

**Die Rolle von PPAR $\gamma$  und glatten Gefäßmuskelzellen  
bei pulmonal arterieller Hypertonie und Insulinresistenz**

**Dissertation**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Manuela Trappiel**

aus Berlin

2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Januar 2012 bis März 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Kai Kappert am *Center for Cardiovascular Research (CCR)* der Charité - Universitätsmedizin in Berlin angefertigt.

---

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Kai Kappert / Charité - Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rudolf Tauber / Freie Universität Berlin

---

Disputation am 13.11.2017

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Dissertation begleitet haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Kai Kappert für die sehr gute und umfangreiche Betreuung und vielen wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen sowie das Ermöglichen der Teilnahme an diversen Kongressen.

Außerdem gilt Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Tauber ein besonderer Dank für die Betreuung meiner Arbeit seitens des Fachbereiches Biochemie der Freien Universität Berlin sowie für die Leitung des Promotionsverfahrens.

Den Kooperationspartnern aus Köln um Priv.-Doz. Dr. med. Evren Caglayan möchte ich für die Zusammenarbeit rund um die Durchführung der Tierexperimente danken. Insbesondere möchte ich Frau Dr. rer. nat. Eva Berghausen für die Durchführung der Kathetermessungen der Mäuse und Ratten in Köln danken. Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Arnica Behringer aus Köln für die Züchtung der *SmPpary*-Mäuse und die tierexperimentellen Arbeiten mit den Ratten sowie Frau Doris Petzold für die Tatkräftige Unterstützung bei den histologischen Auswertungen.

Frau Zsofia Ban und Herrn Dr. rer. medic. Daniel Hackbusch möchte ich ganz besonders für ihre Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten sowie die zahlreichen motivierenden und anregenden Gespräche danken.

Den ehemaligen sowie aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Kappert, Kintscher und Schupp möchte ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft danken.

Danken möchte ich auch allen nicht namentlich genannten Ko-Autoren der aus dieser Dissertation hervorgegangenen Publikation.

Da Stipendien diese Arbeit erst möglich gemacht haben, möchte ich mich an dieser Stelle auch bei der Marga und Walter Boll Stiftung für die Projektfinanzierung, der Sonnenfeld-Stiftung für das Promotionsstipendium sowie der Charité-Universitätsmedizin Berlin für das Abschlussstipendium bedanken.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich nicht nur während der Jahre meiner Promotion, sondern auf dem gesamten Weg dahin motiviert, inspiriert und bedingungslos unterstützt haben.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Physiologische Regulation der Glukosehomöostase</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Definition der Insulinresistenz und des Typ 2 Diabetes</b> .....	<b>1</b>
1.2.1. Entstehung der Insulinresistenz .....	<b>2</b>
1.2.2. Insulin-Signaltransduktion .....	<b>3</b>
1.2.2.1. Protein-Tyrosin-Phosphatasen .....	<b>3</b>
1.2.2.1.1. Density-Enhanced Phosphatase-1 (DEP-1) .....	<b>4</b>
1.2.2.2. Regulation der Insulin-Signaltransduktion durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen .....	<b>4</b>
1.2.3. Überblick über generelle pharmako-therapeutische Möglichkeiten auf molekularer Ebene.....	<b>4</b>
1.2.3.1. Klinische Therapieansätze bei Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes .....	<b>5</b>
<b>1.3. Definition der pulmonal arteriellen Hypertonie</b> .....	<b>6</b>
1.3.1. Einteilung der pulmonalen Hypertonie .....	<b>8</b>
1.3.2. Inzidenz, Prävalenz und Mortalität der PAH .....	<b>8</b>
1.3.3. Entstehung der PAH.....	<b>9</b>
1.3.3.1. Mechanismen der PAH-Entstehung .....	<b>10</b>
1.3.3.2. Derzeitig zugelassene Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der PAH .....	<b>13</b>
1.3.3.3. Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) .....	<b>15</b>
<b>1.4. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen IR und PAH</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5. Hypothese und Ziel der Arbeit</b> .....	<b>19</b>

<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Materialien .....</b>	<b>20</b>
2.1.1. Versuchstiere .....	20
2.1.2. Laborgeräte .....	20
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien .....	21
2.1.4. Verbrauchsmaterialien .....	24
2.1.5. Software .....	24
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.2.1. Tiermodelle.....	25
2.2.1.1. Antisense-Oligonukleotid-Behandlung in C57/BL6J Mäusen .....	25
2.2.1.2. Konventioneller <i>Ptprj</i> (DEP-1)- <i>knockout</i> in C57/BL6J Mäusen .....	26
2.2.1.3. Konventioneller <i>SmPpar<math>\gamma</math></i> - <i>knockout</i> in C57/BL6 x SJL x DBA/2J x C3H Mäusen.....	26
2.2.1.4. Monocrotalin (MCT)-Rattenmodell der pulmonalen Hypertonie .....	27
2.2.2. Hämodynamische Messungen bei Ratten und Mäusen .....	28
2.2.3. Metabolische Charakterisierung von <i>SmPpar<math>\gamma</math></i> -Mäusen.....	29
2.2.3.1. Kernspinresonanzspektroskopie.....	29
2.2.3.2. TSE LabMaster-Analysen .....	29
2.2.3.3. Insulin-Toleranz-Test .....	29
2.2.3.4. Glukose-Toleranz-Test .....	29
2.2.4. Serumspiegel von Pioglitazon.....	30
2.2.5. Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.5.1. Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen der Maus .....	30
2.2.5.2. Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.2.5.3. Quantifizierung der mRNA durch quantitative <i>real-time</i> PCR.....	31
2.2.6. Proteinbiochemische Methoden .....	32
2.2.6.1. Isolierung von Proteinen .....	32
2.2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.2.6.3. Western Blot Analysen.....	33
2.2.6.4. <i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	33
2.2.7. Histologische Charakterisierung der Mäuse und Ratten.....	34
2.2.7.1. Histologische Untersuchung der pankreatischen Inseln.....	34
2.2.7.2. <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA) – Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor und Phosphorylierungsstatus des Insulinrezeptors <i>in situ</i> .....	35
2.2.7.3. Nachweis von PPAR $\gamma$ in mPASCs .....	36
2.2.7.4. Muskularisierung der pulmonalen Gefäße.....	37
2.2.7.5. Zellproliferation in den pulmonalen Gefäßen.....	38
2.2.7.6. Kardiomyozytengröße und Fibrose im rechten und linken Ventrikel .....	38
2.2.7.7. Osteopontin in der Lunge.....	38
2.2.7.8. Fibrose in der Lunge .....	39
2.2.7.9. Makrophageninfiltration.....	39

2.2.8.	Zellkultur-Methoden.....	39
2.2.8.1.	Isolation und Kultivierung von pulmonal arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen .....	39
2.2.8.2.	Behandlung Insulin-stimulierter Zellen mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon .....	40
2.2.9.	Densitometrische Analyse und statistische Auswertung.....	40
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.</b>	<b>Metabolische Charakterisierung von Mäusen unter Niedrig- und Hochfettdiät....</b>	<b>41</b>
3.1.1.	Einfluss einer Hochfettdiät auf die Gewichtszunahme.....	41
3.1.2.	Einfluss einer Hochfettdiät auf die Interaktion von DEP-1 mit dem Insulinrezeptor und auf die $\beta$ -Zellen des Pankreas .....	41
<b>3.2.</b>	<b>Einfluss einer HFD auf SmPpar<math>\gamma</math><sup>-/-</sup>-Mäuse und deren Wildtypen .....</b>	<b>44</b>
3.2.1.	Nachweis von PPAR $\gamma$ in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta.....	44
3.2.2.	Metabolische Charakterisierung von SmPpar $\gamma$ -Mäusen.....	45
3.2.2.1.	Gewichtsverlauf .....	45
3.2.3.	Analyse des Pioglitazon-Serumspiegels .....	47
3.2.3.1.	Analyse der Adiponektin-Serumkonzentration.....	47
3.2.3.2.	Untersuchung der Körperzusammensetzung mittels NMR .....	48
3.2.3.3.	Bestimmung der Organgewichte .....	49
3.2.3.4.	Untersuchung der Glukoseverwertung mittels GTT .....	50
3.2.3.5.	Untersuchung der Insulinsensitivität mittels ITT .....	52
3.2.3.6.	Insulin-induzierte Veränderung der Signaltransduktion in murinen glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta .....	54
3.2.3.7.	Charakterisierung der SmPpar $\gamma$ -Mäuse im TSE LabMaster .....	55
3.2.4.	Hämodynamische Charakterisierung des SmPpar $\gamma$ -Mausmodells.....	56
3.2.4.1.	Invasive Druckmessung mittels Katheter.....	57
3.2.4.2.	Immunohistochemische Untersuchung der Lungengefäße .....	58
3.2.4.3.	Proliferation der pulmonalen Gefäßzellen .....	59
3.2.4.4.	Kardiale Veränderungen im SmPpar $\gamma$ -Mausmodell .....	60
3.2.4.5.	Differentielle Genexpression im Herzgewebe.....	62
3.2.4.6.	Untersuchung von Inflammation und Fibrose in der Lunge.....	63
3.2.5.	Zusammenhang zwischen metabolischen und kardiovaskulären Veränderungen.....	65
<b>3.3.</b>	<b>Behandlung der pulmonalen Hypertonie mit einem PPAR<math>\gamma</math>-Agonisten im MCT-Rattenmodell .....</b>	<b>66</b>

3.3.1.	Messung des rechtsventrikulären und systemischen Blutdruckes .....	67
3.3.2.	Untersuchung der Lungengefäße .....	67
3.3.3.	Bestimmung des Fulton's Index und der Kardiomyozytengröße sowie der differentiellen Genexpression von BNP .....	69
3.3.4.	Untersuchung kardialer fibrotischer Veränderungen .....	72
3.3.5.	Untersuchung inflammatorischer Veränderungen der Lunge .....	73
3.3.6.	Überlebensrate der Ratten im MCT-Modell .....	74
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>76</b>
4.1.	<b>Phänotypisierung der <i>SmPpary</i>-Mäuse.....</b>	<b>76</b>
4.2.	<b>Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf die pulmonale Hypertonie .....</b>	<b>79</b>
4.2.1.	Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf hämodynamische Parameter .....	80
4.2.2.	Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf pulmonale Gefäße.....	81
4.2.3.	Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf kardiale Veränderungen.....	83
4.2.4.	Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf inflammatorische Prozesse .....	84
4.3.	<b>Typ 2 Diabetes, Insulinresistenz und pulmonale Hypertonie – existiert ein kausaler Zusammenhang?.....</b>	<b>85</b>
4.4.	<b>Wirkung der Hochfett-diät auf die Insulinwirkung .....</b>	<b>87</b>
4.5.	<b>Tiermodelle zur Untersuchung der PH .....</b>	<b>87</b>
4.6.	<b>Pulmonale Hypertonie in Frauen.....</b>	<b>88</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>107</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Abkürzung Ausgeschrieben

AUC	engl.: area under the curve, dt.: Fläche unter der Kurve
AP-1	engl.: <i>activator protein 1</i>
ApoE	Apolipoprotein E
ASO	Antisense-Oligonukleotid
BMPR2	engl.: <i>bone morphogenetic protein receptor type 2</i>
BNP	engl.: <i>brain natriuretic peptide</i> , dt.: natriuretischen Peptides Typ B
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
Cdk 7/ 9	engl.: <i>cyclin-dependent kinase</i> , dt.: Cyclin-abhängige Kinase 7 bzw. 9
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
COPD	engl.: <i>chronic obstructive lung disease</i> , dt.: chronisch obstruktive Lungenkrankheit
CSA	engl.: <i>cross sectional area</i> , dt.: Querschnittsfläche
CTEPH	chronisch thromboembolische PH
DEP-1	engl.: <i>Density-Enhanced Phosphatase-1</i>
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> , dt.: Desoxyribonukleinsäure
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
ECL	engl.: <i>enhanced chemiluminescence</i>
EGF	engl.: <i>epidermal growth factor</i>
Egr-1	engl.: <i>early growth response protein 1</i>
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERA	Endothelinrezeptorantagonist
Erk	engl.: <i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FBS	engl.: <i>fetal bovine serum</i> , dt.: fetales Kälberserum
FPAH	familiäre PAH
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukosetransporter 4
GTT	Glukose-Toleranz-Test
HF	Herzfrequenz
HFD	Hochfett-diät
HIV	humanes Immundefizienz- Virus
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i>
IL-2	Interleukin-2
IPAH	idiopatische PAH
IR	Insulinresistenz
IRS1	Insulinrezeptorsubstrat 1
ITT	Insulin-Toleranz-Test
JNK	engl.: <i>Jun amino-terminal kinase</i>
LAR	engl.: <i>leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCT	Monocrotalin
mPAP	engl.: <i>mean pulmonary arterial pressure</i> , dt.: mittlerer pulmonal arterieller Druck
mPASMCM	engl.: <i>mouse pumonary artery smooth muscle cell</i> , dt.: murine glatte Gefäßmuskelzelle aus der Pulmonalarterie



mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFD	Niedrigfett-diät
NF- $\kappa$ B	engl.: <i>nuclear factor kappa B</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMR	engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i> , dt.: Kernspinresonanzspektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	NADPH Oxidasen
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PCNA	engl.: <i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> , dt.: Polymerase Kettenreaktion
PCWP	engl.: <i>pulmonary capillary wedge pressure</i> , dt.: mittlerer Wedge-Druck
PDE-5	Phosphodiesterase Typ 5
PDE-5i	Phosphodiesterase Typ 5 Inhibitoren
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PH	pulmonale Hypertonie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pio	Pioglitazon
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptor gamma
PPRE	engl.: <i>peroxisome proliferator responsive element</i>
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVR	engl.: <i>pulmonary vascular resistance</i> , dt.: pulmonaler Gefäßwiderstand
RCP	engl.: <i>rolling circle product</i> (fluoreszierender Signalpunkt)
Ripa	engl.: <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i> , dt.: reaktive Sauerstoffspezies
RQ	respiratorischer Quotient
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RVSP	engl.: <i>right ventricular systolic pressure</i> , dt.: rechtsventrikulärer Druck
RXR	Retinoidrezeptor X
SBP	engl.: <i>systemic blood pressure</i> , dt.: systemische Blutdruck
SDS-PAGE	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; dt.: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sGC	engl.: <i>soluble guanylate cyclase</i> , dt.: lösliche Guanylatzyklase
SGLT2	engl.: <i>sodium-glucose cotransporter 2</i> , dt.: Natrium/Glukose-Kotransporter 2
SHP-2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>
SMC	engl.: <i>smooth muscle cell</i> ; dt.: glatte Gefäßmuskelzelle
STAT	engl.: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
SUMO	engl.: <i>small ubiquitin-like modifier peptides</i>
T2D	Typ 2 Diabetes
TBS-T	engl.: <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF	von Willebrand Faktor

---

XO	Xanthin-Oxidase
$\alpha$ -SMA	engl.: <i>alpha smooth muscle actin</i>

## TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Versuchstiere.....	20
Tabelle 2:	Verwendete Geräte.....	20
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lieferanten .....	21
Tabelle 4:	Verwendete Verbrauchsmaterialien und Lieferanten .....	24
Tabelle 5:	Verwendete Software .....	24
Tabelle 6:	Schematische Darstellung der Hochfettdiät-induzierten Insulinresistenz mit Antisense-Oligonukleotid (ASO)-Behandlung in C57/BL6J Mäusen.....	25
Tabelle 7:	Schematische Darstellung der Hochfettdiät-induzierten Insulinresistenz in Wildtyp- und Ptp <sup>prj</sup> (DEP-1)-knockout-Mäusen .....	26
Tabelle 8:	Schematische Darstellung der Hochfettdiät-induzierten pulmonalen Hypertonie in Wildtyp- und SmPpary <sup>-/-</sup> -Mäusen einschließlich der pharmakologischen Behandlung mit Pioglitazon .....	27
Tabelle 9:	Schematische Darstellung des MCT-Rattenmodells zur Induktion der pulmonalen Hypertonie und Behandlung mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon .....	28
Tabelle 10:	Temperatur-Zeit-Profil der Polymerase-Kettenreaktion für die Genotypisierung ...	30
Tabelle 11:	Primersequenzen für die Genotypisierung der Ptp <sup>prj</sup> (DEP-1)-Mäuse und SmPpary-Mäuse .....	31
Tabelle 12:	Primersequenzen für die quantitative real-time PCR mit SYBR® Green.....	32
Tabelle 13:	Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung zur Untersuchung der Insulin-Signalweiterleitung in murinen glatten Gefäßmuskulzellen aus der Pulmonalarterie.....	33
Tabelle 14:	Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper zur Untersuchung der Insulinproduzierenden Zellen im Pankreas von DEP-1 Wildtyp- und knockout-Mäusen .....	34
Tabelle 15:	Eingesetzte Primärantikörper für den Proximity Ligation Assay (PLA) .....	36
Tabelle 16:	Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis des PPAR $\gamma$ -knockouts in glatten Gefäßmuskulzellen der Pulmonalarterie .....	37
Tabelle 17:	Eingesetzte Primärantikörper und Detektionskits für die Auswertung der Muskularisierung der pulmonalen Gefäße.....	37
Tabelle 18:	Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper bzw. Detektionskit zur Bestimmung der proliferierenden Zellen in den pulmonalen Gefäßen.....	38
Tabelle 19:	Eingesetzter Primärantikörper und dessen Detektionskit zur Bestimmung der Osteopontin-positiven Bereiche in der Lunge.....	39
Tabelle 20:	Eingesetzte Primärantikörper und Detektionskits zur Bestimmung der Makrophageninfiltration in die Lunge.....	39

Tabelle 21:	Serumspiegel von Pioglitazon sowie dessen Metabolite III und IV in vier stichprobenartig gewählten Pioglitazon-behandelten Mäusen.....	47
Tabelle 22:	Darstellung einzelner Organgewichte [in Gramm] von SmPpar <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar <sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen unter Niedrig- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und nach Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio).....	50

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Veränderungen der Lungengefäße und des Herzens bei Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie (PAH) .....	7
Abbildung 2:	Mechanismen der Vasokonstriktion und -dilatation in pulmonalen Gefäßen, die als Ansatzpunkt der PAH-Therapie dienen (rot: inhibitorische Wirkmechanismen, grün: aktivierende/stimulierende Mechanismen). .....	14
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der PPAR $\gamma$ -vermittelten Genregulation. ....	15
Abbildung 4:	Effekte der PPAR $\gamma$ -Aktivierung in verschiedenen Geweben.....	17
Abbildung 5:	Körpergewicht von SmPpar <sup>+/+</sup> -Mäusen [in Gramm] in Abhängigkeit des Fettgehaltes der Nahrung zum Zeitpunkt 0, nach 12 und 24 Wochen.....	41
Abbildung 6:	Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase DEP-1 zum Insulinrezeptor (IR)..	42
Abbildung 7:	Untersuchung der Phosphorylierung des Insulinrezeptors.....	43
Abbildung 8:	Hochfettdiät-induzierte Veränderungen der pankreatischen Inseln im Ptp $\alpha$ (DEP-1)-knockout-Modell der Maus. ....	44
Abbildung 9:	Nachweis von PPAR $\gamma$ in der Aorta und in glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie.....	45
Abbildung 10:	Gewichtsentwicklung im Verlauf der HFD bzw. der zusätzlichen Pioglitazon-Behandlung im Vergleich zur NFD in SmPpar <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar <sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen .....	46
Abbildung 11:	Bestimmung der Adiponektin-Serumspiegel mittels ELISA in SmPpar <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar <sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen. ....	47
Abbildung 12:	Darstellung der Körperzusammensetzung der SmPpar <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar <sup>-/-</sup> (KO)-Mäuse nach zwölf Wochen.....	48
Abbildung 13:	Darstellung der Körperzusammensetzung der SmPpar <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar <sup>-/-</sup> (KO)-Mäuse nach 24 Wochen. ....	49
Abbildung 14:	Glukose-Toleranz-Test (GTT) unter NFD bzw. HFD sowie nach pharmakologischer Behandlung mit Pioglitazon in SmPpar <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar <sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten.....	51
Abbildung 15:	Insulin-Toleranz-Test (ITT) unter NFD bzw. HFD sowie nach pharmakologischer Behandlung mit Pioglitazon in SmPpar <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar <sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten.....	53

Abbildung 16: Insulin-stimulierte Phosphorylierung von Akt in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie von SmPpar $\gamma^{+/+}$ (WT)- und SmPpar $\gamma^{-/-}$ (KO)-Mäusen. ....	54
Abbildung 17: Respiratorischer Quotient (RQ) der SmPpar $\gamma^{+/+}$ (WT)- und SmPpar $\gamma^{-/-}$ (KO)-Mäuse unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und HFD mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio) nach 24 Versuchswochen. ....	55
Abbildung 18: Lokomotorische Aktivität der SmPpar $\gamma^{+/+}$ - und SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäuse (WT und KO) unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio) nach 24 Versuchswochen. ....	56
Abbildung 19: Invasive Kathetermessung des rechtsventrikulären und systemischen Blutdruckes (RVSP bzw. SBP) sowie der Herzfrequenz (HF) in SmPpar $\gamma^{+/+}$ - und SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäuse (WT und KO) unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio) nach 24 Versuchswochen. ....	57
Abbildung 20: Untersuchung der kleinen Lungengefäße (20–70 $\mu$ m) in SmPpar $\gamma^{+/+}$ - und SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäuse (WT und KO) unter Niedrig- bzw Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio).....	59
Abbildung 21: Berechnung des Fulton's Index zur Bestimmung einer Rechtssherzhypertrophie in SmPpar $\gamma^{+/+}$ - und SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäuse (WT und KO) unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio).....	60
Abbildung 22: Bestimmung der Kardiomyozytengröße in SmPpar $\gamma^{+/+}$ (WT)- und SmPpar $\gamma^{-/-}$ (KO)-Mäuse unter Niedrig- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio).....	61
Abbildung 23: Untersuchung der differentiellen Genexpression im rechten Ventrikel in Abhängigkeit von der Diät (Niedrigfettdiät: NFD, Hochfettdiät: HFD) und pharmakologischen Behandlung mit Pioglitazon (HFD+Pio) in SmPpar $\gamma^{+/+}$ (WT)- und SmPpar $\gamma^{-/-}$ (KO)-Mäusen. ....	63
Abbildung 24: Analyse inflammatorischer Veränderungen in der Lunge von SmPpar $\gamma^{+/+}$ (WT)- und SmPpar $\gamma^{-/-}$ (KO)-Mäusen nach Niedrigfettdiät (NFD) und Hochfettdiät (HFD) bzw. nach HFD mit therapeutischen Behandlung mit Pioglitazon (HFD+Pio). ....	64
Abbildung 25: Analyse fibrotischer Veränderung in der Lunge von SmPpar $\gamma^{+/+}$ (WT)- und SmPpar $\gamma^{-/-}$ (KO)-Mäusen nach Niedrig (NFD)-und Hochfettdiät (HFD) bzw. nach HFD mit therapeutischen Behandlung mit Pioglitazon (HFD+Pio).....	65
Abbildung 26: Korrelation zwischen metabolischen Veränderungen in Form der Glukose- und Insulintoleranz bzw. der Adiponektin-Serumkonzentration und dem rechtsventrikulären Druck (RVSP) in SmPpar $\gamma$ -Mäusen.....	66
Abbildung 27: Bestimmung des rechtsventrikulären und systemischen Blutdruckes (RVSP und SBP) im MCT-Rattenmodell mittels invasiver Kathetermessung an Tag 35.....	67

<i>Abbildung 28: Untersuchung der kleinen Lungengefäße (&lt; 100 µm) im Monocrotalin (MCT)-Modell der Ratte mit therapeutischer Pioglitazon-Behandlung (MCT+Pio).....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 29: Untersuchung proliferativ aktiver Zellen (PCNA-positiv) in den kleinen Lungengefäßen der Ratten des MCT-Modells. ....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 30: Ermittlung des Fulton's Index zur Bestimmung einer Rechtsherzhypertrophie im MCT-Rattenmodell.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 31: Bestimmung der Größe der Kardiomyozyten im rechten und linken Ventrikel für Ratten aus dem MCT-Modell.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 32: Untersuchung der differentiellen Genexpression im rechten Ventrikel im MCT-Rattenmodell mit und ohne pharmakologische Behandlung mit Pioglitazon. ....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 33: Bestimmung fibrotischer Veränderungen im Herzgewebe von Ratten nach MCT-Injektion mit und ohne therapeutische Behandlung mit Pioglitazon. ....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 34: Analyse inflammatorischer Veränderung des Lungengewebes im MCT-Rattenmodell mit und ohne Pioglitazon-Behandlung. ....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve für die Ratten des MCT-Modells mit und ohne Pioglitazon-Behandlung.....</i>	<i>75</i>

## 1. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupttodesursache in westlichen Ländern, einschließlich der Bundesrepublik Deutschland, dar. Sie sind Endpunkte einer Reihe von Risikofaktoren, wie erhöhtem Blutdruck, Rauchen und Typ 2 Diabetes (T2D). Die Prävalenz des T2D steigt stetig, sodass in den USA derzeit beispielsweise 12–14 % der Erwachsenen betroffen sind (Menke *et al.* 2015). Die Vorstufe, der sogenannte Prädiabetes, der maßgeblich durch die Insulinresistenz gekennzeichnet ist, betrifft sogar mehr als 50 % der Erwachsenen in den USA (Menke *et al.* 2015). Neben den Folgen der Insulinresistenz auf die Glukosehomöostase ist diese Krankheit mit pathologischen Entitäten wie systemische Inflammation, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Hyperlipidämie, Hypoxie, Fettleibigkeit, Lipodystrophie, Sepsis, Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen und einem Überschuss an Wachstumshormonen assoziiert (Mackenzie und Watt 2016, Kang *et al.* 2016). Zudem besteht eine enge Verknüpfung zwischen vaskulären Veränderungen, welche auch bei der Entstehung der pulmonalen Hypertonie eine Rolle spielen, und metabolischen Erkrankungen.

### 1.1. Physiologische Regulation der Glukosehomöostase

Bei einem gesunden Erwachsenen liegt der Blutglukosespiegel nüchtern ca. bei 70 mg/dl (3,9 mmol/l) und postprandial bei ca. 120 mg/dl (6,7 mmol/l). Steigt die Blutglukosekonzentration auf Werte über 180 mg/dl (10 mmol/l), so kann es zu einer Ausscheidung von Glukose über den Harn (Glukosurie) kommen. Die Ursache dafür liegt in einer begrenzten Rückresorptionskapazität der Nierentubuli, die bei solchen Werten überschritten wird. Sinkt der Blutglukosespiegel hingegen unter Werte von 70 mg/dl (3,9 mmol/l), können Symptome wie Müdigkeit und Schwindel als eine Folge der Unterversorgung des zentralen Nervensystems mit Glukose auftreten. Sinkt der Spiegel weiter, kann es zu Krämpfen, Schocksymptomatik und schließlich zum Tod kommen. Daher besitzt der Körper Regulationsmechanismen, um den Blutglukosespiegel konstant zu halten (Glukosehomöostase). Die kurzfristige Regulation der Schwankungen des Blutglukosespiegels prä- und postprandial erfolgt über Insulin und Glukagon aus dem Pankreas. Postprandial steigt der Blutglukosespiegel, was zur Ausschüttung von Insulin aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen führt. Insulin bewirkt zum einen den Transport intrazellulärer Vesikel mit Glukosetransportern zur Zellmembran, was eine Aufnahme der Glukose in die Zellen ermöglicht. Zum anderen wird über Insulin die Glukokinase in den Hepatozyten aktiviert. Dies führt zu einer Phosphorylierung der Glukose, die dadurch die Hepatozyten nicht mehr verlassen kann, sodass der Glukosespeicher in der Leber aufgebaut wird (Glykogensynthese). Glukagon wirkt als Gegenspieler des Insulins. Sinkt der Blutglukosespiegel unter einen bestimmten Wert, wird Glukagon aus den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas ausgeschüttet. Glukagon bewirkt einen Abbau des Glykogenspeichers in der Leber und eine Biosynthese von Glukose über die Glukoneogenese (Biesalski und Grimm 2007).

### 1.2. Definition der Insulinresistenz und des Typ 2 Diabetes

Bei der Insulinresistenz (IR) kommt es zu einer verminderten Sensitivität von Körperzellen bzw. Geweben und Organen gegenüber Insulin. Vor allem die Zellen der Muskulatur, der Leber und des Fettgewebes reagieren weniger empfindlich. Insulin wirkt in vielfältiger Weise auf den Organismus und nicht jede dieser Wirkungen muss zwingend beeinflusst sein, damit die Diagnose Insulinresistenz

gestellt wird. Es werden lediglich die metabolischen Effekte des Insulins betrachtet, wie die Fähigkeit die Aufnahme der Glukose in den Muskel oder das Fettgewebe zu fördern oder die Produktion der Glukose in der Leber zu unterdrücken. Klassischerweise ist die Insulinresistenz mit dem T2D assoziiert, wobei sie zu einer Hyperglykämie führt.

Als T2D werden alle Formen einer gestörten glukoseabhängigen Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas bzw. Insulinwirkung an den Zielzellen bezeichnet. Somit kommt es durch die IR bzw. verminderte Insulin-Ausschüttung zu einer Hyperglykämie, die mit Kohlenhydrat- und Fettstoffwechselstörungen assoziiert sein kann. Mit dem T2D gehen wiederum eine Vielzahl anderer pathologischer Veränderungen im Körper einher. Dazu zählen vor allem Komplikationen wie Retinopathie, Neuropathie und Nephropathie (Orchard *et al.* 1997). Die Veränderungen der Niere sind dabei vermutlich nicht alleine auf die direkten Folgen der Hyperglykämie zurückzuführen, sondern rühren auch von einem erhöhten Blutdruck bei diesen Patienten her (Grundy 2016). Die Schäden an den Nerven könnten aus Veränderungen der kleinen Gefäße resultieren (Cameron *et al.* 2001). T2D führt außerdem zum Auftreten von makrovaskulären Komplikationen wie atherosklerotischen bzw. Lumen-reduzierenden Veränderungen der Gefäße (Bornfeldt und Tabas 2011).

### **1.2.1. Entstehung der Insulinresistenz**

Die IR wie auch der T2D betrifft sowohl schlanke als auch übergewichtige Menschen, wobei das Vorkommen bei Übergewichtigen deutlich überwiegt. Daneben spielt die genetische Prädisposition eine entscheidende Rolle. Zusammen mit einer übermäßigen Kalorienzufuhr und einem Mangel an körperlicher Aktivität kommt es zu einem Anstieg freier Fettsäuren im Blut, da die kalorische Speicherkapazität der Adipozyten begrenzt ist. Wenn die Kapazitätsgrenze erreicht ist, wobei es hier große individuelle Unterschiede gibt, kommt es zu dem sogenannten Fettversagen mit einer Folgereaktion auf andere Insulin-sensitive Gewebe (Virtue und Vidal-Puig 2008). Als Folge gelangen freie Fettsäuren in die Zellen des Skelettmuskels, der Leber und des Pankreas, wo sie Schäden hervorrufen, wie z.B. eine Einschränkung der Insulinsensitivität, sekretorische Dysfunktion oder Apoptose (Robbins und Savage 2015). Dieser Prozess wird als Lipotoxizität bezeichnet. Als Reaktion auf den nun steigenden Blutglukosespiegel kommt es zu einer vermehrten Insulinausschüttung aus dem Pankreas und somit zur Hyperinsulinämie, was eine Herabregulation der Insulinrezeptoren auf den Zelloberflächen bedingt und zu einer Zunahme der Insulinresistenz führt. Da Insulin zudem adipogen wirkt, führt der erhöhte Insulinspiegel im Blut zu einer gesteigerten Fettspeicherung, sodass betroffene Personen weiter an Gewicht zunehmen. Die Erhöhung der Insulinproduktion führt längerfristig schließlich zu einer Schädigung des Pankreas, sodass dieses seiner Funktion gegebenenfalls nicht mehr nachkommen kann.

Neben den freien Fettsäuren verändern aus dem Fettgewebe sezernierte Adipokine, das Insulinsignal in z.B. Leber- und Muskelzellen. Eines dieser Adipokine ist das Adiponektin, welches scheinbar vor IR schützt und bei Adipositas-Patienten verringert ist. Trotz einer Fülle von Studien zu diesem Thema ist nicht umfassend geklärt, wie Zellen und Organismen insulinresistent werden (Kang *et al.* 2016).



### 1.2.2. Insulin-Signaltransduktion

Insulin übt seine anabole Wirkung auf Gewebe und Organe über den Insulinrezeptor und die darüber aktivierten intrazellulären Signalkaskaden aus. Der Insulinrezeptor gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und wird nach Bindung von Insulin phosphoryliert und dadurch aktiviert. Durch die Aktivierung werden wiederum verschiedene Signalwege in der Zelle initiiert und somit z.B. der Glukose- und Fettstoffwechsel, oder das Zellwachstum bzw. die Zellteilung beeinflusst.

Es existieren dabei zwei Signalwege, über welche Insulin seine Wirkung entfaltet. Zum einen kann die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) führen. Diese aktiviert Akt, was zu einer Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT4) zur Zellmembran von Skelettmuskel- bzw. Fettzellen führt. Dieser vermehrte Einbau von Glukosetransportern verbessert die Aufnahme der Glukose aus dem Blut in den beiden genannten Organen (Choi und Kim 2010). Daneben wird über die Aktivierung der PI3K die Glykogensynthese in der Leber aktiviert und die Glukoneogenese gehemmt, sodass es zu einem Aufbau der Glykogenspeicher in der Leber kommt (Cohen 2006), was ebenfalls den Blutglukosespiegel senkt.

Der zweite Signalweg, der über Insulin und dessen Rezeptor aktiviert wird, ist der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg. Innerhalb dieses Signalweges entfaltet Insulin seine Wirkung über die Aktivierung der *extracellular-signal regulated kinase* (Erk1/2), p38 oder die *Jun amino-terminal kinase* (JNK) auf das Zellwachstum. Es gibt Hinweise, dass eine übermäßige Aktivierung dieses Signalweges mit der IR assoziiert ist (Gehart *et al.* 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des MAPK-Signalweges bei T2D nicht verändert ist, was vermutlich die schädlichen Einflüsse der Hyperinsulinämie auf das zelluläre Wachstum in den Gefäßen ermöglicht (Cusi *et al.* 2000).

#### 1.2.2.1. Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Die Aktivierung und Inaktivierung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen werden in der Zelle streng über Proteinkinasen und Phosphatasen reguliert.

Die Signalübermittlung über Phosphorylierungen kann dabei durch Hormone, Wachstumsfaktoren aber auch elektrische Stimuli ausgelöst werden und führt zu einer Vielzahl von Zellantworten wie Proliferation, Migration, Wachstum, Differenzierung, Gentranskription, Apoptose und zu Veränderungen metabolischer Signalwege (Johnson und Lewis 2001). Die Phosphorylierung der Proteine findet an den OH-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin statt (Salton 2005). Die regulatorische Dephosphorylierung erfolgt über Phosphatasen wie Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) im Falle von Tyrosin. Es gibt eine enorme Vielfalt an PTPs, wobei die größte Klasse die Cystein-basierten PTPs der Klasse I ausmachen. Zu diesen zählen die 38 klassischen sowie 61 dualspezifische PTPs, welche nicht nur Phosphotyrosinreste, sondern auch Phosphoserin- und Phosphothreoninreste dephosphorylieren (Alonso *et al.* 2004). Darüber hinaus kann man die klassischen PTPs in zytosolische, transmembranäre und rezeptorähnliche PTPs unterscheiden. Zu den rezeptorähnlichen PTPs zählt z.B. die *Density-Enhanced Phosphatase-1* (DEP-1) (Tonks 2006).

Die Aktivität der PTPs kann über verschiedene Mechanismen wie der Expression, Ligandenbindung, Dimerisierung, Phosphorylierung und reversiblen Oxidation beeinflusst und damit reguliert werden (den Hertog *et al.* 2008). Unter pathologischen Zuständen können diese Mechanismen verändert sein. So konnte im Zusammenhang mit der IR und dem T2D in Tiermodellen und in Patienten eine erhöhte Expression bzw. Aktivität der PTPs PTP1B (Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B), LAR (*leukocyte antigen-related tyrosin phosphatase*) und SHP-2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) in metabolisch aktiven Geweben nachgewiesen werden (Ahmad *et al.* 1995, Ahmad und Goldstein 1995, Zabolotny *et al.* 2001).

#### 1.2.2.1.1. *Density-Enhanced Phosphatase-1 (DEP-1)*

DEP-1 wird ubiquitär exprimiert. Der Name wurde gewählt, da eine erhöhte DEP-1 Expression mit einer Zunahme der Zelldichte beobachtet wurde (Ostman *et al.* 1994). Es handelt sich bei DEP-1 um ein glykosyliertes Transmembranprotein mit einer intrazellulären katalytischen PTP-Domäne. Bisher wurde DEP-1 vor allem im Zusammenhang mit Tumoren als Tumorsuppressor untersucht (Keane *et al.* 1996, Balavenkatraman *et al.* 2006, Ostman *et al.* 2006). Neben dieser Beobachtung wurde DEP-1 zudem im Zusammenhang mit vaskulären Umbauprozessen und der Neointimabildung beschrieben (Kappert *et al.* 2007). Im Detail konnte für diese PTP bisher eine Interaktion mit mehreren RTKs wie dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Rezeptor (Lampugnani *et al.* 2006), *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor (Tarcic *et al.* 2009) und dem *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor (Kovalenko *et al.* 2000) nachgewiesen werden. Daher wird angenommen, dass DEP-1 eine regulatorischen Wirkung auf diese Signalkaskaden ausübt.

#### 1.2.2.2. **Regulation der Insulin-Signaltransduktion durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

Um regulatorisch auf die Signalweiterleitung wirken zu können, interagieren PTPs mit den phosphorylierten Tyrosinresten der Substrate aus der Signalkaskade. Dies erfolgt über ihre Bindungsdomäne und es folgt die Dephosphorylierung der Substrate. Auf diese Weise können PTPs z.B. als negative Regulatoren in die Insulinsignaltransduktion eingreifen und die Wirkung des Insulins abschwächen. Bisher konnten verschiedene PTPs identifiziert werden, die den aktivierten Insulinrezeptor bzw. das in der Insulin-Signaltransduktion unterhalb des Insulinrezeptors gelegene Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS1)-Protein dephosphorylieren. Dazu zählen PTP1B (Bandyopadhyay *et al.* 1997, Goldstein *et al.* 2000) und SHP-2 (Rocchi *et al.* 1996). In einem Mausmodell mit *knockout* von PTP1B konnte z.B. ein Anstieg der Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors und IRS-Proteins beobachtet werden, was zu einer verbesserten Insulinsensitivität führte (Elchebly *et al.* 1999). Darüber hinaus könnte DEP-1 eine ähnliche regulatorische Wirkung auf den Insulinrezeptor haben, da diese PTP bereits für die Dephosphorylierung eines Insulinrezeptor-ähnlichen Peptides beschrieben wurde (Walchli *et al.* 2000).

#### 1.2.3. **Überblick über generelle pharmako-therapeutische Möglichkeiten auf molekularer Ebene**

Als therapeutische Maßnahme können zelluläre Prozesse durch die Modulation entsprechender Zielmoleküle beeinflusst werden. Eine Möglichkeit stellt z.B. das Eingreifen auf Genexpressionsebene dar. Dabei wird nach Transkription der Desoxyribonukleinsäure (DNA; engl.: *deoxyribonucleic acid*) in

*messenger ribonucleic acid* (mRNA) diese als therapeutisches Ziel genutzt, indem sogenannte Antisense-Oligonukleotide (ASOs) entsprechend der Watson-Crick-Basenpaarung an die mRNA binden. Dadurch wird die Bindung von Ribosomen an die mRNA und damit Translation in ein funktionsfähiges Protein verhindert. Eine weitere Möglichkeit in zelluläre Prozesse einzugreifen stellt die Beeinflussung von bereits funktionsfähigen Proteinen durch Inhibierung oder Aktivierung dieser mittels pharmakologischer Wirkstoffe dar.

### 1.2.3.1. Klinische Therapieansätze bei Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes

Die Grundlage einer IR- bzw. Diabetes-Therapie stellt eine Umstellung der Lebensgewohnheiten im Hinblick auf die Ernährung und körperliche Aktivität dar. Vor allem bei übergewichtigen Diabetikern soll damit eine Gewichtsreduktion bei gleichzeitiger Verbesserung der Insulinsensitivität erreicht werden (Kelley *et al.* 1999, Mason *et al.* 2011). Erst wenn diese Umstellung nicht ausreicht, wird eine Therapie in der Regel mit Insulin oder oralen Antidiabetika begonnen.

Zurzeit finden Medikamente mit unterschiedlichen Wirkansätzen Anwendung in der Therapie der Insulinresistenz bzw. des Typ 2 Diabetes (Tahrani *et al.* 2016).

Insulinotrope Substanzen bewirken eine Freisetzung von Insulin aus der Bauchspeicheldrüse. Hierzu zählen Sulfonylharnstoffe (Rendell 2004) und Glinide (Blickle 2006). Die gleiche Wirkung, nur über einen anderen Mechanismus ausgelöst, zeigen die Inkretin-Mimetika und die Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4)-Inhibitoren (Kawanami *et al.* 2016).

Neben den insulinotropen Substanzen kommen nicht-insulinotrope Substanzen wie z.B. die  $\alpha$ -Glukosidasehemmer (van de Laar *et al.* 2005) bei der Behandlung des Diabetes zum Einsatz. Diese verzögern die Glukoseaufnahme aus dem Darm, indem sie die Spaltung von Kohlenhydraten verhindern, sodass dem Darm absorbierbare Glukose in reduziertem Maße zur Verfügung steht. Dies hat jedoch den Nachteil, dass Kohlenhydrate in den Dickdarm gelangen, wo sie von Bakterien mit entsprechenden Folgen verstoffwechselt werden. Auch die Gruppe der Biguanide, zu denen Metformin zählt, wird zur Therapie des Diabetes eingesetzt. Sie unterdrücken die hepatische Glukoneogenese und führen zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel (Turban *et al.* 2012). Der Vorteil dieser Behandlung liegt vor allem darin, dass es nicht zu - unter Umständen - lebensbedrohlichen Hypoglykämien kommen kann. Des Weiteren zählen zu den nicht-insulinotropen Substanzen die Glitazone. Die Aktivierung des nukleären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors gamma (PPAR $\gamma$ ) durch Glitazone (Rosiglitazon oder Pioglitazon) resultiert in der Transkription von mehreren insulinsensitiven Genen und fördert dadurch die Glukoseaufnahme (Weinstein *et al.* 1993, Ghanaat-Pour und Sjöholm 2009). Durch Aktivierung von PPAR $\gamma$  wird die Lipotoxizität in der Leber und dem Skelettmuskel durch eine erhöhte Fettspeicherung in den Adipozyten verringert. Zudem nimmt die Anzahl der Adipozyten zu, was zu einem Anstieg von Adiponektin und einer Reduzierung von Resistin und Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) führt. Über diese Wirkungen entfalten PPAR $\gamma$ -Agonisten ihre Insulin-sensitivierende Wirkung (Chakraborti 2015). Auch Inhibitoren für den Natrium/Glukose-Kotransporter 2 (SGLT2; engl.: *sodium-glucose cotransporter 2*) werden zur Behandlung des Diabetes eingesetzt, da sie über die Hemmung eines Transportproteins in der Niere die Glukose-Ausscheidung

über den Harn bedingen und somit dazu beitragen, den Blutglukosespiegel zu senken (Madaan *et al.* 2016).

