

Verringerte PPAR γ - Expression in human, in-vitro differenzierten Adipozyten

Wie unter 3.9. beschrieben, können spezielle AT₁-Antagonisten auch im humanen Zellsystem PPAR γ aktivieren. Somit sollte die negative Autoregulation nicht auf murine

Adipozyten beschränkt sein, sondern auch in humanen Zellen messbar sein. Zu diesem Zweck wurden humane Präadipozyten isoliert und für 12 Tage zu Adipozyten differenziert. Anschließend wurde für 24 Stunden mit den Liganden behandelt und die mRNA- Expression von PPAR γ bestimmt. Verwendet wurden Primer, die an beide Isoformen von humanem PPAR γ binden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.30. dargestellt.

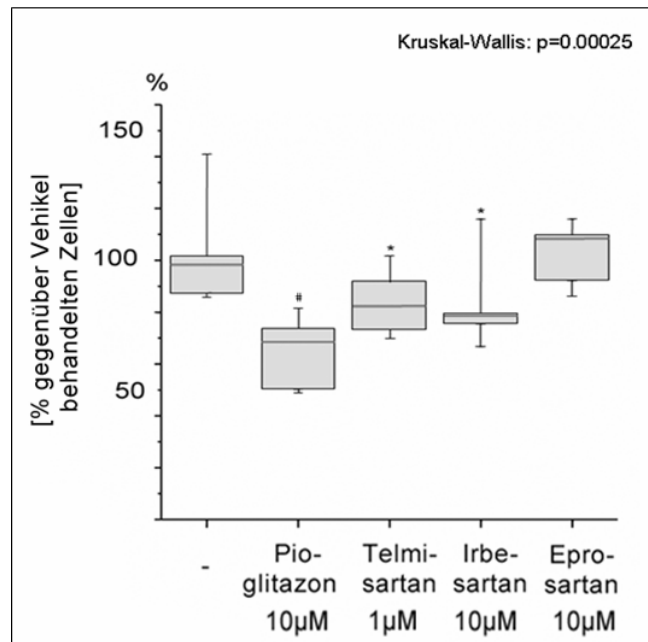


Abb. 3.30.: AT₁- Antagonisten vermindern PPAR γ - mRNA Expression in humanen Adipozyten

Irbesartan und Telmisartan, aber nicht Eprosartan, vermindern die PPAR γ - mRNA Expression in humanen Adipozyten nach 24 h Inkubation, n= 7 Patienten, Real-Time PCR, *p<0,05 #p<0,01 Mann Whitney

Auch in humanen Adipozyten können PPAR γ - aktivierende AT₁-Antagonisten die mRNA Expression von PPAR γ herunterregulieren. Pioglitazon, als Kontrolle, hatte wiederum den stärksten Effekt, Eprosartan war ohne Einfluss.

Interessanterweise scheint die Dissoziation von Korepressoren infolge der Bindung eines Agonisten die Stabilität des PPAR γ - Proteins zu vermindern [181]. Zusammen mit den Daten zur Änderung der Proteinkonformation (siehe 3.10.3.), die Unterschiede durch die Bindung von Telmisartan und Rosiglitazon zeigte, stellte sich die Frage, inwieweit AT₁- Antagonisten die Rekrutierung von Koaktivatoren und Korepressoren induzieren.

3.10.5. Kofaktorrekruitierung durch PPAR γ - aktivierende AT $_1$ - Antagonisten

Die Rekrutierung von Koaktivatoren bzw. die Dissoziation von Korepressoren stellt eine weitere Charakteristik von Liganden dar. Die Rekrutierung hängt von der ligandeninduzierten Konformation von PPAR γ ab, und es existieren Arbeiten, die eine selektive Rekrutierung eines bestimmten Sets an Kofaktoren in Abhängigkeit des Liganden zeigen [37, 85, 187]. Verglichen wird mit den TZDs, mit deren Hilfe die meisten Kofaktoren identifiziert wurden, die an PPAR γ binden können. Mit Hilfe von GST- pull down und FRET- Experimenten wurde die Rekrutierung des Korepressor Nuclear receptor corepressor 1(NCoR) und der Koaktivatoren Vitamin D-interacting protein 205 (DRIP205) und Transcriptional intermediary factor 2 (TIF-2) untersucht.

Ligandenabhängige Interaktion von PPAR γ mit dem Korepressor NCoR im GST-pull down Assay

Korepressoren vermitteln die Repression der Gentranskription von nukleären Transkriptionsfaktoren [188]. Sie binden mit spezifischen C- terminalen „nukleären Rezeptoren Interaktionsdomänen“ (ND) an die Transkriptionsfaktoren [189]. Dabei treten Präferenzen der verschiedenen Faktoren zu einer oder mehreren NDs auf [190]. Diese NDs enthalten ähnliche Motive (sogenannte CORNR Boxen (L/I-x-x-I/V-I-Motive)) wie die Koaktivatoren (LxxLL- Motive) [191]. Im gebundenen Zustand können dann Histondeacetylasen (HDAC) an Repressionsdomänen (RD) der Korepressoren rekrutiert werden [192] und die transkriptionelle Initiierung inhibieren [193]. Abbildung 3.31. zeigt den schematischen Aufbau von NCoR mit 3 RDs und 3 NDs.

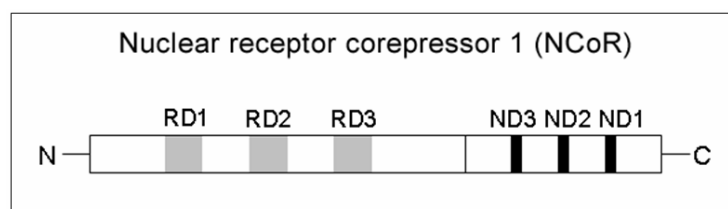


Abb. 3.31.: Organisation des Korepressors NCoR

Neben drei Repressionsdomänen beinhaltet die Proteinstruktur drei C- terminale Interaktionsdomänen für die Bindung an nukleäre Rezeptoren [189]

In GST- pull down Experimenten wurde nun untersucht, inwieweit Telmisartan und Irbesartan die Bindung des NCoR- Proteins an die PPAR γ - LBD beeinflussen. Als Kontrolle dienten die TZDs. Es wurde mit Hilfe des TNT- Systems ein NCoR- Protein *in-vitro* synthetisiert, welches ND 1 und 2 enthielt. Die Inkubation mit dem an Sepharose gekoppeltem PPAR γ -LBD+HINGE- GST Protein erfolgte in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Liganden. Abbildung 3.32. zeigt die gebundene Menge an NCoR bei konstant aufgetragener PPAR γ - Proteinmenge.

