

Deutsches Institut für Ernährungsforschung – Abteilung Klinische Ernährung  
Charité – Campus Benjamin Franklin - Abteilung Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin  
Universität Potsdam – Institut für Molekularbiologie

---

**Untersuchungen über Regulationsmechanismen  
der 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**"doctor rerum naturalium"**

**(Dr. rer. nat.)**

**in der Wissenschaftsdisziplin "Molekularbiologie"**

**eingereicht an der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Universität Potsdam**

**von**

**Janin Andres**

**Potsdam, den 30.06.08**

Diese Arbeit ist urheberrechtsgeschützt.

Online veröffentlicht auf dem Publikationsserver der Universität Potsdam:

URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3303/>

URN urn:nbn:de:kobv:517-opus-33033

[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-33033>]

## INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Kurzfassung.....	IV
Abstract.....	V
Eidesstattliche Versicherung.....	VI
Publikationsliste.....	VII
Abkürzungsliste.....	IX
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.    Das Metabolisches Syndrom.....	1
1.2.    11beta-Hydroxysteroid und 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenasen.....	3
1.2.1.    Cortisol.....	3
1.2.2.    Hypercortisolismus.....	3
1.2.3.    11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenasen (11beta-HSD).....	4
1.2.4.    Tierexperimentelle Modelle der 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1.....	6
1.2.4.1.    Adipöse Mausmodelle und die 11beta-HSD1-Expression.....	6
1.2.4.2.    11beta-HSD1-Knock-out Tiere.....	7
1.2.4.3.    Überexpression der 11beta-HSD1 in transgenen Mäusen.....	7
1.3.    Regulation der Genexpression.....	8
1.4.    Wichtige Transkriptionsfaktoren in Bezug auf die 11beta-HSD1.....	10
1.4.1.    CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs).....	10
1.4.2.    cAMP response element-binding protein (CREB).....	11
1.4.3.    Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs).....	11
1.5.    Bekannte Regulatoren der 11beta-HSD1.....	12
1.5.1.    Regulation des 11beta-HSD1-Promotors.....	12
1.5.2.    Bedeutung und Regulation der 11beta-HSD1 während der Adipogenese.....	13
1.5.3.    Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) im Promotorbereich der 11beta-HSD1 und genetische Assoziationen.....	14
1.6.    Zielstellung.....	15
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1.    Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	16
2.1.1.    Klonierung.....	16
2.1.2.    SNP-Analyse - Herstellung der mutierten Promotorfragmente.....	17
2.1.3.    Dual-Luciferase-Assay.....	17

2.1.4.	Stimulationslösungen.....	18
2.1.5.	mRNA-Isolation .....	19
2.1.5.1.	mRNA-Isolation aus den Fettbiopsien der Rosiglitazon-Interventionsstudie.....	19
2.1.5.2.	mRNA-Isolation aus den Fettbiopsien der GIP-Interventionsstudie.....	19
2.1.5.3.	mRNA-Isolation aus 3T3-L1-Zellen .....	19
2.1.6.	Semi-Quantitative Real-Time-PCR .....	19
2.1.6.1.	Primer-Liste .....	19
2.1.6.2.	Semi-Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	20
2.1.7.	In-Silico-Analyse .....	20
2.1.8.	Nicht-radioaktiver Elektromobilitätsassay (EMSA) .....	21
2.1.8.1.	Kernproteinisolation .....	21
2.1.8.2.	Oligonukleotide.....	21
2.1.8.3.	Bindungsreaktionen .....	21
2.1.8.4.	Gelelektrophorese und Färbung der Gele .....	22
2.1.9.	11beta-HSD1-Enzymaktivität .....	22
2.2.	Zellkultur .....	23
2.2.1.	Verwendete Zellen .....	23
2.2.2.	Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten.....	23
2.2.3.	Oil-Red-Färbung .....	23
2.2.4.	Transfektion .....	25
2.2.5.	Vitalitätsassay .....	26
2.3.	In-vivo-Studien .....	27
2.3.1.	Rosiglitazon-Interventionsstudie .....	27
2.3.2.	GIP-Interventionsstudie .....	28
2.3.3.	Fettsäureintervention bei Mäusen .....	28
2.3.4.	MeSyBePo-Kohorte .....	29
2.3.4.1.	Rekrutierung .....	29
2.3.4.2.	Oraler Glucosetoleranztest (oGTT) .....	29
2.3.4.3.	Blutparameter.....	30
2.3.4.4.	Klassifizierungen.....	30
2.3.4.5.	Indizes des Glucosemetabolismus .....	31
2.3.4.6.	DNA-Isolierung und Genotypisierung .....	31
2.4.	Statistische Auswertung.....	32

<b>3. Resultate .....</b>	<b>33</b>
3.1. Charakterisierung des Promotorbereiches .....	33
3.1.1. Klonierung der Promotorfragmente .....	33
3.1.2. Luciferase-Assay zur Bestimmung der basalen Promotoraktivitäten in verschiedenen Zellsystemen .....	33
3.1.3. Sequenzstruktur um den Transkriptionsstart .....	35
3.1.4. Putative Bindungsstellen im distalen Promotorbereich der 11beta-HSD1.....	36
3.1.5. Position ausgewählter putativer C/EBP-Bindungsstellen im Promotorbereich.....	37
3.1.6. Nachweis der Bindung von ausgewählten Transkriptionsfaktoren an den Promotorbereich der 11beta-HSD1 mittels EMSA.....	37
3.1.6.1. Bindung von TBP an eine inverse atypische TATA-Box .....	37
3.1.6.2. Nachweis der Bindung von C/EBP-Proteinen an verschiedene Bereiche des 11beta-HSD1-Promotors.....	38
3.1.6.3. Transaktivierungspotential der C/EBP-Proteine auf die 11beta-HSD1- Promotorfragmente .....	39
3.1.7. Vergleich der Promotoraktivität mit dem mRNA-Level der 11beta-HSD1 .....	40
3.1.7.1. Vergleich der Promotoraktivität mit dem mRNA-Level der 11beta-HSD1 in undifferenzierten 3T3-L1 Zellen .....	40
3.1.7.2. Vergleich der Promotoraktivität mit dem mRNA-Level der 11beta-HSD1 in ausdifferenzierten 3T3-L1 Zellen .....	41
3.1.8. Charakterisierung mehrerer SNPs im Promotorbereich .....	43
3.2. Die Wirkung des PPAR-gamma Agonisten Rosiglitazon auf die 11beta-HSD1.....	45
3.2.1. Die Wirkung des PPARgamma-Agonist Rosiglitazon auf den Promotor .....	45
3.2.2. Änderung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität unter Rosiglitazon-Behandlung im subkutanen Fettgewebe .....	46
3.2.3. Veränderung des 11beta-HSD1-mRNA-Level unter Zusatz von Rosiglitazon während der Adipogenese .....	47
3.2.4. Vergleich der Expression wichtiger Marker während der Adipogenese unter Zusatz von Rosiglitazon .....	47
3.3. Wirkung des Inkretins GIP auf die 11beta-HSD1 .....	49
3.3.1. Veränderung der Promotoraktivität durch das Inkretin GIP.....	49
3.3.2. Effekte von GIP, Insulin sowie GIP in Kombination mit Insulin auf die Promotoraktivität.....	50
3.3.3. Effekte intrazellulär erhöhter cAMP-Spiegel durch IBMX auf die Promotoraktivität..	50
3.3.4. Änderung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität unter GIP-Infusion .....	52
3.3.4.1. Einfluss der GIP-Infusion auf Expression und Enzymaktivität.....	52
3.3.4.2. Korrelation der Enzymaktivität der 11beta-HSD1 mit Parametern des Körpers .....	53

3.4.	Nachweis der veränderten Bindung von C/EBP-Isoformen unter Rosiglitazon- und GIP- Stimulationen .....	54
3.5.	Effekte von Nahrungsfett.....	56
3.5.1.	Wirkung eines PPARalpha-Agonisten auf die 11beta-HSD1 .....	56
3.5.2.	Änderung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität in Mäusen unter Nahrungsfett-Diät .....	57
3.5.3.	Effekte der Nahrungsfette auf die Promotoraktivität.....	59
3.6.	SNP-Analyse in der MeSyBePo-Studie .....	61
3.6.1.	Promotor-SNP -2937 .....	61
3.6.2.	Promotor-SNP -2677 .....	65
3.6.3.	SNP in der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase.....	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
4.1.	Zellspezifische Regulation des 11beta-HSD1-Promotors.....	72
4.2.	Nachweis einer atypischen (non-canonical) TATA-Box downstream vom Transkriptionsstart .....	73
4.3.	Nachweis der Bindung von C/EBP-Proteinen sowie die Regulation der 11beta-HSD1 durch diese Proteine.....	75
4.4.	Vergleich der mRNA mit den Daten aus den Luciferase-Assays .....	76
4.5.	Die Wirkung des PPARgamma-Agonist Rosiglitazon auf die 11beta-HSD1 .....	80
4.6.	Die Wirkung des endogenen Inkretins GIP auf die 11beta-HSD1 .....	82
4.7.	Die Wirkung einer Fettdiät-Intervention in Mäusen auf die 11beta-HSD1 .....	84
4.8.	Bedeutung genetischer Variationen im Promotorbereich der 11beta-HSD1 sowie im Gen der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase.....	87
4.8.1.	SNP rs860185 an der Position -620 bp im 11beta-HSD1-Promotor.....	87
4.8.2.	Die SNPs rs846910 und rs3753519 im 11beta-HSD1-Promotor .....	88
4.8.3.	Der SNP rs6688832 im Gen der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase.....	89
4.9.	Zusammenfassung .....	90
	Literaturverzeichnis.....	92
	Internetquellen.....	102
	Lebenslauf .....	103
	Danksagung .....	104

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammenspiel der Einflussfaktoren Genetik und Lebensstil .....	2
Abbildung 2: Enzymaktivitäten der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen .....	4
Abbildung 3: GeneAtlas-Daten über die Expression der 11beta-HSD1 in humanen Geweben .....	5
Abbildung 4: Organisation von DNA, Histonen und Chromatin in einer 3D-Struktur .....	9
Abbildung 5: Darstellung beider Genvarianten der 11beta-HSD1 mit Exon-Intron-Struktur .....	16
Abbildung 6: Position der Oligonukleotide 1-8, der Primer F1a-F3 sowie putativer Bindungsstellen der C/EBP-Proteine und anderer ausgewählter putativer Bindungsstellen .....	21
Abbildung 7: Mikroskopische Darstellung der Oil-Red-Färbung .....	24
Abbildung 8: Transfektionseffizienz mit Lipofectamin2000 von HepG2-Zellen .....	25
Abbildung 9: Transfektionseffizienz mit LipofectaminLTX von undifferenzierten 3T3-L1-Zellen .....	25
Abbildung 10: Transfektionseffizienz von differenzierten 3T3-L1-Zellen mittels Elektroporation .....	26
Abbildung 11: Schematischer Ablauf des oralen Glucosetoleranztests (oGTT) .....	30
Abbildung 12: Schematische Darstellung der klonierten Promotorfragmente F1a-F7 .....	33
Abbildung 13: Relative basale Luciferase-Aktivitäten .....	34
Abbildung 14: Darstellung der Bindungsstellen im klonierten Promotorbereich für C/EBP-Proteine .	37
Abbildung 15: Nachweis der Bindung eines TATA-Binding Protein (TBP) .....	38
Abbildung 16: Nachweis der Bindung von C/EBP-Bindungsstellen .....	39
Abbildung 17: Auswirkungen der SNPs rs860185 (-620), rs3753519 (-2677) und rs846910 (-2937) im Promotorbereich auf die Promotoraktivität .....	43
Abbildung 18: Relativer Stimulationseffekt von Rosiglitazon auf die Promotorfragmente F1a-F7 .....	45
Abbildung 19: Enzymaktivitäten der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe von männlichen Probanden vor und nach Rosiglitazon-Behandlung .....	46
Abbildung 20: Veränderungen der Glucose- und Insulinspiegel während eines oralen Glucose Toleranztestes (oGTT) vor und nach der Rosiglitazontherapie in Männern .....	46
Abbildung 21: Relative Veränderung der mRNA-Expression der 11beta-HSD1 und GRalpha während der Adipogenese von 3T3-L1-Zellen .....	47
Abbildung 22: Relative Veränderung der Expression verschiedener Gene/Transkriptionsfaktoren während der Adipogenese von 3T3-L1-Zellen .....	48
Abbildung 23: Relative Wirkung des Inkretins GIP auf die Promotorfragmente F1a-F7 .....	49
Abbildung 24: Wirkung von GIP, Insulin sowie in Kombination auf die Promotorfragmente F1a-F7...	50
Abbildung 25: Relative Wirkung von IBMX auf die Promotorfragmente F1a-F7 .....	51
Abbildung 26: Relative Veränderung der Enzymaktivität und Expression der 11beta-HSD1 durch GIP <i>in-vivo</i> im subkutanen Fettgewebe .....	52
Abbildung 27: Korrelation zwischen der Enzymaktivität der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe mit den Parametern Gewicht, Hüft- und Taillenumfang .....	53
Abbildung 28: Korrelation zwischen dem Gewicht und der Änderung der Enzymaktivität .....	54
Abbildung 29: Nachweis der Bindung von C/EBP-Bindungsstellen unter GIP- und Rosiglitazon- Stimulation .....	54
Abbildung 30: Analyse der Bandenintensität des Proteinnachweises im EMSA aus Abbildung 29 .....	55
Abbildung 31: Relativer Stimulationseffekt des PPARalpha-Agonisten WY-14643 auf die Promotorfragmente F1a-F7 .....	56
Abbildung 32: Veränderung des Körpergewichtes sowie der prozentuale Gewichtsanteil der Organe vor und nach der Intervention mit Nahrungsölen bzw. -fette .....	57

Abbildung 33: Enzymaktivität der 11beta-HSD1 in Mäusen nach 7-tägiger Fütterung .....	58
Abbildung 34: Relativer Stimulationseffekt der Interventionsdiäten auf die Promotorfragmente F1a-F7 .....	60
Abbildung 35: Häufigkeiten der Allele des SNP rs846910 in Promotorbereich der 11beta-HSD1 an Position -2937.....	61
Abbildung 36: Morgendliche Cortisol-Spiegel stratifiziert nach Allelträger.....	64
Abbildung 37: Häufigkeitsverteilung der Allele des SNP rs3753519 in Promotorbereich der 11beta-HSD1 an Position -2677 .....	65
Abbildung 38: Häufigkeiten der Allele des SNP rs6688832 im Exonbereich der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase.....	68
Abbildung 39: Funktion des Transcriptional repressor CDP (Clox/Cut-Familie). .....	72
Abbildung 40: Mögliche Modelle (I-IV) der Bindung von Transkriptionsfaktoren an den 11beta-HSD1-Promotor .....	74
Abbildung 41: Veränderung der Bindungsmuster von Transkriptionsfaktoren an Plasmide oder höher-organisierter DNA .....	77
Abbildung 42: Beispiel für das Zusammenwirken von HMG-Proteinen und anderen Transkriptionsfaktoren.....	78
Abbildung 43: Direkte und indirekte Wirkung von Stimulationsfaktoren auf die Transkription .....	79
Abbildung 44: Regulationsmodell des 11beta-HSD1-Promotors. ....	90



## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zahl der übergewichtigen und adipösen Personen in der Europäischen Union (Auswahl) ...	1
Tabelle 2: Essentielle Elemente für die Transkription.....	10
Tabelle 3: Verwendete Primer für die Klonierung der Promotorfragmente F1a-F7 .....	16
Tabelle 4: Verwendete Mutagenese-Primer für die SNPs rs860185, rs3753519 und rs846910.....	17
Tabelle 5: Verwendete Lösungen für die Stimulationsexperimente.....	18
Tabelle 6: Verwendete Primer für die qRT-PCR .....	20
Tabelle 7: Anthropometrische und metabolische Daten der Teilnehmer der Rosiglitazon-Studie vor und nach der Intervention .....	27
Tabelle 8: Anthropometrische Daten der Probanden der GIP-Interventionsstudie .....	28
Tabelle 9: Diätzusammensetzung für die Mäuse der Fettsäureinterventionsstudie.....	28
Tabelle 10: Klassifizierung des Körpergewichtes nach dem BMI (WHO). .....	30
Tabelle 11: Klassifizierungskriterien für die Einteilung der Probanden von MeSyBePo entsprechend ihres individuellen Glucosestoffwechsels .....	31
Tabelle 12: Verwendete Sonden für die Genotypisierung .....	32
Tabelle 13: Analyse der putativen Promotorelemente im Promotorbereich der 11beta-HSD1. ....	35
Tabelle 14: Relative Luciferase-Aktivität der 11beta-HSD1-Promotorfragmente unter Kotransfektion der C/EBP-Proteine in HepG2-Zellen.....	40
Tabelle 15: Relative Luciferase-Aktivität der 11beta-HSD1-Promotorfragmente unter Kotransfektion der C/EBP-Proteine in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen.....	40
Tabelle 16: Vergleich der relativen 11beta-HSD1 mRNA-Menge mit den relativen Stimulationseffekten aus den Luciferase-Assays in undifferenzierten 3T3-L1 Zellen.....	41
Tabelle 17: Vergleich der relativen 11beta-HSD1 mRNA-Menge mit den relativen Stimulationseffekten aus den Luciferase-Assays in differenzierten 3T3-L1 Zellen.....	42
Tabelle 18: Mittelwert einzelner metabolischer Parameter in der MeSyBePo-Kohorte stratifiziert nach dem SNP rs846910.....	62
Tabelle 19: Assoziation des SNPs rs846910 mit BMI und Diabetes mellitus Typ 2.....	64
Tabelle 20: Mittelwert einzelner metabolischer Parameter in der MeSyBePo-Kohorte stratifiziert nach dem SNP rs3753519.....	66
Tabelle 21: Assoziation des SNPs rs3753519 für BMI und Diabetes Typ 2 .....	68
Tabelle 22: Mittelwert einzelner metabolischer Parameter in der MeSyBePo-Kohorte stratifiziert nach dem SNP rs6688832.....	69
Tabelle 23: Assoziation des SNPs rs6688832 für BMI und Diabetes Typ 2 .....	71

## KURZFASSUNG

Die 11beta-HSD1 reguliert intrazellulär die Cortisolkonzentration durch Regeneration von Cortison z.B. aus dem Blutkreislauf, zu Cortisol. Daher stellt diese ein wichtiges Element in der Glucocorticoid-vermittelten Genregulation dar. Die 11beta-HSD1 wird ubiquitär exprimiert, auf hohem Niveau besonders in Leber, Fettgewebe und glatten Muskelzellen. Insbesondere die Bedeutung der 11beta-HSD1 in Leber und Fettgewebe konnte mehrfach nachgewiesen werden. In der Leber führte eine erhöhte Aktivität aufgrund einer Überexpression in Mäusen zu einer verstärkten Gluconeogenese-rate. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression und erhöhte Enzymaktivität der 11beta-HSD1 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe assoziiert ist mit Fettleibigkeit, Insulin-resistenz und Dyslipidämie. Über die Regulation ist jedoch noch wenig bekannt.

Zur Untersuchung der Promotoraktivität wurde der Promotorbereich von -3034 bis + 188, vor und nach dem Translations- und Transkriptionsstart, der 11beta-HSD1 kloniert. 8 Promotorfragmente wurden mittels Dual-Luciferase-Assay in humanen HepG2-Zellen sowie undifferenzierten und differenzierten murinen 3T3-L1-Zellen untersucht. Anschließend wurde mittels nicht-radioaktiven EMSA die Bindung des TATA-Binding Proteins (TBP) sowie von CCAAT/Enhancer-Binding-Proteinen (C/EBP) an ausgewählte Promotorregionen analysiert. Nach der Charakterisierung des Promotors wurden spezifische endogene und exogene Regulatoren untersucht. Fettsäuren modifizieren die Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz. Ihre Wirkung wird u.a. PPARgamma-abhängig vermittelt und kann durch das Inkretin (Glucose-dependent insulintropic Peptide) GIP modifiziert werden. So wurden die Effekte von unterschiedlichen Fettsäuren, vom PPARgamma Agonisten Rosiglitazon sowie dem Inkretin GIP auf die Expression und Enzymaktivität der 11beta-HSD1 untersucht. Dies wurde *in-vitro*-, tierexperimentell und in humanen *in-vivo*-Studien realisiert. Zuletzt wurden 2 Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) im Promotorbereich der 11beta-HSD1 in der Zellkultur im Hinblick auf potentielle Funktionalität analysiert sowie die Assoziation mit Diabetes mellitus Typ 2 und Körpergewicht in der MeSyBePo-Kohorte bei rund 1.800 Personen untersucht.

Die Luciferase-Assays zeigten basal eine zell-spezifische Regulation der 11beta-HSD1, wobei in allen 3 untersuchten Zelltypen die Bindung eines Repressors nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte eine mögliche Bindung des TBPs sowie von C/EBP-Proteinen an verschiedene Positionen gezeigt werden. Die Transaktivierungsassays mit den C/EBP-Proteinen -alpha, -beta und -delta zeigten ebenfalls eine zellspezifische Regulation des 11beta-HSD1-Promotors. Die Aktivität und Expression der 11beta-HSD1 wurde durch die hier untersuchten endogenen und exogenen Faktoren spezifisch modifiziert, was sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* in unterschiedlichen Modellsystemen dargestellt werden konnte. Die Charakterisierung der MeSyBePo-Kohorte ergab keine direkten Assoziationen zwischen Polymorphismus und klinischem Phänotyp, jedoch Tendenzen für eine erhöhtes Körpergewicht und Typ 2 Diabetes mellitus in Abhängigkeit des Genotyps.

Der Promotor der 11beta-HSD1 konnte aufgrund der Daten aus den Luciferaseassays sowie den Daten aus den EMSA-Analysen näher charakterisiert werden. Dieser zeigt eine variable und zell-spezifische Regulation. Ein wichtiger Regulator stellen insbesondere in den HepG2-Zellen die C/EBP-Proteine -alpha, -beta und -delta dar. Aus den *in-vivo*-Studien ergab sich eine Regulation der 11beta-HSD1 durch endogene, exogene und pharmakologische Substanzen, die durch die Zellkulturversuche bestätigt und näher charakterisiert werden konnten.

## ABSTRACT

The enzyme 11beta-HSD1 regulates intracellular the cortisol concentration by regeneration of cortisone to cortisol. Hence, 11beta-HSD1 is an important factor in glucocorticoid-mediated gene expression. It is ubiquitously expressed, but high levels have been specifically described in liver, adipose tissue and smooth muscle cells. A pivotal role for 11beta-HSD1 has been demonstrated with respect to metabolism in liver and adipose tissue. Thus, a liver-specific overexpression results in an elevated gluconeogenesis and hepatic glucose output. Furthermore, a fat-specific overexpression was associated with obesity, insulin resistance and dyslipidemia. Despite these intriguing data, the regulation of the human 11beta-HSD1 gene is still in its infancies.

8 promoter fragments from -3034 to +188 of 11beta-HSD1-gene were cloned to analyze promoter activity. Dual-Luciferase-Assay was used in humane HepG2 cells and in undifferentiated and differentiated 3T3-L1 cells. Furthermore, the region close to the transcription start was studied with a non-radioactive EMSA for binding of TATA-binding protein (TBP) and CCAAT/enhancer-binding-protein (C/EBP). The role of the endogenous and exogenous regulators fatty acids, PPARgamma and the incretin (Glucose-dependent insulintropic Peptide) GIP was investigated *in-vitro* and *in-vivo*. Finally, the functional consequences of 2 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) within the promoter region were studied in cell culture and the MeSyBePo-cohorts for association with diabetes mellitus type 2 and body weight.

The Luciferase-assay revealed a cell-specific regulation of 11beta-HSD1 and a repressor, which was active in all 3 cell models. Accordingly, a cell-specific regulation was observed in transactivation-assays with C/EBP-proteins -alpha, -beta and -delta. The 11beta-HSD1 enzyme expression and activity was specifically modified by the here investigated endogenous and exogenous factors, which was demonstrated *in-vitro* but also *in-vivo* in various experimental settings. The characterisation of the MeSyBePo-cohorte revealed no association between genotype and clinical phenotype, although a trend for an increased body weight and diabetes mellitus type 2 was detected.

This work demonstrated a cell-specific regulation of the 11beta-HSD1 promoter. Furthermore, a binding site for TATA-binding proteins was detected in HepG2 and undifferentiated 3T3-L1 cells. A pivotal role in regulation of 11beta-HSD1 promoter activity was demonstrated for the C/EBP-proteins, especially in liver cells. The *in-vivo*-Studies revealed a regulation of enzyme expression and activity by endogenous, exogenous and pharmacological substances, which was confirmed and analyzed in more detail in cell culture experiments.

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Hiermit versichere ich, Janin Andres, dass diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Mitteln angefertigt wurde. Diese Arbeit wurde bisher noch an keiner deutschen Hochschule eingereicht.

Teile dieser Arbeit wurde von folgende Firma bzw. Stiftung finanziell unterstützt:

GlaxoKlineSmith GmbH

Eli-Lilly Internation Foundation

## PUBLIKATIONSLISTE

### *Veröffentlichungen:*

**Andres J**, Mai K, Mohlig M, Weickert MO, Bumke-Vogt C, Diederich S, Pfeiffer AF, Bahr V, Spranger J 2007 **Cell-type specific regulation of the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter**. Arch Physiol Biochem 113:110-115

Mai K, **Andres J**, Bobbert T, Maser-Gluth C, Mohlig M, Bahr V, Pfeiffer AF, Spranger J, Diederich S 2007 **Rosiglitazone decreases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in subcutaneous adipose tissue**. Clin Endocrinol (Oxf) 67:419-425

Mai K, Bobbert T, Kullmann V, **Andres J**, Rochlitz H, Osterhoff M, Weickert MO, Bahr V, Mohlig M, Pfeiffer AF, Diederich S, Spranger J 2006 **Free fatty acids increase androgen precursors in vivo**. J Clin Endocrinol Metab 91:1501-1507

Mai K, Bobbert T, Kullmann V, **Andres J**, Bahr V, Maser-Gluth C, Rochlitz H, Spranger J, Diederich S, Pfeiffer AF 2006 **No effect of free fatty acids on adrenocorticotropin and cortisol secretion in healthy young men**. Metabolism 55:1022-1028

### *Eingereichtes Manuskript:*

Mai K, Bobbert T, Reinecke F, **Andres J**, Maser-Gluth C, Wudy SA, Möhlig M, Weickert MO, Hartmann MF, Schulte HM, Diederich S, Pfeiffer A, Spranger J **Hyperlipidemia modifies circulating androgen levels in women: a randomized, controlled trial**. J Clin Endocrinol Metab, *under review*

### *Manuskript in Vorbereitung:*

Gögebakan Ö\*, **Andres J\***, Osterhoff MA, Mai K, Pfeiffer AFH, Spranger J **Glucose-dependent insulinotropic polypeptide acutely reduces gene-expression and activity of 11betaHSD-1 in human adipose tissue (\* geteilte Erst-Autorenschaft)**

*Posterbeiträge als Erstautor:*

DDG 2006 - Gewebsspezifische Regulierung der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1

DGE 2007 - Fatty acids regulate the promoter activity of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1

DDG 2007 - Aktivierung des Promotors der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 durch GIP, Vitamin D3 und PPARalpha-Agonist

- Einfluss zweier Promotorpolymorphismen im 11 $\beta$ HSD-1-Gen auf den Glukosespiegel

DDG 2008 - Gesättigte Fettsäuren steigern die Promotoraktivität und mRNA-Expression der 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1

ECE 2008 - Glucose-dependent insulinotropic polypeptide downregulates expression and enzyme activity of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase type 1

## ABKÜRZUNGLISTE

11beta-HSD1 / HSD11B1	11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1
AA	Arachidonsäure
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
BMI	Body mass index [kg/cm <sup>2</sup> ]
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclische Adenosin-3',5'-monophosphat
CoA	Coenzym A
bp	Basenpaare
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CREB	cAMP response element-binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EMSA	Elektrophorese-Mobilitätsshiftassay
ER	Estrogenrezeptor
GC	Glucocorticoid
GIP	Glucose-dependent insulinotropic Peptide
GLP-1	Glugagon-like Peptide 1
GR	Glucocorticoidrezeptor
HAT	Histon Acetyltransferase (Aktivität)
HDL	High density lipoprotein
HF-Diet	High fat diet / Hochfettdiät
HOMA <sub>IR</sub>	Homeostasis Model Assessment
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin
IFG	impaired fasting glucose/ gestörte Nüchtern-glucose
IGT	impaired glucose tolerance / Glucoseintoleranz
IL-6	Interleukin 6
ISI	Insulinsensitivitätsindex
K	Kontrolle
LA	Linolsäure
LDL	Low density lipoprotein
LXR	Liver X Receptor
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MW	Mittelwert
OA	Ölsäure
oGTT	oraler Glucose Toleranztest
PA	Palmitinsäure
PPAR	Peroxisome proliferation activator receptor
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus / Diabetes mellitus Typ 2
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNFalpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
vs.	Versus
WHR	Waist-to-Hip-Ratio /Taillen-Hüftumfang-Ratio
WT	Wildtyp





# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Das Metabolisches Syndrom

In den letzten 2 Jahrzehnten ist die Zahl der übergewichtigen (BMI $\geq$ 25) und adipösen (BMI $\geq$ 30) Menschen stark angestiegen und ein weiterer Zuwachs wird erwartet. Die WHO schätzt, dass die Zahl adipöser Menschen in der EU bis 2010 auf 150 Millionen ansteigen wird. Das werden durchschnittlich ca. 30% der Bevölkerung sein, wobei es jedoch starke regionale und geschlechtsspezifische Unterschiede geben wird (Tabelle 1) [1].

**Tabelle 1: Zahl der übergewichtigen und adipösen Personen in der Europäischen Union (Auswahl).**

Die jeweilige Altersspanne und das Jahr der Datenerhebung können differieren. Aufgrund der begrenzten Datenverfügbarkeit sind die Daten nicht standardisiert. So können die Selbstauskünfte die tatsächliche Prävalenz unterschätzen. Quelle: © International Association for the Study of Obesity, London – June 2007.

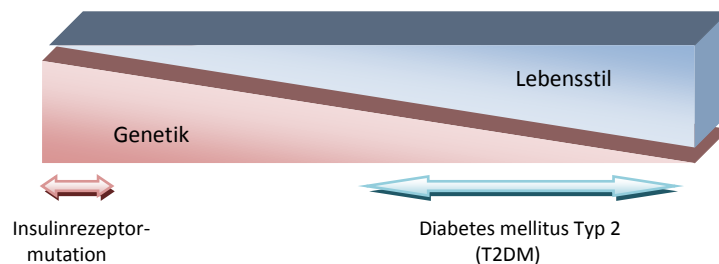
Land in der EU (Auswahl)	Jahr der Daten- erhebung	Männer			Frauen		
		%-über- gewichtig BMI 25-29.9	%-adipös BMI $\geq$ 30	%-Anteil mit BMI $\geq$ 25	%-über- gewichtig BMI 25-29.9	%-adipös BMI $\geq$ 30	%-Anteil mit BMI $\geq$ 25
Österreich	2005/6	42.3	23.3	65.6	32.4	20.8	53.2
Zypern	1999-2000	46	26.6	72.6	34.3	23.7	58
Tschechische Republik	1997/8	48.5	24.7	73.2	31.4	26.2	57.6
Dänemark (Selbstauskunft)	2001	40.1	11.8	51.9	26.9	12.5	39.4
England	2005	43.4	23.1	66.5	32.1	24.3	56.4
Estland (Selbstauskunft)	2004	32	13.7	45.7	28.4	14.4	42.8
Finnland (Selbstauskunft)	2005	44.8	14.9	59.7	26.7	13.5	40.2
Frankreich (Selbstauskunft)	2006	35.6	11.8	47.4	23.3	13	36.3
Deutschland (Selbstauskunft)	2002/3	52.9	22.5	75.4	35.6	23.3	58.9
Griechenland (ATTICA)	2001/2	53	20	73	31	15	46
Italien	2003	42.1	9.3	51.4	25.8	8.7	34.5
Litauen (Selbstauskunft)	2002	41.2	16.4	57.6	26.6	15.8	42.4
Luxemburg		45.6	15.3	60.9	30.7	13.9	44.6
Niederlande	1998-2002	43.5	10.4	53.9	28.5	10.1	38.6
Polen	2000	41	15.4	56.4	28.7	18.9	47.6
Portugal	2003/4	44.1	14.5	58.6	31.9	14.6	46.5
Rumänien (Selbstauskunft)	2000	38.1	7.7	45.8	28.6	9.5	38.1
Slowakei	1992-99	49.7	19.3	69	32.1	18.9	51
Slowenien (Selbstauskunft)	2001	50	16.5	66.5	30.9	13.8	44.7
Spanien	1990-2000	45	13.4	58.4	32.2	15.8	48
Schweden (Göteborg)	2002	43.5	14.8	58.3	26.6	11	37.6

Damit verbunden ist der weltweite Anstieg des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM). Von den betroffenen Patienten sind ca. 90% dieser Personen übergewichtig bzw. adipös. In gut entwickelten Ländern in Europa, Nordamerika und dem Nahen Osten steigt die Zahl der erkrankten Personen zudem rapide an. Besonders Kinder sind davon betroffen. Neben einer frühzeitigen Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus begünstigen Übergewicht und Adipositas eine Reihe von anderen Erkrankungen,

hierunter zählen u.a. Dyslipidämie und Bluthochdruck sowie ein erhöhtes Risiko für Herzerkrankungen. Das gemeinsame Auftreten dieser Erkrankungen wurde unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst.

Die Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) erfolgt über einen langen Zeitraum vermutlich mit einer kontinuierlichen Verschlechterung des Glukosestoffwechsels. Eine sogenannte gestörte Nüchtern-glucose (IFG-impaired fasting glucose) oder eine Glucoseintoleranz (IGT-impaired glucose tolerance) sind mit einem erhöhten Risiko für einen nachfolgenden Diabetes verbunden[2].

Bei der gestörten Nüchtern-glucose haben die Patienten einen erhöhten Blutzuckerspiegel nach dem nächtlichen Fasten, zeigen aber noch keine weiteren Symptome eines T2DM und haben einen normalen oralen Glucose-Toleranztest (oGTT). Bei einer gestörten Glucosetoleranz zeigen die Patienten unter Zuckerbelastung im oGTT nach 2 Stunden erhöhte Blutzuckerspiegel, jedoch keine weiteren Symptome des T2DM oder eine erhöhte Nüchtern-glucose. In dieser Phase kann der T2DM und ein erhöhtes Risiko für weitere metabolische Erkrankungen durch eine Lebensstil-Intervention verringert und/oder gar vermieden werden. Begleitet werden IFG und IGT von einer Insulinresistenz. Dies bedeutet, dass die Zellen des Fettgewebes, des Muskels oder der Leber weniger empfindlich gegenüber Insulin sind und vermehrt Insulin aus dem Pankreas ausgeschüttet werden muss, um die Glucose in die Zellen zu bringen. Die Ursachen dafür sind vielfältig, dazu gezählt werden können genetische (z.B. Mutationen des Insulinrezeptors), hormonelle (z.B. Cushing Syndrom, Hydrocortison-Therapie) oder metabolische (z.B. kohlenhydrat- und/oder fettreiche Ernährung) Ursachen. Letztendlich kommt es in Kombination mit einer gestörten Funktion der beta-Zellen im Pankreas zur Manifestation des T2DM.



**Abbildung 1:** Zusammenspiel der Einflussfaktoren Genetik und Lebensstil, die die Ursachen für die Entstehung von Fettleibigkeit und Diabetes mellitus Typ 2 sind.

Die Ursachen von Fettleibigkeit und Diabetes sind vielfältig und meist nicht auf eine Ursache zu begrenzen. So stellen monogenetische Formen eine eher sehr seltene Ursache dar. Vielmehr sind Gründe in Umweltfaktoren wie persönlicher Lebensstil, Bewegungsmangel und übermäßige Nahrungsaufnahme zu suchen. Dabei kann eine genetische Komponente den Verlauf und die Stärke der Erkrankung beeinflussen. Infolge dessen kann es zu Veränderungen im Stoffwechsel und im Hormonhaushalt kommen, die dann weitere Ursachen und Folgen haben.

## 1.2. 11beta-Hydroxysteroid und 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenasen

### 1.2.1. Cortisol

Cortisol zählt zu den Glucocorticoiden (GC), einer Klasse von Steroidhormonen, die über die Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse in der Nebennierenrinde gebildet werden. Hier wird es über verschiedene Zwischenstufen aus Cholesterolester synthetisiert und in den Blutkreislauf abgegeben. Es wirkt in allen peripheren Organen und aktiviert im Gehirn den Feedback-Kreislauf. Cortisol zeigt einen zirkadianen Rhythmus mit einem morgendlichen Peak sowohl im Serum als auch in der Feedback-Regulation des Hirns [3]. Die Cortisolwerte im Serum liegen normalerweise am Morgen bei 165-690 nmol/l (Cortisol total), wobei es im Blutkreislauf hauptsächlich am Cortisol-Binding-Globulin (CBG) (~95%) gebunden ist. Nur ein Bruchteil im Bereich von 5-23 nmol/l liegt als freies ungebundenes Cortisol vor. Die metabolisch inaktive Form des Cortisols ist das Cortison, welches hauptsächlich ungebunden im Blut transportiert wird und in etwa 2-3-fach höherer Konzentration (ca. 20 -40 nmol/l) als das freie Cortisol vorliegt.

Cortisol ist als Stresshormon bekannt, das unter Bedingungen von „Fliehen und Kämpfen“, in größeren Mengen freigesetzt wird. Als solches beeinflusst es eine Vielzahl von Signalwegen und Schlüsselenzymen im Metabolismus. So wirkt Cortisol insbesondere auf den Metabolismus von Kohlenhydraten und Fetten in Muskel, Leber und Fettzellen ein. Unter den sogenannten Stressbedingungen dient es zur Freisetzung von schnell verfügbarer Energie und zur Erhöhung der Aufmerksamkeit durch erhöhten Blutdruck und Herzschlag. Die Bereitstellung der Energie erfolgt einerseits durch Freisetzung von freien Fettsäuren durch Lipolyse in den Fettzellen oder durch Hydrolyse von Proteinen in den Muskelzellen. Im weiteren Verlauf wird unter Stressbedingungen und Hypoglykämie die Gluconeogenese in der Leber aktiviert und die Insulinfreisetzung gehemmt [4].

Ein anderer Aspekt im Hinblick auf die metabolische Wirkung von Cortisol ist die Adipogenese, das heißt die Ausdifferenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten. So hat Cortisol eine entscheidende Bedeutung bei der Adipogenese in humanen Präadipozyten und der murinen Fettzelllinie 3T3-L1, welches die Adipogenese startet und andere wichtige adipogene Transkripte indiziert [5-7].

Somit übernimmt Cortisol - abhängig von Energiestatus bzw. Nahrungsaufnahme - unterschiedliche Funktionen im Körper und Metabolismus.

### 1.2.2. Hypercortisolismus

Das Cushing- Syndrom – auch als Hypercortisolismus bezeichnet - ist eine endokrine Erkrankung, die durch hohe Cortisolspiegel im Blut gekennzeichnet ist. Die Ursachen können ein Hypophysenadenom (erhöhte ACTH-Produktion und Stimulation der Cortisolproduktion), Veränderungen der Nebennierenrinde (erhöhte Cortisolproduktion), endokrin aktive Tumore (Produktion von ACTH) oder exogene Verabreichung (Therapien mit ACTH oder Hydrocortison/Cortisol) sein.

Die Symptome des Cushing-Syndroms sind u.a. schnelle Gewichtszunahme (insbesondere im viszeralen Bereich), rundes rotes Gesicht und proximale Muskelschwäche. Bei Frauen tritt zudem eine vermehrte Gesichtsbehaarung (Hirsutismus) auf. Des Weiteren leiden die Patienten unter

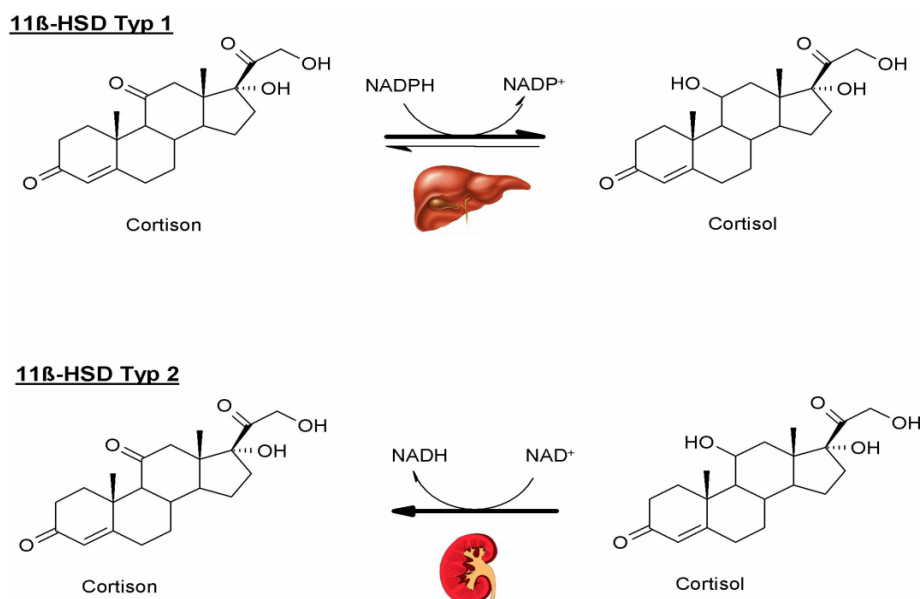
Schlafstörungen, verringerter Libido und Fertilität. Der Hypercortisolismus verursacht bei chronischer Erkrankung Bluthochdruck, Insulinresistenz sowie T2DM und Osteoporose.

Da die Symptomatik des Cushing-Syndrom sehr dem Metabolischen Syndrom ähnelt – ausgenommen den erhöhten Cortisol-Serum-Spiegeln – wurde das Metabolische Syndrom auch teilweise als „Cushing disease of omentum“ bezeichnet [8]. So konnte Fettleibigkeit und erhöhter BMI mit zellulären Cortisol-Aktivität assoziiert werden [9-11]. Im Vergleich zu Cushing-Patienten hatten übergewichtige Patienten in einer Arbeit eine 13-fach erhöhte Expression des Enzyms 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (11beta-HSD1), welches das inaktive Cortison in Cortisol umwandelt, (siehe 1.2.3) im omentalen Fettgewebe [12].

### 1.2.3. 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenasen (11beta-HSD)

In der Peripherie kann Cortisol, aber auch Cortison aktiv wirken, wobei Cortison eigentlich metabolisch nicht wirksam ist. Jedoch existiert in den Zielzellen für Glucocorticoide und Mineralocorticoide die 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11beta-HSD), Enzyme der Oxoreduktase-Klasse (EC-Klasse: 1.1.1.), die die Reaktion zwischen Cortison und Cortisol katalysieren und dadurch der Aktivitätsregulation des Hormons dienen. Es gibt 2 Subtypen, die die entsprechenden Reaktionen katalysieren (Abbildung 2).

Die 11beta-HSD Typ 2 inaktiviert Cortisol in Zellen und Geweben, in denen der Mineralocorticoid Rezeptor (MR) lokalisiert ist. Im nanomolaren Bereich bindet dieser das Mineralocorticoid Aldosteron, welches z.B. in der Niere die Natrium-Retention und somit den Blutdruck reguliert. Jedoch kann auch Cortisol, welches in über 100-fach höherer Konzentration als Aldosteron in der Zelle vorliegt, an den Rezeptor binden. Daher gilt die 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2, die hauptsächlich in Niere und Darm exprimiert ist, als „Schutzenzym“ des MR, indem sie das Cortisol mit Hilfe des Kofaktors  $NAD^+$  inaktiviert.



**Abbildung 2:** Enzymaktivitäten der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Die 11beta-HSD1 (obere Abbildung) katalysiert die Oxoreduktase-Richtung mit Hilfe des Kofaktors NADPH. *Ex-vivo* ist die 11beta-HSD1 bi-direktional. Die 11beta-HSD2 inaktiviert Cortisol mit dem Kofaktor  $NAD^+$  zu Cortison z.B. in der Niere zum Schutz des Mineralocorticoid-Rezeptors.



aktivität assoziiert [9,10,19]. Eine weitere Abhängigkeit der Enzymaktivität zeigt die 11beta-HSD1 dabei auch von der H6PD. Durch verschiedene Experimente [16,20,21] bzw. durch Patienten mit Mutation in der H6PD [22] zeigte sich ein wesentlicher Einfluss der H6PD auf die Enzymaktivität sowie auch die Enzymrichtung der 11beta-HSD1.

Die Expression der 11beta-HSD1 im Fettgewebe unterscheidet sich deutlich in den verschiedenen Fettdepots. Im viszeralen Fettgewebe findet man die höchste Expression im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe [11]. Sowohl bei Kinder als auch Erwachsenen konnte dieses Expressionsmuster nachgewiesen werden und welches mit dem Alter korrelierte [23]. Fettleibigkeit und BMI konnten mit erhöhtem 11beta-HSD1-mRNA-Spiegel und erhöhter 11beta-HSD1-Aktivität ebenso assoziiert werden [9-11]. Im Vergleich zu Cushing-Patienten hatten übergewichtige Patienten eine 13-fach erhöhte 11beta-HSD1-Expression im omentalen Fettgewebe [12]. Es konnte zudem beobachtet werden, dass der Unterschied der 11beta-HSD1-Expression zwischen subkutanem und viszeralem Fettgewebe bei Fettleibigkeit verloren ging, dass heißt, es kam auch zu einer deutlichen Erhöhung der Expression im subkutanen Fett.

#### *1.2.4. Tierexperimentelle Modelle der 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1*

Die Bedeutung der 11beta-HSD1 konnte durch verschiedene Maus-Modelle unterstrichen werden. Hierbei wurden Daten von verschiedenen genetischen Mäusestämmen erhoben sowie transgene und knock-out Mäuse hergestellt. Bei transgenen Mäusen wird eine Überexpression des Gens hergestellt, während bei knock-out Mäusen das Zielgen teilweise (heterozygot (+/-)) oder vollständig (homozygot (-/-)) ausgeschaltet wird.

##### *1.2.4.1. Adipöse Mausmodelle und die 11beta-HSD1-Expression*

Besondere Bedeutung in der Diabetes- und Adipositas-Forschung haben die Mäusestämme ob/ob, db/db und C57BL/6J. Der letztgenannte Mausstamm ist ein weit verbreiteter Inzucht-Stamm zur Herstellung von transgenen Mäusen und eignet sich zur Untersuchung Diät-induzierter Adipositas. Die schwarzen C57BL/6J-Mäuse entwickeln unter fettreicher-Diät (High fat diet – HF) Übergewicht, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie mit einem resultierenden Diabetes mellitus Typ 2.

Die beiden anderen Mäusestämme, ob/ob und db/db, sind Modelle für monogenetische Formen der Adipositas. Ob/ob-Mäuse haben Defizite in der Leptinproduktion in den Fettzellen durch einen Gendefekt im ob-Gen, das später als Leptin-Gen identifiziert werden konnte. Das Leptindefizit führt zur vermehrten Nahrungsaufnahme und zur Verfettung der Maus. Ein weiteres Modell sind die Leptinrezeptor-defizienten Mäuse des Stammes db/db, dessen Gen für den Leptinrezeptor defekt ist, was zur fehlenden Regulation der Nahrungsaufnahme durch den Hypothalamus führt. Die Mäuse nehmen unkontrolliert Nahrung zu sich, was die Entstehung von Adipositas und Diabetes zur Folge hat.

Bei db/db-Mäusen zeigte sich eine erhöhte hepatische Expression der 11beta-HSD1 in der Leber [24,25] mit erhöhten Insulin-, Glucose- sowie Corticosteron-Spiegel im Blut. In primären murinen Hepatozyten war zudem eine dosis-abhängige Steigerung der 11beta-HSD1-mRNA durch Glucose und Corticosterone zu sehen [25]. Diese Effekte konnten durch selektive Inhibition der 11beta-HSD1 oder

des Glucocorticoid-Rezeptors umgekehrt werden, d.h. es kam zur Senkung der Glucose- und Insulin-Spiegel im Blut [25-29]. Der Grad der verbesserten Glucosetoleranz war dabei abhängig vom Maus-Modell. Die selektive Inhibition der 11beta-HSD1 senkte bei den übergewichtigen Maus-Modellen (ob/ob, db/db) die Blut-Glucose-Spiegel deutlich. Dieser Effekt war jedoch nicht bei gesunden Mäusen zu sehen [27]. Weiterhin waren eine verringerte Nahrungsaufnahme und ein Verlust von viszeralem Fett zu beobachten [28]. Das Expressionslevel der 11beta-HSD1 in den verschiedenen Geweben war dabei abhängig vom genetischen Modell und unterschied sich stark von Modell zu Modell [27]. Eine erhöhte Expression der 11beta-HSD1 in der Leber führte zu einer Fettakkumulation in der Leber sowie zu einem verschlechterten Lipidprofil mit vermehrten freien Fettsäuren im Blut.

#### *1.2.4.2. 11beta-HSD1-Knock-out Tiere*

Das Fehlen der 11beta-HSD1 hatte keine letale Wirkung auf die Mäuse, ebenso waren sie normal fertil. Neben Auffälligkeiten in Leber und Fettgewebe, zeigten die Mäuse eine Hyperplasie der Nebenniere und erhöhte Corticosteron-Spiegel im Blut [30,31]. Abhängig von der verabreichten Diät zeigten sich auch Veränderungen insbesondere im Lipidprofil des Blutes. Hier war unter einer HF-Diät eine deutliche Verbesserung mit weniger freien Fettsäuren im Blut zu beobachten [32,33]. Dies konnte auf Veränderungen in der Expression von Lipidstoffwechsel-relevanten Enzymen wie SREBP und PPARalpha zurückgeführt werden [31,32]. Es zeigte sich jedoch eine Akkumulation von Fetten in der Leber bei gefasteten Tieren [32].

Neben einem verbesserten Lipidprofil hatten die 11beta-HSD1 (-/-)-Mäuse einen niedrigeren Nüchtern-Glucosespiegel und eine erhöhte hepatische Insulinsensitivität im Vergleich zu den Kontrollmäusen [31,32]. Neben der verbesserten Insulinsensitivität in der Leber zeigten isolierte Fettzellen aus knock-out Mäusen ebenfalls eine erhöhte Insulinsensitivität. Weiterhin kam es zu einer Fettverteilung unter HF-Diät zum günstigeren, nicht-viszeralem Fettgewebe [33].