Trotz der Vielzahl an Medikamenten zur Therapie der Insulinresistenz bzw. des Typ 2 Diabetes kommt es im klinischen Alltag möglicherweise zu Stoffwechselentgleisungen mit den entsprechend verknüpften Risiken. Daher ist es wünschenswert neue Behandlungsstrategien zu entwickeln, die ein sicheres und frühzeitiges Eingreifen in den Glukosestoffwechsel ermöglichen.

### 1.3. Definition der pulmonal arteriellen Hypertonie

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine Krankheit der kleinen Lungengefäße und ist definiert als ein mittlerer pulmonal arterieller Druck (mPAP, engl.: *mean pulmonary arterial pressure*) von  $> 25$  mmHg unter Ruhe, ein mittlerer Wedge-Druck (PCWP, *pulmonary capillary wedge pressure*, Verschlussdruck)  $\leq 15$  mmHg und ein pulmonaler Gefäßwiderstand (PVR, engl.: *pulmonary vascular resistance*)  $\geq 3$  Wood-Einheiten (Humbert *et al.* 2016). Betrachtet man die Lungengefäße histologisch, so kommt es bei PAH-Patienten, ähnlich wie bei atherosklerotischen Gefäßen, zur Intimaverdickung/Intimahyperplasie, Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen/medialer Hypertrophie, Verdickung der Adventitia, *in situ* Thrombose, inflammatorischen Veränderung und zu endothelialen plexiformen Läsionen (Archer und Rich 2000, Farber und Loscalzo 2004). Die Kombination aus endothelialer Dysfunktion und den Umbauprozessen, welche zu einer Verkleinerung des Lumen der Lungengefäße führt, bedingt schließlich den gegebenenfalls symptomatischen Blutdruckanstieg (Abbildung 1).

Im Zusammenhang mit den Gefäßumbauprozessen ist der Warburg Effekt wichtig, welcher häufig bei PAH-Patienten beobachtet wird (Assad und Hemnes 2015). Dabei handelt es sich um einen adaptiven Mechanismus in Form der anaeroben Glykolyse, welcher von schnell proliferierenden Zellen genutzt wird (z.B. Tumorzellen) und unaufhaltsames Wachstum ermöglicht (Archer *et al.* 2008). Die ATP-Produktion aus je einem Glukosemolekül fällt über die anaerobe Glykolyse sehr viel geringer aus als über die mitochondriale Atmung, scheint aber Vorteile zu haben, solange die Glukoseverfügbarkeit nicht limitiert ist (Vazquez *et al.* 2010).

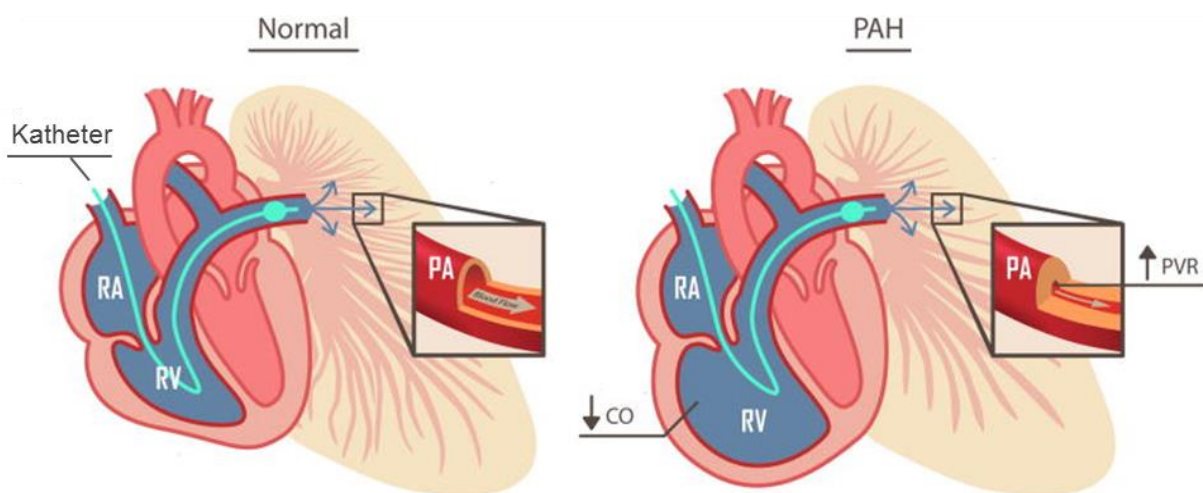
Sekundär kommt es durch den erhöhten Blutdruck in den Lungengefäßen zu einer Veränderung des rechten Ventrikels (Rechtsherzinsuffizienz; Abbildung 1), welche mit Symptomen wie Kurzatmigkeit, Flüssigkeitsretention und Ödemen in den unteren Extremitäten einhergeht. Dieser Effekt auf den rechten Ventrikel des Herzens resultiert aus einer Zunahme der Nachlast bzw. des pulmonalen Widerstandes. Der rechte Ventrikel ist dafür ausgelegt, Blut durch ein vaskuläres System mit niedrigem Druck bei hohem Durchfluss zu pumpen. Die vier bis sechs Liter Blut, die pro Minute vom Herzen zur Lunge gepumpt werden, verteilen sich auf eine Oberfläche der Größe eines Tennisfeldes ( $\sim 260$  m<sup>2</sup>) um einen effizienten Gasaustausch zu gewähren. Deshalb ist der rechte Ventrikel so konzipiert, dass er ein großes Blutvolumen fasst (Vorlast), welches er gegen einen geringen Widerstand auswirft (geringe Nachlast) (Lai *et al.* 2014).

Sinkt der Durchmesser der pulmonalen Gefäße, so kommt es zu einem fortschreitenden Anstieg des pulmonalen Widerstandes, was wiederum zu einem Anstieg des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes führt. Mit dem progressiven Anstieg des pulmonalen Widerstandes kommt es zur Vergrößerung der

Kardiomyozyten, zu Veränderungen der Phosphorylierungsmuster kontraktile Proteine, zu kardialer Fibrose und gegebenenfalls zu einer ventrikulären Dekompensation (Michelakis *et al.* 2008, Walker *et al.* 2011, Michelakis 2014). Diese Veränderungen können schlussendlich in einem Rechtsherzversagen münden, was die Haupttodesursache bei PAH-Patienten darstellt (Vonk Noordegraaf und Galie 2011).

Die für dieses Krankheitsbild charakteristische Dyspnoe (Kurzatmigkeit) entsteht in erster Linie durch den limitierten kardialen Auswurf und nicht wegen eines verschlechterten Gasaustausches; die Sauerstoffwerte im Blut fallen in der Regel erst bei sehr schweren Fällen der PAH (Lai *et al.* 2014).

Bei fortschreitender Rechtsherzinsuffizienz kann schließlich auch die diastolische Füllungs- und Auswurfphase beeinträchtigt sein, da es zu einer Verschiebung des Septums kommt, was die Füllung und das Volumen des linken Ventrikels beeinträchtigt (Lai *et al.* 2014).



**Abbildung 1: Veränderungen der Lungengefäße und des Herzens bei Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie (PAH)**

Unter physiologischen Bedingungen wirft der rechte Ventrikel des Herzens ein großes Volumen gegen einen geringen Widerstand in den Lungen aus (A). Durch die Verdickung der Lungengefäße mit der daraus resultierenden Verringerung des Lumendurchmessers (B), kommt es bei PAH-Patienten zu einem erhöhten Gefäßwiderstand (PVR, engl.: pulmonary vascular resistance) in den Lungengefäßen, sodass der rechte Ventrikel das Blut mit höherem Druck auswirft. Um dies zu gewährleisten resultiert wie in B) dargestellt eine Rechtsherzhypertrophie (modifiziert nach Lai *et al.*, 2014). (RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel, PA: Pulmonalarterie)

### **Rechtsherzkathetermessung**

Das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie wurde das erste Mal im Jahr 1891 durch von Romberg anhand der sklerotischen Veränderungen der Lungengefäße beschrieben (Michelakis 2014). 60 Jahre später (1951) wurde die erste umfassende Beschreibung dessen veröffentlicht, was heutzutage als pulmonale Hypertonie bezeichnet wird (Dresdale *et al.* 1951). Dies war unter anderem daher möglich, das Werner Forssmann 1929 in einem Selbstversuch erstmals eine Herzkathetermessung beim Menschen durchführte. Dazu nutzte er einen Ureter-Katheter und führte diesen über seine Armvene (antecubitale Vene) mit Hilfe einer Röntgenmaschine und einem Spiegel zu seinem rechten Atrium (ForssmannFalck 1997).

Heutzutage wird die Rechtsherzkatheter-Untersuchung zur Diagnose der PAH unter sterilen Bedingungen in einem entsprechenden Katheterlabor durchgeführt. Nach Punktion einer großen Vene in der Leiste, der Ellenbeuge oder am Hals wird ein spezieller Katheter unter Zuhilfenahme eines bildgebenden Verfahrens (Röntgenkontrolle) über das Gefäß zum rechten Vorhof und die rechte Herzkammer in die Pulmonalarterie geführt. Dort findet die Druckmessung sowie Entnahme von Blutproben zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes statt. Nach der Untersuchung wird die Einstichstelle komprimiert und ein Druckverband angelegt.

### **1.3.1. Einteilung der pulmonalen Hypertonie**

Der Begriff pulmonale Hypertonie (PH) umfasst alle Krankheiten, die durch einen Anstieg des Gefäßwiderstandes und einem daraus resultierenden Anstieg des Blutdruckes im Lungenkreislauf gekennzeichnet sind. Nach der NICE-Klassifikation wird die PH entsprechend ihres Auslösers in fünf Subgruppen unterteilt (Simonneau *et al.* 2013).

Gruppe 1) pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

Gruppe 2) PH durch Krankheiten des linken Herzens

Gruppe 3) PH durch Lungenkrankheiten und/oder Hypoxie

Gruppe 4) chronisch thromboembolische PH (CTEPH)

Gruppe 5) PH durch unbekannte/multifaktorielle Mechanismen

Für die Fragestellung dieser Arbeit spielt die Gruppe 1, also die PAH, die entscheidende Rolle, weshalb auf diese Gruppe im Folgenden genauer eingegangen wird. Zur Gruppe der PAH gehören sowohl Patienten mit idiopathischer als auch hereditärer (vererbter) PAH (HPAH). Daneben kann die PAH auch durch Drogen oder Toxine ausgelöst werden oder mit einer HIV (humanes Immundefizienz-Virus)-Infektion, Bindegewebserkrankung, portaler Hypertonie, angeborenem Herzfehler oder Schistosomiasis assoziiert sein (Rosenkranz 2015). Es handelt sich bei PAH-Patienten aufgrund dieser differenziellen Ätiologie sowie weiteren geschlechtsspezifischen und prognostischen (Mortalität/Überleben) Unterschieden um eine sehr heterogene Patientengruppe (Maarman 2013).

### **1.3.2. Inzidenz, Prävalenz und Mortalität der PAH**

Im initialen NIH (*National Institute of Health*) Register, bei dem Patientendaten in einem Zeitraum von 1981 bis 1982 erfasst wurden, war das mittlere Alter der Patienten bei Diagnose der PAH  $36 \pm 15$  Jahren (Rich *et al.* 1987, Dalonzo *et al.* 1991). Heutzutage wird auch immer häufiger bei älteren Patienten eine PAH festgestellt, sodass das mittlere Alter in den aktuellen Registern nun zwischen  $50 \pm 14$  Jahren und  $65 \pm 15$  Jahren liegt (Humbert *et al.* 2010a, Hoepfer *et al.* 2013). Neben dem höheren Bewusstsein für diese Krankheit und damit häufigerer Diagnosestellung, spielt vermutlich zusätzlich der demographische Wandel eine entscheidende Rolle für den Anstieg des Alters bei Diagnose.

Die mittlere Überlebenszeit für IPAH (idiopathische PAH) wird aus den Daten des prospektiven US-Registers für die primäre PAH mit 2,8 Jahren ohne Behandlung angegeben (Dalonzo *et al.* 1991). Es gab in den letzten zwei Jahrzehnten einige Fortschritte in der symptomatischen Behandlung mit Medikamenten, die an den der PAH zugrundeliegenden Mechanismen ansetzen (McLaughlin *et al.*

2009, Taichman *et al.* 2014). Diese Fortschritte in der Behandlung resultierten in einer Verbesserung der Lebensqualität sowie Überlebenszeit nach Diagnosestellung.

Das NIH Register dokumentiert eine Mortalitätsrate von 50 % in den ersten drei Jahren nach Diagnosestellung. In den neueren Registern wurden Mortalitätsraten von 20 % nach drei Jahren (Frankreich) und von 30 % nach drei Jahren (USA) beobachtet. Diese Verbesserung der Mortalität ist allerdings nicht vollständig auf eine verbesserte Therapie zurückzuführen, sondern resultiert vermutlich zum Teil auch aus einem Einschluss von Patienten mit weniger stark ausgeprägter PAH (Lai *et al.* 2014).

Die Inzidenz bzw. Prävalenz der PAH liegt bei 2,4 bzw. 15 Fällen je Million Erwachsene in dem französischen Register (Humbert *et al.* 2006) und 2,3 bzw. 12,4 Fälle je Millionen Erwachsene im US Register (Badesch *et al.* 2010). Damit zählt die PAH definitionsgemäß zu den seltenen Krankheiten.

Trotz einer Verbesserung der Lebensqualität und Lebensspanne gibt es bisher keine Heilung der PAH und die Mortalität bleibt weiterhin sehr hoch (5–10 % pro Jahr) (Rosenkranz 2015).

### **Geschlechtsabhängigkeit der PAH**

Weibliche PAH-Patienten haben bei gleichen hämodynamischen Messwerten ein zirka 18 % geringeres Mortalitätsrisiko als männliche Patienten. Obwohl die PAH sich bei Männern und Frauen jeden Alters entwickeln kann, tritt sie häufiger bei Frauen auf, wobei ein Frau-zu-Mann-Quotient von 1,9 : 1 im französischen Register (Humbert *et al.* 2006) und ein 4,1 : 1 Quotient im REVEAL-Register (registry to evaluate early and long-term PAH disease management; USA) beobachtet wurde (Badesch *et al.* 2010, Benza *et al.* 2010).

Die Bedeutung von Östrogenen bei der Entstehung, Schwere und Behandlung der PAH ist noch nicht hinreichend definiert. Die bisherigen Daten sind in sich nicht schlüssig bzw. sogar paradox. So erkranken häufiger Frauen an idiopathischer PAH als Männer und auch das Auftreten einer PAH durch eine BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor type 2*)-Mutation kommt häufiger bei weiblichen Mitgliedern einer Familie vor. Auf der anderen Seite zeigte jedoch eine Therapie mit 2-Methoxyestradiol in Ratten einen protektiven Effekt auf die Entstehung der PAH (Tofovic *et al.* 2005).

### **1.3.3. Entstehung der PAH**

Die pulmonale Zirkulation unterscheidet sich von der systemischen durch einen hohen Durchfluss bei geringem Druck und geringem Widerstand. Pulmonale Arterien werden in elastische und muskularisierte unterschieden. Die elastischen Arterien sind dabei schon bei geringen Drücken sehr dehnbar. In der Lunge findet man mit Abnahme der Größe der Arterien weniger elastische und entsprechend mehr muskularisierte Arterien, sodass bei einer Arteriengröße von 100 bis 500 µm ausschließlich muskularisierte Arterien vorliegen. Somit sind diese kleinen Gefäße die größten Steuerelemente der Vasokonstriktion und damit des Widerstandes. Die alveolare Sauerstoffanreicherung, die Wasserstoffionen-Konzentration, Stickstoffmonoxid (NO) und die adrenerge Stimulation sind wichtige Regulatoren des pulmonal-vaskulären Widerstandes und des Durchflusses (Sharma *et al.* 2014). Kommt es zu einer Störung dieser Prozesse, so steigt der Widerstand und damit der Druck in den pulmonalen Gefäßen. Möglicherweise wird die Entstehung der PAH zudem durch Tumor-ähnliche bzw. metabolische Umbauprozesse gefördert, die nicht nur die

pulmonalen Gefäße, sondern auch andere Organe, wie vermutlich den rechten Ventrikel, den Skelettmuskel und das Knochenmark betreffen (Paulin und Michelakis 2014). So könnte eine Veränderung der Mitochondrien in pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen intrazelluläre Signalwege verändern und so zu einer Resistenz dieser Zellen gegenüber Apoptose sowie Hyperproliferation führen. Außerdem gibt es Hinweise auf eine verringerte Glukoseoxidation zugunsten einer erhöhten Glykolyse (Dromparis und Michelakis 2013) – ein Zustand, wie man ihn von Tumorzellen bereits kennt und welcher, wie oben beschrieben, als Warburg Effekt bezeichnet wird (Vander Heiden *et al.* 2009).

### **1.3.3.1. Mechanismen der PAH-Entstehung**

Eine der Hauptursachen der PAH besteht in einem Ungleichgewicht zwischen Vasodilatoren (NO, Prostazyklin) (Giaid and Saleh 1995) und Vasokonstriktoren (Endothelin-1) (Giaid *et al.* 1993) und im zweiten Schritt durch daraus resultierende Veränderungen der zellulären Proliferation. Bisherige pharmakologische Therapien adressieren daher diese 3 Signalwege (A–C) mit mehr als zehn zugelassenen Wirkstoffen (Michelakis 2014, Rosenkranz 2015).

#### ***Drei Hauptmechanismen der PAH-Entstehung***

##### **A) NO**

Die PAH ist mit einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit assoziiert, was zu einer erhöhten Vasokonstriktion und Zellproliferation führt (Giaid and Saleh 1995). Nach Freisetzung des gebildeten NOs als Antwort auf die Aktivierung der Koagulationskaskade und durch Scherbelastung kommt es über die Produktion von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen (Brady *et al.* 1998, Mingone *et al.* 2003). Neben hämodynamischen Effekten inhibiert NO zudem die Plättchenaktivierung und wirkt auf der Oberfläche der Endothelzellen antithrombotisch. Außerdem hat NO einen antiproliferativen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen, wirkt so Wachstumsfaktoren entgegen und ist damit in Gefäßumbauprozesse und Angiogenese involviert (Balasubramaniam *et al.* 2006, Gien *et al.* 2007).

##### **B) Prostazyklin**

Ein in Endothelzellen produzierter Vasodilatator ist Prostazyklin. Beim PAH-Patienten sind Prostazyklin selbst sowie dessen Rezeptor und Synthese reduziert (Christman *et al.* 1992, Tudor *et al.* 1999). Die Bindung von Prostazyklin an seinen entsprechenden Rezeptor auf glatten Gefäßmuskelzellen führt zur Relaxation bzw. Vasodilatation. Innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen wird dazu die Adenylatzyklase aktiviert, wodurch es zu einem Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosin-Monophosphat (cAMP)-Spiegels kommt, was wiederum zu einer Aktivierung der Proteinkinase A führt (Lai *et al.* 2014). Über genau denselben Weg unterbindet Prostazyklin zudem die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Clapp *et al.* 2002) und inhibiert die Plättchenaggregation (Moncada *et al.* 1977). Des Weiteren führt dieser Mechanismus zu anti-inflammatorischen (Zhou *et al.* 2007) und anti-thrombotischen Effekten (Pawlak *et al.* 1998).

##### **C) Endothelin-1**

Eines der effektivsten bekannten vasokonstriktorisches Moleküle stellt das Endothelin-1 dar (Yanagisawa *et al.* 1988). Es wird auf der Zellmembran von Endothelzellen aus einem Vorläuferprotein



gebildet (Yanagisawa *et al.* 1988). Endothelin-1 wirkt über zwei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>) auf glatte Gefäßmuskelzellen und führt zur Vasokonstriktion, Proliferation, Migration sowie zu fibrotischen Veränderungen. Neben dem Vorkommen von Endothelinrezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen findet man den ET<sub>B</sub>-Rezeptor zudem auch auf Endothelzellen. Hier führt die Aktivierung durch Endothelin-1 hingegen anders als bei glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Vasodilatation, indem die NO- und Prostazyklinproduktion erhöht werden. Zudem wirkt Endothelin-1 auf Endothelzellen anti-proliferativ. ET<sub>B</sub>-Rezeptoren werden auf Endothelzellen beim Fortschreiten der PAH geringer exprimiert, wohingegen die Expression der ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen zunimmt, sodass es zu einer Verstärkung der vasokonstriktorischen Wirkung von Endothelin-1 kommt (Lai *et al.* 2014).

Neben diesen 3 Mechanismen gibt es weitere Signalwege und Veränderungen, die im Zusammenhang mit der Entstehung bzw. Progression der PAH beobachtet wurden und die nachfolgend skizziert werden.

### **Weitere Mechanismen der PAH-Entstehung**

#### **ROS**

Neben dem Ungleichgewicht der Vasokonstriktion und –dilatation spielen oxidative Enzyme eine Rolle, welche reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren. Dazu gehören unter anderem NADPH Oxidasen (Nox), Xanthine, Aldehydoxidase (eine ausgekoppelte eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase)) und die mitochondriale Dysfunktion (Tabima *et al.* 2012, Suzuki *et al.* 2013). Eine erhöhte Produktion an ROS ist mit einer endothelialen Dysfunktion und der daraus resultierenden Entstehung der PAH assoziiert (Grobe *et al.* 2006).

Für Superoxid-produzierende Nox-Enzyme konnte gezeigt werden, dass diese unter Hypoxie an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion sowie dem vaskulären *Remodeling* beteiligt sind (Fresquet *et al.* 2006, Mittal *et al.* 2007). Außerdem gibt es Hinweise, dass von Nox produzierte Superoxide die Entkoppelung des Enzyms eNOS induzieren, was zu einer Beeinflussung des NO-Signalweges führt (Landmesser *et al.* 2003).

Ein weiteres ROS-produzierendes Enzym stellt die Xanthin-Oxidase (XO) dar. Unter normalen Bedingungen katalysiert die XO die zwei finalen Schritte der Degradation von Purinen. Unter hypoxischen oder inflammatorischen Bedingungen hingegen führt dieses Enzym zur Produktion von Superoxid und Wasserstoffperoxid (Lai *et al.* 2014).

Auch Mitochondrien produzieren ROS, wobei dies bereits unter normalen Bedingungen im Zusammenhang mit einem aeroben Stoffwechsel stattfindet. Unter Hypoxie ist die ROS-Freisetzung aus den Mitochondrien der glatten Gefäßmuskelzellen jedoch erhöht, was zur Vasokonstriktion führt (Waypa *et al.* 2013). Insgesamt kommt es bei PAH-Patienten zu einer veränderten mitochondrialen Funktion, was mit einer verstärkten zellulären, glykolytischen Aktivität einhergeht. Dies legt insgesamt eine Rolle der mitochondrialen Dysfunktion bei der Entstehung der PAH nahe (Lai *et al.* 2014).

#### **Hypoxie**

Bei lokaler Hypoxie in den pulmonalen Gefäßen kommt es zur Vasokonstriktion und zur Bildung von Umgehungskreisläufen um das hypoxische Gebiet herum, um die Durchblutung des Totraums zu

verhindern sowie die Perfusion (Durchblutung) in Verbindung mit Ventilation (Belüftung=Gasaustausch) zu verbessern (Sharma *et al.* 2014). Dies stellt eine weitere Besonderheit der pulmonalen Gefäße dar, da Gefäße des systemischen Kreislaufes unter Hypoxie dilatieren und nicht wie die pulmonalen Gefäße kontrahieren (Weir *et al.* 2005). Chronische Hypoxie kann dabei zu einem dauerhaft erhöhten pulmonal-arteriellen Widerstand, vaskulärem *Remodeling* und schließlich Entstehung einer PAH führen (Sharma *et al.* 2014).

Die PAH entsteht in diesem Fall durch Wachstumsfaktoren-bedingte strukturelle Umbauprozesse (vaskuläres *Remodeling*). In diesem Prozess besitzen Endothelzellen eine veränderte Durchlässigkeit, produzieren inflammatorische Zytokine und sind durch eine veränderte Proteinsynthese gekennzeichnet. In den Endothelzellen steigt unter Hypoxie z.B. die Produktion von VEGF an (Sharma *et al.* 2014).

### **Adrenerge Rezeptoren**

Der vaskuläre Tonus der pulmonalen Gefäße wird zudem über  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren reguliert. Dabei führt eine übermäßige Stimulation der  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren zur Kontraktion, Proliferation und dem Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen.

### **Inflammation**

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass die Inflammation an der Entstehung der PAH beteiligt ist. So sind zirkulierende inflammatorische Marker in Patienten mit PAH erhöht (Humbert *et al.* 1995). Beispielsweise befinden sich vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine in der Zirkulation, welche zur Migration und Proliferation von Zellen in den Gefäßwänden von PAH-Patienten beitragen (Dorfmueller *et al.* 2002, Hassoun *et al.* 2009).

Die pathologischen Veränderungen, die zur Entstehung der PAH führen, resultieren sehr wahrscheinlich aus einer Summe von verschiedenen Einflüssen und einer genetischen Prädisposition.

### **Genetische Ursachen**

Veränderungen in den pulmonalen Gefäßen können auch genetische Ursachen haben. So kann die PAH autosomal dominant vererbt werden, was jedoch seltener auftritt als Spontanmutationen. Die hereditäre PAH (HPAH) führt dabei schon in jungen Jahren zu Symptomen und schließlich zu einem frühen Tod (Lai *et al.* 2014). Bei der HPAH handelt es sich oft um eine Mutation im BMPR2-Gen (Lane *et al.* 2000). Bisher wurden 144 verschiedene solcher BMPR2-Mutationen bei PAH-Patienten gefunden (Machado *et al.* 2006). Ein Verlust von BMPR2 in Endothelzellen der Pulmonalarterie führt zu einer erhöhten Apoptose dieser Zellen, was wiederum in einer endothelialen Dysfunktion und damit in einer PAH resultieren kann (Teichert-Kuliszewska *et al.* 2006).

Plexiforme Läsionen werden häufig in Patienten mit einer schweren Form der PAH gefunden (Tuder *et al.* 1994). Zudem geht eine endotheliale Zellapoptose in der frühen Phase der PAH mit einem Verlust der kleinen Pulmonalarterien einher (Lai *et al.* 2014).

### 1.3.3.2. Derzeitig zugelassene Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der PAH

Die Hauptklassen der im Moment in den USA und Europa zugelassenen Medikamente zur Behandlung der PAH sind Phosphodiesterase Typ 5 Inhibitoren (PDE-5i), Endothelinrezeptor-Antagonisten (ERAs) und Prostanoiden, sowie die kürzlich zugelassenen löslichen Guanylatzyklase-Agonisten, Imatinib als PDGF-Rezeptor Inhibitor und für die wenigen Patienten die darauf reagieren Kalziumkanalblocker (Abbildung 2). Im Folgenden werden diese Medikamentenklassen näher erläutert.

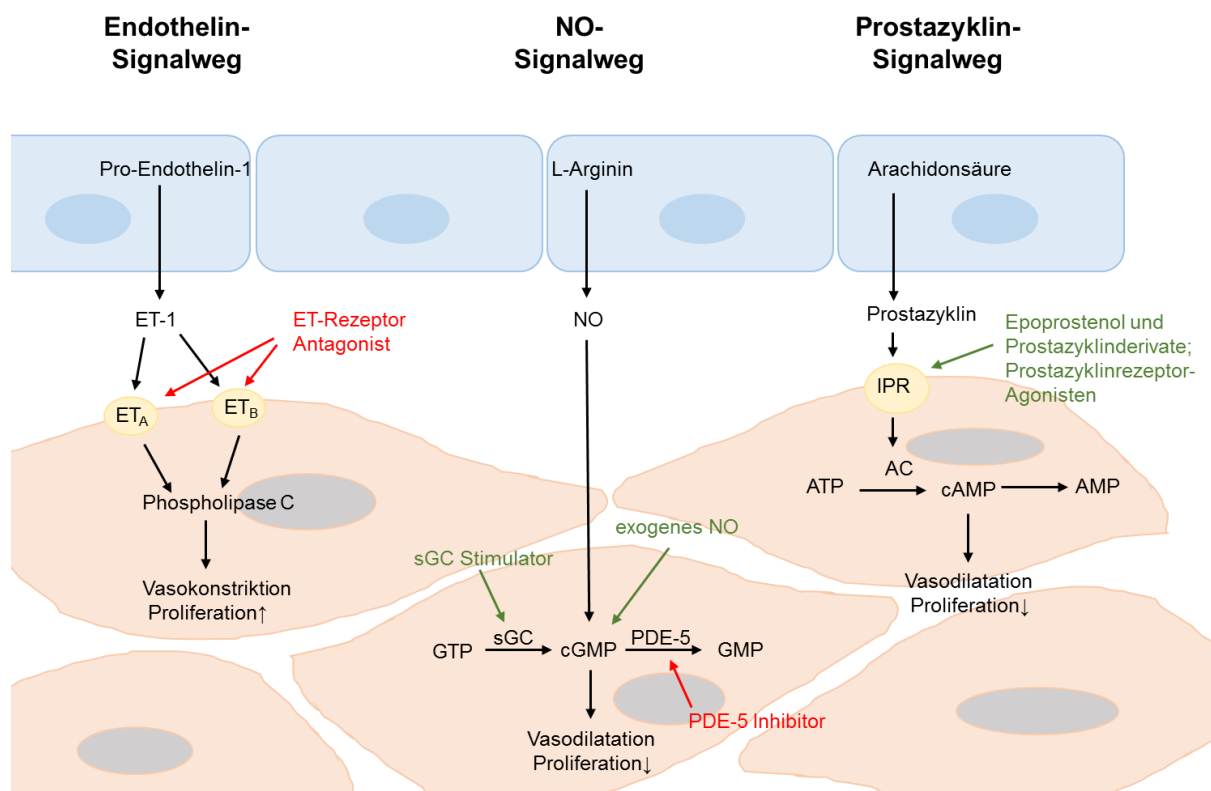
Die Gruppe der Endothelinrezeptor-Antagonisten zeigte in mehreren Studien eine Verbesserung der klinischen Symptome der PAH hinsichtlich körperlicher Leistungsfähigkeit und hämodynamischer Parameter (Channick *et al.* 2001, Galie *et al.* 2008a, Galie *et al.* 2008b). Als Vertreter dieser Substanzklasse sind aktuell Ambrisentan, Bosentan und Macitentan zur Therapie von PAH-Patienten zugelassen. Da Bosentan lebertoxisch wirken kann, muss bei Patienten mit dieser Therapie ein regelmäßiges Monitoring der Leberfunktion durchgeführt werden (Lai *et al.* 2014).

Prostanoiden führten in klinischen Studien zu einer verbesserten körperlichen Leistungsfähigkeit und reduzierten die Symptome der PAH (Rubin *et al.* 1990, Galie *et al.* 2002, Simonneau *et al.* 2002). Die Behandlung mit dem Prostanoid Epoprostenol führte in einer randomisierten Studie neben der Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit, des pulmonalen Gefäßwiderstandes und des kardialen Auswurfes darüber hinaus zu einer verringerten Mortalität (Barst *et al.* 1996). Die Nachteile dieser Therapie liegen jedoch in der geringen Stabilität von Epoprostenol, dem Bedarf der Dauerinfusion und den damit verbundenen hohen Kosten (Lai *et al.* 2014). Zurzeit sind neben Epoprostenol zudem die Prostanoiden Beraprost, Iloprost und Treprostinil zur PAH-Therapie zugelassen.

Die Gruppe der PDE-5-Inhibitoren (PDE5i) umfasst unter anderem Sildenafil und Tadalafil, welche durch Hemmung der PDE-5 den Abbau von cGMP reduzieren und so zu einer Verstärkung des NO-Signalweges mit entsprechender Verstärkung der Vasodilatation führen. In insgesamt fünf randomisiert kontrollierten Studien konnte eine vorteilhafte Wirkung von Sildenafil in PAH-Patienten im Hinblick auf die körperliche Aktivität, Symptome und hämodynamische Parameter nachgewiesen werden (Sastry *et al.* 2004, Singh *et al.* 2006). Für Tadalafil konnten ähnliche Effekte gezeigt werden (Galie *et al.* 2009).

Ein neu zugelassener Wirkstoff zur PAH-Therapie gehört zur Gruppe der löslichen Guanylatzyklase-Agonisten und heißt Riociguat. Mittels Riociguat wird die cGMP-Produktion (zyklisches Guanosin Monophosphat) erhöht, indem es die lösliche Guanylatzyklase NO-unabhängig stimuliert. Außerdem erhöht Riociguat die Sensitivität von sGC (lösliche Guanylatzyklase; engl.: *soluble guanylate cyclase*) gegenüber endogenem NO (Evgenov *et al.* 2006). Auf diese Weise führt die Behandlung mit Riociguat über eine Vasorelaxation zu einer Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit, Hämodynamik und Verzögerung des Voranschreitens der PAH (Ghofrani *et al.* 2013).

Nach neuen Studien zeigen sich Kombinationstherapien als noch erfolgreicher gegenüber Monotherapien im Hinblick auf Morbidität und Mortalität (Galie *et al.* 2015). So wird zum Beispiel die Kombination Tadalafil (PDE5i) und Ambrisentan (ERA) empfohlen (Galie *et al.* 2016). Bei sehr schweren Formen der PAH sind zudem Dreifachkombinationen wie Epoprostenol, Bosentan und Sildenafil vorteilhaft (Sitbon *et al.* 2014). Im Falle der IPAH wird zudem eine anti-koagulatorische Behandlung angeraten, die jedoch bei den anderen PAH-Formen keine Überlebensvorteile gezeigt hat (Rosenkranz 2015).



**Abbildung 2: Mechanismen der Vasokonstriktion und -dilatation in pulmonalen Gefäßen, die als Ansatzpunkt der PAH-Therapie dienen (rot: inhibitorische Wirkmechanismen, grün: aktivierende/stimulierende Mechanismen).**

Abkürzungen: AC: Adenylatzyklase; AMP: Adenosinmonophosphat; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: zyklischen Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; ET: Endothelin; ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>: Endothelinrezeptoren; GMP: Guanosinmonophosphat; GTP: Guanosintriphosphat; IPR: Prostazyklinrezeptor; NO: Stickstoffmonoxid; PDE-5: Phosphodiesterase-5; sGC: zyklische Guanylatzyklase

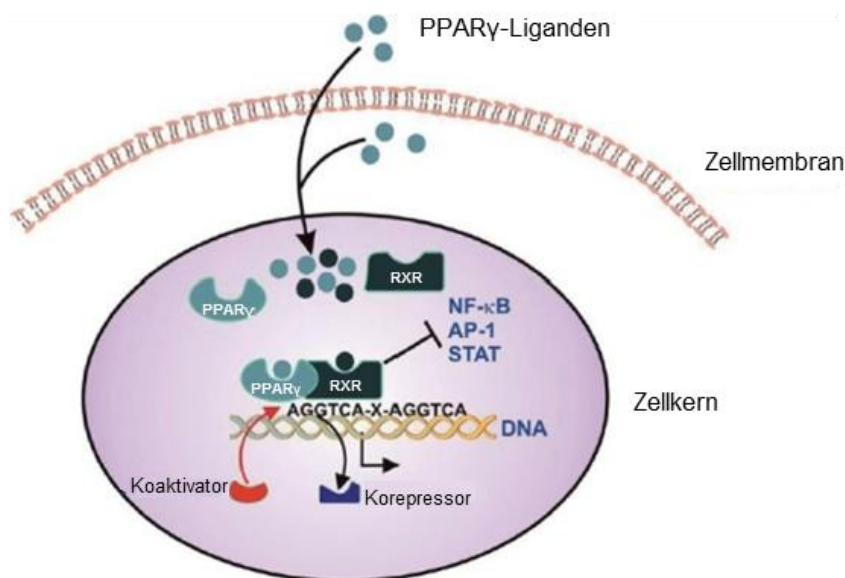
Neben diesen Therapiemöglichkeiten, die auf eine Verbesserung der Vasodilatation pulmonaler Gefäße abzielen, gibt es auch die Möglichkeit der Imatinib-Therapie, welche auch bei chronisch myeloischer Leukämie angewendet wird. Dabei handelt es sich um einen oral verfügbaren PDGF-Rezeptor-Inhibitor. Damit stellt diese Therapie die einzige bisher zugelassene dar, die dem pulmonalen Gefäßumbauprozess entgegenwirkt, indem durch die Inhibition des PDGF-Rezeptors die Proliferation und Migration pulmonaler glatter Gefäßmuskelzellen verringert wird (Perros *et al.* 2008).

Trotz dieser Fortschritte in den Behandlungsmöglichkeiten liegt die Mortalitätsrate der PAH-Patienten bei 10–15 % mit einer mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von nur sechs bis sieben Jahren (Humbert *et al.* 2010b, Benza *et al.* 2012). So zeigen PAH-Patienten und beispielsweise Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs eine ähnliche Mortalitätsrate, wobei die Therapiekosten für PAH-Patienten deutlich höher liegen (ohne die Kosten von Transplantationen einzubeziehen). Die Funktion des rechten Ventrikels ist dabei als der kritischste Parameter für die Morbidität/Mortalität bei PAH-Patienten anzusehen (Michelakis 2014).

### 1.3.3.3. Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR)

Ein mögliches neues Zielmolekül zur Behandlung der PAH stellt PPAR $\gamma$  dar, welches als intrazellulärer Rezeptor und Liganden-induzierbarer Transkriptionsfaktor fungiert (Evans *et al.* 2004). PPAR $\gamma$  befindet sich in der Signalkaskade unterhalb von BMPR2, einem Rezeptor, dessen Mutationen dafür bekannt sind, mit der PAH assoziiert zu sein (siehe 1.3.3.1). Über diesen Signalweg werden inhibitorische Effekte von BMP auf die PDGF-induzierte Proliferation der pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt (Hansmann *et al.* 2008).

Im menschlichen Organismus kommen neben PPAR $\gamma$  zwei weitere Formen von PPARs vor: PPAR $\alpha$  und PPAR $\beta$ . Diese drei Isoformen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer lokalen Expression, sondern vor allem auch in Hinblick auf die von ihnen beeinflussten Genexpressionsmuster (Komar 2005). Sie alle binden, wie in Abbildung 3 für PPAR $\gamma$  dargestellt, nach Aktivierung den Retinoidrezeptor X (RXR). In Form eines Heterodimers binden sie eine spezifische DNA-Sequenz, das PPAR-responsive regulator element (PPRE). Dieses besteht aus einer sich wiederholenden hexameren Sequenz (AGGTCA), welche durch je ein Nukleotid getrennt wird (Green *et al.* 2011). Auf diese Weise wird die Expression einer Vielzahl von Genen der Adipogenese, des Lipidstoffwechsels, der Inflammation und der metabolischen Homöostase reguliert (Ahmadian *et al.* 2013). PPARs werden durch Nahrungsfette wie Öl-, Linol- und Linolensäure sowie 15-Deoxy-Delta-12,14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2) und oxidierten Phospholipiden aktiviert (Forman *et al.* 1995, Forman *et al.* 1997). Trotz vieler Gemeinsamkeiten zwischen den PPARs üben sie sehr unterschiedliche Funktionen aus. Dies ist möglich, da sie in verschiedenen Geweben vorkommen, durch unterschiedliche Liganden aktiviert werden und sich hinsichtlich biochemischer Eigenschaften unterscheiden.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der PPAR $\gamma$ -vermittelten Genregulation.**

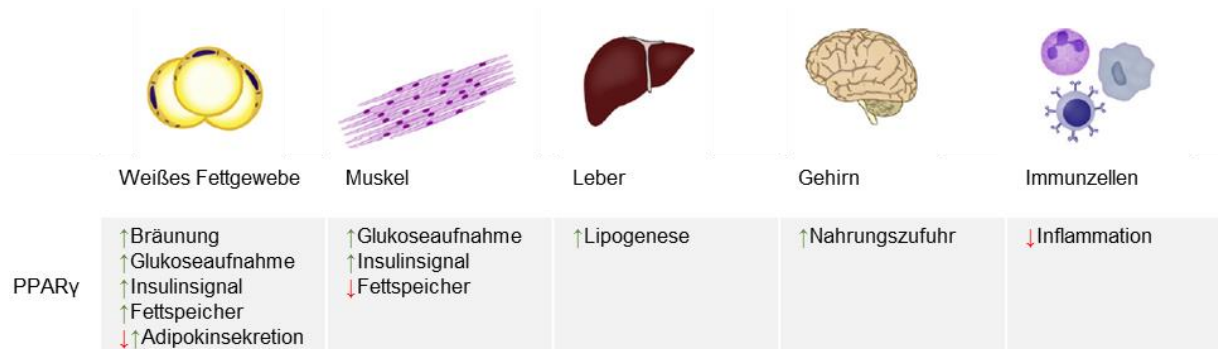
Die PPAR $\gamma$ -Liganden binden an den PPAR $\gamma$ -Rezeptor, was zur Heterodimer-Bildung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) führt. Dieses Heterodimer bindet anschließend das PPAR response element (PPRE), was über Rekrutierung von Koaktivatoren bzw. Entfernen von Korepressoren zu einer veränderten Genexpression führt (Abbildung modifiziert nach Green *et al.*, 2011). (AP-1: activator protein 1; NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B; RXR: Retinoidrezeptor X; STAT: signal transducer and activator of transcription)

PPAR $\alpha$  kommt vorrangig in der Leber, dem braunen Fettgewebe und dem Herzen vor. Nach Aktivierung ist dieser Transkriptionsfaktor maßgeblich an der Regulation von Signalwegen der Fettsäureoxidation beteiligt. PPAR  $\delta$  /  $\beta$  übt ähnliche Funktionen aus wie PPAR $\alpha$ . PPAR $\beta$  wird ubiquitär, verstärkt jedoch in metabolisch aktiven Geweben wie dem Skelettmuskel, der Leber und dem Herzgewebe exprimiert (Ahmadian *et al.* 2013).