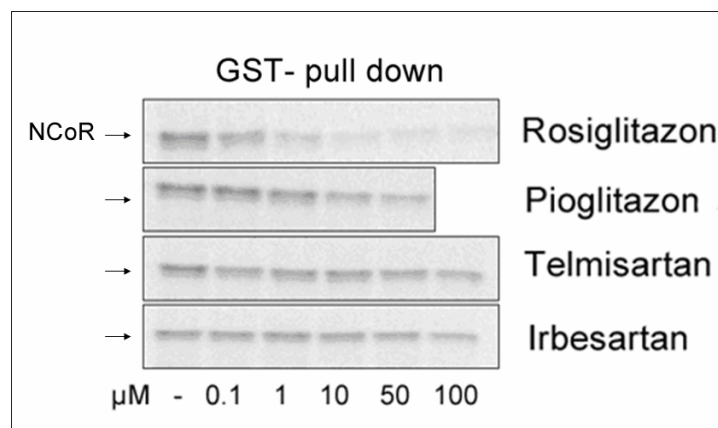


Abb. 3.32.: Einfluss der Liganden auf die Interaktion von PPAR γ mit NCoR
Konzentrationsabhängige Dissoziation von NCoR durch Anwesenheit verschiedener Liganden, GST- pull down Assay

Mit ansteigenden Konzentrationen der TZDs verminderte sich die Menge an gebundenem NCoR, wobei Rosiglitazon den stärksten Effekt hinsichtlich Potenz und Effizienz zeigte. Telmisartan und Irbesartan konnten nur begrenzt die Bindung zwischen den Proteinen vermindern.

Ligandenabhängige Interaktion von PPAR γ mit den Koaktivatoren DRIP205 und TIF-2 im GST- pull down Assay

Koaktivatoren können in 3 Kategorien eingeteilt werden: die erste Gruppe umfasst Proteine, die Histone modifizieren können und so den Zugang anderer Proteine zur DNA ermöglichen (z.B. p300, CBP und die SRC- 1, 2 und 3) [194]. Infolge von Histonacetyltransferase (HAT)- Aktivität können diese Kofaktoren Transkription von chromatingebundener DNA initiieren. Die zweite Gruppe besteht aus Vertretern des

TRAP/DRIP/Mediator/ARC- Komplexes und sind Proteine, die an Transkriptionsfaktoren binden, RNA- Polymerase II rekrutieren und mit der gesamten Transkriptionsmaschinerie interagieren [54]. Somit ist *in-vitro* Transkription nur von nicht- chromatingebundener DNA möglich. Die dritte Gruppe umfasst Proteine der Hefe- SWI/SNF Familie, welche ATP- abhängige DNA Entspiralisierungsaktivität besitzen [195] und somit transkriptionelle Aktivität verstärken können.

Es wurde die Rekrutierung eines Koaktivators aus der ersten und zweiten Gruppe in Abhängigkeit des Liganden untersucht. DRIP205, zur zweiten Gruppe gehörend, ist das bindende Adaptorprotein eines Proteinkomplexes (TRAP-Komplex), der dann Polymerase II rekrutiert und noch weitere Kofaktoren an sich binden kann wie z.B. PGC-1 [196]. TIF-2, als Vertreter der ersten Gruppe, besitzt selber HAT- Aktivität und rekrutiert dann CPB/p300 mit weiteren chromatinmodifizierenden Eigenschaften [54, 197]. Abbildung 3.33. zeigt den vereinfachten schematischen Aufbau der beiden Koaktivatoren. In GST- pull down Experimenten wurde der Einfluss der verschiedenen Liganden auf die Rekrutierung dieser beiden Koaktivatoren untersucht.

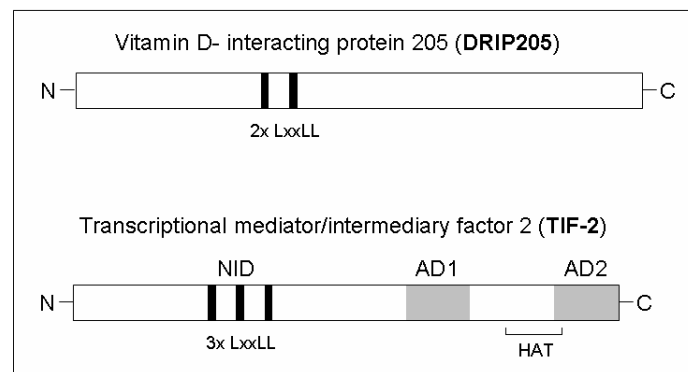


Abb. 3.33.: Organisation der Koaktivatoren DRIP205 und TIF-2 [196, 197]

Neben den Interaktionsdomänen, die LxxLL Motive enthalten und in beiden Proteinen vorkommen, besitzt TIF-2 zwei Aktivierungsdomänen, an die CBP binden kann (AD1) und zusätzliche auch intrinsische HAT- Aktivität besitzen

Die Kofaktorproteine, bestehend aus den LxxLL- Motiven enthaltenden Bereichen, wurden im TNT- System *in-vitro* synthetisiert und mit dem an Sepharose gekoppeltem PPAR γ -LBD+HINGE- GST Protein in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der Liganden, inkubiert. Die Ergebnisse der Autoradiographie sind in Abbildung 3.34. dargestellt.

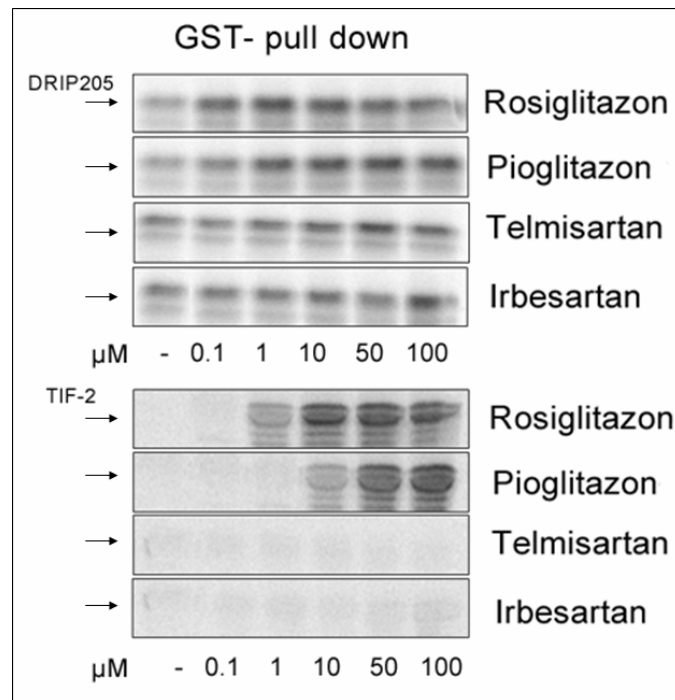


Abb. 3.34.: Einfluss der Liganden auf die Interaktion von PPAR γ mit DRIP205 und TIF-2

Telmisartan und Irbesartan führen zur Interaktion von PPAR γ mit DRIP205, TIF-2 wird nur leicht durch hohe Konzentrationen Irbesartan an PPAR γ rekrutiert

Mit ansteigender Konzentration der AT₁-Antagonisten wurde mehr DRIP205 durch PPAR γ rekrutiert. Im Vergleich zu den TZDs, und insbesondere zu Rosiglitazon, waren wesentlich höhere Konzentrationen dafür nötig. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von PPAR γ mit Telmisartan zu keiner Rekrutierung von TIF-2. Irbesartan konnte nur in hohen Konzentrationen (50 und 100 μ M) eine minimale Interaktion induzieren. Die TZDs zeigten erwartungsgemäß eine robuste Rekrutierung von TIF-2 an die PPAR γ -LBD. Unterschiede in deren Rekrutierungspotenz korrelieren mit den Bindungsaffinitäten zu PPAR γ [198].