#### *1.2.4.3. Überexpression der 11beta-HSD1 in transgenen Mäusen*

Es existieren 2 verschiedene transgene Mäusetypen, die die 11beta-HSD1 überexprimieren. Zum einen wurden Mäuse mit einer Überexpression in der Leber und zum anderen im Fettgewebe generiert.

Die Überexpression der 11beta-HSD1 im Fettgewebe der Maus wurde unter Kontrolle des aP2-Promotors hergestellt [34]. Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4/aP2) ist ein Protein, das ausschließlich im Fettgewebe exprimiert wird. Unter Kontrolle des Promotors des FABP4/aP2 erhöhte sich die 11beta-HSD1-Expression deutlich und war im subkutanen Fettgewebe vergleichbar stark wie in ob/ob-Mäusen und deutlich erhöht in epididymalen Fettgewebe. Unter einer HF-Diät nahmen die transgenen Mäuse überdurchschnittlich an Gewicht - insbesondere an Fettgewebe - zu. Dabei erhöhte sich aber nicht die Zellzahl als solches, sondern die Fettgewebszunahme war auf Hypertrophie der Fettzelle zurückzuführen. Darüberhinaus zeigten die Mäuse erhöhte freien Fettsäuren (FFA)- und Glucose-Spiegel im Blut.

Die Überexpression der 11beta-HSD1 in der Leber führte zur Leberverfettung mit erhöhtem Fettsäure-Spiegel im Blut [35]. Es kam aber zu keinen Veränderungen im Bezug auf das Gewicht und

den Corticosteron-Spiegel im Blut. Im Verlauf der Zeit entwickelten die Mäuse eine Dyslipidämie sowie eine moderate Insulinresistenz. Weiterhin litten die Mäuse unter Bluthochdruck, welcher auf die erhöhte Expression des GC-induzierten Renin-Angiotensin-Systems zurückzuführen war.

### 1.3. Regulation der Genexpression

Unter dem Promotor eines Gens wird allgemein die Struktur auf dem Genom bezeichnet, die funktionellen Genen/Transkripten im 5'-Bereich vorgeschaltet ist. Dieser Bereich reguliert durch Bindung diverser Faktoren die Aktivität des RNA-Polymerase II-Komplexes (POL II) und somit die mRNA- und Proteinmenge. Ebenso wie beim alternativen Splicen von Transkripten kann es für ein Gen mehrere Promotorbereiche geben.

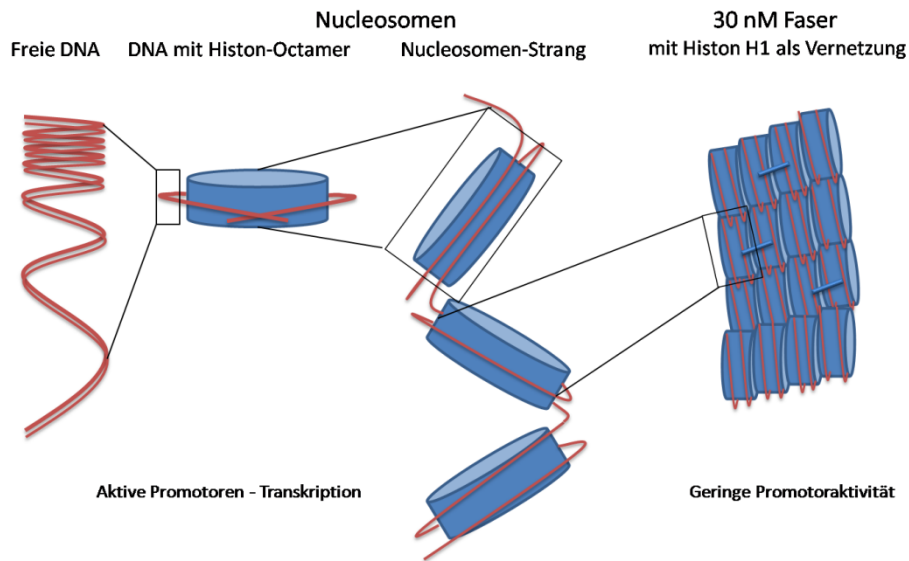
Im Allgemeinen gibt es mehrere „Grundelemente“, die für die Rekrutierung und Bindung der Elemente des POL II benötigt werden. Die Bindung und Zusammensetzung des POL II wird dabei durch die Bindung des Transkriptionsfaktor IID (TFIID) – mit dem TATA-binding protein (TBP) als Untereinheit – an die DNA initiiert. Dabei „wandert“ TBP oder TFIID an der DNA entlang und erkennt spezifische Sequenzen. Die größtmögliche Erkennung erfolgt an der TATA-Box durch die Untereinheit TBP. Da aber nur ein Bruchteil der Gene eine TATA-Box besitzen, kann TFIID auch andere Strukturen erkennen und die Initiation des POLII-Komplexes einleiten. Zu diesen „Grund-Elementen“ im Bereich von +100 bis -100 bp zählen die TATA-Box, das Initiator-Element (Inr) sowie das Downstream Core Promotor Element (DPE) [36,37]. Diese sind jedoch nicht alle zwingend notwendig für die Promotorregulation. Daher gibt es eine Vielzahl von Regulationsmechanismen, die ein Fein- und Grobtuning der Genregulation zulassen.

Man kann grundsätzlich folgende Subtypen von Promotoren unterscheiden:

**(A) – TATA + INR, (B) – nur TATA, (C) – nur INR, (D) – keine TATA oder INR.**

Einen weiteren Einfluss auf die Promotoraktivität von Genen haben die Chromatinstruktur und die Modifikation der Histon-Proteine, die von der DNA umwickelt sind. So ist die DNA durch die Histon-Proteine schließlich in einer höheren Struktur dem Chromatin organisiert. Diese – sowohl Chromatin als auch die DNA um die Histone - sind unterschiedlich stark kondensiert, wodurch die DNA und die Bindungsstellen für die RNA-Polymerase II oder für die Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichem Ausmaß für die Transkription freiliegen. Dieser Kondensationsgrad kann durch Histonmodifikationen für die Genexpression u.a. durch Acetylierung verändert werden. So führt eine Acetylierung der Histone an unterschiedlichen Positionen i.d.R. zu einer Erhöhung der Genexpression, wohingegen i.d.R. Methylierung bzw. Deacetylierung die Aktivität der Genexpression senken [38-40].





**Abbildung 4:** Organisation von DNA, Histonen und Chromatin in einer 3D-Struktur.

Im weiteren Upstream (5'-Richtung)- bzw. Downstream (3'-Richtung)-Bereich können sogenannte Transkriptionsfaktoren binden, die mit dem POL II interagieren und beeinflussen können. Das sind Proteine, die direkt an die DNA an sogenannte „response elements“ oder allgemein „binding sites“ binden. Diese Faktoren treten unabhängig von der Entfernung mit dem RNA-Polymerase II-Komplex in Wechselwirkung und beeinflussen diesen positiv (Enhancer) oder negativ (Silencer oder Repressor). Zusätzlich zur Bindung der Transkriptionsfaktoren treten andere Proteine mit dem POL II-Komplex und den Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung. Je nachdem, ob diese positiven oder negativen Einfluss haben, werden diese Faktoren Koaktivatoren bzw. –repressoren genannt. Ko-repressoren können an die Proteine des POL II oder an die Transkriptionsfaktoren binden. Als Folge dessen kann die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit dem POL II bzw. Bindungen essentieller Faktoren des POL II-Komplexes verhindert oder der Kontakt gestört werden. Koaktivatoren hingegen können den Kontakt zwischen den Transkriptionsfaktoren und dem POL II-Komplex vermitteln und stabilisieren. Weiterhin können diese Faktoren andere DNA-Bindungsproteine aktivieren.

Es besteht die Möglichkeit einer groben Einteilung der Transkriptionsfaktoren entsprechend ihrer Struktur der DNA-Bindedomäne, welche direkt mit der DNA interagiert (Tabelle 2). Teilweise ist die Struktur mit Bioprozessen verbunden. So sind z.B. Transkriptionsfaktoren der Homeobox-Klasse an der Kontrolle der Genexpression während der Entwicklung und Morphogenese von Organen beteiligt.

**Tabelle 2: Essentielle Elemente für die Transkription sind zum einem der RNA-Polymerase II-Komplex und zum anderen Transkriptionsfaktoren.**

Dargestellt sind die Untereinheiten TFIIA-H, die zum RNA-Polymerase II-Komplex gehören. Zudem dargestellt sind diverse Klassen von Transkriptionsfaktoren, die nach der DNA-Bindungsdomäne eingeteilt sind, sowie eine Auswahl von Vertretern.

<b>RNA-Polymerase II – Komplex (POL II)</b>	
TFIIA (Stabilisierung der TFIID-Bindung, Entfernung von neg. Faktoren), TFIIB (Bindung der RNA-Polymerase II), TFIID (TBP-Erkennung TATA-Box, Bindung von TAF) oder (TAF1-12 – Bindung TATA-freier Promotoren mit regulatorischer Funktion), TFIIE (Heranführen von TFIIF), TFIIF (Zusammenführung und Stabilisierung), TFIIH (DNA-Helikase)	
<b>Transkriptionsfaktoren</b>	
<b>Basic-helix-loop-helix</b>	AhR - BMAL-CLOCK - E2F - HIF - Myc - Pax (PAX3, PAX6) – u.v.m.
<b>Basic leucine zipper</b>	C/EBP - CREB - AP-1 (c-Fos, c-Jun) - Activating transcription factor
<b>Basic helix-loop-helix leucine zipper</b>	MITF – SREBP
<b>Homeobox</b>	Hox-Proteine – Pax-Proteine – LIM-Homeobox - POU domain (PIT-1, BRN-3, Octamer transcription factor: 2, 4)
<b>Nuclear receptors</b>	<i>subfamily 1</i> (Thyroid hormone, CAR, FXR, LXR, PPAR, PXR, RAR, ROR, Rev-Erba, VDR) <i>subfamily 2</i> (COUP-TF, Ear-2, HNF4, PNR, RXR) <i>subfamily 3</i> -Steroid hormone (ER, ER-ähnlich, GR, MR, Progesterone, AR) <i>subfamily 4</i> (NGFIB, NURR1, NOR1) <i>subfamily 5</i> (SF1, LRH-1) <i>subfamily 6</i> (GCNF) <i>subfamily 0</i> (DAX1, SHP) Orphan receptors
<b>Winged-helix transcription factors</b>	FOX proteins (FOXP2, FOXP3)
<b>Zinc finger/protein</b>	Gli1 - Gli2 - Gli3 - KIF (Sp1) - Zbtb7 - Zif268
<b>Other families</b>	CAP - CBF (RUNX1, RUNX2) - GATA - NANOG - NF-kB - Rho/Sigma - R-SMAD - Sox2 - STAT (1, 2, 3, 4, 5, 6)

## 1.4. Wichtige Transkriptionsfaktoren in Bezug auf die 11beta-HSD1

### 1.4.1. CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs)

Mitglieder dieser Proteinfamilie sind Transkriptionsfaktoren, welche an die CCAAT-Box binden können. Es sind derzeit 6 Proteine mit teils mehreren Subtypen bekannt. Alle Subtypen haben eine Übereinstimmung auf Proteinebene von über 90% und unterscheiden sich im C-terminalen Bereich durch den basischen Leucin-Zipper, welcher mit der DNA interagiert. C/EBP-Proteine binden als Homo- oder Heterodimer an das symmetrische Bindungsmotiv. Als besondere Ausnahme gilt C/EBPzeta auch CHOP genannt. Heterodimere von C/EBPs und C/EBPzeta verhindern die Bindung des Dimers an die DNA. C/EBPzeta kann aber auch als Aktivator in Abhängigkeit vom zellulären Status agieren. Ebenso kann ein Subtyp von C/EBPbeta dominant-negativ als Heterodimer wirken [41,42].

C/EBPalpha wird am stärksten im Fettgewebe, Leber, Lunge und in der Hypophyse exprimiert, C/EBPbeta in Leber, Fettgewebe, Milz und Niere und C/EBPdelta in Fettgewebe sowie Lunge.

In der Adipogenese von Präadipozyten zu Adipozyten nehmen C/EBPs neben PPARGamma eine Schlüsselrolle ein. C/EBPbeta und C/EBPdelta werden in der frühen Phase durch erhöhte cAMP-Spiegel und Glucocorticoide induziert [7,43]. Es folgt die Induktion des C/EBPalpha-Gens u.a. durch die beiden anderen C/EBP-Proteine [44]. C/EBPalpha unterstützt dabei die Induktion des PPARGamma-Gens [44,45]. Die Bedeutung von C/EBPalpha wurde durch Antisense-Zellkulturversuche

und Knock-out-Mäuse unterstrichen. So starben die Knock-out Mäuse bald nach der Geburt infolge von Hypoglykämie und hatten nur sehr wenig Fettgewebe [46].

#### *1.4.2. cAMP response element-binding protein (CREB)*

CREB – cAMP response element-binding protein – wird durch die cAMP-Kaskade aktiviert und in den Kern translokalisiert. cAMP gehört zu den Second Messenger, die die Signale von Zellmembranrezeptoren in den Kern weiterleitet. Durch die Bindung an das CRE (cAMP response element) werden Gene aktiviert oder teilweise reprimiert (trunkierte Isoformen) [47]. Das Signal wird durch die Hydrolyse von cAMP durch eine Phosphodiesterase (PDE) zu 5'AMP terminiert. In den Zellen kann das cAMP-Signal durch die Inhibition der PDE mittels IBMX (Isobutylmethylxanthin) erhöht werden.

CREB gehört zur Familie der basischen leucin zipper-Transkriptionsfaktoren, zu der auch der Faktor c-Jun (Teil des Activator Protein AP-1) gehört. Derzeit sind 4 CREB-Proteine bekannt - CREB1, CREB2 auch ATF2 genannt, CREB3, CREB5. Aktiviert werden CREBs durch cAMP-responsive Signalwege, aber auch andere Signalwege können zur Phosphorylierung des CREBs führen [48].

CREB1 wird durch cAMP und u.a. durch die Protein Kinase A (PKA) aktiviert, die CREB an der Position Ser-133 phosphoryliert. Mit dieser Region interagiert eine Vielzahl von Kofaktoren, meist Koaktivatoren wie CBP (CREB-binding protein)/p300, [49,50]. ATF2 (CREB2) gehört ebenfalls zur CREB-Familie und besitzt im Gegensatz zu CREB1 aber eine intrinsische Histon-Acetylierung-Aktivität (HAT) [48,51]. CREB1 verfügt nur über Koaktivatoren, z.B. CBP über eine HAT-Aktivität. ATF2 kann auch mit c-Jun ein Heterodimer bilden und an die DNA binden [48].

#### *1.4.3. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)*

Diese Nuklearrezeptorfamilie kontrolliert die Expression von Genen, die eine wichtige Rolle im Lipid- und Glucose-Metabolismus spielen. Zurzeit sind 3 Isoformen bekannt – PPARalpha, PPARbeta/delta und PPARgamma. Vom PPARgamma existieren 3 Subtypen – PPARgamma1, PPARgamma2 und PPARgamma3 mit 3 Promotoren, wobei PPARgamma2 nur im Fettgewebe exprimiert wird, die anderen hingegen ubiquitär. PPARgamma2 unterscheidet sich von PPARgamma1 durch 30 zusätzliche Aminosäuren im Exon 1. PPARs bilden Heterodimere mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und binden an eine einfache Wiederholungssequenz mit einfachem Spacer als DNA-response element.

Aktiviert werden die PPARs durch eine Vielzahl von verschiedenen Fettsäuren, Prostaglandinen und sind Ziel verschiedenster pharmakologischer Substanzklassen. So wird PPARalpha durch Fibrate aktiviert, welche als Cholesterinsenker eingesetzt werden, während PPARgamma durch Thiazolidindione aktiviert werden und zurzeit als Anti-Diabetikum eingesetzt werden. Es gibt aber auch schon sogenannte pan-Agonisten, z.B. Bezafibrat, welches alle 3 Isoformen aktivieren kann [52,53].

Für die PPARs existieren eine Vielzahl von Kofaktoren (Koaktivatoren und Korepressoren), die z.B. mit dem ligandenfreien Rezeptor assoziiert sind und Histon-deacetylierende Eigenschaften besitzen (NCoR - Nuclear receptor co-repressor) oder der Koaktivator SRC-1 (steroid receptor co-aktivator), welcher eine Histon-Acetylase Aktivität besitzt [52,54-56].

PPARgamma spielt eine entscheidende Rolle in der Adipogenese, welcher in der späten Phase verstärkt exprimiert wird und zur Lipidakkumulation in den Zellen führt. Dies zeigte sich u.a. bei PPARgamma-Knock-out Mäuse, die kein bzw. nur sehr wenig Fettgewebe besaßen. In Anti-sense Versuchen in der Zellkultur zeigten sich, dass die Zellen ohne PPARgamma nicht in der Lage waren zu Fettzellen zu differenzieren bzw. sich de-differenzierten [57].

## **1.5. Bekannte Regulatoren der 11beta-HSD1**

Durch Untersuchungen an Gewebehomogenaten, Zellysaten oder Zellkulturen konnten die Wirkungen von bestimmten Substanzen auf die 11beta-HSD1-Aktivität und -mRNA-Spiegel bestimmt werden. Die Zusammenstellung aller bekannten Experimente zeigte, dass die 11beta-HSD1 zell-spezifisch und speziesspezifisch reguliert wird und es teilweise divergente Ergebnisse gibt [58].

### *1.5.1. Regulation des 11beta-HSD1-Promotors*

Der humane Promotor der 11beta-HSD1 wurde bislang noch nicht systematisch charakterisiert. Jedoch gab die Promotorcharakterisierung im Pavian allgemeine Anhaltspunkte für die Regulation des Promotors der 11beta-HSD1. Die Untersuchung deckte eine putative Estrogen-ähnliche-Bindungsstelle in der 5'-UTR sowie eine Vielzahl von CCAAT-Boxen im Bereich um -170 sowie eine putative Glucocorticoid Rezeptor (GR)-Bindungsstelle [59] auf. Auch durch die Charakterisierung des Promotors der Ratte konnte die Vielzahl der CCAAT-Boxen bestätigt werden [60]. Weiterhin wurden verschiedenste Promotorfragmente des Rattenpromotors von +49 bp bis -3618 bp in HepG2-Zellen untersucht. Dabei war die Luciferase-Aktivität relativ schwach, besonders längere Promotorfragmente zeigten eine sehr geringe Aktivität. Wurde jedoch C/EBPalpha kotransfiziert, kam es je nach Abschnitt zu einer 4-20-fach erhöhten Aktivität, wobei C/EBPalpha besonders starken Einfluss auf längere Promotorfragmente hatte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass C/EBPalpha der stärkste Aktivator für die 11beta-HSD1 war. Hingegen waren C/EBPbeta und -delta sowie die Kombination aus C/EBPalpha und -beta relativ schwache Aktivatoren des Rattenpromotors. Des Weiteren scheinen die vorderen putativen Bindungsstellen für die C/EBP-Proteine wichtig für die maximale Induktion der Luciferase-Aktivität zu sein. Da in dieser Studie keine TATA-Box gefunden wurde, wurde angenommen oder lag die Vermutung nahe, dass C/EBPs als Initiator der 11beta-HSD1 dienen können [60].

Auch in weiteren Studien konnte die Bedeutung der putativen C/EBP-Bindungsstellen gezeigt werden [61,62]. In undifferenzierten 3T3-L1-Zellen wurde der Promotor im Bereich von +20 bp bis -1200 bp in verschiedenen Längen untersucht. Hier wurde eine ansteigende Promotoraktivität beobachtet. Durch weitere Analysen wurde gezeigt, dass im Bereich von -137 bis -160 eine hochkonservierte Region mit putativen C/EBP-Bindungsstellen vorliegt. Mutationen in diesem Bereich verringerten die Aktivität um 40-50% und die Expression eines dominant-negativen C/EBP-Vektors senkte die Promotoraktivität der 11beta-HSD1 um 60%. Es zeigte sich weiterhin, dass beide putativen Bindungsstellen in diesem Bereich unterschiedliche Bindungsaffinitäten und -kapazitäten für C/EBPalpha bzw. -beta hatten [62].

In Mäuse-Lungen wurde mittels 5'-RACE-Technologie ein zusätzliches „aktives“ Exon mit entsprechendem Promotor gefunden, welches sich 23.000 bp vom Translationsstart entfernt befindet [61]. Durch Untersuchungen dieses zusätzlichen Promotorbereiches und des Promotorbereiches vor dem Translationsstart in verschiedenen Zelllinien konnten 2 wichtige Erkenntnisse erworben werden. Zum einen zeigte sich, dass der Promotor der 11beta-HSD1 vor dem Translationsstart in den verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Aktivitätsmuster hat und C/EBPalpha-abhängig ist. Zum anderen wurde deutlich, dass der Promotorbereich vor dem zusätzlichen, nicht-translatierten Exon teilweise aktiver ist und C/EBP-unabhängig [61].

### *1.5.2. Bedeutung und Regulation der 11beta-HSD1 während der Adipogenese*

Das Fettgewebe stellt ein spezielles endokrines Organ dar, welches eine Vielzahl von Hormonen sowie sogenannten Adipokinen und Zytokinen sezerniert, welche auto-, para- und endokrine Wirkungen haben können. Daher stellt das Fettgewebe vielmehr ein System von Wechselwirkungen zwischen Präadipozyten, Adipozyten und eingewanderten Makrophagen dar. Durch diese Interaktionen ist eine Vielzahl von Substanzen in und um die Zelle vorhanden, welche Gene, insbesondere der Adipogenese (Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten) und der Hormonsekretion, regulieren können.

Es kann von mindestens 2 metabolisch voneinander verschiedenen Fettdepots – subkutan und viszeral (auch omental) - ausgegangen werden. Diese unterscheiden sich in vielen Punkten deutlich voneinander. So ist der anti-lipolytische Effekt von Insulin im viszeralen Fettgewebe geringer als im subkutanen Fettgewebe. Auch die Expressionsmuster und –spiegel einiger Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren sowie metabolisch wichtiger Enzyme unterscheiden sich teilweise wesentlich in den beiden Depots [43,63-65]. Insbesondere die bei der Adipogenese wichtigen Transkriptionsfaktoren C/EBPalpha und PPARgamma zeigten depotspezifische Expressionsmuster und Wirkungen [65].

Nach neuem Stand beruht eine entstehende Fettleibigkeit eher auf einer Hypertrophie der Fettzelle (Adipogenese) als auf einer Hyperplasie (Proliferation von Präadipozyten) des Fettgewebes [66]. Entscheidend für die Adipogenese sind die Transkriptionsfaktoren PPARgamma, C/EBPalpha aber auch die 11beta-HSD1. Experimente mit siRNA gegen die 11beta-HSD1 zeigten, dass die Expression von C/EBPalpha und PPARgamma inhibiert wurde und somit die Adipogenese gestört wurde und vermindert Triglyceride in die Zellen aufgenommen wurden [67,68]. Die Adipogenese stellt dabei einen komplexen Ablauf von Induktion und Reduktion von Transkriptionsfaktoren und anderen Genen dar. Die 11beta-HSD1 kann eher zu den frühen Markern gezählt werden, welche über den GR und/oder MR die Zellen synchronisiert und anderen Transkriptionsfaktoren der späten Phase (u.a. C/EBPalpha und PPARgamma) induziert [43]. Eine spätere Reduktion der 11beta-HSD1 während der Adipogenese hatte hingegen keinen weiteren Einfluss auf die Ausdifferenzierung [69]. Es zeigte sich außerdem, dass die Regulation der 11beta-HSD1 in viszeralen und subkutanen Fettzellen sehr unterschiedlich war [8,43].

Als Zellkulturmodelle für die Untersuchungen der Adipogenese dienen die murinen Zelllinien 3T3-L1 und 3T3-F442A, die durch einen definierten Hormonmix (Glucocorticoid, Insulin, IBMX und teilweise PPARgamma-Agonist) in Adipozyten differenzieren. In den genannten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression der 11beta-HSD1 in Präadipozyten relativ schwach ist und mit Fortschreiten der

Adipogenese deutlich ansteigt. So wirkt in Zellen und Geweben auch die Dehydro-Formen der Glucocorticoide (z.B. Cortison) durch die Aktivität der 11beta-HSD1 [68,70,71].

Die ausdifferenzierten Fettzellen stellen letztendlich ein aktives endokrines Organ sowie Energiespeicher und –lieferant dar. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Lipogenese und die Lipolyse, welche ein Gleichgewicht zwischen In- und Exflux von freien Fettsäuren bedingen. Entscheidende Regulatoren dieses Gleichgewichtes sind Insulin, Glucocorticoide und beta-adrenerge Substanzen. Ein Ungleichgewicht führt schließlich zu Fettleibigkeit, Insulinresistenz und metabolische Störungen.

### *1.5.3. Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) im Promotorbereich der 11beta-HSD1 und genetische Assoziationen*

Bei der Bindung von Transkriptionsfaktoren oder anderen regulatorischen Faktoren spielt die genaue Nukleotidabfolge bzw. Bindungsmatrix eine bedeutende Rolle. So kann die Veränderung der Bindungsmatrix durch Austausch einzelner Nukleotid – sogenannte Single Nucleotid Polymorphism (SNP) –die Bindungsintensität deutlich verändern.

In einer Studie mit Pima-Indianern konnte gezeigt werden, dass zwei SNPs (rs846910 und rs3334312) im Promotorbereich der 11beta-HSD1 sowie einem SNP in Intron 3 (rs12086634) mit einem erhöhten Diabetes und Adipositasrisiko bzw. –erkrankung assoziiert sind [72]. Bei den Pima-Indianern handelt es sich um eine relativ isolierte Bevölkerungsgruppe, die zum einen in Arizona, USA sowie in Maycoba, Mexiko leben. Trotz übereinstimmenden genetischen Voraussetzungen sind in Mexiko nur wenige Indianer von Diabetes betroffen, während in Arizona ca. 50-60% der Pimas an Diabetes und Fettleibigkeit leiden, was die enorme Bedeutung von Umweltfaktoren bei der Pathogenese des Diabetes unterstreicht.

Des Weiteren zeigten Träger des SNP rs846910 mit dem heterozygoten Allel sowie den raren homozygoten Allel eine geringere Aufnahmefähigkeit von Glucose („glucose disposal rate“) in die Zellen. Weiterhin hatten diese Träger erhöhte Nüchtern-Insulinspiegel und erhöhte Insulinspiegel während eines oGTTs. Dieser SNP (g>a) ist -2937 bp vom Transkriptionsstart lokalisiert und steht in Kopplungsungleichgewicht mit dem SNP rs3753519 an der Position -2677 bp [72]. Weiterhin zeigte sich bei Pima Indianern verschiedener Generationen ein erhöhtes Risiko für Bluthochdruck für den SNP rs846910, insbesondere bei Personen, die in den 50iger Jahren geboren wurden [73]. In anderen Ethnien (Franco-Kanadier) konnte diese Allelhäufigkeit im Bereich des Promotors nicht gefunden werden [74].

Weitere SNPs wurden im Intron 3 der 11beta-HSD1 untersucht. Hier gibt es einerseits den SNP rs12086634 (t>g) sowie eine Insertion eines Adenosins (aa>aaa), als InsA bezeichnet. Bei diesen beiden SNPs konnte trotz mangelnder Signifikanz eine Tendenz zu verstärkter Fettakkumulation in viszeralen Fettgeweben beobachtet werden [74]. In einer Assoziationsstudie mit gemischten Ethnien zeigten sich höhere BMI-Werte, Waist-to-Hip-Ratios (WHR) sowie höhere Insulin- und HOMA-Werte [75]. Zudem konnte in einem Luciferase-Reporter-Assay gezeigt werden, dass der SNP im Intron 3 sowie die Insertion im Intron in Kombination mit einem 1,4 kbp Wildtyp-Promotorbereich der 11beta-HSD1 die Luciferase-Aktivität deutlich verringerte [22]. Andere Studien konnten für die Insertion in Intron 3 und dem Aminosäure-Austausch in der H6PD jedoch keine Assoziation sehen [76,77].

Allerdings besteht bei genetischen Assoziationsstudien das Problem der geringen Fallzahl oder der Ethnie. So sind die Verteilungsmuster zwischen den Ethnien (Europäer, Afroamerikaner, Asiaten) teilweise für jeden SNP sehr unterschiedlich. Bei fast allen SNP-Studien/Kohorten der 11beta-HSD1 war die Fallzahl relativ gering und kleiner als 500 Personen.

## 1.6. Zielstellung

Aufgrund der Bedeutung der 11beta-HSD1 bei der Entstehung von Fettleibigkeit und Diabetes Typ 2 soll untersucht werden, welche Faktoren die Expression und Aktivität der 11beta-HSD1 beeinflussen. Hierzu wird zunächst der humane Promotor in verschiedenen relevanten Zellsystemen charakterisiert. Zur Anwendung sollen zusätzlich *in-silico*-Analysen kommen, die Anhaltspunkte für bindende Transkriptionsfaktoren und Signalwege liefern. Potentielle Regulatoren sollen dann durch spezifische, experimentelle Methoden validiert werden. Dabei werden als Zellkulturmodelle HepG2-Zellen – eine humane hepatozelluläre Karzinoma-Zelllinie – sowie murine 3T3-L1-Zellen in undifferenziertem und differenziertem Stadium genutzt. Potentielle exogene und endogene Faktoren, die in der Pathogenese des Diabetes und der Adipositas eine Rolle spielen, werden im Hinblick auf ihre Effekte auf die 11beta-HSD1 analysiert. Solche Substanzen mit potentiell vorhandener Modifikation der Promotoraktivität können tierexperimentell und in humanen Studien weiter untersucht werden.

Weiterhin soll die Bedeutung und Relevanz von mehreren SNPs im Promotorbereich sowie im Gen der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase untersucht werden. Dabei wird die MeSyBePo-Kohorte (Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam) untersucht und statistische Auswertungen in Hinblick auf Zusammenhänge zwischen den SNPs und Fettleibigkeit oder Diabetes mellitus Typ 2 gemacht. Zusätzlich werden die im Promotorbereich befindlichen SNPs in den Zellkultursystemen *in-vitro* im Hinblick auf eine potentielle Funktionalität charakterisiert.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### 2.1.1. Klonierung

Es existieren von dem Gen der 11beta-HSD1 zwei Transkriptionsvarianten mit einer 7-Exon-Variante (mRNA: NM\_181755.1) und einer 6-Exon-Variante (mRNA: NM\_005525.2) (Abbildung 5). Aufgrund der Veröffentlichung nach Beginn der Arbeit sowie der Tatsache, dass in menschlichen Proben das längere Transkript noch nicht nachgewiesen werden konnte, wurde der 5'-Bereich vor dem Translationsstart des Exon 1 der kurzen Transkriptionsvariante bzw. dem Exon 2 der langen Variante für die Promotoranalyse näher untersucht und Teile davon kloniert.



**Abbildung 5:** Darstellung beider Genvarianten der 11beta-HSD1 mit Exon-Intron-Struktur (Quelle: NCBI).

Insgesamt wurden 8 Promotorfragmente mit einem gemeinsamen reversen Primer und Deletionen in 3'-Richtung (Tabelle 3) hergestellt.

**Tabelle 3: Verwendete Primer für die Klonierung der Promotorfragmente F1a-F7 mit einem reversen Primer und 8 verschiedenen forward Primern.**

Kursiv dargestellt die Schnittstelle für MluI im reversen Primer sowie KpnI in den forward Primern.

Reverse Primer	
	5'-cct <b>acg</b> cggttacctggctgtaattcctcg-3'
Forward Primer	
F1a (-85/+188)	5'-cgtc <b>gg</b> tacctcccaccaaagccaatc-3'
F1 (-172/+188)	5'-gcttag <b>gt</b> accatctggaagtctctc-3'
F2 (-321/+188)	5'-ggatc <b>gg</b> taccacagaagccctacatgc-3'
F3 (-823/+188)	5'-cg <b>ag</b> gtacctagctggtgtggcgctcc-3'
F4 (-1505/+188)	5'-cgg <b>ag</b> gtacctagggatgaaaatggagtg-3'
F5 (-2235/+188)	5'-gct <b>ag</b> gtaccgctaatagccactgcctg-3'
F6 (-2841/+188)	5'-gtctac <b>gg</b> tacctgaaagcctgctctgg-3'
F7 (+3034/+188)	5'-gct <b>ag</b> gtaccagatctggccatccttc-3'

Zur Klonierung der Promotorfragmente wurde die genomische DNA eines jungen gesunden männlichen Probanden verwendet. Die PCR wurde mittels High Fidelity Pfx Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Beschreibung bei einer Annealing-Temperatur von 52-56°C durchgeführt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen MluI und KpnI (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland) verdaut und in den Vektor pGL-3 basic vector (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) mit dem Firefly Luciferase Gen einkloniert.



### 2.1.2. SNP-Analyse - Herstellung der mutierten Promotorfragmente

Für die Mutagenese der 3 SNPs im Promotorbereich wurden die Primer laut Anleitung designt und die PCR sowie die Klonierung nach Anleitung durchgeführt. Dafür wurde das QuikChange Multi Site-directed-Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet. In Kürze, die aus dem E.coli-Stamm JM109 isolierten Wildtyp-Plasmide sind methyliert. Durch die PCR wird das komplette Plasmid amplifiziert, wobei der Primer sowohl als Template für die PCR als auch Mutagenese-Primer genutzt wird. Der entstandene Einzelstrang ist im Gegensatz zum Template unmethyliert und wird nicht durch das Restriktionsenzym Dpn I verdaut. Dadurch wird nur der Einzelstrang in die kompetenten E.coli transformiert. Die Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert.

**Tabelle 4: Verwendete Mutagenese-Primer für die SNPs rs860185, rs3753519 und rs846910.**

Mutagenese-Primer	
rs860185 (-620) – T/A	GTAAAAATAATAAGTGTATGAACCATTGCACTTGCCTT
rs3753519 (-2677) – T/C	TGCTTTTACTTTTTAAACTTTGTTGACAACCCAGAGA
rs846910 (-2937) – A/G	TTCCATTTATTCTGGTGGAATGATCAAATCAGAGA

### 2.1.3. Dual-Luciferase-Assay

Auf Basis von Dyer et al. wurde ein nicht-kommerzieller Dual-Luciferase-Assay etabliert. Es wurden 2 Puffer benutzt um die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität zu quantifizieren [78]. Der Firefly-Luciferase-Puffer bestand wie folgt aus: 25 mM Glycylglycin, 15 mM  $K_3PO_4$ , 4 mM EGTA, 15 mM  $MgSO_4$  und mit frisch dazugesetztem 0.1 mM CoA, 10 mM ATP, 150  $\mu$ M Beetle Luciferin (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA). Der Renilla-Puffer bestand aus: 1.1 M NaCl, 2.2 mM EDTA, 0.22 M  $K_3PO_4$ , 0.44 mg/ml BSA, 1.3 mM  $NaN_3$  und frisch zugesetztem 1.43 mM native Coelenterazine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland).

Die Signale wurden detektiert mit dem Multi-Well-Reader Mithras LB 940 (Berthold Technologies GmbHCo.KG, Bad Wildbad, Deutschland) mit 2 Injektoren. Die Messprozedur lief wie folgt ab: Dispension von 50  $\mu$ l Luciferase-Puffer mit 3 s Messung der Biolumineszenz gefolgt von einer Injektion von 50  $\mu$ l Renilla-Puffer und anschließender Messzeit von 3 s. Zum Vergleich wurde der kommerzielle Dual-Luciferase-Assay (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) gemessen und verglichen. Dazu wurde je 1 Transfektion in HepG2 und 3T3-L1 mit jeweils ein positiven und einer negativen Stimulation durchgeführt. Es ergab sich für beide Experimente die gleiche Tendenz und vergleichbarer Stimulationseffekt.

Alle Werte der Dual-Luciferase-Assays wurden normalisiert durch die Quotientenbildung von Luciferase- und Renilla-Signalen und relativiert zum Signalquotienten des leeren pGL3-Vektors. Jede Messung erfolgte als 5-fach-Replikat. Alle Werte stellen den Mittelwert und den Standardfehler dar. Es wurde zur Bestimmung des Signifikanzlevel zwischen den Gruppen ein 2-faktorieller ANOVA durchgeführt. Alle Stimulationsexperimente wurden mindestens 3-5-mal wiederholt.

### 2.1.4. Stimulationslösungen

Alle Lösungen wurden so gelöst, dass der Ethanolgehalt  $\leq 0,01\%$  in der Endstimulation betrug. Die Substanzen wurden entsprechend der Tabelle 5 gelöst und wässrig weiter verdünnt. Die Arbeitslösung wurde so hergestellt, dass ein 50-fach Stock entstand und 2  $\mu\text{l}$  je Well in einer 96-Well-Platte eingesetzt werden konnte. Nur der PPAR $\alpha$ -Agonist WY-14643 wurde frisch wässrig verdünnt.

Analog zu einer Arbeit von Richieri et. al wurden für die Fettsäuren 2 BSA-Lösungen hergestellt, um die Konzentration der freien Fettsäuren zu modifizieren [79-81]. Fettsäure-freies BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurde in den Konzentrationen 2,5 mM und 833  $\mu\text{M}$  aufgelöst. Für die Ratio 2 (Fettsäure/BSA) wurden 5 mM Fettsäure mit 2,5 mM BSA verdünnt sowie für die Ratio 6 2,5 mM Fettsäure mit 833  $\mu\text{M}$  BSA-Lösung. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren unter einer Ratio von 3 fast vollständig am BSA gebunden sind und nur eine physiologische Konzentration von rund 100 nM (abhängig von der Fettsäure) in Lösung frei vorliegt. Mit sinkendem Bindungsproteingehalt, d.h. mit steigender Ratio, steigt exponentiell die Konzentration der freien Fettsäuren. Daher kann angenommen werden, dass bei einer Fettsäure/fettsäure-freies BSA-Ratio von 6 der Großteil der Fettsäuren frei in der Lösung ist [79,81].

**Tabelle 5: Verwendete Lösungen für die Stimulationsexperimente.**

Angegeben sind Hersteller, Stockkonzentration, Lösungsmittel und verwendeter Endkonzentration.

Testsubstanz	Hersteller/Lieferant	Stocklösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Cortisol	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 $\mu\text{M}$	HEPES	1 $\mu\text{M}$
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	500 $\mu\text{M}$	0,02 M HCl	1 $\mu\text{M}$
Beta-Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	500 $\mu\text{M}$	10% Ethanol/ H <sub>2</sub> O	0,1 - 1 $\mu\text{M}$
Testosteron	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	500 $\mu\text{M}$	10% Ethanol/ H <sub>2</sub> O	0,1 - 1 $\mu\text{M}$
Rosiglitazon	Calbiochem, MerckKAG, Deutschland	500 $\mu\text{M}$	10% Ethanol/ H <sub>2</sub> O	1 $\mu\text{M}$
Glucose-dependent insulinotropic Peptide (GIP)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	200 $\mu\text{M}$	H <sub>2</sub> O	1 - 10 nM
Arachidonsäure (AA) (Ratio 2)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	0,5 N NaOH/ H <sub>2</sub> O /BSA	100 $\mu\text{M}$
Linolsäure (LA) (Ratio 2)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	0,5 N NaOH/ Ethanol/BSA	100 $\mu\text{M}$
Ölsäure (OA) (Ratio 2)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	0,5 N NaOH/ H <sub>2</sub> O /BSA	100 $\mu\text{M}$
Palmitinsäure (PA) (Ratio 2)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	Ethanol/BSA	100 $\mu\text{M}$
WY-14643	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	100% Ethanol	20 $\mu\text{M}$
3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	200 mM	0,5 M KOH/ H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{M}$
Arachidonsäure (AA) (Ratio 6)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	0,5 N NaOH/ H <sub>2</sub> O /BSA	1 $\mu\text{M}$
Linolsäure (LA) (Ratio 6)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	0,5 N NaOH/ Ethanol/BSA	1 $\mu\text{M}$
Ölsäure (OA) (Ratio 6)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	0,5 N NaOH/ H <sub>2</sub> O /BSA	1 $\mu\text{M}$
Palmitinsäure (PA) (Ratio 6)	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland	50 mM	Ethanol/BSA	1 $\mu\text{M}$

### *2.1.5. mRNA-Isolation*

Die gewonnenen Fettbiopsien waren Saugbiopsien aus der Rosiglitazon-Interventionsstudie (2.3.1.) sowie Nadelbiopsien aus der GIP-Interventionsstudie (2.3.2.). Die Fettzellen, die bei den Saugbiopsien durch Unterspülen des subkutanen Fettgewebes mit NaCl-Lösung gewonnen wurden, wurden durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren von Blut und andere lösliche Bestandteilen (Zelltrümmer etc.) gereinigt. Anschließend wurden die Proben sofort bei -80°C eingefroren und gelagert. Bei den Nadelbiopsien wurden mittels eines Biopsiegerätes mehrere kleine Biopsieproben aus dem subkutanen Fettgewebe entnommen und sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben sowie der isolierten RNA erfolgte bei -80°C.

#### *2.1.5.1. mRNA-Isolation aus den Fettbiopsien der Rosiglitazon-Interventionsstudie*

Ca. 150 mg gefrorenes Fettgewebematerials wurde mit einer 26er-Nadel homogenisiert und die totale RNA mit dem SV total RNA Isolation Kit (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) isoliert. Anschließend wurde die RNA mit dem RNA Clean-up Kit (Zymo Research, Orange, USA) aufkonzentriert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

#### *2.1.5.2. mRNA-Isolation aus den Fettbiopsien der GIP-Interventionsstudie*

Zur mRNA-Isolation aus den Stanzbiopsien wurde das RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Vor der Isolation wurden die Fettgewebeproben in 15 ml Röhrchen auf Eis gelagert und mit einem äquivalenten Volumen Qiazol-Reagenz (Trizol) (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgefüllt (Verhältnis 1:1). Es folgte eine gründliche Homogenisierung der Proben mittels Homogenisator für ca. 25-30 s auf Eis. Abschließend erfolgte die RNA-Isolation nach Vorschrift.

#### *2.1.5.3. mRNA-Isolation aus 3T3-L1-Zellen*

Die Zellen für die mRNA-Analyse wurden mit einer Dichte von 8.000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte eingesät. 24 Stunden vor der Stimulation wurden diese auf serum-freies Medium gesetzt. Die Zellen wurden 1 Stunde stimuliert und die RNA nach Anleitung mit dem ZR-96 Mini RNA Isolation I Kit™ (Zymo Research, Orange, USA) isoliert.

### *2.1.6. Semi-Quantitative Real-Time-PCR*

#### *2.1.6.1. Primer-Liste*

Alle Primer wurden Exon-übergreifend mit Oligo 5.0 hergestellt. Diese wurden so ausgewählt, dass sowohl humane als auch murine mRNA damit amplifiziert werden kann. Daher enthalten einige Primer sogenannte Wobbles. Alle Primer-Paare wurden mittels Standardreihe mit HepG2-mRNA sowie mRNA von ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen getestet. Die Effizienzen lagen zwischen 80-120%. Als interner Standard wurden 16s und beta-Actin benutzt.

**Tabelle 6: Verwendete Primer für die qRT-PCR in 5'-3'-Richtung sowie revers-komplementär für die antisense-Primer.**

qRT-PCR Primer für die mRNA-Analyse			
Gen	Sense Primer	Antisense Primer	Tm für die qRT-PCR
Beta-Actin	TCTACAATGAGCTGCGTG	TGGGGTGTGAAGGTCTC	55°C und 60°C
16s-RiboProtein	TGCAGGTCTTCGGACGCA	ACTGYAGCGYGC GCGGCT	55°C und 60°C
GAPDH	CCTGCACCACCAACTGCT	GAGGGGCCATCCACAGTC	55°C und 60°C
AP2/FABP4	AGATGGSGGKGYCCTGGT	TGGAAGTSACGCCTTCA	55°C
HSD11B1	TTGCCCATGCTGAAGCA	AGAACCCATCCARAGCAAAC	60°C
GRalpha	AYTGGCAGCGGTTTTATC	CTCRGGGAATTCAATACTC	55°C
PPARalpha	TCCCTKTTTGTGGCTGCTAT	GTTGCTCTGCAGGTGGAG	55°C
PPARgamma	CGAGGGCGATCTTGACAG	TCTTTGCTCTGCTCCTGC	60°C
SREBP1	AGAAGCGCACAGCCACA	ATGGCCTTGCGCAAGACA	55°C
CEBPalpha	TGGACGGCAGGCTGGA	GGAAGAGGCCGCGCCAG	60°C
CEBPbeta	CATGGCGGCSGGYTTTC	TGGCGTCAGCGGGGCT	60°C
CEBPdelta	CATGTACGACGACGAGAGC	TTGCTGTTGAAGAGGTGCG	60°C
LXRalpha	TGGARTTCATCAACCCCA	AGCTGGTCTGCACGTTG	55°C
LXRbeta	CARCTGCAGTGCAACAAAC	GAGATGATGGCYAGCTC	55°C

#### 2.1.6.2. Semi-Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Analyse der mRNA-Level erfolgte direkt von der mRNA mittels qRT-PCR und den validierten Primern (siehe 2.8.2.). Die Analyse der Proben der Rosiglitazon-Interventionsstudie erfolgte mit 10 ng RNA und 4 µl Power-SYBR RT-PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, USA) im ABI PRISM 7900HT System und wurde mit der SDS 2.2 Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewertet.

Die qRT-PCR der GIP-Interventionsstudie sowie der 3T3-L1-Zellstimulationen erfolgte mit dem iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Die Messung und Auswertung wurde mit dem ABI PRISM 7300-System (Applied Biosystems, Foster City, USA) und SDS 1.3 Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

Alle Auswertungen erfolgten mit der untenstehenden Formel der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta(Ct_{Gene\ nachher} - Ct_{interner\ Standard\ nachher}) - \Delta(Ct_{Gene\ vorher} - Ct_{interner\ Standard\ vorher})$$

$$relative\ Veränderung\ zur\ vorher = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**Formel 1:** Berechnung der relativen Veränderung der mRNA nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode.

#### 2.1.7. In-Silico-Analyse

Zur Bestimmung putativer Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren wurden verschiedenen Datenbanken benutzt. Die Sequenz des längsten klonierten Fragmentes F7 wurde mit MatInspector und JasparDatabase untersucht [82,83]. Des Weiteren wurden Bindungsstellen aus bereits erschienenen Publikationen berücksichtigt. Es ergab sich ein komplexes Bild von vielen möglichen Bindungsstellen. Die Darstellung der DNA und der putativen Bindungsstellen erfolgte mit VectorNTI (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA).

## 2.1.8. Nicht-radioaktiver Elektromobilitätsassay (EMSA)

### 2.1.8.1. Kernproteinisolation

Für den Mobilitätsassay wurden 8 Oligonukleotide mit einer Länge von 70 bp synthetisiert. Eine radioaktive Markierung der Oligonukleotide für den nicht-radioaktiven Assay ist dabei nicht notwendig. Es wurden pro Ansatz 400 ng/µl Oligonukleotid sowie 2 µg Protein-Kernextrakt eingesetzt. Die Kernextrakte wurden wie folgt gewonnen: Zellen mit 90% Konfluenz wurden 24 Stunden vor der Stimulation auf serum-freies Medium umgestellt und abschließend für 1 Stunde stimuliert. Die Gewinnung der Kernproteine erfolgt nach Anleitung des Nuclear Extract Kits (Active Motif Europe, Rixenart, Belgien). Für die Proteinbestimmung wurden ein Aliquot für eine 1:20- und 1:50-Verdünnung abgenommen und der Rest des Extraktes bei -80°C gelagert. Die Proteinmenge wurde im 96-Well-Format als Duplikate mit Roti-Nanoquant (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Die Konzentrationen wurden mittels BSA-Standardreihe berechnet.

### 2.1.8.2. Oligonukleotide

Die Position der Oligonukleotide wurden so gewählt, dass die wichtigsten Bindungsstellen – insbesondere von C/EBP-Isoformen - erfasst werden. Die Oligonukleotide wurden mittels PCR und High Fidelity Pfx Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Beschreibung bei einer Annealing-Temperatur von 52-56°C amplifiziert.



**Abbildung 6:** Position der Oligonukleotide 1-8, der Primer F1a-F3 sowie putativer Bindungsstellen der C/EBP-Proteine und anderer ausgewählter putativer Bindungsstellen. Blau-markiert dargestellt der Transkriptionsstart.

### 2.1.8.3. Bindungsreaktionen

Für die Bindungsreaktion wurden 10 µl-Ansätze mit dem mitgelieferten Reaktionspuffer des Electrophoretic Mobility-Shift Assay (EMSA) Kit (BioProbes, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) benutzt. Für jede Reaktion wurden 2 µg Kernprotein sowie 400 ng/µl Oligonukleotid eingesetzt. Für

die Supershiftreaktionen wurden zusätzlich 1 µl Antikörper dazugegeben. Der TATA-Antikörper (abcam plc, Cambridge, Großbritannien) wurde vorher 1:10 verdünnt. Die C/EBP-Isoform-Antikörper (Cell signaling Technology, New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) wurden ohne Verdünnung eingesetzt. Alle Ansätze wurden 20-30 min bei RT inkubiert. Zum Abschluss wurden 3 µl des mitgelieferten Ladepuffers zugesetzt.

#### *2.1.8.4. Gelelektrophorese und Färbung der Gele*

Für die elektrophoretische Trennung wurde mindestens 1 Tag vorher ein natives (nicht-denaturierendes) 5%iges Mini-Gel hergestellt und im Kühlschrank gelagert. Dazu wurden 1,75 ml 40% Arcylamid/Bis-Acrylamid (37:2,5) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 0,5-fachen TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer, 100 µl 10% (w/v) APS und 10 µl TEMED gemischt und auf 14 ml mit Wasser aufgefüllt.

Die Gele wurden während der Inkubationszeit bei 170 V warm gelaufen. Nach dem Auftragen der Proben wurden diese bei 170-200 V getrennt. Der Lauf wurde beendet sobald die Markerfront das letzte Drittel erreicht hatte (ca. 30 min).