PPAR $\gamma$  wird hauptsächlich im weißen und braunen Fettgewebe exprimiert und wurde ursprünglich als induzierender Faktor der Adipozytendifferenzierung beschrieben (Barak *et al.* 1999). Durch weitere Untersuchungen konnte diesem Transkriptionsfaktor auch eine Rolle bei der Regulation von adipogenen und lipogenen Stoffwechselwegen und bei der Adipogenese zugeschrieben werden. Außerdem ist PPAR $\gamma$  ein Modulator des Fettstoffwechsels im gesamten Körper sowie der Insulinsensitivität (Evans *et al.* 2004, Tontonoz und Spiegelman 2008). Dazu beeinflusst PPAR $\gamma$  Gene, die an der Glukosehomöostase beteiligt sind, wie die Expression von GLUT4. Des Weiteren reguliert PPAR $\gamma$  die Freisetzung von Zytokinen und Lipokinen aus dem Fettgewebe wie Adiponektin, Resistin, Leptin und TNF $\alpha$  (Hofmann *et al.* 1994, Hollenberg *et al.* 1997, Iwaki *et al.* 2003, Tomaru *et al.* 2009). Die Mechanismen, die speziell zur Insulinresistenz führen, sind unter anderem die TNF $\alpha$ -vermittelte Inflammation, die durch Adiponektin verursachte Freisetzung von Glukose aus der Leber und der Einfluss von Leptin auf die Nahrungszufuhr (Abbildung 4).

Aufgrund von *splice* Varianten gibt es von PPAR $\gamma$  zwei Isoformen. PPAR $\gamma$ -1 findet man in vielen Geweben, PPAR $\gamma$ -2 unter physiologischen Bedingungen ausschließlich im Fettgewebe. *In vivo* Studien zeigen jedoch, dass das Produkt dieser *splice* Variante (PPAR $\gamma$ -2) als Folge von Überernährung auch in anderen Geweben wie der Leber und dem Skelettmuskel exprimiert wird. Daher könnte auch PPAR $\gamma$ -2 eine Rolle bei der Insulinresistenz und Lipotoxizität in diesen Geweben spielen (VidalPuig *et al.* 1996, Medina-Gomez *et al.* 2005).

Die Regulation der PPAR $\gamma$ -Funktion erfolgt zell- und gewebespezifisch über dessen Phosphorylierung, Acetylierung, Sumoylierung und Ubiquinierung (van Beekum *et al.* 2009). Die Phosphorylierung durch MAPKs unterdrückt die transkriptionelle Aktivität, indem die Ligandenbindung verhindert und die Rekrutierung von Kofaktoren verändert wird (Zhang *et al.* 1996, Camp und Tafuri 1997). Wird PPAR $\gamma$  an denselben Stellen jedoch durch die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk7 und Cdk9 (engl.: *cyclin-dependent kinase*) phosphoryliert, so steigt die Aktivität von PPAR $\gamma$ . Die Sumoylierung stellt einen weiteren Regulationsmechanismus dar. Hierbei werden kleine Ubiquitin-ähnliche Peptidstrukturen (SUMO Peptide; engl.: *small ubiquitin-like modifier peptides*) kovalent am PPAR $\gamma$  gebunden. Dies führt, vermutlich über eine Veränderung der rekrutierten Kofaktoren, zu einer Blockierung der transkriptionellen Fähigkeiten von PPAR $\gamma$ . Darüber hinaus wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  neben diesen post-translationalen Modifikationen zudem über die kurze Halbwertszeit von ca. zwei Stunden reguliert (Hauser *et al.* 2000, Ahmadian *et al.* 2013).



**Abbildung 4: Effekte der PPAR $\gamma$ -Aktivierung in verschiedenen Geweben.**

Die grünen Pfeile stehen für eine Erhöhung, die roten für eine Reduktion des genannten Effektes auf das Gewebe durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung. (modifiziert nach Kang et al., 2016)

### Die Rolle von PPAR $\gamma$ in der PAH

Das vaskuläre *Remodeling*, wie es in den Pulmonalarterien von PAH-Patienten vorkommt, ist zumindest teilweise durch Veränderungen der Intima und Media, wie z.B. durch eine erhöhte Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen bei gleichzeitig verringerter Apoptose bedingt (Yuan und Rubin 2005). Die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten für PAH-Patienten zielen primär auf eine Verbesserung der Vasodilatation der Lungengefäße ab. Da die Morbidität und Mortalität der PAH damit jedoch noch immer auf einem hohen Niveau liegt, bedarf es neuer Behandlungsstrategien. Dazu finden derzeit eine Reihe von Studien zu Wirkstoffen statt, die über eine zeitgleiche Regulation mehrerer der bei der Pathogenese der PAH beteiligten Signalwege eine Reduzierung bzw. Umkehr der Gefäßumbauprozesse bewirken (Green et al. 2011). Es gibt bereits einige Studien, die eine reduzierte PPAR $\gamma$ -Expression im Zusammenhang mit der PAH gezeigt haben. So konnte im Vergleich zu Gesunden bzw. COPD-Patienten (chronisch obstruktive Lungenkrankheit; engl.: *chronic obstructive lung disease*) in PAH-Patienten ein Fehlen von PPAR $\gamma$  bzw. eine verringerte Expression in plexiformen Läsionen der präkapillären Arteriolen nachgewiesen werden (Ameshima et al. 2003). Auch in Endothelzellen von PAH-Patienten wurde eine reduzierte PPAR $\gamma$ -Expression gemessen (Green et al. 2011). Ähnliches wurde zudem in Tiermodellen der Hypoxie-induzierten PAH bei der Ratte gezeigt (Ameshima et al. 2003, Kim et al. 2010).

Um die Funktion von PPAR $\gamma$  genauer untersuchen zu können, wurden PPAR $\gamma$ -*knockout* Mäuse generiert. Da ein globaler *knockout* dieses Transkriptionsfaktors zum Tod der Embryonen führt (Barak et al. 1999), wurden gewebespezifische *knockout*-Modelle zur Untersuchung verwendet. Der PPAR $\gamma$ -*knockout* in Endothelzellen führt dabei zu einer spontanen Ausbildung der PH mit einer Muskularisierung der kleinen pulmonalen Arterien und einer Rechtsherzhypertrophie (Guignabert et al. 2009). Ähnliches wurde für einen PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet (Hansmann et al. 2008). Damit liegt nahe, dass der Verlust von PPAR $\gamma$  in den Zellen der Gefäßwände eine Rolle bei der Pathogenese der PAH spielt. Dies zeigen auch Studien zur Aktivierung von PPAR $\gamma$  in sowohl Tierversuchen als auch Zellkulturmodellen. So konnte in verschiedenen Hypoxie- und Monocrotalin-induzierten Maus- bzw. Rattenmodellen der PH gezeigt werden, dass eine präventive PPAR $\gamma$ -Aktivierung über Pioglitazon oder Rosiglitazon zu einer Verringerung der rechtsventrikulären

Hypertrophie sowie Reduzierung der Gefäßumbauprozesse führt (Crossno *et al.* 2007, Hansmann *et al.* 2008). In einem weiteren Hypoxie-induzierten Mausmodell der PH wurde der therapeutische Effekt der PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Rosiglitazon untersucht. Auch hier zeigten sich eine Reduzierung der rechtsventrikulären Hypertrophie und der Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße (Nisbet *et al.* 2010). Auch *in vitro* Untersuchungen mit glatten Gefäßmuskelzellen zeigten eine durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung verringerte Proliferations- und Migrationsrate (Law *et al.* 2000).

#### **1.4. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen IR und PAH**

Inflammatorische Veränderungen werden seit längerem als Ursache für die endotheliale Dysfunktion unter der Insulinresistenz diskutiert (Yudkin *et al.* 1999, Pradhan *et al.* 2001). Dabei wurden bisher lediglich die Effekte auf die systemischen Gefäßveränderungen genauer betrachtet (Ginsberg 2000). Die Wirkung der metabolischen Veränderungen auf die pulmonale Zirkulation und den rechten Ventrikel ist hingegen derzeit nicht hinreichend untersucht. Es gibt jedoch Hinweise aus verschiedenen Tier- und Humanstudien auf einen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und PAH (Naderi *et al.* 2014). So kommt die PH, unabhängig von Hypertonie, ischämischer Herzerkrankung und Herzinsuffizienz, bei Diabetes-Patienten signifikant häufiger vor (Movahed *et al.* 2005). Andere Studien zeigen wiederum eine hohe Prävalenz von Insulinresistenz unter PAH-Patienten (Zamanian *et al.* 2009, Pugh *et al.* 2011). Die als genetischer Faktor bei der Entstehung der PAH bekannten BMPR2-Mutationen könnten an diesem Zusammenhang beteiligt sein, da Untersuchungen gezeigt haben, dass diese ebenfalls mit einer Insulinresistenz assoziiert sind (West *et al.* 2013). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass das gleichzeitige Auftreten von PAH und Insulinresistenz das kurz- und langfristige Überleben verringert (Zamanian *et al.* 2009, Belly *et al.* 2012). In einem *in vivo* Modell mit Apolipoprotein E (ApoE)-*knockout* Mäusen wurde außerdem gezeigt, dass eine Hochfettdiät neben einer Insulinresistenz einen erhöhten RVSP mit einhergehender rechtsventrikulärer Hypertrophie und erhöhter Muskularisierung der peripheren Pulmonalarterie bedingt (Hansmann *et al.* 2007). Ob es jedoch einen funktionellen bzw. kausalen Zusammenhang zwischen diesen beiden Krankheiten gibt, oder die PAH durch die Insulinresistenz eventuell verstärkt wird, ist nicht bekannt.



## 1.5. Hypothese und Ziel der Arbeit

Die PAH ist eine Krankheit, die durch Veränderungen der kleinen pulmonalen Arterien mit daraus resultierenden Veränderungen des rechten Ventrikels charakterisiert ist. Die bisher zugelassenen Therapien wirken nicht kurativ, verringern allerdings die Symptome, wobei die Mortalität jedoch mit einer mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von sechs bis sieben Jahren verhältnismäßig hoch ist. Es gibt Hinweise auf eine Assoziation der PAH mit der für den Typ 2 Diabetes ursächlichen Insulinresistenz.

Um das Verständnis der molekularen Hintergründe der Insulinresistenz zu erweitern, wurde in dieser Arbeit die Funktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) DEP-1 innerhalb der Insulin-Signalkaskade näher untersucht. In einem Mausmodell wurde in einem therapeutischen Ansatz mit Antisense-Oligonukleotiden gegen DEP-1 der Einfluss dieser PTP auf die Phosphorylierung und damit den Aktivitätsstatus des Insulinrezeptors analysiert. In einem Hochfett-diät-induzierten Insulinresistenz-Modell mit DEP-1-*knockout* Mäusen wurde darüber hinaus die Auswirkung am Insulinrezeptor und auf die pankreatischen Inseln untersucht.

Im Zusammenhang mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR $\gamma$ ), welcher bereits erfolgreich zur Behandlung der Insulinresistenz eingesetzt wird, gibt es Hinweise aus *in vitro* und *in vivo* Studien für eine potentiell vorteilhafte Behandlungsmöglichkeit der PAH. Vor allem die kausale Therapie der PAH durch PPAR $\gamma$ -Agonisten wurde jedoch noch nicht umfassend untersucht. Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit, eine Behandlung der PAH in einem therapeutischen Ansatz mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon zu untersuchen. Dazu wurde ein Monocrotalin-induziertes Modell der Ratte gewählt. In diesem wurden die Effekte einer PPAR $\gamma$ -Aktivierung im Kontext der PAH hinsichtlich der veränderten Muskularisierung mit den damit verbundenen Druckveränderungen im rechten Ventrikel untersucht. Das Herz wurde in Bezug auf hypertrophe bzw. fibrotische und die Lunge auf inflammatorische Veränderungen untersucht. Zum anderen ist das Ziel dieser Arbeit, den Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und PAH detaillierter zu untersuchen. Dazu wurde in einem weiteren Tiermodell getestet, ob die PAH durch gewebespezifischen PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen beziehungsweise durch eine Hochfett-diät induziert wird. Hier wurden die metabolischen Veränderungen wie die Insulinresistenz und die Veränderungen der pulmonalen Gefäße mit den einhergehenden Druckveränderungen in den pulmonalen Gefäßen untersucht. Analog zu dem Rattenmodell erfolgte die Untersuchung des Herzens im Hinblick auf Hypertrophie und Fibrose und die Untersuchung der Lunge bezüglich inflammatorischer Veränderungen. Im zweiten Schritt ist das Ziel dieses Versuches, eine Korrelation zwischen der Insulinresistenz und der Schwere der PAH, gemessen als rechtsventrikulären Druck, zu analysieren.

Das Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis eines vorteilhaften Effektes einer therapeutischen PPAR $\gamma$ -agonistischen Behandlung mit Pioglitazon zur kausalen Therapie der PAH sowie die Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Insulinresistenz und PAH im Rahmen eines PPAR $\gamma$ -*knockouts* in glatten Gefäßmuskelzellen. Daneben wird der Einfluss der PTP DEP-1 auf die Insulin-Signaltransduktion zur Identifizierung eines möglichen neuen Therapieansatzes der Insulinresistenz untersucht.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Versuchstiere

**Tabelle 1: Verwendete Versuchstiere**

Bezeichnung	Lieferant
<b>Mausstämme</b>	
Sm22-Cre C57/BL6 x SJL	Jackson
PPAR $\gamma$ -KO Kardiomyozyten DBA/2J x C3H	Evren Calagan (Kooperationspartner, Köln) von Joachim Herz (Department of Molecular Genetics, Dallas) zur Verfügung gestellt
C57BL/6J	Janvier, Le Genest-Saint-Isle, FR
C57BL/6-Ptprj/J	Deltagen, San Mateo, CA
<b>Rattenstämme</b>	
Sprague-Dawley	Charles River, D

#### 2.1.2. Laborgeräte

**Tabelle 2: Verwendete Geräte**

Bezeichnung	Lieferant
<b>Laborgeräte für Tierversuche</b>	
Contour XT Glukosemessgerät	Bayer Vital, Leverkusen, D
SPR-1000 Mikro-Tip <sup>®</sup> 1 F Millar Katheter	Millar, Inc., Houston, USA
SPR-320 Mikro-Tip <sup>®</sup> 2 F Millar Katheter	Millar, Inc., Houston, USA
TSE LabMaster	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, D
<b>Geräte für <i>in vitro</i>-Experimente</b>	
Analysewaage BL 150S, BL 310	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav Systec V-150	Systec, Wettenberg, D
Benchmark Plus <sup>TM</sup> Microplate Spectrophotometer	BioRad GmbH, München, D
Blotkammer und Apparatur	BioRad GmbH, München, D
CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell 150	Heraeus, Hanau, D
EC 350-1 und -2 Einbettgerät	Microm, Walldorf, D
Elektrophoresekammer 250 EX	Whatman, Brentford, UK
Entwicklungsmaschine Curix 60	AGFA, Köln, D
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, D
Gel-Dokumentations-System ChemiDoc	Bio-Rad, Hercules, USA
HM325 Microtom	Microm, Walldorf, D

<b>Ikamag RCT Heizplatte/Magnetrührer</b>	Th. Karow GmbH, Berlin, D
<b>Laminar-Flow- Arbeitsbank LaminAir 1.2</b>	Heto-Holten, Allerød, DK
<b>Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer</b>	PeqLab, Erlangen, D
<b>pH-Meter pH 340</b>	WTW, Weilheim, D
<b>Pipetten 0,5 - 1000 µl</b>	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Power Pac 300</b>	BioRad GmbH, München, D
<b>real time-PCR-System Mx3000P</b>	Stratagene, La Jolla, USA
<b>Rollenmischgerät RM5</b>	Karl Hecht, Sondheim, D
<b>Shandon Citadel 1000</b>	Thermo Electron, Piräus, GR
<b>SpeedMill Plus</b>	Analytik Jena, Jena, D
<b>Thermomixer comfort</b>	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Tischzentrifuge Galaxy Mini</b>	Merck Eurolab, Darmstadt, D
<b>Vortex Genie 2, Scientific Industries</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Wasserbad WB 14</b>	Memmert GmbH, Schwabach, D
<b>Zentrifuge 32R, Micro 20</b>	Hettich, Tuttlingen, D
<b>Zentrifuge 5415R, 5810R</b>	Eppendorf, Hamburg, D

### 2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lieferanten**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Lieferant</b>
<b>Tierversuche</b>	
<b>0,9 % Kochsalzlösung, steril</b>	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
<b>Glucosteril 20 %</b>	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
<b>Hochfettdiät (HFD) (60 % kcal Fett)</b>	Brogaarden, Gentofte, DK
<b>Hochfettdiät (HFD) (60 % kcal Fett) mit Pioglitazon</b>	Brogaarden, Gentofte, DK
<b>Insuman Rapid 40 I.E./ml Insulin</b>	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, D
<b>Isofluran</b>	Baxter Deutschland, Unterschleißheim, D
<b>Niedrigfettdiät (NFD) (10 % kcal Fett)</b>	Brogaarden, Gentofte, DK
<b>Pioglitazon</b>	Biomol, Hamburg, D
<b>in vitro-Experimente</b>	
<b>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin)ethansulfonsäure (HEPES)</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Acrylamid (30 %)</b>	Serva, Heidelberg, D
<b>Agarose</b>	Eurogentec, Köln, D
<b>Albumin Fraktion V rein (BSA)</b>	Sigma, Taufkirchen, D

<b>Albuminstandard</b>	Pierce, Bonn, D
<b>Ammoniumpersulfat</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Bromphenolblau</b>	VWR, Darmstadt, D
<b>Complete Proteaseinhibitor</b>	Roche, Mannheim, D
<b>Deoxycholsäure (Sodium salt)</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Dithiothreitol (DTT)</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Eosin</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Essigsäure</b>	Roth, Karlsruhe, D
<b>Ethanol 96 % und 100 %</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>Ethidiumbromid</b>	Roth, Karlsruhe, D
<b>Ethylendiamintetraessigsäuredinatrium-Dihydrat (EDTA)</b>	Taufkirchen, D
<b>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Formaldehyd</b>	Roth, Karlsruhe, D
<b>Glycerin</b>	Roth, Karlsruhe, D
<b>Glycin</b>	Roth, Karlsruhe, D
<b>Insulin</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Isopropanol</b>	Roth, Karlsruhe, D
<b>Kaiser's Glyceringelatine</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>Methanol</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin (TEMED)</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Natriumacetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Serva, Heidelberg, D
<b>Natriumfluorid (NaF)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>Natriumhydrogenphosphat</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Natriumhydroxid</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>Natriumorthovanadat</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>NeoClear</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>Orange G</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>PhosStop (Phosphatase-Inhibitor)</b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<b>Pioglitazon</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>Ponceau S Lösung</b>	Fluka, Taufkirchen, D
<b>Salzsäure (HCL)</b>	Merck, Darmstadt, D
<b>Sucrose</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizmabase)</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)</b>	Roth, Karlsruhe, D

<b>Triton X-100</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Trypanblau Lösung 0,4 Trypsin/EDTA</b>	Gibco, Karlsruhe, D
<b>Tween 20</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Sigma, Taufkirchen, D
<b>Puffer, Lösungen, Medien, Zusätze</b>	
<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 4,5 g/l Glukose</b>	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
<b>Fetales Kälberserum (FBS)</b>	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	PAA, Marburg, D
<b>Phosphatpuffer (PBS)</b>	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
<b>Power SYBR Green PCR Master Mix</b>	Applied Biosystems, Darmstadt, D
<b>Trypsin/EDTA</b>	PAA, Marburg, D
<b>Ultra Pure Water</b>	Biochrom AG, Berlin, D
<b>Kits, Marker</b>	
<b>AEC solution</b>	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
<b>BCA Protein Assay Reagenz A und B</b>	Pierce, Bonn, D
<b>Duolink II® Kit</b>	Olink, Uppsala, SE
<b>ECL Western-Blot Detection Reagent</b>	Amersham, Freiburg, D
<b>Gene Ruler™ 1 kb und 100 bp DNA Ladder</b>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
<b>Mouse Adiponektin ELISA</b>	Crystal Chem, Zaandam, NL
<b>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</b>	Fermentas, St. Leon, D
<b>Peroxidase Kit ARK</b>	Dako, Hamburg, D
<b>Peroxidase Kit DAB</b>	Vector, Burlingame, USA
<b>Phire Animal Tissue Direct PCR Kit</b>	New England Biolabs, Frankfurt, D
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen, Hilden, D
<b>Vectastain Elite ABC HRP Kit</b>	Vector, Burlingame, USA
<b>Enzyme</b>	
<b>Collagenase Typ II</b>	Worthington Biochemical, Lakewood, USA
<b>DNase</b>	Qiagen, Hilden, D
<b>Elastase</b>	Worthington Biochemical, Lakewood, USA
<b>High Capacity RNA-to-cDNA Kit</b>	Applied Biosystems, Darmstadt, D
<b>Proteinase K</b>	Qiagen, Hilden, D
<b>Trypsin-Inhibitor</b>	Worthington Biochemical, Lakewood, USA

#### 2.1.4. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Lieferanten**

Bezeichnung	Lieferant
<b>Material für Tierversuch</b>	
Contour next Sensoren	Bayer Vital, Leverkusen, D
Spritzen BD Discardit II	BD, Heidelberg, D
<b>Material für <i>in vitro</i>-Experimente</b>	
96-well MultiPLY PCR-Platte	Sarstedt, Nümbrecht, D
CryoTube Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Hyperfilm ECL Chemilumineszenz-Film	GE Healthcare, Solingen, D
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Pipettenspitzen VWR	International GmbH, Darmstadt, D
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	GE Healthcare, Solingen, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilfilter (0,2 µm)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
SuperFrost™ Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
Whatman Papier	Roth, Karlsruhe, D

#### 2.1.5. Software

**Tabelle 5: Verwendete Software**

Bezeichnung	Lieferant
Duolink Image Tool	Sigma, Taufkirchen, D
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
IBM SPSS Statistics V 23	IBM Deutschland, Ehningen, D
ImageJ	imageJ.net (open source)
MS Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Tiermodelle

Es wurde die Rolle von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) im Hinblick auf die Insulin-Signaltransduktion in einem Hochfett-diät-induzierten Insulinresistenzmodell in C57/BL6J Mäusen untersucht. Dabei erfolgte zum einen die pharmakologische PTP-Inhibition durch Antisense-Oligonukleotide (ASO) gegen DEP-1. Zum anderen wurde in einem zweiten Ansatz die Rolle von DEP-1 mittels eines konventionellen *knockout*-Mausmodells näher charakterisiert.

Zur Untersuchung eines möglichen therapeutischen Effektes einer PPAR $\gamma$ -agonistischen Behandlung über Pioglitazon auf die Pulmonale Hypertonie (PH) wurden zwei weitere Tiermodelle gewählt. Zum einen ein Mausmodell, bei welchem zunächst der Effekt einer Hochfett-diät und eines PPAR $\gamma$ -*knockouts* in glatten Gefäßmuskelzellen auf den rechtsventrikulären Druck untersucht wurde. Zum anderen fand die Untersuchung dieser Fragestellung an einem MCT-Rattenmodell statt.

#### 2.2.1.1. Antisense-Oligonukleotid-Behandlung in C57/BL6J Mäusen

Im ersten Tiermodell (Tabelle 6) wurden C57/BL6J Mäuse (n=28) im Alter von vier bis sechs Wochen mit einer Hochfett-diät (HFD, n=18), bei welcher 60 % der aufgenommenen Kalorien aus Fett stammen, über einen Zeitraum von zehn Wochen *ad libitum* gefüttert. Nach diesen zehn Wochen wurden die Mäuse der HFD-Gruppe randomisiert in zwei Gruppen für eine sechswöchige pharmakologische Behandlung aufgeteilt. Die eine Gruppe der HFD-Mäuse erhielt zweimal pro Woche eine intraperitoneale Applikation von ASO-DEP-1 (5'-TACATTGCTGCCATCTCCAG-3' ISIS 285564; n=10), die andere HFD-Gruppe zu den gleichen Zeitpunkten eine Applikation der ASO-Kontrolle (5'-CCTTCCCTGAAGGTTCCCTCC-3' ISIS 141923; n=8). Am Ende des Versuches, nach insgesamt 16 Wochen, wurde einem Teil der Tiere (ASO Kontrolle, n=5; ASO DEP-1, n=6) unter 1-2 %iger Isoflurannarkose Insulin (10 U/kg Körpergewicht) in die *Vena cava* injiziert und dessen Verteilung im Körper für zwei Minuten ermöglicht. Anschließend wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen, gewogen und für immunohistochemische Untersuchungen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

**Tabelle 6:** Schematische Darstellung der Hochfett-diät-induzierten Insulinresistenz mit Antisense-Oligonukleotid (ASO)-Behandlung in C57/BL6J Mäusen

Die Mäuse wurden im Alter von vier bis sechs Wochen in den Versuch eingeschlossen. Ab Versuchsbeginn wurden sie mit einer Hochfett-diät (HFD, n=18) gefüttert. Nach zehn Wochen wurde ein Teil der HFD-gefütterten Tiere zweimal wöchentlich intraperitoneal mit ASO-DEP-1 (25 mg/kg Körpergewicht gelöst in PBS; n=10) bzw. zur Kontrolle mit ASO-Kontrolle (25 mg/kg Körpergewicht gelöst in PBS; n=8) über einen Zeitraum von sechs Wochen behandelt. Abkürzung: DEP-1, density-enhanced phosphatase-1

Diät	Versuchszeitraum		n
	Woche 1-9	Woche 10-16	
HFD (n= 8)		ASO-Kontrolle	8
		ASO-DEP-1	10

### 2.2.1.2. Konventioneller *Ptprj* (DEP-1)-*knockout* in C57/BL6J Mäusen

In einem zweiten Tiermodell wurde ein konventionelles *knockout*-Modell auf dem genetischen Hintergrund von C75/BL6J Mäusen zur Charakterisierung der Funktion von DEP-1 (Gen: *Ptprj*) untersucht (Tabelle 7). Dazu wurden vier bis sechs Wochen alte Wildtyp (WT)- und *knockout* (KO)-Mäuse randomisiert in je zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe eines jeweiligen Genotyps erhielt *ad libitum* eine NFD und die andere Gruppe eines jeweiligen Genotyps erhielt *ad libitum* eine HFD analog zum ASO-Ansatz. Nach zwölf Wochen im Versuch wurde einem Teil der Tiere unter 1–2 %iger Isoflurannarkose Insulin (10 U/kg Körpergewicht) in die *Vena cava* injiziert und dessen Verteilung im Körper für zwei Minuten ermöglicht (NFD WT, n=5; NFD *Ptprj*-KO, n=5; HFD WT, n=7; HFD *Ptprj*-KO, n=7). Anschließend wurden die Mäuse analog zum ASO-Tierversuch getötet und die Organe entnommen.

**Tabelle 7: Schematische Darstellung der Hochfettdiät-induzierten Insulinresistenz in Wildtyp- und *Ptprj* (DEP-1)-*knockout*-Mäusen**

Es wurden Wildtyp (WT, n=18)- und *Ptprj* (DEP-1)-*knockout* (*Ptprj*-KO, n=18)-Mäuse im Alter von vier bis sechs Wochen in den Versuch aufgenommen. Ab Versuchsbeginn wurden die Mäuse in randomisierten Gruppen mit einer Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD (hellgelb), n=16 bzw. HFD (gelb), n=20) gefüttert.

Diät	Genotyp	Versuchszeitraum	n
		Woche 1-12	
NFD (n=16)	WT		8
	<i>Ptprj</i> -KO		8
HFD (n=20)	WT		10
	<i>Ptprj</i> -KO		10

### 2.2.1.3. Konventioneller *SmPparγ*-*knockout* in C57/BL6 x SJL x DBA/2J x C3H Mäusen

In einem Mausmodell, in dem der Effekt einer Hochfettdiät (HFD) auf die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie (PH) untersucht wurde, fand anschließend die Analyse einer potenziell vorteilhaften pharmakologischen Wirkung des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon auf die PH statt. Darüber hinaus wurde die Rolle von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Entstehung der PH unter Verwendung von *knockout*-Mäusen (*SmPparγ*<sup>-/-</sup>) analysiert.

Um zu untersuchen, ob eine Hochfettdiät einen Einfluss auf den rechtsventrikulären Druck (RVSP, engl.: *right ventricular systolic pressure*) hat, wurden acht bis zwölf Wochen alte, männliche Wildtyp- (n=42) und *knockout*-Mäuse (n=41) 24 Wochen mit einer HFD beziehungsweise zur Kontrolle mit einer NFD *ad libitum* gefüttert. Zusätzlich wurde ein Teil der HFD-gefütterten Tiere nach den ersten zwölf Wochen für weitere zwölf Wochen mit Pioglitazon, welches in die Hochfettdiät eingearbeitet wurde (200 mg/kg Futter; HFD+Pio), behandelt. Über den gesamten Zeitraum des Versuches wurde zweimal wöchentlich das Gewicht der Tiere bestimmt. Darüber hinaus wurden die Mäuse zu drei Zeitpunkten - zu Versuchsbeginn, nach zwölf Wochen und nach 24 Wochen - mittels Glukose- und Insulin-Toleranz-Tests (GTT und ITT), sowie zu den beiden letzten Zeitpunkten zusätzlich mittels NMR und



metabolischen Käfigen (TSE LabMaster) charakterisiert. Zum Versuchsende (nach 24 Wochen) wurde der rechtsventrikuläre Druck sowie der systemische Druck (SBP, engl.: *systemic blood pressure*) und die Herzfrequenz unter 2–3 % Isoflurannarkose gemessen (Tabelle 8). Nach Tötung der Mäuse wurden die Lungen der Tiere mit 0,9 % NaCl und anschließend mit 4 % PFA perfundiert. Anschließend wurden die Organe entnommen, gewogen und für spätere RNA- und Proteinuntersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren beziehungsweise für histologische Untersuchungen in 4 % PFA fixiert.

**Tabelle 8: Schematische Darstellung der Hochfett-diät-induzierten pulmonalen Hypertonie in Wildtyp- und SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen einschließlich der pharmakologischen Behandlung mit Pioglitazon**

Es wurden acht bis zwölf Wochen alte Wildtyp-(SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>, WT; n=42) und gewebespezifische PPAR $\gamma$ -knockout (SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>, KO; n=41)-Mäuse mit einem entsprechenden knockout von PPAR $\gamma$  in den glatten Gefäßmuskeln untersucht. Zu Versuchsbeginn (t=0) wurden die Mäuse metabolisch mittels Glukose- und Insulin-Toleranz-Tests (GTT und ITT) charakterisiert und anschließend in Gruppen mit einer Niedrigfett- bzw. Hochfett-diät (NFD (hellgelb), n=21 bzw. HFD (gelb), n=62) randomisiert. Nach zwölf Wochen (t=12) wurde diese metabolische Charakterisierung mittels GTT und ITT wiederholt und um NMR (engl.: nuclear magnetic resonance)- und LabMaster-Untersuchungen erweitert. Anschließend hat ein Teil der HFD-gefütterten Tiere eine pharmakologische Behandlung über das Futter mit Pioglitazon (HFD+Pio (grün), n=29) für weitere zwölf Wochen erhalten. Nach 24 Wochen (t = 24) wurden erneut ein GTT und ITT, sowie die Untersuchungen mittels NMR und LabMaster durchgeführt und zudem der rechtsventrikuläre Druck (RVSP; engl.: right ventricular systolic pressure) und der systemische Blutdruck (SBP; engl.: systemic blood pressure) gemessen. Über den gesamten Versuchszeitraum von insgesamt 24 Wochen wurde zweimal wöchentlich das Gewicht der Mäuse bestimmt.

Diät/ Behandlung	Genotyp	Versuchszeitraum		n
		Woche 1-12	Woche 13-24	
Niedrigfett-diät (NFD) (n=21)	WT			11
	SmPpar $\gamma$ -KO			10
Hochfett-diät (HFD) (n=33)	WT			16
	SmPpar $\gamma$ -KO			17
HFD + Pioglitazon (HFD+Pio) (n=29)	WT			15
	SmPpar $\gamma$ -KO			14

← zweimal wöchentlich Gewichtsbestimmung →		
<b>t = 0 Wochen</b>	<b>t = 12 Wochen</b>	<b>t = 24 Wochen</b>
GTT / ITT	GTT / ITT	GTT / ITT
	NMR	NMR
	TSE LabMaster	TSE LabMaster
		RVSP / SBP
		Organentnahme

#### 2.2.1.4. Monocrotalin (MCT)-Rattenmodell der pulmonalen Hypertonie

In einem zweiten Tiermodell wurde durch den Kooperationspartner in Köln in adulten, männlichen Sprague-Dawley Ratten (250–300 g) mittels subkutaner Injektion von Monocrotalin (MCT; 60 mg/kg Körpergewicht; n=22) eine PH induziert. Den Kontrolltieren wurde zum selben Zeitpunkt isotonische Natriumchloridlösung injiziert (n=9). Um eine therapeutische Wirkung von Pioglitazon untersuchen zu können, wurde ein Teil der Tiere 21 Tage nach MCT-Injektion mit Pioglitazon (MCT+Pio, n=21), welches in das Futter eingearbeitet war (40 mg/kg Futter), für weitere 14 Tage mit einer mittleren

aufgenommenen Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht behandelt. Daneben wurden Ratten zur Kontrolle ohne vorherige MCT-Injektion therapeutisch mit Pioglitazon behandelt (n=3). Nach insgesamt 35 Tagen wurden hämodynamische Messungen unter Narkose durchgeführt (Tabelle 9). Nach der Tötung der Tiere wurden die Lungen mit NaCl (0,9 %) und 4 % PFA perfundiert. Anschließend wurden Organe entnommen und für RNA- und Proteinuntersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren beziehungsweise in 4 % PFA fixiert.

**Tabelle 9: Schematische Darstellung des MCT-Rattenmodells zur Induktion der pulmonalen Hypertonie und Behandlung mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon**

Den Tieren wurden zu Versuchsbeginn Monocrotalin (MCT; 60 mg/kg Körpergewicht) oder als Kontrolle isotonisches Natriumchlorid injiziert (d 0). Die 14-tägige pharmakologische Behandlung mit Pioglitazon begann 21 Tage nach MCT-Injektion in einer randomisierten Gruppen mit durchschnittlich 2,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag über das Futter (grün). Zum Versuchsende (Tag 35) wurden der rechtsventrikuläre und systemische Blutdruck mittels Katheter bestimmt und die Organe nach Tötung der Tiere für weitere Untersuchungen entnommen.

Behandlung	Versuchszeitraum		n
	Tag 0 - 20	Tag 21-35	
Kontrolle			9
Monocrotalin (MCT)	1 x MCT (d0)		22
MCT + Pioglitazon (Pio)	1 x MCT (d0)		21

### 2.2.2. Hämodynamische Messungen bei Ratten und Mäusen

Zum Versuchsende, bei den Ratten 35 Tage nach MCT-Injektion beziehungsweise bei den Mäusen nach 24 Wochen, wurden die Tiere anästhesiert (Ratte: Mischung aus 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 4 mg/kg Körpergewicht Xylazin; Maus: Inhalation von 1,5–2 % Isofluran). Nach dem Freipräparieren der Trachea wurden die Tiere künstlich beatmet. Die Messung des RVSP, als Maß für den pulmonal arteriellen systolischen Druck (PASP), fand über die Jugularvene mittels eines flüssigkeitsgefüllten Katheters statt (Ratte: SPR-320 Mikro-Tip® 2 F Millar Ratten Druckkatheter; Maus: SPR-1000 Mikro-Tip® 1 F Millar Maus Druckkatheter). Der systemische Blutdruck (SBP) wurde anschließend über die *Arteria carotis* gemessen. Zur Ermittlung der jeweiligen Drücke der Tiere fand eine Auswertung von drei bis fünf Bereichen der aufgenommenen Druckkurven statt. Diese Untersuchungen wurden in Köln zusammen mit Frau Dr. rer. nat. Eva Berghausen und Frau Arnica Behringer (beide aus der kooperierenden Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Evren Caglayan in Köln) durchgeführt.

### 2.2.3. Metabolische Charakterisierung von SmPpary-Mäusen

Um die Mäuse hinsichtlich ihres Metabolismus charakterisieren zu können, wurde ihre Körperzusammensetzung im NMR, ihre körperliche Aktivität und Verstoffwechslung im LabMaster und ihre Glukoseverwertung durch Glukose- und Insulin-Toleranz-Tests (GTT und ITT) untersucht.

#### 2.2.3.1. Kernspinresonanzspektroskopie

Neben der zweimal wöchentlichen Bestimmung des Gewichtes der Tiere wurde nach zwölf und 24 Wochen mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, engl.: *nuclear magnetic resonance*) der Anteil des Fettgewebes, freien Wassers und der Magermasse bestimmt.

#### 2.2.3.2. TSE LabMaster-Analysen

Um die Mäuse detaillierter hinsichtlich ihres Metabolismus zu phänotypisieren, wurden sie mit Hilfe des TSE LabMaster Systems untersucht. Dabei wurden der respiratorische Quotient (RQ), die lokomotorische Aktivität sowie die aufgenommene Futter- und Wassermenge bestimmt und alle 30 Minuten die entsprechenden Parameter automatisch vom System dokumentiert. Die Mäuse wurden dazu einzeln über einen Zeitraum von 22-24 Stunden in einem Käfig gehalten. Über Sensoren wurde der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Gehalt aufgezeichnet; beide Werte dienen der Berechnung des RQ ( $RQ = VCO_2 / VO_2$ ). Über ein Infrarot-Lichtschrankensystem wurde zudem die physische Aktivität der Mäuse in x- und y-Ebene dokumentiert. Für die Auswertung wurden die Messwerte nach einer Eingewöhnungsphase der Tiere von vier Stunden ausgewertet, sodass die Ergebnisse einen Beobachtungszeitraum von 18 Stunden (sechs Stunden Tagphase und zwölf Stunden Nachtphase) darstellen.

#### 2.2.3.3. Insulin-Toleranz-Test

Zur Überprüfung der Insulinsensitivität wurde bei den Mäusen ein Insulin-Toleranz-Test (ITT) durchgeführt. Dazu wurde den Tieren nach einer Fastenzeit von etwa vier Stunden und nach einer initialen Messung des Blutglukosespiegels aus der Schwanzvene (Zeitpunkt 0) Insulin (0,5 U/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Nach 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten wurde erneut der Blutglukosespiegel aus der Schwanzvene mittels Glukosemessegerät und Teststreifen bestimmt. Die gemessenen Werte sind als zeitabhängiger Verlauf der absoluten Werte, sowie als berechnete Fläche unter der Glukosekonzentrationskurve (*area under the curve*, AUC) dargestellt.

#### 2.2.3.4. Glukose-Toleranz-Test

Zur Ermittlung der Glukosetoleranz wurde bei den Mäusen ein intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test (GTT) durchgeführt. Nach einer Nüchternphase von etwa zwölf Stunden wurde der initiale Blutglukosespiegel mit Hilfe des Glukosemessgerätes und den Teststreifen aus Blut der Schwanzvene bestimmt. Anschließend wurde den Mäusen Glukose (1 g/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert und der Blutglukosespiegel erneut nach 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten bestimmt. Die gemessenen Werte sind als zeitlicher Verlauf der Blutglukosekonzentration als auch als Fläche unter der Kurve (AUC; engl.: *area under the curve*) dargestellt.

## 2.2.4. Serumspiegel von Pioglitazon

Die Serumspiegel von Pioglitazon und zwei seiner Metabolite wurden bei der Labor Berlin GmbH nach einem Standardverfahren mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt.

## 2.2.5. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.5.1. Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen der Maus

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden Schwanzspitzen zur Isolation der genomischen Desoxyribonukleinsäure (engl.: *deoxyribonucleic acid*, DNA) verwendet. Zur Isolation selbst wurde das *Phire Animal Tissue Direct PCR Kit* eingesetzt. Dazu wurde die Schwanzspitze mit einem Mix aus *Dilution Buffer* und *DNA Release Additive* für zwei Minuten bei 98°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch eine Minute bei 13 000 xg und RT zentrifugiert und die sich im Überstand befindliche DNA danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.5.2. Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die aus der zuvor beschriebenen Isolation aus der Schwanzspitze der Mäuse erhaltenen DNA wurde mit Hilfe des *Phire Animal Tissue Direct PCR Kits* und Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) entsprechend dem Temperatur-Zeit-Profil in Tabelle 10 aufgearbeitet. Dazu wurde mit einem 20 µl Ansatz entsprechend den Herstellerangaben und den in Tabelle 11 aufgeführten Primern gearbeitet. So wurde zum einen die DNA von Cre, als Nachweis für einen *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen, als auch Interleukin-2 (IL-2), als interne PCR-Amplifikationskontrolle, vervielfältigt.

Um die PCR-Produkte für die Genotypisierung untersuchen zu können, wurden sie in einem 1 % Agarosegel, welches Ethidiumbromid enthielt, in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA; pH 8,0) aufgetrennt. Zuvor wurde Orange G zu den PCR-Produkten gegeben. Zur Darstellung der Fragmentgrößen wurde zusätzlich ein 100 Basenpaar-Marker aufgetragen. Die DNA wurde in Gelkammern bei 120 Volt für 30 Minuten aufgetrennt und zur Visualisierung der erhaltenen PCR-Fragmente unter UV-Licht einer Geldokumentationsanlage untersucht.

**Tabelle 10: Temperatur-Zeit-Profil der Polymerase-Kettenreaktion für die Genotypisierung**

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 s	32 Zyklen
Primer-Annealing	61°C	30 s	
Primer-Elongation	72°C	45 s	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	

**Tabelle 11: Primersequenzen für die Genotypisierung der *Ptprj* (DEP-1)-Mäuse und *SmPpary*-Mäuse**

Zur Genotypisierung der *Ptprj*-(DEP-1)-Mäuse wurden mittels multiplex-PCR eine interne Kontrolle (Primer-Kombination GS (E,T) mit GS (E1)) und eine Zielsequenz (Primer-Kombination GS (E,T) mit NEO (T)) amplifiziert. Zur Genotypisierung der *SmPpary*-Mäuse wurden mittels multiplex-PCR eine interne Kontrolle (Primer-Kombination IL-2 fwd mit IL-2 rev) und eine Zielsequenz (Primer-Kombination Cre fwd mit Cre rev) amplifiziert.