Validierung der Kofaktorrekutierung im FRET- Assay

Um die Ergebnisse der Kofaktorrekutierung aus den GST-pull down Experimenten zu bestätigen, wurde eine fluoreszenzbasierende Nachweismethode angewandt. Die FRET-Technologie stellt eine sensitive und zuverlässige Methode zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen dar, die auch zum Nachweis von ligandenabhängigen Interaktionen von Kofaktoren mit nukleären Rezeptoren verwendet wird [176, 199-]

201]. Abbildung 3.35. zeigt die Ergebnisse mit Rosiglitazon, welches zur Validierung der Interaktionen benutzt wurde.

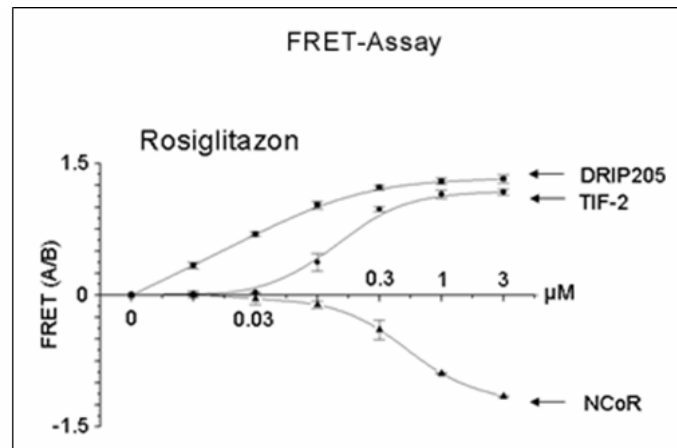


Abb. 3.35.: Einfluss von Rosiglitazon auf die Bindung von Kofaktorpeptiden

Ein FRET Quotient $A/B > 0$ zeigt eine Annäherung von $PPAR\gamma$ zu den Kofaktorpeptiden an, ein Quotient $A/B < 0$ eine räumliche Trennung, $n=3$

Der Quotient A/B ist die Fluoreszenz der ligandenhaltigen- gegenüber der vehikelhaltigen Pufferlösung der Interaktionspartner. So zeigt ein Quotient größer Null eine Annäherung der Peptide, und damit eine Bindung an. Entsprechend gibt ein Quotient kleiner Null Hinweis auf eine Dissoziation, d.h. eine räumliche Trennung beider Interaktionspartner. Rosiglitazon rekrutierte DRIP205 und TIF-2 potent an die $PPAR\gamma$ - LBD. Dementsprechend verminderte es (ab ca. $0,3 \mu\text{M}$) die Interaktion mit NCoR. Es bestand eine gute Korrelation zu den Ergebnissen der GST- pull down Experimente.

Im folgenden wurden Telmisartan und Irbesartan im FRET- Assay untersucht und die Ergebnisse in Abbildung 3.36. dargestellt.

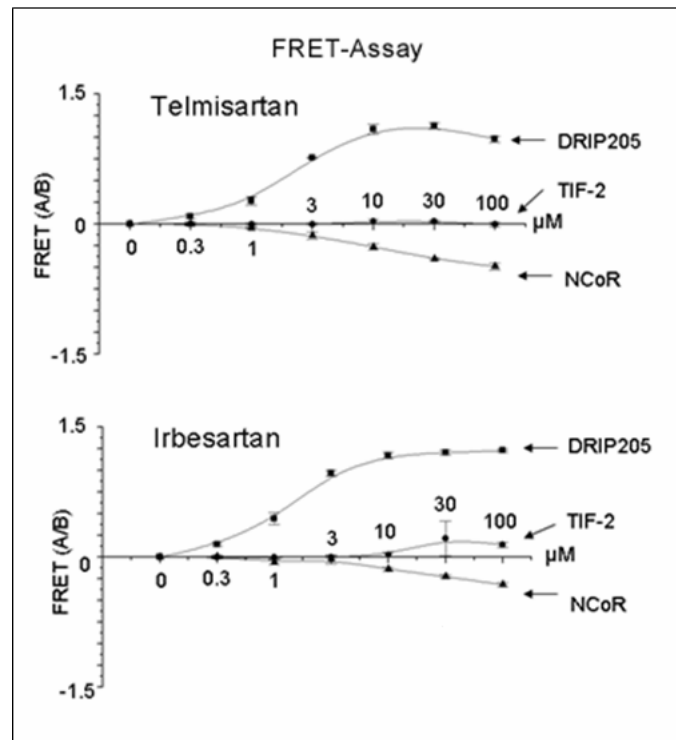


Abb. 3.36.: Einfluss von Telmisartan und Irbesartan auf die Bindung von Kofaktorpeptiden
 Beide AT₁-Antagonisten rekrutierten DRIP205, und ließen NCoR zu einem gewissen Anteil dissoziieren, jedoch nur Irbesartan hatte einen leichten Einfluss auf die TIF-2 Rekrutierung durch PPAR γ in hohen Konzentrationen, n=3

Beide Liganden (ab 0,3 μ M) führten zur Rekrutierung von DRIP205 an die PPAR γ -LBD. Entsprechend konnten sie in höheren Konzentrationen (ab 10 μ M) die Interaktion von NCoR und PPAR γ vermindern, jedoch nur zu maximal 50% der durch Rosiglitazon induzierten Dissoziation. Telmisartan rekrutierte TIF-2 nicht an die PPAR γ -LBD, Irbesartan dagegen nur in hohen Konzentrationen (30 und 100 μ M). Wiederum korrelierten diese Ergebnisse mit denen der GST-pull down Experimente und untermauerten das unterschiedliche Verhalten der Liganden bezüglich der TIF-2 Rekrutierung. Es kommt somit durch AT₁-Antagonisten zu einer differentiellen Kofaktorrekutierung im Vergleich zu den TZDs.