Die Färbung erfolgte nach Anleitung. In Kürze, die Färbung der DNA erfolgte nach Beendigung der Elektrophorese mit 1xSYBRgreen in 1xTBE-Puffer für 30 min. Die Bilder wurden anschließend mit einem Trans-Illuminator (E-Box, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) aufgenommen. Es folgte die Färbung der Proteine mit SYBRruby über 3 Stunden bzw. über Nacht und die Entfärbung mit 10% (v/v) Essigsäure, 7% (v/v) Methanol-Lösung für 1 Stunde. Abschließend erfolgte wieder eine Bildaufnahme mit dem Trans-Illuminator. Die Bildaufarbeitung erfolgt mit der E-Capt-Software (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) sowie die Messung der Bandenintensität mit ImageJ [84].

#### *2.1.9. 11beta-HSD1-Enzymaktivität*

Beide Richtungen der 11beta-HSD1-Aktivität sind ex-vivo stabil und können abhängig vom Kofaktor getestet werden. Für die Fettgewebsbiopsien wurde die Dehydrogenase-Aktivität quantifiziert. Dazu wurden ca. 50-100 mg Fettgewebe eingewogen und in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 8,00 mit einem Überschuss (250 µM) an dem Kofaktor beta-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert) (NADP<sup>+</sup>) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) sowie 500.000 dpm 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-Cortisol (Amersham Biosciences Limited, Buckinghamshire, Großbritannien) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Bei den verschiedenen Gewebeproben der Versuchsmäuse wurde die Reduktase-Aktivität quantifiziert. Dazu wurden ca. 50 mg Lebergewebe, ca. 100 mg Fettgewebe und ca. 100 mg Muskelgewebe eingewogen. Die Gewebe wurden in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5 mit einem Überschuss (250 µM) an dem Kofaktor beta-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert) (NADPH) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) sowie 1,2-<sup>3</sup>H-Cortison (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA) bei 37°C inkubiert. Die Zeit betrug für das Lebergewebe ½ Stunde, sowie für das Fett- und Muskelgewebe mindestens für 3 Stunden.

Nach der Inkubation wurde bei den Fettproben das Fettgewebe von der Flüssigphase getrennt. Das Gewebe wurde mit 1 ml Methanol und die Flüssigphase mit 1 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Bei den

Leber- und Muskelproben wurde die gesamte Probe mit 1 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgenommen, mit Luft verblasen und wieder mit Dichlormethan rekonstituiert. Die Proben wurden auf einer Dünnschichtplatte aufgetragen und die beiden Steroide – Cortison und Cortisol – in einer Dichlormethan:Methanol (75:5) gesättigten Kammer getrennt. Anschließend wurden die Spots markiert und ausgeschnitten. Die beta-Strahlung der <sup>3</sup>H-markierten Steroide wurde mit einem Szintillationscocktail im beta-Counter quantifiziert.

$$\text{nmol/mg/h} = \frac{\text{dpm}}{2,22 \cdot 10^6 \left[ \frac{\mu\text{Ci}}{\text{dpm}} \right] * \text{spezifische Aktivität} \left[ \frac{\text{nmol}}{\mu\text{Ci}} \right]} \div \text{Zeit [h]} \div \text{Feuchtwicht [mg]}$$

**Formel 2:** Formel zur Berechnung des Stoffumsatzes aus den gemessenen radioaktiven Zerfällen des Tritium-markierten Substrates.

## 2.2. Zellkultur

### 2.2.1. Verwendete Zellen

HepG2 – eine Hepatoma-Zelllinie - und die murine Zelllinie 3T3-L1 (undifferenziert und differenziert) wurden für die 11beta-HSD1 Promotoraktivität-Untersuchungen benutzt. HepG2-Zellen wurden in modified Eagle's medium with Earle's salt (EMEM) mit stabilen Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) und 10% fetalen Kälberserum (FKS) (Charge 764H) kultiviert. Das Kulturmedium für die 3T3-L1 war Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose und stabilen Glutamin und 10% FKS. Alle Medien, FKS und NEA wurde von Biochrom bezogen (Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Die Trypsinierung erfolgte mit TrypLE Express (GibcoBRL, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA).

### 2.2.2. Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten

Die Differenzierung der 3T3-L1 wurde wie folgt erreicht: 2-3 Tage erhielten die Zellen DMEM mit 10% FKS, 1 μM Insulin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), 500 μM IBMX (Isobutylmethylxanthin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), 1 μM Dexamethason (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und 1 μM Rosiglitazon (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Es folgte ein Wechsel zu DMEM mit 10% FKS, 1 μM Insulin und 1 μM Rosiglitazon für die nächsten 2-3 Tage. Abschließend wurde die Zellen bis zu den entsprechenden Experimenten (i.d.R. Tag 8-14) in DMEM mit 10% FKS kultiviert. Die Auswirkungen des Zusatzes von Rosiglitazon zum Standard-Differenzierungsmix wurden noch weiter analysiert [5,6,85].

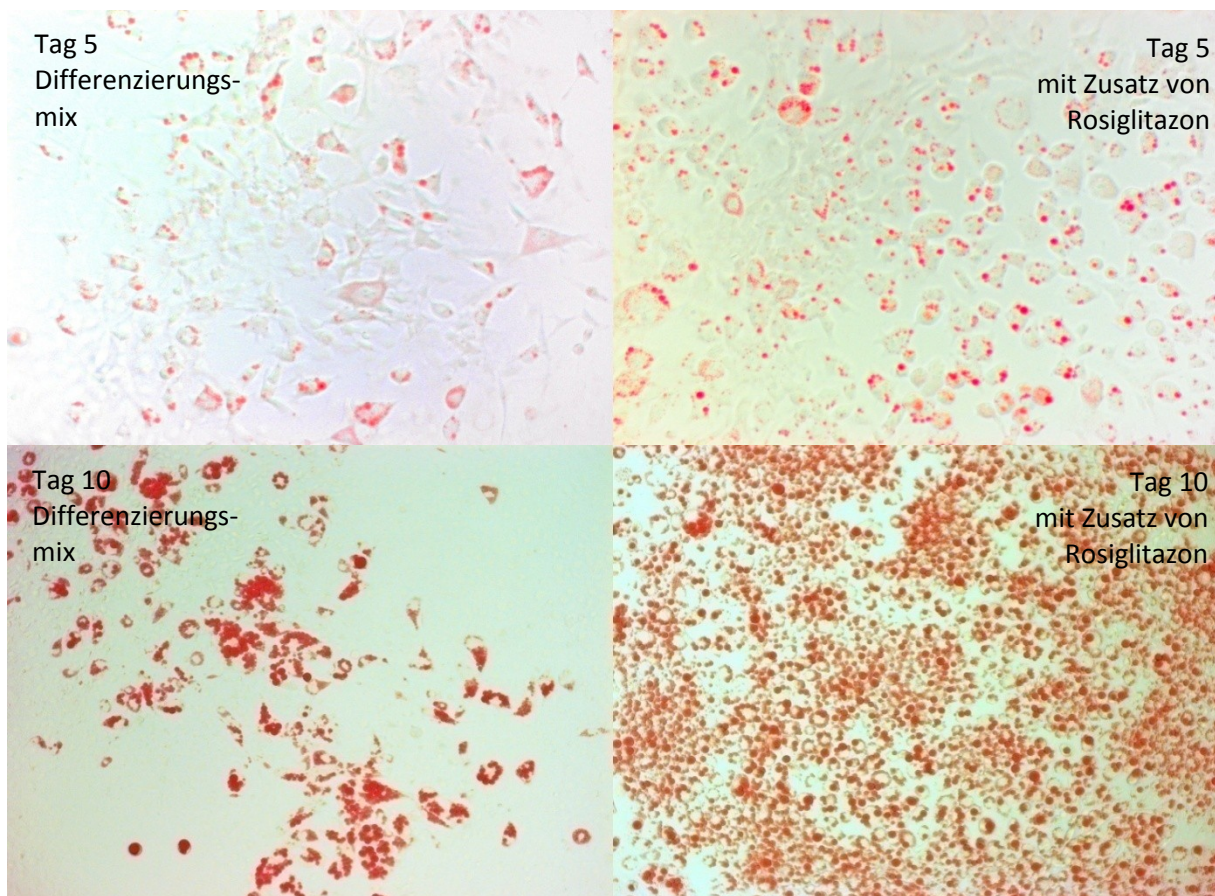
### 2.2.3. Oil-Red-Färbung

Der Differenzierungsprozess wurde mittels spezifischer Fettanfärbung durch die Oil-Red-Färbung überprüft und quantifiziert [86]. Zur Quantifizierung wurde ein Fettextrakt aus Lipovenös (Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) nach dem Methanol-Chloroform-Protokoll gewonnen. Sowohl die Proben als auch die Standards wurden mit Oil-Red (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gefärbt und photometrisch bei 510 nm vermessen.



Die ausdifferenzierten Zellen wurden mit HEPES-gepufferten 10%igen Formalin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100% 1,2-Propandiol/Propylglykol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen, um die Proben wasserfrei zu machen. Es folgte die Färbung der Zellen für ca. 20 min mit einer 3 mg/ml Oil-Red-Färbelösung (gelöst in Propylglykol), die unter dem Mikroskop qualitativ beobachtet wurden. Um die überschüssige Farbe zu entfernen, wurde mit 85%igen 1,2-Propandiol/Propylglykol gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für die photometrische Messung mit Isopropanol entfärbt.

Für die Mikroskopie wurden die Zellen nach Waschen mit 85%igen 1,2-Propandiol/ Propylglykol, nochmals mit Wasser gewaschen. Die Proben wurden abschließend mit Glycerin Jelly (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) eingebettet.



**Abbildung 7:** Mikroskopische Darstellung der Oil-Red-Färbung unter Differenzierungsmix (links) und unter Differenzierungsmix mit Zusatz von 1  $\mu$ M Rosiglitazon (rechts) am Tag 5 (Vergrößerung 20-fach) und Tag 10 (Vergrößerung 10-fach).

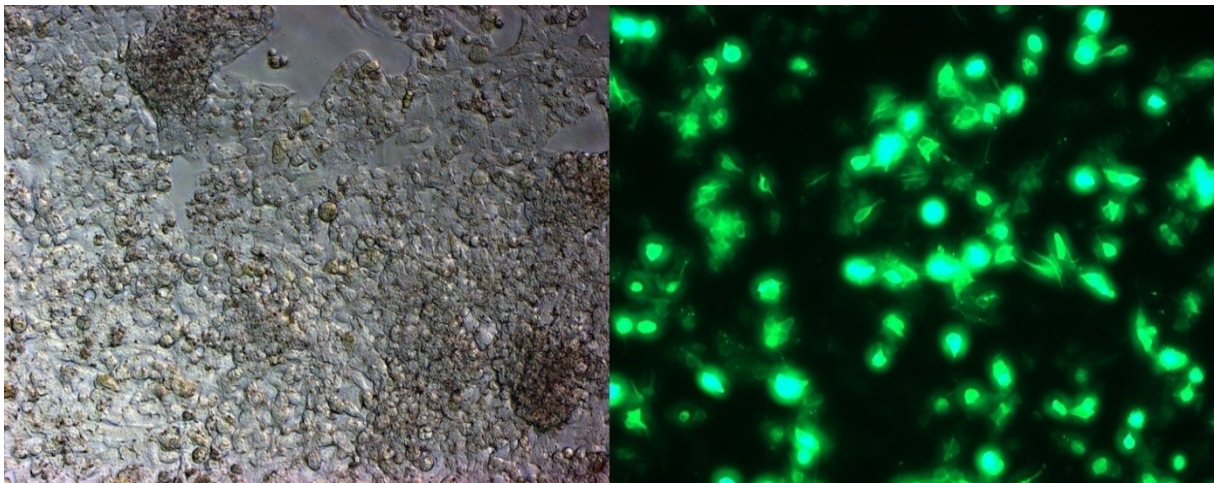
Zur Überprüfung der Auswirkung von Rosiglitazon als Zusatz zum Differenzierungsmix wurde die Fetteinlagerung photometrisch bestimmt. So ist der Fettgehalt in differenzierten 3T3-L1-Zellen am Tag 10, die zusätzlich Rosiglitazon während der 5-tägigen Differenzierungsprozesses erhielten, signifikant erhöht gegenüber den Zellen mit dem Standard-Differenzierungsmix ( $3,17 \pm 0,93 \text{ mg/cm}^2$  (Rosiglitazon) vs.  $1,44 \pm 0,56 \text{ mg/cm}^2$ ,  $P < 0,05$ ).



#### 2.2.4. Transfektion

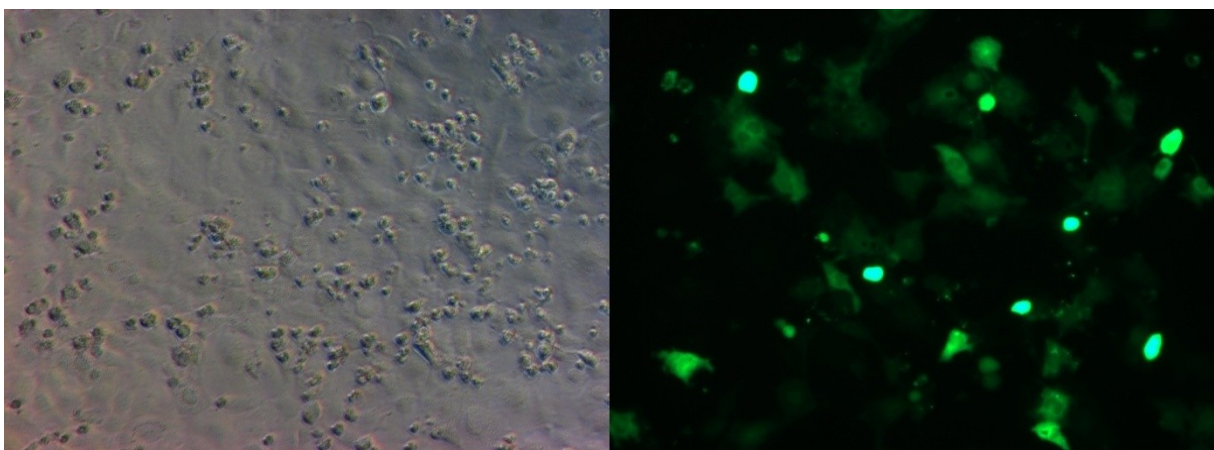
Es wurden in Laufe der Zeit 3 verschiedene Methoden zur Transfektion benutzt. Dies waren die normale und reverse Transfektion sowie die Elektroporation. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Mikroskopie (Axiostar plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit einem Vektor mit einem grün-fluoreszenzierenden Protein (pMaxGFP, Amaxa biosystems, Köln, Deutschland) den entsprechenden Protokollen transfiziert.

HepG2-Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von 40.000 Zellen /Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Transfektion mit Lipofectamin2000 erfolgt nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). Bei der reversen Transfektion wurde der Transfektionsansatz nach Anleitung vorbereitet und nach Ablauf der Inkubation 60.000 Zellen/Well zum Ansatz dazugegeben. Für die Kotransfektion des GRalpha-Vektors in HepG2-Zellen wurde 1/10 der eingesetzten pGI3-Vektormenge eingesetzt. Dieser Ansatz wurde abschließend in 96-Well-Platten verteilt.



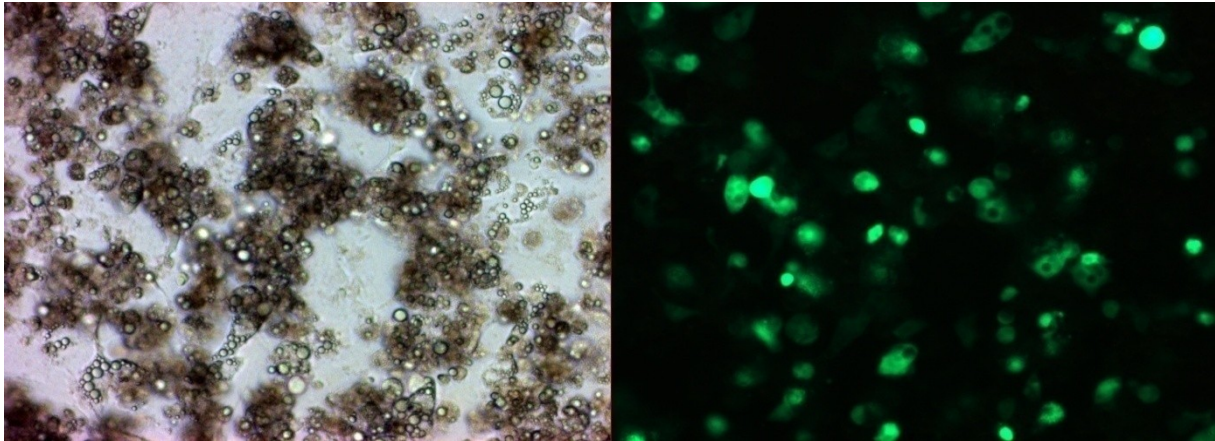
**Abbildung 8:** Transfektionseffizienz mit Lipofectamin2000 von HepG2-Zellen. Links: Phasenkontrastaufnahme mit 10x Vergrößerung. Rechts: Fluoreszenzaufnahme mit Anregung bei 485 nm mit 10x Vergrößerung.

Die Transfektion der undifferenzierten 3T3-L1-Zellen erfolgte mit 2 verschiedenen Transfektionsreagenzien – Lipofectamin2000 und LipofectaminLTX (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). Es wurde jeweils nach Anleitung gearbeitet. Dafür wurden am Vortag ca. 7.500 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte eingesät.



**Abbildung 9:** Transfektionseffizienz mit LipofectaminLTX von undifferenzierten 3T3-L1-Zellen. Links: Phasenkontrastaufnahme mit 10x Vergrößerung. Rechts: Fluoreszenzaufnahme mit Anregung bei 485 nm mit 10x Vergrößerung.

Die Transfektion der ausdifferenzierten 3T3-L1 erfolgte mittels Elektroporation mit dem Amaxa Line Nucleofactor Kit L (Amaxa biosystems, Köln, Deutschland). Es wurde nach Anleitung gearbeitet und das Programm A-033 durchgeführt. Vor der Transfektion erfolgt die Ausdifferenzierung in T-75 Flaschen nach Protokoll (siehe 2.2.2.). Es wurden nur Flaschen mit einer Ausdifferenzierungsrate von mehr als 90% benutzt. In der Regel lag die Rate bei größer 98%. Es wurden meist zwei T-75-Flaschen zusammengefasst und nach der Elektroporation entsprechenden auf 3x 96-Well-Platten verteilt.



**Abbildung 10:** Transfektionseffizienz von differenzierten 3T3-L1-Zellen mittels Elektroporation. Links: Phasenkontrastaufnahme mit 10x Vergrößerung. Rechts: Fluoreszenzaufnahme mit Anregung bei 485 nm mit 10x Vergrößerung.

Der leere pGL3 basic Vektor bzw. die 8 verschiedenen Promoter-pGL3-Konstrukte (200 ng/well) wurden mit dem pRL-SV40 (4 ng/well) (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) für die Normalisierung zusammen transfiziert. Für die Transaktivierungsassays der C/EBP-Isoformen wurden zusätzlich noch 1/10 der C/EBP-Isoformen zugeben und entsprechenden das Volumen des Transfektionsreagenz erhöht.

Nach 4-6 Stunden wurde auf das entsprechende FKS-freie Medium gewechselt. Es wurden alle Stimulanzien in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. Nach 40 Stunden wurden die Zellen mit 40  $\mu$ l passiven Lysis-Puffer entsprechenden der Anleitung (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) lysiert. 20  $\mu$ l der Proben wurden in weiße LumiNUNC 96-Well-Platten (NUNC A/S, Roskilde, Dänemark) überführt und anschließend analysiert. Wurden die Messung nach der Lysis nicht anschließend durchgeführt, wurden die Platten im -80°C-Tiefkühlschrank bis zur Messung gelagert.

### 2.2.5. Vitalitätsassay

Um die Auswirkungen der Transfektion, des serumfreien Mediums sowie der Stimulationssubstanzen zu erfassen, wurde ein MTT-Test (Chemicon, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) durchgeführt. HepG2 und undifferenzierten 3T3-L1-Zellen wurden dazu mit dem leeren pGL3 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen stimuliert, um den Effekt der serumfreien Stimulation zu untersuchen. In beiden Zelllinien wurde der Test 3-mal wiederholt. Die Inkubationszeit betrug 40 Stunden. Die Messung des Farbstoffes, der nur durch vitale Zellen umgewandelt wird, erfolgte nach Anleitung.

Es ergab sich eine leichte, nicht signifikante Reduktion der Zellvitalität aufgrund der Serumreduktion. Alle getesteten Substanzen ergaben keine signifikanten Veränderungen der Zellvitalität unter Transfektionsbedingungen und Serumentzug.

### 2.3. In-vivo-Studien

Alle *in-vivo*-Studien wurden in Kooperation durchgeführt. Die Rosiglitazon-Interventionsstudie wurde von Dr. Knut Mai (Charité) initiiert und durchgeführt. Die GIP-Interventionsstudie wurde von Dr. Özlem Gögebakan (DIfE) geleitet. Die Organe der Mäuse aus der Fettdiät-Intervention wurden von Dr. Susanne Neschen (DIfE) bereitgestellt.

#### 2.3.1. Rosiglitazon-Interventionsstudie

Für die Rosiglitazon-Studie wurden 7 männliche freiwillige Probanden an der Charité – Campus Benjamin Franklin, Abteilung Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin rekrutiert. Es lag eine Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission vor. Alle Teilnehmer zeigten eine gestörte Glucosetoleranz und hatten ein stabiles Gewicht 2 Monate vor Behandlungsbeginn. Ausschlusskriterien waren Medikation mit Insulin oder oralen Anti-Diabetika, Glucocorticoiden oder Vitamin K Antagonisten. Darüberhinaus wurden Personen mit Herzproblemen, hepatische oder renale Fehlfunktionen, Gerinnungsstörungen oder endokrine Störungen ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Die Patienten wurden aufgeklärt und unterschrieben eine Einverständniserklärung.

Über einem Zeitraum von 8 Wochen erhielten die Patienten 8 mg/Tag Rosiglitazon (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München, Deutschland). Dabei wurden die Patienten angewiesen ihren Lebensstil nicht zu verändern.

Die Probenentnahme erfolgte an 5 voneinander getrennten Tagen vor Beginn der Behandlung sowie nach der Beendigung. Es wurden ein oraler Glucose Toleranz Test (oGTT) mit 75 g Glucose, ein euglykämischen, hyperinsulinämischer Clamp, 24-Stunden Urin, Cortisol-Test sowie eine Fettbiopsie vorgenommen. Die Fettbiopsie-Entnahme erfolgte nach örtlicher Betäubung mittels Lidocain aus dem abdominellen subkutanen Fettgewebe. Die Proben wurden mehrmals gewaschen und bei -80°C aufbewahrt.

**Tabelle 7: Anthropometrische und metabolische Daten der 7 Studienteilnehmer der Rosiglitazon-Studie vor und nach der Intervention.**

	vor Rosiglitazon	nach Rosiglitazon	P
Alter	59,3 ± 3,0		
Größe [cm]	169,1 ± 2,9		
Gewicht [kg]	83,44 ± 4,35	84,43 ± 4,33	n.s.
BMI	29,26 ± 1,56	29,56 ± 1,42	n.s.
Taille [cm]	103,7 ± 3,7	106,1 ± 3,9	P=0,109
Hüfte [cm]	103,1 ± 2,3	103,4 ± 2,0	n.s.
Waist-to-Hip-Ratio (WHR)	1,01 ± 0,03	1,02 ± 0,2	n.s.
Systolischer Blutdruck	148,9 ± 5,9	137,3 ± 6,2	P=0,063
Diastolischer Blutdruck	85,7 ± 2,8	79,3 ± 3,0	n.s.
Freie Fettsäuren (FFA)	0,499 ± 0,075	0,299 ± 0,057	<b>P=0,016</b>
Cholesterin	4,95 ± 0,32	5,29 ± 0,28	n.s.
Triglyceride	1,58 ± 0,34	1,58 ± 0,18	n.s.
HDL	1,40 ± 0,08	1,42 ± 0,04	n.s.
LDL	2,84 ± 0,24	3,16 ± 0,27	P=0,128

### 2.3.2. GIP-Interventionsstudie

Die Durchführung der klinischen Studie an 10 Probanden erfolgte randomisiert und einfach verblindet. Dabei wurde jeweils eine GIP- und Placebo (physiologischen Kochsalz)-Infusion durchgeführt, wobei bei der GIP-Infusion 2 pmol GIP/min/kg KG infundiert wurden.

Bei jedem Probanden erfolgten die zwei Untersuchungen an verschiedenen Tagen. Zwischen den einzelnen Terminen wurden mindestens 7 untersuchungsfreie Tage eingehalten, um eine Erholungszeit zwischen den subkutanen Fettbiopsien zu ermöglichen, damit die entstandenen subkutanen Hämatome der Bauchdecke sich auflösen konnten. Die Patienten wurden aufgeklärt und unterschrieben eine Einverständniserklärung.

Jeweils vor und nach Beginn der Intervention wurden Biopsieproben aus dem subkutanen Fettgewebe (Stanzbiopsie) nach lokaler Betäubung auf der einen Seite des Bauchbereiches entnommen. Die Interventionsdauer betrug jeweils 4 Stunden und nach Ablauf der Intervention erfolgte eine erneute Stanzbiopsie auf der gegenüberliegenden Bauchseite.

**Tabelle 8: Anthropometrische Daten der Probanden der GIP-Interventionsstudie.**

	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Alter	10	24,0	67,0	46,8	9,9
Gewicht	10	80,9	121,0	100,0	8,2
BMI	10	29,30	37,80	33,05	2,39
Taillenumfang	10	98,0	123,0	111,2	6,9
Hüftumfang	10	102,5	115,6	109,0	4,3
Waist-to-Hip-Ratio (WHR)	10	0,92	1,11	1,01	0,05

### 2.3.3. Fettsäureintervention bei Mäusen

20 männliche 129SvS2-Mäuse wurden in 4 Gruppen eingeteilt und nach Gewicht gepaart. Das initiale Körpergewicht betrug etwa 24 g. Die Tiere erhielten 7 Tage unter Standardbedingungen folgende Diät-Interventionen (Tabelle 9): Grundmatrix: Ssniff R/M-H (Pulver) mit 3,3% Fett; 19% Protein; 36,5% Stärke; 4,7% Zucker; 6,4% Asche und 4,9% Rohfasern (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

**Tabelle 9: Diätzusammensetzung der Nahrung für die Mäuse der Fettsäureinterventionstudie.**

Gruppe	Diät	Öl-/Fetthersteller
Standard Vergleichsdiät	Ssniff (gepulvert) + 15% (w/w) Leitungswasser	
Fischöl-Diät	Ssniff (gepulvert) + 15% (w/w) Hering-Fischöl	Research Diets Inc., New Brunswick, New Jersey, USA
Distelöl-Diät	Ssniff (gepulvert) + 15% (w/w) Distelöl	Kunella Feinkost GmbH, Cottbus, Deutschland
Kokosfett-Diät	Ssniff (gepulvert) + 15% (w/w) Kokosfett	Ostthüringer Nahrungswerk Gera GmbH, Gera, Deutschland

Der Nahrungsverbrauch der Tiere wurde täglich gewogen und dokumentiert. Des Weiteren wurden die Tiere an den Tagen 0, 2, 5 und 7 gewogen und der Blutzucker an Tagen 0, 5 und 7 am Schwanzende bestimmt. Am Tag 7 erfolgten die Tötung der Tiere mit Isofluran und die Organentnahme. Alle

entnommenen Organe wurden gewogen und sofort in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Folgende Organe/Gewebe wurden entnommen und teilweise gewogen: Leber, Wadenmuskel (Musculus gastrocnemius), epididymales, subkutanes sowie mesentriales und omentales Fettgewebe. Die Mäuse wurden ebenfalls bei der Sektion auf Auffälligkeit untersucht.

#### 2.3.4. MeSyBePo-Kohorte

Die MeSyBePo-Studie ist eine Querschnittsstudie. Dies bedeutet, dass eine empirische Untersuchung einmalig durchgeführt wurde und somit Momentaufnahmen dieses Zeitpunktes gültigen Phänotypen darstellt. Die Studie MeSyBePo hat das Ziel, die Zusammenhänge der Charakteristika des metabolischen Syndroms und Adipositas-assoziiierter Erkrankungen zu evaluieren.

##### 2.3.4.1. Rekrutierung

Die Probanden wurden seit 2002 über Zeitungsannoncen, Jahresberichte, Tag der offenen Tür, Internet und über Informationsblätter in Arztpraxen und Apotheken rekrutiert. In den zwei Studienzentren – Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abteilung für Klinische Ernährung sowie Charité Campus Benjamin Franklin (CBF), Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin – wurden folgende Daten erhoben und Untersuchungen durchgeführt:

- Angaben zur Person (Geburtsdatum, Geschlecht) und persönlichem Lebensstil
- Anthropometrie
- Anamnese (Angabe eigener Erkrankungen und Erkrankungen Verwandter ersten Grades)
- oraler Glucosetoleranztest (oGTT)
- sonographische Messung der Intima-Media Dicke von *Arteria carotis communis* (ACC)
- Ernährungsfragebogen
- Aktivitätsfragebogen
- Blutparameter

Desweiteren wurden aus den erhobenen Daten folgende Parameter berechnet:

BMI (body mass index): 
$$BMI [kg/m^2] = \frac{\text{Körpermasse [kg]}}{\text{Körpergröße [m]}^2}$$

WHR (Waist-to-Hip-Ratio): 
$$WHR = \frac{\text{Taillenumfang [cm]}}{\text{Hüftumfang [cm]}}$$

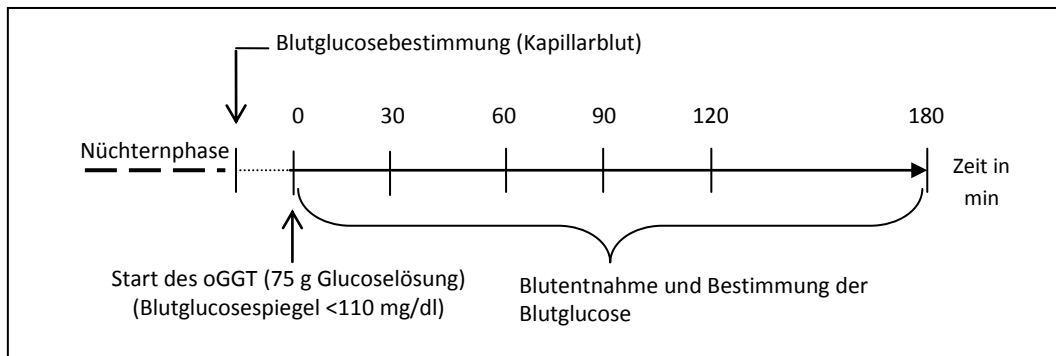
**Formel 3:** Berechnungsformeln für die Parameter BMI (Body mass index) und WHR (Waist-to-Hip-Ratio).

##### 2.3.4.2. Oraler Glucosetoleranztest (oGTT)

Zur Charakterisierung des individuellen Glucosestoffwechsels, wurde bei jedem Probanden der MeSyBePo-Studie ein oGTT durchgeführt (Abbildung 11). Bei Probanden mit einem bereits diagnostizierten Diabetes oder einem zu hohen Nüchternblutglucosespiegel (>110 mg/dl) zum Rekrutierungsbeginn (keine Durchführung eines oGTTs) wurden der Nüchternblutglucose- und der



Nüchterninsulinspiegel und zusätzlich GAD (Glutaminsäure-Decarboxylase Antikörper) und IA (Insulinantikörper) bestimmt, um eine Unterscheidung zwischen T2DM und T1DM zu ermöglichen.



**Abbildung 11:** Schematischer Ablauf des oralen Glucosetoleranztests (OGTT) in MeSyBePo und den anderen Interventionsstudien (2.3.1. und 2.3.2.).

#### 2.3.4.3. Blutparameter

Aus dem Vollblut wurden weitere Parameter wie Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten und Leukozyten bestimmt. Der Gehalt an Hb<sub>A1c</sub> wurde mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) ermittelt. Aus Serum bzw. Plasma (Aliquot-Lagerung bei -80 °C) wurden Triglyceride (TG) (ABX Pentra, Axon Lab AG, Stuttgart, Deutschland), freie Fettsäuren (NEFA), Cholesterole (ABX Pentra, Axon Lab AG, Stuttgart, Deutschland) und HDL (ABX Pentra, Axon Lab AG, Stuttgart, Deutschland) nach Anleitung bestimmt. Des Weiteren wurde berechnet:

$$LDL [mmol/l] = Cholesterol [mmol/l] - \frac{TG [mmol/l]}{2,2} - HDL [mmol/l]$$

**Formel 4:** Berechnungsformel des LDL-Gehalts im Serum.

#### 2.3.4.4. Klassifizierungen

Aufgrund der erfassten metabolischen und anthropometrischen Parameter wurden die Probanden für die Betrachtung verschiedener Endpunkte (BMI, Diabetes mellitus Typ 2) klassifiziert.

**Tabelle 10:** Klassifizierung des Körpergewichtes nach dem BMI (WHO).

Kategorie	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	
Untergewicht	<19	
Normalgewicht	19-24,99	
Präadipositas	25-29,99	≥25 Übergewicht
Adipositas Grad I	30-34,99	
Adipositas Grad II	35-39,99	
Adipositas Grad III	>40	

In Tabelle 11 ist die Einteilung der Probanden entsprechend ihres Glucosestoffwechsels dargestellt. Inzwischen wurden die Grenzwerte für eine gestörte Nüchternblutglucose von der American Diabetes Association [87] von 110 auf 100 mg/dl (venöse PlasmaGlucose) herabgesenkt, was einer kapillaren Vollblutglucose von 100 auf 90 mg/dl entspricht. Die Probanden der MeSyBePo-Studie wurden nach den geltenden Richtlinien zum Zeitpunkt des Beginns der Studie eingestuft, d.h. auf der Grundlage der Kriterien von 2002.

**Tabelle 11: Klassifizierungskriterien für die Einstufung des individuellen Status des Glucosestoffwechsels nach Daten aus MeSyBePo.**

NG- normaler Glucosestoffwechsel, IFG- impaired fasting glucose (gestörte Nüchtern-glucose), IGT- impaired glucose tolerance (gestörte Glucosetoleranz), T2DM- Typ 2 Diabetes mellitus; T1DM- Typ 1 Diabetes mellitus, GAD- Glutaminsäure Decarboxylase Antikörper, IA-Insulinantikörper.

	GAD (U/ml)	IA (U/ml)	Nüchtern-Blutzucker (mg/dl)	Blutzucker 120 Min (mg/dl)
<b>NG = Kontrollen</b>	<0,9 oder fehlend	<0,75 oder fehlend	<100	<140
<b>IFG</b>	<0,9 oder fehlend	<0,75 oder fehlend	100-109,99	<140
<b>IGT</b>	<0,9 oder fehlend	<0,75 oder fehlend	<100	140-199,99
<b>IFG+IGT</b>	<0,9 oder fehlend	<0,75 oder fehlend	100-109,99	140-199,99
<b>T2DM</b>	<0,9 oder fehlend	<0,75 oder fehlend	≥110	≥200
<b>T1DM</b>	≥0,9	≥0,75		
<b>keine Aussage</b>				

#### 2.3.4.5. Indizes des Glucosemetabolismus

Aus den verschiedenen Werten vor und während des oGTTs wurden Indizes zur Charakterisierung der Insulinsensitivität bzw. der Insulinsekretion berechnet. Zur Abschätzung der Insulinresistenz und beta-Zellfunktion kann mittels des Computermodells „Homeostasis Model Assessment“ ( $HOMA_{IR}$ ) aus dem basalen Plasmaspiegel von Insulin und Glucose bestimmt werden. Dabei wurde angenommen, dass gesunde Probanden unter 35 Jahren eine  $\beta$ -Zellfunktion von 100% und eine Insulinsensitivität von „eins“ aufweisen.

- (1) Insulinsensitivität aus den Nüchternwerten  $HOMA_{IR}$

$$HOMA_{IR} = \frac{Insulin_{0\ min} \cdot Glucose_{0\ min}}{18,02 \cdot 22,5}$$

- (2) Insulinsensitivität aus Messungen des OGTT nach *Stumvoll et al.[88]*

$$ISI_{S3} = 0,157 - 0,00004576 \cdot Insulin_{120\ min} \cdot 7,175 - 0,000299 \cdot Insulin_{0\ min} \cdot 7,175 - \frac{0,00519 \cdot Glucose_{90\ min}}{18,02}$$

**Formel 5:** Formeln zur Berechnung der Insulinsensitivität –  $HOMA_{IR}$  und  $ISI_{S3}$

#### 2.3.4.6. DNA-Isolierung und Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Kohorte wurde der TaqMan-Assay (5'-Nuklease-Allelic-Discrimination-Assay) mittels ABI PRISM 7900 HT Sequenzdetektionssystem (Applied Biosystems, Foster City, USA) genutzt. Die zur Genotypisierung verwendeten DNA-Proben wurden aus dem Vollblut der Studienteilnehmer mittels AGOWA-mag-Maxi DNA Isolation Kit (AGOWA GmbH, Berlin, Deutschland) extrahiert. Für den TaqMan-Assay wurde jeweils ca. 2 ng DNA eingesetzt. Die Analyse erfolgte in 384-Well-Mikrotiterplatten sowie Ampli-Taq-Gold-DNA-Polymerase (Applied Applied Biosystems, Foster City, USA). Dazu wurde der entsprechende Costumer-Mix (ready-to-use) (Applied Biosystems, Foster City, USA) dazugegeben, die die entsprechenden Sonden (200 nM) und Primer (900 nM) enthielt (Tabelle 12).

Die den SNP umgebende Region (100-150 bp) wird mittels PCR in Gegenwart zweier PCR-Primer amplifiziert. Die speziellen TaqMan-Sonden sind Oligonukleotide, von denen eine perfekt komplementär („perfect match“) zur Wildtyp-Sequenz und die andere perfekt komplementär zur SNP-tragenden Sequenz ist. Die Sonden sind dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche mit FAM (6-Carboxyfluorescein) oder VIC bezeichnet werden.

**Tabelle 12: Verwendete Sonden für die Genotypisierung der SNP rs3753519 und rs846910 im Promotorbereich der 11beta-HSD1 und der SNP rs6688832 im Exon 5 der Hexose-6-Phosphat Dehydrogenase (H6PD).**

Fett dargestellt sind die entsprechenden Allelvarianten.

Sequenz Sonde 1	Sequenz Sonde 2		Sonden-Label 1	Sonden-Label 2
<b>CATTTTGTCTTTATTATTTT</b>	ATTTTGTCTTTATTACTTTT	rs3753519 (-2677) T/C	FAM	VIC
<b>CTGGTGGGAATGAT</b>	TCTGGTGAGAATGAT	rs846910 (-2937) A/G	VIC	FAM
<b>CTGTGCGGGAGCG</b>	CTGTGCAGGAGCG	rs6688832 G/A	VIC	FAM

## 2.4. Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden mittels SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) analysiert. Alle experimentellen Datensätze wurden mittels Student-T-Test verglichen.

Folgende genetische Modelle wurden betrachtet: additiv (jeder Genotyp für sich), rezessiv (homozygote Wildtyp-Allelträger und Heterozygote-Allelträger vs. Träger des homozygot mutierten Allels) und dominant (homozygote Wildtyp-Allelträger vs. Heterozygote-Allelträger und homozygote Träger des mutierten Allels). Bei Polymorphismen die eine Frequenz kleiner 5% des homozygoten Mutanten aufwiesen, wurde ausschließlich das dominante Model angewendet.

Alle Parameter die nach „Kolmogorov-Smirnov“-Test nicht-normalverteilt waren, wurden mittels Logarithmierung transformiert. Bei der Betrachtung der verschiedenen Parameter wurden Personen mit T1DM ausgeschlossen, um den Effekt der Polymorphismen unabhängig von Krankheitsbildern beurteilen zu können. Die Mittelwertvergleiche wurde mittels ein-faktoriellen ANOVA durchgeführt, um einen ersten Effekttrend zu ermitteln. Zur Kalkulation der Effekte der Allele auf mögliche Endpunkte (BMI, Diabetes mellitus Typ 2) wurde im allgemein linearen Model (GLM) betrachtet. Dabei wurden Einflussgrößen wie Alter, Geschlecht und BMI als Kovariaten eingeschlossen, welche selbst einen starken Einfluss auf betrachtete Parameter haben könnten, zu korrigieren (adjustieren).

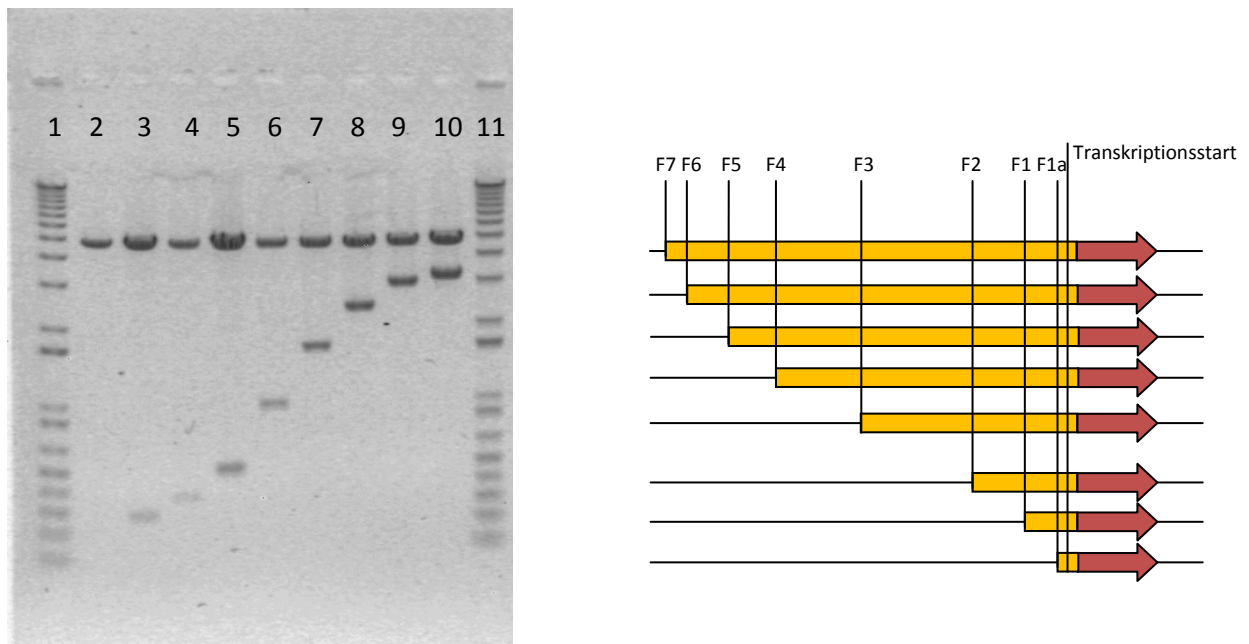


### 3. RESULTATE

#### 3.1. Charakterisierung des Promotorbereiches

##### 3.1.1. Klonierung der Promotorfragmente

Es wurden 8 verschiedene Promotorfragmente mit 5'-Deletion kloniert. Als Grundlage diente die DNA eines jungen gesunden männlichen Probanden ohne SNP mit geringer Allelfrequenz.

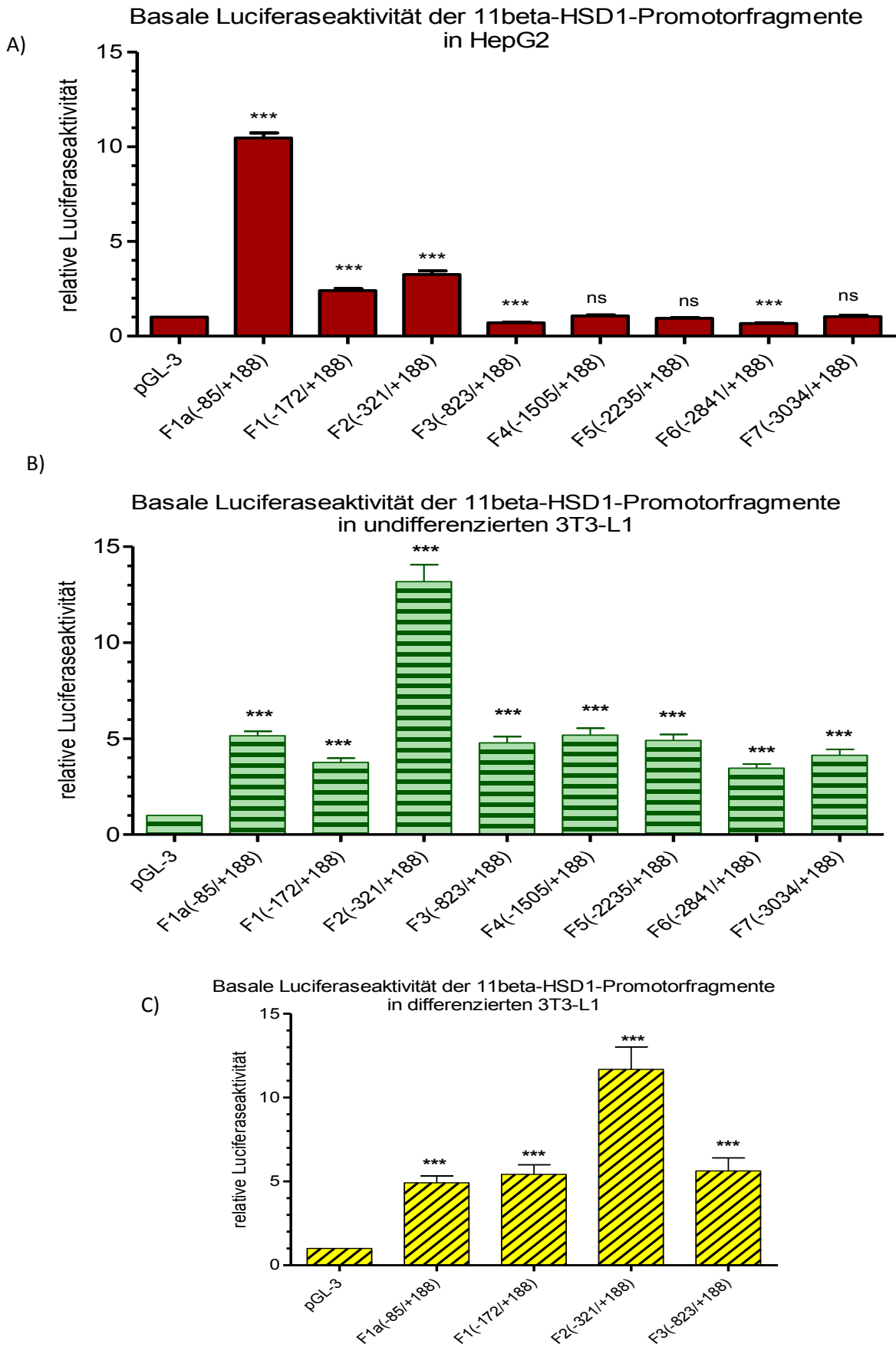


**Abbildung 12:** Links: Analytischer Verdau der klonierte pGL-3-Vektoren mit den Promotorfragmenten F1a (Bahn 3) bis F7 (Bahn 10) sowie den leeren Kontrollvektor (Bahn 2). Rechts: Schematische Darstellung der klonierten Promotorfragmente (gelb) mit dem 3'-anschließenden Luciferase-Gen (rot).

##### 3.1.2. Luciferase-Assay zur Bestimmung der basalen Promotoraktivitäten in verschiedenen Zellsystemen

Es konnte in den 3 Zellmodellen – HepG2 als Leberzellmodell, undifferenzierte 3T3-L1 als Adipozyten-Vorläuferzellen sowie differenzierten 3T3-L1 als Adipozytenmodell – gezeigt werden, dass der Promotor zellspezifisch reguliert wird.

In der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 zeigte sich die maximale basale Promotoraktivität ( $10,47 \pm 0,26$ ) im Bereich zwischen +188 und -85 (Fragment F1a). Im weiteren downstream-Bereich ab -86 sank die Aktivität auf ca. 23% der maximalen Aktivität ab. Ab dem downstream-Bereich -322 wirkte zudem ein starker Repressor, der die Luciferase-Aktivität der folgenden Promotorfragmente auf 10% der maximalen Aktivität sinken lässt (Abbildung 13A).



**Abbildung 13:** Relative basale Luciferase-Aktivitäten in A) HepG2 (n=46) B) undifferenzierten 3T3-L1 (n=40) und C) differenzierten 3T3-L1 (n=26) Zellen ohne Stimulation und im serumfreien Medium; leerer pGL-3-Vektor wurde auf 1 gesetzt; \*\*\*P≤0,001, \*\*P≤0,01, \*P≤0,05.

In undifferenzierten und differenzierten murinen 3T3-L1-Zellen – als Modell für Präadipozyten und Adipozyten - zeigte sich die maximale Promotoraktivität erst im Bereich von -173 bp und -321 bp (Abbildung 13B und C). Die Höhe der Aktivität im Promotorfragment F2 unterschied sich dabei deutlich von HepG2-Zellen ( $13,16 \pm 0,88$  (3T3-L1) vs.  $5,25 \pm 0,75$  (HepG2)).

Ebenfalls sank in den 3T3-L1-Zellen die Luciferase-Aktivität ab den Promotorfragment F3 deutlich ab. So hatten die Promotorfragmente F4 bis F7 in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen durchschnittlich nur noch eine Luciferase-Aktivität von 26-38% der maximalen Aktivität des Fragments F2 (Abbildung 13B und C). In den ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen reduzierte sich die Luciferase-Aktivität des Promotorfragmentes F3 nur auf ca. 48% der Maximalaktivität und war somit ähnlich hoch wie in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen. Die Aktivität des Fragmentes F2 in den differenzierten 3T3-L1-Zellen fiel dabei etwas aus geringer als in den undifferenzierten Zellen ( $11,67 \pm 1,34$  vs.  $13,16 \pm 0,88$ ). Das Muster der Luciferase-Aktivitäten der einzelnen Promotorfragmente war jedoch relativ homogen.