Primer-Bezeichnung	Primersequenz 5' – 3'
GS (E,T)	GGA GAA TGT ATA CGA AGT GCC TGG G
NEO (T)	GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC TCA T
GS (E1)	AGC TGT CGT CAG CCC AAC TAG TGT G
Cre fwd	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC
Cre rev	GTG AAA CAG TAA AAA CTA TC
IL-2 fwd	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT
IL-2 rev	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C

E, endogen; T, target; fwd, forward; rev, reverse

### Isolierung von RNA

Zur Isolation von Ribonukleinsäure (engl: *ribonucleic acid*, RNA) aus Geweben (Herz, Lunge) und Zellen wurde das *RNeasy Mini Kit* entsprechend dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers und unter Verwendung der im Kit enthaltenen Säulen und Puffer genutzt. Zur RNA-Isolation aus Gewebe wurde dieses zunächst in Lysepuffer (RLT-Puffer) mit Hilfe von Keramikkügelchen in einem Reaktionsgefäß in einer Speedmill zerkleinert. Bei der Isolierung von RNA aus Herzgewebe fand anschließend ein zusätzlicher Verdau mit Proteinase-K auf der Säule statt. Anschließend wurden die Säulen mehrfach gewaschen. Um eine Kontamination mit genomischer RNA zu verhindern erfolgte ein DNase-Verdau auf den Säulen. Nach der RNA-Isolation wurde die Konzentration sowie Reinheit der RNA im Eluat an einem Spektrophotometer (Nanodrop) bestimmt.

### cDNA-Synthese

Zum Umschreiben von 1 µg RNA in komplementäre DNA (engl.: *complementary DNA*, cDNA) wurde das *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* von *Applied Biosystems* entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Nach Zugabe des Puffers, in welchem dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) und *random-Primer* enthalten sind, sowie des Enzyms Reverse Transkriptase zur RNA, erfolgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 37°C. Um die Reaktion abzubrechen fand ein abschließender Inkubationsschritt von fünf Minuten bei 95°C statt, bevor die cDNA auf Eis gestellt wurde. Vor der Analyse der Genexpression mittels quantitativer *real-time* PCR wurde die cDNA 1 : 6 mit Wasser verdünnt.

#### 2.2.5.3. Quantifizierung der mRNA durch quantitative *real-time* PCR

Zur Analyse der Genexpression wurde die quantitative *real-time* PCR unter Verwendung von SYBR® Green genutzt. Die hierfür designten Primer führten jeweils zur Amplifikation eines Produktes von 70

bis 150 Basenpaaren (Tabelle 12). In das doppelsträngige Amplifikationsprodukt lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green ein, was zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffes führt. Dieser Zyklus wird 40-mal wiederholt, wobei sich das Fluoreszenzsignal mit jedem Zyklus exponentiell steigert, bis es eine Plateau-Phase erreicht. Die Messung der Genexpression wurde in Duplikaten durchgeführt und auf ein Referenzgen (Maus: 18S, Ratte: HPRT) normalisiert. Zur Berechnung wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet, deren Formeln im Folgenden dargestellt sind:

$$\Delta CT = CT_{(\text{Zielgen})} - CT_{(\text{Referenzgen})}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(\text{Behandlung})} - \Delta CT_{(\text{Kontrolle})}$$

$$\text{Ratio} = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

**Tabelle 12: Primersequenzen für die quantitative real-time PCR mit SYBR® Green**

Gen		Forward 5' – 3'	Reverse 5' – 3'
<b>Maus</b>			
<b>Rn18S</b>	<b>18S rRNA</b>	GGACTCTTTTCGAGGCCCTGTA	CACCAGACTTGCCCTCCAAT
<b>NPPB</b>	<b>BNP</b>	GGTCCAGCAGAGACCTCAAAA	GCCAGGAGGTCTTCCTACAAC
<b>SPP1</b>	<b>OPN</b>	CTCCAATCGTCCCTACAGTCG	AGGCCTCATCTGTGGCATC
<b>EGR1</b>	<b>Egr-1</b>	CCGAGCGAACAACCCTATGA	CGAGTCGTTTGGCTGGGATA
<b>Ratte</b>			
<b>HPRT1</b>	<b>HPRT</b>	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
<b>NPPB</b>	<b>BNP</b>	GAAGATAGACCGGATCGGCG	TCCCAGAGCTGGGGAAAGAA
<b>SPP1</b>	<b>OPN</b>	CCAGCCAAGGACCAACTACA	TGGCTACAGCATCTGAGTGTT

*18S rRNA: 18S ribosomale Ribonukleinsäure (engl.: ribosomal ribonucleic acid); NPPB: natriuretic peptide precursor B; BNP: natriuretisches Peptid Typ B (engl.: Brain Natriuretic Peptide); OPN: Osteopontin SPP1: secreted phosphoprotein 1; Egr-1: engl.: early growth response protein 1; HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase*

## 2.2.6. Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.6.1. Isolierung von Proteinen

Für Proteinuntersuchungen mittels Immunoblot wurden Proteine aus Gewebe isoliert, indem das Gewebe zusammen mit Ripa-Lysepuffer (engl.: *radioimmunoprecipitation assay buffer*), welcher Protease- und Phosphataseinhibitoren enthielt, und Keramikkügelchen in einem Reaktionsgefäß in einer Speedmill zerkleinert wurde. Zur Isolation von Proteinen aus kultivierten Zellen wurde das gleiche Gemisch aus Lysepuffer und Inhibitoren auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und diese durch mehrmaliges rauf- und runter-pipettieren homogenisiert. Nach dem Homogenisieren fand die Inkubation des Gewebe- beziehungsweise Zelllysats für 20 Minuten auf Eis statt, bevor es bei 13 000 xg bei 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand, welche die gelösten Proteine enthielt, wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration fand unter Verwendung von Bradford-Lösung entsprechend den Angaben des Herstellers statt. Jede Probe wurde im Triplikat bei 595 nm gemessen und die Konzentration anschließend mit Hilfe eines ebenfalls gemessenen BSA (bovines Serumalbumin)-Standards berechnet.

### 2.2.6.3. Western Blot Analysen

Zum Nachweis einzelner Proteine wurde das Proteinlysate aus den Geweben bzw. aus den Zellen über eine SDS (engl.: *sodium dodecyl sulfate*; dt.: Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend im *Tank-Blot* auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran übertragen. Um ein unspezifisches Binden der zur Detektion von Proteinbanden genutzten Antikörper zu verhindern, wurde die Membran in 5 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (Tabelle 13), welcher in 2 %iger BSA Lösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C. Nach einem viermal 15-minütigen Waschschrift mit TBS-T (engl.: *Tris-buffered saline with Tween20*) wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten und ebenfalls in 2 %iger BSA-Lösung verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal 15 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor die Detektion der Proteinbanden mit ECL (engl.: *enhanced chemiluminescence*)-Lösung erfolgte. Für diesen Schritt wurden die Lösungen nach Herstellerangaben gemischt und auf eine PVDF-Membran gegeben und *Hyperfilm* darauf gelegt. Die Detektion der Banden erfolgte dabei durch ein Umsetzen des Luminols in der ECL-Lösung durch *horseradish* Peroxidase in die oxidierte Form, dessen Lumineszenz zu einer spezifischen Belichtung des aufgelegten *Hyperfilmes* und somit zur Sichtbarmachung von Proteinbanden führt. Diese visualisierten Banden konnten anschließend wie unter 2.2.9 beschrieben quantifiziert werden.

**Tabelle 13: Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung zur Untersuchung der Insulin-Signalweiterleitung in murinen glatten Gefäßmuskelzellen aus der Pulmonalarterie**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
<b>Akt</b>	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	Cell Signaling #9272
<b>pAkt Thr308</b>	Kaninchen	polyklonal	1 : 2000	Cell Signaling #9275
<b>pAkt Ser473</b>	Kaninchen	monoklonal	1 : 2000	Cell Signaling #4060
<b>Kaninchen</b>	Schwein	polyklonal	1 : 1000	Dako #P0217

*pAkt: phosphoryliertes Akt; Thr: Threonin; Ser: Serin*

### 2.2.6.4. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der Adiponektin-Konzentrationen im Serum der *SmPpar $\gamma$* -Mäuse erfolgte im Duplikat mittels ELISA entsprechend den Herstellerangaben.

## 2.2.7. Histologische Charakterisierung der Mäuse und Ratten

### 2.2.7.1. Histologische Untersuchung der pankreatischen Inseln

Um das Pankreas hinsichtlich der Langerhans-Inseln untersuchen zu können, wurden gefrorene Pankreasschnitte einer Dicke von 5 µm auf SuperFrost™ Plus Objektträgern gebracht und dort für 20 Minuten mit 4 % PFA bei Raumtemperatur fixiert. Nach Waschsritten (zweimal fünf Minuten in PBS) wurden die Schnitte für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 3 % Wasserstoffperoxid inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen. Nach erneutem zweimal fünf-minütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte je 20 Minuten mit einer Avidin- bzw. Biotin-Blockierung inkubiert, um unspezifische Farbreaktionen zu hemmen.

Anschließend wurden die Schnitte zur Detektion Insulin-produzierender Zellen mit einem anti-Insulin Primärantikörper in der Verdünnung 1 : 200 in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert (Tabelle 14). Nach viermal fünf Minuten Waschen der Schnitte in PBS wurden sie mit einem biotinyliertem anti-Maus Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 1000 in PBS inkubiert (Tabelle 14). Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, bildeten zunächst unter Verwendung des ABC Kits von Vectastain, entsprechend den Herstellerangaben, 30 Minuten vor Inkubation auf dem Gewebe Avidin und biotinylierte *horseradish* Peroxidase einen Komplex, welcher dann innerhalb der 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Anschließend findet nach einem Waschschrift von viermal fünf Minuten mit PBS, gefolgt von fünf Minuten mit deionisiertem Wasser die Inkubation der Schnitte mit den nach Herstellerangaben angefertigten Reagenzien aus dem AEC Kit statt. In diesem sind ein Puffer, Wasserstoffperoxid und die Verbindung 3-Amino-5-ethylcarbazol (AEC) enthalten, welche durch das Enzym Peroxidase unter Reaktion mit dem Wasserstoffperoxid zu einem roten Farbkomplex umgesetzt wird. Nach einem Abstoppen der Farbreaktion in deionisiertem Wasser, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gefärbt. Unter fließendem Wasser fand dann das Nachbläuen statt, bevor die gefärbten Schnitte mit Kaiser's Glycergelatine eingedeckt wurden.

Der relative Anteil an β-Zellen im Pankreas wurde als prozentualer Anteil Insulin-positiver Zellen zur Pankreasfläche bestimmt. Zur Aufnahme und Analyse der Bilder wurden das Mikroskop Keyence BZ 900 und die Software ImageJ 1.48 verwendet.

**Tabelle 14: Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper zur Untersuchung der Insulin-produzierenden Zellen im Pankreas von DEP-1 Wildtyp- und knockout-Mäusen**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Hersteller
Insulin	Maus	monoklonal	BIOTREND #MOB234
Maus	Kaninchen	polyklonal	Dako #E0464



### 2.2.7.2. *Proximity Ligation Assay (PLA) – Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor und Phosphorylierungsstatus des Insulinrezeptors in situ*

Um die Rekrutierung der Phosphatase DEP-1 an bzw. die Phosphorylierung des Insulinrezeptors im Lebergewebe von ASO-DEP-1 behandelten und nicht behandelten Mäusen bzw. in ASO-Wildtyp Mäusen mit und ohne Insulininjektion, untersuchen zu können, wurde der *Proximity Ligation Assay (PLA)* verwendet. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Protein-Protein-Interaktionen als auch Proteinmodifikationen wie z.B. Phosphorylierungen nachweisen, sofern Antikörper zur Detektion in räumlicher Nähe vorliegen. Zur Durchführung verwendet man Primärantikörper aus zwei verschiedenen Spezies, welche die zu untersuchenden Proteine bzw. das Protein und seine post-translationale Modifikation (z.B. Phosphorylierung) binden. An diese Primärantikörper binden dann Oligonukleotidgekoppelte Sekundärantikörper, wobei eines der beiden Oligonukleotide eine Primersequenz enthält. Befinden sich diese in kurzer Distanz („*in proximity*“) zueinander, verbindet eine Ligase die Oligonukleotide und eine Polymerase amplifiziert das entstandene Produkt über 100 Mal. In das entstandene Produkt binden Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide, sodass jede Protein-Protein-Interaktion bzw. Proteinmodifikation als fluoreszierender Punkt unter dem Mikroskop sichtbar und eine Quantifizierung der Signale möglich wird.

Zur Untersuchung der Rekrutierung der PTP DEP-1 zum Insulinrezeptor wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte vom Lebergewebe bei 60°C für 1,5 Stunden auf SuperFrost™ Plus Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in Neo-Clear deparaffiniert und zweimal fünf Minuten in einem Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 bei 450 Watt in der Mikrowelle gekocht, um eine Bindung der Antikörper zu ermöglichen. Nach dem Abkühlen und waschen in TBS-T wurden die Schnitte eine Stunde mit 5 % BSA in TBS-T geblockt, bevor sie über Nacht bei 4°C mit den aus verschiedenen Spezies stammenden Primärantikörpern, welche in 5 % BSA/TBS-T verdünnt waren, inkubiert wurden. Für die Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor waren dies ein anti-Insulinrezeptor und anti-DEP-1 Antikörper aus Kaninchen bzw. Maus, für die Phosphorylierung des Insulinrezeptors ein anti-Insulinrezeptor und anti-pY Antikörper aus Kaninchen bzw. Ziege (Tabelle 15). Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten in TBS-T gewaschen, bevor sie mit den PLA Sekundärantikörpern aus dem Duolink Kit bei 37°C für eine Stunde inkubiert wurden. Dazu wurde eine Kombination aus einem anti-Kaninchen MINUS und einem anti-Maus PLUS Sekundärantikörper bzw. anti-Ziege PLUS Antikörper verwendet, welche in 5 % BSA/TBS-T verdünnt waren. Das besondere dieser Sekundärantikörper besteht in der Kopplung eines Oligonukleotids an ihnen, wobei der „PLUS“-Sekundärantikörper einen Primer enthält, der später von einer Polymerase erkannt wird. Nach einem erneuten Waschschrift mit zweimal fünf Minuten in Waschpuffer A, wurden die Gewebeschnitte mit einem verdünnten Ligationsmix aus dem Duolink Kit für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, welcher eine Ligase enthält. Wenn die beiden Zielproteine mit den gebundenen Sekundärantikörpern interagieren und sich somit in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, hybridisieren und binden die Oligonukleotidproben mit zwei zusätzlichen „Verbindungsoligonukleotiden“ und bilden eine ununterbrochene ringförmige DNA-Struktur. Nach einem weiteren Waschschrift für zweimal zwei Minuten in Waschpuffer A wurden die Schnitte mit einem verdünnten Amplifikationsmix aus dem Duolink Kit bei 37°C für 100 Minuten inkubiert. In diesem Mix sind Nukleotide, eine Polymerase und mit einem orangen Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotide enthalten. Während der Inkubation amplifiziert

die Polymerase den DNA-Ring einige Male und die Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide binden in dem entstehenden Produkt. Nach einem finalen Waschschrift mit zweimal zehn Minuten in Waschpuffer B und einmal eine Minute Waschpuffer verdünntem und damit 1 % Waschpuffer B, wurden die Gewebeschnitte mit Eindeckmedium, in welchem DAPI zur Färbung der Zellkerne enthalten war, eingedeckt und für spätere Aufnahmen am Mikroskop bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Die Aufnahmen der Bilder wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop der Firma Keyence mit einer 40-fachen Vergrößerung angefertigt. Dabei wurden Filter zur Visualisierung der DAPI-Färbung, sowie ein FITC Filter zur Visualisierung der PLA Signale, welche auch als *rolling circle products* (RCPs) bezeichnet werden, verwendet. Der Vorteil der PLA-Methode gegenüber herkömmlichen histologischen Färbungen besteht vor allem in der Quantifizierbarkeit der RCPs pro Zelle. Zusätzlich ist es möglich, die genaue bzw. spezifische Lokalisation der Signale auf Einzelzellniveau zu bestimmen. Zur Auswertung der Bilder fand mit der Software Duolink Image Tool statt. Dabei wurde ermittelt, wie viele RCPs mit einer jeweiligen Zelle assoziiert vorlagen.

**Tabelle 15: Eingesetzte Primärantikörper für den Proximity Ligation Assay (PLA)**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Hersteller
Insulinrezeptor	Kaninchen	polyklonal	Abcam #ab5500
DEP-1	Ziege	polyklonal	R&D Systems #AF1934
pY100	Maus	monoklonal	Cell Signaling #9411

### 2.2.7.3. Nachweis von PPAR $\gamma$ in mPASCs

Nach der Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen aus den Pulmonalarterien (mPASCs, engl.: *mouse pulmonary artery smooth muscle cells*) von SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup> und SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>-Mäusen wurden diese Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach dem Adhärenz mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden sie dreimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Triton-X permeabilisiert. Nach dem erneuten Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 5 % BSA blockiert, bevor sie mit den Primärantikörpern gegen alpha *smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA; zur Visualisierung der glatten Gefäßmuskelzellen) und gegen PPAR $\gamma$  inkubiert wurden. Bevor die Zellen mit den Sekundärantikörpern (Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 und Ziege anti- Maus Alexa Fluor 568) inkubiert wurden, erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI, welches sich im Eindeckmedium befand, gegengefärbt. Diese Färbungen wurden von der Arbeitsgruppe des Kooperationspartners Priv.-Doz. Dr. med. Evren Caglayan in Köln durchgeführt.

**Tabelle 16: Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis des PPAR $\gamma$ -knockouts in glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Hersteller
$\alpha$ -SMA	Maus	monoklonal	Sigma Aldrich #A2547
PPAR $\gamma$	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling #2443
Maus	Ziege	polyklonal	ThermoFischer #A11004
Kaninchen	Ziege	polyklonal	ThermoFischer #A11008

$\alpha$ -SMA : *alpha smooth muscle actin*; PPAR $\gamma$ : *Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma*

#### 2.2.7.4. Muskularisierung der pulmonalen Gefäße

Um die eventuellen Druckänderungen zugrundeliegende Veränderungen der Muskularisierung der pulmonalen Gefäße untersuchen zu können, wurden 5  $\mu$ m dicke Schnitte der Lunge im Mausmodell gegen von Willebrand Faktor (vWF) und *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) und für das Rattenmodell gegen  $\alpha$ -SMA Färbung gefärbt (Tabelle 17). Beide Färbungen wurden durch die Pathologie der Universitätsklinik Köln angefertigt (Kolaboration desKooperationspartners Priv.-Doz. Dr. med. Evren Caglayan, Köln). Es wurde anschließend der Anteil der nicht-muskularisierten, partiell muskularisierten und voll-muskularisierten Gefäße ermittelt. Dazu wurden die nicht-muskularisierten als solche definiert, deren Anteil der  $\alpha$ -SMA-positiven Fläche zur gesamten Fläche der Gefäßwand < 25 % betrug. Die partiell muskularisierten Gefäße wurden als solche definiert, deren  $\alpha$ -SMA-positive Fläche zwischen 25 und 75 % lag. Und die voll-muskularisierten Gefäße waren entsprechend solche, bei denen die  $\alpha$ -SMA-positive Fläche mehr als 75 % der Gefäßwandfläche ausmachte. Bei den Mäusen diente die zusätzliche vWF-Färbung der Sichtbarmachung der Endothelzellen, um die nicht-muskularisierten Gefäße, welche bei Mäusen in höherem Maße vorkommen, besser differenzieren zu können.

**Tabelle 17: Eingesetzte Primärantikörper und Detektionskits für die Auswertung der Muskularisierung der pulmonalen Gefäße**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Hersteller	Detektionskit
vWF	Kaninchen	polyklonal	Dako #A0082	Dako #P0397
$\alpha$ -SMA	Maus	monoklonal	Abcam #ab125057	Zytomed #POLAP-100

vWF: *von Willebrand Faktor*;  $\alpha$ -SMA: *alpha smooth muscle actin*

Anhand dieser Färbungen wurde zudem die Lumenfläche mittels Keyence Software ermittelt. Darüber hinaus fand die Ermittlung der prozentualen Mediadicke über die folgende Formel statt (Mediadicke [%]:  $(2 \times \text{Mediadicke} / \text{externen Durchmesser}) \times 100$ ). Für die Lungenschnitte der Ratten wurden diese Untersuchungen von Frau Arnica Behringer (aus der kooperierenden Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Evren Caglayan in Köln) durchgeführt.

### 2.2.7.5. Zellproliferation in den pulmonalen Gefäßen

Zur Untersuchung der pulmonalen vaskulären Proliferation wurden auf 5 µm dicken Schnitten der Lunge im Mausmodell eine Ki67-Färbung und im Rattenmodell eine PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*)-Färbung (Tabelle 18) mit jeweiliger Hämatoxylin- Gegenfärbung zur Sichtbarmachung nicht proliferativer Zellen durchgeführt. Es wurde ein Standardprotokoll zur histochemischen Färbung basierend auf einer Avidin-Biotin-Bindung der Peroxidase an die Antikörper verwendet. Die Gefäße der Lunge wurden mit einer 40 x Vergrößerung aufgenommen und die Anzahl der proliferativ-aktiven Zellkerne (Ki67-positiv bzw. PCNA-positiv) erfasst und ins Verhältnis zu den Hämatoxylin und damit nicht proliferierenden Zellen gesetzt.

**Tabelle 18: Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper bzw. Detektionskit zur Bestimmung der proliferierenden Zellen in den pulmonalen Gefäßen**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Hersteller	Detektionskit
<b>Ki67</b>	Kaninchen	polyklonal	Abcam #ab15580	Histofine #414341F
<b>PCNA</b>	Maus	monoklonal	Dako, #M0879	
<b>Maus</b>	Kaninchen	polyklonal	Dako #E0464	

*Ki67: Antigen Kiel 67; PCNA: Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*

### 2.2.7.6. Kardiomyozytengröße und Fibrose im rechten und linken Ventrikel

Zur Untersuchung kardialer Umbauprozesse wurden 3 µm dicke Schnitte des rechten und linken Ventrikels von Tieren aus dem Maus- und Rattenmodell einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung in der Pathologie der Universitätsklinik Köln unterzogen. Anschließend wurde anhand von Aufnahmen dieser Färbungen der Umfang von je 50 Kardiomyozyten je Tier gemessen. Um fibrotische Veränderungen bestimmen zu können, wurden weitere 3 µm dicke Schnitte des rechten und linken Ventrikels der Ratten nach Massons'-Trichrom-Färbung, welche Ebenfalls durch die Pathologie in Köln angefertigt wurden, ausgewertet. Dazu wurde bei der prozentuale Anteil des Kollagen-positiven Bereiches auf dem gesamten Schnitt ermittelt. Beide Untersuchungen wurden durch Frau Arnica Behringer (aus der kooperierenden Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Evren Caglayan in Köln) für das Rattenmodell durchgeführt.

### 2.2.7.7. Osteopontin in der Lunge

Zur Untersuchung Osteopontin-positiver Bereiche in der Lunge wurden 5 µm dicke Schnitte der Lunge von Tieren aus dem Mausmodell gegen Osteopontin in der Pathologie der Universitätsklinik Köln gefärbt (Tabelle 19). Zusätzlich fand eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin zur Sichtbarmachung der Zellkerne statt. Anhand von 40 x vergrößerten Aufnahmen aus der gefärbten Lunge wurde der Anteil Osteopontin-positiver Bereiche in je fünf zufällig gewählten Ausschnitten je Tier bestimmt.

**Tabelle 19: Eingesetzter Primärantikörper und dessen Detektionskit zur Bestimmung der Osteopontin-positiven Bereiche in der Lunge**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Hersteller	Detektionskit
Osteopontin	Ziege	polyklonal	R&D #AF808	Histofine #414351F

### 2.2.7.8. Fibrose in der Lunge

Zur Untersuchung fibrotischer Veränderungen der Lunge wurden 5 µm Schnitte der Lunge für Tiere aus dem Mausmodell mit Hilfe einer Massons'-Trichrom-Färbung durch die Pathologie in Köln nach Standardprotokoll behandelt. Anschließend wurden pro Tier je fünf Aufnahmen bei 40 x Vergrößerung am Keyence Mikroskop BZ-9000 angefertigt und jeweils der prozentuale Anteil fibrotischer Färbung bestimmt.

### 2.2.7.9. Makrophageninfiltration

Um die Infiltration von Makrophagen in die Lunge bestimmen zu können, wurden für das Mausmodell 5 µm dicke Lungenschnitte gegen F4/80 und für das Rattenmodell gegen CD68 durch die Pathologie der Universitätsklinik Köln gefärbt. Um die Zellkerne sichtbar zu machen fand zudem eine Hämatoxylin-Gegenfärbung statt. Für die Ratten wurden pro Tier zehn zufällig gewählte Bereiche mit einer 200 x Vergrößerung aufgenommen und hinsichtlich der Anzahl der Makrophagen je mm<sup>2</sup> von Frau Arnica Behringer (aus der kooperierenden Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Evren Caglayan in Köln) ausgewertet. Zur Auswertung der Makrophageninfiltration in die Lungen der Mäuse wurden pro Tier je fünf Hauptgesichtsfelder bei 40 x Vergrößerung am Keyence Mikroskop BZ-9000 hinsichtlich der Anzahl der Makrophagen in den Gesichtsfeldern untersucht.

**Tabelle 20: Eingesetzte Primärantikörper und Detektionskits zur Bestimmung der Makrophageninfiltration in die Lunge**

Antikörper gegen	Spezies	Klonalität	Hersteller	Detektionskit
F4/80	Ratte	monoklonal	Thermo Fisher , MA5-16624	Histofine #414311F
CD68	Maus	monoklonal	AbD Serotec #MCA341GA	Zyted #POLAP-100

## 2.2.8. Zellkultur-Methoden

### 2.2.8.1. Isolation und Kultivierung von pulmonal arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen

Zur Isolation von pulmonal arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen (engl.: *pulmonary artery smooth muscle cells*; PAMSCs) wurde die Pulmonalarterie (PA) nach der Entnahme aus der Maus in gekühltes PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin überführt, um sie anschließend unter sterilen Bedingungen von

umliegendem Fettgewebe sowie Bindegewebe zu befreien. Dann wurde die PA in eine auf 37°C vorgewärmte Enzymlösung (Collagenase Typ I, Elastase, Trypsin Inhibitor und DMEM mit 20 % FBS (fetales Kälberserum; engl.: *fetal bovine serum*)) überführt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abbrechen des Enzymverdaus wurde die PA in 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen. Die Adventitia wurde mit zwei Pinzetten entfernt, bevor die PA längs mit einer Schere aufgeschnitten und die Epithelzellen abgeschabt wurden. Schließlich wurde die PA in kleine Stücke geschnitten und diese in ein Reaktionsgefäß mit 2 ml Enzymlösung überführt und in diesem bei 37°C für 1,5 Stunden verdaut. Um den Enzymverdau abzubrechen, wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen bei 5000 U/min für zwei Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml DMEM mit 20 % FBS resuspendiert und je zwei solcher Pellets aus insgesamt zwei PAs wurden zusammen in eine 3 cm Kulturschale überführt. Nachdem die Zellen nach sechs bis acht Tagen 90 % konfluent waren, wurden sie in eine 10 cm Kulturschale überführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, bevor sie mit Trypsin inkubiert wurden. Nach dem Ablösen der Zellen wurde der Verdau mit Trypsin mit Hilfe von DMEM mit 20 % FBS gestoppt und die Zellen bei 1200 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in DMEM mit 20 % FBS resuspendiert und die Zellen wie oben beschrieben in eine 10 cm Zellkulturschale überführt.

Die Kultivierung der PSMCs erfolgte anschließend in DMEM mit 20 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen 1 : 3 subkultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

#### **2.2.8.2. Behandlung Insulin-stimulierter Zellen mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon**

Um einen möglichen Unterscheid in der Insulin-induzierten Signaltransduktion in mPSMCs von SmPpar $\gamma^{+/+}$ - und SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäusen mit und ohne Pioglitazon-Stimulation zu untersuchen, wurden die Zellen mit Pioglitazon vorbehandelt. Dazu wurden die mPSMCs 16 Stunden mit Pioglitazon (100 nM) in DMEM mit 0,5 % FBS inkubiert. Anschließend wurden sie für zehn Minuten mit Insulin (10 nM) in DMEM mit 0,5 % FBS stimuliert, bevor sie dreimal mit 4°C kalten PBS gewaschen und mit Ripa-Puffer lysiert und in einem Reaktionsgefäß auf Eis gestellt wurden. Daran schlossen sich Proteinisolation und Western Blot Analysen an.

#### **2.2.9. Densitometrische Analyse und statistische Auswertung**

Zur Quantifizierung der Western Blots wurde die Software ImageJ (Version 1.46r) verwendet. Die statistischen Auswertungen sowie Erstellung der Diagramme zur visuellen Veranschaulichung der erhobenen Daten fanden mit Prism GraphPad und MS Office Excel statt. Dabei wurden statistische Signifikanzen mit parametrischen (t-Test, ANOVA, Varianzanalyse mit Messwiederholung) und nicht-parametrischen Test (Kruskal Wallis) in SPSS und GraphPad in Zusammenarbeit mit Priv.-Doz. Dr. med. Ernst Wellnhofer (Deutsches Herzzentrum Berlin) berechnet. Bei Mehrfachvergleichen wurde *post-hoc* mit Tukey korrigiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  *standard error of the mean* (SEM) dargestellt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

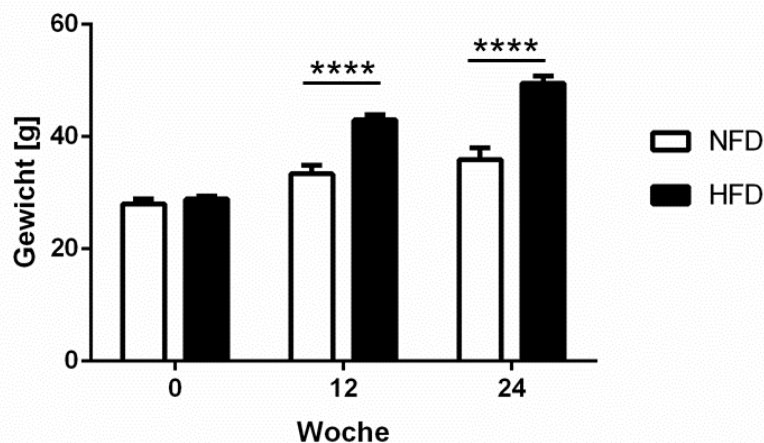
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Metabolische Charakterisierung von Mäusen unter Niedrig- und Hochfettdiät

Durch die Fütterung einer Hochfettdiät ist es möglich, Mäuse metabolisch dahingehend zu modifizieren, dass es zu pathologischen Veränderungen wie z.B. der Ausbildung einer Insulinresistenz kommt. Ein Teil der diesem Phänomen zugrunde liegenden Mechanismen wurde im Folgenden mit Hilfe verschiedener Mausmodelle untersucht.

##### 3.1.1. Einfluss einer Hochfettdiät auf die Gewichtszunahme

Die *SmPpary<sup>+/-</sup>*-Mäuse wurden entweder mit einer Hochfettdiät (HFD), bei der die Tiere 60 % ihrer Kalorien über Fett, oder einer Niedrigfettdiät (NFD) als Kontrolldiät gefüttert, bei der sie 10 % ihrer Kalorien über Fett zu sich nahmen. Dies führte zu einem höheren Gewichtsanstieg für die HFD-gefütterten Tiere (Abbildung 5). So wogen die HFD-gefütterten Mäuse nach zwölf Wochen bereits im Mittel 9,6 g mehr als die Tiere, welche mit einer NFD ( $33,35 \pm 1,53$  g) gefütterten wurden. Nach 24 Wochen betrug die Differenz zwischen beiden Gruppen im Mittel 13,6 g (NFD  $35,93 \pm 2,04$  g), was einem prozentualen Unterschied des Gewichtes von 27,5 % entsprach.



**Abbildung 5: Körpergewicht von *SmPpary<sup>+/-</sup>*-Mäusen [in Gramm] in Abhängigkeit des Fettgehaltes der Nahrung zum Zeitpunkt 0, nach 12 und 24 Wochen**

Dargestellt sind die Gewichte der *SmPpary<sup>+/-</sup>*-Mäuse unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD;  $n = 11$  bzw. HFD;  $n = 16$ ) zu Versuchsbeginn (Woche 0) sowie nach zwölf und 24 Wochen (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

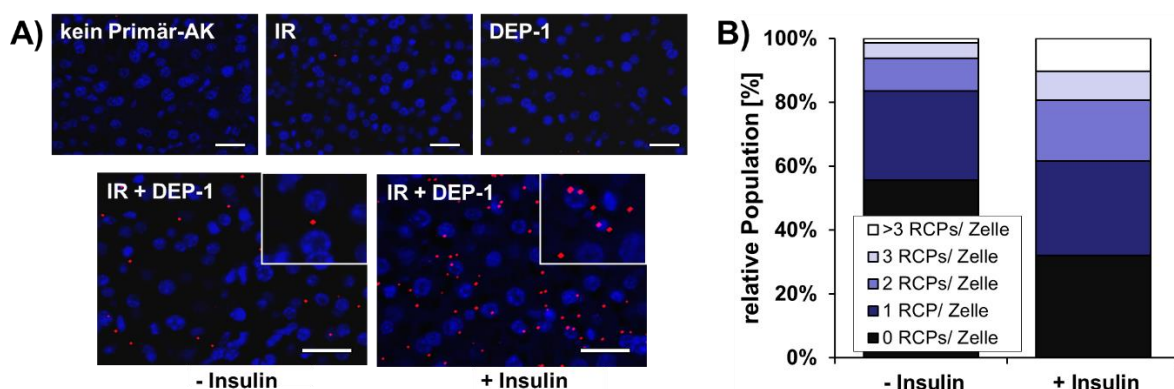
##### 3.1.2. Einfluss einer Hochfettdiät auf die Interaktion von DEP-1 mit dem Insulinrezeptor und auf die $\beta$ -Zellen des Pankreas

Neben einer Erhöhung des Gewichtes durch einen höheren Fettanteil in der Nahrung führt eine solche Diät zu einer verschlechterten Insulinsensitivität in den Mäusen (Howard 2002). Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Daten aus diabetischen Mausmodellen, dass es zu einer veränderten Regulation von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) kommt (Goldstein 2002, Zabolotny *et al.* 2008). Zudem konnte im Gewebe adipöser Menschen eine

erhöhte Expression und Aktivität von PTPs nachgewiesen werden (Ahmad *et al.* 1997a, Ahmad *et al.* 1997b). Es gibt auch Hinweise aus einem *in vitro* Experiment, dass die PTP DEP-1 einen Einfluss auf die Insulin-induzierte Signaltransduktion hat, was in Form der Dephosphorylierung eines Insulinrezeptor-ähnlichen Phosphopeptides gezeigt wurde (Walchli *et al.* 2000). Daher fand in der vorliegenden Arbeit die Analyse der Insulin-induzierten Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor, sowie die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung und damit Aktivierung/Inaktivierung des Insulinrezeptors statt. Die Untersuchungen erfolgten in der Leber von C57/BL6J Mäusen, die mit einer NFD oder HFD gefüttert wurden.

### Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor

Zur Untersuchung der Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor wurde der *Proximity Ligation Assay* (PLA) verwendet. Mit dieser *in situ* Methode können Proteininteraktionen untersucht werden, bei welchen sich die Proteine in einen Abstand von weniger als 30 nm zueinander befinden. Es zeigte sich, dass die Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor im Lebergewebe von Mäusen, denen zwei Minuten vor der Tötung Insulin appliziert wurde, deutlich höher war. Der Nachweis erfolgte durch eine höhere Zahl von RCPs pro Zelle (RCPs: *rolling circle products* = fluoreszierende Signale) als bei Tieren ohne Insulingabe (Abbildung 6).



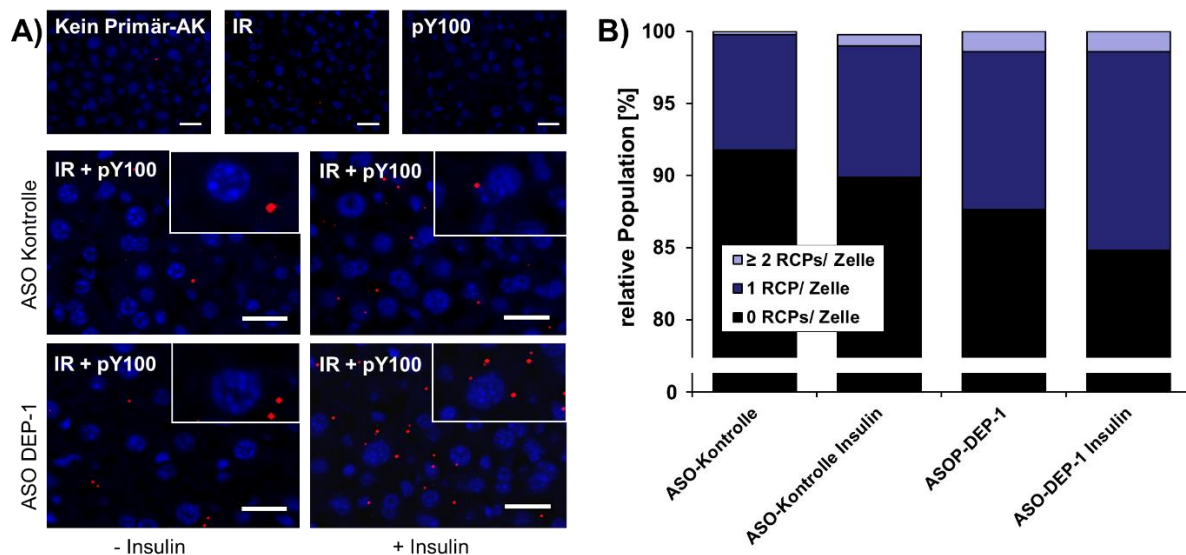
### Abbildung 6: Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase DEP-1 zum Insulinrezeptor (IR)

In murinem Lebergewebe von Kontroll-ASO behandelten Mäusen mit und ohne Insulininjektion (10 U/kg Körpergewicht) zwei Minuten vor Tötung (ASO-Kontrolle ohne Insulin,  $n = 3$ ; ASO-Kontrolle mit Insulin,  $n = 5$ ; ASO-DEP-1 ohne Insulin,  $n = 3$ ; ASO-DEP-1 mit Insulin,  $n = 6$ ) wurde mittels PLA (rote Punkte) die Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor bestimmt. Die Zellen wurden mit DAPI (blau, Zellkernfärbung) gegengefärbt. A) Darstellung repräsentativer Bilder (Maßstabsbalken: 25  $\mu$ m) und den dazugehörigen Kontrollfärbungen (Bilder in der oberen Reihe) zur Untersuchung der Spezifität der Primär- und Sekundärfärbungen (kein Primär-AK: nur Sekundärfärbung ohne Primärfärbung, IR: anti-Insulinrezeptorantikörper mit Sekundärfärbung, DEP-1: anti-DEP-1 Antikörper mit Sekundärfärbung). B) Quantifizierung der PLA Signale pro Zelle (RCPs/Zelle), dargestellt als Prozentanteil jeder Gruppe mit einer bestimmten Anzahl von Signalen je Zelle ( $n=350-500$  Zellen).



### Phosphorylierung des Insulinrezeptors *in situ*

Um zu zeigen, dass DEP-1 nach der Rekrutierung zum Insulinrezeptor diesen auch dephosphoryliert, wurde die PLA-Methode auf Lebergewebe von Kontroll-ASO und DEP-1-ASO Mäusen mit und ohne Insulininjektion (10 U/kg Körpergewicht) zwei Minuten vor der Tötung (n=11) angewendet. Durch die Behandlung mit Antisense Oligonukleotiden (ASOs) gegen DEP-1 wird die mRNA durch die diese gebunden und kann nicht mehr in ein funktionsfähiges Protein translatiert werden. Da ASOs in Geweben wie Leber, Niere, Milz, Knochenmark und Fettgewebe akkumulieren, eignen sie sich zur gewebespezifischen Therapie verschiedener Krankheiten. Die durchgeführte PLA zeigte eine höhere Phosphorylierung des Insulinrezeptors nach Insulin-Stimulation (Abbildung 7). Durch die DEP-1-ASO Behandlung der Mäuse wurde die Phosphorylierung des Insulinrezeptors noch einmal zusätzlich verstärkt.



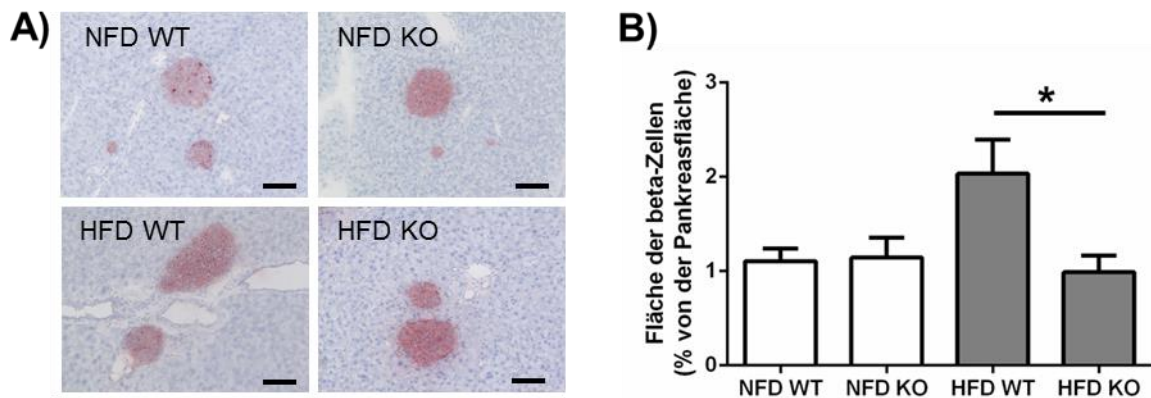
**Abbildung 7: Untersuchung der Phosphorylierung des Insulinrezeptors**

Die Untersuchung der Phosphorylierung des Insulinrezeptors fand in murinem Lebergewebe von Kontroll-ASO bzw. DEP-1-ASO behandelten Mäusen mit und ohne Insulininjektion (10 U/kg Körpergewicht) zwei Minuten vor Tötung statt (n=11). A) Die Insulinrezeptorphosphorylierung an Tyrosinresten wurde über *in situ* PLA (rote Punkte), unter Verwendung von anti-Insulinrezeptor (IR) und anti-Phosphotyrosin Antikörpern (pY100), detektiert. Die Zellen wurde mit DAPI (blau, Zellkern) gegengefärbt. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurden Kontrollschnitte mit den einzelnen Primärantikörpern (IR bzw. pY100) bzw. nur mit den Sekundärantikörpern (kein Primär-AK) inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder (Maßstabsbalken: 25  $\mu$ m). B) Die Quantifizierung der Signale pro Zelle ist in Prozent für jede Gruppe mit einer bestimmten Anzahl von Signale pro Zelle angegeben (n=424-458 Zellen pro Gruppe)

### Einfluss einer Hochfett diät und eines DEP-1-knockouts auf die $\beta$ -Zellen des Pankreas

Phänotypisch zeigte sich eine HFD-induzierte Veränderung der Insulinsensitivität auch auf histologischer Ebene anhand der Fläche der Insulin-produzierenden Zellen ( $\beta$ -Zell-Inseln) im Pankreas. Durch die verringerte Insulinsensitivität der peripheren Zellen müssen die  $\beta$ -Zellen des Pankreas erhöhte Mengen an Insulin produzieren. Über die Zeit nimmt daher die Anzahl der  $\beta$ -Zellen und damit die Fläche der  $\beta$ -Zell-Inseln im Pankreas zu (Kloppel *et al.* 1985). Die immunohistologische Färbung von Insulin auf den Pankreasschnitten zeigte eine Zunahme der positiv gefärbten Fläche unter HFD.