3.10.6. Einfluss der Rekrutierung von TIF-2 auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ in Abhängigkeit der Liganden

Durch *in-vitro* Techniken wurde TIF-2 als Koaktivator identifiziert, der, abhängig vom jeweiligen Ligand, unterschiedlich durch PPAR γ rekrutiert wird. Kofaktorrekutierung

und transkriptionelle Aktivität von PPAR γ sind funktionell eng miteinander verbunden [202]. Es stellte sich nun die Frage, ob die unterschiedliche Rekrutierung von TIF-2 Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ hat, d.h. mit einer funktionellen Relevanz in der Zelle verbunden ist. Dazu wurden COS-7 Zellen mit einem Expressionsvektor für PPAR γ_2 , einer PPRE- abhängigen Luziferase, einem Renilla-Luziferasevektor als interne Kontrolle und mit zunehmenden Mengen eines TIF-2 Expressionsvektors transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Luziferaseaktivitäten bestimmt und in Abbildung 3.37. dargestellt.

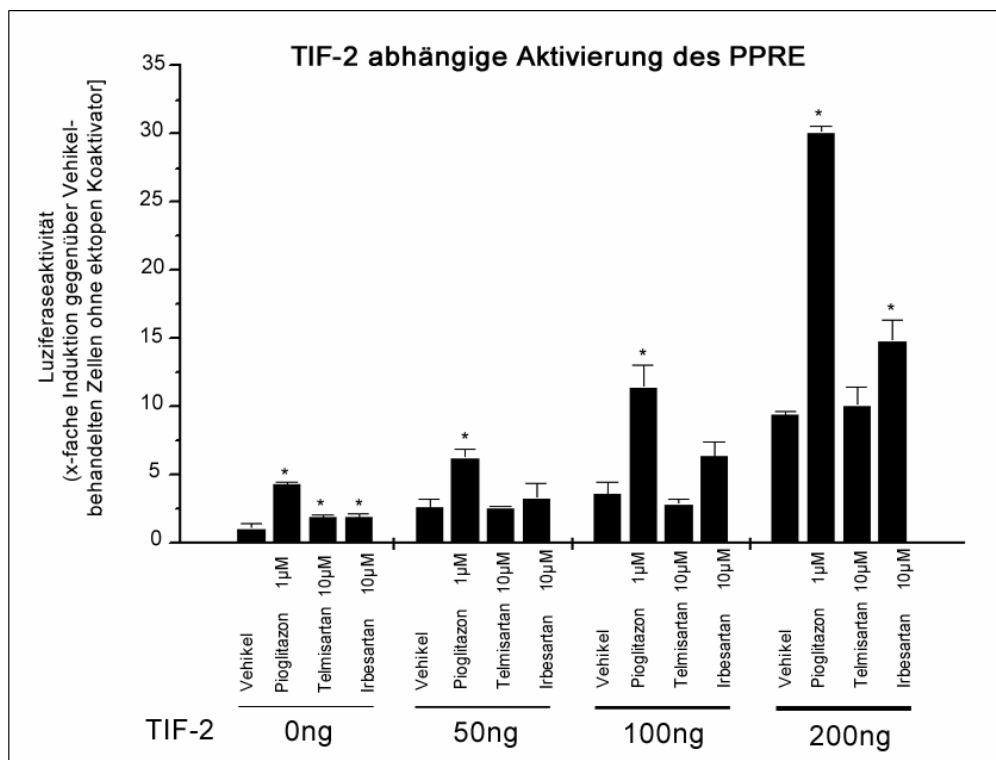


Abb. 3.37. : Ligandenabhängige PPAR γ - Aktivität mit ectopischer TIF-2 Expression

Pioglitazon und Irbesartan, aber nicht Telmisartan potenzieren die basale PPAR γ - Aktivität bei zunehmender TIF-2 Expression, * $p < 0,05$ gegenüber Vehikel, $n=3$

Ohne zusätzliche TIF-2 Expression steigerte 1 μ M Pioglitazon und 10 μ M Telmisartan bzw. Irbesartan die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ (4,3 \pm 0,2fach und 1,9 \pm 0,1 bzw. 1,9 \pm 0,2fach gegenüber Vehikel behandelten Zellen). Wurde der TIF-2 Expressionsvektor kotransfiziert, so konnte man zunächst eine ligandenunabhängige Aktivitätssteigerung erkennen (bis auf 9,2 \pm 0,2fach bei 200ng), was auf die mögliche Anwesenheit eines endogenen Liganden oder auch auf eine ligandenunabhängige Bindung außerhalb der PPAR γ - LBD hinweist. Pioglitazone konnte diese basale

Aktivität weiter potenzieren. Im Gegensatz dazu verlor Telmisartan seine moderate Aktivitätssteigerung und konnte nicht von kotransfiziertem TIF-2 profitieren. Irbesartan wiederum zeigte eine leichte Steigerung gegenüber der Basalaktivität, signifikant bei 200ng ektopischer TIF-2 Expression. Die Ergebnisse demonstrierten, dass die selektive Rekrutierung von TIF-2 durch die Liganden funktionelle Konsequenzen bezüglich der transkriptionellen Aktivität nach sich zieht. Auch die schwache Rekrutierung von TIF-2 durch Irbesartan konnte mit hohen Mengen von ektopisch- exprimiertem TIF-2 nachgewiesen werden.

3.11. Die Untersuchung der ligandenabhängigen Zielgenexpression in 3T3-L1 Adipozyten mittels Microarrays

Die Aktivierung von PPAR γ in Adipozyten durch einen Liganden führt zu einer veränderten Expression vieler in Glukose- und Fettstoffwechsel involvierter Gene [203]. Studien zu verschiedenen nukleären Rezeptoren konnten zeigen, dass quantitative und qualitative Unterschiede in der Genregulation durch volle und selektive Agonisten bestehen [204-206]. Es sollte deshalb untersucht werden, wie AT₁-Antagonisten, als Liganden mit selektiver Kofaktorrekutierung, im Vergleich zu TZDs, als volle Agonisten, die Expression PPAR γ - abhängiger Gene verändern. Tag 7 Adipozyten wurden für 24 Stunden mit den Liganden inkubiert und die mRNA isoliert. Diese wurde auf Agilent Oligonukleotid- Chips hybridisiert. Dazu wurde ein Pool aus 3 verschiedenen Experimenten je Behandlung angefertigt und in 4 verschiedenen Experimenten hybridisiert.

Ähnlich regulierte Gene durch TZDs und PPAR γ aktivierende AT₁- Antagonisten

Abbildung 3.38. zeigt eine Auswahl an Genen, die qualitativ ähnlich durch Pioglitazon bzw. die AT₁-Antagonisten reguliert wurden und mit PPAR γ bzw. mit der Fettzellfunktion in Verbindung gebracht werden.