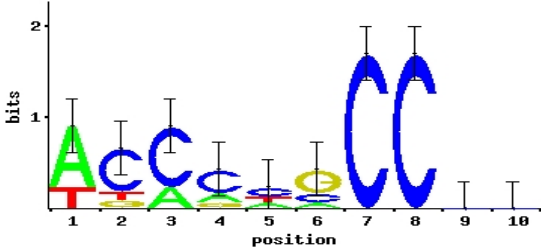
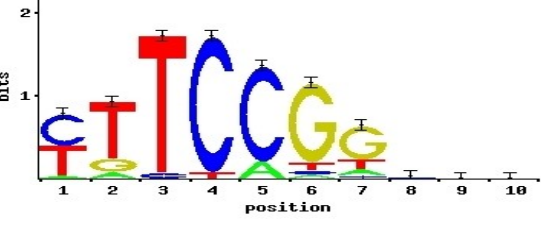
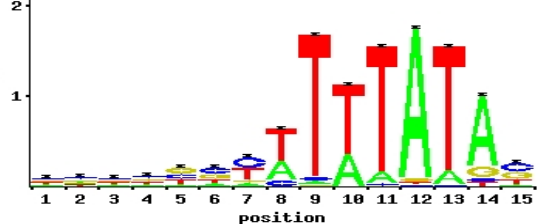
### 3.1.3. Sequenzstruktur um den Transkriptionsstart

Der Promotorbereich der 11beta-HSD1 besitzt am Beginn des Translationsstarts eine typische INR-Struktur an der +1-Position. Darüberhinaus findet man weitere Elemente, die für den POLII-Komplex von Bedeutung sein könnten. Dabei sind in diesem Bereich 2 alternative Muster zu erkennen. Auf dem Positiv-Strang (+Strang) sind putative Bindungsstellen für ELK-1 und SP-1 im Bereich zwischen -219 und -163 zu finden, welche typisch für TATA-lose Promotoren sind. Des Weiteren ist ein Downstream Core Promotor Element (DPE) für die Bindung des TFIID des POL-Komplexes an der typischen Position um +30 bp lokalisiert (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Analyse der putativen Promotorelemente in Bezug auf Position und Übereinstimmung.**

Die Konsensus-Sequenzen als Abbildung stammen aus der Jaspar-Datenbank und stellen die Bindungsmatrizen (weight matrix) dar, welche die Verteilung und Häufigkeit der Base an einer Position mathematisch gewichtet wiedergibt. Bereiche und Sequenz der putativen Bindungsstellen sowie deren Orientierung, die mit der Bindungsmatrix/ Konsensussequenz im 11beta-HSD1-Promotor übereinstimmen, sind gelb-markiert. Gelb-markierte kursive Basen stellen diejenigen dar, welche in der Matrix die geringste Wahrscheinlichkeit haben.

	Consensus-Sequenz	gefundene Sequenz (rel. Zu +1)
<b>+ Strang</b>		
SP-1		<b>G G T A G G G A</b> (-219 bis -211)
ELK-1		<b>C T G G A A G</b> (-171 bis -163)

	Consensus-Sequenz	gefundene Sequenz (rel. Zu +1)
+1 / INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	T C A C A A T (-2 bis +5)
DPE (Downstream Core Promotor Element)	A/G G A/T C G T G	G G A G G T T (+27 bis +33)
<b>- Strang</b>		
SP-1 (reverse Komplementär)		T C C C A C C C (-85 bis -77) A G C C T C C C (-22 bis -13)
ELK-1 (reverse Komplementär)		C T T C A G G (+75 bis +82)
TATA (reverse Komplementär)		G A A A A T A C (+96 bis +112)

Das zweite Muster zeigt sich auf den Negativ-Strang (-Strang). Hier sind eine TATA-Box, eine mögliche DPE sowie SP-1 und ELK-1 lokalisiert. Alle finden sind in typischen Abständen zueinander und in reverser komplementärer Orientierung. Die Ausnahme bildet dabei die Position der TATA-Box, welche sich upstream von der +1-Position und dem INR-Komplex im Bereich von +96 bis +112 befindet (Tabelle 13).

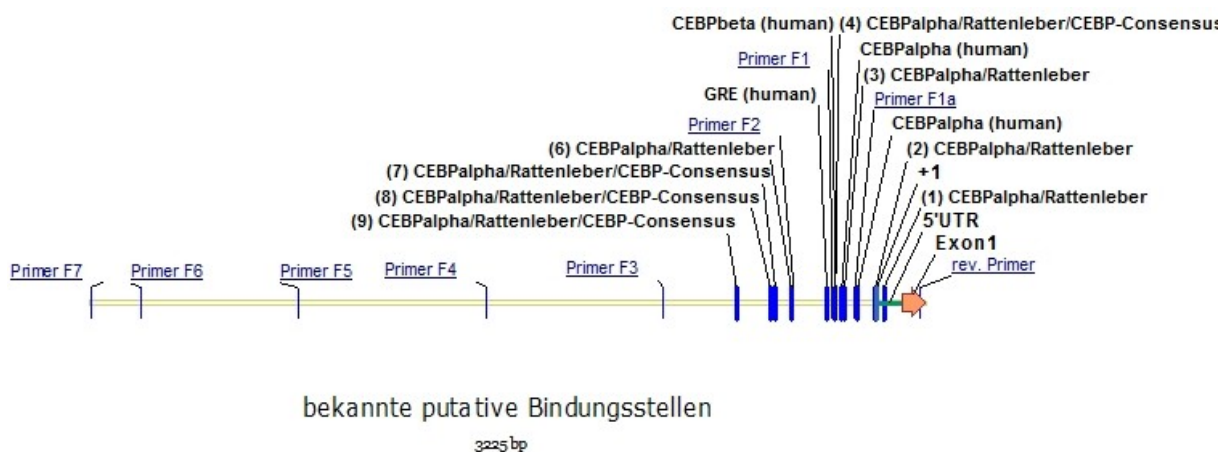
#### 3.1.4. Putative Bindungsstellen im distalen Promotorbereich der 11beta-HSD1

Die in der *in-Silico*-Analyse gefundenen putativen Bindungsfaktoren sind größtenteils DNA-bindende Faktoren ohne bekannte Funktion oder Bedeutung. Eine Überprüfung in Datenbanken zeigte, dass alle gefundenen Transkriptionsfaktoren sowohl in der Maus als auch im Menschen exprimiert werden. Im untersuchten Promotorbereich sind zudem auch eine Reihe möglicher Bindungsstellen für Nuklearrezeptoren wie u.a. dem Glucocorticoidrezeptor oder PPARgamma zu finden, welche

bekanntem Signalwegen zugeordnet werden können. Darüberhinaus befinden sich in relativ regelmäßigen Abständen mögliche Bindungsstellen für strukturverändernde Proteine (Chromatinremodeling Factors) wie z.B. SWI/SNF-related Proteins. Des Weiteren ergaben sich Hinweise, dass einige Faktoren dem CLOCK-System (CLOCK, BMAL1, rev-erb alpha) zugeordnet werden können, was eine circadiane Regulation des 11beta-HSD1-Promotors wahrscheinlich macht. Weitere Transkriptionsfaktoren sind aus der Insulinsignalkaskade (CREB, FOXO) oder der Inflammationsmediation (NF-kappaB) bekannt.

### 3.1.5. Position ausgewählter putativer C/EBP-Bindungsstellen im Promotorbereich

In früheren Arbeiten wurde bereits der Promotor des Pavian und der Ratte untersucht. Weiterhin wurden Teile des Promotorbereiches des Menschen und der Maus näher charakterisiert. Dabei konnte eine Vielzahl von Bindungsstellen für C/EBP-Proteine im Rattenpromotor gefunden werden (Abbildung 14). Im Vergleich mit dem humanen Promotor konnten einige dieser Bindungssequenzen ebenfalls mit geringen Fehlpaarungen wiedergefunden werden (Abbildung 6). Jedoch stimmte nur eine humane C/EBPbeta-Bindungsstelle direkt mit einer Bindungsstelle für C/EBPalpha aus dem Rattenpromotor (Nr. 4) überein. Weitere humane bekannte C/EBP-Bindungsstellen konnten nicht mit denen aus dem Rattenpromotor überlagert werden.



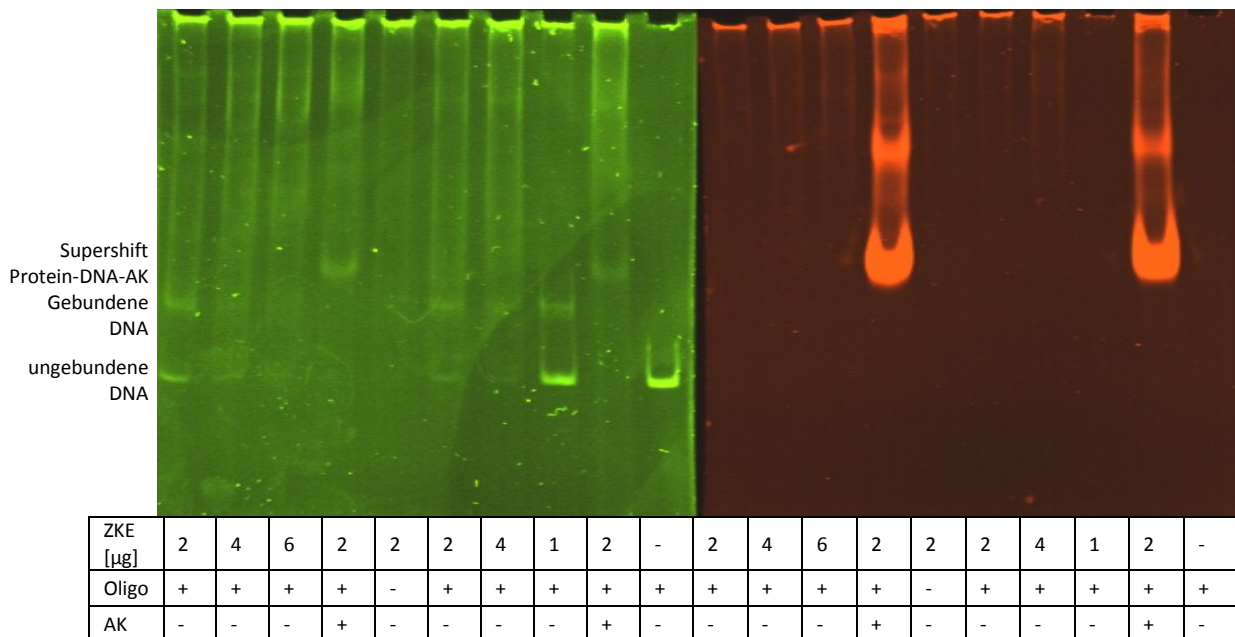
**Abbildung 14:** Darstellung der Bindungsstellen im klonierten Promotorbereich für C/EBP-Proteine sowie GR, die in der Literatur bereits beschrieben worden sind. Grundlage sind dafür Promotoranalysen aus Menschen, Maus bzw. Ratte.

### 3.1.6. Nachweis der Bindung von ausgewählten Transkriptionsfaktoren an den Promotorbereich der 11beta-HSD1 mittels EMSA

#### 3.1.6.1. Bindung von TBP an eine inverse atypische TATA-Box

Mittels des Oligos mit der inversen atypischen TATA-Box, die im Bereich von +96 bis +112 auf dem Negativ-Strang lokalisiert ist, konnte gezeigt werden, dass es zu einer Bindung von Proteinen in diesem Bereich in beiden Zelltypen kam. Durch Zusatz eines spezifischen Antikörpers gegen TBP war in beiden Zellextrakten (HepG2 und undifferenzierte 3T3-L1) ein Supershift zu erkennen (Abbildung 15). Die Bindung des TBP schien in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen variabel zu sein, da auch mit zu anderen Zeitpunkten gewonnenen unstimulierten Zellkernextrakten kein Supershift zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Dies kann mit der Konfluenz der Zellen zusammenhängen. Zudem war die

Supershift-Reaktion spezifisch (Daten nicht gezeigt). Unter 10 nM GIP- bzw. 1 µM Rosiglitazon-Stimulation war gegenüber der Kontrolle keine Veränderung zu erkennen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15:** Nachweis der Bindung eines TATA-Binding Protein (TBP) mit HepG2- und undifferenzierten 3T3-L1-Zellkernextrakten (ZKE) mittels EMSA und Supershift durch ein TBP-Antikörper. Links in Grün dargestellt die Oligo-DNA nachgewiesen mit SYBRgreen und Rechts in Rot die nachgewiesenen Proteine mittels SYBRruby.

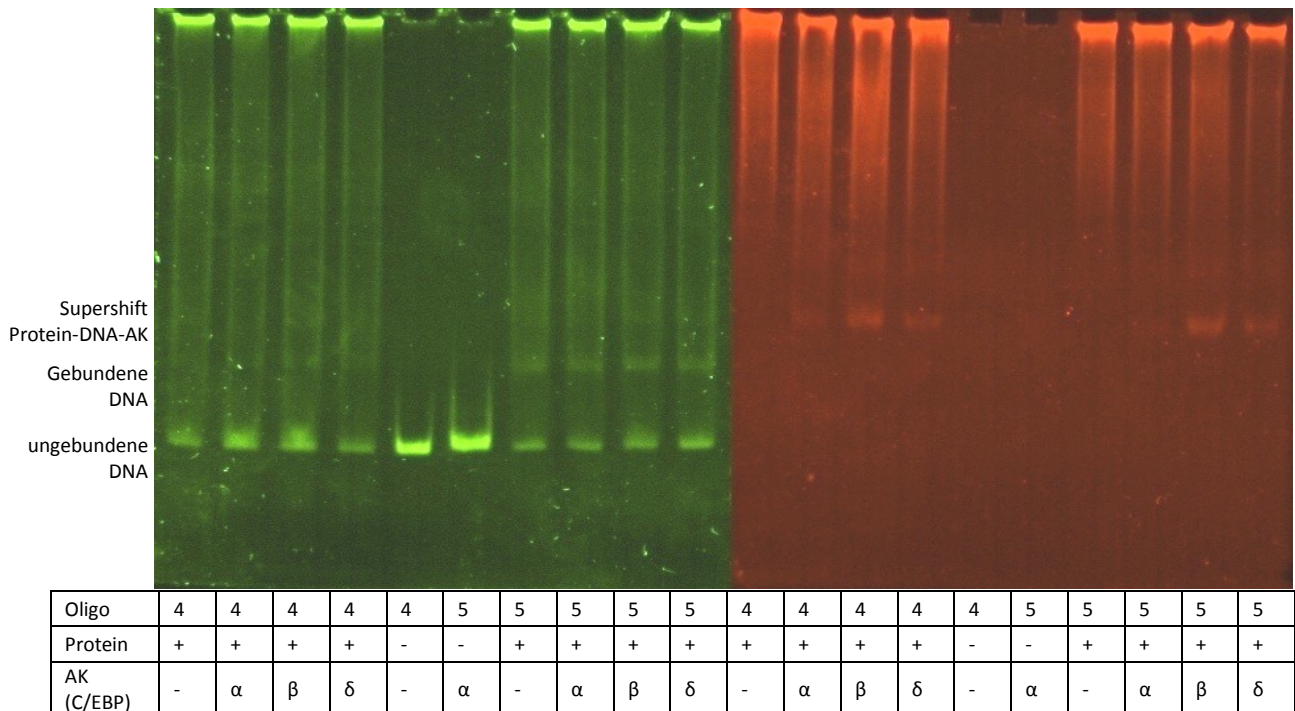
### 3.1.6.2. Nachweis der Bindung von C/EBP-Proteinen an verschiedene Bereiche des 11beta-HSD1-Promotors

Mit Hilfe der *in-Silico*-Analyse konnten bis zur Position -823 bp sechs putative C/EBP-Bindungsstellen gefunden werden. Bei der Analyse des 11beta-HSD1-Promotors der Ratte wurden sogar bis zu 9 mögliche Bindungsstellen nachgewiesen. Daher wurden verschiedene Oligos (~70 bp) produziert, die entsprechende Bindungsstellen abdeckten (Abbildung 6).

Es zeigte sich, dass die Bindung der C/EBP-Proteine an die Oligos 2 (alpha ≈ beta ≈ delta) und Oligo 3 (beta > alpha ≈ delta) in Promotorfragment F1a im Vergleich zu den Oligos 4 und 5 relativ schwach war (Daten nicht gezeigt). In den Oligos 4 und 5, die im Promotorfragment F1 lokalisiert sind, gibt es mindestens 2 putative Bindungsstellen. Eine wurde als C/EBPalpha-Bindungsstellen in der Rattenleber charakterisiert. Mit den unstimulierten HepG2-Zellkernextrakten zeigte sich jedoch hauptsächlich eine Bindung des C/EBPbeta an das Oligo 4, wo eher eine Bindung von C/EBPalpha vermutet wurde. Jedoch zeigte sich auch eine schwache Bindung für C/EBPalpha und -delta. Es ist möglich, dass noch mehr Faktoren an dieses Oligo binden, da die Bande der gebundenen DNA im Vergleich zum Oligo 5 schwächer sind. Im Oligo 5 gibt es 2 mögliche Bindungsstellen, die je nach Spezies für C/EBPalpha (Ratte) oder für C/EBPalpha bzw. -beta definiert wurden. Im EMSA zeigte sich jedoch hauptsächlich eine Bindung von C/EBPbeta und nur eine geringe Bindung von C/EBPdelta. Die Bindung eines C/EBP-Proteins an das Oligo 6 (Fragment F2) war kaum nachweisbar und eher unwahrscheinlich (Daten nicht gezeigt).

In den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zeigte sich für alle untersuchten Oligonukleotide (2 bis 5) eine gleichmäßige Bindung aller 3 Isoformen an die DNA. Zudem zeigen alle 3 C/EBP-Proteine ein ähnliches Aktivierungspotential auf die Promotorfragmente (Tabelle 15).





**Abbildung 16:** Nachweis der Bindung von C/EBP-Bindungsstellen mit HepG2-Zellkernextrakten mittels EMSA und Supershift durch ein C/EBP-Antikörper (CEBPalpha, -beta bzw. -delta). Links in Grün dargestellt die Oligo-DNA nachgewiesen mit SYBRgreen und Rechts in Rot die nachgewiesenen Proteine mittels SYBRruby.

### 3.1.6.3. Transaktivierungspotential der C/EBP-Proteine auf die 11beta-HSD1-Promotorfragmente

Insbesondere die Proteine C/EBPalpha und C/EBPbeta zeigten unterschiedliche Effekte auf die Transaktivierung der 11beta-HSD1. So war die Aktivierung durch C/EBPbeta in den HepG2-Zellen wesentlich schwächer als durch C/EBPalpha. In den Promotorfragmenten häufen sich insbesondere im proximalen Bereich putative bzw. nachgewiesene Bindungsstellen (Abbildung 14). Aber auch im Fragment F5 kommt es zur Häufung von möglichen Bindungsstellen.

Die höchsten Luciferase-Aktivitäten in HepG2-Zellen wurden durch C/EBPalpha und -delta erreicht. Die sehr hohen Aktivierungspotentiale waren jedoch abhängig von der Isoformen und den Promotorfragmenten. Dies war insbesondere bei C/EBPalpha und -delta in den Fragmenten F2, F5 und F7 zu sehen. Unter C/EBPbeta-Kotransfektion war nur ein Bruchteil der Aktivierung zu sehen. Im Schnitt lag die Luciferase-Aktivität dabei zwischen dem 3- bis 6-fachen ggü. der basalen Luciferase-Aktivität (Tabelle 14).

Da die C/EBP-Isoformen nicht nur Homodimere bilden, sondern auch Heterodimere untereinander, wurde auch die Kotransfektion in Kombination untersucht. Es zeigte sich, dass C/EBPalpha mit C/EBPbeta nur bei bestimmten Promotorfragmenten ein reduziertes Aktivierungspotential in HepG2-Zellen verursachte. Dies waren F1, F4 und F5. Auch bei der Kombination von C/EBPdelta und -beta ergab sich eine Reduktion in diesen Promotorfragmenten. Interessanterweise galt das auch für die Kombination von C/EBPalpha und -delta (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Relative Luciferase-Aktivität der 11beta-HSD1-Promotorfragmente unter Kotransfektion der C/EBP-Proteine in HepG2-Zellen.**

C/EBPalpha, -beta, -delta Kotransfektion ggü. nicht stimulierten, nicht kotransfizierten HepG2-Zellen (MW ± SD).

	C/EBPalpha	C/EBPbeta	C/EBPdelta	C/EBPalpha + beta	C/EBPalpha + delta	C/EBPdelta+ beta
F1a	7,98 ± 0,40	4,02 ± 0,53	8,24 ± 0,62	7,86 ± 1,48	8,14 ± 1,18	7,40 ± 0,90
F1	30,92 ± 2,76	5,85 ± 1,21	24,40 ± 4,42	20,44 ± 2,26	20,32 ± 1,80	14,17 ± 1,66
F2	16,94 ± 1,80	2,92 ± 0,76	9,33 ± 2,05	15,35 ± 2,37	19,15 ± 4,00	10,31 ± 0,80
F3	48,97 ± 15,11	6,51 ± 1,60	32,94 ± 8,93	46,28 ± 6,44	57,95 ± 3,58	30,26 ± 3,21
F4	31,09 ± 8,48	5,78 ± 1,37	31,91 ± 11,29	16,73 ± 3,29	23,00 ± 4,51	9,00 ± 1,37
F5	25,62 ± 3,22	2,66 ± 0,42	11,89 ± 1,94	16,24 ± 1,44	23,51 ± 1,94	6,46 ± 0,42
F7	47,97 ± 14,79	3,38 ± 1,25	21,01 ± 8,89	42,29 ± 8,47	60,76 ± 11,23	26,84 ± 6,91

Die Kotransfektionen der C/EBP-Proteine in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zeigten ein geringes 2- bis 4-faches Aktivierungspotential für die Promotorfragmente. Insbesondere das längste Fragment zeigt die höchsten Werte. Es war keine wesentliche Veränderung ggü. der Kotransfektion von C/EBPbeta zu beobachten. Auch die Kombination der verschiedenen Isoformen ergab keine Veränderung in den Aktivierungspotentialen im Vergleich zu den Homodimeren (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Relative Luciferase-Aktivität der 11beta-HSD1-Promotorfragmente unter Kotransfektion der C/EBP-Proteine in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen.**

C/EBPalpha, -beta, -delta-Kotransfektion ggü. nicht stimulierten, nicht kotransfizierten undifferenzierten 3T3-L1-Zellen (MW ± SD).

	C/EBPalpha	C/EBPbeta	C/EBPdelta	C/EBPalpha + beta	C/EBPalpha + delta	C/EBPbeta + delta
F1a	3,23 ± 0,40	2,91 ± 0,39	2,56 ± 0,16	3,76 ± 0,01	3,51 ± 0,46	3,38 ± 0,10
F1	3,83 ± 0,83	2,82 ± 0,19	4,40 ± 0,86	4,83 ± 0,49	4,59 ± 0,22	3,85 ± 0,19
F2	2,35 ± 0,35	2,04 ± 0,03	2,49 ± 0,04	2,26 ± 0,26	2,28 ± 0,32	2,46 ± 0,15
F3	3,70 ± 0,46	2,68 ± 0,33	4,15 ± 0,002	3,51 ± 0,26	3,60 ± 0,09	3,24 ± 0,51
F4	2,58 ± 0,06	1,94 ± 0,12	2,40 ± 0,20	3,15 ± 0,91	3,30 ± 0,66	3,63 ± 0,97
F5	2,75 ± 0,02	2,51 ± 0,23	3,42 ± 0,34	3,55 ± 0,62	3,40 ± 0,69	3,28 ± 0,37
F7	5,05 ± 1,37	3,08 ± 0,59	6,59 ± 2,24	4,30 ± 0,42	4,15 ± 0,53	3,80 ± 0,44

### 3.1.7. Vergleich der Promotoraktivität mit dem mRNA-Level der 11beta-HSD1

#### 3.1.7.1. Vergleich der Promotoraktivität mit dem mRNA-Level der 11beta-HSD1 in undifferenzierten 3T3-L1 Zellen

Der Vergleich der relativen mRNA-Level mit den Luciferase-Aktivitätsdaten zeigte bis auf einige Substanzen, dass die Tendenz sowie Stärke der Regulation übereinstimmen. Bei der Arachidonsäure (Ratio 2), Linolensäure (Ratio 2 und 6) und Rosiglitazon zeigten sich jedoch gegensätzliche Regulationsrichtungen. So scheinen diese Substanzen unterschiedliche akute bzw. chronische Effekte auf die Regulation der 11beta-HSD1 in den undifferenzierten 3T3-L1 Zellen zu haben. Diese Tatsache liegt den Testsystemen zugrunde, da die mRNA bereits nach 1 Stunde isoliert wurde, die Luciferase-Daten jedoch erst nach ca. 40 Stunden erhoben wurden.



**Tabelle 16: Vergleich der relativen 11beta-HSD1 mRNA-Menge mit den relativen Stimulationseffekten aus den Luciferase-Assays in undifferenzierten 3T3-L1 Zellen.**

Weiterhin sind angegeben die minimalste und maximalste relative Luciferase-Aktivität der Promotorfragmente aus den Stimulationsassays. Die relative Veränderung der 11beta-HSD1 mRNA ggü. dem Kontrollmittelwert sind als MW  $\pm$  SD dargestellt (n=4). Die Signifikanzlevel der mRNA sind gegen die Kontrollen mittels T-Test berechnet. Fett dargestellte Werte zeigen eine annähernde Übereinstimmung zwischen den mRNA- und Luciferase-Ergebnissen.

<b>mRNA und Luciferase-Aktivität in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen</b>		
	<b>mRNA</b>	<b>relative Luciferase-Aktivität</b>
	<b>MW <math>\pm</math> SD (P-Wert)</b>	<b>der 11beta-HSD1-Promotorfragmente</b>
<b>Kontrolle 1</b>	<b>0,98 <math>\pm</math> 0,12 (0,691)</b>	
<b>Kontrolle 2</b>	<b>1,03 <math>\pm</math> 0,11 (0,676)</b>	
<b>Kontrollen (MW)</b>	<b>1,01 <math>\pm</math> 0,11</b>	
<b>WY-14643</b>	<b>1,76 <math>\pm</math> 0,59 (0,047)</b>	<b>1,32 - 1,92</b>
<b>Rosiglitazon</b>	<b>1,51 <math>\pm</math> 0,39 (0,044)</b>	<b>0,74 - 1,05</b>
<b>Insulin</b>	<b>0,81 <math>\pm</math> 0,24 (0,604)</b>	<b>0,46 - 0,69</b>
<b>Cortisol</b>	<b>1,22 <math>\pm</math> 0,33 (0,382)</b>	<b>0,90 - 1,71</b>
<b>1 nM GIP</b>	<b>1,29 <math>\pm</math> 0,17 (0,018)</b>	<b>0,88 - 1,29</b>
<b>10 nM GIP</b>	<b>0,86 <math>\pm</math> 0,06 (0,005)</b>	<b>0,65 - 0,84</b>
<b>IBMX</b>	<b>1,66 <math>\pm</math> 0,21 (0,025)</b>	<b>0,70 - 3,04</b>
<b>Palmitinsäure (Ratio 2)</b>	<b>1,60 <math>\pm</math> 0,16 (0,0003)</b>	<b>0,88 - 1,44</b>
<b>Palmitinsäure (Ratio 6)</b>	<b>1,62 <math>\pm</math> 0,34 (0,035)</b>	<b>1,19 - 1,56</b>
<b>Ölsäure (Ratio 2)</b>	<b>0,78 <math>\pm</math> 0,21 (0,124)</b>	<b>0,63 - 1,03</b>
<b>Ölsäure (Ratio 6)</b>	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,58 (0,031)</b>	<b>1,12 - 1,32</b>
<b>Arachidonsäure (Ratio 2)</b>	<b>1,40 <math>\pm</math> 0,46 (0,090)</b>	<b>0,44 - 0,64</b>
<b>Arachidonsäure (Ratio 6)</b>	<b>1,67 <math>\pm</math> 0,53 (0,048)</b>	<b>1,05 - 1,29</b>
<b>Linolsäure (Ratio 2)</b>	<b>1,20 <math>\pm</math> 0,32 (0,327)</b>	<b>0,84 - 1,07</b>
<b>Linolsäure (Ratio 6)</b>	<b>0,68 <math>\pm</math> 0,29 (0,105)</b>	<b>1,00 - 1,36</b>
<b>100 nM Beta-Estradiol</b>	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,21 (0,021)</b>	<b>0,66 - 1,00</b>
<b>100 nM Testosteron</b>	<b>1,36 <math>\pm</math> 0,23 (0,049)</b>	<b>1,09 - 1,49</b>

### 3.1.7.2. Vergleich der Promotoraktivität mit dem mRNA-Level der 11beta-HSD1 in ausdifferenzierten 3T3-L1 Zellen

Auch in den ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen zeigten sich Übereinstimmungen zwischen den Veränderungen in der mRNA und den Effekten auf die Promotorfragmente im Luciferase-Assay. Jedoch wurden nur die Fragmente F1a-F3 im Luciferase-Assay untersucht.

Insbesondere bei den Fettsäuren zeigten sich ebenfalls gegenteilige Tendenzen bzw. die Stärke der Effekte fiel geringer aus. Der PPARalpha-Agonist WY-14643 zeigte auf mRNA-Ebene eine Herunterregulation, aber eine deutliche Aktivierung der Promotorfragmente. Bei IBMX zeigten sich auf der mRNA-Ebene kein nennenswerter Effekt, jedoch eine deutliche Stimulation der Promotorfragmente.

Im Gegensatz zu den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen hatten einige Substanzen in den differenzierten 3T3-L1-Zellen keine nennenswerten Effekte mehr auf das mRNA-Level (z.B. einige Fettsäuren, Sexualhormone, IBMX) oder hatten gegenteilige Effekte im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen (z.B. 1nM GIP, die PPAR-Agonisten).

**Tabelle 17: Vergleich der relativen 11beta-HSD1 mRNA-Menge mit den relativen Stimulationseffekten aus den Luciferase-Assays in differenzierten 3T3-L1 Zellen.**

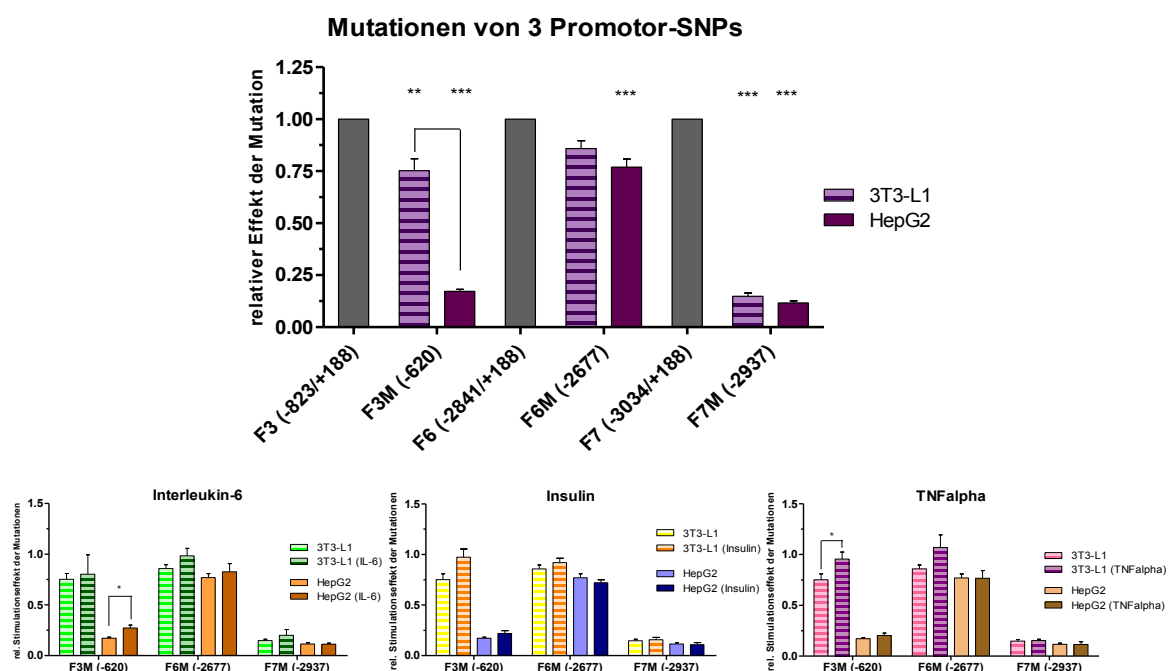
Weiterhin sind angegeben die minimalste und maximalste relative Luciferase-Aktivität der Promotorfragmente aus den Stimulationsassays. Die relative Veränderung der 11beta-HSD1 mRNA ggü. dem Kontrollmittelwert sind als MW ± SD dargestellt (n=4). Die Signifikanzlevel der mRNA sind gegen den Kontrollen mittels T-Test berechnet. Fett dargestellte Werte zeigen eine annähernde Übereinstimmung zwischen den mRNA- und Luciferase-Ergebnissen.

<b>mRNA und Luciferase-Aktivität in differenzierten 3T3-L1-Zellen</b>		
	<b>mRNA MW ± SD (P-Wert)</b>	<b>relative Luciferase-Aktivität der 11beta-HSD1-Promotorfragmente</b>
<b>Kontrolle 1</b>	0,90 ± 0,09 (0,652)	
<b>Kontrolle 2</b>	0,97 ± 0,25 (0,875)	
<b>Kontrolle (MW)</b>	0,95 ± 0,20	
<b>WY-14643</b>	0,59 ± 0,19 ( <b>0,025</b> )	1,11 - 1,52
<b>Rosiglitazon</b>	<b>0,60 ± 0,08 (0,008)</b>	<b>0,57 - 0,79</b>
<b>Insulin</b>	<b>0,55 ± 0,21 (0,009)</b>	<b>0,60 - 0,89</b>
<b>Cortisol</b>	<b>1,34 ± 0,10 (0,004)</b>	<b>1,01 - 1,45</b>
<b>1 nM GIP</b>	<b>0,48 ± 0,14 (0,002)</b>	<b>0,61 - 0,85</b>
<b>10 nM GIP</b>	<b>0,77 ± 0,15 (0,192)</b>	<b>0,57 - 0,79</b>
<b>IBMX</b>	<b>0,98 ± 0,20 (0,806)</b>	<b>0,94 - 1,32</b>
<b>Palmitinsäure (Ratio 2)</b>	0,92 ± 0,18 (0,877)	1,03 - 1,70
<b>Palmitinsäure (Ratio 6)</b>	0,53 ± 0,09 ( <b>0,012</b> )	0,87 - 0,99
<b>Ölsäure (Ratio 2)</b>	1,19 ± 0,21 (0,180)	1,55 - 3,29
<b>Ölsäure (Ratio 6)</b>	0,79 ± 0,29 (0,460)	1,42 - 1,61
<b>Arachidonsäure (Ratio 2)</b>	0,62 ± 0,19 ( <b>0,017</b> )	1,17 - 2,05
<b>Arachidonsäure (Ratio 6)</b>	<b>1,24 ± 0,44 (0,364)</b>	<b>1,10 - 1,46</b>
<b>Linolsäure (Ratio 2)</b>	<b>1,03 ± 0,09 (0,408)</b>	<b>0,94 - 1,21</b>
<b>Linolsäure (Ratio 6)</b>	1,23 ± 0,52 (0,441)	0,75 - 1,02
<b>100 nM Beta-Estradiol</b>	0,87 ± 0,17 (0,566)	
<b>100 nM Testosteron</b>	0,87 ± 0,13 (0,483)	

### 3.1.8. Charakterisierung mehrerer SNPs im Promotorbereich

Ein SNP im Promotorbereich kann Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen verändern und folglich die Transkription des Gens beeinflussen. Aus diesem Grund wurden 2 SNPs aus der Studie der Arizona-Pima-Indianer ausgewählt sowie nach Abgleich mit putativen Bindungsstellen ein dritter SNP im Promotorbereich näher betrachtet.

Der SNP an der Position -620 bp befindet sich in einer Bindungsstelle für „Transcriptional repressor CDP“. Durch Analyse mit MatInspector zeigte sich, dass der Basenaustausch zum Verlust der Bindungsstelle führen kann. Bei den SNPs an den Positionen -2677 und -2937 bp zeigten sich bei der *in-Silico*-Analyse keine direkten putativen Bindungsstellen bzw. in deren direkter Nachbarschaft.



**Abbildung 17:** Auswirkungen der SNPs rs860185 (-620), rs3753519 (-2677) und rs846910 (-2937) im Promotorbereich sowie der Stimulationseffekt von Insulin, Interleukin-6 und TNFalpha auf die Promotorfragmente F3, F6 und F7 sowie auf die enthaltenen SNPs. Oben als graue Balken dargestellt, sind die unmutierten Promotorfragmente, dessen relative Luciferase-Aktivitäten auf Eins gesetzt wurden. Unten darstellt, sind die relativen Effekte der mutierten Promotorfragmente sowie unter Stimulation; \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ .

Die Mutationen zeigten in den Transfektionsexperimenten teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit vom Zelltyp. Ebenfalls ergaben sich bei den Stimulationsexperimenten zellabhängige Ergebnisse.

Der SNP rs860185 an der Position -620 bp im Fragment F3 zeigte in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen einen Aktivitätsverlust um ca. 25%, hingegen sich in den HepG2-Zellen die Luciferase-Aktivität des mutierten Fragmentes F3 auf unter 25% reduzierte. Dieser Basenaustausch aber führte in HepG2-Zellen auch zu einem erhöhten Stimulationseffekt durch IL-6. In 3T3-L1-Zellen zeigte sich hingegen kein höherer Stimulationseffekt. Insulin erhöhte tendenziell die Luciferase-Aktivität in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen und verursachte einen geringeren Repressionseffekt als beim Wildtyp. Ebenfalls in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zeigte sich für den SNP an Position -620 bp eine erhöhte Promotoraktivität unter TNFalpha-Stimulation. Ursprünglich zeigte TNFalpha in den

undifferenzierten 3T3-L1-Zellen einen Repressionseffekt auf die unmutierten Fragmente. Durch den SNP (-620 bp) ging dieser verloren und TNFalpha zeigte einen leicht aktivierenden Effekt auf das Promotorfragment F3.

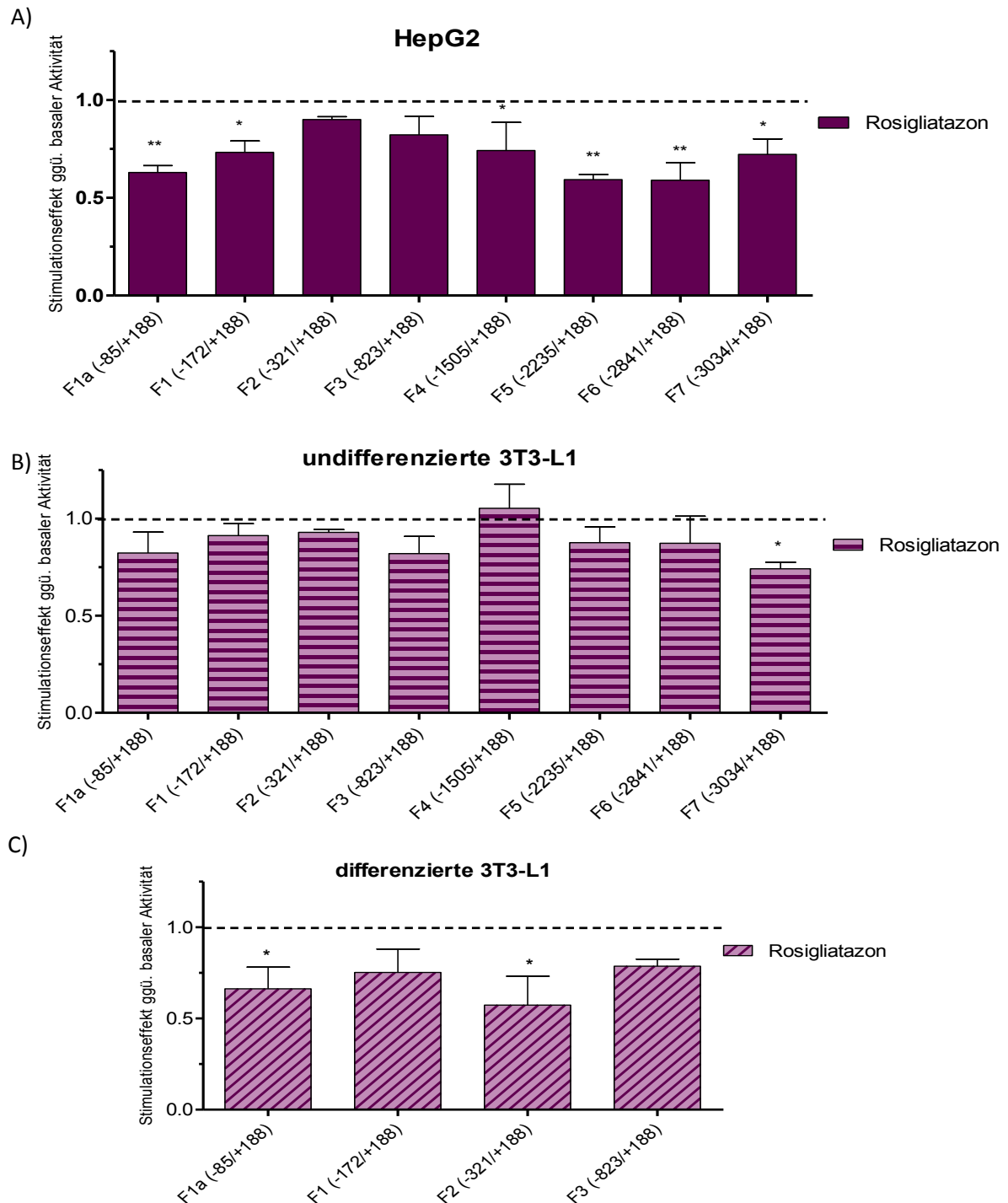
Der SNP rs3753519 an Position -2677 bp relativ zum Transkriptionsstart ist im Promotorfragment F6 lokalisiert. Dieser hat ebenfalls eine zellspezifische Wirkung. In undifferenzierten 3T3-L1-Zellen hatte der Basenaustausch keine wesentliche Wirkung. Hier kam es zu einer Absenkung auf 85% der basalen Promotoraktivität des unmutierten Fragmentes F6. In HepG2-Zellen betrug hingegen der Mutationseffekt 24%. In undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zeigte sich für alle 3 Stimulanzen tendenziell eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität.

Der SNP rs846910 befindet sich im Promotorfragment F7. Der Basenaustausch führte in allen beiden Zelllinien fast zur totalen Inaktivierung des Promotorfragmentes. So war nur eine minimale Aktivität von 10% nachweisbar und es konnten auch keine Stimulationseffekte gezeigt werden.

### 3.2. Die Wirkung des PPAR-gamma Agonisten Rosiglitazon auf die 11beta-HSD1

#### 3.2.1. Die Wirkung des PPARgamma-Agonist Rosiglitazon auf den Promotor

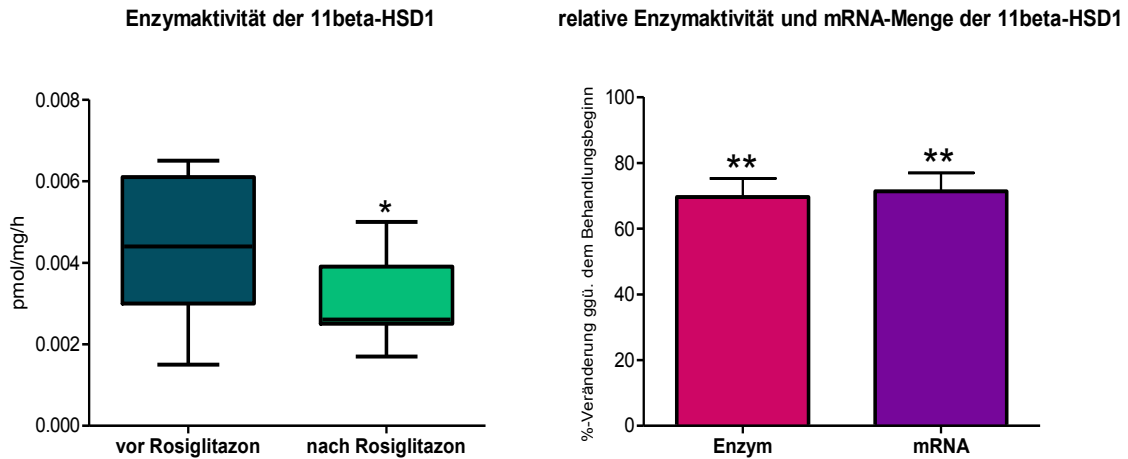
Rosiglitazon als PPARgamma-Agonist senkte in den HepG2-Zellen die Luciferase-Aktivität in fast allen Fragmenten auf durchschnittlich 60-80%. In undifferenzierten 3T3-L1-Zellen schien der PPARgamma-Agonist hingegen keinen nennenswerten Effekt zu haben. In den differenzierten 3T3-L1-Zellen senkte Rosiglitazon die relative Luciferase-Aktivität auch auf ca. 60-80%.



**Abbildung 18:** Relativer Stimulationseffekt von Rosiglitazon (anti-diabetisches Arzneimittel) auf die Promotoraktivität. Stimuliert wurden A) HepG2-Zellen, B) undifferenzierte und C) differenzierte 3T3-L1-Zellen mit 1  $\mu$ M Rosiglitazon; \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ .

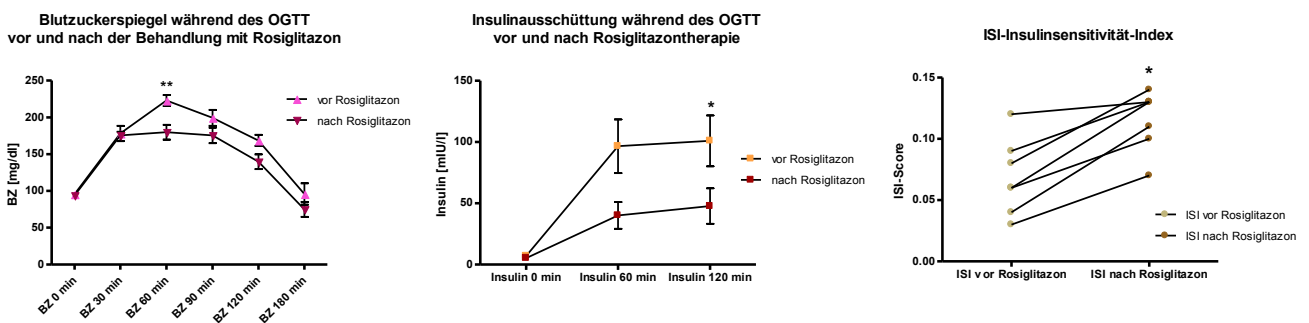
### 3.2.2. Änderung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität unter Rosiglitazon-Behandlung im subkutanen Fettgewebe

Die Kurzzeit-Studie (8 Wochen) mit Rosiglitazon an 7 Männer zeigte eine deutliche Verringerung der Enzymaktivität sowie der mRNA der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe. Dabei sank sowohl die Enzymaktivität als auch die mRNA auf durchschnittlich  $69,9 \pm 5,6 \%$  bzw.  $71,33 \pm 5,6 \%$  ggü. dem Behandlungsbeginn.



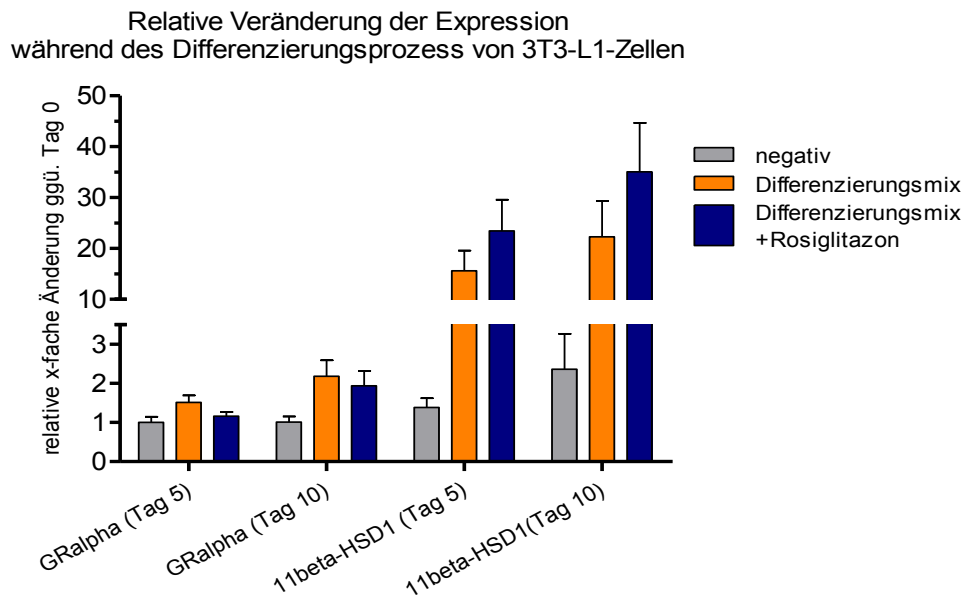
**Abbildung 19:** Enzymaktivität [pmol/mg/h] der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe von männlichen Probanden vor und nach Rosiglitazon-Behandlung. Im Vergleich ist links die relative Änderung der Enzymaktivität sowie die relative mRNA-Änderung der 11beta-HSD1 unter Rosiglitazon-Behandlung im subkutanen Fettgewebe dargestellt; \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ .

Durch die Behandlung mit Rosiglitazon kam es auch zu einer Verbesserung des Levels der freier Fettsäuren im Serum ( $0,499 \pm 0,075$  vs.  $0,299 \pm 0,057$ ;  $P=0,016$ ) und tendenziell zur Erhöhung des LDL-Spiegels ( $2,84 \pm 0,24$  vs.  $3,16 \pm 0,27$ ;  $P=0,128$ ). Außerdem verbesserte sich der systolische Blutdruck von  $148,9 \pm 5,9$  auf  $137,3 \pm 6,2$  ( $P=0,063$ ), wobei sich der diastolische Blutdruck nur leicht veränderte ( $85,7 \pm 2,8$  vs.  $79,3 \pm 3,0$ ). Die Probanden nahmen unter der Rosiglitazon-Behandlung leicht zu und der Taillenumfang vergrößerte sich tendenziell ( $103,7 \pm 3,7$  vs.  $106,1 \pm 3,9$ ;  $P=0,109$ ).



**Abbildung 20:** Veränderungen der Glucose- und Insulinspiegel während eines oralen Glucose-Toleranztestes (oGTT) vor und nach der Rosiglitazontherapie in Männern sowie die Veränderung der Insulinsensitivität (ISI); \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ .

### 3.2.3. Veränderung des 11beta-HSD1-mRNA-Level unter Zusatz von Rosiglitazon während der Adipogenese



**Abbildung 21:** Relative Veränderung der mRNA-Expression der 11beta-HSD1 und des GRalpha während der Adipogenese zum Beginn (Tag 0) sowie den Einfluss durch den Zusatz von 1  $\mu$ M Rosiglitazon zum Differenzierungsmix, dargestellt sind MW  $\pm$  SD. Der Differenzierungsmix besteht aus 1  $\mu$ M Insulin, 1  $\mu$ M Dexamethason und 500  $\mu$ M IBMX über einen Zeitraum von 4-5 Tagen.

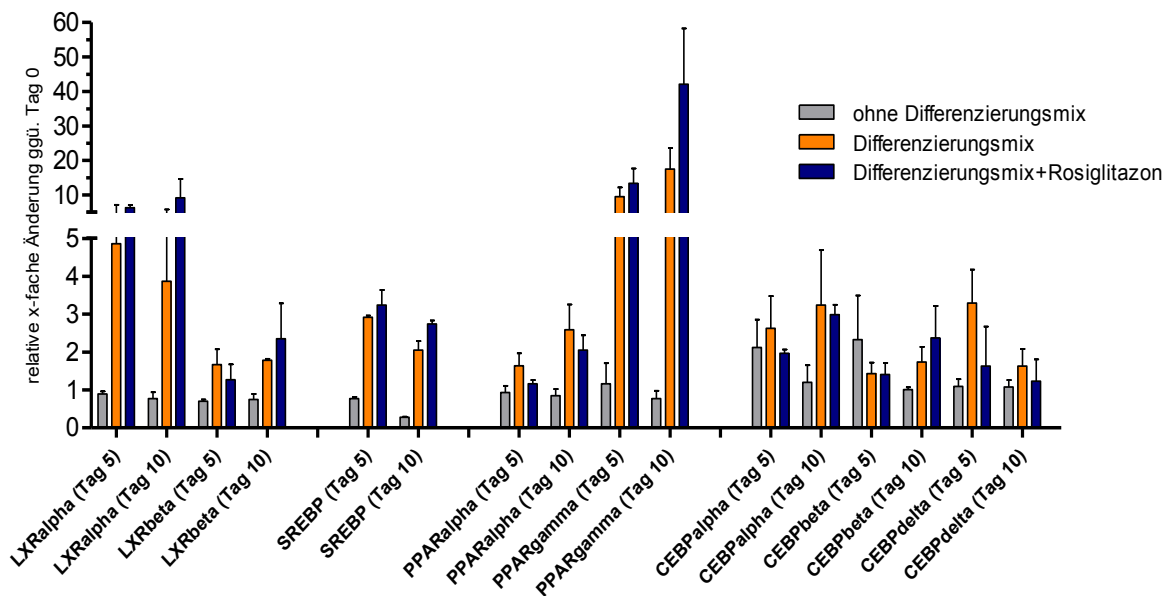
Es zeigte sich, dass der Differenzierungsprozess der 3T3-L1-Zellen einen geringen Einfluss auf die Expression des GRalpha hatte und sich das mRNA-Level während der Adipogenese in etwa verdoppelte. Rosiglitazon hatte dabei auf die Expression des GRalpha keinen wesentlichen Einfluss.

Im Gegensatz zum GRalpha stieg die Expression der 11beta-HSD1 während der Adipogenese um das  $15,6 \pm 6,8$ -fache am Tag 5 auf das  $23,5 \pm 10,6$ -fache am Tag 10. Der Zusatz von Rosiglitazon zum Differenzierungsmix führte während der Adipogenese zu einer Expressionssteigerung um ca. 30% gegenüber dem Standard-Differenzierungsmix und einer Steigerung auf  $35,1 \pm 16,6$ -fache am Tag 10 gegenüber dem Tag 0.

### 3.2.4. Vergleich der Expression wichtiger Marker während der Adipogenese unter Zusatz von Rosiglitazon

Als Indikator der erhöhten Aufnahme und Einlagerung von Lipiden dient das Fatty Acid Binding Protein (FABP oder aP2), welches gewebespezifisch exprimiert wird und für den Transport der Lipide innerhalb der Zelle verantwortlich ist. Die relative Expression stieg während der Differenzierung über das  $638 \pm 221$ -fache (Tag 5) auf das  $1077 \pm 61$ -fache (Tag 10) unter dem Standard-Differenzierungsmix gegenüber dem Tag 0. Mit dem PPARgamma-Agonist erreichte das relative Expressionslevel des FABP's das  $2631 \pm 375$ -fache (Tag 5) und  $2036 \pm 36$ -fache am Tag 10.

## Relative Veränderung der Expression ausgewählter Gene während des Differenzierungsprozesses



**Abbildung 22:** Relative Veränderung der Expression verschiedener Gene/Transkriptionsfaktoren während der Adipogenese von 3T3-L1-Zellen in Abhängigkeit des Differenzierungsmixes in Bezug auf den Tag 0. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung. Die relative Veränderung wurde mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode zum internen Standard 16s bestimmt.

Die GAPDH stieg ebenfalls unter Rosiglitazon über die 10 Tage deutlich an ( $2,15 \pm 1,06$  vs.  $12,41 \pm 5,75$ ) und ist damit als interner Standard für Fettzellen bzw. –gewebe unbrauchbar. Die Expression von beta-Actin war bis zum Tag 10 in allen Versuchsreihen stabil ( $1,01 \pm 0,09$  vs. 16s).

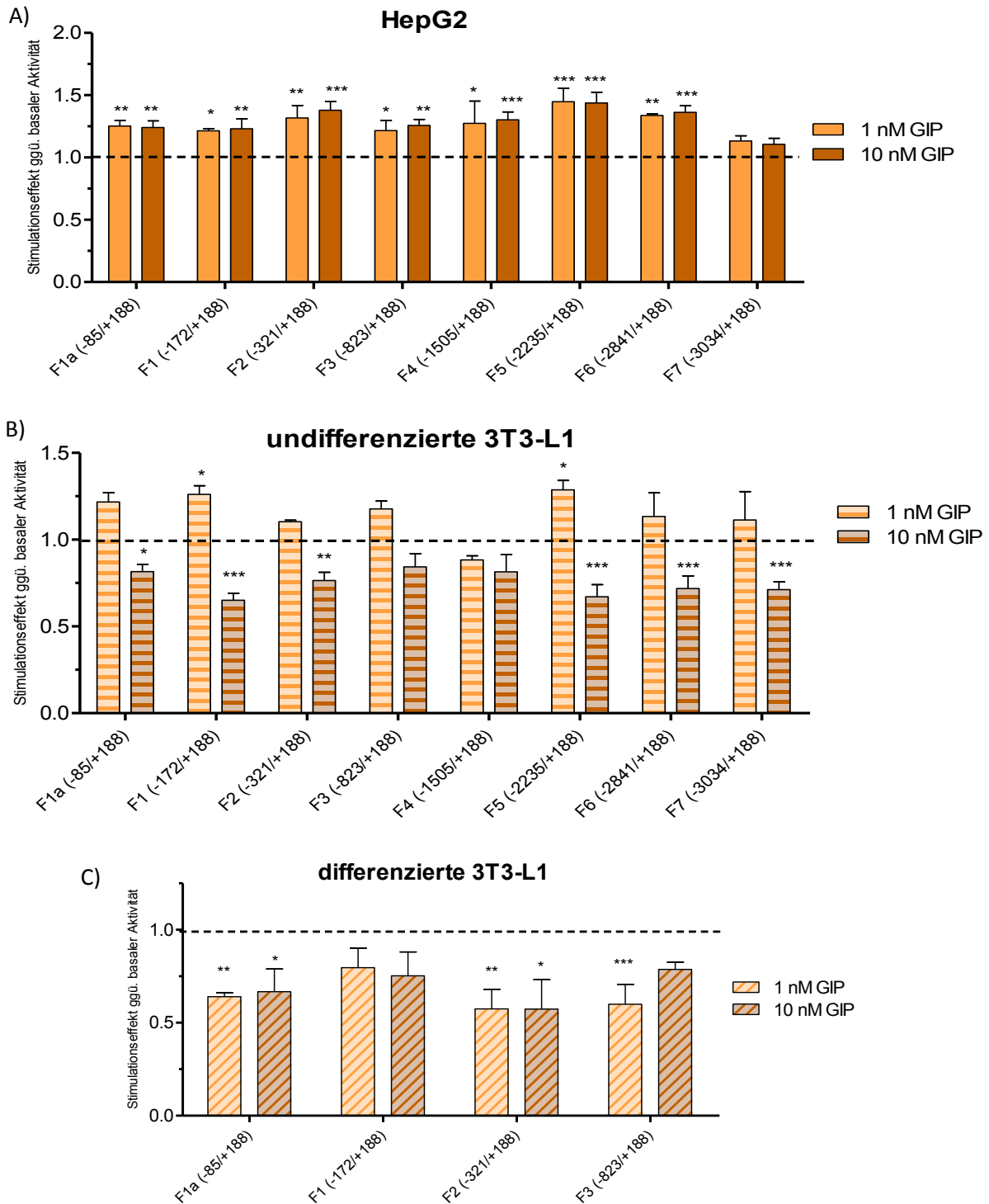
Bis auf die Transkriptionsfaktoren LXRalpha und PPARgamma sind alle anderen Faktoren unabhängig vom Rosiglitazonzusatz und stiegen bis zum Tag 10 in Schnitt um das 2-fache an. Die Expressionssteigerung von LXRalpha lag unter Rosiglitazon doppelt so hoch ( $3,87 \pm 1,92$  vs.  $9,18 \pm 5,45$ ), ebenso wie bei PPARgamma ( $17,5 \pm 6,1$  vs.  $42,1 \pm 16,1$ ). Die Expression der C/EBP-Proteine steigerte sich durchschnittlich um das 2-3-fache, wobei am Tag 10 die Expression von C/EBPalpha gegenüber den anderen C/EBP-Proteinen durchschnittlich höher war.



### 3.3. Wirkung des Inkretins GIP auf die 11beta-HSD1

#### 3.3.1. Veränderung der Promotoraktivität durch das Inkretin GIP

In HepG2-Zellen zeigte sich generell eine Aktivierung der Promotorfragmente durch das Peptidhormon GIP (Glucose-dependent insulintropic Peptide). Es ergab sich ein Wirkungsspektrum mit einer Aktivierung um etwa 25% unabhängig von Konzentration.

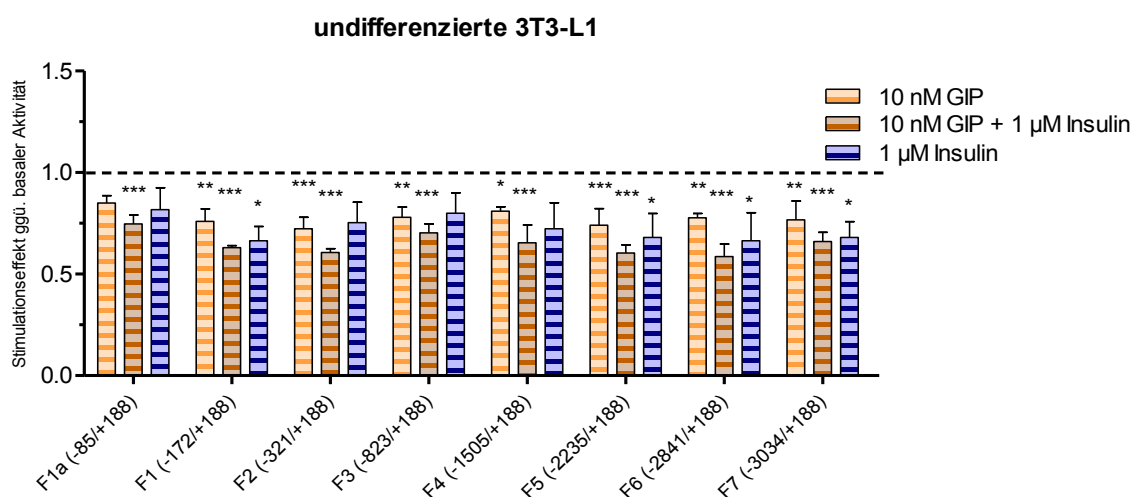


**Abbildung 23:** Relative Wirkung des endogenen Inkretins GIP auf die Promotorfragmente der 11beta-HSD1 in A) HepG2-Zellen B) undifferenzierten und C) differenzierten 3T3-L1-Zellen. Dabei wurde mit 1 nM und 10 nM Glucose-dependent insulintropic Peptide (GIP) über 40 Stunden stimuliert; \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ .

In undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zeigte sich hingegen bei GIP eine konzentrationsabhängige Regulation der Promotorfragmente. Während 1 nM GIP die Aktivität fast aller Promotorfragmente steigerte, senkte 10 nM GIP die Promotoraktivität auf rund 75-80%. Die konzentrationsabhängige Wirkung von GIP war in differenzierten 3T3-L1-Zellen nicht mehr vorhanden. Hier senkten 1nM GIP als auch 10nM GIP die Aktivität der 11beta-HSD1-Promotorfragmente auf rund 60-80%.

### 3.3.2. Effekte von GIP, Insulin sowie GIP in Kombination mit Insulin auf die Promotoraktivität

Da GIP stimulatorische Effekte auf die Insulinsekretion hat, wurde die kombinatorische Wirkung von GIP und Insulin auf undifferenzierte 3T3-L1-Zellen getestet. Sowohl das Inkritin GIP als auch Insulin hatten repressorische Wirkungen auf die Promotorfragmente der 11beta-HSD1. Auf undifferenzierte 3T3-L1-Zellen hatte die Kombination aus GIP und Insulin zudem einen zusätzlichen Effekt auf die Herunterregulation der Promotorfragmente. Die Kombinationswirkung lag bei durchschnittlich 5-10% unter den Effekten von GIP bzw. Insulin in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen.

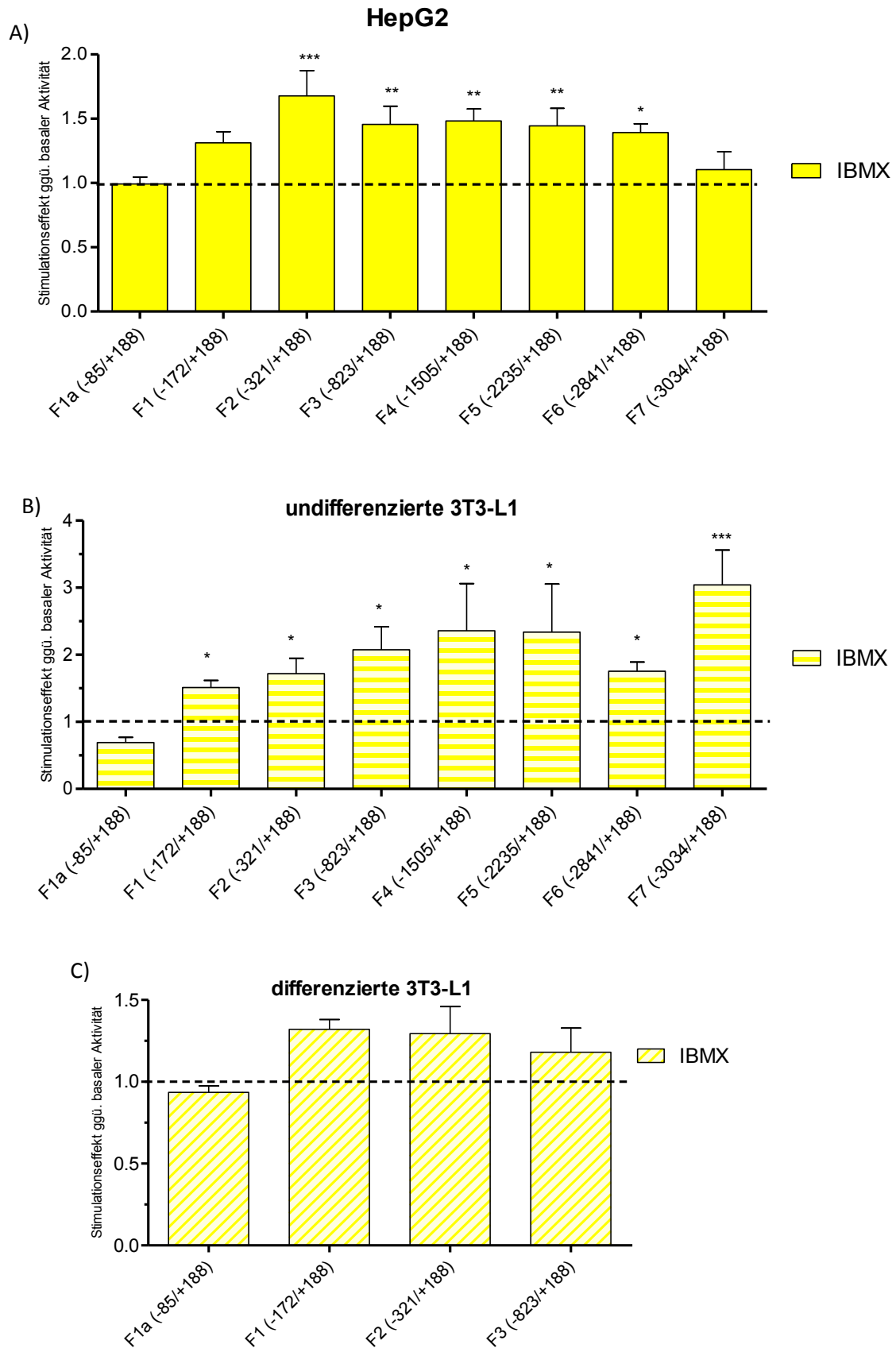


**Abbildung 24:** Wirkung von 10 nM GIP, 1 μM Insulin sowie in Kombination auf undifferenzierte 3T3-L1-Zellen; \*\*\*P≤0,001, \*\*P≤0,01, \*P≤0,05.

### 3.3.3. Effekte intrazellulär erhöhter cAMP-Spiegel durch IBMX auf die Promotoraktivität

IBMX (Isobutylmethylxanthin) ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase (PDE), welche cAMP zu 5'AMP hydrolysiert. Durch den IBMX-Zusatz kommt es in der Zelle zu einem erhöhten cAMP-Spiegel.

In HepG2-Zellen wurde die Luciferase-Aktivität der Promotorfragmente durch IBMX deutlich um das 1,5-fache gesteigert. Ausgenommen davon war das kleinste Fragment F1a, welches keinerlei Veränderung der Aktivität zeigte. Auch die Luciferase-Aktivität des längsten Fragmentes war im Vergleich zu den anderen Promotorfragmenten deutlich reduziert.



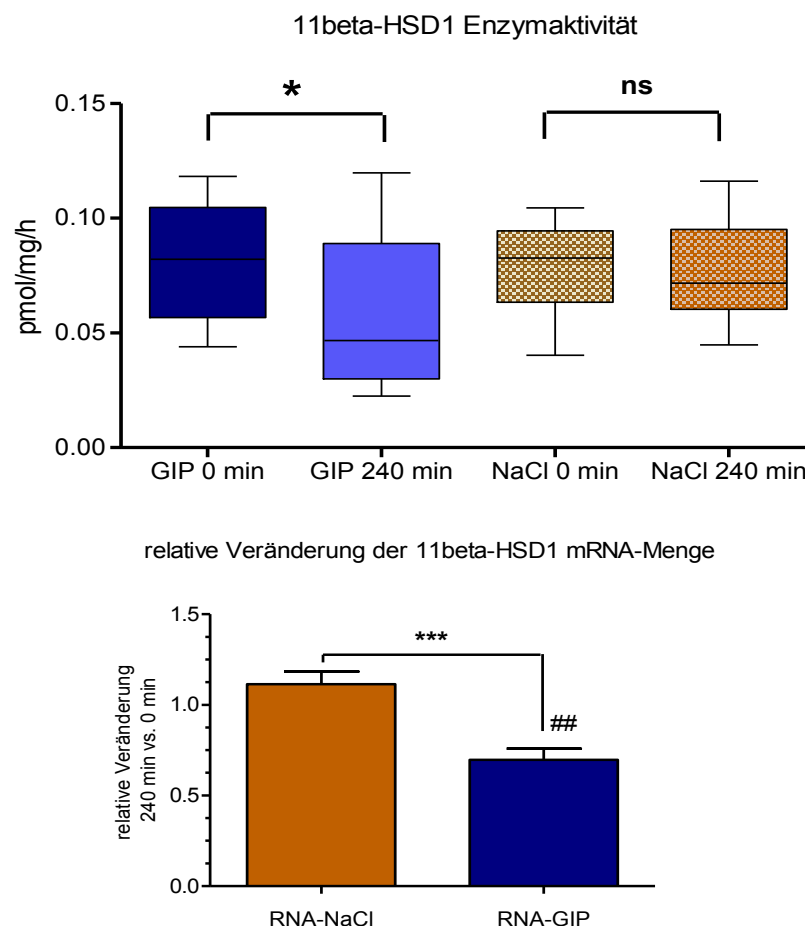
**Abbildung 25:** Relative Wirkung von IBMX, ein Inhibitor der Phosphodiesterase (PDE), auf die Promotorfragmente der 11beta-HSD1 in A) HepG2-Zellen B) undifferenzierten und C) differenzierten 3T3-L1-Zellen. Es wurde mit 500  $\mu$ M IBMX stimuliert; \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ .

In den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen war eine ansteigende Promotoraktivität unter IBMX zu sehen, welches eine Steigerung um 50-200% verursachte. Ebenfalls war wie in den HepG2-Zellen keine Aktivierung des kleinsten Promotorfragmentes F1a zu sehen. In den ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen war das Aktivierungspotential deutlich kleiner und liegt bei ca. 30%. Auch hier wurde das Fragment F1a durch IBMX nicht aktiviert.

### 3.3.4. Änderung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität unter GIP-Infusion

#### 3.3.4.1. Einfluss der GIP-Infusion auf Expression und Enzymaktivität

Die Studie mit einer 4-stündigen GIP- (Glucose-dependent insulinotropic Peptide) bzw. NaCl-Infusion wurde an 10 männlichen gesunden Personen durchgeführt. Die 10 Männer (durchschnittliches Alter:  $48,8 \pm 11,8$ ) waren alle übergewichtig (BMI  $33,53 \pm 2,38$ ) und hatten ein durchschnittliches Gewicht von  $101,6 \pm 7,68$  kg. Der durchschnittliche Taillenumfang von  $112,8 \pm 6,36$  cm lag deutlich über dem Risikowert von  $>102$  cm. Mit dem mittleren Hüftumfang von  $110,0 \pm 4,4$  cm ergab sich so eine Waist-to-Hip-Ratio (WHR) von  $1,01 \pm 0,05$ . Dieser Wert lag ebenfalls über der Risikogrenze für Männer von  $>0,9$ . Eine Normalverteilung von Gewicht, Hüft- und Taillenumfang lag zudem nicht vor.

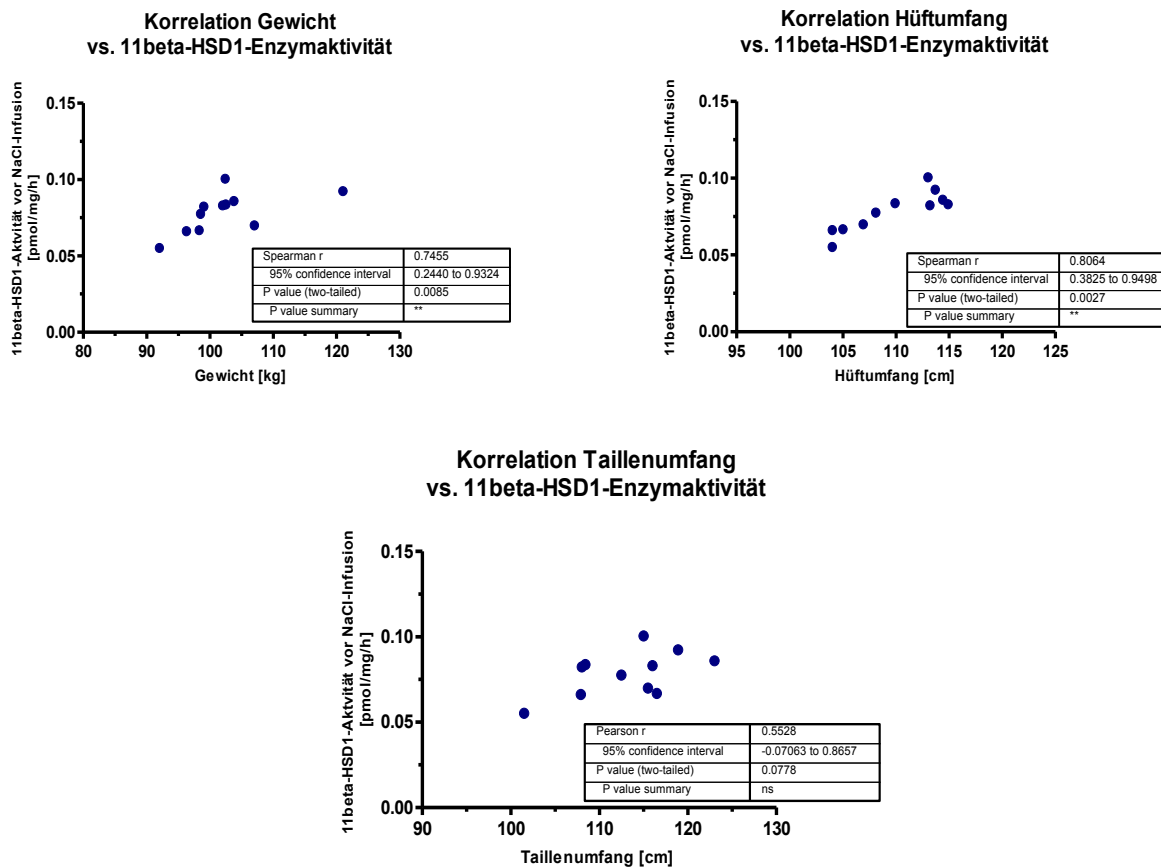


**Abbildung 26:** Studie über die Wirkung von GIP *in-vivo* an 10 gesunden männlichen Probanden. Die obere Abbildung zeigt die Enzymaktivität der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe vor und nach einer GIP- bzw. NaCl-Infusion. Die Biopsien wurden 40 min vor Start der Infusion sowie 4 Stunden nach Beginn genommen. Die untere Abbildung zeigt die relative Veränderung des mRNA-Levels der 11beta-HSD1 nach den entsprechenden Infusionen zum Start. Zur Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet und 16s-mRNA als interne Bezugsquelle genutzt. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \* $P \leq 0,05$ , ## $P < 0,01$  vs. RNA vor Infusionsbeginn.

Die 4-stündige Infusion mit GIP (Glucose-dependent insulinotropic Protein) bei den männlichen Probanden führte im subkutanen Fettgewebe zu einer Verringerung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität auf ca. 75% der Ausgangsaktivität. Unter der NaCl-Infusion wurde keine Veränderung beobachtet. Neben der Veränderung der Enzymaktivität kam es zu einer Senkung des mRNA-Levels auf ca. 70%.

### 3.3.4.2. Korrelation der Enzymaktivität der 11beta-HSD1 mit Parametern des Körpers

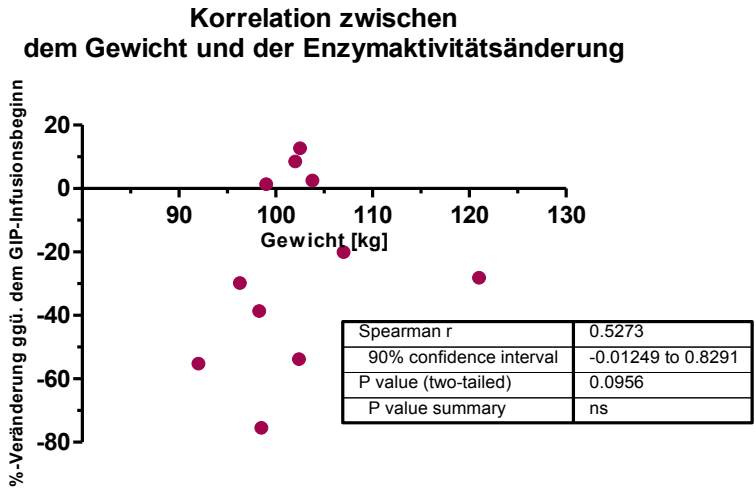
Die 11beta-HSD1-Enzymaktivität sowie die mRNA wurde aus allen Fettbiopsien bestimmt und quantifiziert. Es konnte hier in der kleinen Kohorte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität deutlich mit dem Gewicht der Männer positiv korreliert ( $r=0,927$ ,  $P<0,001$ ). Ebenfalls gut korrelierten der Hüftumfang ( $r=0,742$ ,  $P=0,017$ ) mit der Enzymaktivität. Eine tendenziell positive, aber nicht signifikante Korrelation konnte mit dem Taillenumfang ( $r=0,636$ ,  $P<0,054$ ) und dem BMI ( $R=0,624$ ,  $P=0,060$ ) gesehen werden.



**Abbildung 27:** Korrelation zwischen der Enzymaktivität der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe mit den Parametern Gewicht, Hüft- und Taillenumfang.

In dieser Studie korrelierte das Gewicht mit dem Taillenumfang ( $r=0,697$ ,  $P=0,031$ ) sowie dem Hüftumfang ( $r=0,790$ ,  $P=0,009$ ) positiv. Ebenfalls korrelierte der BMI der Männer positiv mit der Taille ( $r=0,832$ ,  $P=0,003$ ) und dem Hüftumfang ( $r=0,632$ ,  $P=0,030$ ).

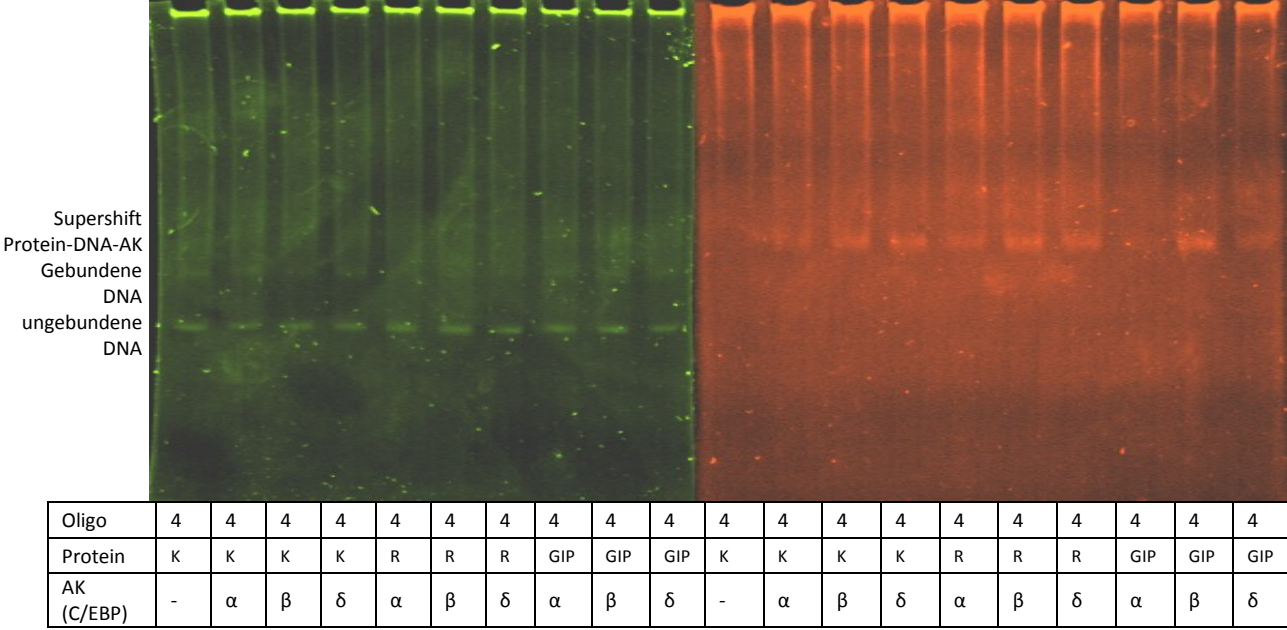
Zudem zeigte sich hier, dass tendenziell die negative Änderung der Enzymaktivität der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe mit dem Gewicht korrelierte. So änderte sich die Enzymaktivität nach der GIP-Infusion nur geringfügig und war leicht erhöht bei den Männern mit erhöhtem Gewicht.



**Abbildung 28:** Korrelation zwischen dem Gewicht und der Änderung der Enzymaktivität unter der 4-stündigen GIP im subkutanen Fettgewebe.

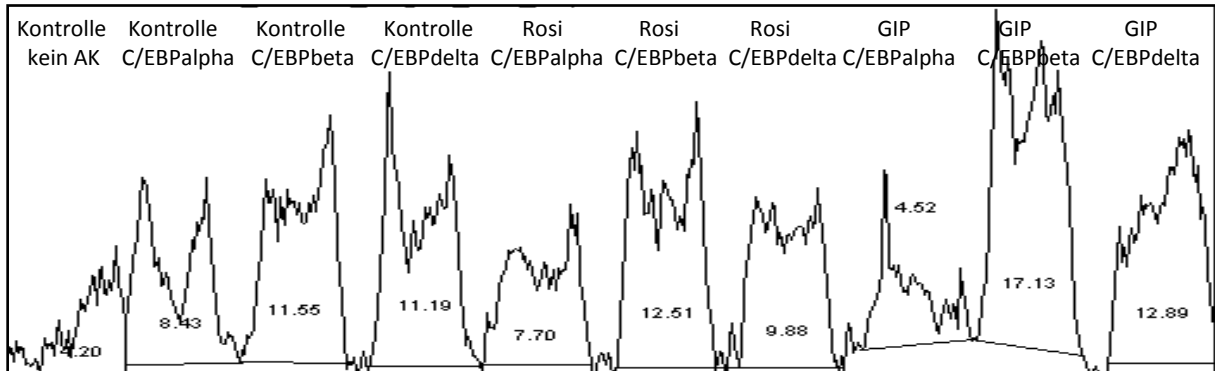
**3.4. Nachweis der veränderten Bindung von C/EBP-Isoformen unter Rosiglitazon- und GIP- Stimulationen**

Rosiglitazon zeigte in den Luciferase-Assays in den undifferenzierten Zellen keinen Effekt auf die 11beta-Promotorfragmente (Abbildung 18). Nur in der Kurzzeitstimulation ergab sich eine Steigerung der 11beta-HSD1-mRNA (Tabelle 16). Es zeigte sich jedoch keine wesentliche Änderung der C/EBP-Protein-Bindung an das Oligo 4 (Promotorfragment F1) unter Rosiglitazon (1 h). Jedoch führte GIP zu einem veränderten Bindungsprofil an das Oligo 4.



**Abbildung 29:** Nachweis der Bindung von C/EBP-Bindungsstellen mit 3T3-L1-Zellkernextrakten (undifferenziert) mittels EMSA und Supershift durch ein C/EBP-Antikörper (CEBPalpha, -beta bzw. -delta). Verwendet wurden Kernextrakte von Zellen, die 1 h mit 1 µM Rosiglitazon (R) bzw. 10 nM GIP stimuliert wurden. Als Kontrolle (K) dienten unstimulierte Zellen. Links in Grün dargestellt die Oligo-DNA nachgewiesen mit SYBRgreen und Rechts in Rot die nachgewiesene Proteine mittels SYPROuby.

Die Stimulation durch 10 nM GIP in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen führte in den Luciferase-Assays sowie bei der mRNA-Messung zu einer Reduktion. Im EMSA zeigte sich, dass kein C/EBPalpha mehr an das Oligo 4 unter GIP-Stimulation bindet (der Flächeninhalt ist vergleichbar mit der No-Shift-Kontrolle). Zudem binden vermehrt die Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta und C/EBPdelta an diesem Bereich. Die Intensität der C/EBPbeta-Banden nahm im Vergleich zur Kontrolle C/EBPbeta um 50% von 11,55% auf 17,13% zu. Die Zunahme der C/EBPdelta-Bande betrug rund 15% (11,19% vs.12,89%).

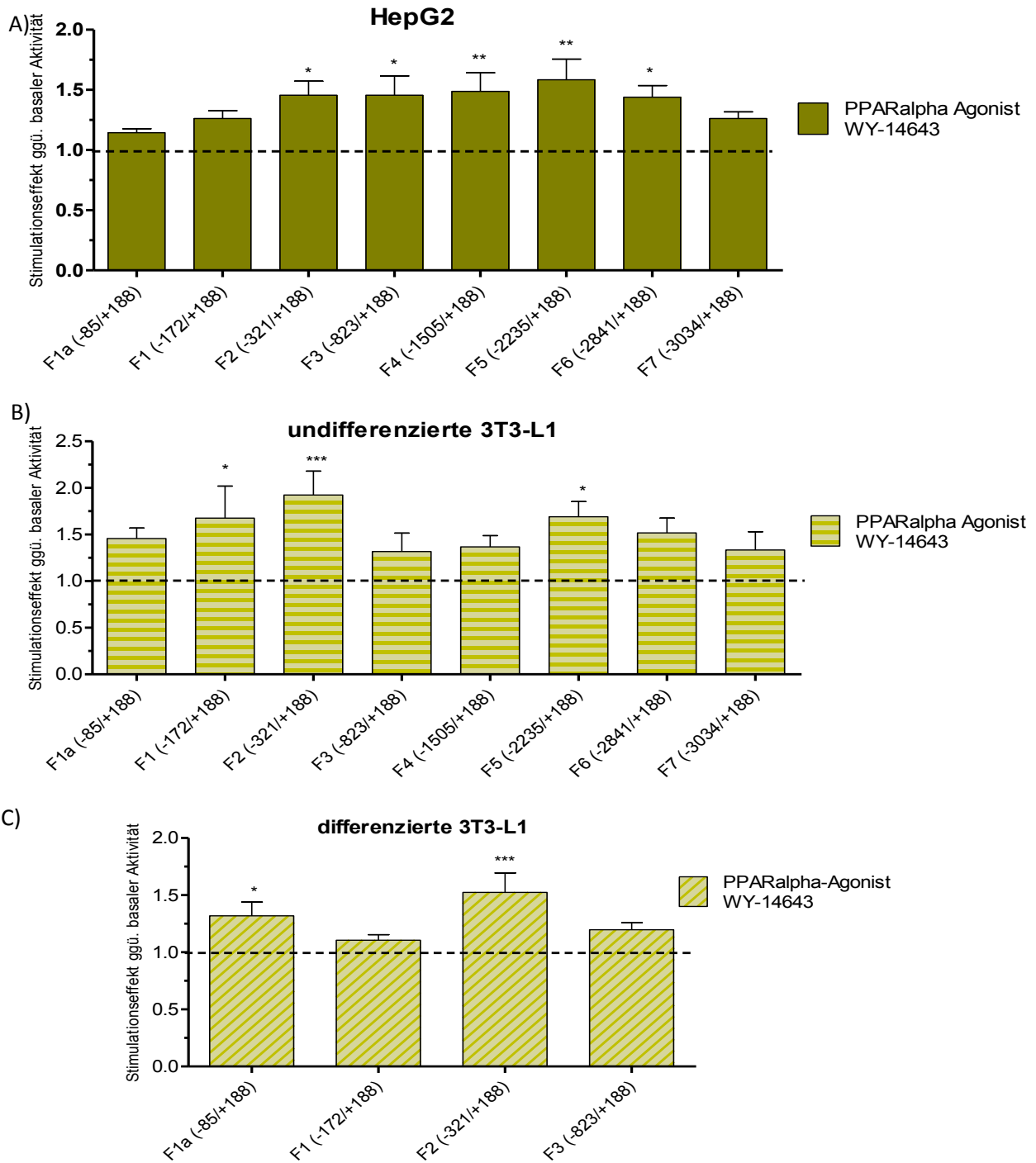


**Abbildung 30:** Analyse der Bandenintensität des Proteinnachweises im EMSA aus Abbildung 29 rechts. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Fläche unter der Kurve an der gesamten gemessenen Fläche (alle Peaks).

### 3.5. Effekte von Nahrungsfett

#### 3.5.1. Wirkung eines PPARalpha-Agonisten auf die 11beta-HSD1

WY-14643 ist ein starker Aktivator in HepG2-Zellen und erhöhte die Luciferase-Aktivität um ca. 50% in den Fragmenten F2 bis F6. Der PPARalpha-Agonist schien jedoch nur geringe Effekte auf das kürzeste Fragment F1a zu haben.



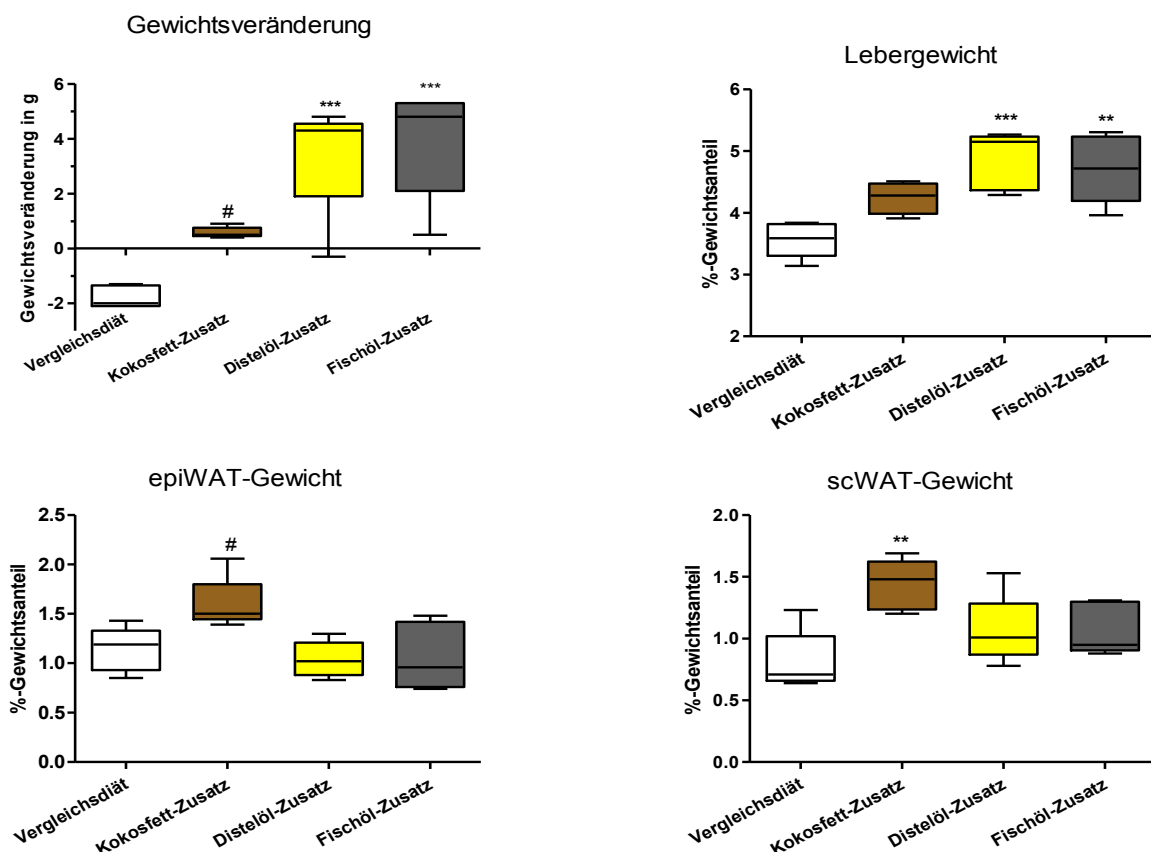
**Abbildung 31:** Relativer Stimulationseffekt mit dem PPARalpha-Agonist WY-14643. Stimuliert wurden A) HepG2-Zellen, B) undifferenzierte und C) differenzierte 3T3-L1-Zellen mit 20  $\mu$ M WY-14643; \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ .



In den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen hatte WY-14643 ein stark aktivierendes Potential. Die Luciferase-Aktivität stieg hier ebenfalls deutlich um 50% und mehr in allen Fragmenten. In den differenzierten 3T3-L1-Zellen schien der PPARalpha-Agonist kaum einen Effekt zu haben. Lediglich im Fragment F2 war eine erhöhte Aktivität zu finden.

### 3.5.2. Änderung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität in Mäusen unter Nahrungsfett-Diät

Jeweils 5 junge männliche 129SvS2-Mäuse erhielten 7 Tage eine Standarddiät mit zusätzlich 15% (w/w) Fett bzw. Öl. Dabei kam es unter dem Zusatz der Fette/Öle zu Veränderungen im Körpergewicht. Die Mäuse unter Distel- und Fischöl nahmen dabei im Schnitt 4 - 4,5 g zu. Unter Kokosfett kam es kaum zur Gewichtszunahme, wobei diese Mäuse aber auch weniger Nahrung zu sich nahmen als die anderen Gruppen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu hatten die Mäuse unter der Kokosfett-Diät jedoch prozentual mehr subkutanes und epididymales Fettgewebe als die Mäuse der anderen Gruppen. Beide Öl-Diäten zeigten eine ähnliche Veränderung in den Fettgeweben. In etwa gleichem Maße erhöhte sich tendenziell das prozentuale Gewicht des subkutanen Fettgewebes, dabei blieb das epididymale Fettgewebe unverändert. Weiterhin kam es unter Distel- und Fischöl zu signifikanten Erhöhungen des Lebergewichtes (Abbildung 32).

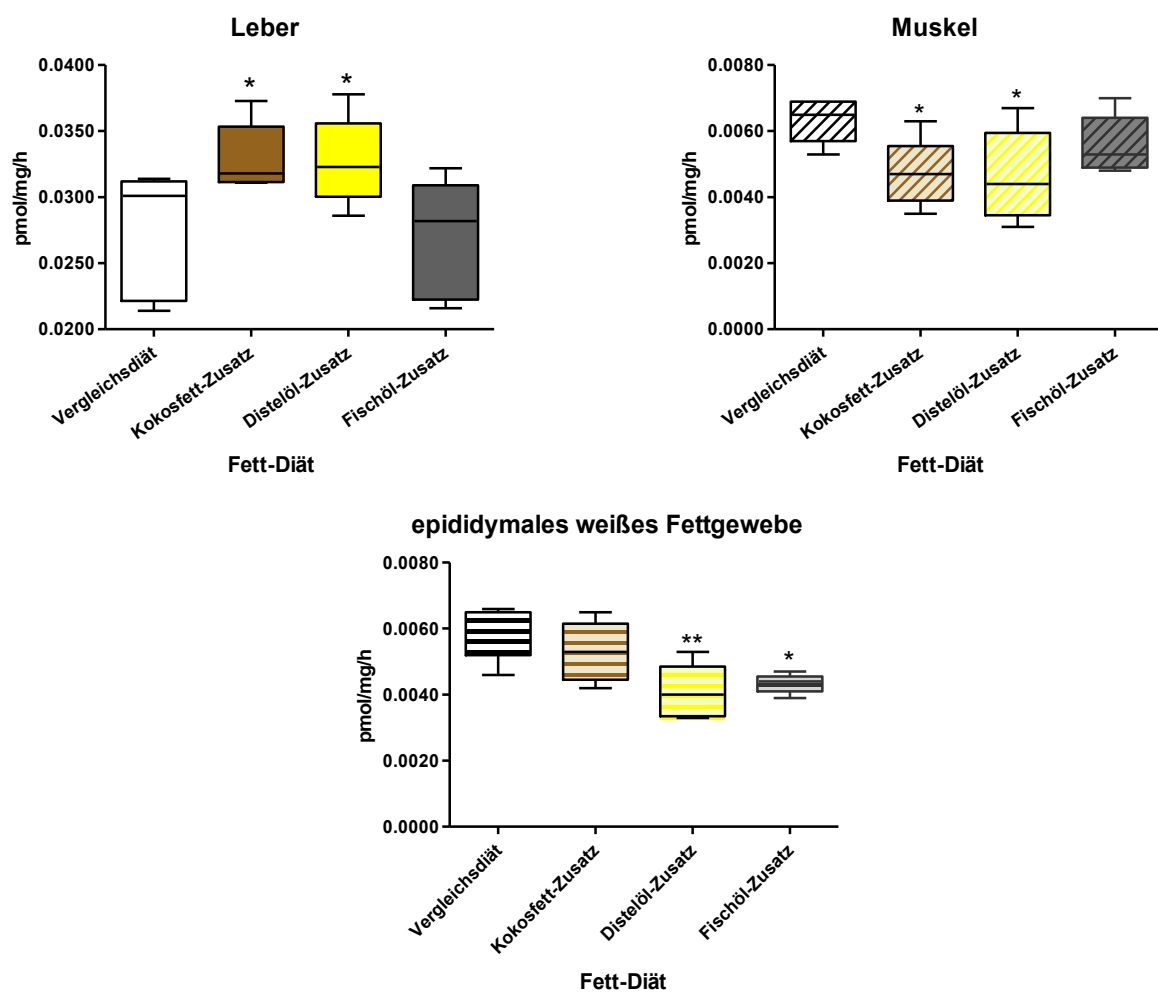


**Abbildung 33:** Veränderung des Körpergewichtes vor und nach der Intervention mit Zusatz von 15% (w/w) Nahrungsölen bzw. -fette sowie der prozentuale Gewichtsanteile der Organe vom Gesamtgewicht – Leber, epididymales (epiWAT) und subkutanes (scWAT) weißes Fettgewebe - nach der Intervention. \*\*\*P≤0,001, \*\*P≤0,01, \*P≤0,05 vs. der Vergleichsdiät, #P≤0,05 vs. die anderen Diätgruppen.

Es zeigte sich bereits nach 7 Tagen ein deutlicher Effekt in der Enzymaktivität der 11beta-HSD1. Gegenüber der Standard-Diät ohne Zusatz von Nahrungsfetten war in allen 3 untersuchten Geweben eine spezifische Veränderung abhängig von dem Fettzusatz zu sehen. Weiterhin stiegen bei allen 3 Fettdiäten zum Ende der Diäten die Blutzuckerwerte deutlich in Schnitt zwischen 30-40 mg/dl an (Daten nicht gezeigt).

Durch den Zusatz von 15% (w/w) Kokosfett, welches zu 87% aus gesättigten mittelkettigen Fettsäuren besteht, stieg die 11beta-HSD1-Aktivität in der Leber signifikant an und nahm im Muskel deutlich ab. Im epididymalen Fettgewebe gab es keine wesentlichen Änderungen der Enzymaktivität. Dabei nahmen die Mäuse prozentual deutlich in allen Fettgeweben sowie der Leber zu. Jedoch legten diese kaum an Körpergewicht zu und nahmen unbekannterweise weniger Kalorien zu sich (Daten nicht gezeigt).