Durch einen *knockout* von DEP-1 wurde eine solche HFD-induzierte Vergrößerung der pankreatischen Inseln unterbunden, sodass die Insulin-positiv gefärbten Flächen im Pankreas dieser Mäuse unverändert zu den NFD-gefütterten Tieren war (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Hochfettdiät-induzierte Veränderungen der pankreatischen Inseln im *Ptptrj* (DEP-1)-knockout-Modell der Maus.**

A) Repräsentative Bilder von immunohistochemisch gefärbten Pankreasschnitten, die Insulin-positiv gefärbte Zellen zeigen (Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m). B) Bestimmung der Fläche der pankreatischen  $\beta$ -Zellen von NFD- und HFD-Wildtyp-Mäusen, sowie NFD- und HFD-*Ptptrj*-knockout-Mäusen ( $n=8-10$  pro Gruppe).

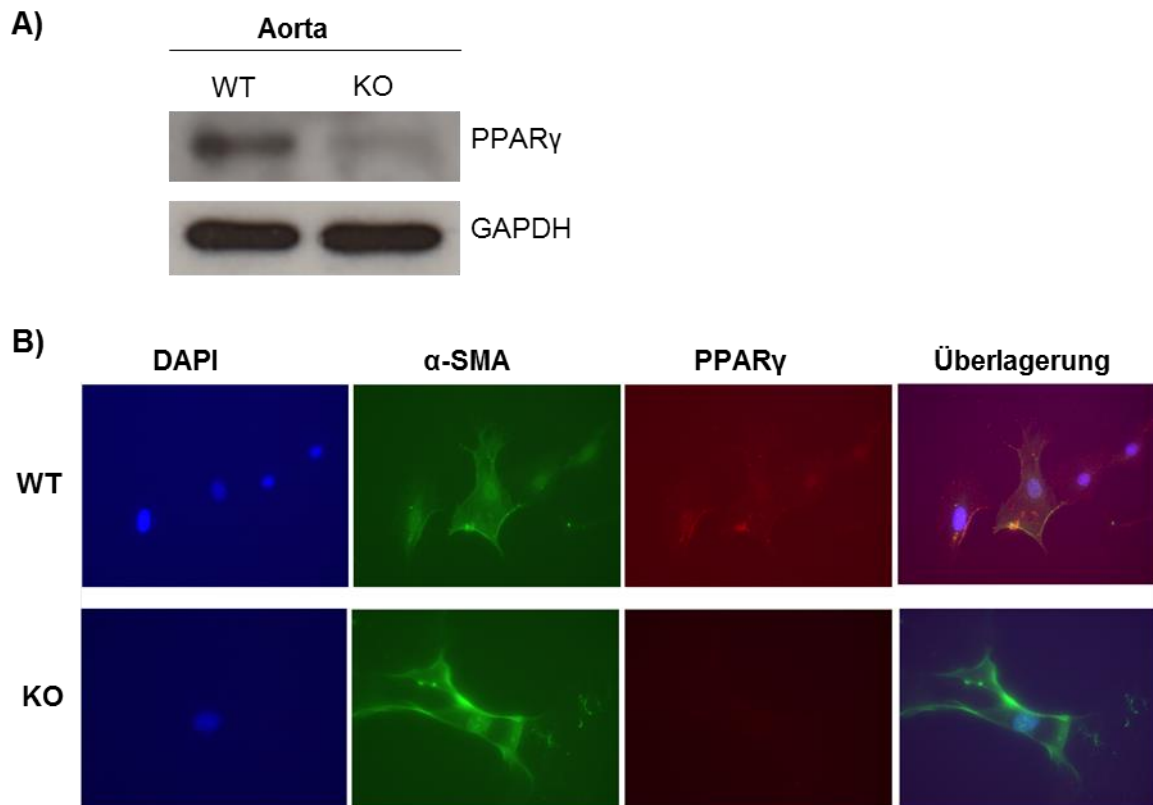
Diese Daten unterstützen damit die Auffassung, dass DEP-1 ein negativer Regulator in der Insulin-induzierten Signaltransduktion auf der Stufe des Insulinrezeptors darstellt. Damit könnte DEP-1 ein potenzielles Zielmolekül zur Behandlung der Insulinresistenz darstellen.

### 3.2. Einfluss einer HFD auf *SmPpary*<sup>-/-</sup>-Mäuse und deren Wildtypen

Eine Möglichkeit die Insulinsensitivität zu verbessern, besteht in der Gabe von PPAR $\gamma$ -Agonisten. Welche Rolle dabei ein PPAR $\gamma$ -knockout in glatten Gefäßmuskelzellen von Mäusen hinsichtlich metabolischer Veränderungen hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit in diversen Untersuchungen wie der zweimal wöchentlichen Gewichtsbestimmung, Insulin- und Glukosetoleranztests sowie Untersuchungen mittels NMR und TSE LabMaster analysiert.

#### 3.2.1. Nachweis von PPAR $\gamma$ in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta

Der erfolgreiche *knockout* des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs) wurde auf Proteinebene im Western Blot und durch immunohistologische Färbung untersucht (Abbildung 9). Dazu wurden Pulmonalarterien aus *SmPpary*<sup>-/-</sup>-Mäusen und entsprechenden Wildtypen verwendet. Im Western Blot zeigte sich eine verringerte Expression von PPAR $\gamma$  in den *knockout*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen. Im Einklang mit diesem Ergebnis zeigte auch die immunohistologische Färbung von mPASCs (murine glatte Gefäßmuskelzellen aus der Pulmonalarterie), dass die PPAR $\gamma$ -Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von *SmPpary*<sup>-/-</sup>-Mäusen aufgehoben war.



**Abbildung 9: Nachweis von PPAR $\gamma$  in der Aorta und in glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie**

A) Zum Nachweis des knockouts von PPAR $\gamma$  in den glatten Gefäßmuskelzellen der SmPpary<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden Proteinlysate aus Aorten von SmPpary<sup>+/+</sup>- und SmPpary<sup>-/-</sup>-Mäusen (WT und KO) im Western Blot aufgetrennt und gegen PPAR $\gamma$  und GAPDH als Ladekontrolle gefärbt (Western Blot). B) Repräsentative Bilder der immunohistochemischen Färbung von mPASCs aus SmPpary<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO) und den Wildtypen der gleichen Zucht gegen  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin) zur Darstellung glatter Gefäßmuskelzellen (grüner Kanal) sowie Färbung von PPAR $\gamma$  (roter Kanal) mit DAPI-Gegenfärbung (blauer Kanal) und Überlagerung aller drei Kanäle.

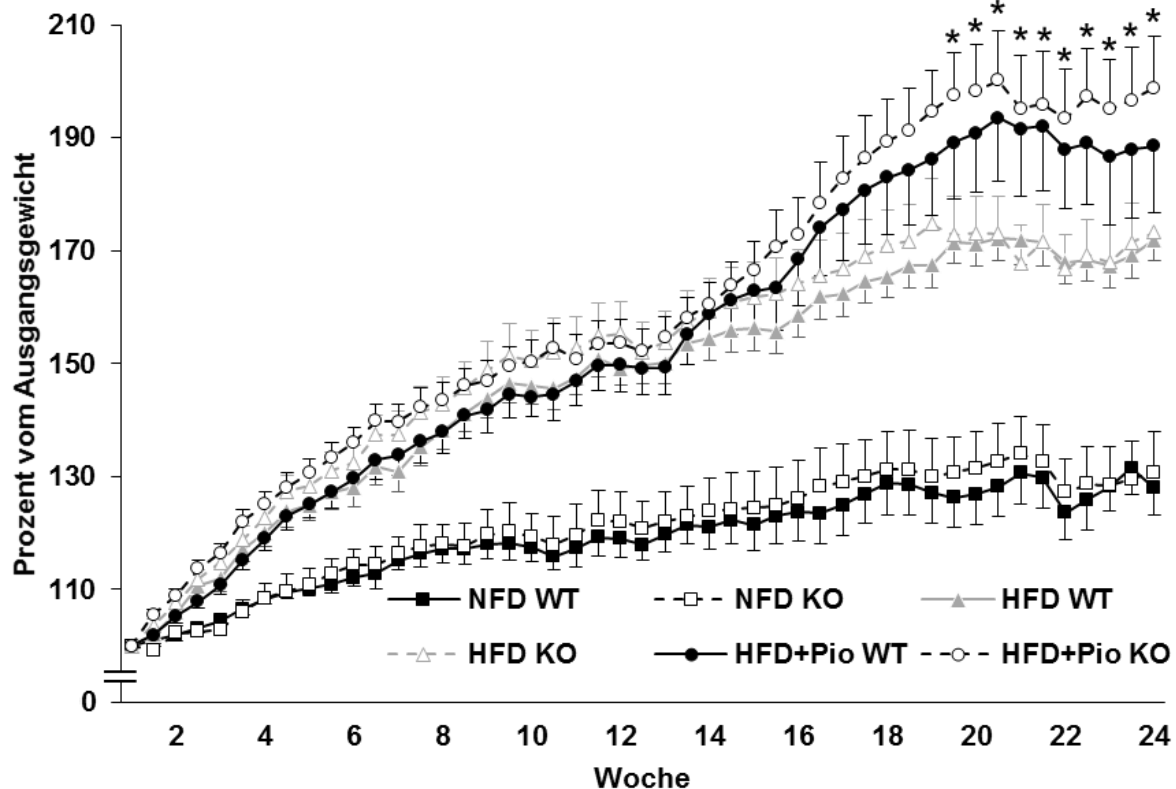
### 3.2.2. Metabolische Charakterisierung von SmPpary-Mäusen

#### 3.2.2.1. Gewichtsverlauf

In ApoE-knockout Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass eine HFD neben einer Insulinresistenz auch eine Erhöhung des rechtsventrikulären Druckes (RVSP) bedingt (Hansmann *et al.* 2007). Zudem konnten Hansmann *et al.* zeigen, dass ein *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen zu einem Anstieg des RVSPs führt (Hansmann *et al.* 2008). Ob eine HFD im hier untersuchten Modell des PPAR $\gamma$ -knockouts in glatten Gefäßmuskelzellen zu einem erhöhten RVSP führt und ob eine Behandlung mit Pioglitazon dabei in der Lage ist, diesen Druck zu reduzieren, wurde im Folgenden untersucht.

Zunächst wurde das Gewicht der Tiere zweimal wöchentlich über den Zeitraum von 24 Wochen bestimmt (Abbildung 10). Ab der zweiten Wochen unter Hochfettdiät zeigte sich für HFD-gefütterte Mäuse bereits ein signifikanter ( $p < 0,01$ ) und ab Woche vier ein hoch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Anstieg des Gewichtes gegenüber NFD-gefütterten Tieren (Signifikanzen zur besseren Darstellung der Kurvenverläufe nicht in der Abbildung dargestellt). Pioglitazon, welches einem Teil der HFD-gefütterten Tiere nach den ersten zwölf Versuchswochen für weitere zwölf Wochen verabreicht wurde, führte zu

einem weiteren Anstieg des Gewichtes. Dabei waren die Pioglitazon-behandelten HFD-SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse in den Wochen 19 bis 24 signifikant ( $p < 0,05$ ) schwerer als die HFD-gefütterten SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse ohne Pioglitazon. Über fast den gesamten Zeitraum des Versuches waren die SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse beider Diät- bzw. Behandlungsgruppen zudem durch ein tendenziell höheres Gewicht charakterisiert, als die jeweiligen SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>-Mäuse.



**Abbildung 10: Gewichtsentwicklung im Verlauf der HFD bzw. der zusätzlichen Pioglitazon-Behandlung im Vergleich zur NFD in SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup> (WT)- und SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen**

Es wurden acht bis zwölf Wochen alte SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>- (WT; n=42) und SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup> (PPAR $\gamma$ -knockout in glatten Gefäßmuskelzellen, KO; n=41)-Mäuse in den Versuch einbezogen. Über den gesamten Versuchszeitraum von 24 Wochen wurde das Körpergewicht der Mäuse zweimal wöchentlich bestimmt. Während der ersten zwölf Wochen wurden die Mäuse in zwei randomisierten Gruppen mit einer Niedrigfettdiät (NFD; n=21) oder Hochfettdiät (HFD; n=62) gefüttert. In den darauf folgenden zwölf Wochen wurde ein Teil der Mäuse der HFD-Gruppe zusätzlich mit Pioglitazon behandelt (HFD+Pio; n=29). (\*  $p < 0,05$  HFD KO vs. HFD+Pio KO; NFD vs. HFD ab Woche zwei signifikant ( $p < 0,01$ ) und ab Woche vier hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) – zugunsten einer besseren Visualisierung der Kurvenverläufe sind diese Signifikanzen in der Abbildung nicht dargestellt) (Mittelwert $\pm$ SEM)

### 3.2.3. Analyse des Pioglitazon-Serumspiegels

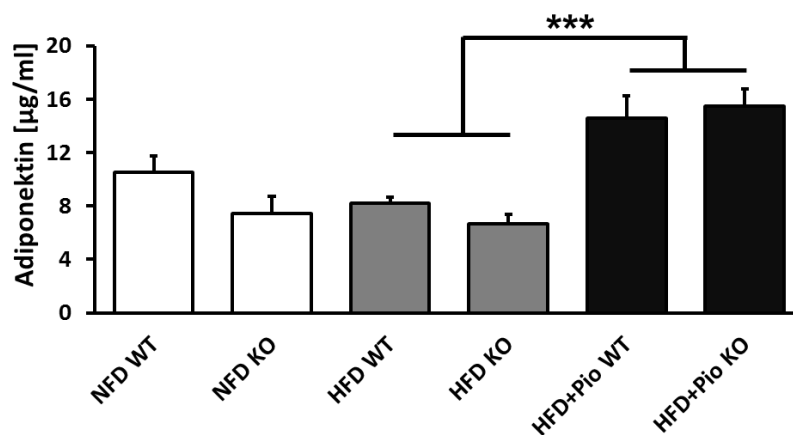
Um eine wirksame Verabreichung von Pioglitazon über das Futter nachzuweisen, wurde der Serumspiegel von Pioglitazon untersucht (Tabelle 21). Im Serum aller vier stichprobenartig gewählten Tiere konnte Pioglitazon nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden zwei Metabolite (III und IV) im Serum gemessen, die eine funktionierende Verstoffwechslung des Pioglitazons anzeigen. So wurden im Serum aller Tiere die Metabolite III und IV nachgewiesen.

**Tabelle 21: Serumspiegel von Pioglitazon sowie dessen Metabolite III und IV in vier stichprobenartig gewählten Pioglitazon-behandelten Mäusen.**

Tier Nr.	Pioglitazon (Pio) [ng/ml]	Pio-Metabolit III [ng/ml]	Pio-Metabolit IV [ng/ml]
1	1265	68,95	107,45
2	1850	91,65	290,5
3	1225	103,5	445,5
4	2150	151	452

#### 3.2.3.1. Analyse der Adiponektin-Serumkonzentration

Um neben dem Vorhandensein von Pioglitazon auch einen Effekt von Pioglitazon auf Adipokine nachzuweisen, wurden die Adiponektinkonzentrationen im Serum der Mäuse gemessen. Dabei zeigte sich eine leichte Reduktion der Konzentration für *SmPpary*<sup>-/-</sup>-Mäuse unter NFD und HFD gegenüber den entsprechenden Wildtypen (nicht signifikant). Pioglitazon führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Adiponektinkonzentration (Abbildung 11).

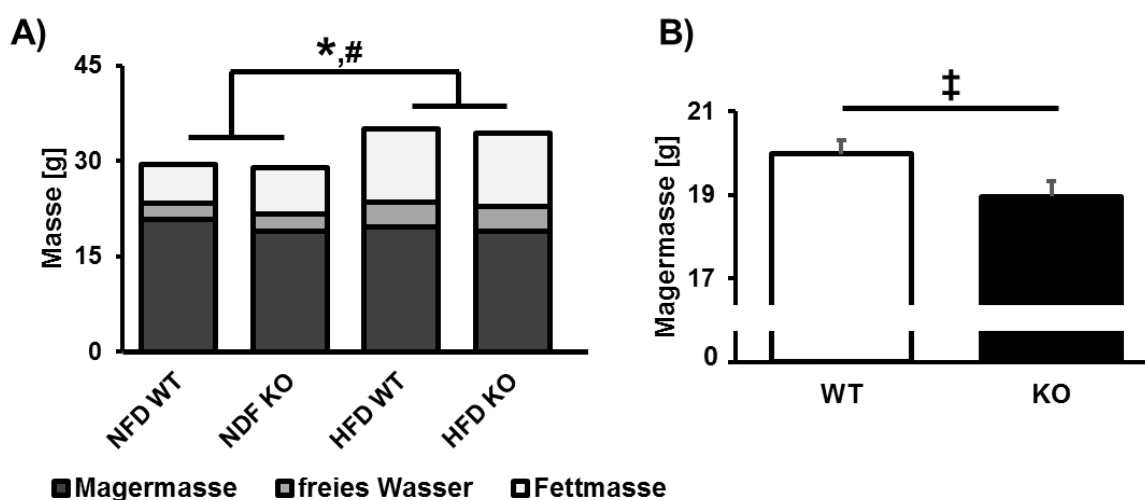


**Abbildung 11: Bestimmung der Adiponektin-Serumspiegel mittels ELISA in *SmPpary*<sup>+/+</sup>(WT)- und *SmPpary*<sup>-/-</sup>(KO)-Mäusen.**

Zur Bestimmung der Adiponektin-Serumspiegel wurde Serum der Mäuse gesammelt und die Adiponektin-Konzentration [µg/ml] mittels ELISA gemessen (n=5-6 pro Gruppe). (\*\*\*) p < 0,001; Abkürzungen: WT: Wildtyp; KO: knockout; NFD: Niedrigfettdiät; HFD: Hochfettdiät; Pio: Pioglitazon.

### 3.2.3.2. Untersuchung der Körperzusammensetzung mittels NMR

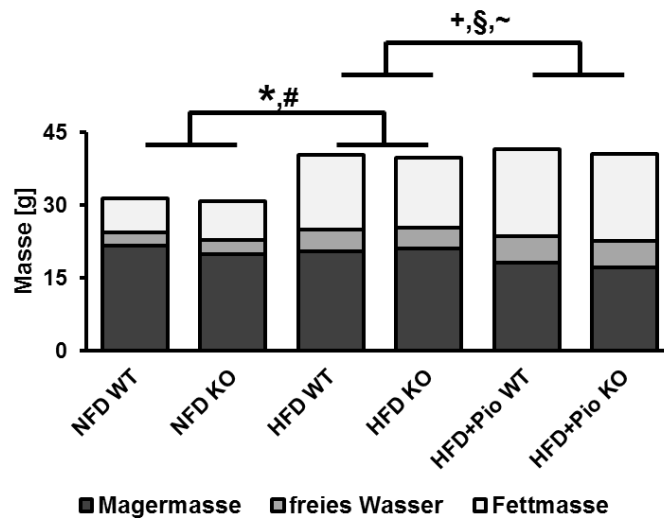
Um die Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen genauer beschreiben zu können, wurde die Körperzusammensetzung der Mäuse nach zwölf Wochen und 24 Wochen mittels NMR bestimmt. Dabei wurden die Fettmasse, die Menge an freiem Wasser und die Magermasse bestimmt (Abbildung 13). Nach zwölf Wochen NFD bzw. HFD zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Magermasse und des freien Wassers zwischen den Gruppen (Abbildung 12 A). Die zuvor gezeigte Gewichtszunahme der HFD-gefütterten *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*- und *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse war damit über einen signifikant erhöhten Fettanteil bedingt. Daneben zeigte sich eine Reduktion der Magermasse in *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen, wenn man die Tiere der NFD zusammen mit denen der HFD nach Genotyp getrennt betrachtet (Abbildung 13 B).



**Abbildung 12:** Darstellung der Körperzusammensetzung der *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*(WT)- und *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>* (KO)-Mäuse nach zwölf Wochen.

A) Zur Bestimmung der Magermasse, des Anteils an freiem Wasser sowie des Fettanteils am Körpergewicht wurden die Mäuse aller Gruppen nach zwölf Wochen Versuchswochen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie; engl.: nuclear magnetic resonance) gemessen (NFD, n=10-12; HFD, n=31-32). Zur Darstellung des Genotyp-bedingten Effektes ist in B) die Magermasse aller Diät- bzw. Behandlungsgruppen für die jeweiligen Genotypen zusammengefasst dargestellt (Wildtyp, n=43; *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse, n=42). (\* p < 0,05 Fettmasse NFD vs. HFD; # p < 0,05 freies Wasser NFD vs. HFD; ‡ p < 0,05 WT vs. KO); Abkürzungen: WT, Wildtyp; KO, knockout; NFD, Niedrigfettdiät; HFD, Hochfettdiät.

Nach den ersten zwölf Wochen wurde ein Teil der HFD-gefütterten Tiere für weitere zwölf Wochen mit Pioglitazon behandelt, sodass sechs Gruppen im NMR gemessen wurden. Hier zeigte sich eine weitere Zunahme der Fettmasse in der HFD-gefütterten Gruppe für beide Genotypen (Abbildung 13). Die Magermasse von NFD- und HFD-gefütterten Tieren war unverändert. Das erhöhte Gewicht der Pioglitazon-behandelten Mäuse war durch eine signifikante Erhöhung des Fettgewebes sowie freien Wassers bedingt. Die Magermasse war bei Pioglitazon-behandelten Mäusen unter HFD hingegen signifikant gegenüber HFD-gefütterten ohne Pioglitazon-Behandlung reduziert.



**Abbildung 13:** Darstellung der Körperzusammensetzung der *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>* (WT)- und *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>* (KO)-Mäuse nach 24 Wochen.

Zur Bestimmung der Magermasse, des Anteils an freiem Wasser sowie des Fettanteils am Körpergewicht wurden die Mäuse aller Gruppen nach 24 Versuchswochen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie; engl.: nuclear magnetic resonance) gemessen (NFD, n=10-11; HFD, n=16; HFD+Pio, n=13). (\* p < 0,05 Fettmasse NFD vs. HFD; # p < 0,05 freies Wasser NFD vs. HFD; ‡ p < 0,05 WT vs. KO; + p < 0,05 Fettmasse kein Pioglitazon vs. Pioglitazon; § p < 0,05 freies Wasser kein Pioglitazon vs. Pioglitazon; ~ p < 0,05 Magermasse kein Pioglitazon vs. Pioglitazon); Abkürzungen: WT, Wildtyp; KO, knockout; NFD, Niedrigfettdiät; HFD, Hochfett diät; Pio, Pioglitazon.

### 3.2.3.3. Bestimmung der Organgewichte

Um detaillierter zu bestimmen, welche Art von Fettgewebe bzw. welche Organe an der Gewichtsveränderung beteiligt waren, wurden *post mortem* verschiedene Organe entnommen und gewogen (Tabelle 22). So zeigte sich, dass bereits der *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskeln zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der Masse von Leber sowie perirenalem, braunem und epididymalem Fettgewebe führte. Die HFD führte zu einem signifikanten Anstieg des perirenen sowie epididymalen Fettgewebes. Das Lebergewicht war in HFD-gefütterten Mäusen ebenfalls erhöht (nicht signifikant), wohingegen das Gewicht des braunen Fettgewebes und der Niere durch die HFD nicht verändert wurde. Die Pioglitazon-Behandlung führte für das epididymale Gewicht zu einem leichten, nicht signifikanten Gewichtsanstieg und für das braune Fettgewebe zu einem signifikanten Anstieg der Masse um mehr als das Vierfache. Die Masse der Leber, Niere und des perirenen Fettgewebes wurde durch die Pioglitazon-Behandlung hingegen nicht beeinflusst.

**Tabelle 22: Darstellung einzelner Organgewichte [in Gramm] von *SmPpar*<sup>+/+</sup> (WT)- und *SmPpar*<sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen unter Niedrig- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und nach Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio)**

Die Organe wurden nach der Tötung der Tiere entnommen und gewogen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Abkürzungen: FG, Fettgewebe; kPio, kein Pioglitazon; Pio, Pioglitazon (\*  $p < 0,05$ ).

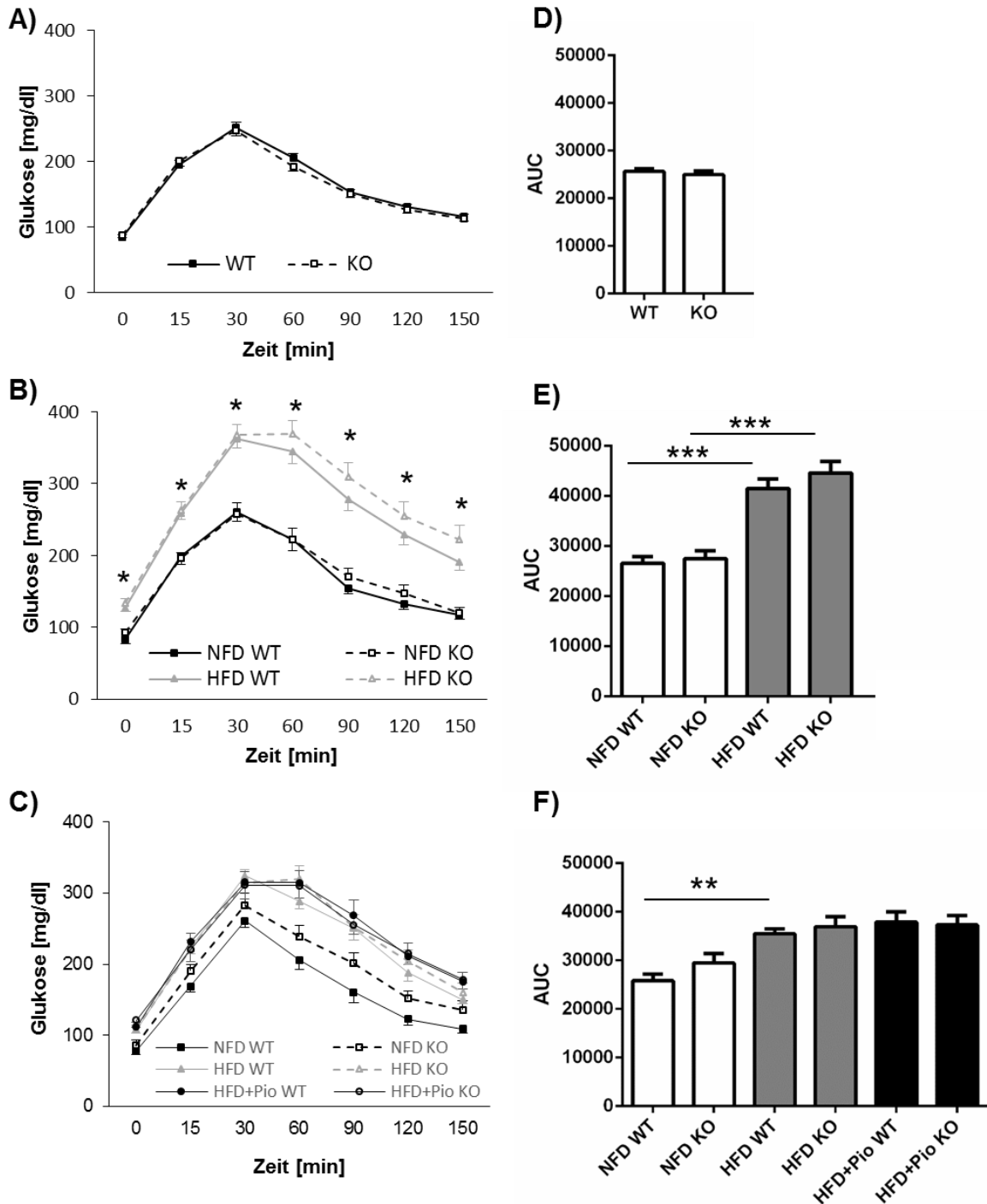
	NFD WT	NFD KO	HFD WT	HFD KO	HFD+Pio WT	HFD+Pio KO	P	n
Leber	1,4 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,8		10 - 16
Niere	0,5 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2		10 - 16
Perirenales FG	0,5 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 1,1	1,8 $\pm$ 1,0	NFD vs. HFD*	10 - 15
Braunes FG	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 2,1	1,0 $\pm$ 1,2	kPio vs. Pio*	9 - 11
Epididymales FG	0,8 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 2,4	1,8 $\pm$ 1,4	NFD vs. HFD*	9 - 16

### 3.2.3.4. Untersuchung der Glukoseverwertung mittels GTT

Um mögliche weitere metabolische Einflüsse des *knockouts*, der Diäten und der Pioglitazon-Behandlung zu identifizieren, wurden die Tiere hinsichtlich ihrer Glukose- und Insulinsensitivität untersucht. Dazu fanden zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt 0) sowie nach zwölf und 24 Wochen Glukose- und Insulin-Toleranz-Tests (GTT und ITT) statt, deren Ergebnisse zum einen als Kurvenverlauf und zum anderen als Fläche unter der Kurve (AUC; engl.: *area under the curve*) dargestellt sind (Abbildung 14). Zu Versuchsbeginn zeigten sowohl die *SmPpar*<sup>+/+</sup>-Mäuse als auch die Mäuse mit *PPAR* $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen keinen Unterschied hinsichtlich der Glukoseverlaufskonzentration im Blut bzw. im Bezug auf die entsprechende AUC. Nach zwölf Wochen auf HFD kam es zu einer signifikanten Verschlechterung der Glukosetoleranz der Mäuse gegenüber den NFD-gefütterten Tieren, was sich sowohl in den Glukoseverlaufskonzentrationen, als auch den entsprechenden AUCs zeigte. Zudem konnte zu diesem Zeitpunkt bei HFD-gefütterten Mäusen eine tendenziell schlechtere Glukosetoleranz für die *SmPpar*<sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber den Wildtypen verzeichnet werden. Nach 24 Wochen konnte man diesen Genotyp-bedingten Effekt auch unter der NFD sehen. Die HFD-gefütterten Mäuse zeigten nach 24 Wochen eine ähnlich verschlechterte Glukosetoleranz wie bereits nach zwölf Wochen. Die Pioglitazon-Behandlung HFD-gefütterter Mäuse hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Glukosetoleranz.

Zusammenfassend zeigten sich eine tendenzielle Verschlechterung der Glukoseverwertung durch den *PPAR* $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen und eine signifikante Verschlechterung durch die Hochfettdiät. Pioglitazon hatte keinen Einfluss auf den Blutglukoseverlauf unter den gewählten Versuchsbedingungen.





**Abbildung 14:** Glukose-Toleranz-Test (GTT) unter NFD bzw. HFD sowie nach pharmakologischer Behandlung mit Pioglitazon in *SmPparγ*<sup>+/+</sup> (WT)- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten

Nach zwölf-stündiger Nüchternphase wurde ein intraperitonealer GTT durch Glukoseinjektion von 1 g/kg Körpergewicht in *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. A) Dargestellt ist der Kurvenverlauf des GTTs in *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=43-44) zu Versuchsbeginn (Woche 0). B) Darstellung des Kurvenverlaufs aus dem GTT in *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach zwölf-wöchiger NFD (n=10-12) bzw. HFD (n=30-32). Nach 24 Wochen erfolgte ein weiterer GTT, dessen Kurvenverläufe in C) für *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup> Mäuse der NFD (n=9-10)- und HFD-Gruppe (n=16-17) sowie der Pioglitazon-behandelten Gruppe (n=14-15) dargestellt sind. Zudem erfolgte die Berechnung der Fläche unter der Kurve (engl.: area under the curve (AUC)) für alle zuvor genannten GTT-Kurven (D-F). (\* *p* < 0,05 NFD vs. HFD; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001)

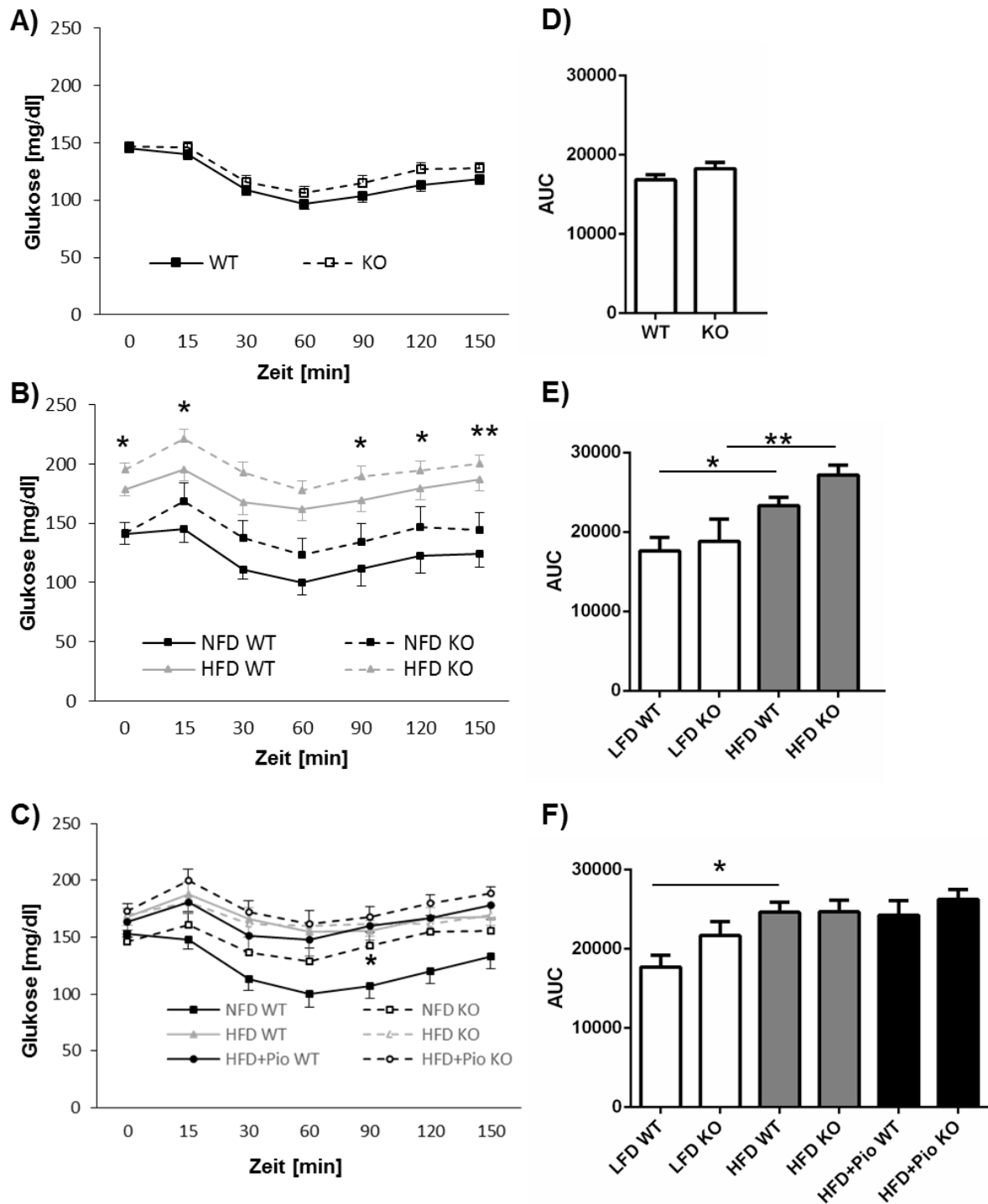
### 3.2.3.5. Untersuchung der Insulinsensitivität mittels ITT

Neben der Glukoseverwertung wurde zudem die Insulinsensitivität durch einen ITT zu den gleichen Zeitpunkten wie beim GTT bestimmt und auf die gleiche Weise dargestellt (Abbildung 15). Hier zeigte sich bereits zu Versuchsbeginn eine leicht verschlechterte Insulinsensitivität für die Mäuse mit PPAR $\gamma$ -*knockout* in den glatten Gefäßmuskelzellen im Vergleich zu den SmPpar $\gamma^{+/+}$ -Mäusen.

Dieser Unterschied war nach zwölf Wochen auf NFD noch deutlicher, jedoch ebenfalls nicht signifikant. Die zwölfwöchige HFD hingegen führte zu einer signifikant verschlechterten Insulinsensitivität für beide Genotypen gegenüber den NFD-gefütterten SmPpar $\gamma^{+/+}$ -Mäusen, was sich sowohl in den Glukoseverlaufskonzentrationen für fünf Messpunkte als auch den entsprechenden AUCs zeigte. Auch innerhalb der HFD-gefütterten Gruppe gab es eine Verschiebung der Glukoseverlaufskonzentration, wobei auch hier die SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäuse eine schlechtere Insulinsensitivität aufwiesen als die Wildtypen.

Nach 24 Wochen war die Kurve der Glukoseverlaufskonzentration der SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäuse unter NFD noch näher zur Kurve der HFD-gefütterten Mäuse verschoben, sodass es zu einem signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf bei 90 Minuten zwischen NFD-gefütterten SmPpar $\gamma^{+/+}$ - und SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäusen kam. In den aus den Kurven berechneten AUCs war dieser signifikante Unterschied lediglich als Tendenz sichtbar. Innerhalb der HFD-gefütterten Gruppe war hingegen kein Genotyp-bedingter Unterschied zu erkennen. Es zeigte sich allerdings, wie auch schon nach zwölf Wochen HFD-Fütterung, eine signifikant verschlechterte Insulinsensitivität im Vergleich zu den NFD-gefütterten SmPpar $\gamma^{+/+}$ -Mäusen.

Die Pioglitazon-Behandlung führte zu keiner Veränderung der HFD-induzierten Verschlechterung der Insulinsensitivität. Hier zeigte sich jedoch erneut ein Genotyp-bedingter Unterschied, mit einer tendenziell verschlechterten Insulinsensitivität für die SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäuse. Zusammenfassend zeigte sich eine Reduzierung der Insulinsensitivität durch den PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen und eine signifikante Verschlechterung der Insulinsensitivität durch die HFD. Pioglitazon zeigte keinen Einfluss auf den Blutglukoseverlauf unter den gewählten Versuchsbedingungen.

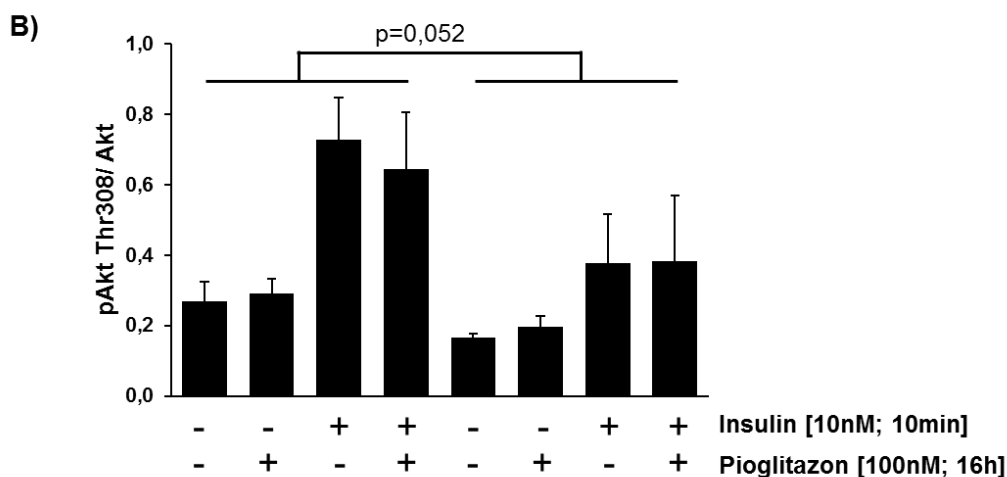
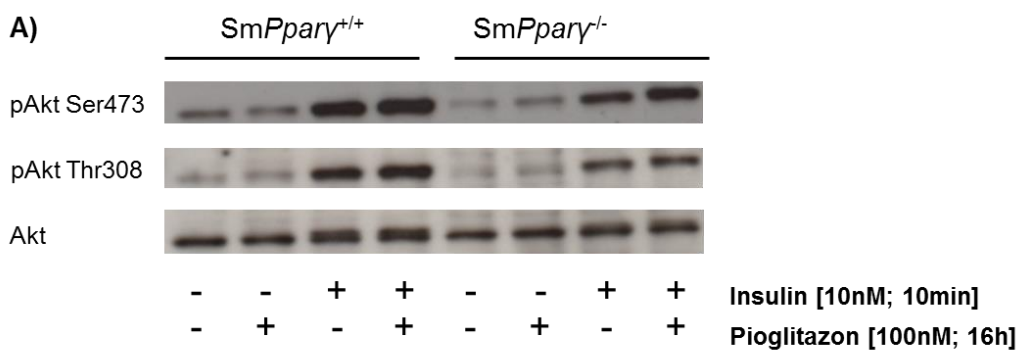


**Abbildung 15: Insulin-Toleranz-Test (ITT) unter NFD bzw. HFD sowie nach pharmakologischer Behandlung mit Pioglitazon in *SmPparγ*<sup>+/+</sup> (WT)- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten**

Nach vier-stündiger Nüchternphase wurde ein intraperitonealer ITT durch Insulininjektion von 0,5 U/kg Körpergewicht in *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. A) Dargestellt ist der Kurvenverlauf des ITTs in *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=43-44) zu Versuchsbeginn (Woche 0). B) Darstellung des Kurvenverlaufs aus dem ITT in *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach zwölf-wöchiger Niedrigfett- (NFD, n=7-12) bzw. Hochfett-diät (HFD, n=22-24). Nach 24 Wochen erfolgte ein weiterer ITT, dessen Kurvenverläufe in B) für *SmPparγ*<sup>+/+</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäuse der NFD (n=10-11)- und HFD-Gruppe (n=16-17) sowie der Pioglitazon-behandelten Gruppe (n=14-15) dargestellt sind. Zudem erfolgte die Berechnung der Fläche unter der Kurve (engl.: area under the curve (AUC)) für alle zuvor genannten ITT-Kurven (D-F). (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)

**3.2.3.6. Insulin-induzierte Veränderung der Signaltransduktion in murinen glatten Gefäß-muskelzellen aus der Aorta**

Um den Einfluss des PPAR $\gamma$ -*knockouts* auf die Insulin-induzierte Signaltransduktion untersuchen zu können, wurden glatte Gefäßmuskelzellen aus der Pulmonalarterie mittels Western Blot und Antikörperdetektion untersucht. Bei der quantitativen, densitometrischen Auswertung der Phosphorylierung von Akt an Position Threonin 308 (Thr308) zeigte sich bereits ohne Insulinstimulation ein kleiner, allerdings nicht signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Dabei war Akt in den SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen tendenziell weniger stark phosphoryliert. Dieser Unterschied wurde nach Insulinstimulation deutlicher. Die densitometrischen Auswertungen aller Behandlungsgruppen der WT- bzw. SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten insgesamt eine reduzierte Phosphorylierung von Akt (p=0,052) in PPAR $\gamma$ -*knockout* Zellen. Pioglitazon hatte keinen Einfluss auf die Insulin-induzierte Signaltransduktion. Zusammengefasst zeigte sich eine Tendenz zu einer Genotyp-assoziierten Veränderung des Insulin-*Signalings* bezogen auf eine reduzierte Phosphorylierung von Akt an Position Threonin 308 (Thr308) sowie eine minimale gleichgeartete Tendenz an Position Serin 473 (Ser473). Die Pioglitazon-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Insulin-induzierten Phosphorylierung von Akt.