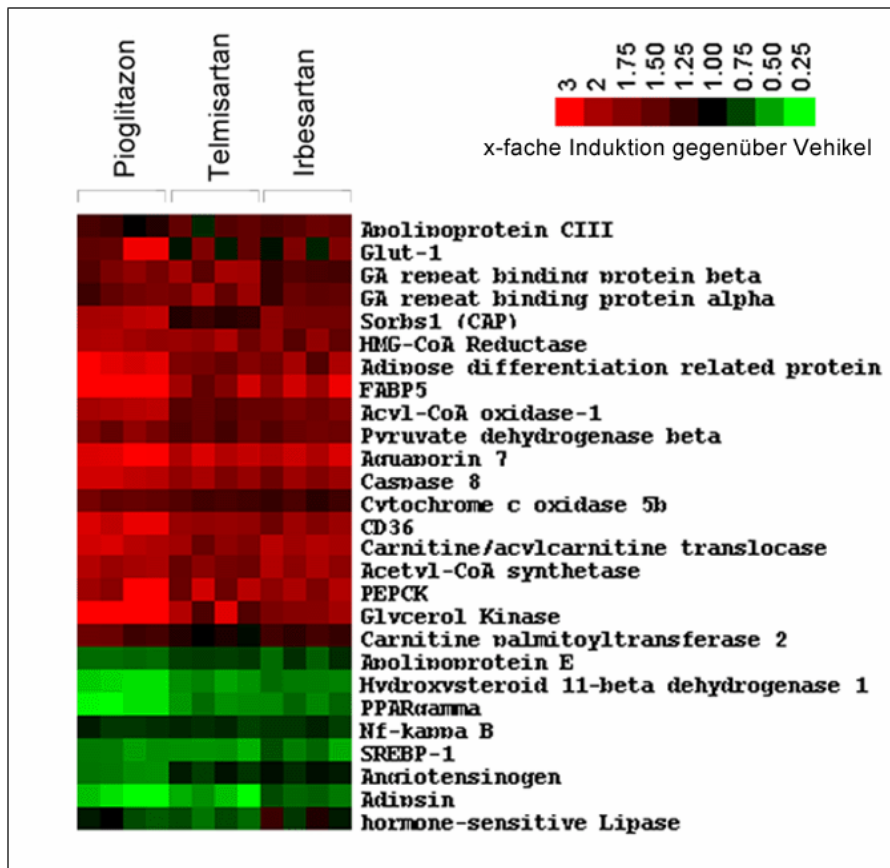


Abb. 3.38. : Qualitativ gleich regulierte Gene in Adipozyten

3T3-L1 Expressionsprofil nach 24 Stunden Inkubation der Adipozyten mit 10 μM Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan (alle Liganden mit gleicher Orientierung der Regulation)

Viele der gezeigten Gene besitzen bereits identifizierte PPREs in deren Promotoren (wie z.B. CD36, PEPCK, Sorbs1, Acetyl- CoA Oxidase und Aquaporin 7) [207-211], andere sind bekannte Zielgene, die durch TZDs reguliert werden (wie z.B. HMG-CoA-Reduktase und Glycerolkinase) [212, 213]. Es zeigte sich eine gute Korrelation zwischen Pioglitazon und den beiden AT₁- Antagonisten. Auffällig war die schwache Induktion von CAP durch Telmisartan.

Unterschiedlich regulierte Gene durch TZDs und PPAR_γ aktivierende AT₁-Antagonisten

Abbildung 3.39. zeigt eine Auswahl verschieden regulierter Gene, bei denen mindestens zwei Liganden signifikante Unterschiede induzierten.

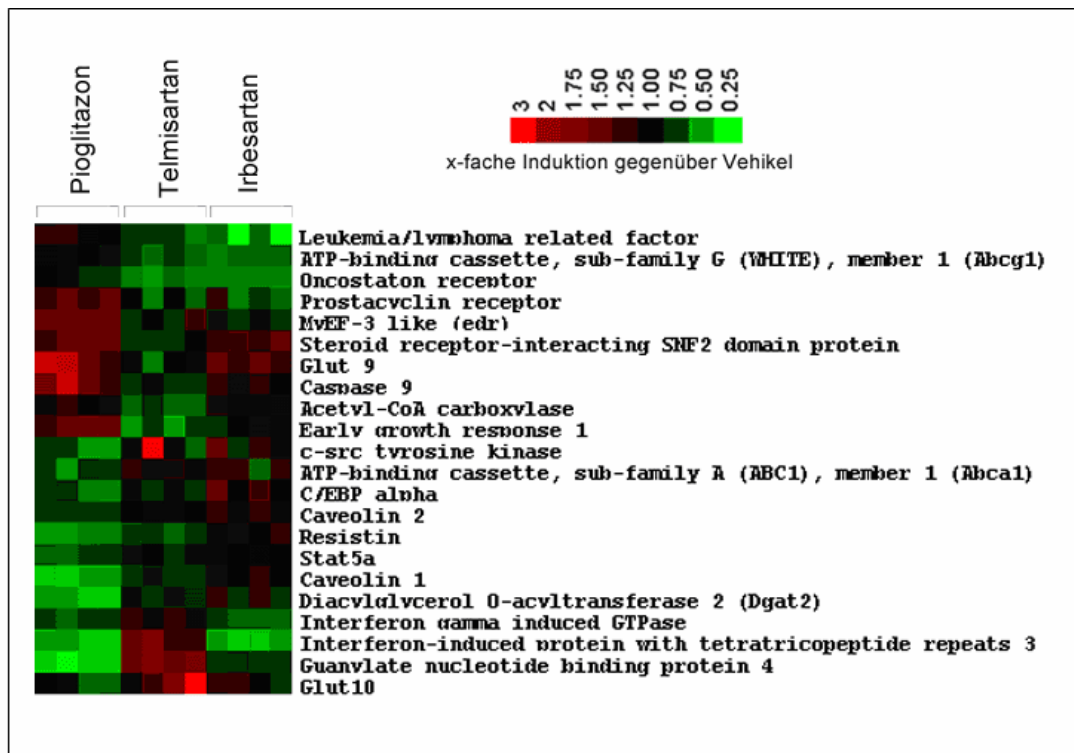


Abb. 3.39. : Qualitativ unterschiedlich regulierte Gene in Adipozyten

3T3-L1 Expressionsprofil nach 24 Stunden Inkubation der Adipozyten mit 10 μM Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan (zwischen mindestens zwei Liganden signifikant unterschiedliche Regulation)

Einige dieser Gene haben wichtige Funktionen im Adipozyten (wie z.B. C/EBP α , Resistin, Stat5a und Dgat2) [214-217], andere werden mit der Entstehung von Diabetes (Leukemia/lymphoma related Factor (FBI-1)) [218] oder Atherosklerose (Early growth response (EGR-1)) [219, 220] in Zusammenhang gebracht. Interessanterweise gab es auch signifikante Unterschiede zwischen den Telmisartan und Irbesartan behandelten Zellen, was auf zusätzliche Spezifitäten bezüglich der Kofaktorrekutierung oder auch PPAR γ - unabhängiger Effekte hinweist.