Distelöl mit ca. 75% Linolsäure zeigte ein ähnliches Muster wie unter der Kokosfett-Diät. Jedoch sank signifikant die Enzymaktivität im epididymalen Fettgewebe. Die Mäuse zeigten eine deutliche Gewichtszunahme, wobei sich das prozentuale Lebergewicht deutlich gegenüber der Standarddiät erhöhte. In den Fettgeweben waren keine wesentliche Veränderungen zu sehen.

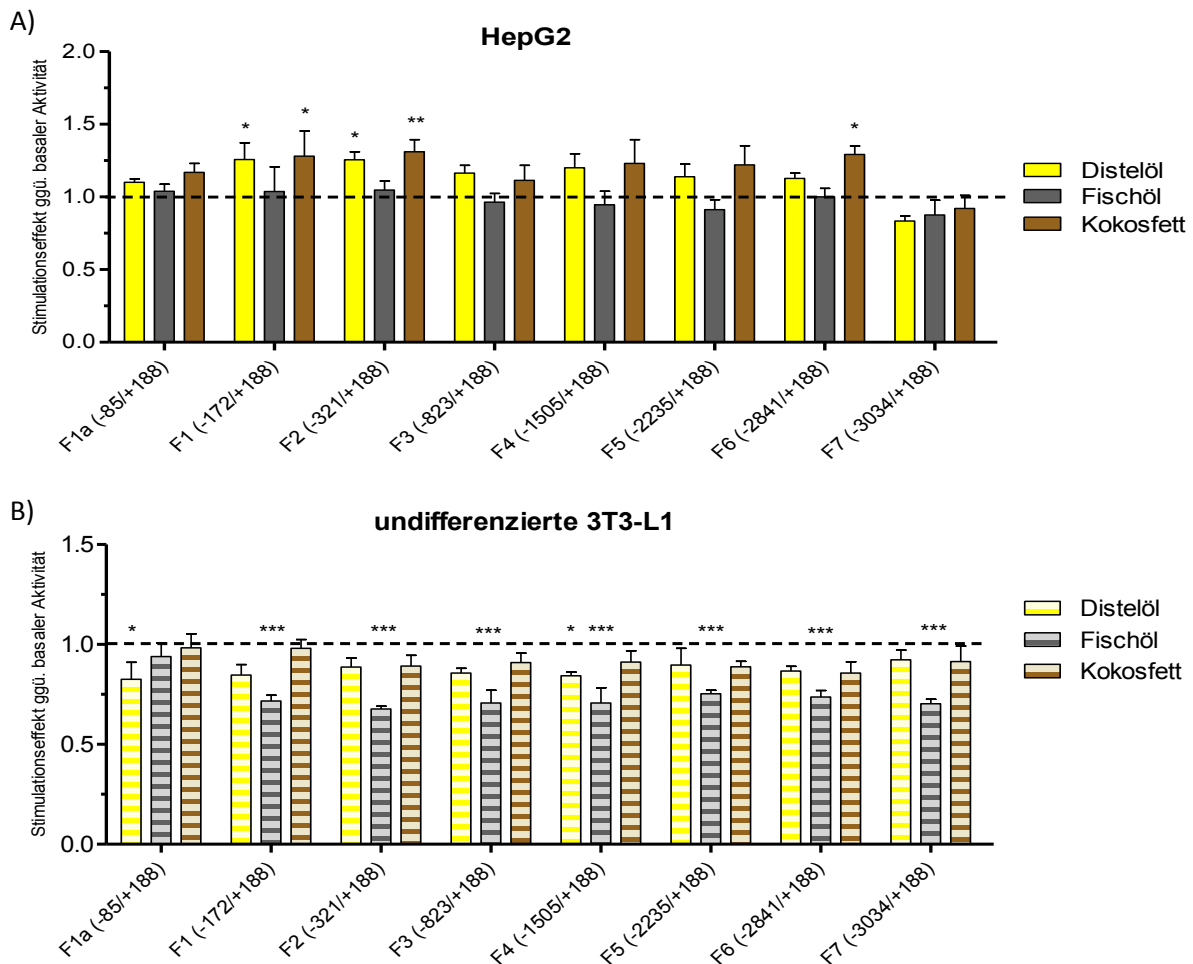


**Abbildung 34:** Enzymaktivität der 11beta-HSD1 in 129SvS2-Mäusen nach 7-tägiger Fütterung mit Standarddiät und Zusatz von 15% (w/w) Kokosfett, Distel- oder Fischöl; \*\*\*P≤0,001, \*\*P≤0,01, \*P≤0,05.

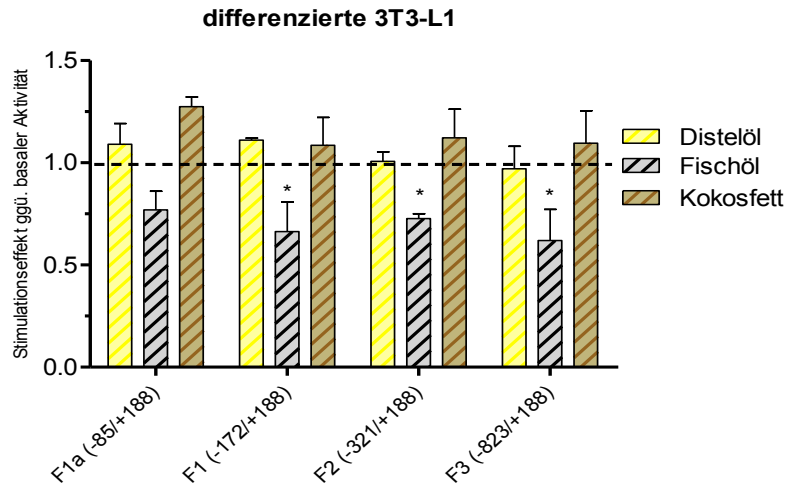
Fischöl ist ein Gemisch aus relativ gleichen Mengen gesättigten, einfach-ungesättigten und mehrfach-ungesättigten Fettsäuren. Dieses hat keinen Effekt auf die Enzymaktivität in der Leber sowie im Muskel. Jedoch sank die Enzymaktivität deutlich in epididymalen Fettgewebe. Das Gewicht des epididymalen Fettgewebes veränderte sich jedoch nicht im Vergleich zur Standarddiät. Das prozentuale Gewicht des subkutanen Fettgewebes zeigte keine wesentliche Veränderung. Es kam jedoch unter der Fischöl-Diät zu einer Erhöhung des prozentualen Lebergewichtes.

### 3.5.3. Effekte der Nahrungsfette auf die Promotoraktivität

Die Ergebnisse aus der *in-vivo* Studie konnten in den Zellkulturmodellen vollständig bestätigt werden. Sowohl die Tendenz der Veränderung der Enzymaktivität in den Mäuselebern als auch die Stärke des Effektes konnte in der humanen HepG2-Zelllinie reproduziert werden. Auch die Ergebnisse aus den undifferenzierten 3T3-L1 entsprachen in etwa den Ergebnissen der Enzymaktivitätsänderungen im epididymalen Fettgewebe.



C)



**Abbildung 35:** Relativer Stimulationseffekt der Interventionsdiäten mit einer Endkonzentration von 0,3% (v/v) in A) HepG2, B) undifferenzierten und C) differenzierte 3T3-L1-Zellen; \*\*\*P≤0,001, \*\*P≤0,01, \*P≤0,05.

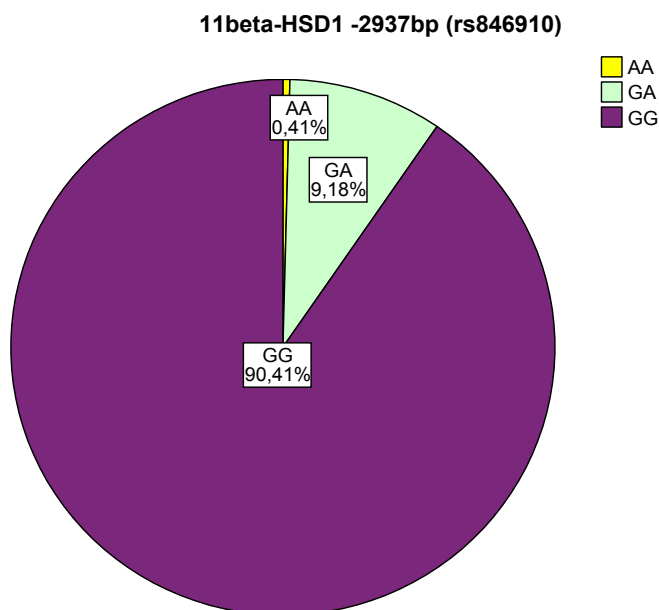
### 3.6. SNP-Analyse in der MeSyBePo-Studie

Es wurden im untersuchten Promotorbereich die SNPs rs846910 an der Position -2937 bp und rs3753519 an der Position -2677 bp relativ zum Transkriptionsstart in der MeSyBePo-Kohorte analysiert.

Insgesamt wurden 1712 Proben (Stand: August 2007) untersucht von 1151 Frauen und 555 Männern. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte in der Region von Potsdam-Rehbrücke und Berlin. Das durchschnittliche Alter der Probanden lag bei 52 Jahren mit einem durchschnittlichen Body-Mass-Index (BMI) von 29,2 kg/cm<sup>2</sup>. Die Beteiligung von weiblichen Probanden in der Studie war etwa doppelt so hoch wie von männlichen Probanden.

#### 3.6.1. Promotor-SNP -2937

Die Häufigkeit des Allels AA fiel bei der MeSyBePo-Kohorte sehr gering aus. So waren nur 7 Personen (4 männlich/3 weiblich) Träger dieses Allels. Auch das Auftreten des heterozygoten Allels GA fiel mit 9,18% und 157 Trägern gering aus.



**Abbildung 36:** Häufigkeiten der Allele des SNP rs846910 im Promotorbereich der 11beta-HSD1 an der Position -2937 bp relativ zum Transkriptionsstart. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der 3 Alleltypen von 1712 Probanden.

Die untenstehende Tabelle zeigt die Häufigkeiten der Allele sowie die Mittelwerte verschiedener Indizes der entsprechenden Allelträger. Tendenziell, aber aufgrund der niedrigen Zahl nicht signifikant, zeigten die Träger des AA-Allels einen höheren Blutdruck, BMI sowie einen größeren Taillen- und Hüftumfang. Weiterhin war der basale Blutzucker- und Insulinwert erhöht, wodurch sich ein deutlich erhöhter signifikanter HOMA<sub>IR</sub> ergab. Die Blutfettwerte HDL, LDL sowie Triglyceride und Cholesterin ließen keinen wesentlichen Einflüsse erkennen.

**Tabelle 18: Mittelwerte einzelner Faktoren in der MeSyBePo-Kohorte getrennt nach Allele für den SNP rs846910 und die Signifikanz zwischen den Gruppen (ANOVA-Analyse).**

	Allel	N	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz zwischen den Gruppen
<b>Alter bei Datenerhebung</b>	GG	1.543	51,8	0,35	0,300
	GA	157	53,6	1,03	
	AA	7	51,4	3,56	
	Gesamt	1.707	52,0	0,33	
<b>Geschlecht des Probanden (männlich)</b>	GG	509			
	GA	42			
	AA	4			
	Gesamt	555			
<b>Geschlecht des Probanden (weiblich)</b>	GG	1.033			
	GA	115			
	AA	3			
	Gesamt	1.151			
<b>Systole [mmHg]</b>	GG	1.450	125,2	0,46	0,604
	GA	149	124,4	1,40	
	AA	7	130,7	7,05	
	Gesamt	1.606	125,2	0,44	
<b>Diastole [mmHg]</b>	GG	1.450	77,8	0,27	0,255
	GA	147	77,7	0,79	
	AA	7	84,3	4,94	
	Gesamt	1.604	77,8	0,26	
<b>Hüftumfang [cm]</b>	GG	1.535	107,7	0,35	0,731
	GA	157	108,4	1,15	
	AA	7	110,1	6,99	
	Gesamt	1.699	107,7	0,33	
<b>Taillenumfang [cm]</b>	GG	1.535	95,4	0,40	0,464
	GA	157	96,2	1,34	
	AA	7	102,1	8,09	
	Gesamt	1.699	95,5	0,39	
<b>BMI</b>	GG	1.541	29,20	0,164	0,523
	GA	157	29,06	0,562	
	AA	7	31,92	3,656	
	Gesamt	1.705	29,20	0,158	
<b>WHR (Waist-to-Hip-Ratio)</b>	GG	1.534	0,886	0,0025	0,566
	GA	157	0,887	0,0083	
	AA	7	0,926	0,0328	
	Gesamt	1.698	0,8862	0,0024	
<b>0 min Blutzucker [mg/dl]</b>	GG	1.512	94,59	0,428	0,883
	GA	151	94,30	1,278	
	AA	7	97,40	5,201	
	Gesamt	1.670	94,58	0,404	
<b>120 min Blutzucker [mg/dl]</b>	GG	1.453	128,95	1,020	0,674
	GA	145	131,75	2,618	
	AA	6	133,73	13,968	
	Gesamt	1.604	129,22	0,955	

	Allel	N	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz zwischen den Gruppen
<b>0 min Insulin [mIU/l]</b>	GG	1.399	8,99	0,171	<b>0,002</b>
	GA	142	8,46	0,496	
	AA	6	17,98	10,109	
	Gesamt	1.547	8,97	0,166	
<b>120 min Insulin [mIU/l]</b>	GG	1.334	55,21	1,299	0,415
	GA	136	58,13	4,345	
	AA	5	79,86	22,067	
	Gesamt	1.475	55,56	1,244	
<b>HOMA<sub>IR</sub></b>	GG	1.399	2,18	0,050	<b>0,001</b>
	GA	142	2,01	0,129	
	AA	6	4,89	3,034	
	Gesamt	1.547	2,18	0,049	
<b>ISI<sub>S3</sub></b>	GG	1.283	0,078	0,0009	0,793
	GA	130	0,078	0,0029	
	AA	5	0,068	0,0166	
	Gesamt	1.418	0,078	0,0009	
<b>Cholesterin [mmol/l]</b>	GG	1.437	5,38	0,028	0,319
	GA	150	5,44	0,092	
	AA	6	5,98	0,269	
	Gesamt	1.593	5,39	0,027	
<b>HDL [mmol/l]</b>	GG	1.437	1,41	0,009	0,306
	GA	150	1,42	0,031	
	AA	6	1,19	0,082	
	Gesamt	1.593	1,41	0,009	
<b>LDL [mmol/l]</b>	GG	1.431	3,32	0,024	0,279
	GA	148	3,37	0,081	
	AA	6	3,88	0,165	
	Gesamt	1.585	3,33	0,023	
<b>Triglyceride [mmol/l]</b>	GG	1.447	1,45	0,022	0,260
	GA	151	1,47	0,068	
	AA	6	2,00	0,524	
	Gesamt	1.604	1,45	0,021	
<b>Hb<sub>A1C</sub> [%]</b>	GG	1.432	5,52	0,018	0,508
	GA	148	5,56	0,056	
	AA	6	5,78	0,275	
	Gesamt	1.586	5,5231	0,017	

Zu näheren Untersuchung wurde aufgrund der Zellkulturdaten und der niedrigen Häufigkeit des AA-Allels ein dominantes Modell angenommen. Hier werden das heterozygote und das Allel mit der geringsten Frequenz zusammengefasst und als eine Gruppe analysiert. So wurden für den SNP rs846910 an der Position -2937 bp mit dem additiven und dominanten Modell gerechnet.

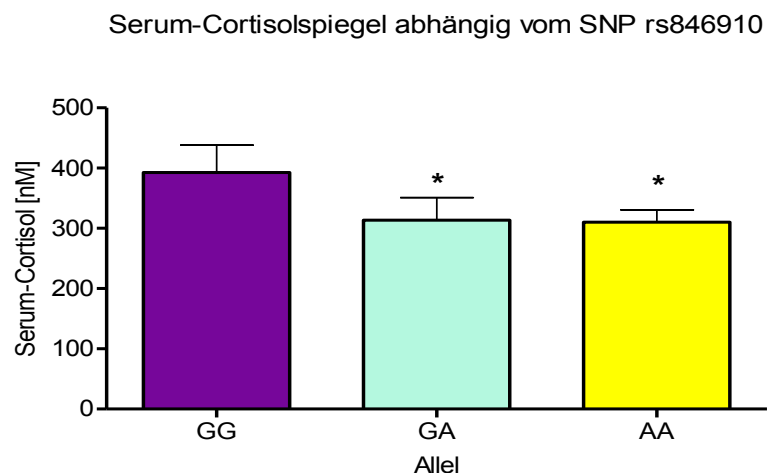
**Tabelle 19: Assoziation zwischen den SNP rs846910 für BMI und Diabetes Typ 2.**

Dargestellt sind die Assoziationen für die Endpunkte im additiven und dominanten Modell für SNP an der Position -2937 bp.

	Odd-Ratio	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
<b>Endpunkt</b>	<b>additiv</b>		
BMI>25 (Heterozygot)	0,732	0,511 - 1,050	0,090
BMI>25 (Mutante)	2,152	0,256 - 18,123	0,481
	<b>dominant</b>		
BMI>25	0,760	0,533 - 1,085	0,131
	<b>additiv</b>		
Typ 2 Diabetes (Heterozygot)	0,867	0,523 - 1,437	0,579
Typ 2 Diabetes (Mutante)	0,849	0,090 - 7,996	0,886
	<b>dominant</b>		
Typ 2 Diabetes	0,866	0,528 - 1,421	0,569

Die Risikoberechnung für das heterozygote Allel GA und Allel AA ergab keine signifikante Ergebnisse. Lediglich tendenziell ergab sich ein das Risiko für einen erhöhten BMI für das Allel AA im additiven Modell. Diese ist aber aufgrund der geringen Zahl von Trägern (n=7) nicht signifikant. Die heterozygoten Träger hatten hingegen tendenziell ein niedriges Risiko (0,732; P=0,090).

Die Bestimmung des Serum-Cortisolspiegel zeigte, dass die Allelträger GA und AA signifikant erniedrigte Cortisolspiegel am Morgen (ca. 8:00) hatten. Die Träger des Allels GG hatten ein Cortisolspiegel von  $392,78 \pm 45,35$  nM. Die Träger der seltenen Allelen GA und AA zeigten geringere Spiegel von  $313,40 \pm 37,61$  nM (GA) und  $310,29 \pm 20,41$  nM (AA). Die Messung erfolgte in den 7 Trägern des Allels AA und Personen mit den Allelen GA und GG, die Alter- BMI- und Geschlechts-gematcht waren. Der durchschnittliche BMI betrug  $31,5 \pm 2,7$  (GG),  $29,6 \pm 2,1$  (GA) sowie  $32,1 \pm 3,6$  (AA).

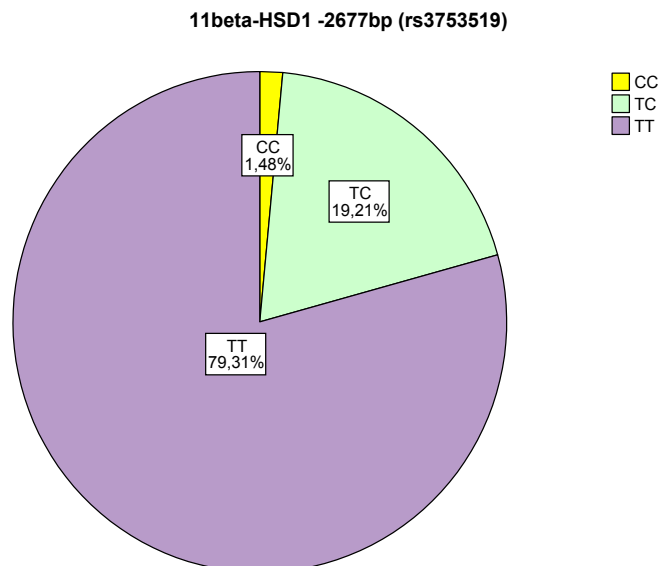


**Abbildung 37:** Morgendliche Cortisol-Spiegel [nM] getrennt nach Allelträger adjustiert für Alter, Geschlecht und BMI; \*P<0,05.



### 3.6.2. Promotor-SNP -2677

In der MeSyBePo-Kohorte gab es 25 Träger des Allels CC und 324 Träger der heterozygoten Variante TC. Insgesamt trugen 1340 Personen das Allel TT. Es gab keine geschlechtsspezifische Verteilung der Allele.



**Abbildung 38:** Häufigkeitsverteilung der Allele TT, TC und CC in der MeSyBePo-Kohorte des SNP rs3753519 im Promotorbereich der 11beta-HSD1 an der Position -2677 bp relativ zum Transkriptionsstart.

In der Kohorte zeigten sich für das seltene Allel CC ein signifikant erhöhter Hüftumfang und ein tendenziell erhöhter Taillenumfang. Daher hatten die Träger des Allels CC einen deutlich erhöhten BMI ( $33,37 \pm 8,46$  vs.  $29,24 \pm 6,24$  (TT),  $P=0,004$ ). Die Zunahme von Hüftumfang als auch Taillenumfang führte zu keinem Unterschied in der Waist-to-Hip-Ratio (WHR).

Für andere Risikofaktoren wie Blutdruck sowie Parameter der Blutfettwerte zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Allelträgern. Auch die Blutzuckerspiegel vor und während des oGTT waren nicht voneinander verschieden. Hingegen war der basale Insulinspiegel bei CC-Allelträgern tendenziell erhöht. Während des oGTT (120 min) zeigten sich ebenfalls tendenziell erhöhte Insulinspiegel bei den Allelträgern CC aber auch bei den Trägern TC. Die  $Hb_{1AC}$ -Werte waren dabei signifikant erhöht ( $5,98 \pm 1,39$  (CC) vs.  $5,52 \pm 0,67$  (TT)).

Tabelle 20: Mittelwerte bestimmter Faktoren in der MeSyBePo-Kohorte getrennt nach Allele für den SNP rs3753519 und die Signifikanz zwischen den Gruppen (ANOVA-Analyse).

	Allel	N	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz zwischen den Gruppen
Alter bei Datenerhebung	TT	1.335	52,2	0,37	0,683
	TC	324	52,6	0,75	
	CC	25	54,3	3,04	
	Gesamt	1.684	52,3	0,33	
Geschlecht des Probanden (männlich)	TT	445			
	TC	100			
	CC	7			
	Gesamt	552			
Geschlecht des Probanden (weiblich)	TT	888			
	TC	224			
	CC	18			
	Gesamt	1130			
Systole [mmHg]	TT	1.255	125,6	0,49	0,393
	TC	307	124,6	0,99	
	CC	23	129,0	3,15	
	Gesamt	1.585	125,4	0,44	
Diastole [mmHg]	TT	1.255	77,9	0,29	0,924
	TC	306	77,8	0,61	
	CC	23	78,6	2,42	
	Gesamt	1.584	77,9	0,26	
Hüftumfang [cm]	TT	1.327	107,8	0,37	<b>0,035</b>
	TC	324	107,3	0,77	
	CC	25	114,6	3,42	
	Gesamt	1.676	107,8	0,34	
Taillenumfang [cm]	TT	1.326	95,8	0,43	<b>0,067</b>
	TC	324	95,0	0,92	
	CC	25	102,7	3,53	
	Gesamt	1.675	95,8	0,39	
BMI	TT	1.333	29,24	0,171	<b>0,004</b>
	TC	324	29,00	0,383	
	CC	25	33,37	1,692	
	Gesamt	1.682	29,25	0,157	
WHR (Waist-to-Hip-Ratio)	TT	1.325	0,89	0,003	0,782
	TC	324	0,89	0,006	
	CC	25	0,90	0,020	
	Gesamt	1.674	0,89	0,002	
0 min Blutzucker [mg/dl]	TT	1.312	94,84	0,47	0,992
	TC	312	94,76	0,87	
	CC	22	95,16	3,09	
	Gesamt	1.646	94,83	0,41	
120 min Blutzucker [mg/dl]	TT	1.258	128,87	1,085	0,179
	TC	300	132,93	2,220	
	CC	20	122,29	6,834	
	Gesamt	1.578	129,56	0,967	

	Allel	N	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz zwischen den Gruppen
0 min Insulin [mIU/l]	TT	1.215	9,01	0,191	<b>0,088</b>
	TC	291	9,02	0,365	
	CC	20	12,35	3,089	
	Gesamt	1.526	9,06	0,172	
120 min Insulin [mIU/l]	TT	1.156	54,54	1,337	0,135
	TC	280	60,00	2,927	
	CC	18	65,68	9,923	
	Gesamt	1.454	55,73	1,210	
HOMA <sub>IR</sub>	TT	1.215	2,21	0,057	0,141
	TC	291	2,18	0,103	
	CC	20	3,09	0,919	
	Gesamt	1.526	2,21	0,051	
ISI <sub>S3</sub>	TT	1.116	0,078	0,0010	0,557
	TC	265	0,077	0,0021	
	CC	18	0,072	0,0063	
	Gesamt	1.399	0,078	0,0009	
Cholesterin [mmol/l]	TT	1.247	5,39	0,030	0,670
	TC	302	5,37	0,065	
	CC	24	5,21	0,183	
	Gesamt	1.573	5,39	0,027	
HDL [mmol/l]	TT	1.247	1,40	0,010	0,534
	TC	302	1,42	0,021	
	CC	24	1,36	0,065	
	Gesamt	1.573	1,40	0,009	
LDL [mmol/l]	TT	1.242	3,34	0,026	0,686
	TC	299	3,29	0,056	
	CC	23	3,28	0,175	
	Gesamt	1.564	3,33	0,023	
Triglyceride [mmol/l]	TT	1.254	1,46	0,024	0,767
	TC	305	1,43	0,046	
	CC	24	1,37	0,173	
	Gesamt	1.583	1,45	0,021	
Hb <sub>A1C</sub> (%)	TT	1.241	5,52	0,019	<b>0,004</b>
	TC	300	5,57	0,039	
	CC	23	5,98	0,290	
	Gesamt	1.564	5,53	0,017	

Im Risiko-Modell für den SNP an der Position -2677 bp ergab sich weder für das additive noch dominante Modell ein erhöhtes Risiko für einen BMI > 25 kg/cm<sup>2</sup> oder Typ 2 Diabetes mellitus. Wie sich bereits bei den Mittelwerten für die 3 Allel zeigte, kann eher ein rezessives Modell für den SNP angenommen werden.

Bei den rezessiven Modell zeigte sich schließlich ein tendenziell erhöhtes Risiko für das seltene Allel für einen BMI > 25 kg/cm<sup>2</sup> (P=0,093) mit einer ODD-Ratio von 2,880. Jedoch ist die Zahl der rezessiven Träger gering (N=25). So zeigte sich auch im rezessiven Modell kein erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes.

**Tabelle 21: Risiko-Bewertung für den SNP rs3753519 für BMI und Diabetes Typ 2.**

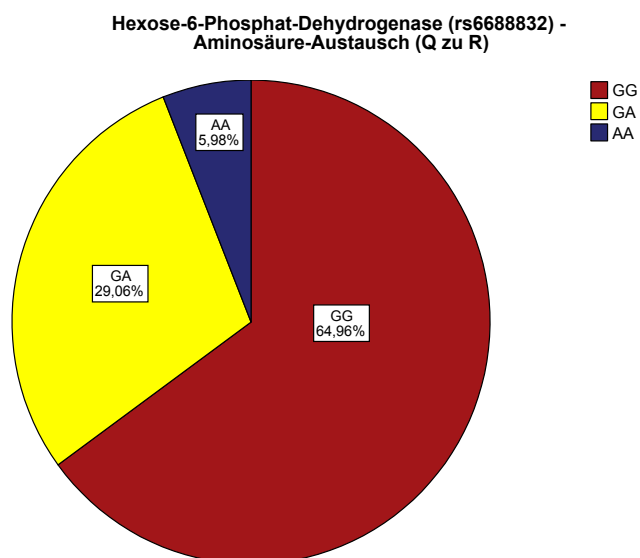
Assoziationen für die Endpunkte im additiven, dominanten und rezessiven Modell für SNP an der Position -2677 bp.

Endpunkt	Odd-Ratio	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
	<b>additiv</b>		
BMI>25 (Heterozygot)	0,876	0,666 - 1,152	0,344
BMI>25 (Mutante)	2,804	0,815 – 9,646	0,102
	<b>dominant</b>		
BMI>25	0,933	0,533 - 1,085	0,611
	<b>rezessiv</b>		
BMI>25	2,880	0,838 – 9,893	0,093
	<b>additiv</b>		
Typ 2 Diabetes (Heterozygot)	1,057	0,735 - 1,518	0,766
Typ 2 Diabetes (Mutante)	1,152	0,403 – 3,293	0,792
	<b>dominant</b>		
Typ 2 Diabetes	1,065	0,751 - 1,510	0,724
	<b>rezessiv</b>		
Typ 2 Diabetes	1,345	0,500 – 3,619	0,557

### 3.6.3. SNP in der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase (H6PD) ist im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums mit der 11beta-HSD1 kolokalisiert und regeneriert den Kofaktor NADP+. Bei einem Ausfall der Enzymaktivität der H6PD ist die Enzymaktivität der 11beta-HSD1 sehr gering oder kaum vorhanden. Der untersuchte SNP führt im Exon 5 zu einem Basenaustausch von der Aminosäure Glutamin zu Arginin.

Diese SNP-Variante war in der MeSyBePo-Kohorte häufiger vertreten als die beiden anderen untersuchten SNP-Varianten im Promotorbereich der 11beta-HSD1. Mit ca. 6% war die seltene Variante AA relativ häufig vertreten.



**Abbildung 39:** Häufigkeiten der 3 Allele des SNP rs6688832 im Exonbereich der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit einem Basenaustausch von Glutamin zu Arginin.

Es ergab sich für keinen der untersuchten Parameter ein wesentlicher Unterschied zwischen den Allelvarianten. Für den Blutzuckerspiegel vor und während des oGTTs konnten leicht erhöhte Werte für das seltene Allel AA beobachtet werden. Die Insulinspiegel unterschieden sich dabei nicht. Hin-gegen hatten die Träger des seltenen Allels AA leicht erniedrigte, aber nicht signifikant, Hüftumfänge und BMI-Werte.

**Tabelle 22: Mittelwerte bestimmter Faktoren in der MeSyBePo-Kohorte getrennt nach Allele für den SNP rs6688832 und die Signifikanz zwischen den Gruppen (ANOVA-Analyse).**

	Allel	N	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz zwischen den Gruppen
<b>Alter bei Datenerhebung</b>	GG	835	52,7	0,47	0,754
	GA	373	52,1	0,72	
	AA	77	53,0	1,60	
	Gesamt	1.285	52,6	0,38	
<b>Geschlecht des Probanden (männlich)</b>	GG	290			
	GA	110			
	AA	32			
	Gesamt	432			
<b>Geschlecht des Probanden (weiblich)</b>	GG	542			
	GA	262			
	AA	45			
	Gesamt	849			
<b>Systole [mmHg]</b>	GG	781	125,7	0,64	0,715
	GA	348	125,1	0,95	
	AA	72	126,9	1,97	
	Gesamt	1.201	125,6	0,51	
<b>Diastole [mmHg]</b>	GG	780	78,2	0,39	0,267
	GA	348	77,1	0,55	
	AA	72	77,3	1,02	
	Gesamt	1.200	77,9	0,31	
<b>Hüftumfang [cm]</b>	GG	829	107,2	0,46	0,233
	GA	371	107,0	0,70	
	AA	77	104,6	1,27	
	Gesamt	1.277	107,0	0,37	
<b>Tailenumfang [cm]</b>	GG	829	95,5	0,55	0,625
	GA	371	94,7	0,83	
	AA	77	94,4	1,68	
	Gesamt	1.277	95,2	0,44	
<b>BMI</b>	GG	833	29,13	0,224	0,420
	GA	372	28,62	0,326	
	AA	77	28,75	0,674	
	Gesamt	1.282	28,96	0,178	
<b>WHR (Waist-to-Hip-Ratio)</b>	GG	828	0,89	0,003	0,337
	GA	371	0,88	0,005	
	AA	77	0,90	0,011	
	Gesamt	1.276	0,89	0,003	
<b>Mittelwert beider ACC</b>	GG	741	0,67	0,006	0,336
	GA	325	0,67	0,008	
	AA	65	0,70	0,020	
	Gesamt	1.131	0,68	0,005	

	Allel	N	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz zwischen den Gruppen
<b>0 min Blutzucker [mg/dl]</b>	GG	821	94,77	0,584	0,259
	GA	362	94,23	0,889	
	AA	71	97,83	2,228	
	Gesamt	1.254	94,79	0,478	
<b>120 min Blutzucker [mg/dl]</b>	GG	787	127,96	1,334	0,131
	GA	347	130,45	2,081	
	AA	67	137,19	5,858	
	Gesamt	1.201	129,20	1,110	
<b>0 min Insulin [mIU/l]</b>	GG	749	9,01	0,231	0,489
	GA	326	8,72	0,355	
	AA	59	9,78	1,185	
	Gesamt	1.134	8,97	0,193	
<b>120 min Insulin [mIU/l]</b>	GG	713	52,94	1,651	0,325
	GA	310	57,20	2,721	
	AA	56	57,95	6,594	
	Gesamt	1.079	54,42	1,385	
<b>HOMA<sub>IR</sub></b>	GG	749	2,19	0,067	0,564
	GA	326	2,13	0,112	
	AA	59	2,42	0,310	
	Gesamt	1.134	2,18	0,057	
<b>ISI<sub>S3</sub></b>	GG	687	0,079	0,0012	0,690
	GA	298	0,079	0,0019	
	AA	53	0,075	0,0052	
	Gesamt	1.038	0,078	0,0010	
<b>Cholesterin [mmol/l]</b>	GG	768	5,39	0,037	0,101
	GA	341	5,52	0,057	
	AA	70	5,30	0,132	
	Gesamt	1.179	5,42	0,030	
<b>HDL [mmol/l]</b>	GG	768	1,41	0,013	0,373
	GA	341	1,44	0,020	
	AA	70	1,41	0,045	
	Gesamt	1.179	1,42	0,011	
<b>LDL [mmol/l]</b>	GG	764	3,33	0,032	0,412
	GA	336	3,40	0,052	
	AA	70	3,27	0,097	
	Gesamt	1.170	3,34	0,026	
<b>Triglyceride [mmol/l]</b>	GG	773	1,45	0,029	0,526
	GA	343	1,51	0,050	
	AA	70	1,49	0,096	
	Gesamt	1.186	1,47	0,025	
<b>Hb<sub>A1c</sub> [%]</b>	GG	767	5,53	0,026	0,216
	GA	337	5,49	0,038	
	AA	70	5,66	0,097	
	Gesamt	1.174	5,53	0,021	

Obwohl sich keine signifikanten Ergebnisse für einzelne Parameter ergaben, zeigte sich für die Risikoberechnung eine Tendenz für ein erhöhtes Typ 2 Diabetes-Risiko. Im additiven Modell sowie im rezessiven Modell konnten für das seltene Allel AA ein tendenziell erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes beobachtet werden.

**Tabelle 23: Risiko-Bewertung für den SNP rs6688832 in der H6PD für BMI und Diabetes Typ 2.**

Assoziationen für die Endpunkte im additiven, dominanten und rezessiven Modell für SNP in der H6PD.

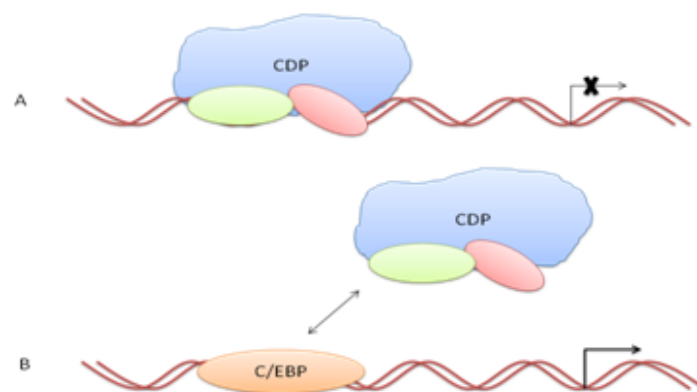
	Odd-Ratio	95%-Konfidenzintervall	P-Wert
<b>Endpunkt</b>	<b>additiv</b>		
BMI>25 (Heterozygot)	0,789	0,600 - 1,037	0,089
BMI>25 (Mutante)	0,918	0,537 – 1,537	0,753
	<b>dominant</b>		
BMI>25	0,807	0,625 - 1,047	0,107
	<b>rezessiv</b>		
BMI>25	0,990	0,584 – 1,677	0,970
	additiv		
Typ 2 Diabetes (Heterozygot)	1,200	0,837 - 1,720	0,322
Typ 2 Diabetes (Mutante)	1,757	0,403 – 3,375	0,090
	<b>dominant</b>		
Typ 2 Diabetes	1,285	0,918 - 1,799	0,144
	<b>rezessiv</b>		
Typ 2 Diabetes	1,660	0,873 – 3,155	0,122

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Zellspezifische Regulation des 11beta-HSD1-Promotors

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die klonierten Promotorfragmente der 11beta-HSD1 aus dem Bereich von +188 bis -3034 bp zellspezifisch reguliert werden. So zeigte sich, dass der Bereich mit der höchsten basalen Luciferase-Aktivität in 3T3-L1-Zellen (undifferenziert sowie differenziert) mit -321 bis +188 bp (F2) wesentlich länger war als in HepG2-Zellen, wo bereits im Fragment F1a (-85/+188) die höchste Luciferase-Aktivität zu finden war. Eine solche zellabhängige Regulation hatte bereits Bruley et al. durch Transfektion des Maus-11beta-HSD1-Promotors in verschiedenen Zelllinien gesehen [61]. In diesem Bereich ist eine Vielzahl von putativen Bindungsstellen für CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) zu finden. Zudem kann direkt auf dem Transkriptionsstart CREB2 mit intrinsischer HAT-Aktivität binden [48,89]. So ist es möglich, dass in den HepG2-Zellen bereits das sehr kleine Promotorfragment F1a die höchste Luciferase-Aktivität zeigte. Durch die Interaktion direkt mit anderen Transkriptionsfaktoren oder indirekt durch andere Kofaktoren kommt es in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zu einer weiteren Steigerung der Promotoraktivität im Fragment F2. Ansonsten zeigte die 3T3-L1-Zellen relativ gleichbleibende Luciferase-Aktivitäten. Diese Interaktionen könnten aber auch das Absinken der Aktivität von Fragment F1a zu F1 und F2 in den HepG2-Zellen verursachen.

In beiden Zellmodellen zeigte sich zudem eine starke Reduktion der Luciferase-Aktivität um mehr als 50% ab dem Promotorfragment F3, d.h. ab dem Bereich -322, die auch in allen längeren Fragmenten erhalten blieb. Eine solche Reduktion war auch im Rattenpromotor, der in HepG2-Zellen untersucht worden ist, zu sehen [60]. Untersuchungen des humanen Promotors in WISH-Zellen zeigten ebenfalls eine Reduktion der Promotoraktivität um mehr als 50%, jedoch erst ab dem Bereich um -858 bp [90]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Regulation des 11beta-HSD1-Promotors zellabhängig ist und Mechanismen nur bedingt auf andere Zell- oder Gewebetypen übertragbar sind. Jedoch wirkt ein starker Repressor auf den Promotor der 11beta-HSD1, der in mehrere Zelltypen nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 40:** Funktion des Transcriptional repressor CDP (Clox/Cut-Familie) und C/EBP-Proteinen und deren Einfluss auf die Promotoraktivität.

Im Bereich des Promotorfragmentes F3 ist durch den MatInspector als sichtlich erkennbarer Repressor der Transcriptional repressor CDP (CLOX) gefunden worden. Darüberhinaus befindet sich dort ein weiterer Repressor, der Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/ CBF1, der für die starke Repression mitverantwortlich sein kann. Diese Transkriptionsfaktoren sind einerseits starke



aktive Repressoren, können aber auch in Konkurrenz mit anderen Faktoren treten [91-95]. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die variable Stärke der Repression in den 3 Zellmodellen (Abbildung 13) sowie für die in der Literatur gesehene unterschiedliche Repression des 11beta-HSD1-Promotors [60,61,90].

Der Repressor „Transcriptional repressor CDP“ steht für CAAT displacement protein und gehört zur Proteinfamilie Clox (Cut-like homeo box) [94,95], die hochkonserviert ist. Die Aktivierung von CDP erfolgt über die Phosphorylierung und dessen Aktivität scheint abhängig vom Differenzierungsstatus und vom Zellzyklus zu sein [96]. Ein SNP (rs860185) der 11beta-HSD1, der sich exakt im möglichen Bindungsbereich des CDP befindet, kann die Bindungssequenz zerstören und führte zu zellspezifischen Reaktionen (Abbildung 17). Während die Mutation an der Position -620 bp in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen nur zu einer geringen Reduktion ( $\approx 25\%$ ) der Promotoraktivität des Fragments F3 führte, kam es in den HepG2-Zellen zu einer totalen Deaktivierung des Promotorfragmentes. Dies zeigt wiederum eine zellspezifische Regulation der 11beta-HSD1, jedoch stehen diese Ergebnisse in offensichtlichem Widerspruch. So würde man durch die Zerstörung einer Bindestelle eher eine Steigerung der Promotoraktivität erwarten und nicht eine Deaktivierung. Dies legt nahe, dass weitere Faktoren eine Rolle in diesem Zusammenhang spielen müssen.

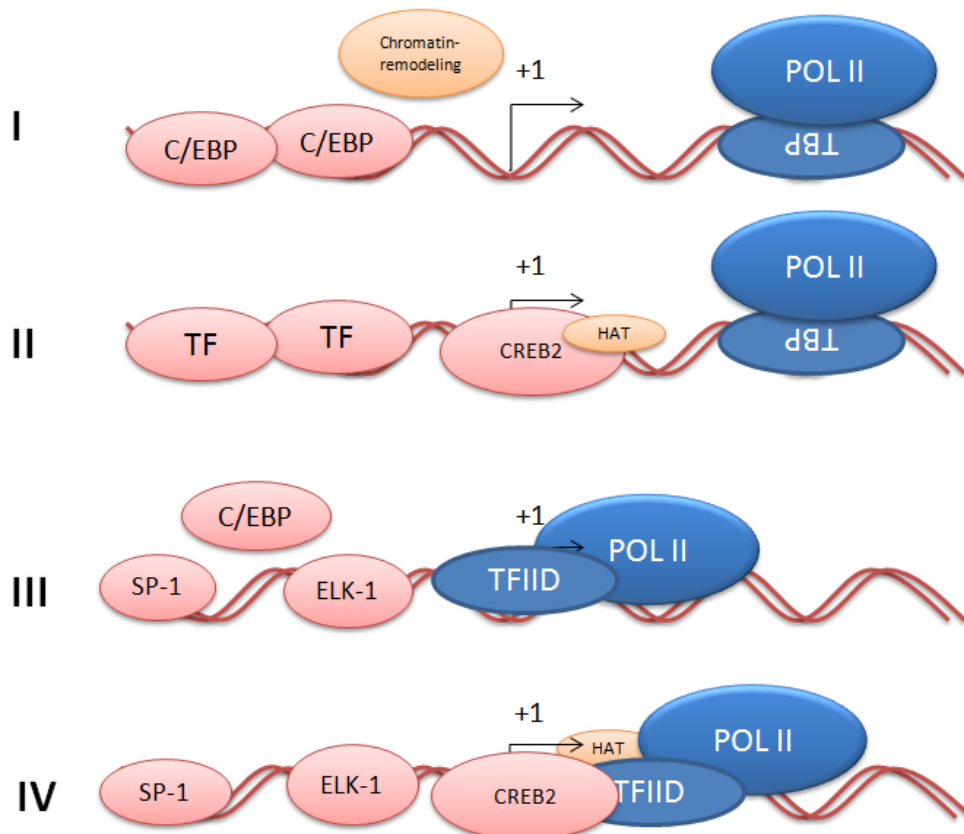
#### **4.2. Nachweis einer atypischen (non-canonical) TATA-Box downstream vom Transkriptionsstart**

Bisher wurde der Promotor der 11beta-HSD1 in den wenigen vorhandenen Studien als TATA-loser Promotor beschrieben, da im Bereich um -30 bp vor dem Transkriptionsstart keine entsprechende Konsensussequenz für eine TATA-Box zu finden ist [59,60]. Es zeigte sich bei einer ausgedehnteren Analyse, dass sich eine atypische (non-canonical) TATA-Box downstream vom Transkriptionsstart befindet und von 2 unabhängigen Datenbanken (MatInspector und JasparDatabase) gefunden wurde [82,83]. Normalerweise befindet sich die Mehrzahl der klassischen TATA-Box um die Position -30 bp. Jedoch zeigte sich bei der systematischen Analyse von humanen Genen, dass die Positionsfrequenz von sogenannten atypischen TATA-Box zwar auch an der Position -30 bp die größte Häufigkeit hat, aber die Häufigkeiten für den Bereich zwischen -250 bis +180 bei 25-45% liegt [97]. Die hier gefundene atypische TATA-Box liegt auf dem Negativ-Strang in umgekehrter Orientierung an der Position +96 bis +112 bp relativ zum Transkriptionsstart (Tabelle 13). Die umgekehrte Richtung würde nicht für die Ablesung des Gens auf dem Positiv-Strang sprechen, wo das Gen der 11beta-HSD1 lokalisiert ist. So zeigten auch erste Experimente mit synthetischer DNA mit einem TATA-Box-Element eine polare Bindung des TATA-Binding Proteins (TBP) – eine Untereinheit des zuerst bindenden TFIID-Komplexes - und man ging daher von einer richtungsabhängigen Funktion der TATA-Box aus. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Orientierung keinen wesentlich Einfluss auf die Ableserichtung des RNA-Polymerase-II-Komplexes hatte, wenn alle weiteren beeinflussenden Faktoren (Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren) auf der 5'-Seite (Positiv-Strang) der TATA-Box liegen. Durch die umgekehrte Orientierung ergibt sich lediglich eine Reduktion der Promotoraktivität [98,99].

Mittels eines Elektrophorese-Mobilität-Shift-Assays (EMSA) konnte für das Oligo 1, das den Bereich +86 bis +155 bp umfasst, eine Bindung in diesem Bereich durch Kernextrakte von HepG2- und undifferenzierten 3T3-L1-Zellen nachgewiesen werden, wobei die Nutzung in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen variabel zu sein scheint (Daten nicht gezeigt). Durch den Zusatz eines Antikörpers

gegen das TATA-Binding Protein (TBP) kam es zu einem Supershift und somit zum Nachweis der direkten TBP-Bindung an den Promotorbereich in diesen Bereich der DNA (Abbildung 15). Eine variable Bindung des TBP in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen kann möglicherweise auch auf temporäre Effekte in 3T3-L1-Zellen zurückgeführt werden. Ein Punkt, der neben der chemisch induzierten Adipogenese eine Rolle spielt, ist die Kontaktinhibition und das Synchronisieren dieser Zellen in einer Phase [100,101]. Dabei kann die Bindung von C/EBP-Proteinen, die u.a. Chromatinremodeling Proteine an die DNA rekrutieren, eine wesentliche Rolle spielen. So kann C/EPalpha aber auch mit dem TBP interagieren und die Transkription initiieren [45,69,100]. Des Weiteren ist auch eine Konkurrenz zwischen TBP und anderen Transkriptionsfaktoren möglich, die in diesen Bereich binden könnten [102]. Weiterhin steht eine CREB2-Bindungsstelle direkt auf dem Transkriptionsstart in Konkurrenz mit der INR, welche eine intrinsische Histon-Acetyltransferase (HAT)-Aktivität besitzt, aber mit dem TBP interagieren kann und so deutlich die Promotoraktivität steigern kann [48,50,51]. So ist es möglich, dass sich die Konfluenz der Zellen bei den Zellkernextraktionen voneinander unterscheiden und es dadurch zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen kam.

Betrachtet man jedoch ausschließlich den Positiv-Strang und die für den RNA-Polymerase-II-Komplex wichtigen Positionen und Sequenzen, ergibt sich das Bild eines TATA-losen Promotors mit einem Initiator-Element (INR) um die Position +1 sowie ein Downstream Core Promotor Element (DPE) um die Position +30 (Tabelle 13). Diese können unabhängig von der TATA-Box die Transkription initiieren [36]. Für TATA-lose Promotoren spielt insbesondere das DPE eine entscheidende Rolle. Dieses bindet den TFIID des RNA-Polymerase-II-Komplexes und arbeitet in Verbindung mit dem Initiator-Element. Im Promotor der 11beta-HSD1 war dieses Element exakt um die Position +30 lokalisiert [36]. Dabei kann die INR auch unabhängig von den anderen Elementen arbeiten und die Transkription initiieren.



**Abbildung 41:** Mögliche Modelle (I-IV) der Bindung von Transkriptionsfaktoren an den 11beta-HSD1-Promotor

Es besteht die Möglichkeit einer vielfältigen Regulation des basalen Promotorkomplexes, so dass mehrere mögliche Modelle konstruiert werden können (Abbildung 41). So wäre die Regulation nur durch die INR+DPE-Elemente mit der Unterstützung der putativen SP-1- und ELK-1-Bindungsstellen bzw. C/EBP-Proteinen auf dem Positiv-Strang möglich (III-IV). Da in diesem Fall die Orientierungen der Bindungsstellen 5'-3' auf dem Positiv-Strang sind, könnte man eine höhere Promotoraktivität als im Fall der atypischen TATA-Box erwarten [99]. Des Weiteren kann die INR auch unabhängig vom DPE die Promotoraktivität regulieren (III).

Eine weitere Möglichkeit ist die Regulation durch eine atypische TATA-Box, welche in reverser Richtung zum Gen im upstream-Bereich liegt. Dazu können die putativen SP-1- und ELK-1-Bindungsstellen ebenfalls mit reverser Orientierung die Initiation des RNA-Polymerase II-Komplexes unterstützen (I-II). In diesem Fall wäre eventuell die Promotoraktivität leicht reduziert. Eine weitere Rolle können CREB2 oder C/EBP-Proteine in Zusammenarbeit mit der atypischen TAT-Box spielen (II), wobei man hier eine höhere Promotoraktivität durch HAT-Aktivität oder die Rekrutierung von Chromatin-Remodeling Faktoren erwarten könnte (Abbildung 41) [48,50,103,104].