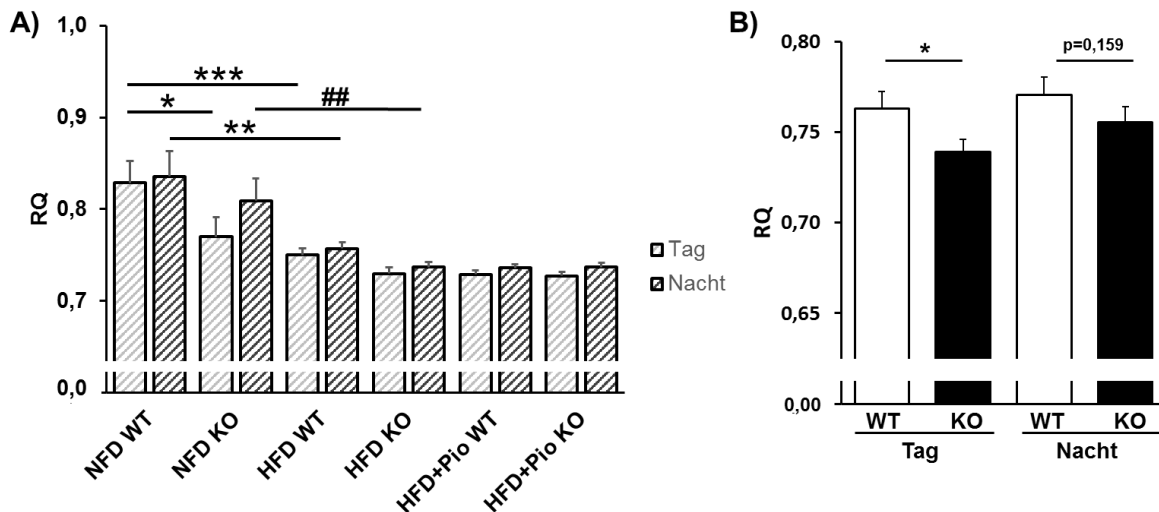


**Abbildung 16: Insulin-stimulierte Phosphorylierung von Akt in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie von SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>(WT)- und SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>(KO)-Mäusen.**

Isolierte glatte Gefäßmuskelzellen aus Pulmonalarterien von SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>- und SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen wurden zehn Minuten mit Insulin stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit Pioglitazon vorbehandelt bzw. gar nicht behandelt/stimuliert. Im Western Blot wurden die Proteinlysate aus diesen Zellen untersucht. A) Die Phosphorylierung von Akt wurde mit Antikörpern gegen pAkt Thr308 und pAkt Ser473 bestimmt. Als Ladekontrolle diente (pan-)Akt. B) Densitometrische Analysen des Western Blots, wobei die Ratio zwischen pAkt und Akt gemessen wurde (n=3).

**3.2.3.7. Charakterisierung der *SmPpar $\gamma$* -Mäuse im TSE LabMaster**

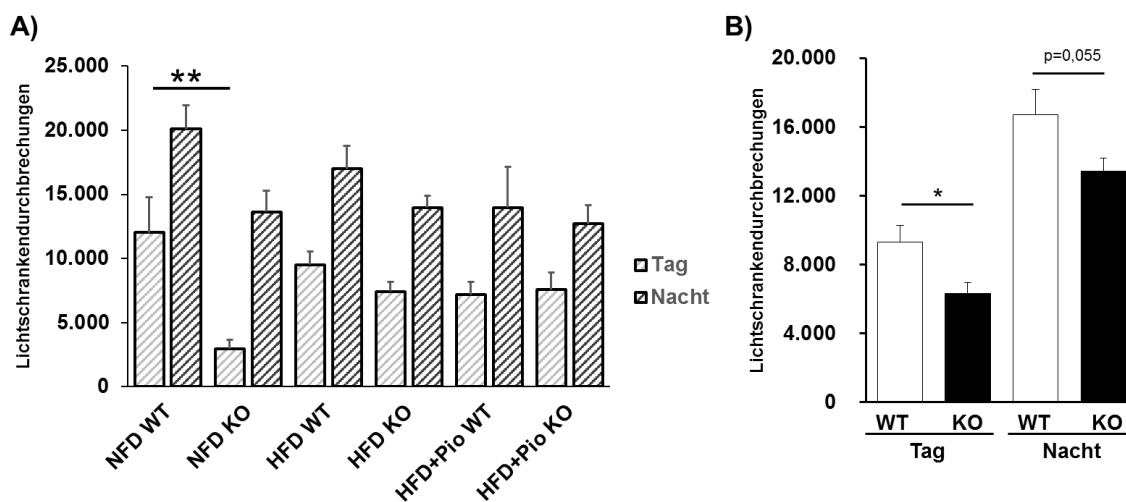
Zur weiteren Phänotypisierung wurden die Mäuse am Ende des Versuches in metabolischen Käfigen des TSE LabMaster Systems untersucht. Hierbei wurden die Lokomotoraktivität und der respiratorische Quotient (RQ) bestimmt, welcher das Verhältnis der ausgeatmeten Kohlenstoffdioxidmenge zum gleichzeitig aus der Luft aufgenommenen Sauerstoff beschreibt. Der RQ hängt von der Art des verstoffwechselten Substrates ab. Bei ausschließlicher Verstoffwechslung von Kohlenhydraten liegt der RQ bei 1, bei Verstoffwechslung von Fetten bei 0,7 und von Proteinen bei 0,81. Für den im TSE LabMaster ermittelten RQ zeigte sich bei den HFD-gefütterten Mäusen ein erwartungsgemäß niedrigerer Wert im Vergleich zur NFD-Gruppe, was für eine vermehrte Energiegewinnung der HFD-gefütterten Mäuse aus der Verstoffwechslung von Fetten spricht (Abbildung 17 A). Dieser Unterschied war für die *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse nachts und für *SmPpar $\gamma$* <sup>+/+</sup>-Mäuse nachts und tagsüber signifikant. Die Behandlung mit Pioglitazon hatte keinen Einfluss auf den RQ. Vergleicht man die *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>- und *SmPpar $\gamma$* <sup>+/+</sup>-Tiere innerhalb der NFD- bzw. HFD-Gruppe miteinander, so zeigte sich innerhalb der NFD-Gruppe am Tag ein signifikant reduzierter RQ für die *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse (0,77±0,02) gegenüber den *SmPpar $\gamma$* <sup>+/+</sup>-Mäusen (0,83±0,02). Ansonsten waren die *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse in beiden Diätgruppen durch einen tendenziell reduzierten RQ gegenüber den Wildtypen charakterisiert, welcher tagsüber signifikant war, wenn man alle *SmPpar $\gamma$* <sup>+/+</sup>- bzw. *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse zusammenfasst (Abbildung 17 B). Damit scheint der *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen bei diesen Mäusen einen Einfluss auf die Wahl des zur Energiegewinnung verstoffwechselten Nährstoffes zu haben. Für die Pioglitazon-behandelten HFD-Tiere ließ sich eine solche durch den Genotypen verursachte Tendenz nicht nachweisen.



**Abbildung 17:** Respiratorischer Quotient (RQ) der *SmPpar $\gamma$* <sup>+/+</sup> (WT)- und *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup> (KO)-Mäuse unter Niedrigfett- bzw. Hochfett-diät (NFD bzw. HFD) und HFD mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio) nach 24 Versuchswochen.

A) Zur Bestimmung des RQ wurden die Mäuse in Stoffwechsellkäfigen des TSE LabMaster Systems nach 24 Wochen im Versuch untersucht. B) RQ für die *SmPpar $\gamma$* <sup>+/+</sup>- und *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse aller Gruppen zusammengefasst. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  beim Vergleich mit NFD-*SmPpar $\gamma$* <sup>+/+</sup>-Mäusen; ##  $p < 0,01$  beim Vergleich mit NFD-knockout-Mäusen;  $n=10-16$  Mäuse pro Gruppe)

Die lokomotorische Aktivität in x-y-Ebene wurde im TSE LabMaster mit Hilfe von Lichtschranken gemessen, wobei jede Unterbrechung dieser Lichtschranken über 18 Stunden aufgezeichnet wurde. Vergleich man die Mäuse hier in Abhängigkeit von ihrer Diät, so zeigte sich eine tendenziell geringere Bewegung für HFD- gegenüber NFD-gefütterten Mäusen (Abbildung 18 A). Pioglitazon-behandelte Tiere bewegten sich so viel wie HFD-gefütterte. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich hingegen am Tag für *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse unter NFD, die sich im Vergleich zu den Wildtypen der gleichen Diät zirka 75 % weniger bewegten. Wenn man die Genotypen aller Diät- und Behandlungsgruppen zusammenfasst, zeigten *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse tagsüber signifikant weniger Lichtschrankendurchbrechungen als *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse. Nachts konnte eine ähnliche Tendenz ( $p=0,055$ ) beobachtet werden (Abbildung 18 B). Dieser Genotyp-bedingte Unterschied war unter der HFD nicht mehr signifikant. In der Pioglitazon-behandelten Gruppe war dieser Effekt hingegen vollständig aufgehoben. Zusammenfassend zeigte sich damit eine Genotyp-bedingte Veränderung in der planimetrischen Aktivität und im RQ der Mäuse vor allem unter der NFD dahingehend, dass sowohl der RQ als auch die Aktivität durch den *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen reduziert waren. Die Hochfettdiät führte zu einer weiteren Reduktion des RQ, wohingegen die Aktivität der Mäuse durch die HFD nicht beeinträchtigt war. Pioglitazon hatte keinen Einfluss auf diese beiden Parameter.



**Abbildung 18:** Lokomotorische Aktivität der *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*- und *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse (WT und KO) unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio) nach 24 Versuchswochen.

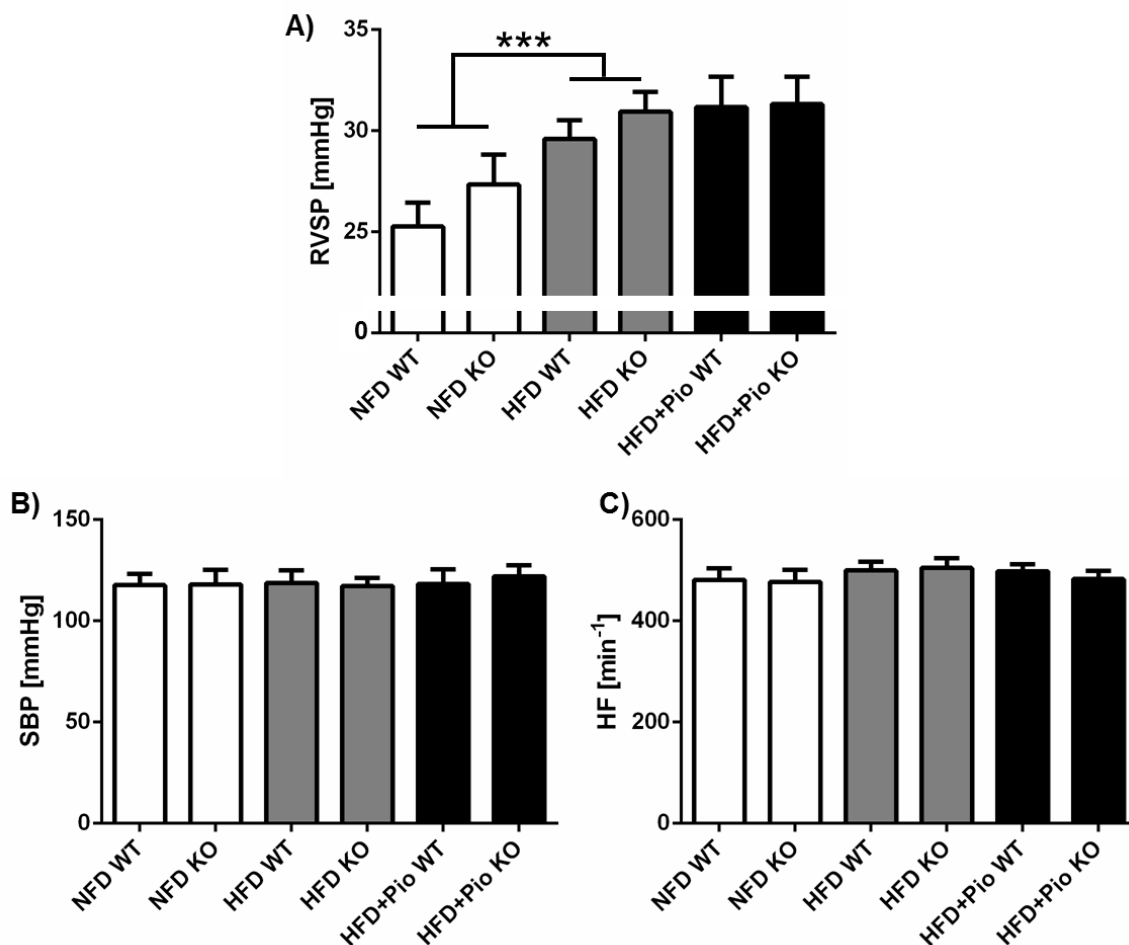
A) Zur Bestimmung der lokomotorischen, planimetrischen (x-y-Ebene) Aktivität wurden die Mäuse in Stoffwechselläufigen des TSE LabMaster Systems nach 24 Wochen im Versuch für 18 Stunden untersucht und die Anzahl der Lichtschrankendurchbrechungen gemessen. B) Lokomotoraktivität für die *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*- und *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse aller Gruppen zusammengefasst. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;  $n = 10-16$  Mäuse pro Gruppe)

### 3.2.4. Hämodynamische Charakterisierung des *SmPpar $\gamma$* -Mausmodells

Um eine potenzielle Induzierung der PH durch die Diät bzw. den Genotyp sowie die Effekte der Behandlung mit Pioglitazon funktionell zu messen, wurden hämodynamische Messungen sowie morphologische Untersuchungen der Lungengefäße durchgeführt.

### 3.2.4.1. Invasive Druckmessung mittels Katheter

Die Messung des rechtsventrikulären Druck (RVSP, engl.: *right ventricular systolic pressure*), als Maß für den pulmonal arteriellen Druck, zeigte einen leichten Anstieg durch den *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen innerhalb der NFD-Gruppe. Die HFD führte zu einem signifikanten Anstieg des RVSP um im Mittel 4 mmHg gegenüber NFD-gefütterten Mäusen von  $26,2 \pm 0,9$  mmHg auf  $30,3 \pm 0,7$  mmHg (Abbildung 19 A). Die Pioglitazon-Behandlung zeigte keinen Einfluss auf den RVSP. Vergleicht man den systemischen Blutdruck im Hinblick auf die Diät, den Genotyp und die Behandlung mit Pioglitazon, so blieb dieser unverändert und lag bei allen Gruppen bei zirka 118 mmHg (117-122 mmHg) (Abbildung 19 B). Auch auf die Herzfrequenz hatten weder Diät noch Genotyp oder Behandlung mit Pioglitazon einen Einfluss. So lag die Herzfrequenz für alle Gruppen bei zirka 490 Schlägen pro Minute (477-505 Schläge pro Minute) (Abbildung 19 C).



**Abbildung 19:** Invasive Kathetermessung des rechtsventrikulären und systemischen Blutdruckes (RVSP bzw. SBP) sowie der Herzfrequenz (HF) in *SmPpar* $\gamma^{+/±}$ - und *SmPpar* $\gamma^{-/-}$ -Mäusen (WT und KO) unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio) nach 24 Versuchswochen.

Die Messungen der Drücke erfolgten mittels Katheter für (A) den rechten Ventrikel (=RVSP) über die Jugularvene und (B) für den systemischen Blutdruck über die Halsschlagader (Arteria carotis), wo gleichzeitig die Herzfrequenz (C) aufgezeichnet wurde. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ;  $n=9-15$  Mäuse pro Gruppe), Abkürzungen: RVSP, *right ventricular systolic pressure*, dt.: rechtsventrikulärer Druck; SBP, *systemic blood pressure*, dt.: systemischer Blutdruck; HF, Herzfrequenz

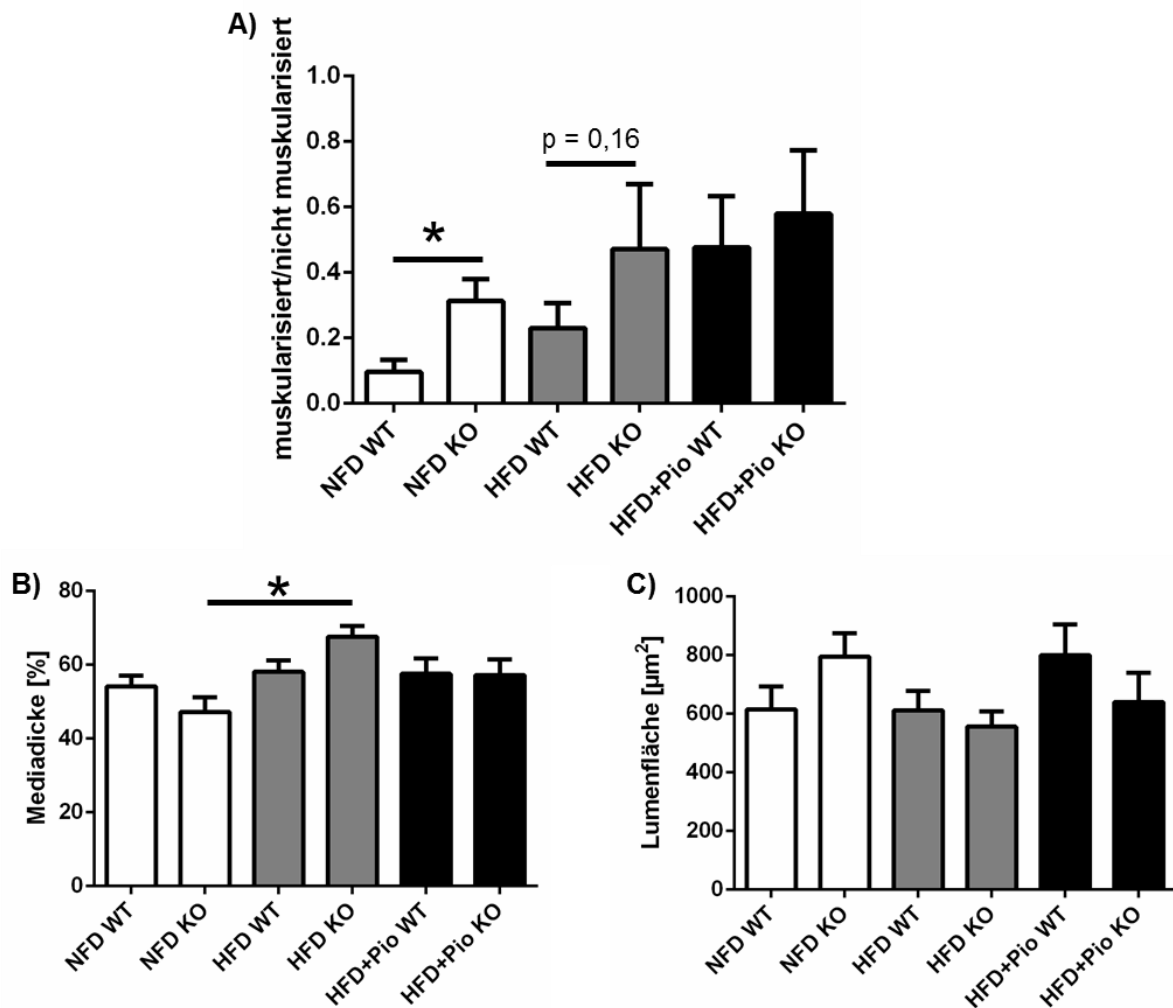
### 3.2.4.2. Immunohistochemische Untersuchung der Lungengefäße

Um die mit den Druckveränderungen im Ventrikel potenziell einhergehenden Veränderungen der Gefäße der Lunge untersuchen zu können, wurden immunohistochemische Färbungen von Lungenschnitten gegen *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) und von Willebrand Faktor (vWF) angefertigt. Somit wurden die glatten Gefäßmuskelzellen ( $\alpha$ -SMA-positiv) und Endothelzellen (vWF-positiv) dargestellt, sodass es möglich war, die Muskularisierung der Gefäße als Quotient aus muskularisierten zu nicht muskularisierten Gefäßen zu bestimmen (Abbildung 20 A). In der NFD-Gruppe zeigte sich eine um mehr als den Faktor drei signifikante in der HFD-Gruppe eine um den Faktor 1,8 tendenzielle Zunahme der muskularisierten pulmonalen Gefäße für *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen. Vergleicht man die *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse der NFD mit denen der HFD, so zeigte sich ebenfalls eine durch die HFD induzierte, tendenzielle Zunahme der muskularisierten pulmonalen Gefäße, obgleich diese schwächer ausfiel. Beide Einflussfaktoren zusammen, der *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen und die HFD, zeigten einen additiven Effekt. Die Pioglitazon-Behandlung unter HFD hatte keinen Einfluss auf die Muskularisierung im Vergleich zur HFD alleine.

Um die strukturellen Veränderungen der kleinen Gefäße der Lunge detaillierter beschreiben zu können, wurde zudem der prozentuale Anteil der Mediadicke bestimmt (Abbildung 20 B). Hier zeigte sich ein HFD-induzierter, signifikanter Anstieg der Mediadicke für KO-Mäuse im Vergleich zu den NFD-gefütterten Tieren. Dieser Effekt konnte für die WT-Mäuse weniger ausgeprägt beobachtet werden. Zudem verringerte sich die prozentuale Mediadicke für die *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse unter NFD tendenziell im Vergleich zu den *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäusen dieser Diätgruppe. Die HFD hingegen führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der Mediadicke für KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen der gleichen Diätgruppe. Die Pioglitazon-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Mediadicke, wenn man die *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse der Pioglitazon-Gruppe zu denen der HFD-Gruppe vergleicht. Innerhalb der Pioglitazon-behandelten Gruppe gab es keinen Genotyp-assoziierten Effekt auf die Mediadicke. Vergleicht man HFD-gefütterte *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse mit Pioglitazon-behandelten *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen, so zeigte sich eine Tendenz zu einer Reduktion der Mediadicke. Zusammenfassend zeigten diese Daten einen signifikanten Anstieg der prozentualen Mediadicke durch die HFD in *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen. Pioglitazon hatte keinen Einfluss.

Neben der Muskularisierung ist zudem die Lumenfläche der Gefäße entscheidend für Druckveränderungen im rechten Ventrikel. Hier zeigte sich ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Lumenfläche durch den PPAR $\gamma$ -*knockout* innerhalb der NFD-gefütterten Gruppe (Abbildung 20 C). Betrachtet man die *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse, so zeigte sich kein Effekt durch die HFD. Die *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse waren innerhalb der HFD-Gruppe durch eine sehr leicht verringerte Lumenfläche gekennzeichnet. Diese Reduktion war gegenüber den *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen der NFD-gefütterten Gruppe deutlicher, jedoch nicht signifikant. Die Pioglitazon-Behandlung führte zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der Lumenfläche, wenn man die *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse dieser Gruppe mit denen der NFD- bzw. HFD-Gruppe vergleicht. Innerhalb der Pioglitazon-behandelten Gruppe war der *knockout* von PPAR $\gamma$  mit einer diskreten Reduktion der Lumenfläche assoziiert. Zusammenfassend zeigte sich keine signifikante Veränderung der Lumenfläche in Abhängigkeit vom Genotyp, der Diät oder der Behandlung mit Pioglitazon.





**Abbildung 20: Untersuchung der kleinen Lungengefäße (20–70 µm) in *SmPparγ*<sup>+/-</sup>- und *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäuse (WT und KO) unter Niedrig- bzw Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio).**

A) zeigt den Quotienten der muskularisierten zu den nicht muskularisierten pulmonalen Gefäßen. Es wurden darüber hinaus die prozentuale Dicke der Media (B) und die Lumenfläche der pulmonalen Gefäße (C) bestimmt. (\*  $p < 0,05$ ;  $n=5$  Mäuse pro Gruppe)

### 3.2.4.3. Proliferation der pulmonalen Gefäßzellen

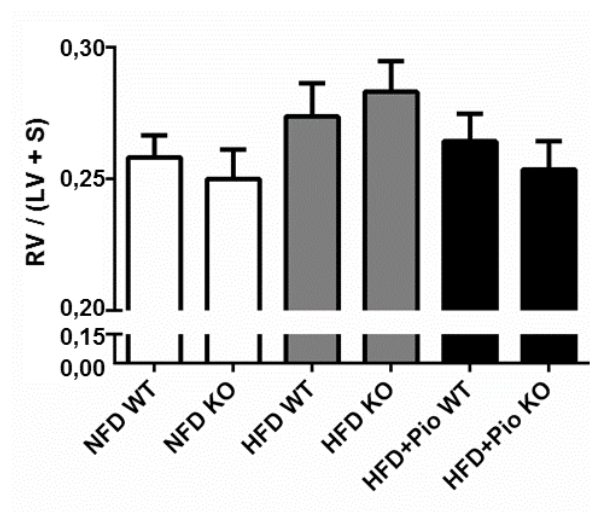
Zur Untersuchung der pulmonalen Gefäße hinsichtlich der Zellproliferation wurden Lungenschnitte gegen Ki67, ein Proliferationsmarker, gefärbt. Die Auswertung dieser Färbung zeigte keine bzw. eine sehr geringe proliferative Aktivität in den Zellen der pulmonalen Gefäße (Daten nicht gezeigt). In den NFD-gefütterten Mäusen konnte keine Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden, wohingegen unter HFD einige wenige Gefäße proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen aufwiesen, sodass hier im Mittel für *SmPparγ*<sup>+/-</sup>-Mäuse  $0,002 \pm 0,001$  Ki67-positive glatte Gefäßmuskelzellen beobachtet wurden, wohingegen die *SmPparγ*<sup>-/-</sup>-Mäuse  $0,011 \pm 0,006$  Ki67-positive Zellen hatten. Für die Pioglitazon-behandelten Mäuse konnten in Wildtypen  $0,007 \pm 0,006$  Ki67-positive

Zellen und in den *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse der gleichen Behandlungsgruppe wiederum keine proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet werden.

#### 3.2.4.4. Kardiale Veränderungen im *SmPpar $\gamma$* -Mausmodell

Die Veränderungen der Lungengefäße gingen, wie oben gezeigt, mit einer Veränderung des rechtsventrikulären Druckes einher. Dadurch kann es zu strukturellen Veränderungen des Herzens wie Hypertrophie und Fibrose kommen, welche im Folgenden untersucht wurden. Zunächst erfolgte die Ermittlung des Quotienten aus dem Gewicht des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel mit Septum (Fulton's Index) (Mam *et al.* 2010) als Maß für eine Rechtsherzhypertrophie. Zudem wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen des rechten und linken Ventrikels hinsichtlich der Größe der Kardiomyozyten untersucht.

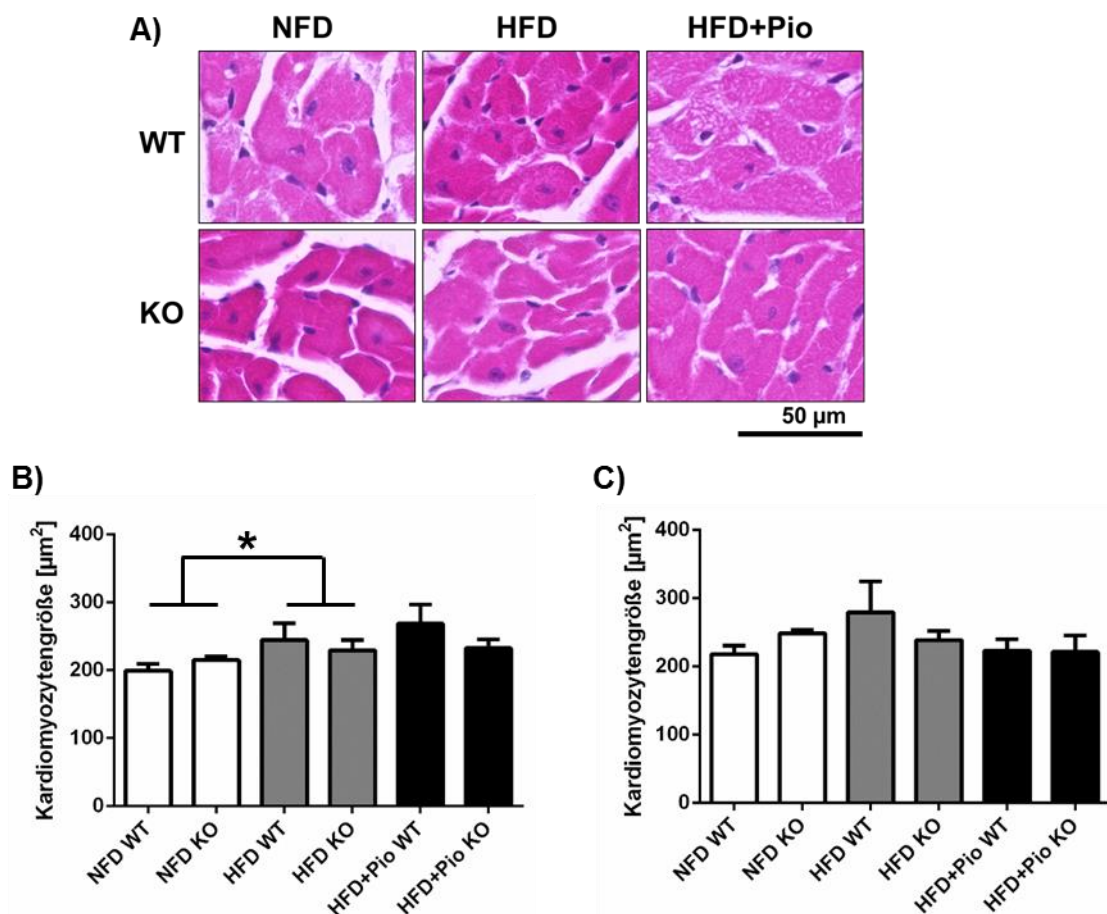
Die Berechnung des Fulton's Index (Abbildung 21) zeigte einen leichten, nicht signifikanten Anstieg für den rechten Ventrikel durch die HFD. Innerhalb der NFD- und HFD-Gruppe gab es keinen Genotyp-assoziierten Effekt. Pioglitazon hatte keinen Einfluss auf das Gewicht des rechten Ventrikels. Der *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen war in der Pioglitazon-behandelten Gruppe mit einer leichten, nicht signifikanten Reduktion des Fulton's Index assoziiert. Zusammenfassend zeigten die Daten keine Veränderung des Fulton's Index durch den Genotyp, die Diät oder die Behandlung mit Pioglitazon.



**Abbildung 21:** Berechnung des Fulton's Index zur Bestimmung einer Rechtsherzhypertrophie in *SmPpar $\gamma$ <sup>+/-</sup>*- und *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse (WT und KO) unter Niedrigfett- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio).

Nach Tötung der Mäuse wurden die Gewichte des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels zusammen mit dem Septum bestimmt, um daraus den Quotienten und damit Fulton's Index ( $RV / (LV+S)$ ) berechnen zu können ( $n=10-16$ ).

m eine mögliche strukturelle Anpassung auf zellulärer Ebene bestimmen zu können, wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen vom linken und rechten Ventrikel hinsichtlich der Größe der Kardiomyozyten (*cross sectional area*, CSA) ausgewertet (Abbildung 22 A). Für den rechten Ventrikel zeigten sich dabei keine Genotyp-bedingten Unterschiede innerhalb der NFD- oder HFD-gefütterten Gruppen (Abbildung 22 B). Die HFD führte zu einem leichten, signifikanten Anstieg der CSA. Die Pioglitazon-Behandlung hatte keinen wesentlichen Einfluss. Die gleiche Untersuchung wurde für den linken Ventrikel der Mäuse durchgeführt. Hier zeigte sich innerhalb der NFD-gefütterten Gruppe kein signifikanter Anstieg der CSA durch den *knockout* bzw. die HFD (Abbildung 22 C). Pioglitazon hatte keinen Effekt auf die CSA im linken Ventrikel. Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante, HFD-induzierte Hypertrophie der Kardiomyozyten des rechten, nicht jedoch des linken Ventrikels. Der Genotyp und die Pioglitazon-Behandlung hatten hingegen keinen Einfluss auf die Kardiomyozytengröße.



**Abbildung 22:** Bestimmung der Kardiomyozytengröße in *SmPpar*<sup>+/+</sup> (WT)- und *SmPpar*<sup>-/-</sup> (KO)-Mäuse unter Niedrig- bzw. Hochfettdiät (NFD bzw. HFD) und Hochfettdiät mit Pioglitazon-Behandlung (HFD+Pio).

Darstellung exemplarischer Bilder der Hämatoxylin-Eosin-Färbung des A) rechten Ventrikels (RV). Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$ . Anhand dieser Färbung wurde die Größe der Kardiomyozyten als *cross sectional area* (CSA) im B) rechten und C) linken Ventrikel bestimmt. (\*  $p < 0,05$ ;  $n=50$  Kardiomyozyten je Tier für  $n=4-5$  Tiere pro Gruppe)

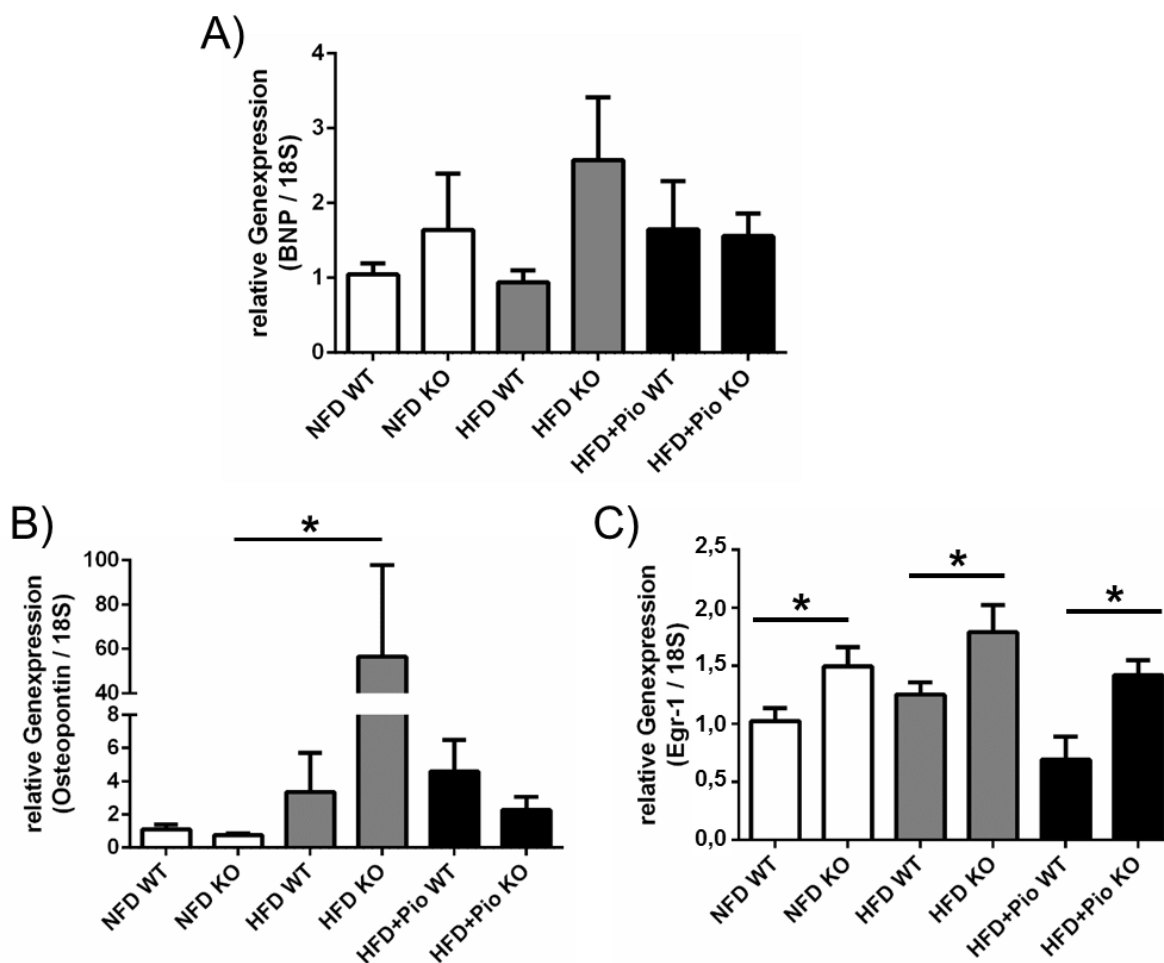
### 3.2.4.5. Differentielle Genexpression im Herzgewebe

Zur genaueren Untersuchung des Herzens auf molekularer Ebene wurde RNA aus dem rechten Ventrikel isoliert, in cDNA umgeschrieben und via quantitativer PCR untersucht. Die Untersuchung der Genexpression des natriuretischen Peptides Typ B (*brain natriuretic peptide*, BNP) zeigte dabei einen leichten Anstieg der Expression bei den *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen innerhalb der NFD-Gruppe (Abbildung 23 A). Vergleicht man die *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse der NFD- und HFD-Gruppe, so zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der genetischen Expression. Innerhalb der HFD-gefütterten Gruppe sah man wieder den Anstieg der BNP-Expression für die *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse, welcher jedoch, wie auch die vorher genannten Veränderungen, nicht signifikant war. Bei den Pioglitazon-behandelten Mäusen zeigte sich hingegen kein Genotyp-bedingter Unterschied. Hier lag die Expression im Wildtyp leicht höher als bei den Wildtyp-Mäusen der HFD.

Des Weiteren wurde die Expression von Osteopontin im Herzen untersucht (Abbildung 23 B). Hier zeigte sich kein Genotyp-bedingter Unterschied in der NFD-Gruppe. Die HFD führte zu einem Anstieg der Osteopontin-Expression für beide Genotypen, wobei der Effekt bei den *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen signifikant ausfiel. Die Pioglitazon-Behandlung führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der Osteopontin-Expression.

Neben BNP und Osteopontin wurde zudem die Expression von Egr-1 (*Early growth response protein 1*) gemessen (Abbildung 23 C). Hier zeigte sich ein signifikanter Genotyp-assoziiertes Anstieg der Expression innerhalb beider Diätgruppen sowie in der Behandlungsgruppe mit Pioglitazon. Die HFD führte ebenfalls zu einem Anstieg der Expression, welcher jedoch nicht so stark ausfiel wie der Anstieg durch den *knockout*. Pioglitazon führte sowohl im Wildtyp als auch im *knockout* tendenziell zur Reduktion der BNP-Genexpression.

Zusammenfassend zeigten die Daten diskrete, nicht signifikante HFD-induzierte Erhöhungen der Genexpression für BNP und Osteopontin im rechten Ventrikel. Für Egr-1 konnte hingegen ein signifikanter Genotyp-bedingter Anstieg der Genexpression im rechten Ventrikel beobachtet werden. Diesen Effekten wirkte Pioglitazon bei BNP und Osteopontin in den *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen und bei Egr-1 für beide Genotypen tendenziell entgegen.



**Abbildung 23: Untersuchung der differentiellen Genexpression im rechten Ventrikel in Abhängigkeit von der Diät (Niedrigfettdiät: NFD, Hochfettdiät: HFD) und pharmakologischen Behandlung mit Pioglitazon (HFD+Pio) in *SmPpary*<sup>+/+</sup> (WT)- und *SmPpary*<sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen.**

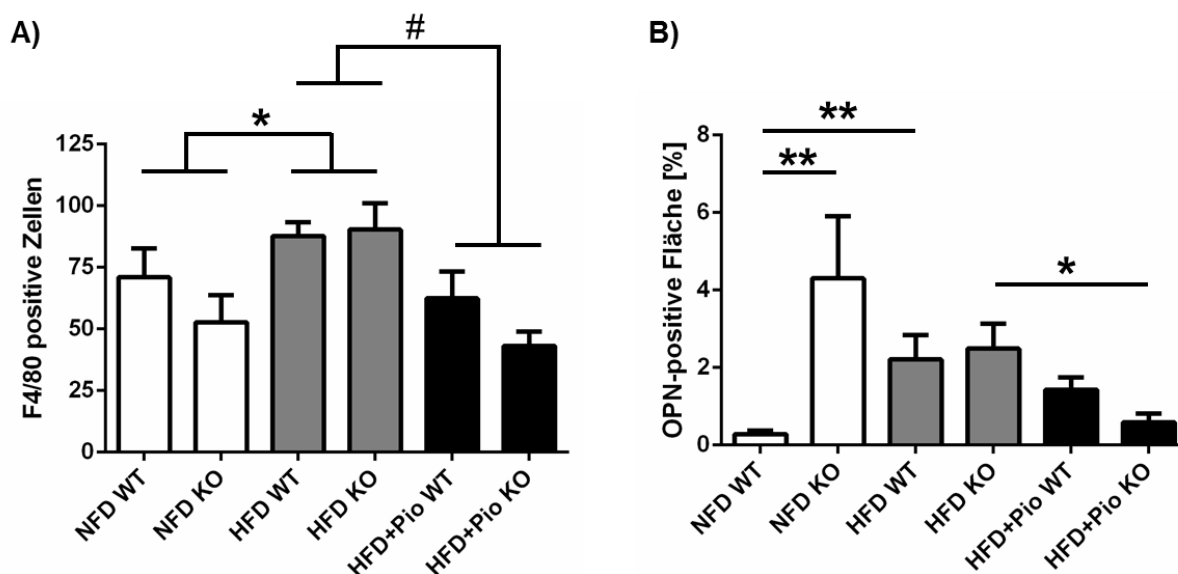
Aus dem rechten Ventrikel der Mäuse wurde RNA isoliert und zur Untersuchung mittels quantitativer PCR in cDNA umgeschrieben. Auf diese Weise wurde die Expression auf mRNA-Ebene von A) BNP, B) Osteopontin und C) *Egr-1* im Herzgewebe untersucht und auf die Expression von 18S als Referenzgen normalisiert (\*  $p < 0,05$ ;  $n=6-8$  für BNP und *Egr-1* und  $n=4-6$  für Osteopontin). Abkürzungen: BNP, engl.: brain natriuretic peptide, dt.: natriuretisches Peptid Typ B; *Egr-1*, Early growth response protein 1

### 3.2.4.6. Untersuchung von Inflammation und Fibrose in der Lunge

Bei der Entstehung der PH spielen auch inflammatorische Prozesse eine pathogenetische Rolle (Rabinovitch *et al.* 2014). Daher wurden die Lungen der Mäuse hinsichtlich dem Vorhandensein von Makrophagen mittels immunohistochemischer Färbung gegen F4/80 untersucht. Darüber hinaus wurde das Glykoprotein Osteopontin, welches mit der Schwere der PH und fibrotischen Veränderung assoziiert ist (Mura *et al.* 2013), sowie die fibrotischen Veränderungen mittels Massons's-Trichrom-Färbung untersucht.