Validierung des Oligochips mittels Real-Time PCR

Für interessante Gene wurden Primersysteme entworfen und deren Expression mit Real-Time PCR in den Proben bestimmt. Zum einen werden dadurch die Ergebnisse des Oligochips überprüft und validiert, zum anderen kann nur so eine echte Signifikanz (gegenüber der Signifikanz der Messung, bei 4facher Bestimmung eines mRNA-Pools beim Oligochip) ermittelt werden. Abbildung 3.40. zeigt die Expression von qualitativ gleich regulierten Genen, bestimmt mit Real-Time PCR.

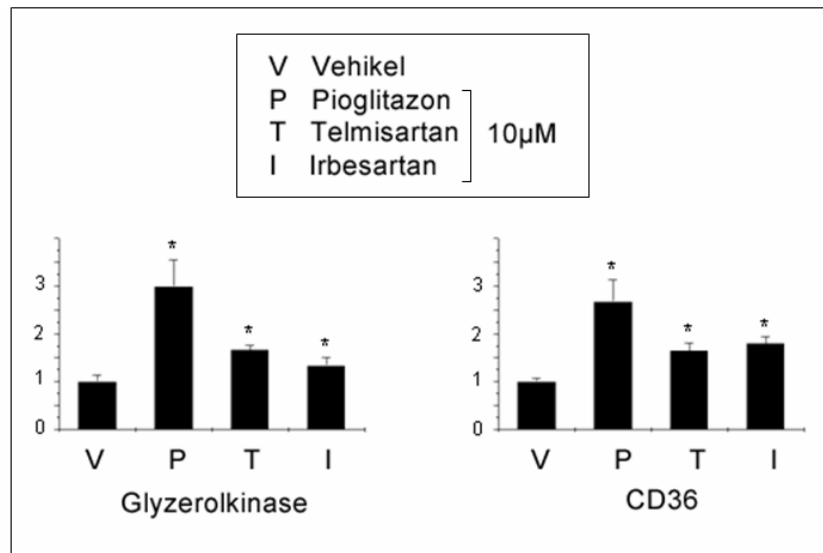


Abb. 3.40.: Expression gleich regulierter Gene, gemessen mit Real-Time PCR

Expression von Glyzerolkinase und CD36 nach 24 Stunden Inkubation mit den Liganden,

* $p < 0,05$ # $p < 0,01$, $n=3$

Beide Gene wurden durch Pioglitazon in ihrer Expression gesteigert, wobei im Promoter von CD36, wie oben beschrieben, ein klassisches PPRE identifiziert wurde. Sowohl Telmisartan als auch Irbesartan erhöhten die Expression der beiden Gene, jedoch nur zu ca. 10-40% des Pioglitazoneffektes. Die Real-Time Ergebnisse korrelierten eng mit denen der Oligochips.

Abbildung 3.41. zeigt unterschiedlich regulierte Gene, die mittels Real-Time PCR überprüft wurden.

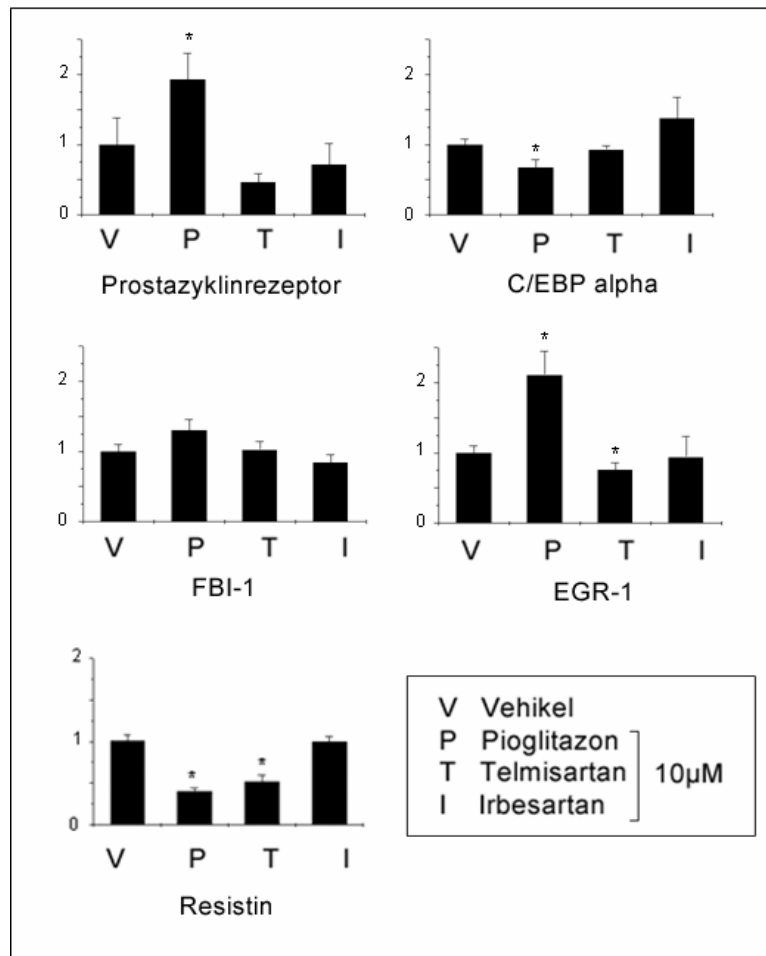


Abb. 3.41.: Expression unterschiedlich regulierter Gene, gemessen mit Real-Time PCR

Expression nach 24 Stunden Inkubation mit den Liganden, * $p < 0,05$ # $p < 0,01$, $n = 3$

Es zeigte sich wiederum eine enge Korrelation zu den Ergebnissen der Oligochips. Nicht alle Änderungen der Genexpression erlangten Signifikanz (vgl. FBI-1), jedoch waren Tendenzen immer gleich orientiert wie die der Microarrays. Pioglitazon erhöhte die Expression des Prostazyklinrezeptors und von EGR-1, wohingegen die AT_1 -Antagonisten keinen Einfluss hatten, bzw. das Gegenteil bewirkten (Telmisartan erniedrigte die EGR-1 Expression). Pioglitazon verminderte die Expression von C/EBP α , Irbesartan zeigte einen Trend zur erhöhten Expression. Resistin wurde nur durch Pioglitazon und Telmisartan herunterreguliert, nicht aber durch Irbesartan. Die Bestätigung der differentiell regulierten Gene demonstrierte die Wirkung der AT_1 -Antagonisten als selektive Agonisten.