Welcher Fall für den Promotor der 11beta-HSD1 zutrifft bzw. welche weiteren Einflüsse der Zellstatus oder Stimulationen haben, kann hier nicht abschließend gesagt werden und bedürfen weiterer Analysen dieses Bereiches. Jedoch konnte die *in-silico*-Analyse einige Anhaltspunkt für mögliche Regulationsmechanismen auf Promotorebene liefern. Mit den hier durchgeführten Experimenten konnte aber nicht die Protein-Protein-Interaktionen bzw. Kofaktoren-Rekrutierungen und 3D-Struktur des Genabschnittes erfasst werden, die wesentliche Rollen bei der Genregulation spielen. Jedoch ergibt sich trotz alledem eine hohe Variabilität in der Regulation der 11beta-HSD1 durch eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten von Elementen, die für die Bindung des RNA-Polymerase II-Komplexes verantwortlich sind.

#### **4.3. Nachweis der Bindung von C/EBP-Proteinen sowie die Regulation der 11beta-HSD1 durch diese Proteine**

Eine weitere mögliche Erklärung für die sehr unterschiedliche Promotoraktivität im proximalen Bereich, könnte die Regulation durch C/EBP-Proteine darstellen. Diese Transkriptionsfaktoren sind insbesondere im Metabolismus in Leber und Fettgewebe sowie bei der Adipogenese von Bedeutung. Bereits in anderen Arbeiten konnte die Bedeutung der Regulation durch C/EBPs für den 11beta-HSD1-Promotor gezeigt werden [59-62,90]. Im humanen Promotor sind ebenfalls mehrere putative C/EBP-Bindungsstellen mit einer Häufung um den Transkriptionsstart der 11beta-HSD1 zu finden [59,60]. Im Bereich bis -321 bp wurden mit Rattenleberextrakten mehrere Bindungsstellen nachgewiesen, die mit der Consensus-Sequenz übereinstimmen oder sensitiv auf C/EBPalpha reagierten [60]. Jedoch sinkt die Sequenzübereinstimmung mit der Ratte in Bereich ab ca. -225 bp stark ab (Daten nicht gezeigt), so dass sich einige Bindungsstellen im humanen Promotorbereich nicht wiederfinden lassen (Abbildung 14).

Alle Subtypen der C/EBP-Familie können mit der gleichen Bindungsstelle interagieren. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die C/EBP-Proteine unterschiedliche Transaktivierungspotentiale auf den 11beta-HSD1-Promotor zeigten (51). Dies war auch in dieser Arbeit zu beobachten. So zeigten insbesondere Kotransfektionsexperimente mit C/EBPalpha in allen Spezies ein großes Aktivierungspotential auf den Promotor der 11beta-HSD1. Die Stärke der Aktivierung durch C/EBPalpha war dabei

abhängig von der Bindungsposition [60-62]. Die Expression der C/EBP-Proteine ist dabei stark gewebeabhängig [105] und so ist die Expression von C/EBPalpha und -beta in der humanen Leber gegenüber C/EBPdelta relativ hoch. In den Präadipozyten und Adipozyten ist die Expression dagegen abhängig von der Adipogenese und temporal reguliert [44]. Während C/EBPbeta und -delta in der frühen Phase eine Rolle spielen und deren Expression hoch ist, spielen in der späten Phase sowie in den ausgereiften Adipozyten nur C/EBPalpha und -beta eine Rolle (Abbildung 22) [44,45]. So zeigte sich hier, dass C/EBPalpha aber auch C/EBPdelta in den HepG2-Zellen ähnliche, sehr hohe Aktivierungspotentiale besitzen, im Vergleich dazu C/EBPbeta jedoch nur ein sehr schwacher Aktivator der 11beta-HSD1-Promotorfragmente ist [59,60]. Interessanterweise war zu sehen, dass die C/EBP-Proteine als Heterodimere die einzelnen Promotorfragmente ebenfalls individuell regulierten und durch C/EBPbeta nur geringfügig in ihrem Aktivierungspotential beeinflusst wurden. Zudem zeigte sich auch in HepG2-Zellen eine starke Abhängigkeit der Aktivierung durch die C/EBP-Isoformen von den Promotorfragmenten (Tabelle 14). So kann die Regulation der 11beta-HSD1 in den HepG2-Zellen auf direkte Bindung sowie auf eine individuelle Rekrutierung und Interaktion mit Kofaktoren zurückgeführt werden und so ist insbesondere hier eine differenzielle Regulation der 11beta-HSD1 möglich. Die Transaktivierungspotentiale der C/EBP-Proteine waren überraschenderweise in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen gleich hoch. Zudem war in allen untersuchten Oligonukleotiden im EMSA mit putativen Bindungsstellen für C/EBP keine Bindungspräferenz der drei C/EBP-Proteine zu erkennen. Jedoch kann die Bindung der C/EBP-Proteine zu einem anderen Zeitpunkt eine veränderte Bedeutung haben [106].

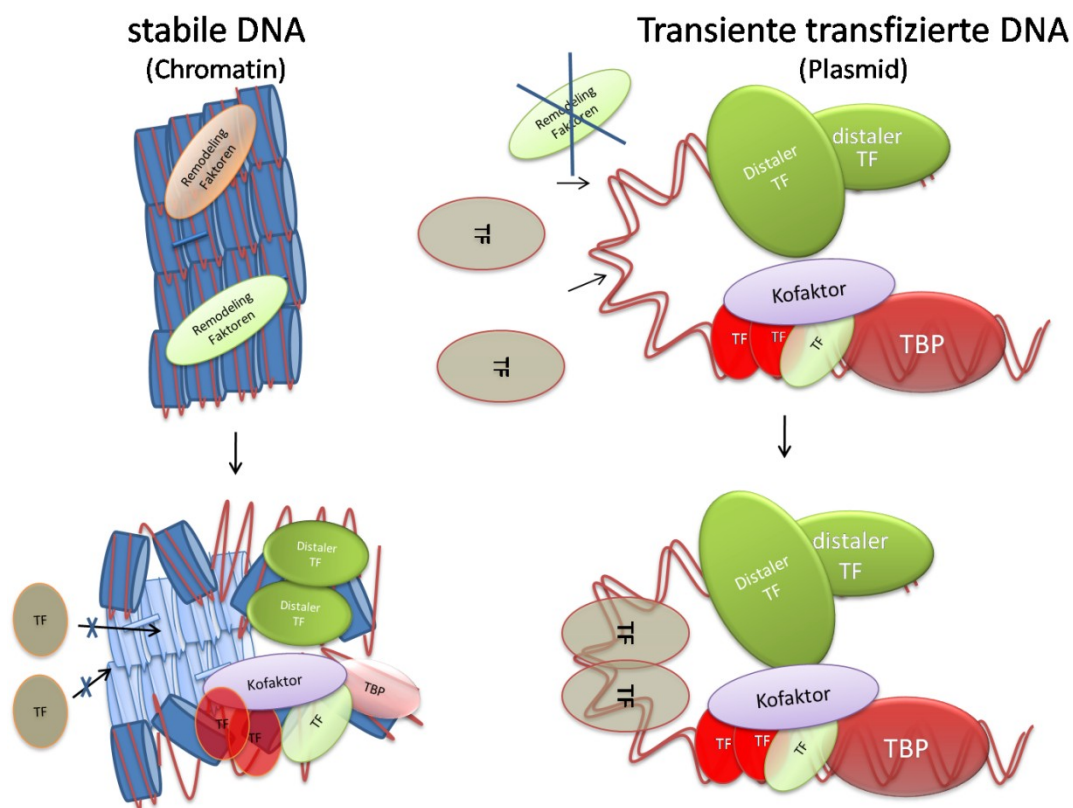
Bei der basalen Luciferase-Aktivität zeigte sich in den HepG2-Zellen die höchste Promotoraktivität im Fragment F1a, hier war die zusätzliche Aktivierung durch die Kotransfektion am geringsten. Im EMSA zeigte sich ebenfalls nur eine sehr schwache Bindung der C/EBP-Proteine an die Oligos 2 und 3 (Promotorfragment F1a) in beiden Zelltypen (HepG2 und undifferenzierten 3T3-L1) (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich, dass insbesondere das Fragment F3 mit der geringsten Luciferase-Aktivität durch alle 3 Isoformen die deutlichste Steigerung erfuhr. Da sich im Promotorfragment F3 auch eine putative Bindungsstelle für das Transcriptional repressor CDP (CAAT displacement protein) befindet, ist es möglich, dass durch die Kotransfektion es zur Competition mit den C/EBP-Proteinen kam und der Repressor verdrängt wurde (Abbildung 40). Zudem zeigten alle längeren Fragmente (ausgenommen F6) eine ähnliche Luciferase-Aktivität wie die kürzeren Fragmente.

Diese Ergebnisse unterstreichen die zellabhängige und wahrscheinlich entwicklungsabhängige Regulation (Adipogenese etc.) der 11beta-HSD1 durch die zellspezifische Expression von Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren scheint der basale Promotorkomplex sehr variabel zu sein, so dass eine individuelle Regulation möglich ist. Auch die unterschiedliche Rekrutierung von Kofaktoren sowie Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren können zu einer zellspezifischen Regulation führen.

#### **4.4. Vergleich der mRNA mit den Daten aus den Luciferase-Assays**

Der Vergleich der mRNA-Expressionsänderung unter den verschiedenen Stimulationen zeigte eine weitgehende Übereinstimmung mit den Daten aus den Luciferase-Assays sowohl in der Tendenz als auch im Effekt selbst. Bei einigen Substanzen zeigte sich jedoch eine gegensätzliche Regulation des mRNA-Levels und in den Luciferase-Assays. Für diese Unterschiede gibt es 2 mögliche Erklärungen.

Einerseits können sich Regulationsmechanismen in den akuten und chronischen Stimulationen grundsätzlich voneinander unterscheiden. Die mRNA wurde hier bereits nach 1 Stunde gewonnen, während die Stimulationszeit in den Luciferase-Assays 40 Stunden betrug. Andererseits unterscheidet sich in beiden Experimenten die Architektur des Promotorbereiches der 11 $\beta$ -HSD1. Im Luciferase-Assay wurde nur ein Ausschnitt des Promotors untersucht. Hinzu kommt, dass dieser in ein Plasmid inkloniert ist, welcher keine höhere Struktur (Histone/ Chromatinstruktur) annehmen kann. Dies bedeutet, dass alle Transkriptionsfaktoren ohne sterische Hinderung an die DNA binden und so die Transkription verändern können [107]. Zudem besitzen einige Faktoren Histon-modifizierende Eigenschaften bzw. rekrutieren entsprechende Kofaktoren, so dass die Ergebnisse aus den Luciferase-Assays von den mRNA-Daten abweichen können (Abbildung 42) [44,50,104].

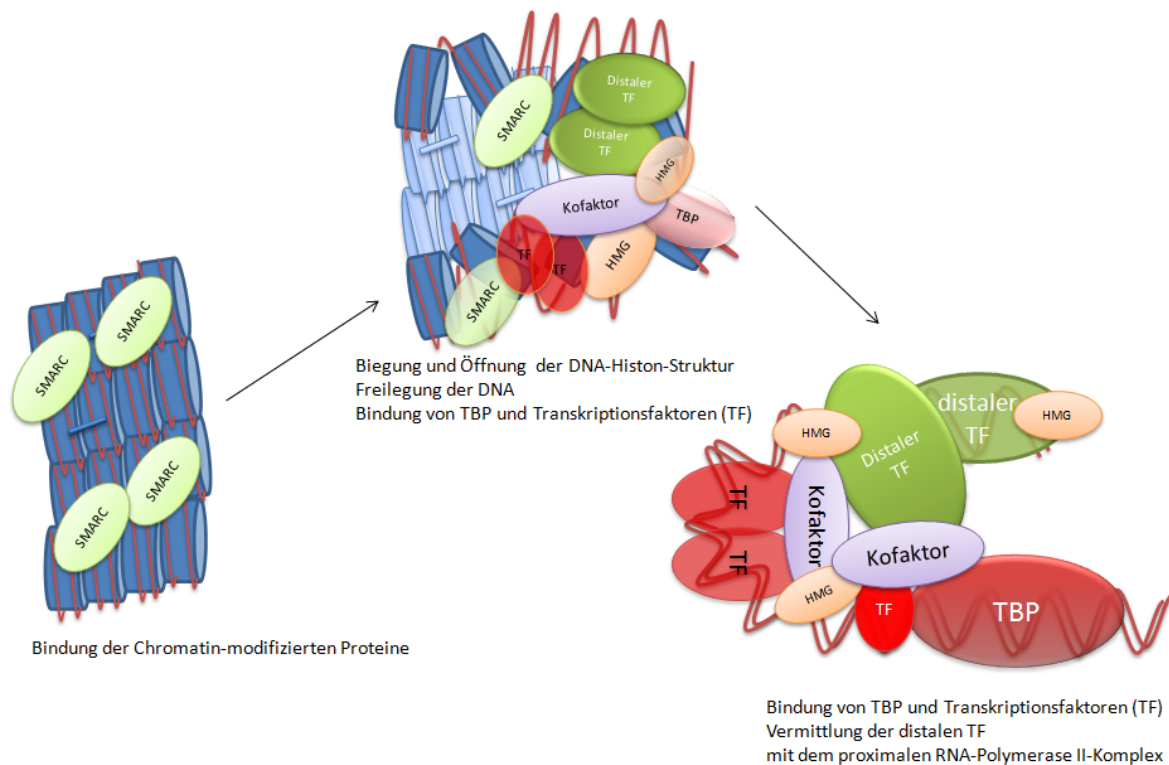


**Abbildung 42:** Veränderung des Bindungsmusters von Transkriptionsfaktoren an die DNA, die im Plasmid organisiert ist oder an die DNA, die in höherer 3D-Struktur (Histonen, Chromatin) organisiert ist.

Die 3D-Struktur der untersuchten DNA-Region spielt neben dem Promotor eine besondere Rolle bei der Genregulation. Die DNA liegt kompakt gebunden an Histonen und ist in höheren Strukturen den Nucleosomen und letztendlich im Chromatin organisiert (Abbildung 4). Durch diese kompakte Struktur ist die Bindung von Transkriptionsfaktoren als auch des RNA-Polymerase II-Komplexes inhibiert. Um die Struktur zu verändern und aufzuheben gibt es sogenannte „architectural transcription factors“. Dazu gehören u.a. die Proteine der HMG-Familie (high-mobility group mammalian non histone nuclear proteins) sowie die SMARC (SWI/SNF-related, matrix associated, actin-dependent regulator of chromatin) dazu [104,106,108,109].

HMG-Proteine haben dabei keine direkte aktivierende oder reprimierende Wirkung, aber unterstützen die Zusammensetzung großer Multiproteinkomplexe und vermitteln die Interaktion dieser mit dem basalen RNA-Polymerase-II-Komplex [110-112]. Bei aktivierender Wirkung werden diese

auch Enhanceosomen genannt. Die HMG-Proteine bewirken u.a. die Entfernung des Histonproteins H1, welches die Nucleosomen „quervernetzt“, sowie biegen und entwinden die DNA. Dadurch können die Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Stellen binden. Im untersuchten Bereich befinden sich 6 putative Bindungsstellen mit einer Häufung zwischen -900 bis -2100 bp. Dadurch wird die Interaktion von Transkriptionsfaktoren, die im distalen Bereich des 11beta-HSD1-Promotors lokalisiert sind, mit dem basalen Promotorkomplex vermittelt (Abbildung 43).

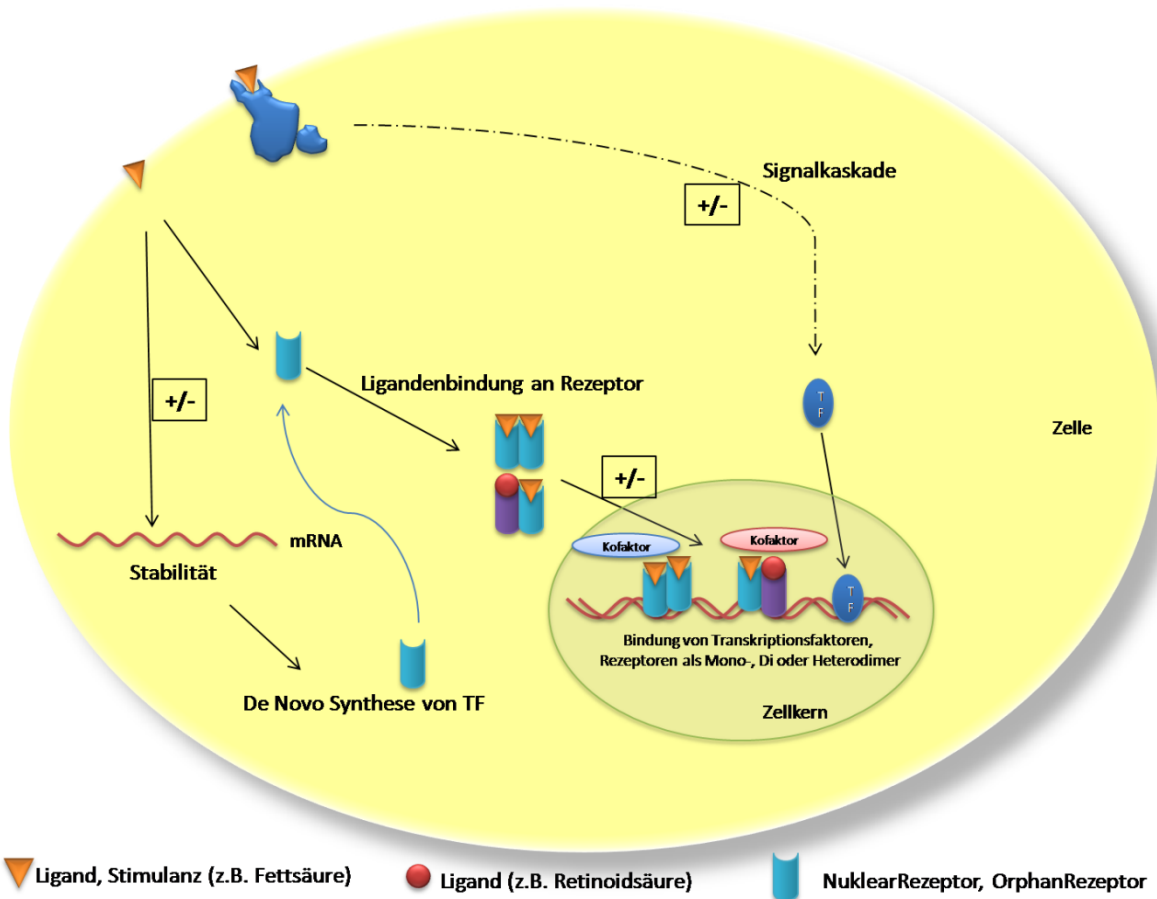


**Abbildung 43:** Beispiel für das Zusammenwirken von HMG- sowie SMARC-Proteinen und anderen Transkriptionsfaktoren, die einen Multiproteinkomplex (Enhanceosomen) bilden und die Promotoraktivität beeinflussen.

SMARC hingegen sind ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Proteine, die die Struktur des Chromatins verändern und die Bindung von Transkriptionsfaktoren begünstigen [104,106,108]. Wesentlich häufiger und im gleichmäßigeren Abstand als bei HMG tauchen Bindungsstellen für SMARC auf. Im gesamten untersuchten Bereich sind 11 putative Bindungsstellen, welche in gleichmäßigen Abständen zu finden sind. Insbesondere in der Nähe des Transkriptionsstarts befinden sich 3 mögliche Bindungspositionen, wodurch die Freilegung des Transkriptionsstarts durch SMARC gewährleistet werden kann. Nukleare Rezeptoren wie der GR und PPARgamma können mit SMARC interagieren und durch Vermittlung weiterer Kofaktoren, die ebenfalls Histon-modifizierende Eigenschaften besitzen, die Aktivierung potenzieren [104,106,113].

Insbesondere die Fettsäuren und Fettdiäten zeigten eine unterschiedliche Regulation des 11beta-HSD1-Promotors. Grundsätzlich können Fettsäuren regulatorische Effekte in positiver wie negativer Richtung haben. Dabei kann eine Regulation auf mehreren Ebenen stattfinden. So kann z.B. die Protein- sowie mRNA-Stabilität durch mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFA) negativ verändert werden. Weiterhin kann auf mehreren Wegen die Transkription beeinflusst werden. Während eine direkte Regulation durch Aktivierung von Signaltransduktionswegen oder Bindung an Liganden-abhängige Rezeptoren abläuft, können auch indirekt die Transkription und Translation von beteiligten Transkriptionsfaktoren verändert werden [114]. So können z.B. einige Fettsäuren zu Prosta-

glandinen oder Leukotrienen umgewandelt werden, welche u.a. Liganden des PPARalpha und -gamma sind. Zudem lassen sich Fettsäuren auch leicht oxidieren, die ebenfalls transaktivierende Wirkung haben können. Insbesondere bei PPARgamma aber auch bei PPARalpha konnte gezeigt werden, dass es zu einer Liganden-spezifischen Transaktivierung von Genen sowie zur Liganden-abhängigen Rekrutierung von Kofaktoren kommt [55,56].



**Abbildung 44:** Direkte und indirekte Wirkung von Stimulationsfaktoren auf die Transkription. Liganden können direkt an Rezeptoren im Cytosol oder Zellkern binden, die dann an die DNA interagieren, wobei Kofaktoren (Koaktivatoren oder Korepressoren) rekrutiert werden. Über Signalwege, die durch Membran-gebundene Rezeptoren aktiviert werden, können Transkriptionsfaktoren an die DNA rekrutiert werden. Weiterhin können Stimulationsfaktoren die Stabilität der mRNA verändern.

#### 4.5. Die Wirkung des PPARgamma-Agonist Rosiglitazon auf die 11beta-HSD1

Rosiglitazon ist ein spezifischer Agonist des PPARgamma und wird therapeutisch als orales Anti-Diabetikum eingesetzt. PPARgamma-Agonisten führen aber gleichzeitig auch zu einer erhöhten Adipogenese. Während PPARgamma eher eine wichtige Rolle in der späten Phase der Adipogenese spielt, liegt die Bedeutung der 11beta-HSD1 eher am Beginn dieser. Dort synchronisiert Cortisol die Zellen in der S-Phase [69] und induziert die Expression der Marker der späten Phase – C/EBPalpha und PPARgamma. Eine Reduktion der 11beta-HSD1 zum Beginn der Adipogenese auf ein geringeres Level bzw. der totale Ausfall der 11beta-HSD1 führen zur kompletten Inhibition der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen [68,69,101]. Eine spätere Reduktion der 11beta-HSD1 hingegen hat keinen weiteren Einfluss auf den Fortgang der Adipogenese [69].

So hatte die Behandlung der undifferenzierten 3T3-L1-Zellen mit Rosiglitazon unterschiedliche Effekte. Die 1-stündige Stimulation erhöhte das Expressionslevel der 11beta-HSD1 um das 1,5-fache, im Luciferase-Assay hingegen war kein Effekt zu beobachten. So zeigte eine Publikation, dass der Einsatz von Rosiglitazon innerhalb der 1.Stunde die Expression einiger Transkriptionsfaktoren deutlich erhöht und verändert diese weiter in Verlaufe der Adipogenese [115]. Aus diesem Grund ist die Expression der 11beta-HSD1 stark abhängig von den eingeleiteten molekulargenetischen Prozessen. Darüberhinaus führt eine Rosiglitazon-Therapie zu einer Umverteilung der Fettgewebemasse zum subkutanen Fettgewebe hin [116], so dass eine Induktion der 11beta-HSD1 für die Adipogenese im subkutanen Fettgewebe notwendig ist, um die Lipide aus dem viszeralen Fettgewebe aufzunehmen.

In den differenzierten 3T3-L1-Zellen zeigte Rosiglitazon sowohl in der Kurzzeit-Stimulation (mRNA) als auch im Luciferase-Assay eine Reduktion auf ca. 60% vom Ausgangsniveau (Tabelle 15). Interessanterweise wurde dieses Reduktionslevel (ca. 60%) auch im subkutanen Fettgewebe der Rosiglitazon-Interventionsstudie wiedergefunden. Obwohl die Reduktion in allen Fragmenten zu sehen war, konnte eine mögliche Bindungsstelle für PPARgamma in diesem Bereich per *in-silico*-Analyse nicht gefunden werden. Lediglich im Fragment F2 ist eine mögliche Bindungsstelle vorhanden. Da aber bereits das kleinste Fragment von der Reduktion der Luciferase-Aktivität betroffen ist, sind andere Regulationsmechanismen in Betracht zu ziehen. PPARgamma zeigte in verschiedenen Versuchen, dass dieser Liganden-abhängig die Bindungen von Korepressoren verringert und die Rekrutierung von Kofaktoren fördert [54-56,117,118]. Dieser Mechanismus spricht aber für die aktivierende Wirkung von PPARgamma [117]. Wirkungsmechanismen, die durch PPARgamma zu einer Reduktion der Genexpression führen, sind bisher kaum beschrieben. Daher kann hier nur angenommen werden, dass die Reduktion indirekt über die Regulation von anderen Transkriptionsfaktoren führt oder über die Rekrutierung von Korepressoren abläuft [56]. Im Fall der Rosiglitazon-Stimulation kann die Veränderung der Bindung von C/EBP-Proteinen an die DNA jedoch ausgeschlossen werden (Abbildung 29).

Aufgrund dieser Daten scheint die Regulation der 11beta-HSD1 durch Rosiglitazon eher abhängig von anderen Transkriptionsfaktoren sowie von der Rekrutierung von Kofaktoren zu sein. Zudem zeigte sich, dass der Differenzierungsstatus der 3T3-L1-Zellen als auch von humanen Fettzellen starken Einfluss auf die Expression von Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren hat [63,115]. So können sich Regulationsmechanismen deutlich in undifferenzierten und differenzierten Fettzellen voneinander unterscheiden [119,120]. Darüberhinaus muss die Funktion der 11beta-HSD1 in Präadipozyten von



Adipozyten getrennt werden. So führt die Expressionserhöhung der 11beta-HSD1 in den Präadipozyten zur Unterstützung der Adipogenese [68,69,101], während die Funktion der 11beta-HSD1 in ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen sowie Adipozyten eher in der Regulation der Lipolyse zu sehen ist [15,121]. Eine erniedrigte Expression würde daher eher positiv sein und die Wirkung von Rosiglitazon *in-vivo* unterstützen.

Bei den männlichen Probanden mit einer gestörten Glucosetoleranz kam es durch die Rosiglitazon-Therapie, wie zu erwarten war, zu einer deutlichen Verbesserung der Insulinsensitivität (Abbildung 20). Dabei fiel der Anstieg des Blutzuckerspiegels während des oGTTs geringer aus, sowie war die benötigte Menge an Insulin zur Normalisierung des Blutzuckerspiegels deutlich verringert. Dieser Effekt könnte daher zum Teil auf die Reduktion der 11beta-HSD1-Enzymaktivität und somit einer verringerten lokalen intrazellulären Cortisol-Konzentration im subkutanen Fettgewebe zurückgeführt werden. In anderen Arbeiten konnte ebenfalls eine Reduktion der 11beta-HSD1 durch Rosiglitazon im humanen Fettgewebe als auch in behandelten Mäusen beobachtet werden [121,122]. So wurde gezeigt, dass es unter Rosiglitazon zu einer Veränderung des Lipidmetabolismus im Fettgewebe kam. Hier führte es zu einer Hochregulierung von Genen der Lipidaufnahme, -speicherung und -oxidation. Widersprüchlich sind dabei die Ergebnisse der Lipidspeicherung, jedoch wurden in diesen Arbeiten Gene der Lipolyse nicht näher betrachtet [122,123]. Villena et. al beschrieben 2004 eine neues Enzym, welches neben der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) die Lipolyse steuert. Dieses Enzym, die Adipose Triglycerin Lipase (AGTL/ Desnutrin), wird u.a. durch Glucocorticoide und Insulin reguliert und steuert so die Freisetzung von freien Fettsäuren [14,124,125]. Die AGTL spaltet dabei intrazellulär gelagerte Triacylglyceride zu Diacylglycerid und einer freie Fettsäure auf, die die Zelle verlassen kann. Bei den behandelten Probanden kam es ebenfalls zu einer Verbesserung der Blutfettwerte durch verminderte Konzentration von freien Fettsäuren (Tabelle 7). Dies kann möglicherweise auf eine verringerte Lipolyse und vermehrte Lipidspeicherung in den Fettzellen zurückgeführt werden. Die Probanden nahmen dabei auch im Schnitt 1 kg Körpergewicht zu und der Taillenumfang vergrößerte sich um etwa 2,4 cm. So konnte gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung von PPARgamma u.a. in subkutanen Präadipozyten zu einer Umverteilung von Lipiden vom viszeralen („schlechten“) zum subkutanen („guten“) Fettgewebe kam. Des Weiteren scheinen sich eher kleinere Fettzellen zu bilden, die sich ebenfalls positiver auswirken als große Fettzellen [116]. Die Wirkung von Rosiglitazon scheint dabei eher Liganden-spezifisch zu sein, da andere Effekte sowohl auf die 11beta-HSD1 als auch auf andere wichtige Gene mit Pioglitazon (ebenfalls ein PPARgamma-Agonist) gesehen wurden [53]. Dies zeigte sich bei einer großen Expressionsanalyse, wo die zurzeit drei wichtigsten PPARgamma-Agonisten nur einen kleinen Teil von Genen gleich regulierten und ein wesentlich größerer Teil von Genen durch die Liganden des PPARgamma individuell reguliert wurden [56].

Es handelte sich hier zwar nur um eine kleine Studie (n=7), die nicht Placebo-kontrolliert war, die aber dennoch zeigte, dass Rosiglitazon direkt die Expression der 11beta-HSD1 reguliert und keine posttranslationalen Prozesse für die Enzymaktivitätsveränderung im subkutanen Fettgewebe verantwortlich sind. Diese Ergebnisse konnten sowohl in *in-vitro*-Zellversuchen gezeigt werden, als auch in einer *in-vivo*-Interventionsstudie bestätigt werden.

#### 4.6. Die Wirkung des endogenen Inkretins GIP auf die 11beta-HSD1

GIP (Glucose-dependent insulintropic Peptide) wird in den K-Zellen des Duodenums gebildet und postprandial aufgrund von oralen Stimuli wie Glucose und Fettsäuren sezerniert. Im Pankreas stimuliert GIP die Insulinausschüttung, jedoch scheint GIP in den peripheren Organen nur bedingt die Insulinwirkung zu unterstützen. Vielmehr entstand der Eindruck, dass GIP eher eine entscheidende Rolle bei fettreicher Nahrungsaufnahme und nachlassender Insulinwirkung an Adipozyten hat [126-129]. Hier wird durch GIP dosis-abhängig die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL; spaltet Triglyceride an der Zelloberfläche zu Glycerol und Fettsäuren für die Aufnahme in die Zelle) reguliert [127]. Des Weiteren hat GIP bei gleichzeitiger niedriger Insulinkonzentration adipogene Wirkungen [130].

Neben dem PPARgamma-Agonist Rosiglitazon zeigte sich, dass die Zellkulturdaten der GIP-Stimulation *in-vivo* bestätigt werden konnten. Bei Infusion von GIP in 10 Probanden zeigte sich nach 4 Stunden sowohl auf mRNA-Ebene als auch bei der Enzymaktivität eine Reduktion auf ca. 70 – 75% (Abbildung 26). Diese Ergebnisse konnten sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten 3T3-L1-Zellen nachgewiesen werden. Zudem war es in dieser kleinen Studie möglich zu zeigen, dass einige Parameter des Körpers gut mit der Enzymaktivität der 11beta-HSD1 korrelierten. So hatten alle Probanden mit erhöhtem Gewicht eine erhöhte Expression der 11beta-HSD1 im subkutanen Fettgewebe (Abbildung 27). Darüberhinaus zeigte sich ein positiver Zusammenhang mit dem Hüftumfang (Indikator von vermehrten subkutanen Fettgewebe) sowie nicht-signifikant mit dem Taillenumfang. Dies bestätigt, dass die Aktivität der 11beta-HSD1 in Zusammenhang mit vermehrter Adipogenese aufgrund größerer Fettdepots und erhöhtem Gewicht steht. Interessanterweise ergab sich eine tendenzielle ( $P=0,096$ ) Korrelation zwischen der Reduktionsmöglichkeit der 11beta-HSD1 durch GIP und dem Gewicht. So zeigten Probanden mit höherem Gewicht eine geringere Reduktion der 11beta-HSD1-Enzymaktivität durch GIP als Probanden mit vergleichsweise geringerem Gewicht (Abbildung 28). Jedoch lagen die Körpergewichte der Probanden relativ nah beieinander, so dass sich dieser Unterschied in nur wenigen Kilogramm ausdrückte. Es müssen dennoch weitere Parameter berücksichtigt werden, die die Reduktion der 11beta-HSD1 mit beeinflussen. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass GIP in der Lage ist die 11beta-HSD1 negativ zu regulieren und dass es einen Zusammenhang mit der Körperfettverteilung gibt.

In undifferenzierten Zellen kann GIP über den GIP-Rezeptor sowie über die Aktivierung des AKT-Signalweges wirken [130]. Der Rezeptor wird bereits in den frühen Stadien der Adipogenese exprimiert und ist bereits 30 min nach der Induktion nachweisbar [130]. In ausdifferenzierten humanen Adipozyten sowie murinen 3T3-L1-Zellen ist die Expression des GIP-Rezeptors relativ hoch [130]. Während der Adipogenese appliziertes GIP kann zur erhöhten Expression des Fatty Acid Binding Protein (FABP/aP2) sowie zu vermehrter Adipogenese durch Potenzierung der Insulinwirkung führen [126,127,129]. Des Weiteren wird die Expression der Lipoprotein Lipase erhöht, um vermehrt Fette in die Zellen aufzunehmen [127]. In 3T3-L1-Zellen wird im Gegensatz zu anderen Zellmodellen das Signal nicht über erhöhte cAMP-Spiegel vermittelt [130], jedoch sind die Daten widersprüchlich. Es zeigte sich zudem in humanen Adipozyten bzw. ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen, dass die Deaktivierung der AMP-Kinase durch Dephosphorylierung eine wesentliche Rolle spielt [127]. Auch die hier gewonnenen Daten mittels IBMX-Stimulation (ein Inhibitor der Phosphodiesterase – erhöht den cAMP-Gehalt in der Zelle) sprechen dafür, dass die Signalkaskade des GIP-Rezeptors in 3T3-L1-Zellen nicht über einen erhöhten cAMP-Spiegel läuft. So zeigte IBMX in den 3T3-L1-Zellen eine deutliche Aktivierung der 11beta-HSD1-Promotorfragmente. Bei 1 nM GIP war in den

undifferenzierten 3T3-L1-Zellen eine leichte Aktivierung aller Promotorfragmente von 25% zu erkennen. Hingegen war unter 10 nM Stimulation sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten 3T3-L1-Zellen (hier auch bei 1 nM GIP) eine Reduktion auf ca. 60-70% der Luciferase-Aktivität ab dem Fragment F1a zu erkennen. Alle Stimulationseffekte der Luciferase-Daten wurden auch auf mRNA-Ebene bestätigt. In der Arbeit von Kim et al. zeigte sich eine konzentrationsabhängige GIP-Reaktion auf die Triglycerid-Aufnahme und die Lipoprotein Lipase-Aktivität [127]. So war in ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen bei 1 nM noch kein wesentlicher Einfluss auf die Enzymaktivität oder Dephosphorylierung-Reaktionen der Signalkaskade zu sehen. Erst ab einer Konzentration von 10 nM war eine deutliche Reaktion erkennbar [127]. So kann die leicht stimulierende Wirkung in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen von 1 nM GIP eventuell auf einer Aktivierung eines anderen Signalweges zurückgeführt werden.

Zudem zeigte sich, dass GIP die Bindung der C/EBP-Proteine an den Promotor der 11beta-HSD1 veränderte. Die GIP-Stimulation führte in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zur verminderten Bindung von C/EBPalpha und vermehrter Bindung von C/EBPbeta an den Bereich von -70 bis -140 bp (Abbildung 29 und Abbildung 30). Geht man von einem verringerten Transaktivierungspotential von C/EBPbeta gegenüber C/EBPalpha aus (Tabelle 15), wäre dies eine mögliche Erklärung für die verringerte 11beta-HSD1-Expression und-Enzymaktivität. So zeigte sich, dass Insulin in der Lage ist die Expression des negativ-wirkenden LIP-C/EBPbeta zu induzieren [131]. Da mit diesem Antikörper jedoch nicht unterschieden werden kann, um welche Isoform von C/EBPbeta es sich handelt, kann darüber nur spekuliert werden, ob die GIP-Signalkaskade ebenfalls die LIP-Form von C/EBPbeta an die DNA rekrutiert. Da zudem alle C/EBP-Proteine an die gleiche Bindungssequenz binden können, müssen die einzelnen C/EBP-Protein noch andere spezifische Funktionen haben. So binden diese z.B. sequenziell an den PPARgamma2-Promotor und induzieren durch spezifische Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren die Expression und stabilisieren diese [44,103,104]. Jedoch ist noch nicht bekannt welche Signalkaskade durch GIP aktiviert wird und was für diese Veränderung der Bindung verantwortlich ist. Dies wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Da die Regulation über cAMP scheinbar zellspezifisch ist, wäre in HepG2-Zellen die aktivierende Wirkung von GIP durch eine cAMP-vermittelte Signalkaskade erklärbar. So befinden sich in den Fragmenten F1a und F5 putative Bindungsstellen für CREB2. IBMX zeigte ein ähnliches Aktivierungsmuster mit Ausnahme des Fragmentes F1a, wo es durch IBMX zur keiner Aktivierung kam. Daher ist eine Regulation im Gegensatz zu den 3T3-L1-Zellen in HepG2 über cAMP sehr wahrscheinlich.

Es konnte so gezeigt werden, dass GIP akut *in-vitro* und *in-vivo* die 11beta-HSD1 auf Ebene der Expression reguliert und auch die Enzymaktivität in gleichem Maße verändert wird. Dabei scheinen zellspezifische Prozesse bei der Signaltransduktion eine Rolle zu spielen wie die Daten mit IBMX zeigen.

#### 4.7. Die Wirkung einer Fettdiät-Intervention in Mäusen auf die 11beta-HSD1

Im Körper spielen Nahrungsfette eine wichtige Rolle und einige Fettsäuren sind essentiell für bestimmte Entwicklungsprozesse. Zudem bestehen unsere Zellmembranen zu 30% aus Lipiden. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden Fette als Ursache für die zunehmende Fettleibigkeit gesehen und ein verringerter Konsum propagiert. Dabei wurden gesättigte Fettsäuren eher als gesundheitlich negativ eingestuft und einfach- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren positive Effekte zugeschrieben. Daher wurden hier die Effekte von 3 Vertretern von Nahrungsfetten – Fischöl (viele mehrfach-ungesättigte Fettsäuren), Distelöl (2-fach-ungesättigte Fettsäuren) und Kokosfett (gesättigte Fettsäuren) – auf die Körperzusammensetzung sowie die Enzymaktivität der 11beta-HSD1 in den einzelnen Organen von Mäusen untersucht.

Direkte Rezeptoren für die Fettsäuren sind bisher kaum bekannt. Man geht jedoch von einer direkten sowie indirekten Wirkung von Fettsäuren auf die Generegulation aus (Abbildung 44). Derzeit kennt man nur die PPAR-Rezeptoren, die durch langkettigen Fettsäuren sowie deren Metabolite wie z.B. Prostaglandine Liganden-abhängig aktiviert werden [132,133]. PPARalpha reguliert hauptsächlich in der Leber sowie dem Skelett- und Herzmuskel die beta-Oxidation sowie den Lipidmetabolismus generell. Für PPARalpha als auch die anderen Isoformen gibt es im Gegensatz zu den übrigen Nuklearrezeptoren eine Vielzahl von Liganden mit unterschiedlicher Affinität (meist alle relativ schwach), die auch die anderen Isoformen durch Ligandenbindung aktivieren können [132]. Zu den natürlichen Liganden von PPARalpha zählen u.a. Fettsäuren und Leukotriene (werden aus der mehrfach-ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure synthetisiert). Synthetische Liganden sind u.a. Fibrate, die teilweise pharmakologisch zur Senkung des Cholesterol- und Triglyceridspiegels im Blut eingesetzt werden. Insbesondere PPARgamma zeigte aber auch, dass durch unterschiedliche Liganden unterschiedliche Gene aktiviert werden und teilweise gegenteilige Reaktionen in der Expression beobachtet werden konnten [55,56]. Auch die Fettsäuren, insbesondere die mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, zeigten eine Organ-abhängige Regulation von Genen [114,134].

In HepG2-Zellen zeigte sich unter dem spezifischen PPARalpha-Ligand WY-14643 eine Stimulation der Luciferase-Aktivität zwischen 25-50% für die Promotorfragmente F1-F7. Die höchsten Aktivitäten waren bei den Fragmenten F2-F6 (50%ige Aktivitätssteigerung) zu beobachten. Hier befinden sich auch mehrere putative Bindungsstellen für PPAR/RXR, so dass eine direkte Regulation durch PPARalpha angenommen werden kann. In der Leber besteht die Hauptfunktion von Glucocorticoiden in der Regulation der Gluconeogenese, insbesondere bei einem niedrigen Glucosespiegel und nach einer Fastenperiode [4]. Als Substrate für die Gluconeogenese dienen Aminosäuren sowie Glycerol, welches aus den Triglyceriden freigesetzt wird. Bei Mäusen mit einer Überexpression der 11beta-HSD1 in der Leber zeigten sich unter einer Niedrig-Fett-Diät erhöhte Triglyceridkonzentrationen in der Leber sowie erhöhte Lipogenese und Lipidoxidation, die u.a. von PPARalpha reguliert werden [35]. So war die Expression von PPARalpha während und nach dem Zustand des Fastens erhöht. Unter Hoch-Fett-Diät bzw. PPARalpha-Agonisten hingegen war das Gegenteil zu beobachten [35,135]. Es kann daher ein Synergismus in der Leber zwischen der Lipidoxidation (PPARalpha) und der Gluconeogenese (11beta-HSD1) in Abhängigkeit vom Nahrungszustand vermutet werden. So wäre eine erhöhte Expression der 11beta-HSD1 für eine erhöhte Gluconeogeneserate sowie eine gegenseitige Aktivierung von PPARalpha denkbar.

Die Expression von PPARalpha in Adipozyten ist ggü. PPARgamma eher moderat und scheinbar weniger von Bedeutung als in den Leberzellen. Neben der Regulation der Fettoxidation reduziert PPARalpha die Inflammation im Fettgewebe sowie die Expression Makrophagen-spezifischer Gene im Fettgewebe [52]. So würde eine Raufregulation der 11beta-HSD1 diesen Effekt unterstützen, da Cortisol anti-inflammatorisch wirkt und die Expressionssteigerung durch NF-kappaB verhindert. In den undifferenzierten als auch differenzierten 3T3-L1-Zellen führt die Stimulation mit WY-14643 sowohl im Luciferase-Assay als auch auf Ebene der mRNA zu einer Stimulation. Alle Promotorfragmente zeigten sehr schwankende Ergebnisse zwischen 30-100%-Aktivierung. Dieser Effekt ist aber eher nicht auf die direkte Wirkung von PPARalpha zurückzuführen, da alle Promotorfragmente in unterschiedlicher Weise aktiviert wurden. Der genaue Wirkungsmechanismus von PPARalpha auf andere Transkriptionsfaktoren ist dabei noch weitgehend unbekannt.

Die beiden Vertreter der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (Fischöl und Distelöl) zeigten die gleichen Muster sowohl bei der Gewichtszunahme als auch bei den prozentualen Gewichtsanteilen der Organe nach der Intervention. Interessanterweise war die Gewichtszunahme im Vergleich zur Vergleichsdiät, aber auch zur Kokosfett-Diät, mit 4 bis 4,5 g nach 1 Woche sehr hoch. Jedoch blieben die Gewichtsanteile der Fettgewebe konstant, nur das Lebergewicht nahm deutlich zu. Trotz des gleichen Musters war der Einfluss auf die Enzymaktivität der 11beta-HSD1 in den einzelnen Geweben sehr unterschiedlich. Unerwarteterweise nahmen die Mäuse unter Kokosfett kaum an Gewicht zu, aufgrund eventuell verminderter Nahrungsaufnahme, zeigten jedoch deutliche Zuwächse in den Fettdepots. Wo die Masse letztendlich „verloren“ ging, bleibt ungeklärt. Denkbar wäre jedoch z.B. eine Reduktion der Muskelmasse.

Distelöl, welches in hohen Maßen Linolen- und Ölsäuren enthält [136], führte zu einer Aktivitätssteigerung der 11beta-HSD1 in der Leber verbunden mit einer erhöhten Lebermasse. Der Fettgehalt der Leber konnte nicht bestimmt werden, jedoch ist aufgrund anderer Mäuse-Daten, bei der die 11beta-HSD1 in der Leber überexprimiert wurde, ist damit zu rechnen, dass es nach der einwöchigen Diätintervention zu Ansätzen einer Leberverfettung kommen könnte [35]. Die erhöhte 11beta-HSD1-Expression in der Leber könnte auch die höheren Blutglucosespiegel aufgrund erhöhter hepatischer Gluconeogeneserate sowie Glucoseproduktion erklären [4]. Insgesamt kam es unter der Distelöl-Diät zu einer Lipidspeicherung hin zum subkutanen Fettgewebe. Es waren dabei keine Gewichtsveränderungen im omentalen Fettdepot (Fettgewebe zwischen den Gedärmen) oder eine Reduktion im epididymalen Fettdepot (Fettgewebe auf den Geschlechtsorganen – hier Testis) zu erkennen, welche zum viszeralen Fettgewebe zählen. Jedoch war im epididymalen Fettgewebe eine Reduktion der 11beta-HSD1-Aktivität zu sehen. Da kein subkutanes Fettgewebe für die Aktivitätsbestimmung eingefroren wurde, kann hier keine Aussage über einen eventuellen Anstieg der 11beta-HSD1-Aktivität in Zusammenhang mit der leichten Erhöhung des subkutanen Fettgewebes gemacht werden.

Fischöl besteht zu etwa gleichen Teilen aus gesättigten, einfach-ungesättigten und mehrfach-ungesättigten Fettsäuren [137]. Hier zeigten sich die gleichen Tendenzen bei der Gewichtsverteilung der Organe wie beim Distelöl. Im Gegensatz dazu kam es trotz der Zunahme des Lebergewichtes zu keiner Erhöhung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität. Trotz alledem zeigten die Tiere eine Erhöhung der Blutglucosespiegel nach der Diät. Ein Ungleichgewicht in der hepatischen Glucoseproduktion ist aber eher unwahrscheinlich. Auch das Fettgewebe scheint nicht für erhöhten Blutglucosespiegel in Frage zu kommen, da das viszerale Fettdepot (epididymales und omentales Fettgewebe) abnahm und das subkutane Fettgewebe zunahm. So führte Fischöl in Ratten zu einer Verbesserung aller Ungleich-

gewichte (Insulinresistenz, Dyslipidämie), welche durch eine Sucrose-reiche Diät verursacht wurde. Dies wurde u.a. mit Verringerung der Fettzellgröße begründet, da kleiner Fettzellen sensitiver gegenüber Insulin sind [138].

Hauptbestandteile von Kokosfett sind mittelkettige gesättigte Fettsäuren (C8-C14) sowie im geringeren Maße kurz- und langkettige Fettsäuren [139]. Diese Diät führte bei den Mäusen zu keiner Gewichtsveränderung. Eventuell kann dies auf die verringerte Nahrungsaufnahme zurückgeführt werden. Der Grund dafür ist unbekannt – möglich wären jedoch veränderter Geschmack, Geruch oder Konsistenz der Nahrung, aber auch ein verändertes Sättigungsgefühl. Dennoch nahmen die Mäuse deutlich an Gewicht in allen Fettgeweben zu. Die 11beta-HSD1-Aktivität blieb jedoch im epididymalen Fettgewebe unverändert. Die eher mittelkettigen Fettsäuren stellen zudem keine Liganden für PPARalpha oder PPARgamma dar [132], so dass eine Regulation der 11beta-HSD1 durch diese im Fettgewebe ausblieb. Im Vergleich zu den beiden anderen Fettdiäten wiesen die Mäuse einen etwas geringeren Anstieg der Blutglucose nach Abschluss der Diät auf. Die 11beta-HSD1-Aktivität stieg in der Leber ebenfalls wie bei der Distelöl-Diät deutlich an und war mit einer Zunahme des Lebergewichtes verbunden. Auch hier könnte es aufgrund einer erhöhten 11beta-HSD1-Aktivität zu einem Ungleichgewicht in der hepatischen Glucoseproduktion gekommen sein. Da die Mechanismen der Signaltransduktion durch Fettsäuren noch weitgehend unbekannt sind und zumindest nur für langkettige Fettsäuren die PPAR-Isoformen als Rezeptoren bekannt sind, ist es nicht möglich zu sagen welcher Mechanismus dazu führte, dass durch die Kokosfett-Diät die Enzymaktivität der 11beta-HSD1 in der Leber nicht aber im Fettgewebe anstieg. Eine Regulation durch PPARalpha ist jedoch in der Leber durchaus möglich, da die Aktivierung durch WY-14643 im ähnlichen Rahmen lag.

Die Funktion der 11beta-HSD1 im Muskel ist noch weitgehend unbekannt und wird kontrovers diskutiert. So gibt es bisher nur 2 Arbeiten über die Enzymaktivität der 11beta-HSD1 im humanen Muskel bei gesunden und diabetischen Probanden, welche zu gegensätzlichen Ergebnissen über die Enzymaktivität kamen [140,141]. Ebenso ist bisher wenig über die Bedeutung in Bezug auf die Insulinsensitivität bekannt. Darüberhinaus ist aber bekannt, dass eine Wechselwirkung zwischen dem Fettgewebe und dem Muskel gibt, wodurch die Insulinsensitivität beeinflusst wird [142]. Exogenes Glucocorticoid führt zudem zu Muskelschwäche und Proteolyse [143,144]. Die Deletion der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Mäusen (Kokolokalisierung mit der 11beta-HSD1 im ER und Regenerator des Kofaktor NADP<sup>+</sup>) zeigten auch eine Muskelschwäche und eingeschränkte Mobilität [145]. So ist hier die Bedeutung der Runterregulation der 11beta-HSD1-Aktivität im Muskel in Bezug auf die Insulinsensitivität noch offen.