Die immunohistochemische Färbung der Lunge gegen F4/80 als Makrophagenmarker zeigte einen signifikanten, HFD-induzierten Anstieg der Makrophagenzahl in der Lunge der Mäuse. Die Pioglitazon-Behandlung führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der F4/80-positiven Zellen. Der Genotyp hatte hingegen keinen Einfluss auf die Makrophagenzahl (Abbildung 24 A).

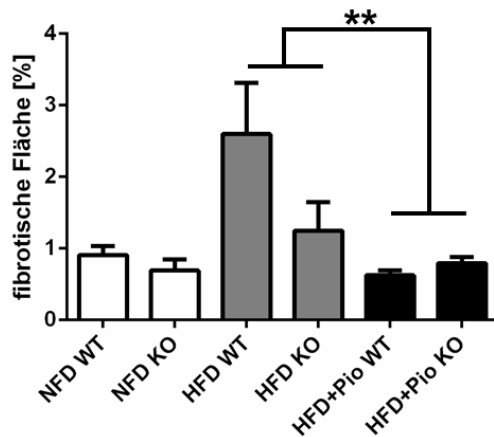
Die Betrachtung des Osteopontin-positiven Bereiches in immunohistochemischen Färbungen der Lunge zeigte einen signifikanten Genotyp-abhängigen Effekt für die NFD-gefütterten Mäuse, wobei die *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse mehr Osteopontin in ihren Lungen aufwiesen (Abbildung 24 B). Innerhalb der HFD-Gruppe bestanden diese Genotyp-assoziierten Effekt hingegen nicht. Die HFD führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Osteopontin-positiven Fläche in *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäusen. Durch die Pioglitazon-Behandlung kam es im Vergleich zur HFD-Gruppe für *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse zu einer signifikanten und für *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse zu einer tendenziellen Reduktion des Osteopontin-positiven Bereiches in der Lunge.



**Abbildung 24:** Analyse inflammatorischer Veränderungen in der Lunge von *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>* (WT)- und *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>* (KO)-Mäusen nach Niedrigfett-diät (NFD) und Hochfett-diät (HFD) bzw. nach HFD mit therapeutischen Behandlung mit Pioglitazon (HFD+Pio).

Zur Untersuchung der Inflammation wurde A) die Makrophageninfiltration in die Lunge mittels F4/80 Färbung und Auszählung der F4/80-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern ermittelt (n=4-5; \* p < 0,05 NFD vs. HFD; # p < 0,05 kein Pioglitazon vs. Pioglitazon). Daneben wurde das Vorhandensein von B) Osteopontin (OPN) im Lungengewebe mittels immunohistologischer Färbung und Bestimmung des prozentualen Osteopontin-positiven Bereiches der Lunge bestimmt (n=5; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01)

Zur Untersuchung fibrotischer Veränderungen der Lunge wurden histologische Masson's-Trichrom-Färbungen ausgewertet. Die Auswertung dieser Färbung zeigte einen HFD-induzierten, Anstieg der fibrotischen Fläche in der Lunge (Abbildung 25). Pioglitazon führte bei behandelten Mäusen im Vergleich zu nicht behandelten HFD-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der fibrotischen Fläche. Innerhalb der HFD-Gruppe zeigte sich eine tendenziell verringerte fibrotische Fläche für *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse gegenüber *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäusen. In der NFD- sowie Pioglitazon-behandelten Gruppe hatte der Genotyp hingegen keinen Einfluss auf diesen gemessenen Parameter.



**Abbildung 25:** Analyse fibrotischer Veränderung in der Lunge von *SmPpar*<sup>+/+</sup> (WT)- und *SmPpar*<sup>-/-</sup> (KO)-Mäusen nach Niedrig (NFD)- und Hochfettdiät (HFD) bzw. nach HFD mit therapeutischer Behandlung mit Pioglitazon (HFD+Pio).

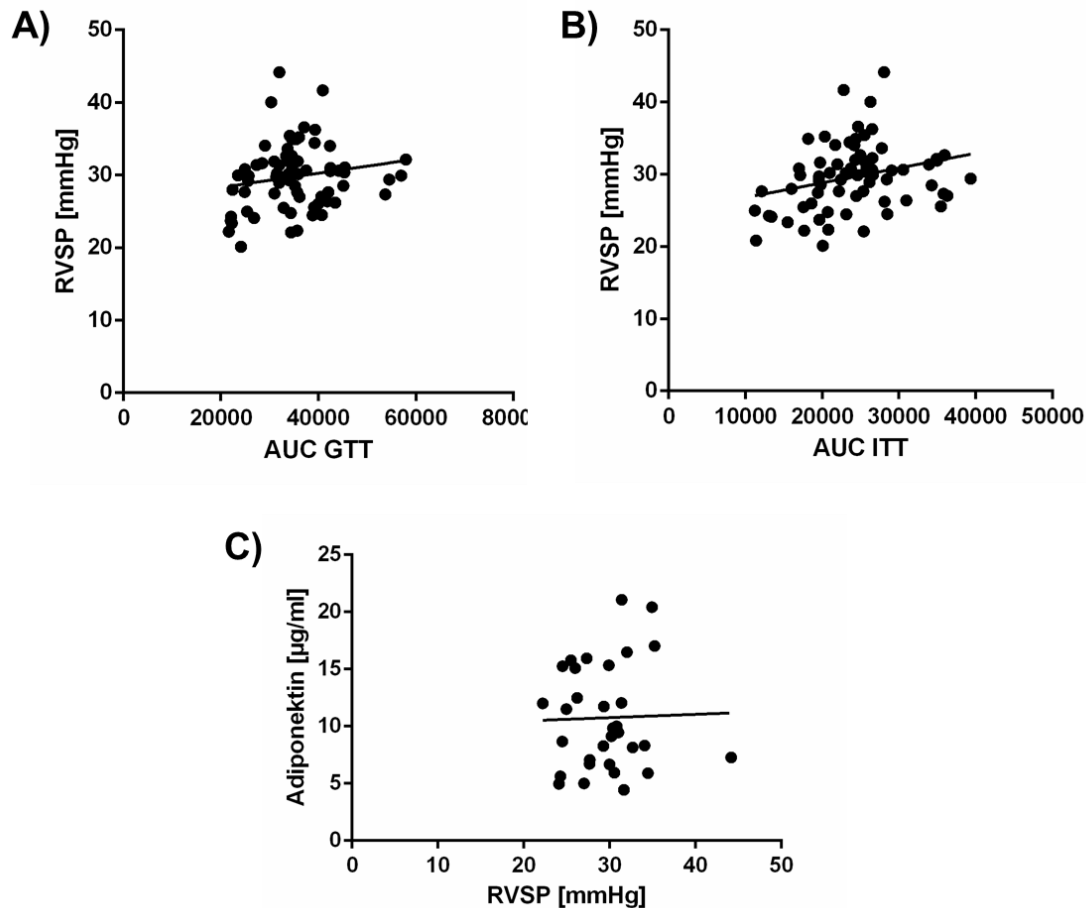
Zur Untersuchung der pulmonalen Fibrose wurde der prozentuale Anteil fibrotischer Veränderungen der Lunge bestimmt (n=3-5). (\*  $p < 0,05$  NFD vs. HFD; #  $p < 0,05$  kein Pioglitazon vs. Pioglitazon)

Zusammenfassend zeigten die Daten einen signifikanten, HFD-induzierten Anstieg der Makrophageninfiltration, wohingegen Pioglitazon die Makrophageninfiltration signifikant reduzierte. Auch fibrotische Veränderungen nahmen in der Lunge HFD-induziert zu, was ebenfalls durch die Behandlung mit Pioglitazon signifikant reduziert werden konnte. Der Osteopontingehalt der Lunge war signifikant für *SmPpar*<sup>-/-</sup>-Mäuse unter NFD sowie HFD-induziert für *SmPpar*<sup>+/+</sup> erhöht. Die Pioglitazon-Behandlung konnte dieser Erhöhung in *SmPpar*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant entgegen wirken.

### 3.2.5. Zusammenhang zwischen metabolischen und kardiovaskulären Veränderungen

Da es in der Literatur Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz bzw. Typ 2 Diabetes und der PH gibt, sollten in diesem Modell diese beiden Krankheiten zusammen betrachtet werden. Dazu wurden Korrelationsanalysen zwischen dem GTT bzw. ITT mit den Druckwerten aus dem rechten Ventrikel durchgeführt.

Die Korrelationsanalyse von den AUCs des GTTs mit den RVSP-Werten zeigte eine Tendenz, allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern (Abbildung 26 A). Bei der Betrachtung der Parameter ITT und RVSP war demgegenüber eine signifikante Korrelation ( $p=0,018$ ) erkennbar (Abbildung 26 B). Somit war in diesem Tiermodell die AUC des ITTs positiv mit der Höhe des RVSPs korreliert. Das bedeutet, dass mit höherer AUC im ITT, und damit verschlechterter Insulinsensitivität, ein höherer RVSP einherging. Zusammengefasst zeigten die Daten einen Zusammenhang zwischen der Schwere der PH und einer verschlechterten Insulinsensitivität. Daneben fand die Korrelationsanalyse zwischen Adiponektin-Serumspiegel und RVSP statt. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (Abbildung 26 C).



**Abbildung 26:** Korrelation zwischen metabolischen Veränderungen in Form der Glukose- und Insulintoleranz bzw. der Adiponektin-Serumkonzentration und dem rechtsventrikulären Druck (RVSP) in SmPpary-Mäusen

Um den Einfluss der Insulinresistenz auf das Ausmaß der RVSP (engl.: right ventricular systolic pressure)-Erhöhung zu bestimmen wurden A) die AUC (engl.: area under the curve; dt.: Fläche unter der Kurve)-Werte des 24 Wochen Glukose-Toleranz-Tests (GTTs) mit den RVSP-Werten ( $r=0,175$ ;  $p=0,145$ ;  $n=71$ ), sowie B) die 24 Wochen AUC-Werte des Insulin-Toleranz-Tests (ITTs) mit den RVSP-Werten korreliert ( $r=0,278$ ;  $p=0,018$ ;  $n=72$ ). Grafik C) zeigt die Korrelationsanalyse der Adiponektin-Serumspiegel mit dem RVSP ( $r=0,027$ ;  $p=0,882$ ).

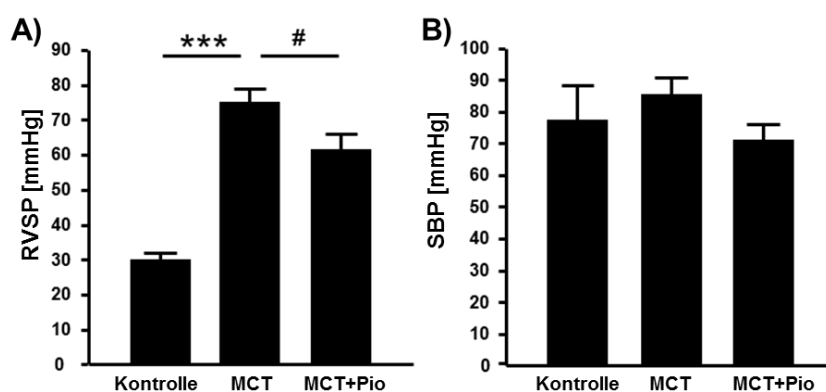
### 3.3. Behandlung der pulmonalen Hypertonie mit einem PPAR $\gamma$ -Agonisten im MCT-Rattenmodell

In einem weiteren Tierexperiment wurde das „MCT-Rattenmodell“ verwendet, um die Wirkung von Pioglitazon auf die PH zu untersuchen. Dabei wurde Ratten Monocrotalin (MCT) subkutan zur Induktion der PH appliziert. Um eine therapeutische Wirkung von Pioglitazon untersuchen zu können, wurde ein Teil der Tiere 21 Tage nach dieser Injektion für weitere 14 Tage mit Pioglitazon behandelt. Nach insgesamt 35 Tagen im Versuch wurde bei den Ratten der rechtsventrikuläre sowie systemische Blutdruck gemessen und nach anschließender Tötung wurden Organe, wie die Lunge und das Herz, für weitere Untersuchungen entnommen.



### 3.3.1. Messung des rechtsventrikulären und systemischen Blutdruckes

Die Messung des rechtsventrikulären und systemischen Blutdruckes fand über eine Katheter-basierte invasive Messung über die Jugularvene bzw. *Arteria carotis* (Herzschlagader) statt. Zur Auswertung der Drücke eines jeden Tieres wurden je drei Bereiche der Druckkurve von der mehrere Minuten dauernden Messung ausgewertet und gemittelt. Dabei zeigten die Daten, dass die Injektion von MCT zu einem deutlichen, signifikanten Anstieg des RVSP von im Mittel  $28,6 \pm 2,3$  mmHg auf  $74,9 \pm 4,1$  mmHg führte (Abbildung 27). Die therapeutische Behandlung mit Pioglitazon war des Weiteren dazu in der Lage, diesen MCT-induzierten Druckanstieg um  $13,5$  mmHg auf im Mittel  $61,4 \pm 4,5$  mmHg zu reduzieren. Ratten, die zur Kontrolle nur Pioglitazon ohne vorherige MCT-Injektion erhielten, zeigten einen weitgehend unveränderten RVSP von  $32,9 \pm 1,3$  mmHg (Daten nicht gezeigt). Der systemische Blutdruck hingegen veränderte sich durch die MCT-Injektion nicht signifikant gegenüber dem der Kontrolltiere. Durch die Pioglitazon-Behandlung wurde er nicht signifikant reduziert. Zusammenfassend zeigten diese Daten eine erfolgreiche Induktion der PH durch MCT-Injektion mit einem RVSP von über  $70$  mmHg, sowie eine wirksame Reduktion des RVSP durch Pioglitazon. Der systemische Blutdruck blieb unter diesen Umständen unverändert.



**Abbildung 27:** Bestimmung des rechtsventrikulären und systemischen Blutdruckes (RVSP und SBP) im MCT-Rattenmodell mittels invasiver Kathetermessung an Tag 35.

Die Messungen der Drücke erfolgten für (A) den rechten Ventrikel über die Jugularvene (RVSP, engl.: right ventricular systolic pressure, dt.: rechtsventrikulärer Druck; Kontrolle,  $n=5$ ; MCT,  $n=6$ ; MCT+Pio,  $n=7$ ) und (B) für den systemischen Druck (SBP, engl.: systemic blood pressure) über die Halsschlagader (*Arteria carotis*), in Kontrolltieren ( $n=6$ ), Monocrotalin-behandelten Ratten (MCT,  $n=6$ ) sowie Ratten, die 21 Tage nach MCT-Injektion eine Behandlung mit Pioglitazon erhielten (MCT+Pio). (\*\*\*)  $p < 0,001$  Kontrolle vs. MCT; #  $p < 0,05$  MCT vs. MCT+Pio,  $n=9$ ). Abkürzungen: MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon

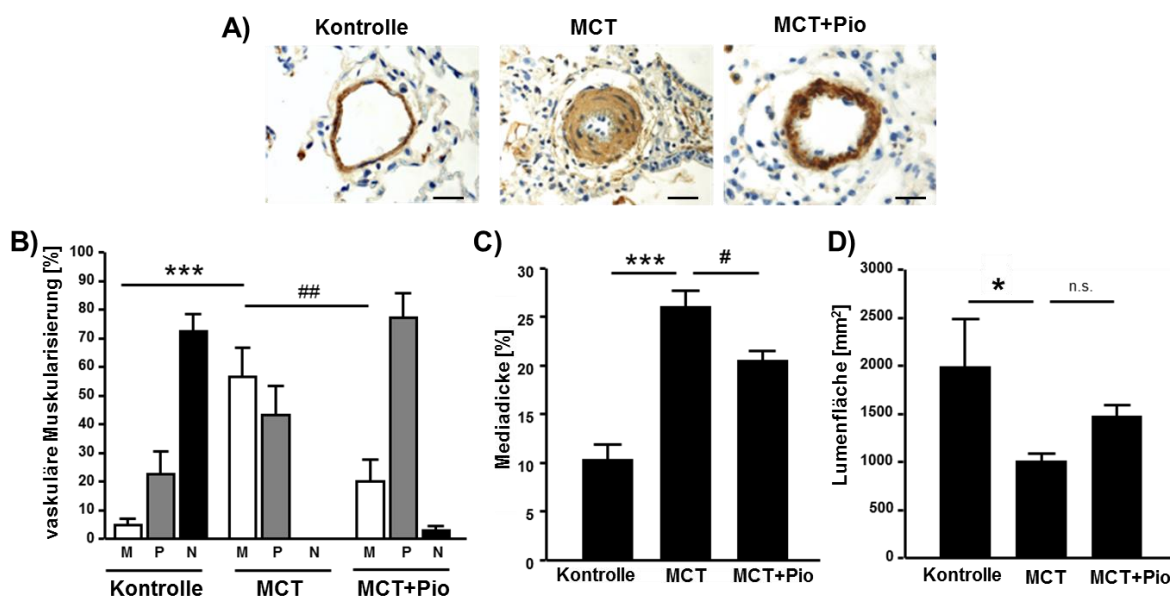
### 3.3.2. Untersuchung der Lungengefäße

Zur Untersuchung der möglicherweise den Druckänderungen zugrundeliegenden Veränderungen in den Lungengefäßen wurden immunohistochemische Färbungen der Lunge gegen *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA; Marker für glatte Gefäßmuskelzellen) angefertigt. Damit konnte die Muskularisierung der kleinen Lungengefäße (Größe  $< 100$   $\mu\text{m}$ ) hinsichtlich nicht, teilweise und vollständig muskularisierter Gefäße vorgenommen werden (Abbildung 28).

Die Färbungen und an ihnen vorgenommenen Quantifizierungen zeigten eine signifikante Zunahme der muskularisierten Gefäße durch die MCT-Injektion von  $\sim 5$  % in den Kontrolltieren auf über  $55$  % sowie einer Zunahme der partiell muskularisierten Gefäße. In den Lungen der MCT-behandelten Ratten

fehlten nicht muskularisierte Gefäße, welche in der Kontrollgruppe den größten Anteil mit  $72,4 \pm 6,3$  % ausmachten. Die therapeutische Behandlung mit Pioglitazon führte zu einer signifikanten Abnahme der muskularisierten Gefäße auf  $19,9 \pm 8,0$  %, was mit einer deutlichen Zunahme der partiell muskularisierten Gefäße führte ( $77,3 \pm 8,5$  %). In den Lungen dieser Ratten lag der Anteil nicht muskularisierter Gefäße bei  $2,8 \pm 1,6$  %. Zusammenfassend zeigte die Auswertung der  $\alpha$ -SMA Färbung eine Zunahme der Muskularisierung der kleinen Lungengefäße nach MCT-Injektion, was durch eine therapeutische Behandlung mit Pioglitazon signifikant reduziert werden konnte.

Neben der anteiligen Muskularisierung der Lungengefäße wurden zudem die Dicke der Media und die Lumenfläche bestimmt (Abbildung 28 C+D). Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Mediadicke in den MCT-behandelten Tieren, wobei es zu einem Anstieg der prozentualen Mediadicke von  $10,2 \pm 1,7$  % in der Kontrollgruppe auf  $26,1 \pm 1,7$  % in der MCT-Gruppe kam. Die Pioglitazon-Behandlung führte hier zu einer signifikanten Umkehrung des MCT-Effektes, sodass die Mediadicke in dieser Gruppe bei  $20,5 \pm 1,1$  % lag. Die Lumenfläche verhielt sich entsprechend umgekehrt, sodass nach MCT-Injektion eine signifikante Abnahme um etwa 50 % nachgewiesen werden konnte. Die therapeutische Behandlung mit Pioglitazon war in der Lage, der MCT-bedingten Abnahme der Lumenfläche entgegen zu wirken, sodass es für die Pioglitazon-behandelten Ratten zu einer Verringerung der Lumenfläche von nur etwa 26 % gegenüber der Kontrollgruppe kam. Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass es zu einer Zunahme der Muskularisierung der Lungengefäße nach MCT-Injektion kam, welche durch eine Behandlung mit Pioglitazon signifikant reduziert werden konnte.

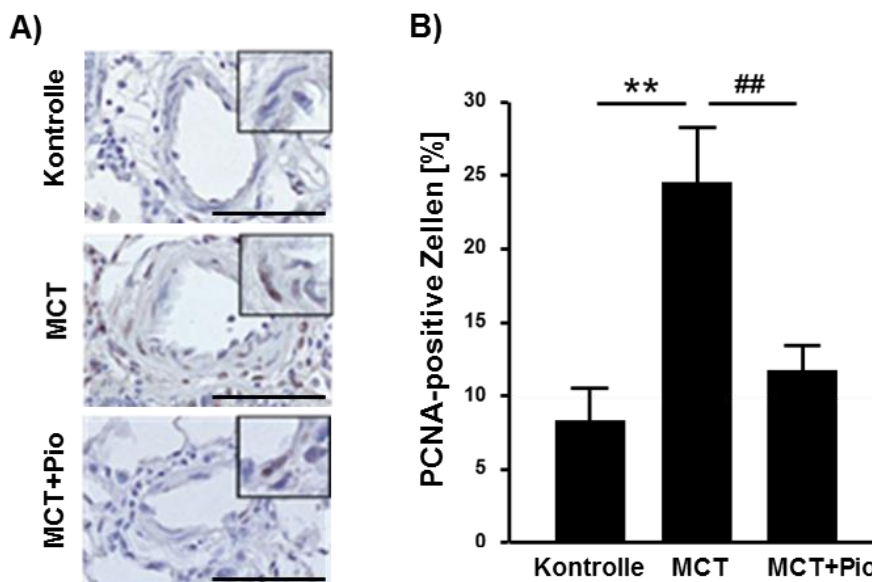


**Abbildung 28: Untersuchung der kleinen Lungengefäße (< 100 µm) im Monocrotalin (MCT)-Modell der Ratte mit therapeutischer Pioglitazon-Behandlung (MCT+Pio).**

Zur Untersuchung der Muskularisierung wurden alpha smooth muscle actin Färbungen von Lungenschnitten der Ratten zur Visualisierung der glatten Gefäßmuskelzellen (braun) angefertigt. In A) sind exemplarischer Bilder dieser Färbung dargestellt (Maßstabsbalken: 100 µm). B) Zur Beurteilung der Muskularisierung der Lungengefäße wurde der Anteil der nicht (N), partiell (P) und voll muskularisierten (M) Gefäße bestimmt (Kontrolle, n=42 Gefäße in n=3 Ratten; MCT, n=66 Gefäße in n=6 Ratten; MCT+Pio, n=91 Gefäße in n=7 Ratten). Es wurde darüber hinaus die prozentuale Dicke der Media mit Hilfe dieser gefärbten Schnitte berechnet (C) und die Lumenfläche bestimmt (D). (\* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001 Kontrolle vs. MCT; # p < 0,05; ## p < 0,01 MCT vs. MCT+Pio)

Um die Gefäßmuskularisierung näher untersuchen zu können, wurden immunohistologische Färbungen der Lunge gegen PCNA (engl.: *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) einem Proliferationsmarker, angefertigt (Abbildung 29 A). Die Auswertung dieser Färbungen zeigte ebenfalls eine signifikante Zunahme der Proliferation der Zellen in den Lungengefäßen nach MCT-Injektion von  $8,2 \pm 2,6$  % PCNA-positiven Zellen in Gefäßen von Kontrolltieren auf  $24,5 \pm 3,8$  % positive Zellen (Abbildung 29 B). Wie bei der Darstellung der für die Muskularisierung ausgewerteten Lungenschnitte, zeigte sich auch hier eine signifikante Reduktion der MCT-bedingten Zunahme der Proliferation durch die Pioglitazon-Behandlung, sodass in dieser Gruppe nur noch  $11,6 \pm 1,9$  % der Zellen in den Lungengefäßen PCNA-positiv waren.

Zusammengefasst zeigten diese Daten eine signifikante Zunahme der Zellproliferation in den kleinen Gefäßen der Lunge nach MCT-Injektion, was durch eine therapeutische Behandlung mit Pioglitazon signifikant reduziert werden konnte.



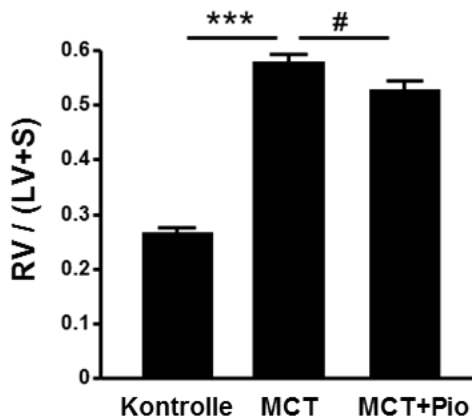
**Abbildung 29: Untersuchung proliferativ aktiver Zellen (PCNA-positiv) in den kleinen Lungengefäßen der Ratten des MCT-Modells.**

Zur Bestimmung proliferativ aktiver Zellen wurden immunohistologische Färbungen der Lungen gegen PCNA (braun) mit Hämalaun-Gegenfärbung zur Darstellung der Zellkerne (blau) angefertigt. In A sind exemplarische Bilder dargestellt. Maßstabsbalken:  $80 \mu\text{m}$ . B) Es wurde der prozentuale Anteil PCNA-positiver Zellen innerhalb der Gefäße ermittelt (Kontrolle,  $n=8$ ; MCT,  $n=9$ ; MCT+Pio,  $n=9$ ). Abkürzungen: PCNA, Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen; MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon (\*\*  $p < 0,01$  Kontrolle vs. MCT; ##  $p < 0,01$  MCT vs. MCT+Pioglitazon)

### 3.3.3. Bestimmung des Fulton's Index und der Kardiomyozytengröße sowie der differentiellen Genexpression von BNP

Durch die Veränderungen der Lungengefäße kommt es bei der PH zur Erhöhung des rechtsventrikulären Druckes, was im späteren Verlauf zu Veränderungen des Herzens führen kann. Um solche Veränderungen feststellen zu können, wurden zunächst die Gewichte des rechten Ventrikels und

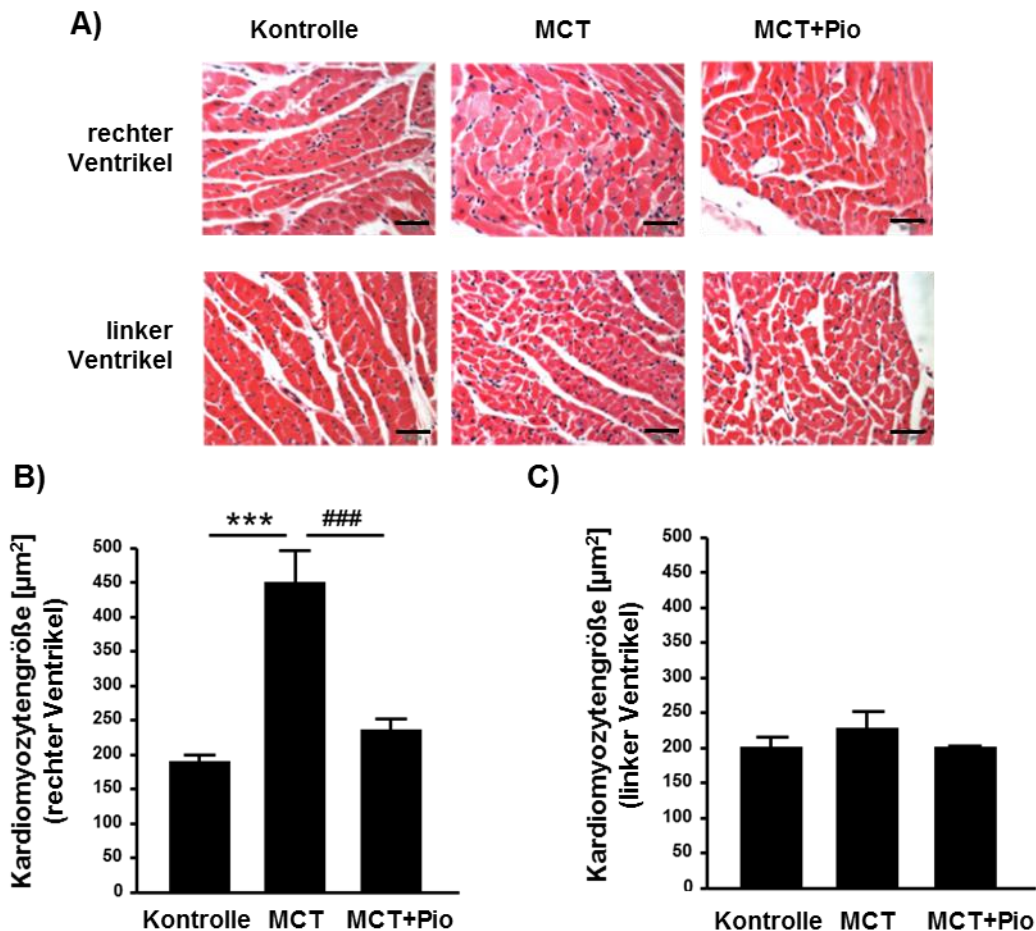
des linken Ventrikels zusammen mit dem Septum dokumentiert. Anschließend wurde aus diesen Werten der Fulton's Index, also der Quotient aus dem Gewicht des rechten Ventrikels zum Gewicht des linken Ventrikels mit Septum, berechnet (Abbildung 30). Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme des Fulton's Index für die Ratten der MCT-Gruppe von  $0,26 \pm 0,05$  in der Kontrollgruppe auf  $0,56 \pm 0,02$ . Diese Rechtsherzhypertrophie wurde durch die Behandlung mit Pioglitazon signifikant auf  $0,52 \pm 0,02$  reduziert.



**Abbildung 30:** Ermittlung des Fulton's Index zur Bestimmung einer Rechtsherzhypertrophie im MCT-Rattenmodell

Nach Tötung der Ratten wurden Organe entnommen und unter anderem die Gewichte des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels zusammen mit dem Septum (LV+S) bestimmt. Aus diesen Werten wurde der Quotient:  $RV/(LV+S)$  und damit Fulton's Index berechnet (Kontrolle,  $n=5$ ; MCT,  $n=6$ ; MCT+Pio,  $n=9$ ). (\*\*\*)  $p < 0,001$  Kontrolle vs. MCT; #  $p < 0,05$  MCT vs. MCT+Pio). Abkürzungen: MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon

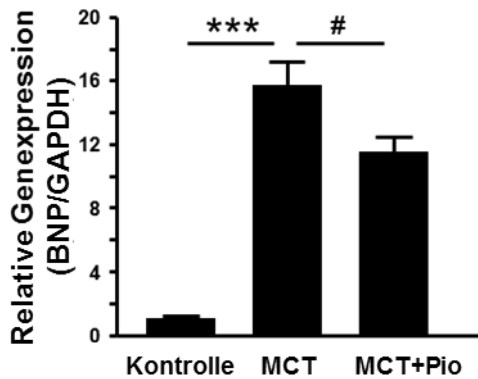
Um die Herzen der Ratten detaillierter auf die druckbedingten Veränderungen untersuchen zu können, wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen des rechten und linken Ventrikels angefertigt (Abbildung 31 A). Anhand dieser Färbung konnte die Größe der Kardiomyozyten in Form der *cross sectional area* (CSA) bestimmt werden. Für den rechten Ventrikel zeigte sich eine MCT-bedingte, signifikante Zunahme der Kardiomyozytengröße von  $187,9 \pm 11,6 \mu\text{m}^2$  in der Kontrollgruppe auf  $448,2 \pm 48,1 \mu\text{m}^2$  in der MCT-Gruppe (Abbildung 31 B). Die Behandlung mit Pioglitazon führte schließlich zu einer fast vollständigen Umkehr des MCT-bedingten Effektes auf die Kardiomyozytenfläche. So zeigten die Kardiomyozyten in der Pioglitazon-Gruppe eine Größe von  $235,4 \pm 18,8 \mu\text{m}^2$  im rechten Ventrikel. Die Größe der Kardiomyozyten im linken Ventrikel (Abbildung 31 C) veränderte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe hingegen weder durch MCT noch durch Pioglitazon.



**Abbildung 31: Bestimmung der Größe der Kardiomyozyten im rechten und linken Ventrikel für Ratten aus dem MCT-Modell**

Zur Untersuchung der Kardiomyozytengröße wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen angefertigt, von denen exemplarische Bilder des rechten und linken Ventrikels dargestellt sind (A). Maßstabsbalken: 50 µm. Anhand dieser histologisch gefärbten Schnitte wurde die Größe der Kardiomyozyten als cross sectional area (CSA) im B) rechten und C) linken Ventrikel bestimmt (n=50 Kardiomyozyten je Tier für n=5 Tiere pro Gruppe). (\*\*\*)  $p < 0,001$  Kontrolle vs. MCT; ###  $p < 0,001$  MCT vs. MCT+Pio) Abkürzungen: MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon

Zur Analyse einer möglichen differentiellen Genexpression wurde darüber hinaus RNA aus dem Herzgewebe der Ratten isoliert und zur Analyse mittels quantitativer PCR in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Expression von BNP im rechten Ventrikel gemessen, einem Markerprotein für Herzversagen, welches auch verstärkt nach einem Dehnungsreiz des Herzmuskels ausgeschüttet wird (Tokola *et al.* 2001). Dabei zeigte sich eine signifikante und um mehr als das 15-fach erhöhte Genexpression von BNP in den Herzen MCT-behandelter Ratte gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 32). Die Behandlung mit Pioglitazon führte zu einer signifikanten Verringerung des MCT-bedingten Anstieges der BNP Genexpression.



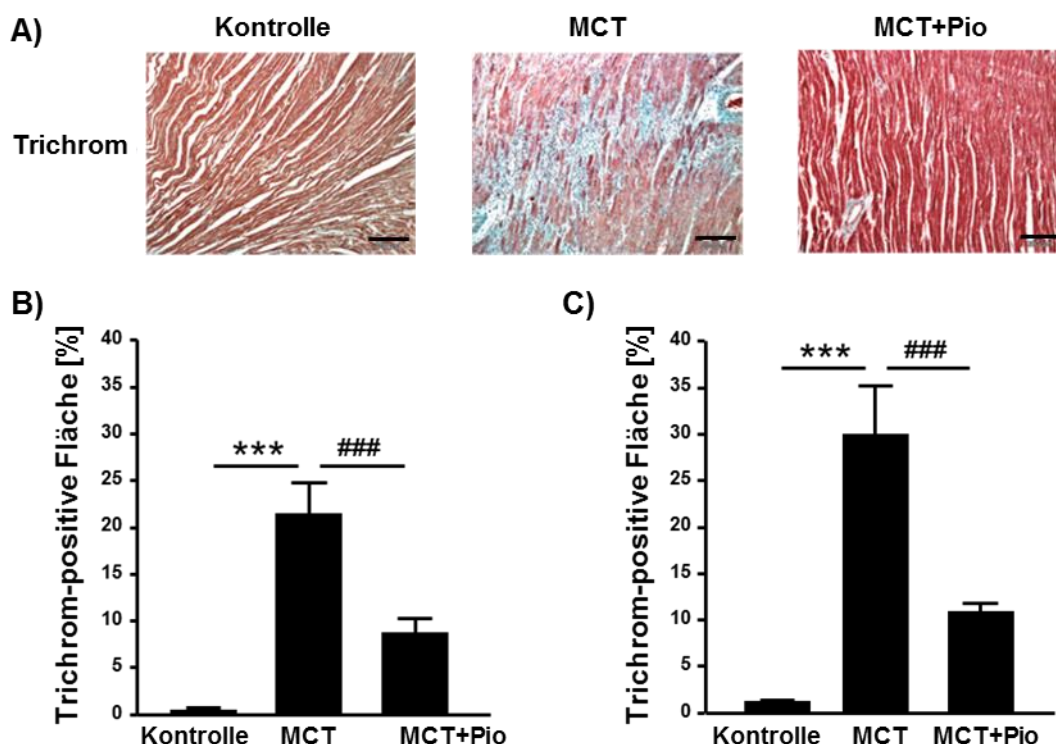
**Abbildung 32: Untersuchung der differentiellen Genexpression im rechten Ventrikel im MCT-Rattenmodell mit und ohne pharmakologische Behandlung mit Pioglitazon.**

Aus dem rechten Ventrikel der Ratten wurde RNA isoliert und zur Untersuchung mittels quantitativer PCR in cDNA umgeschrieben, um die Expression von BNP zu messen. Dargestellt ist die BNP-Expression normalisiert auf das Referenzgen GAPDH (Kontrolle, n=6; MCT, n=11; MCT+Pio, n=11). (\*\*\*)  $p < 0,001$  Kontrolle vs. MCT; #  $p < 0,05$  MCT vs. MCT+Pio) Abkürzungen: MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon; BNP, engl.: brain natriuretic peptide, dt.: natriuretischen Peptides Typ B; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen am Herzen eine Zunahme der Größe rechtsventrikulärer Kardiomyozyten und des Gewichtes des rechten Ventrikels nach MCT-Injektion, was durch eine Behandlung mit Pioglitazon teilweise verhindert wurde. Gleichzeitig war durch MCT im rechten Ventrikel eine erhöhte Expression von BNP messbar, was ebenfalls durch die Pioglitazon-Behandlung verringert wurde.

### 3.3.4. Untersuchung kardialer fibrotischer Veränderungen

Nachdem gezeigt wurde, dass Pioglitazon die MCT-induzierte Rechtsherzhypertrophie und Vergrößerung der Kardiomyozyten erfolgreich reduzierte, wurden fibrotischer Veränderungen durch eine Massons'-Trichrom-Färbung, bei der sich Kollagen blau darstellt, untersucht (Abbildung 33 A). Die Auswertung der Herzschnitte dieser Färbung zeigte eine Zunahme der fibrotischen Fläche in beiden Ventrikeln. Im rechten stieg der Anteil der Kollagen-positiven Fläche signifikant von  $1,2 \pm 0,2$  % in der Kontrollgruppe auf  $29,8 \pm 5,4$  % in der MCT-Gruppe an (Abbildung 33 C). Ähnlich sah die Veränderung im linken Ventrikel aus (Abbildung 33 B), hier erhöhte sich der Anteil fibrotischer Bereiche MCT-bedingt signifikant von  $0,4 \pm 0,4$  % auf  $21,4 \pm 3,4$  % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Behandlung mit Pioglitazon konnte die Fibrose in beiden Ventrikeln signifikant reduziert werden, sie lag in dieser Gruppe für den rechten Ventrikel bei  $10,8 \pm 1,0$  % und für den linken Ventrikel bei  $8,6 \pm 1,7$  %. Zusammenfassend zeigten diese Daten neben der erfolgreichen Reduktion der MCT-induzierten Rechtsherzhypertrophie und Vergrößerung der Kardiomyozytenfläche durch die Behandlung mit Pioglitazon zusätzlich eine Reduktion der MCT-bedingten Fibrose im rechten sowie linken Ventrikel.



**Abbildung 33:** Bestimmung fibrotischer Veränderungen im Herzgewebe von Ratten nach MCT-Injektion mit und ohne therapeutische Behandlung mit Pioglitazon.

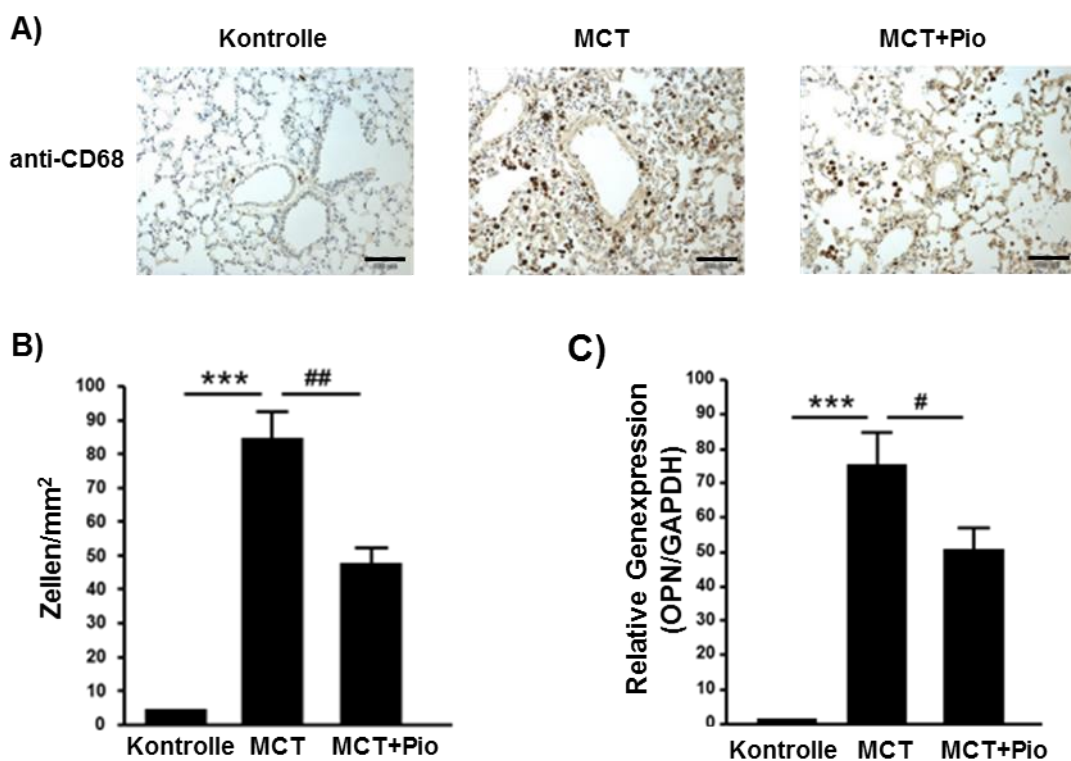
Zur Untersuchung von fibrotischen Veränderungen wurden Kollagenfasern mittels Massons'-Trichrom-Färbung auf Gewebeschnitten des rechten und linken Ventrikels von Ratten aus dem MCT-Modell durchgeführt. Unter A) sind exemplarische Bilder dieser Färbungen dargestellt (Maßstabsbalken: 200 µm). Zur Auswertung der fibrotischen Veränderungen innerhalb der drei Gruppen (Kontrolle, n=5; MCT, n=5; MCT+Pio, n=5) wurde der prozentuale Anteil der fibrotischen Veränderungen je Gewebesausschnitt sowohl für den B) linken als auch C) rechten Ventrikel ermittelt. Abkürzungen: MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon (\*\*\*)  $p < 0,001$  Kontrolle vs. MCT; ###  $p < 0,001$  MCT vs. MCT +Pioglitazon)

### 3.3.5. Untersuchung inflammatorischer Veränderungen der Lunge

Da die PH neben einer Veränderung der Proliferation der Lungengefäße und Veränderungen am Herzen auch durch eine differentielle Inflammation im Lungengewebe gekennzeichnet ist (Rabinovitch *et al.* 2014), wurde mittels CD68-Färbung die Infiltration von Makrophagen in das Lungengewebe der Ratten untersucht (Abbildung 34 A). Dabei zeigte sich mit  $84,1 \pm 8,3$  Zellen/mm<sup>2</sup> eine signifikante Erhöhung der Zellzahl pro mm<sup>2</sup> in der MCT-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ( $4,2 \pm 0,2$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Dieser MCT-bedingte Anstieg der Makrophageninfiltration wurde durch die Behandlung mit Pioglitazon zumindest teilweise reduziert, hier wurden nur  $47,3 \pm 4,9$  Zellen/mm<sup>2</sup> gezählt (Abbildung 34 B).