3.12. Der Vergleich der Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten

Die Inkubation von ausdifferenzierten murinen und humanen Adipozyten mit AT₁-Antagonisten führte zu einer veränderten Expression von Genen, die wichtig für die Steuerung der Fettzellfunktion sind (siehe 3.9.2. und 3.11.). Unterschiede im Expressionsprofil von AT₁-Antagonisten und Pioglitazon sollten daher funktionelle Konsequenzen in reifen Adipozyten nach sich ziehen. Eine wichtige Funktion der Fettzellen ist die Glukoseaufnahme, die durch Insulin stimuliert wird [221]. Die Aufnahme erfolgt über bestimmte Glukosetransporter, Glut-1 und Glut-4, wobei Insulin, unter anderem, die Translokation von Glut-4 in die Zellmembran bewirkt und somit zu einer erhöhten Aufnahme der Glukose führt [221]. Glut-1 scheint für eine niedrige basale Glukoseaufnahme in Adipozyten verantwortlich zu sein [221]. TZD erhöhen die Aufnahme von Glukose in Fettzellen [222], was mit einer vermehrten Glut-4 Expression erklärt wird [223, 224]. Um den Einfluss der AT₁-Antagonisten auf die Glukoseaufnahme in Adipozyten zu untersuchen, wurden ausdifferenzierte Tag 7 Adipozyten für 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert und anschließend die Aufnahme von Glukose mit und ohne Insulinstimulation gemessen. Mit Hilfe von Tritium- markierter Deoxyglukose, die von der Zelle aufgenommen, nicht aber in der Glykolyse verstoffwechselt wird, kann deren kumulierte Menge in der Zelle bestimmt werden [225]. Als Bezug dienten Pioglitazon und das nicht PPAR γ -aktivierende Eprosartan. Abbildung 3.42. zeigt die basalen und Insulin-induzierten Glukoseaufnahmen.

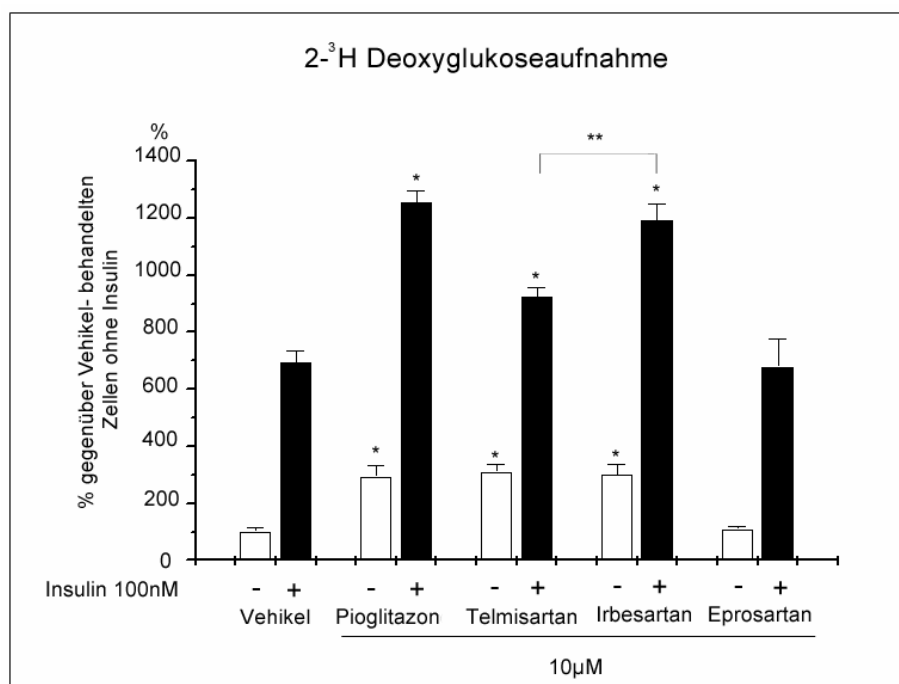


Abb. 3.42.: Deoxyglukoseaufnahme von 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit den Liganden für 72 Stunden

Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan erhöhten die basale und Insulin- induzierte Glukoseaufnahme, wobei Telmisartan signifikant weniger Insulin- induzierte Aufnahme erzeugt als Irbesartan $n=3$, $*p<0,05$ vs. Vehikel, $**p<0,05$ vs. Irbesartan + Insulin

Pioglitazon, Telmisartan und Irbesartan, d.h. alle PPAR γ - aktivierenden Substanzen, erhöhten die basale (von 100% auf 293,5±38,8; 310,0±26,5 und 300,1±34,2 %) und Insulin- induzierte (von 693,4±42,5% auf 1254,2±40,2; 924,5±31,7 und 1191,2±58,7 %) Deoxyglukoseaufnahme. Eprosartan hatte keinen Einfluss auf diese Parameter. Die Inkubation mit Telmisartan führte zu signifikant weniger Insulin- induzierter Glukoseaufnahme, als Pioglitazon und Irbesartan.

3.13 Die Kristallisation der PPAR γ - LBD mit gebundenem Liganden

Ein exaktes Lösen der Struktur der besetzten Ligandenbindungsdomäne ist nur durch eine Kristallisation des Proteins möglich. Die Kristallstrukturen von PPAR γ , des Heterodimers PPAR γ /RXR α und auch des Heterodimers mit Peptiden von Koaktivatoren in Anwesenheit von Rosiglitazon sind bereits gelöst [193, 226]. Aufgereinigtes und konzentriertes Protein wurde in Anwesenheit der Liganden (zuerst Pioglitazon, später Telmisartan) in verschiedenen Lösungsmittelgemischen im „Hängenden Tropfen“ wachsen gelassen. Nach dreimonatiger Inkubation bei 21 Grad

konnten Kristalle ausgemacht werden. Abbildung 3.43. zeigt mikroskopische Aufnahmen der ersten beiden Kristalle.

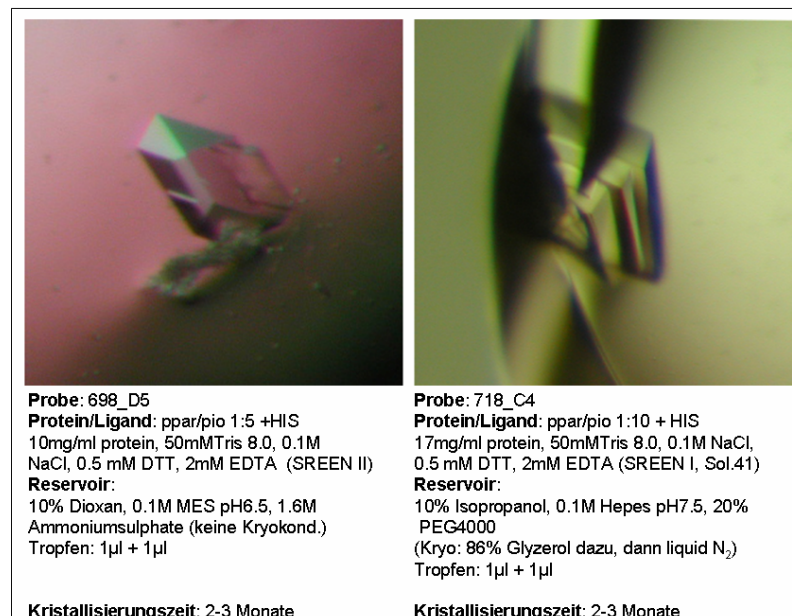


Abb. 3.43.: Erste Kristalle der PPAR γ - LBD nach 3 monatigem Wachstum

Kristalle der PPAR γ -LBD-HIS mit 1:5 bzw. 1:10 fachem Ligand Pioglitazon mit den jeweiligen Lösungsmittelbedingungen, Probe 718_C4 besteht aus 3 übereinander angeordneten Kristallschichten