Die beobachteten Enzymaktivitäten der 11beta-HSD1 in den einzelnen Organen, hervorgerufen durch die Fett-Diäten, stimmten mit den Ergebnissen aus dem Luciferase-Promotorassays in Tendenz und Stärke überein. In den HepG2-Zellen zeigte sich so, dass die 11beta-HSD1 über Transkriptionsfaktoren im Fragment F1 reguliert wird. Neben Kandidaten wie die PPAR-Isoformen und SREBP1, die aber erst in den Fragmenten F2, F4, F5 und F6 (PPAR) bzw. F4 und F6 (SREBP1) zu finden sind, wäre eine Regulation über Yin and Yang 1 (YY1) denkbar. So ist YY1 in die Regulation einiger Proteine des Lipidstoffwechsel sowie SREBP-responsive Gene involviert [146,147]. In den 3T3-L1-Zellen konnten die Daten ebenfalls eindeutig bestätigt werden, lediglich die Reduktion durch das Distelöl fiel etwas geringer aus. Dennoch zeigte sich hier, dass die beiden verschiedenen Ölarten mit mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (Distel- und Fischöl) die 11beta-HSD1 unterschiedlich regulieren. Während das Distelöl alle Promotorfragmente herunterregulierte, konnte unter dem Fischöl erst eine Reduktion der Luciferase-Aktivität ab dem Fragment F1 beobachtet werden. Auch hier werden

direkte Effekte durch die PPAR-Isoformen sowie durch andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen. Wie auch in den Fettgewebeproben war im Zellversuch durch Kokosfett keine Regulation zu beobachten bzw. bewegte sich im Rahmen der *in-vivo*-Versuche von rund 10%. Überraschenderweise war in den ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen wiederum ein anderes Regulationsmuster zu finden. Hier regulierte nur das Fischöl alle Fragmente deutlich herunter, während Distelöl und Kokosfett keine Effekte zeigten.

Auch in dieser Interventionsstudie war zu beobachten, dass die 11beta-HSD1 durch exogene Nahrungsbestandteile reguliert wird. Insbesondere zeigte sich hier, dass kurzzeitige Veränderungen der Nahrungszusammensetzung die Körperzusammensetzung und u.a. die Expression der 11beta-HSD1 deutlich verändern können. So bestätigten die *in-vitro*-Versuche die *in-vivo*-Ergebnisse und mögliche Regulationsmechanismen wurden aufgezeigt.

#### **4.8. Bedeutung genetischer Variationen im Promotorbereich der 11beta-HSD1 sowie im Gen der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase**

Im Promotorbereich der 11beta-HSD1 befinden sich eine Vielzahl von SNPs (Single Nucleotid Polymorphism). Diese können in regulierenden Bereichen wie dem Promotor Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren verändern bzw. zur Zerstörung der Bindungsmatrix führen. Daher wurde die Auswirkung von drei SNPs in der Zellkultur getestet. Darüberhinaus wurden zwei dieser Kandidaten, die bereits Assoziationen in anderen Studien zeigten, in der MeSyBePo-Kohorte untersucht. Weiterhin kam ein SNP aus der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase (H6PD) hinzu, welche ebenfalls im Zusammenhang mit der 11beta-HSD1 steht, da dieser den Kofaktor regeneriert und ein Ausfall zu verringerter 11beta-HSD1-Enzymaktivität führt [21,22,148].

##### *4.8.1. SNP rs860185 an der Position -620 bp im 11beta-HSD1-Promotor*

Es zeigte sich, dass dieser SNP zellspezifische Reaktionen verursachte. So führte der SNP rs860185 an der Position -620 bp in den HepG2-Zellen zu einer totalen Reduktion der Luciferase-Aktivität des Promotorfragmentes F3, während in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen lediglich die Aktivität um 25% reduziert wurde. An dieser Position liegen putative Bindungsstellen für den Transcriptional repressor CDP bzw. HOX/PBX-Dimer. Außerdem liegt in direkter Nähe dazu eine putative Bindungsposition für SMARCB1 (ein Regulator der Chromatinstruktur). Auch wenn diese Bindungsstelle nicht direkt vom SNP betroffen ist, können naheliegende Bereiche die Bindung beeinflussen [99]. So besteht die Möglichkeit, dass diese 3 Faktoren wesentlich mehr Bedeutung in HepG2-Zellen haben als in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen. Durch die nochmalige Untersuchung der alternativen Basenabfolge in diesem Bereich durch den MatInspector ging nur die Bindung des CDP verloren. Jedoch würde man aufgrund der Funktion von CDP (Verhinderung der Bindung von C/EBP-Proteinen an diese Position bzw. in unmittelbarer Nähe) eine Erhöhung der Promotoraktivität erwarten. Die Bindung von HOX/PBX kann ebenfalls für diesen Ausfall der Promotoraktivität verantwortlich sein, da HOX/PBX-Heterodimere Isoform-abhängig Koaktivatoren oder Korepressoren rekrutieren [149]. Da zumindest aber in HepG2-Zellen die basale Promotoraktivität des Fragments F3 (Abbildung 13A) sehr gering ist und eher für die Bindung dieser Faktoren spricht, ist es schwer zu erklären was die Ursache für diesen weiteren Aktivitätsverlust ist. Zudem zeigten sich für diesen SNP veränderte Stimulations-

effekte durch IL-6 in HepG2-Zellen und TNFalpha in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen. Unter Insulin kam es tendenziell in beiden Zelltypen ebenfalls zu einer leichten Erhöhung.

Die Häufigkeit dieses SNP ist jedoch in Europäern und Asiaten sehr gering bzw. kaum vorhanden, während in Afroamerikanern und Afrikanern die seltenen Allel-Varianten (AT und AA) häufiger vorkommen. Welche genauen Auswirkungen diese Allelvarianten auf den Metabolismus haben und wie sich die veränderten Stimulationseffekte auswirken, ist offen, da in der Regel eine Reihe von Kompensationsmechanismen dies wieder ausgleichen können. Jedoch könnte man aufgrund der Zellkultur-Daten von einem gestörten Glucose-Metabolismus ausgehen und eventuell von einer gestörten Regulation im Fastenzustand.

#### *4.8.2. Die SNPs rs846910 und rs3753519 im 11beta-HSD1-Promotor*

Die weiteren SNPs, die im Promotorbereich der 11beta-HSD1 untersucht wurden, waren SNPs die in einigen Studien Assoziationen mit verschlechterter Glucoseaufnahme, erhöhtem Gewicht [72] oder Demenz zeigten [150]. Daher wurden diese in der Zellkultur als auch in der MeSyBePo-Kohorte näher untersucht. Der SNP rs3753519 an der Position -2677 bp kam in der Kohorte selten vor (Abbildung 36), jedoch stimmt die Allelfrequenz mit der europäischen Gruppe überein, während in den anderen Ethnien dieser wesentlich häufiger auftritt [151,152]. Dieses seltene Allel zeigte in den Zellkulturmodellen keinen bedeutenden Einfluss auf die Promotoraktivität im Fragment F6, jedoch war eine tendenziell eine erhöhte Stimulierbarkeit durch TNFalpha in den undifferenzierten 3T3-L1-Zellen zu beobachten. Das WT-Allel zeigte durch TNFalpha eine Reduktion der Luciferase-Aktivität (Abbildung 17), während das seltene Allel hier eine positive Tendenz erkennen ließ. Auch Insulin schien minimale Tendenzen für eine gegenteilige Wirkung auf die Promotoraktivität der 11beta-HSD1 zu haben. So könnte es durch diese beiden Faktoren in Fettgewebe zu einer leicht erhöhten Aktivität der 11beta-HSD1 führen und entsprechende metabolische Störungen verursachen, die mit einer erhöhten 11beta-HSD1-Enzymaktivität assoziiert sind [9,153,154].

So konnte beobachtet werden, dass die Träger des seltenen Allels eine Tendenz für ein erhöhtes Körpergewicht verbunden mit deutlich erhöhten Taillenumfängen und erhöhten Hüftumfängen aufwiesen. Im oGTT wiesen diese Personen zudem erhöhte Nüchterninsulinspiegel sowie erhöhte Insulinwerte (120 min) auf. Der Langzeit-Indikator Hb<sub>A1C</sub> war ebenfalls signifikant bei den seltenen Allelträgern erhöht. Die Heterozygoten Allelträger zeigten hingegen keine Veränderungen ggü. den Wildtyp-Trägern. So ergab sich in der Risikobewertung ein tendenziell dreifach erhöhtes Risiko (P=0,093, Odd-Ratio=2,88) für eine BMI > 25 und damit Übergewicht. So konnten hier mit der MeSyBePo-Kohorte teilweise die Daten aus den Pima-Indianern-Studie bestätigt werden [19,72]. Die erhöhten Risiken könnten mit der erhöhten Stimulierbarkeit der 11beta-HSD1 durch TNFalpha und eventuell durch Insulin in Präadipozyten zusammenhängen. Trotz der etwas geringeren basalen 11beta-HSD1-Expression ist es möglich, dass es durch diese Stimulanzen zu einem Ungleichgewicht in der Glucoseaufnahme in die Zelle kommt und so die Insulinsensitivität verringert wird.

Der zweite SNP rs846910 im Promotorbereich an der Position -2937 bp zeigte in den Zellkulturversuchen ebenfalls eine totale Reduktion der Promotoraktivität wie der SNP an der Position -620 bp, hier jedoch war dies in beiden Zellkulturen – HepG2 und undifferenzierten 3T3-L1 – der Fall.



Weiterhin ist die Häufigkeit des SNP in der MeSyBePo-Kohorte äußerst gering, so dass nur 7 von 1.707 Probanden Träger des seltenen Allels AA (0,4%) waren und nur 9,2% das Heterozygoten-Allel GA trugen. Dies stimmt mit der Allelfrequenz in den Europäern überein und ist auch in den Afrikanern ebenso selten zu beobachten. Nur bei den Asiaten tritt das seltene Allel häufiger auf. Aufgrund der geringen Zahl der homozygoten Träger ergaben sich große Standardabweichungen, wodurch nur wenige Parameter eine Signifikanz erreichten. Dennoch wurden tendenziell erhöhte Taillenumfänge, Waist-to-Hip-Ratios sowie erhöhte BMI-Werte beobachtet. Zudem wiesen sie eine gestörte Nüchternblutglucose und -insulin mit tendenziell erhöhten Hb<sub>A1C</sub>-Werten auf. Die heterozygoten Träger zeigten ggü. den Wildtyp-Trägern keine veränderte Tendenz. Aufgrund dieser geringen Zahl konnte kein Risiko für die homozygoten Träger des seltenen Allels berechnet werden, jedoch war eine Tendenz für ein erhöhtes Risiko für einen erhöhten BMI zu erkennen.

Da sich in der Zellkultur diese starke Reduktion der 11beta-HSD1 ergab, jedoch die Träger der homozygoten Variante einen erhöhten BMI hatten, wurde der morgendliche Serum-Cortisolspiegel überprüft. Die 7 Träger der homozygoten seltenen Variante sowie die der heterozygoten Allelvariante hatten einen erniedrigten Cortisolspiegel im Serum. Sollte eine erniedrigte 11beta-HSD1-Aktivität in den Zellen vorliegen, könnte es zu einem Kompensationsmechanismus in der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse kommen, so dass es zu einer höheren Nettoproduktion kommt, aber ein geringerer Cortisolserum-Spiegel vorliegt [155]. Der genaue Mechanismus muss jedoch noch aufgeklärt werden.

Durch den SNP an der Position -2937 kann es bei der seltenen Allelvariante zur zusätzlichen Bindung des Transkriptionsrepressors RBP-Jkappa/CBF1 kommen, was zu der beobachteten Reduktion der Promotoraktivität führen könnte. Jedoch passt die gesehene Reduktion der Promotoraktivität aufgrund der bekannten Daten aus den knock-out-Mäusen nicht mit dem erhöhten BMI zusammen. Daher ist der Mechanismus unklar, der dazu führt, dass Personen mit einer möglichen verringerten 11beta-HSD1-Aktivität ein erhöhtes Risiko für Übergewicht oder Insulinresistenz haben.

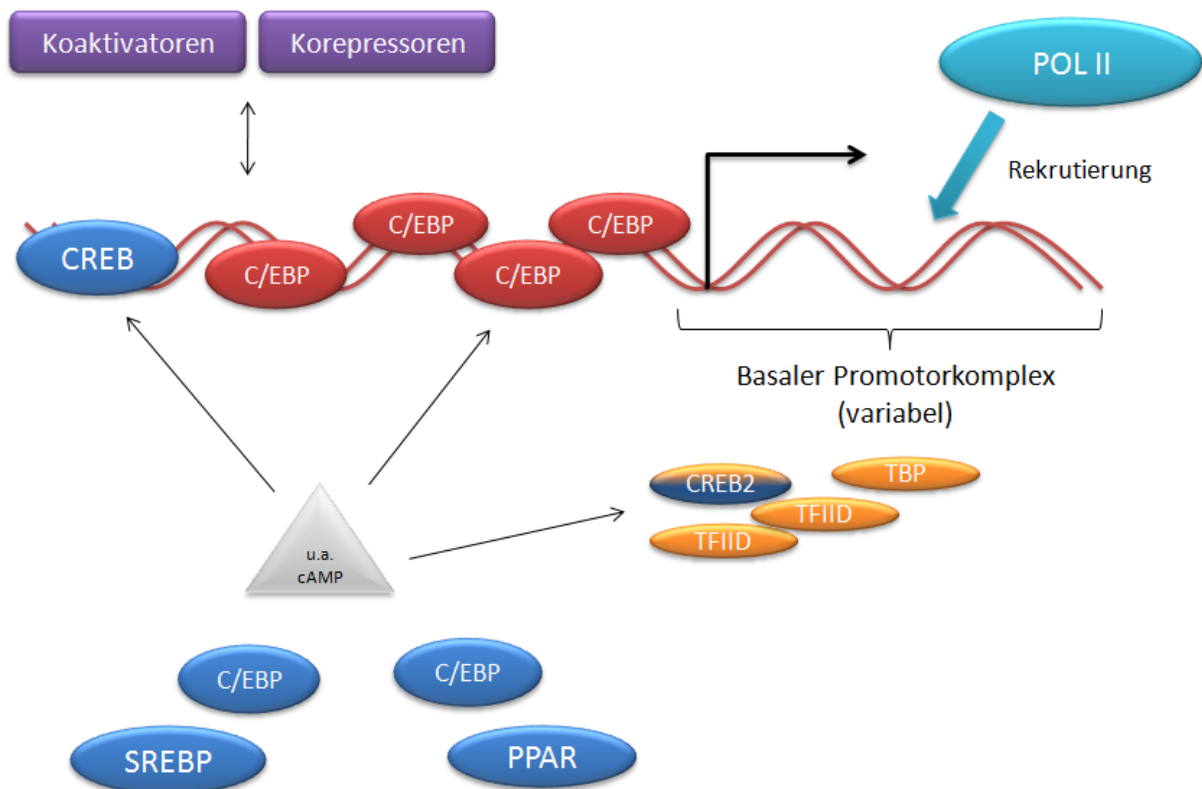
#### *4.8.3. Der SNP rs6688832 im Gen der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase*

Der SNP rs6688832 im Gen der Hexose-6-Phosphat Dehydrogenase (H6PD) hat als funktionelle Konsequenz einen Aminosäureaustausch und führt zu einem 50%igem Aktivitätsverlust [22]. Verbunden damit kann eine Reduktion der Oxo-Reduktase-Aktivität der 11beta-HSD1 sein. Dieser SNP trat im Vergleich zu den SNP im Promotor der 11beta-HSD1 wesentlich häufiger auf und stimmte nur bedingt mit der publizierten Verteilung in der europäischen Bevölkerung überein. So waren in der MeSyBePo-Kohorte wesentlich mehr Träger der seltenen Allel-Variante vorhanden, als die nach der Literatur zu erwarten gewesen wäre.

Bei dem SNP in der H6PD ergaben sich keine wesentlichen Änderungen, jedoch deuteten sich Tendenzen für eine Störung im Glucosestoffwechsel an. So ergab sich für die Allelträger AA und GA ein tendenziell schwaches Risiko für einen Typ 2 Diabetes mellitus. Die Auswirkungen der mutierten H6PD auf die 11beta-HSD1 scheinen dabei gering zu sein, da nur eine geringe Tendenz zu sehen war. Zudem liegt die Expression der H6PD in den meisten Gewebe weit unter dem Expressionslevel der 11beta-HSD1 [156]. Jedoch bleibt grundsätzlich die Frage offen, welche Folgen eine erniedrigte 11beta-HSD1-Aktivität auf das Gewicht und den Metabolismus im Menschen haben.

#### 4.9. Zusammenfassung

Es konnte dargestellt werden, dass der basale Promotorkomplex des 11beta-HSD1-Gens variabel und zelltyp-abhängig reguliert wird. Die Promotoraktivität kann dabei von unterschiedlichen Komponenten gesteuert. Insbesondere cAMP-response element binding protein (CREB) sowie CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), die im proximalen Promotorbereich binden können, sind von Bedeutung. Im Bereich von -300 bis +1 bp kommt es zu einer Häufung von putativen Bindungsstellen für C/EBP-Proteine. Ein Teil dieser Bindungsstellen konnte hier direkt nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass es durch verschiedene Stimulationen zu einer Veränderung der Bindung der C/EBP-Proteine kam. Neben der Regulation der Promotoraktivität spielt cAMP bei der Regulation scheinbar eine wichtige Rolle. So kann es durch diverse Stimulationsfaktoren zu Veränderung des cAMP-Spiegels in der Zelle kommen, was der Signaltransduktion dient und zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie CREB und C/EBP führt.



**Abbildung 45:** Modell der Regulation des 11beta-HSD1-Promotors und die wesentlichen Elemente, die eine bedeutende Rolle spielen. Dargestellt sind die Faktoren TFIID, der sowohl an der Position +1 als an die Position +30 des Positiv-Strang binden können. Des Weiteren können wesentliche Elemente des basalen Promotorkomplexes CREB2, TBP und C/EBP sein, die im Bereich von +1 bis +100 binden können. Im proximalen Promotorbereich ist eine Mehrzahl von C/EBP-Bindungsstellen zu finden. Diese und CREB werden u.a. durch den zellulären cAMP-Spiegel gesteuert. Weitere wichtige Elemente bei der Promotorregulation der 11beta-HSD1 sind SREBP, C/EBP und PPAR. Ein wesentlicher Faktor bei der Regulation spielt die Transkriptionsfaktor-abhängige Rekrutierung von Kofaktoren (Koaktivatoren oder Korepressoren).

In Bereich -100 bis +100 bp besteht eine hohe Variabilität für die Bindung von verschiedenen Faktoren. So kann TFIID (Element des RNA-Polymerase II-Komplexes) selbst an die DNA binden oder mit Hilfe des TATA-binding protein (TBP) an den Negativ-Strang in reverser Orientierung. Das Vorhandensein einer TATA-Box am reversen Strang konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Daneben spielen vermutlich auch weitere Transkriptionsfaktoren eine Rolle, die vor allem im 5'-Bereich des Promotors (meist im distalen Bereich um -2000 bp) binden. Dies sind u.a. das Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) und der Peroxisome proliferation activator receptor (PPAR). Darüberhinaus sind die sogenannten „Chromatin-remodeling proteins“ von wesentlicher Bedeutung, da diese die 3D-Struktur der Promotorregion aufheben und die Interaktion zwischen distal bindenden Transkriptionsfaktoren und dem basalen Promotorkomplex vermitteln.

Durch mehrere *in-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression und Enzymaktivität der 11beta-HSD1 akut und chronisch durch endogene, exogene und pharmakologische Substanzen verändert werden kann. Zudem konnten alle Ergebnisse aus den *in-vivo*-Studien auch in den *in-vitro*-Versuchen bestätigt und vertieft werden. So reprimierten GIP und Rosiglitazon die Expression sowie die Enzymaktivität. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass es dabei zu einer Veränderung in der Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor der 11beta-HSD1 kam. So veränderte GIP jedoch nicht Rosiglitazon die Bindung der C/EBP-Proteine an einen Abschnitt der DNA, was neben anderen Veränderungen einen möglichen Repressionsmechanismus auf die Promotoraktivität darstellt. Zudem veränderten verschiedene Nahrungsfette die Enzymaktivität der 11beta-HSD1 in verschiedenen Geweben deutlich, was einen Einfluss auf die Körperzusammensetzung haben dürfte.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität der 11beta-HSD1 abhängig vom Zelltyp differentiell reguliert wird. Es konnte dargestellt werden, dass einzelne Transkriptionsfaktoren wie die C/EBP-Proteine für die Promotoraktivität relevant sind. Endogene und exogene Komponenten können die Aktivität und Expression der 11beta-HSD1 modifizieren und möglicherweise auf diesem Weg zur Entstehung spezifischer metabolischer Phänotypen beitragen.

## LITERATURVERZEICHNIS

2. **Nichols GA, Hillier TA, Brown JB** 2007 Progression from newly acquired impaired fasting glucose to type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:228-233
3. **Buren J, Bergstrom SA, Loh E, Soderstrom I, Olsson T, Mattsson C** 2007 Hippocampal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 messenger ribonucleic acid expression has a diurnal variability that is lost in the obese Zucker rat. *Endocrinology* 148:2716-2722
4. **Khani S, Tayek JA** 2001 Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 101:739-747
5. **Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF** 1987 Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 64:832-835
6. **Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF** 1989 Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84:1663-1670
7. **Tomlinson JJ, Boudreau A, Wu D, Atlas E, Hache RJ** 2006 Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids. *Endocrinology* 147:5284-5293
8. **Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM** 1997 Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 349:1210-1213
9. **Lindsay RS, Wake DJ, Nair S, Bunt J, Livingstone DE, Permana PA, Tataranni PA, Walker BR** 2003 Subcutaneous adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic Acid levels are associated with adiposity and insulinemia in pima indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2738-2744
10. **Kannisto K, Pietilainen KH, Ehrenborg E, Rissanen A, Kaprio J, Hamsten A, Yki-Jarvinen H** 2004 Overexpression of 11{beta}-Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 in Adipose Tissue Is Associated with Acquired Obesity and Features of Insulin Resistance: Studies in Young Adult Monozygotic Twins. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4414-4421
11. **Michailidou Z, Jensen MD, Dumesic DA, Chapman KE, Seckl JR, Walker BR, Morton NM** 2007 Omental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 15:1155-1163
12. **Mariniello B, Ronconi V, Rilli S, Bernante P, Boscaro M, Mantero F, Giacchetti G** 2006 Adipose tissue 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in obesity and Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 155:435-441
13. **Caprio M, Feve B, Claes A, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC** 2007 Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 21:2185-2194
14. **Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS** 2004 Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *JBC* 279:47066-47075
15. **Berthiaume M, Laplante M, Festuccia W, Gelinis Y, Poulin S, Lalonde J, Joanisse DR, Thieringer R, Deshaies Y** 2007 Depot-specific modulation of rat intraabdominal adipose tissue lipid metabolism by pharmacological inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* 148:2391-2397

16. **Atanasov AG, Nashev LG, Schweizer RA, Frick C, Odermatt A** 2004 Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett* 571:129-133
17. **Dieudonne MN, Sammari A, Dos SE, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R** 2006 Sex steroids and leptin regulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase I and P450 aromatase expressions in human preadipocytes: Sex specificities. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99:189-196
18. **Liu Y, Sun WL, Sun Y, Hu G, Ding GX** 2006 Role of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in differentiation of 3T3-L1 cells and in rats with diet-induced obesity. *Acta Pharmacol Sin* 27:588-596
19. **Koska J, de Court, Wake DJ, Nair S, Walker BR, Bunt JC, Permana PA, Lindsay RS, Tataranni PA** 2006 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue and prospective changes in body weight and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 14:1515-1522
20. **Bujalska IJ, Draper N, Michailidou Z, Tomlinson JW, White PC, Chapman KE, Walker EA, Stewart PM** 2005 Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Mol Endocrinol* 34:675-684
21. **Lavery GG, Walker EA, Draper N, Jeyasuria P, Marcos J, Shackleton CH, Parker KL, White PC, Stewart PM** 2006 Hexose-6-phosphate dehydrogenase knockout mice lack 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1-mediated glucocorticoid generation. *JBC* 281:6546-6551
22. **Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, Lavery GG, Bedendo O, Ray DW, Laing I, Malunowicz E, White PC, Hewison M, Mason PJ, Connell JM, Shackleton CH, Stewart PM** 2003 Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet* 34:434-439
23. **Li X, Lindquist S, Chen R, Myrnas T, Angsten G, Olsson T, Hernell O** 2007 Depot-specific messenger RNA expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and leptin in adipose tissue of children and adults. *Int J Obes (Lond)* 31:820-828
24. **Aoki K, Homma M, Hirano T, Oka K, Satoh S, Mukasa K, Ito S, Sekihara H** 2001 MRNA and enzyme activity of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 are elevated in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci* 69:2543-2549
25. **Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Sakurai R, Tripathi PV, Lutfy K, Friedman TC** 2005 Increased Glucocorticoid Receptor and 11{beta}-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression in Hepatocytes May Contribute to the Phenotype of Type 2 Diabetes in db/db Mice. *Diabetes* 54:32-40
26. **Alberts P, Engblom L, Edling N, Forsgren M, Klingstrom G, Larsson C, Ronquist-Nii Y, Ohman B, Abrahmsen L** 2002 Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia* 45:1528-1532
27. **Alberts P, Nilsson C, Selen G, Engblom LO, Edling NH, Norling S, Klingstrom G, Larsson C, Forsgren M, Ashkzari M, Nilsson CE, Fiedler M, Bergqvist E, Eva BB, Abrahmsen LB** 2003 Selective inhibition of 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology* 144:4755-4762
28. **Hermanowski-Vosatka A, Balkovec JM, Cheng K, Chen HY, Hernandez M, Koo GC, Le Grand CB, Li Z, Metzger JM, Mundt SS, Noonan H, Nunes CN, Olson SH, Pikounis B, Ren N, Robertson N, Schaeffer JM, Shah K, Springer MS, Strack AM, Strowski M, Wu K, Wu T, Xiao J, Zhang BB, Wright SD, Thieringer R** 2005 11beta-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* 202:517-527
29. **Bhat BG, Younis H, Herrera J, Palacio K, Pascual B, Hur G, Jessen B, Ogilvie KM, Rejto PA** 2008 Antisense inhibition of 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves diabetes in a novel cortisone-induced diabetic KK mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 365:740-745

30. **Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC** 2001 Intracellular Regeneration of Glucocorticoids by 11 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 $\alpha$ -HSD)-1 Plays a Key Role in Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Analysis of 11 $\alpha$ -HSD-1-Deficient Mice. *Endocrinology* 142:114-120
31. **Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CRW, Seckl JR, Mullins JJ** 1997 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14924-14929
32. **Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR** 2001 Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity and glucose tolerance in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *JBC* 276:41293-41300
33. **Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, Holmes MC, Staels B, Fievet C, Walker BR, Flier JS, Mullins JJ, Seckl JR** 2004 Novel Adipose Tissue-Mediated Resistance to Diet-Induced Visceral Obesity in 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1-Deficient Mice. *Diabetes* 53:931-938
34. **Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS** 2001 A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science* 294:2166-2170
35. **Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ** 2004 Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7088-7093
36. **Smale ST, Kadonaga JT** 2003 The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72:449-479
37. **Gross P, Oelgeschlager T** 2006 Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochem Soc Symp* 225-236
38. **Ogryzko VV** 2001 Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. *Cell Mol Life Sci* 58:683-692
39. **Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y** 1996 The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87:953-959
40. **Leader JE, Wang C, Fu M, Pestell RG** 2006 Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. *Biochem Pharmacol* 72:1589-1596
41. **Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD** 2004 Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:43-47
42. **Ramji DP, Foka P** 2002 CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575
43. **Bujalska IJ, Quinkler M, Tomlinson JW, Montague CT, Smith DM, Stewart PM** 2006 Expression profiling of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and glucocorticoid-target genes in subcutaneous and omental human preadipocytes. *J Mol Endocrinol* 37:327-340
44. **Salma N, Xiao H, Imbalzano AN** 2006 Temporal recruitment of CCAAT/enhancer-binding proteins to early and late adipogenic promoters in vivo. *J Mol Endocrinol* 36:139-151
45. **Tang QQ, Zhang JW, Daniel LM** 2004 Sequential gene promoter interactions of C/EBP $\beta$ , C/EBP $\alpha$ , and PPAR $\gamma$  during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 319:235-239
46. **Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ** 1995 Impaired energy homeostasis in C/EBP  $\alpha$  knockout mice. *Science* 269:1108-1112

47. **Sands WA, Palmer TM** 2008 Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* 20:460-466
48. **Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK** 2000 ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* 405:195-200
49. **Yuan LW, Gambee JE** 2001 Histone acetylation by p300 is involved in CREB-mediated transcription on chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1541:161-169
50. **Chen CJ, Deng Z, Kim AY, Blobel GA, Lieberman PM** 2001 Stimulation of CREB binding protein nucleosomal histone acetyltransferase activity by a class of transcriptional activators. *Mol Cell Biol* 21:476-487
51. **Kawasaki H, Taira K, Yokoyama K** 2000 Histone acetyltransferase (HAT) activity of ATF-2 is necessary for the CRE-dependent transcription. *Nucleic Acids Symp Ser* 259-260
52. **Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T** 2005 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes* 54:3358-3370
53. **Nakano S, Inada Y, Masuzaki H, Tanaka T, Yasue S, Ishii T, Arai N, Ebihara K, Hosoda K, Maruyama K, Yamazaki Y, Shibata N, Nakao K** 2006 Bezafibrate regulates the expression and enzyme activity of 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in murine adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(4):E1213-22
54. **Fujimura T, Sakuma H, Konishi S, Oe T, Hosogai N, Kimura C, Aramori I, Mutoh S** 2005 FK614, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator, induces differential transactivation through a unique ligand-specific interaction with transcriptional coactivators. *J Pharmacol Sci* 99:342-352
55. **Kodera Y, Takeyama K, Murayama A, Suzawa M, Masuhiro Y, Kato S** 2000 Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *JBC* 275:33201-33204
56. **Sears DD, Hsiao A, Ofrecio JM, Chapman J, He W, Olefsky JM** 2007 Selective modulation of promoter recruitment and transcriptional activity of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 364:515-521
57. **Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM** 1999 PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617
58. **Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM** 2004 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25:831-866
59. **Davies WA, Luo H, Dong KW, Albrecht ED, Pepe GJ** 1997 Cloning and expression of the 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene in the baboon. *Mol Cell Endocrinol* 127:201-209
60. **Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE** 2000 C/EBP regulates hepatic transcription of 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1; a novel mechanism for cross talk between the C/EBP and glucocorticoid signalling pathways. *JBC* 275:30232-30239
61. **Bruley C, Lyons V, Worsley AG, Wilde MD, Darlington GD, Morton NM, Seckl JR, Chapman KE** 2006 A novel promoter for the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is active in lung and is C/EBPalpha independent. *Endocrinology* 147:2879-2885

62. **Gout J, Tirard J, Thevenon C, Riou JP, Begeot M, Naville D** 2006 CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) regulate the basal and cAMP-induced transcription of the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase encoding gene in adipose cells. *Biochimie* 88:1115-1124
63. **Sauma L, Franck N, Paulsson JF, Westermark GT, Kjolhede P, Stralfors P, Soderstrom M, Nystrom FH** 2007 Peroxisome proliferator activated receptor gamma activity is low in mature primary human visceral adipocytes. *Diabetologia* 50:195-201
64. **Giusti V, Suter M, Verdumo C, Gaillard RC, Burckhardt P, Pralong FP** 2004 Molecular determinants of human adipose tissue: differences between visceral and subcutaneous compartments in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1379-1384
65. **Tchkonia T, Lenburg M, Thomou T, Giorgadze N, Frampton G, Pirtskhalava T, Cartwright A, Cartwright M, Flanagan J, Karagiannides I, Gerry N, Forse RA, Tchoukalova Y, Jensen MD, Pothoulakis C, Kirkland JL** 2007 Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E298-E307
66. **Van H, V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Prath-Husmann I, Hauner H** 2003 Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:889-895
67. **Permana PA, Nair S, Lee YH, Luczy-Bachman G, Vozarova De Court, Tataranni PA** 2004 Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E958-E962
68. **Kim J, Temple KA, Jones SA, Meredith KN, Basko JL, Brady MJ** 2007 Differential modulation of 3T3-L1 adipogenesis mediated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 levels. *JBC* 282:11038-11046
69. **Liu Y, Park F, Pietrusz JL, Jia G, Singh RJ, Netzel BC, Liang M** 2007 Suppression of 11{beta}-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 with RNA Interference Substantially Attenuates 3T3-L1 Adipogenesis. *Physiol Genomics* 32(3):343-51
70. **Bader T, Zoumakis E, Friedberg M, Hiroi N, Chrousos GP, Hochberg Z** 2002 Human adipose tissue under in vitro inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: differentiation and metabolism changes. *Horm Metab Res* 34:752-757
71. **Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM** 1999 Differentiation of adipose stromal cells: The roles of glucocorticoids and 11β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140:3188-3196
72. **Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ, Permana PA** 2004 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1: genetic polymorphisms are associated with Type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia* 47:1088-1095
73. **Franks PW, Knowler WC, Nair S, Koska J, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Looker HC, Permana PA, Tataranni PA, Hanson RL** 2004 Interaction Between an 11{beta}HSD1 Gene Variant and Birth Era Modifies the Risk of Hypertension in Pima Indians. *Hypertension* 44(5):681-8
74. **Robitaille J, Brouillette C, Houde A, Despres JP, Tchernof A, Vohl MC** 2004 Molecular Screening of the 11{beta}-HSD1 Gene in Men Characterized by the Metabolic Syndrome. *Obes Res* 12:1570-1575
75. **Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z, Yanovski JA** 2003 Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:983-986
76. **Millan JL, Botella-Carretero JI, Alvarez-Blasco F, Luque-Ramirez M, Sancho J, Moghetti P, Escobar-Morreale HF** 2005 A study of the Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene R453Q and 11{beta}-



Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Gene 83557insA Polymorphisms in the Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90(7):4157-62

77. **Smit P, Dekker MJ, de Jong FJ, van den Beld AW, Koper JW, Pols HA, Brinkmann AO, de Jong FH, Breteler MM, Lamberts SW** 2007 Lack of Association of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 83,557insA and hexose-6-phosphate dehydrogenase gene R453Q polymorphisms with body composition, adrenal androgen production, blood pressure, glucose metabolism, and dementia. *J Clin Endocrinol Metab* 92:359-362
78. **Dyer BW, Ferrer FA, Klinedinst DK, Rodriguez R** 2000 A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem* 282:158-161
79. **Richieri GV, Anel A, Kleinfeld AM** 1993 Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32:7574-7580
80. **Richieri GV, Kleinfeld AM** 1995 Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res* 36:229-240
81. **Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM** 1999 The measurement of free fatty acid concentration with the fluorescent probe ADIFAB: a practical guide for the use of the ADIFAB probe. *Mol Cell Biochem* 192:87-94
85. **Hauner H, Wabitsch M, Pfeiffer EF** 1988 Differentiation of adipocyte precursor cells from obese and nonobese adult women and from different adipose tissue sites. *Horm Metab Res Suppl* 19:35-39
86. **Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W** 1992 Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97:493-497
88. **Stumvoll M, Van HT, Fritsche A, Gerich J** 2001 Oral glucose tolerance test indexes for insulin sensitivity and secretion based on various availabilities of sampling times. *Diabetes Care* 24:796-797
89. **Hay CW, Ferguson LA, Docherty K** 2007 ATF-2 stimulates the human insulin promoter through the conserved CRE2 sequence. *Biochim Biophys Acta* 1769:79-91
90. **Yang Z, Guo C, Zhu P, Li W, Myatt L, Sun K** 2007 Role of glucocorticoid receptor and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in the feed-forward induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by cortisol in human amnion fibroblasts. *J Endocrinol* 195:241-253
91. **Plaisance S, Vanden BW, Boone E, Fiers W, Haegeman G** 1997 Recombination signal sequence binding protein Jkappa is constitutively bound to the NF-kappaB site of the interleukin-6 promoter and acts as a negative regulatory factor. *Mol Cell Biol* 17:3733-3743
92. **Lee SH, Wang X, DeJong J** 2000 Functional interactions between an atypical NF-kappaB site from the rat CYP2B1 promoter and the transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1. *Nucleic Acids Res* 28:2091-2098
93. **Singh PP, Voleti B, Agrawal A** 2007 A novel RBP-J kappa-dependent switch from C/EBP beta to C/EBP zeta at the C/EBP binding site on the C-reactive protein promoter. *J Immunol* 178:7302-7309
94. **Maily F, Berube G, Harada R, Mao PL, Phillips S, Nepveu A** 1996 The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Mol Cell Biol* 16:5346-5357
95. **Andres V, Chiara MD, Mahdavi V** 1994 A new bipartite DNA-binding domain: cooperative interaction between the cut repeat and homeo domain of the cut homeo proteins. *Genes Dev* 8:245-257
96. **Jing H, Yen JH, Ganea D** 2004 A novel signaling pathway mediates the inhibition of CCL3/4 expression by prostaglandin E2. *JBC* 279:55176-55186

97. **Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM, Martinez E** 2007 Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* 389:52-65
98. **Smale ST** 1997 Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* 1351:73-88
99. **Su M, Lee D, Ganss B, Sodek J** 2006 Stereochemical analysis of the functional significance of the conserved inverted CCAAT and TATA elements in the rat bone sialoprotein gene promoter. *JBC* 281:9882-9890
100. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS** 1998 Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809
101. **Liu Y, Sun Y, Zhu T, Xie Y, Yu J, Sun WL, Ding GX, Hu G** 2007 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Acta Pharmacol Sin* 28:1198-1204
102. **Meyer T, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J** 1997 Glucocorticoid-dependent transcriptional repression of the osteocalcin gene by competitive binding at the TATA box. *DNA Cell Biol* 16:919-927
103. **Nerlov C, Ziff EB** 1995 CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *EMBO J* 14:4318-4328
104. **Pedersen TA, Kowenz-Leutz E, Leutz A, Nerlov C** 2001 Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev* 15:3208-3216
106. **Salma N, Xiao H, Mueller E, Imbalzano AN** 2004 Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 24:4651-4663
107. **Smith CL, Hager GL** 1997 Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *JBC* 272:27493-27496
108. **Hassan AH, Neely KE, Vignali M, Reese JC, Workman JL** 2001 Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Front Biosci* 6:D1054-D1064
109. **Urs S, Smith C, Campbell B, Saxton AM, Taylor J, Zhang B, Snoddy J, Jones VB, Moustaid-Moussa N** 2004 Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. *J Nutr* 134:762-770
110. **Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T, Thanos D** 1998 Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1:277-287
111. **Najima Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Matsuzaka T, Sekiya M, Nakagawa Y, memiya-Kudo M, Okazaki H, Okazaki S, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Ishibashi S, Yamada N, Osuga J, Shimano H** 2005 High mobility group protein-B1 interacts with sterol regulatory element-binding proteins to enhance their DNA binding. *JBC* 280:27523-27532
112. **Chau KY, Munshi N, Keane-Myers A, Cheung-Chau KW, Tai AK, Manfioletti G, Dorey CK, Thanos D, Zack DJ, Ono SJ** 2000 The architectural transcription factor high mobility group I(Y) participates in photoreceptor-specific gene expression. *J Neurosci* 20:7317-7324
113. **Keeton EK, Fletcher TM, Baumann CT, Hager GL, Smith CL** 2002 Glucocorticoid receptor domain requirements for chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter in different nucleoprotein contexts. *JBC* 277:28247-28255
114. **Duplus E, Glorian M, Forest C** 2000 Fatty acid regulation of gene transcription. *JBC* 275:30749-30752

115. **Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ** 2005 A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 19:2437-2450
116. **Kim JY, van de WE, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE** 2007 Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117:2621-2637
117. **Zhou G, Cummings R, Li Y, Mitra S, Wilkinson HA, Elbrecht A, Hermes JD, Schaeffer JM, Smith RG, Moller DE** 1998 Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Mol Endocrinol* 12:1594-1604
118. **Olefsky JM, Saltiel AR** 2000 PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 11:362-368
119. **Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK, O'Rahilly S** 1997 Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100:3149-3153
120. **Bujalska IJ, Durrani OM, Abbott J, Onyimba CU, Khosla P, Moosavi AH, Reuser TT, Stewart PM, Tomlinson JW, Walker EA, Rauz S** 2007 Characterisation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human orbital adipose tissue: a comparison with subcutaneous and omental fat. *J Endocrinol* 192:279-288
121. **Wake DJ, Stimson RH, Tan GD, Homer NZ, Andrew R, Karpe F, Walker BR** 2007 Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma agonists on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in subcutaneous adipose tissue in men. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1848-1856
122. **Kolak M, Yki-Jarvinen H, Kannisto K, Tiikkainen M, Hamsten A, Eriksson P, Fisher RM** 2007 Effects of chronic rosiglitazone therapy on gene expression in human adipose tissue in vivo in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:720-724
123. **Wang P, Renes J, Bouwman F, Bunschoten A, Mariman E, Keijer J** 2007 Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia* 50:654-665
124. **Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS** 2007 Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27:79-101
125. **Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA, Matthews DR, Frayn KN** 1996 Effects of morning rise in cortisol concentration on regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol* 271:E996-1002
126. **Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM** 2006 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)* 14:1124-1131
127. **Kim SJ, Nian C, McIntosh CH** 2007 Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *JBC* 282:8557-8567
128. **Yip RG, Wolfe MM** 2000 GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* 66:91-103
129. **Zhou H, Yamada Y, Tsukiyama K, Miyawaki K, Hosokawa M, Nagashima K, Toyoda K, Naitoh R, Mizunoya W, Fushiki T, Kadowaki T, Seino Y** 2005 Gastric inhibitory polypeptide modulates adiposity and fat oxidation under diminished insulin action. *Biochem Biophys Res Commun* 335:937-942

130. **Song DH, Getty-Kaushik L, Tseng E, Simon J, Corkey BE, Wolfe MM** 2007 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide enhances adipocyte development and glucose uptake in part through Akt activation. *Gastroenterology* 133:1796-1805
131. **MacDougald OA, Cornelius P, Liu R, Lane MD** 1995 Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *JBC* 270:647-654
132. **Desvergne B, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-688
133. **Hostetler HA, Huang H, Kier AB, Schroeder F** 2008 Glucose directly links to lipid metabolism through high affinity interaction with peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *JBC* 283:2246-2254
134. **Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferre P** 1997 Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res* 38:1963-1972
135. **Hermanowski-Vosatka A, Gerhold D, Mundt SS, Loving VA, Lu M, Chen Y, Elbrecht A, Wu M, Doebber T, Kelly L, Milot D, Guo Q, Wang PR, Ippolito M, Chao YS, Wright SD, Thieringer R** 2000 PPARalpha Agonists Reduce 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in the Liver. *Biochem Biophys Res Commun* 279:330-336
138. **Lombardo YB, Hein G, Chicco A** 2007 Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids* 42:427-437
140. **Jang C, Obeyesekere VR, Dilley RJ, Alford FP, Inder WJ** 2006 11Beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is expressed and is biologically active in human skeletal muscle. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:800-805
141. **Abdallah BM, Beck-Nielsen H, Gaster M** 2005 Increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in type 2 diabetic myotubes. *Eur J Clin Invest* 35:627-634
142. **Zhou Q, Du J, Hu Z, Walsh K, Wang XH** 2007 Evidence for adipose-muscle cross talk: opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and Fatty acids. *Endocrinology* 148:5696-5705
143. **Jang C, Inder WJ, Obeyesekere VR, Alford FP** 2008 Adiponectin, skeletal muscle adiponectin receptor expression and insulin resistance following dexamethasone. *Clin Endocrinol (Oxf)*
144. **Schakman O, Gilson H, Thissen JP** 2008 Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197:1-10
145. **Lavery GG, Walker EA, Turan N, Rogoff D, Ryder JW, Shelton JM, Richardson JA, Falciani F, White PC, Stewart PM, Parker KL, McMillan DR** 2008 Deletion of hexose-6-phosphate dehydrogenase activates the unfolded protein response pathway and induces skeletal myopathy. *JBC* 283:8453-8461
146. **Shea-Eaton W, Lopez D, McLean MP** 2001 Yin yang 1 protein negatively regulates high-density lipoprotein receptor gene transcription by disrupting binding of sterol regulatory element binding protein to the sterol regulatory element. *Endocrinology* 142:49-58
147. **Ericsson J, Usheva A, Edwards PA** 1999 YY1 is a negative regulator of transcription of three sterol regulatory element-binding protein-responsive genes. *JBC* 274:14508-14513
148. **White PC, Rogoff D, McMillan DR, Lavery GG** 2007 Hexose 6-phosphate dehydrogenase (H6PD) and corticosteroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:89-92
149. **Asahara H, Dutta S, Kao HY, Evans RM, Montminy M** 1999 Pbx-Hox heterodimers recruit coactivator-corepressor complexes in an isoform-specific manner. *Mol Cell Biol* 19:8219-8225

150. **De Quervain DJ, Poirier R, Wollmer MA, Grimaldi LM, Tsolaki M, Streffer JR, Hock C, Nitsch RM, Mohajeri MH, Papassotiropoulos A** 2004 Glucocorticoid-related genetic susceptibility for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 13:47-52
153. **Alberti L, Girola A, Gilardini L, Conti A, Cattaldo S, Micheletto G, Invitti C** 2007 Type 2 diabetes and metabolic syndrome are associated with increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 31:1826-1831
154. **De Sousa Peixoto RA, Turban S, Battle JH, Chapman KE, Seckl JR, Morton NM** 2008 Preadipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is a keto-reductase and contributes to diet-induced visceral obesity in vivo. *Endocrinology* 149:1861-1868
155. **Drake AJ, Livingstone DE, Andrew R, Seckl JR, Morton NM, Walker BR** 2005 Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high fat feeding in Wistar rats. *Endocrinology* 146:913-919
156. **London E, Lala G, Berger R, Panzenbeck A, Kohli AA, Renner M, Jackson A, Raynor T, Loya K, Castonguay TW** 2007 Sucrose access differentially modifies 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase message in liver and adipose tissue in rats. *J Nutr* 137:2616-2621

## INTERNETQUELLEN

1. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, 22 August 2006;  
[http://www.euro.who.int/obesity/pub/20060221\\_1?language=german](http://www.euro.who.int/obesity/pub/20060221_1?language=german)
82. MatInspector; <http://www.genomatix.de/>
83. Jaspar Database; [http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar\\_db.pl](http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl)
84. ImageJ (Open Source software); <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
87. American diabetes Association; <http://www.diabetes.org>
105. Genomics Institute of the Novartis Research Foundation; <http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>
136. NutritionData - Distelöl; <http://www.nutritiondata.com/facts-C00001-01c209F.html>
137. NutritionData - Fischöl; <http://www.nutritiondata.com/facts-C00001-01c20AA.html>
139. NutritionData - Kokosfett; <http://www.nutritiondata.com/facts-C00001-01c224P.html>
151. Pubmed; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
152. Ensembl; <http://www.ensembl.org/index.html>

## LEBENS LAUF

Name: Janin Andres

Geburtsdatum: 25.01.1980

Geburtsort: Potsdam

### Promotion:

Januar 2005 – Juni 2008

Anfertigung der Doktorarbeit (Dr. rer. nat.)  
in der Abteilung für Klinische Ernährung am Deutschen Institut  
für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke und in der  
Abteilung für Endokrinologie an der Charité – CBF

### Studium:

Oktober 1999 - Januar 2005

Studium der Biochemie an der Universität Potsdam

Oktober 2003 - November 2004

Diplomarbeit in der Abteilung Endokrinologie an der Charité –  
CBF

Januar 2002 - Dezember 2004

Arbeit als studentische Hilfskraft am DIfE

### Schule:

Juni 1999

Abschluss der Schule mit dem Abitur in Potsdam

1992 – 99

Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe

1986 – 92

Polytechnische Oberschule

## DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. AFH Pfeiffer für Bereitstellung aller Mittel, die für die Anfertigung dieser Arbeit notwendig waren und von mir verbraucht worden sind.

Prof. Dr. J Spranger danke ich für die Unterstützung bei dieser Arbeit und die Verknüpfung der *in-vivo*-Daten mit *in-vitro* -Daten. Zudem danke ich für die Freiheit, die ich bei der Durchführung dieser Arbeit hatte.

Eli-Lilly International Foundation danke ich für ein Teil der Finanzierung.

Dr. Knut Mai und Dr. Özlem Gögebakan danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die zur Verfügung gestellten humanen Proben. Daraus sind tolle Ergebnisse und Publikationen entstanden bzw. zukünftige Publikationen werden noch entstehen.

Bei Dr. Susanne Neschen bedanke ich mich für die Bereitstellung der Mäuse-Organen und –Daten. Es hat daraus ein schönes Projekt entwickelt.

Birgit Faust danke ich für die tolle Unterstützung bei den Experimenten in der Endphase. Schade nur, dass wir nicht schon früher zusammenarbeiten konnten.

Antje Fischer danke ich für die Unterstützung bei der MeSyPeBo-Analyse und für das Erlangen einer Teilkenntnis von SPSS.

Dr. Markus Tölle, Mirjam Schuchardt und Anette Wiedon aus der Abt. van der Giet (Nephrologie) danke ich für die tolle Zusammenarbeit. Besonders Dank gehört Markus Tölle und dass er mir Zugang zu allen seinen Geräten, insbesondere dem Multi-Well-Reader, gewährt hat. Ohne diese Unterstützung wäre ein großer Teil der Ergebnisse nicht möglich gewesen.

Petra Exner danke ich für die seelische und moralische Unterstützung. Ein großer Teil der Unterstützung bestand in kalorisch-nicht-einwandfreien und sehr energiedichten Nahrungsmitteln.

Auch den Zivildienstleistenden Fabian danke ich für die unliebsamen Arbeiten, die er für mich erledigt hat.

Markus Sabath und Susanne Schnell sowie den Rest der Arbeitsgruppe danke ich für die tolle Zusammenarbeit und Spaß, den wir im Labor hatten.

Zuletzt danke ich meinen Lebensgefährten Erich Hoops, dass er stundenlang diese Arbeit gelesen hat. Auch danke ich ihm dafür, dass er den Haushalt geschmissen hat als ich mich stundenlang dieser Arbeit gewidmet habe.

Meiner Familie danke ich für die sonstige Unterstützung.

**AN ALLE EIN DICKES DANKE!**