Das Kristall der Probe 698_D5 wurde leider beim Herauslösen zerstört. Die Struktur des anderen Kristalls der Probe 718_C4 wurde mit einem MAR300 mit einer Auflösung von 2,5Å gelöst und mit Hilfe des Molecular Replacement identifiziert. Es zeigte sich Anordnung zu einem PPAR γ - Homodimer mit zwei Molekülen Pioglitazon (Abbildung 3.44.). Die Ausbildung eines Homodimers der PPAR γ - LBD, der aber physiologisch gesehen keine Funktion haben dürfte, war von anderen Kristallisationen bereits bekannt [226]. Die Anordnung der Domänen dieses Homodimers entsprach den Daten aus anderen veröffentlichten Daten [226-228].

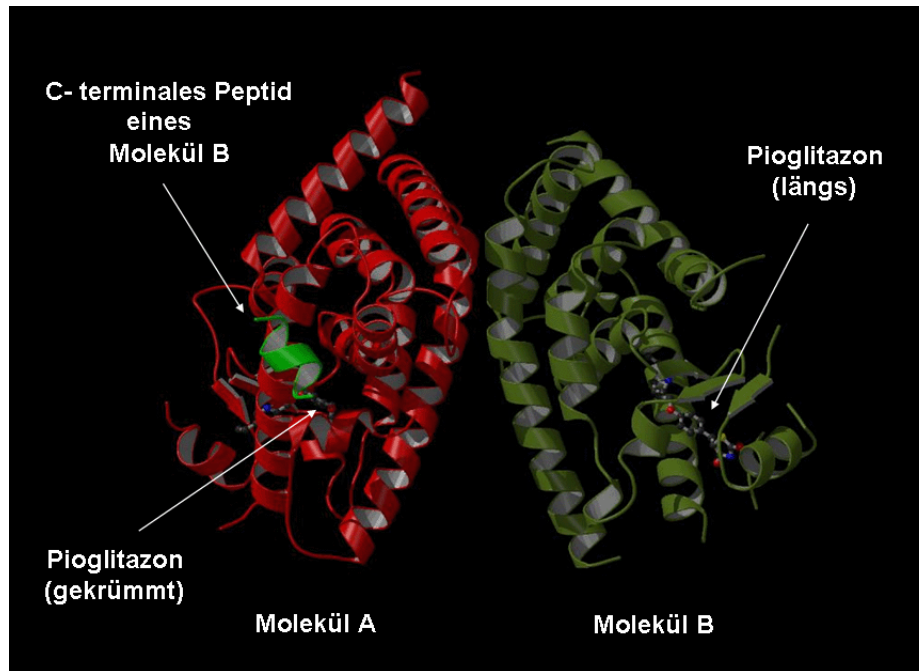


Abb. 3.44.: Struktur des PPAR γ -LBD Homodimers mit 2x Pioglitazon

Pioglitazon bindet in 2 unterschiedlichen räumlichen Anordnungen in Molekül A und B. Das C-terminale Ende der PPAR γ -LBD eines Molekül B interagiert mit der AF-2 Domäne von Molekül A

Die Anordnung von Pioglitazon im Molekül A ist der von Rosiglitazon sehr ähnlich [226]. Interessanterweise wurde ein Peptidrest, der mit der AF-2 Domäne von Molekül A interagiert, als das C-terminale Ende eines kristallographisch verwandten Molekül B identifiziert. In anderen Kristallisationen, bei denen ein Kofaktorpeptid anwesend war, wurden diese Interaktion durch das LxxLL- Motiv des Kofaktors eingegangen. Betrachtet man nun Molekül B, so entdeckt man eine andere Ausrichtung von Pioglitazon, nämlich nicht gekrümmt wie in Molekül A, sondern längs, ohne eine Interaktion mit der verschobenen AF-2 Domäne einzugehen. Abbildung 3.45. vergleicht die räumlichen Anordnungen von Pioglitazon in den Molekülen A und B.

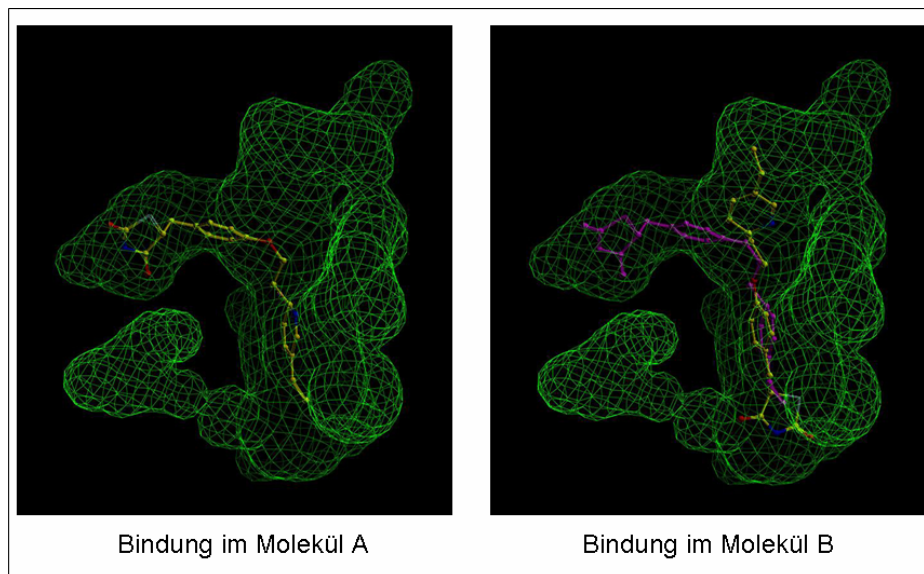


Abb. 3.45.: Bindungen von Pioglitazon in Molekül A und B

Links: gekrümmte Orientierung von Pioglitazon im Molekül A mit der Ausrichtung des Thiazolidindionringes zur AF-2 Domäne, rechts: Längsausrichtung im Molekül B (rosa: Pioglitazon aus Molekül A zum Vergleich)

Aufgereinigtes PPAR γ - LBD- Protein mit Telmisartan wurde im Januar 2005 zur Kristallisation angesetzt.