Osteopontin spielt eine Rolle bei der Migration und Akkumulation von Makrophagen (Lund *et al.* 2009). Deshalb wurde RNA aus dem Lungengewebe der Ratten isoliert und zur Genexpressionsanalyse mittels quantitativer PCR in cDNA umgeschrieben. Die Expression von Osteopontin stieg dabei durch MCT signifikant auf ein 75-faches im Vergleich zu den Kontrolltieren an ( $75,1 \pm 9,6$ -fach höher in der MCT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe). Durch eine Behandlung mit Pioglitazon konnte dieser Anstieg signifikant reduziert, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden: die Expression lag noch  $50,5 \pm 6,8$ -fach über der Expression in der Kontrollgruppe (Abbildung 34 C).

Damit zeigte sich neben einer Reduktion der MCT-bedingten Veränderungen der Lungengefäße und des Herzens auch ein positiver Effekt der Pioglitazon-Behandlung auf inflammatorische Faktoren.



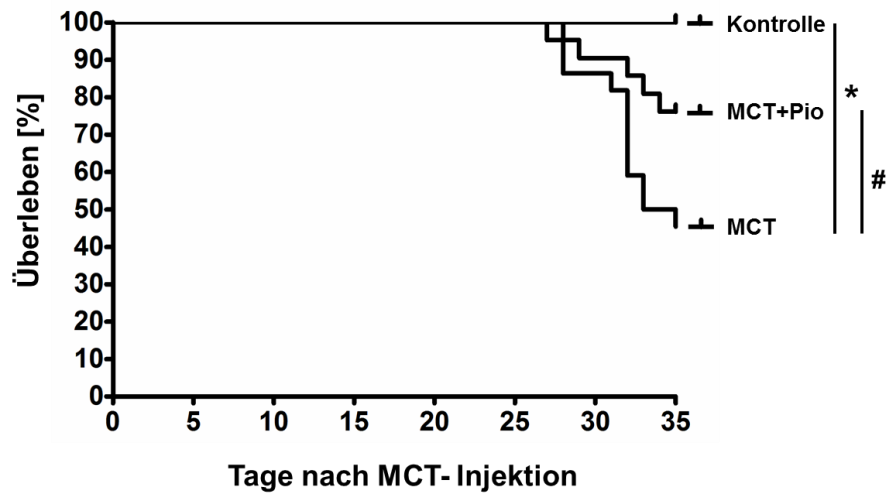
**Abbildung 34: Analyse inflammatorischer Veränderung des Lungengewebes im MCT-Rattenmodell mit und ohne Pioglitazon-Behandlung.**

Zur Untersuchung der Inflammation wurde die Makrophageninfiltration in die Lunge mittels anti-CD68 Färbung untersucht. A) zeigt exemplarische Bilder dieser Färbung (Maßstabsbalken: 100 µm) und B) das Ergebnis der Auszählung der CD68-positiven Zellen (10 Hauptgesichtsfelder für n=3-5 Ratten pro Gruppe). C) Daneben wurde die Genexpression von Osteopontin im Lungengewebe nach RNA-Isolation und Umschreiben zu cDNA mittels quantitativer PCR ermittelt (Kontrolle, n=5; MCT, n=6; MCT+Pio, n=13). Osteopontin (\*\*\*)  $p < 0,001$  Kontrolle vs. MCT; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  MCT vs. MCT+Pioglitazon) Abkürzungen: MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon; OPN

### 3.3.6. Überlebensrate der Ratten im MCT-Modell

Neben den MCT-bedingten Veränderungen der Lunge, des Herzens und der Inflammation führte diese auch zu einer erhöhten Mortalität der Ratten innerhalb der 35 Versuchstage (Abbildung 35). So überlebten bis zum Versuchsende nur 45 % der n=22 Ratten der MCT-Gruppe. Die Behandlung mit Pioglitazon, welche mit den vorangehend beschriebenen vorteilhaften Effekten auf die MCT-bedingten Veränderungen einherging, führte zu einer erhöhten Überlebensrate der Ratten. Es überlebten bis zum Versuchsende 76 % der Pioglitazon-behandelten Tiere, bei denen Blutdrücke gemessen und Organe entnommen werden konnten. In der Kontrollgruppe verstarb innerhalb des Versuches kein Tier.





**Abbildung 35:** Kaplan-Meier-Kurve für die Ratten des MCT-Modells mit und ohne Pioglitazon-Behandlung

Über den Versuchszeitraum von 35 Tagen wurde dokumentiert, wann ein Tier in welcher Gruppe vorzeitig durch Tod aus dem Versuch ausschied. Das Ergebnis ist hier in Form einer Überlebenskurve für die Tiere einer jeden Gruppe (Kontrolle,  $n=9$ ; MCT,  $n=22$ ; MCT+Pio,  $n=21$ ) dargestellt. (\*  $p < 0,05$  Kontrolle vs. MCT; #  $p < 0,05$  MCT vs. MCT+Pio) Abkürzungen: MCT, Monocrotalin; Pio, Pioglitazon

## 4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Hochfettdiät (HFD) auf die Entstehung der pulmonalen Hypertonie (PH) sowie ein potenzieller Nutzen einer PPAR $\gamma$ -agonistischen Behandlung durch Pioglitazon auf die MCT- bzw. HFD-induzierte PH untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Entstehung der PH, sowie der mögliche Zusammenhang zwischen PH und Insulinresistenz charakterisiert. Zuletzt erfolgte in Bezug auf die Insulinresistenz eine Analyse der Bedeutung der Protein-Tyrosin-Phosphatase DEP-1 in der Insulin-Signaltransduktion.

### 4.1. Phänotypisierung der *SmPpar $\gamma$* -Mäuse

Der erfolgreiche *knockout* von PPAR $\gamma$  wurde in den Mäusen zum einen in Aorten mittels Western Blot untersucht und zum anderen mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf isolierten glatten Gefäßmuskelzellen aus der Pulmonalarterie. Dabei zeigte sich für *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse Restprotein im Western Blot, was an Endothelzellen oder restliche Zellen der Adventitia, welche nicht vollständig entfernt wurden, liegen könnte. Die Immunfluoreszenzbilder zeigten ein vollständiges Fehlen von PPAR $\gamma$  in den glatten Gefäßmuskelzellen der *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse, sodass man von einem erfolgreichen *knockout* in diesen Zellen ausgehen kann.

Zur phänotypischen Charakterisierung der *SmPpar $\gamma$* <sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen wurde zweimal wöchentlich das Gewicht der Tiere bestimmt. Zudem fanden vor Versuchsbeginn sowie nach zwölf und 24 Wochen Untersuchungen bezüglich der Glukosehomöostase durch GTT- und ITT-Experimente statt. Darüber hinaus wurden die Mäuse nach Woche zwölf und 24 bezüglich ihrer Körperzusammensetzung im NMR und hinsichtlich der Verstoffwechslung von Nährstoffen und ihrer körperlichen Aktivität im TSE LabMaster untersucht.

Beim Gewichtsverlauf zeigte sich ein erwartungsgemäß signifikant stärkerer Anstieg des Gewichtes für die Tiere unter HFD im Vergleich zur NFD. Dass Pioglitazon darüber hinaus zu einem weiteren signifikanten Anstieg des Gewichtes führte, ist in Übereinstimmung mit anderen klinischen bzw. tierexperimentellen Untersuchungen (Smith *et al.* 2005, Burkey *et al.* 2000). Hierbei handelt es sich auch um eine bereits bekannte klinische Nebenwirkung, die v.a. aus einer gesteigerten Adipozytendifferenzierung und einer erhöhten Flüssigkeitsretention resultiert (Chawla *et al.* 1994, Nesto *et al.* 2004). Die Flüssigkeitsretention, welche mit peripheren Ödemen einhergeht, ist dabei Folge einer veränderten Natrium- und Wasser-Reabsorption im distalen Sammelrohr der Niere (Guan *et al.* 2005, Borsting *et al.* 2012). Die beobachtete zusätzliche Gewichtszunahme unter Pioglitazon-Behandlung wurde durch die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen bestätigt. Hier zeigten sich nach 24 Wochen für die Pioglitazon-behandelten Mäuse eine signifikant höhere Fettmasse sowie signifikant mehr freies Wasser. Weiterhin war die *post mortem* ermittelte Masse an braunem Fettgewebe in den Pioglitazon-behandelten Mäusen signifikant höher als in den Mäusen der HFD- und NFD-Gruppen. Dass die Aktivierung von PPAR $\gamma$  über Thiazolidindione (TZDs), wie Pioglitazon, zu einem Anstieg der Fettmasse

und dabei vor allem der braunen Fettmasse führte, stimmt mit Daten aus der Literatur überein (Tai *et al.* 1996). Das braune Fettgewebe, welches PPAR $\gamma$  exprimiert (Sears *et al.* 1996), ist darauf spezialisiert, Fettsäuren abzubauen und die dabei entstehende Energie in Form von Wärme freizugeben. Dies ist durch das gewebespezifische Entkoppelungsprotein UCP-1 (engl.: *uncoupling protein-1*) möglich. Es gibt zudem zahlreiche Studien, die gezeigt haben, dass ein Verlust von PPAR $\gamma$  in reifen Adipozyten zu Lipodystrophie und Insulinresistenz führt (He *et al.* 2003, Imai *et al.* 2004). Auch der selektive Verlust von PPAR $\gamma$ -2 führt zu einer Verringerung der Fettmasse und einer starken Insulinresistenz mit Dyslipidämie (Medina-Gomez *et al.* 2007). Obwohl auch die Quantität der Fettmasse als maßgeblich für die Insulinresistenz diskutiert wird, zeigt sich somit, dass weitere Faktoren eine pathologische Rolle spielen. Auch ist weitgehend gesichert, dass viszerale Fettspeicher schädlicher im Hinblick auf das Risiko für Diabetes, kardiovaskuläre Krankheiten, Bluthochdruck und einige Tumoren sind als subkutane Fettgewebe (Kissebah 1997, Reaven *et al.* 2004). Dabei spielt vermutlich die Insulinresistenz mit der damit einhergehenden Hyperinsulinämie eine verbindende Rolle zwischen viszeralen Fettspeichern und dem Risiko für die vorgenannten Krankheiten (Bergman *et al.* 2006).

Die Untersuchungen der Mäuse hinsichtlich der Glukosetoleranz im GTT und der Insulinsensitivität im ITT zeigten erwartungsgemäß eine Verschlechterung der Glukosehomöostase für die Mäuse unter HFD. Bei der Glukosehomöostase spielt die postprandiale Glukoseaufnahme eine wichtige Rolle, welche über den Glukosetransporter 4 (GLUT4) in den Skelettmuskel und in das Fettgewebe erfolgt (Katz *et al.* 1983, Ferrannini *et al.* 1985). Darüber hinaus ist bekannt, dass GLUT4 auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird und hier ebenfalls zur Insulin-abhängigen Aufnahme von Glukose beiträgt (Standley und Rose 1994). Der *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen führte interessanterweise unter NFD ebenfalls zu einer verschlechterten Glukoseverwertung, was sich tendenziell in einer schlechteren Glukosetoleranz nach 24 Wochen unter HFD und einer noch deutlicher bzw. signifikant verringerten Insulinsensitivität nach zwölf und 24 Wochen zeigte. Ein Effekt auf das Insulin-*Signaling* durch den PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen wurde im Western Blot näher betrachtet. Hier zeigte sich in pulmonal arteriellen Gefäßmuskelzellen (mPASCs; engl.: *mouse pulmonary arterial smooth muscle cells*) von Mäusen mit PPAR $\gamma$ -*knockout* eine reduzierte Phosphorylierung vom *downstream* des Insulinrezeptors gelegenen Akt (pAkt Thr308) nach Stimulation mit Insulin, wenn man diese mit den mPASCs aus SmPpar $^{+/+}$ -Mäusen vergleicht. Dies deutet auf eine geringere Insulinsensitivität der mPASCs mit PPAR $\gamma$ -*knockout* hin. Dass der *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Insulinresistenz bzw. tendenziell zu einer Glukose-Intoleranz führt, konnte in diesem Mausmodell erstmals gezeigt werden. Es ist jedoch unklar, ob das verminderte Insulin-*Signaling* in glatten Gefäßmuskelzellen mit PPAR $\gamma$ -*knockout* alleine für die im GTT bzw. ITT beobachtete schlechtere Glukosetoleranz bzw. Insulinsensitivität verantwortlich ist. So könnte die Verschlechterung der Glukosehomöostase in den SmPpar $^{-/-}$ -Mäusen unter NFD auch mit dem leichten Anstieg der Masse des perirenal und epididymalen Fettgewebes zusammenhängen. In Versuchen mit Ratten konnte gezeigt werden, dass das operative Entfernen des epididymalen und perirenal Fettes sowie die pharmakologische oder Leptin-induzierte bzw. Diät-induzierte Reduktion des epididymalen Fettes zur Verbesserung der hepatischen Insulinsensitivität führte (Barzilai *et al.* 1999). Wie ein gewebespezifischer *knockout* von PPAR $\gamma$  in den glatten Gefäßmuskelzellen jedoch zu einem Anstieg dieser beiden Fettdepots führt, bleibt weiterhin ungeklärt. Hierbei könnten eventuelle *off-*

*target* Effekte des *knockouts* von PPAR $\gamma$  eine Rolle spielen. Es scheint allerdings der *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen einen Einfluss auf die Fettverteilung im Körper der Mäuse und darüber einen weiteren Einfluss auf die Glukosehomöostase in Form einer verschlechterten Insulinsensitivität und Glukosetoleranz zu haben.

In der Literatur werden TZDs wie Pioglitazon als sogenannte „Insulin-Sensitizer“ bezeichnet und in der Klinik zum Verbessern der Insulinsensitivität und damit zur Behandlung des Typ 2 Diabetes eingesetzt ([www.nice.org.uk](http://www.nice.org.uk)). Aufgrund tierexperimenteller und epidemiologischer Beobachtungen (Tseng und Tseng 2012; Lewis *et al.* 2011; Neumann *et al.* 2012), die ein leicht erhöhtes Blasenkarzinom-Risiko zeigten, wird vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte eine Neueinstellung von Patienten allerdings aktuell nicht empfohlen. Auf der anderen Seite bemängeln Soccio *et al.*, dass die positiven Effekte neben der Insulin-Sensitivierung bei dieser Bewertung außer Acht gelassen wurden (Soccio *et al.* 2014). So gibt es Studien die zeigten, dass Pioglitazon das Risiko für Herzinfarkte und andere Tumoren reduziert, sodass trotz des Pioglitazon-assoziierten erhöhten Mortalitätsrisiko bei Hüftfrakturen eine reduzierte Gesamtmortalität durch Soccio *et al.* für die Pioglitazon-Behandlung bei Typ 2 Diabetikern berechnet wurde (Soccio *et al.* 2014).

Im gewählten Mausmodell ist Pioglitazon jedoch nicht dazu in der Lage, während der zwölfwöchigen Behandlungsphase die Glukosetoleranz bzw. Insulinsensitivität zu verbessern. Auffällig ist auch, dass es keine Veränderung bezüglich des Fettdepots gibt. So ist für TZDs bekannt, dass sie zwar zu einem Anstieg des subkutanen Fettes führen, es jedoch zu einer Reduktion des viszeralen Fettes kommt (Mori *et al.* 1999). In diesem Zusammenhang wurde die Theorie aufgestellt, dass TZDs die Fettverteilung in den Depots verlagern, die weniger anfällig für hormonelle Stimulation sind und einen schlechteren Zugang zur portalen Zirkulation aufweisen (Tontonoz und Spiegelman 2008). So hat man beobachtet, dass es während der Hyperinsulinämie zu einer vermehrten Freisetzung von Fettsäuren aus den viszeralen und im Oberkörper befindlichen Fettdepots kommt (Guo *et al.* 1999). Für die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch TZDs konnte dabei gezeigt werden, dass die Aufnahme freier Fettsäuren, deren zirkulierende Menge im Blut positiv mit dem Auftreten der Insulinresistenz korrelieren, in das weiße Fettgewebe verbessert wird, was den Nebeneffekt der Gewichtszunahme mit sich bringt (Ahmadian *et al.* 2009). Neben der Wirkung der TZDs auf das Fett selber wird zudem eine Wirkung auf das Gehirn bei der Gewichtszunahme diskutiert (Ryan *et al.* 2011). So führt eine Behandlung mit dem TZD Rosiglitazon in Mäusen mit Neuronen-spezifischem PPAR $\gamma$  *knockout* zu keinem Gewichtsanstieg unter HFD, aber auch zu keiner verbesserten hepatischen Insulin-Sensitivierung (Lu *et al.* 2011).

In dem in dieser Arbeit untersuchten Mausmodell führte die Behandlung mit Pioglitazon hingegen lediglich zu einem Anstieg des Gesamtgewichtes sowie der gesamten Fettmasse und des freien Wassers. Die Masse des epididymalen und perirenal Fettgewebes blieb genau wie die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz jedoch unverändert gegenüber den HFD-gefütterten Mäusen. Dies könnte auch einen Grund für das Ausbleiben einer Pioglitazon-assoziierten Verbesserung der Insulinsensitivität darstellen.

Um ein Defizit an Adiponektin als mögliche Ursache der fehlenden Pioglitazon-Wirkung auf die Glukosehomöostase auszuschließen, wurden die Adiponektin-Serumspiegel der *SmPpar $\gamma$* -Mäuse gemessen. Laut Literatur führt die PPAR $\gamma$ -Aktivierung über TZDs zu einer erhöhten Adiponektin-

Expression in den Adipozyten sowie zu höheren Adiponektin-Serumspiegeln (Maeda *et al.* 2001, Bouskila *et al.* 2005). In den hier untersuchten Mäusen konnte in Abhängigkeit der Pioglitazon-Behandlung ebenfalls eine signifikant erhöhte Konzentration von Adiponektin in den *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen sowie tendenzielle Erhöhung in den Wildtypen unter HFD gezeigt werden. Da die Arbeitsgruppe um Nawrocki in Adiponektin-defizienten Mäusen zeigen konnte, dass der Effekt der TZDs auf die Glukosetoleranz in diesen Mäusen sehr gering ausfällt, kann man auf einen zumindest zum Teil Adiponektin-vermittelten Effekt der TZDs schließen (Nawrocki *et al.* 2006). Eine Überexpression von Adiponektin in 3T3-L1 Zellen führte zudem zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$ -Expression, was mit einer erhöhten Adipozytendifferenzierung einherging (Fu *et al.* 2005).

Die weitere Charakterisierung der Mäuse im TSE LabMaster zeigte erwartungsgemäß eine Reduktion des respiratorischen Quotienten (RQ) für die HFD-gefütterten im Vergleich zu den NFD-gefütterten Mäusen (Marvyn *et al.* 2016). Auffällig war hier in der NFD-Gruppe, dass die *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse tagsüber einen niedrigeren RER aufwiesen. Dies spricht für eine verstärkte Energiegewinnung der Tiere durch Verstoffwechslung von Fettsäuren. Inwiefern ein *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen zu einem solchen Effekt führt, ist zunächst nicht ersichtlich. Bei der Betrachtung der Aktivität der Tiere fällt jedoch auf, dass die *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäuse unter NFD eine signifikant geringere planimetrische Motilität in x-y-Ebene aufwiesen als die *SmPpar $\gamma$ <sup>+/+</sup>*-Mäuse unter der gleichen Diät. Dies gibt zudem einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Ursache der Verschlechterung des Glukosemetabolismus in diesen Mäusen. So erfolgt die Aufnahme von Glukose in den Skelettmuskel und das Fettgewebe unter physiologischen Bedingungen postprandial nach Insulin-Stimulation über den Glukosetransporter GLUT4 (Katz *et al.* 1983, Ferrannini *et al.* 1985). Die Glukosetransporter befinden sich bis zur Insulinrezeptor-Aktivierung intrazellulär in Vesikeln gespeichert. Daneben erfolgt die Translokation der Vesikel mit den GLUT4-Transportern zudem durch Muskelkontraktion bei moderater physischer Aktivität (van Loon *et al.* 2001, Wasserman *et al.* 2011). Die verringerte Aktivität der Tiere könnte daher mit einer verschlechterten Glukoseaufnahme in den Muskel einhergehen. Der RQ sowie die physische Aktivität waren in Pioglitazon-behandelten Mäusen unter HFD gegenüber HFD-gefütterten unverändert. Damit führt der PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer vermehrten Verstoffwechslung von Fettsäuren sowie zu einer verringerten physische Aktivität der Mäuse, wohingegen Pioglitazon keinen Einfluss auf einen der beiden Faktoren zeigt.

#### **4.2. Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf die pulmonale Hypertonie**

Die PH stellt noch immer eine Krankheit mit nur unzureichenden therapeutischen Möglichkeiten und einer hohen Mortalität dar. Die bisherigen Therapien zielen vor allem durch Verringerung der pulmonalen Vasokonstriktion und Verbesserung der Vasodilatation auf eine symptomatische Verbesserung ab. In neueren Ansätzen versucht man hingegen die vaskulären Umbauprozesse, welche zur Erhöhung des pulmonalen Druckes führen, zu verändern. Dazu zählen z.B. der Signalweg über den transformierenden Wachstumsfaktor TGF (engl.: *transforming growth factor*) (Ambalavanan *et al.* 2008, Upton und Morrell 2009). Eine weitere Möglichkeit der Therapie stellt die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  dar. Dieser wird im Lungengewebe von PAH-Patienten reduziert exprimiert (Ameshima *et al.* 2003). In einigen experimentellen Tierversuchen konnte eine Reduktion von Hypoxie-induzierten PH-Symptomen, wie z.B. Gefäßveränderungen durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung über

Rosiglitazon, gezeigt werden (Crossno *et al.* 2007, Nisbet *et al.* 2010). PPAR $\gamma$  wird im Herzen sowie in Zellen der Gefäße (Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, eingewanderte Monozyten/Makrophagen) exprimiert und seine Aktivierung führt dort zu anti-atherogenen und anti-hypertrophen Effekten (Kim und Yang 2013). Zudem schützt die Aktivierung von PPAR $\gamma$  vor kardialer Hypertrophie und Herzversagen (Yue *et al.* 2001, Wayman *et al.* 2002, Duan *et al.* 2005).

In dieser Arbeit wurde die PH in zwei unterschiedlichen Tiermodellen untersucht. Zum einen im Monocrotalin (MCT)-Rattenmodell und zum anderen wurde untersucht, ob eine Hochfettdiät (HFD) in einem Mausmodell mit SmPpar $\gamma^{+/+}$ - und SmPpar $\gamma^{-/-}$ -Mäusen eine PH auslöst. Beide Modelle wurden hinsichtlich entscheidender Parameter der PH, wie Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße, rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP; engl.: *right ventricular systolic pressure*), Rechts- und Linksherzhypertrophie, Fibrose im Herzen und Inflammation in der Lunge untersucht.

In beiden Modellen erfolgte die Verabreichung von Pioglitazon über das Futter. Damit ergeben sich aufgrund einer unterschiedlichen Futteraufnahme bereits verschiedenen Therapiedosen für die Tiere. Dies wiederum resultiert möglicherweise in einer höheren Streuung der Messdaten. Eine Alternative würde das Applizieren von Pioglitazon per Injektion darstellen. Dies wurde in den hier untersuchten Tiermodellen aufgrund des hohen und gegebenenfalls einflussreichen Stresses für die Tiere nicht verwendet. Darüber hinaus fand die Verabreichung der Pioglitazon-Therapie über das Futter bei den Mäusen auch aufgrund der langen Versuchsdauer mit einer Therapiezeit von zwölf Wochen aus praktikablen Gründen statt. Um zudem einen Hinweis auf die Stabilität des Pioglitazons im Futter zu erhalten dienten die Serum-Pioglitazonspiegel der Mäuse, aus Serumproben, die am Tötungstag entnommen wurden. Es zeigte sich kein Unterschied in den Serumspiegeln zwischen Tieren, die in den ersten Durchläufen einbezogen wurden zu denen die in späteren untersucht wurden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Pioglitazon im HFD-Futter über den gesamten Versuchszeitraum stabil war.

Im MCT-Modell wird die PH über eine direkte Schädigung der Endothelzellen durch Monocrotalin induziert. Die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion geht mit einer Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der Gefäßwand und der Induktion von Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen in der Lunge einher. Darüber hinaus kommt es zu einer Rechtsherzhypertrophie (Stenmark *et al.* 2009).

Im Mausmodell wurde hingegen untersucht, ob eine HFD als metabolische Beeinflussung zur Ausbildung einer PH führt. Hansmann *et al.* konnten bereits in einem ApoE-*knockout* Modell zeigen, dass eine HFD in diesem Modell eine PH induziert (Hansmann *et al.* 2007). Zudem gibt es Hinweise, dass ein *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen, welcher im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich als genetischer Auslöser einer PH untersucht wurde, mit einem Anstieg des pulmonalen Druckes und einer Rechtsherzhypertrophie assoziiert sein könnte (Hansmann *et al.* 2008).

#### **4.2.1. Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf hämodynamische Parameter**

Im MCT-Modell zeigte sich eine deutliche Induktion der PH durch MCT, gemessen als Anstieg des RVSP. Dieser MCT-induzierte Druckanstieg wurde durch die Pioglitazon-Behandlung erfolgreich reduziert. Dabei konnte die 14-tägige Therapie mit Pioglitazon den MCT-induzierten Anstieg des RVSP jedoch nicht komplett umkehren. Dies kann als generelle Unmöglichkeit zur physiologischen

Wiederherstellung eines strukturellen Umbauprozesses gewertet werden. Eventuell könnte eine höhere Dosis von Pioglitazon als die hier verwendete von 2,5 mg/kg Körpergewicht den Effekt jedoch verstärken. Allerdings konnte in einem Strömungs-induzierten PH Modell mit einer Behandlungsdosis von 20 mg/kg Körpergewicht ebenfalls keine komplette Reduktion des Druckanstieges durch Pioglitazon erreicht werden (Dickinson *et al.* 2014). Die Dauer der Therapie könnte hierbei zudem eine weitere Rolle spielen. Aufgrund des aggressiven Modells, welches mit einer hohen Mortalität in der MCT-Gruppe einhergeht, konnte die Pioglitazon-Behandlung im Versuch aus ethischen und praktischen Gründen nicht über einen längeren Zeitraum als 14 Tage durchgeführt werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist der Einfluss anderer, hier nicht untersuchter bzw. nicht-PPAR $\gamma$ -abhängiger Signalwege bei der Entstehung der PH.

Im Mausmodell kam es demgegenüber nur zu einem leichten, dennoch signifikanten Anstieg des rechtsventrikulären Druckes unter HFD bzw. zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg durch den PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen. Pioglitazon war in HFD-SmPpar $\gamma$ -Mäusen nicht dazu in der Lage, den erhöhten Druck im rechten Ventrikel zu senken. Dies könnte zum einen am sehr geringen RVSP-Anstieg liegen, der einen Druck-reduzierenden Effekt durch Pioglitazon schwer messbar macht. Zum anderen könnten die Pioglitazon-Effekte auf das perivaskuläre Fettgewebe mögliche positive Effekte auf die pulmonalen Gefäße abschwächen. Fast alle Blutgefäße sind von Fettgewebe umgeben, welches Einfluss auf die vaskuläre Funktion hat. Unter physiologischen Bedingungen werden von diesem perivaskulären Fettgewebe vasodilatative Substanzen produziert. Im perivaskulären Fettgewebe von Übergewichtigen zeigt sich hingegen eine Produktion von pro-inflammatorischen Substanzen wie TNF $\alpha$  sowie eine Reduktion der vasodilatativen und Produktion von vasokonstriktorisches Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (Gu und Xu 2013). Wie sich die Behandlung mit Pioglitazon auf dieses Fettgewebe auswirkt, ist bisher nicht untersucht und könnte Gegenstand von Folgeexperimenten sein.

Der systemische Blutdruck war im eingesetzten Modell der Maus unverändert, wohingegen es in einem anderen Mausmodell mit PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Hypotonie kam (Chang *et al.* 2009). Dies ist möglicherweise der zusätzlichen metabolischen Belastung (durch die HFD) der SmPpar $\gamma$ -Mäuse geschuldet. Zum anderen könnte die durch Chang *et al.* gezeigte zirkadiane Abhängigkeit der Blutdruckwerte eine Rolle spielen, da diese tagsüber abfallen und zur Nacht wieder zunehmen. Zudem kam es nur tagsüber zu einem signifikant reduzierten SBP durch den PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen. Die SmPpar $\gamma$ -Mäuse wurden hingegen im hier verwendeten Modell nicht über 24 Stunden, sondern einmalig zu Versuchsende und zu etwas unterschiedlichen Tageszeitpunkten gemessen, sodass eventuelle durch den PPAR $\gamma$ -*knockout* bedingte Unterschiede des SBPs maskiert wurden.

#### **4.2.2. Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf pulmonale Gefäße**

Die mit den Druckänderungen im rechten Ventrikel einhergehende Veränderung der Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße verhielt sich ähnlich. Im hier untersuchten MCT-Modell zeigte sich eine erwartungsgemäße Verdickung der Media durch MCT (Michelakis *et al.* 2008). Dabei waren sowohl der Anteil muskularisierter Gefäße erhöht, als auch das Lumen der Gefäße verringert. Diese

Gefäßumbauprozesse werden unter anderem durch die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen verursacht (Tajsic und Morrell 2011). Die erhöhte Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen wurde hier in Form einer PCNA-Färbung für die pulmonalen Gefäße nach MCT-Injektion bestätigt. Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  zeigte bereits in *in vitro* und *in vivo* Modellen eine reduzierte Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen bzw. ein reduziertes vaskuläres *Remodeling* (Hansmann *et al.* 2008, Li *et al.* 2010, Nisbet *et al.* 2010). In dem hier untersuchten Modell der PH in Ratten zeigte sich ebenfalls im Einklang mit zuvor genannten Beobachtungen durch andere TZDs eine erfolgreiche Reduzierung der MCT-induzierten vaskulären Umbauprozesse durch die Pioglitazon-Behandlung im Hinblick auf den Anteil der muskularisierten Gefäße und der prozentualen Mediadicke sowie als Tendenz für das Lumen der kleinen pulmonalen Gefäße.

Im *SmPpar $\gamma$* -Mausmodell kam es durch den PPAR $\gamma$ -*knockout* zu einem signifikanten Anstieg der Muskularisierung in den kleinen pulmonalen Gefäßen. Andere Modelle aus der Literatur, wie das des induzierbaren PPAR $\gamma$ -*knockouts* in glatten Gefäßmuskelzellen, zeigen gleichsam ein Angiotensin II-induziertes hypertrophes *Remodeling* in arteriellen Gefäßen (Marchesi *et al.* 2013). Auch die HFD führte im *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mausmodell zu einem Anstieg der Muskularisierung, wenn auch quantitativ geringer und nicht signifikant ausgeprägt. Ähnliches konnte bereits unter HFD bzw. nach Überernährung und daraus resultierendem Übergewicht in Pulmonalarterien von Ratten beobachtet werden (Irwin *et al.* 2014). Pioglitazon war im *SmPpar $\gamma$* -Mausmodell jedoch, anders als im MCT-Rattenmodell, nicht dazu in der Lage, diesen Effekt umzukehren, was an den bereits beschriebenen, eventuellen negativen Effekten von Pioglitazon auf das perivaskuläre Fettgewebe liegen könnte (Gu und Xu 2013).

Generell zeigte sich im untersuchten Mausmodell ein nur geringer Einfluss des *knockouts* bzw. der HFD auf die Muskularisierung bzw. den rechtsventrikulären Druck. Ein Unterschied der verwendeten Mäuse zu denen von Kelley *et al.*, die einen deutlicheren Anstieg des RVSP unter HFD nach 20 Wochen nachweisen konnten (Kelley *et al.* 2014), besteht im genetischen Hintergrund. Bei den hier verwendeten Mäusen handelt es sich mit C57/BL6 x SJL x DBA/2J x C3H um einen gemischten Hintergrund. Im Gegensatz zu C57/BL6-Mäusen sind SJL-, C3H/HeJ- und DBA/2J-Mäuse beispielsweise auch relativ resistent gegenüber der Entwicklung einer Atherosklerose durch eine atherogene Diät (Nishina *et al.* 1993). Darüber hinaus entwickeln SJL-Mäuse in Folge einer sieben-wöchigen Hochfettdiät mit ca. 40 % der Kalorien aus Fett kein Übergewicht (West *et al.* 1992) und ihr Metabolismus ist von der Glukose- zur Fettstoffwechselung verschoben, was die Ausbildung eines Diabetes unterdrückt (Chadt *et al.* 2008). Bei der klinischen PAH-Entstehung kommt es hingegen genau im Gegenteil zu einem Wechsel von Fett- zu Glukoseverwertung (Talati und Hemnes 2015). Es scheinen somit einige metabolische Mechanismen in den oben erwähnten Mausstämmen verändert zu sein, sodass der hier verwendete, gemischte, genetische Hintergrund möglicherweise vor der Ausbildung der PH eher schützt bzw. diesen abschwächt. Dass die Mäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund trotzdem eine Insulinresistenz ausgebildet haben, ist demnach vermutlich eher dem Einfluss der anderen genetischen Hintergründe geschuldet.

Zusammengefasst führt die PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Pioglitazon zu einer Reduktion des MCT-induzierten Anstiegs des RVSP sowie der verstärkten Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße in den hier untersuchten Ratten. Im *SmPpar $\gamma$* -Mausmodell zeigt sich hingegen keine Reduktion der



HFD- und *knockout*-induzierten Zunahme des RVSPs sowie Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße durch die Pioglitazon-Behandlung.

#### 4.2.3. Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf kardiale Veränderungen

Neben den Veränderungen des RVSP und der kleinen pulmonalen Gefäße kommt es bei der PH gegebenenfalls konsekutiv zum kardialen *Remodeling* und in diesem Zusammenhang zur Rechtsherzhypertrophie, die maßgeblich für die hohe Mortalität bei diesem Krankheitsbild verantwortlich ist (Vonk Noordegraaf und Galie 2011). Im Modell der Ratte zeigte sich eine erfolgreiche Reduktion der MCT-induzierten rechtsventrikulären Hypertrophie durch Pioglitazon, angezeigt durch den reduzierten Fulton's Index, wie es bereits durch Liu *et al.* für die Behandlung mit Rosiglitazon gezeigt wurde (Liu *et al.* 2012). Allerdings konnte dieser MCT-Effekt nicht vollständig durch die PPAR $\gamma$ -Aktivierung über Pioglitazon, wie auch in dem Rattenmodell von Liu *et al.* durch Rosiglitazon, umgekehrt werden. Die Bestimmung der Kardiomyozytengröße unterstreicht die über den Fultons' Index beobachtete rechtsventrikulären Hypertrophie, wobei die Größe der Zellen MCT-induziert im rechten nicht aber im linken Ventrikel vergrößert war. Diesen MCT-Effekt auf die Kardiomyozyten des rechten Ventrikels konnte Pioglitazon vollständig aufheben. BNP, als Marker eines chronischen Dehnungsreizes der Herzwand, korreliert bei PAH-Patienten mit dem PASP (Nagaya *et al.* 1998) und dient diagnostisch als Marker für die kardiale Funktion. Ein erhöhter BNP-Plasmawert ist dabei mit Herzinsuffizienz oder kardialer Dysfunktion assoziiert (Doust *et al.* 2006). Die Expression dieses Markerproteins war im rechten Ventrikel der Ratten im hier untersuchten Modell erhöht und konnte, genau wie die anderen MCT-assoziierten Beobachtungen hinsichtlich kardialer Veränderungen, durch die 14-tägige therapeutische Pioglitazon-Behandlung 21 Tage nach MCT-Injektion reduziert werden. Fibrotische Veränderungen zeigten sich MCT-abhängig in beiden Ventrikeln. Auch hier reduzierte Pioglitazon die MCT-induzierte Zunahme der fibrotischen Bereiche. Damit zeigt die Behandlung mit Pioglitazon in diesem Modell der Ratte sowohl im Hinblick auf die Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße als auch kardiale *Remodeling* Prozesse, gemessen als Fulton's Index und Kardiomyozytengröße vorteilhafte Effekte. Daneben zeigte sich eine Umkehr des MCT-induzierten Effektes auf die mit Herzinsuffizienz assoziierte BNP-Expression durch die Pioglitazon-Behandlung. Dies legt nahe, dass PPAR $\gamma$  über unterschiedliche Effekte in verschiedenen Geweben Einfluss auf die Entstehung bzw. Progression der PH nimmt.

Im Mausmodell kam es durch die HFD ebenfalls zu einer tendenziellen Vergrößerung des rechten Ventrikels (erhöhter Fulton's Index) sowie einer leichten, signifikanten Vergrößerung der Kardiomyozyten im rechten Ventrikel. Da die kardialen Umbauprozesse in erster Linie als adaptive Mechanismen auf einen deutlich erhöhten Druck in den pulmonalen Arterien erfolgen, ist es nicht verwunderlich, dass die kardialen Umbauprozesse im hier untersuchten Mausmodell nur gering ausfielen. Eine Reduktion der HFD-induzierten Effekte auf die Umbauprozesse im rechten Ventrikel durch die zwölfwöchige Pioglitazon-Behandlung zeigte sich tendenziell für den Fulton's Index, nicht jedoch für die Kardiomyozytengröße. Dies könnte an den mit der HFD assoziierten sehr geringen Veränderungen des rechten Ventrikels liegen, die eventuelle positive Effekte der Pioglitazon-Behandlung unzureichend messbar machen. Neben diesen histologischen Veränderungen des rechten Ventrikels war die Egr-1-Expression im rechten Ventrikel von SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse innerhalb der Diät- bzw.

Behandlungsgruppen signifikant gegenüber den entsprechenden Wildtypen erhöht. Egr-1 spielt eine Rolle bei der kardialen Hypertrophie (Brand *et al.* 1993) und die Expression ist in pulmonalen Gefäßen von PAH-Patienten stark erhöht (van der Feen *et al.* 2016). Die Aktivierung von PPAR $\gamma$ , hier durch Pioglitazon, führte in diesem Mausmodell tendenziell zu einer reduzierten Expression von Egr-1, was auch in anderen inflammatorischen Zusammenhängen beobachtet werden konnte (De Backer *et al.* 2009, Meng *et al.* 2015). Für die BNP-Expression zeigte sich eine Tendenz eines Genotyp-abhängigen Effektes mit einer erhöhten Expression in *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen bei den NFD- und HFD-Gruppen, nicht jedoch in Pioglitazon-behandelten Mäusen. Da es zu keinem deutlichen Genotyp- oder HFD-induzierten Anstieg der BNP-Genexpression kam, konnte auch keine Pioglitazon-assoziierte Reduktion dieses Markerproteins gemessen werden. Daneben wurde die Genexpression von Osteopontin im rechten Ventrikel gemessen, welche in *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen unter HFD signifikant erhöht war und in HFD-gefütterten Mäusen durch Pioglitazon-Behandlung tendenziell reduziert werden konnte. Auch hier konnten aufgrund von fehlenden Genotyp- oder HFD-induzierten, deutlichen Veränderungen der Genexpression keine möglichen vorteilhaften Effekte einer Pioglitazon-Behandlung gemessen werden.

Im *SmPpar $\gamma$* -Mausmodell kommt es weder durch die HFD noch den *knockout* zur Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie. Dennoch zeigen sich leichte kardiale Veränderungen im rechten Ventrikel, wie HFD-induziert minimal vergrößerte Kardiomyozyten sowie Genotyp-abhängig eine signifikant erhöhte Egr-1-Expression in *SmPpar $\gamma$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen, welche durch die Pioglitazon-Behandlung tendenziell reduziert wird. Auf die Kardiomyozytengröße hingegen zeigt die Pioglitazon-Behandlung keinen Einfluss.

#### 4.2.4. Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf inflammatorische Prozesse

Neben den bisher beschriebenen Effekten von Pioglitazon auf vaskuläre und kardiale Veränderungen wurden die beiden Tiermodelle zudem hinsichtlich inflammatorischer Veränderungen in der Lunge untersucht, da es Hinweise auf eine entscheidende Rolle dieser bei der Entstehung der PAH gibt (Pullamsetti *et al.* 2011, Schermuly *et al.* 2011). Dazu wurde das Vorhandensein von Makrophagen in der Lunge bestimmt. Im MCT-Rattenmodell wurde diesbezüglich eine CD68-Färbung zur Bestimmung der Anzahl der Makrophagen je mm<sup>2</sup> ausgewertet. Es zeigte sich, dass die MCT-induzierte PAH im Rattenmodell mit einer deutlichen Erhöhung der Makrophageninfiltration einherging. Dieser MCT-Effekt wurde signifikant durch die Behandlung mit Pioglitazon reduziert, wobei es zwar zu keiner vollständigen, aber ca. 50 %-igen Reduktion der Makrophagenzahl kam. In diesem Zusammenhang wurde zudem die Osteopontin-Expression in der Lunge gemessen. Osteopontin (OPN) ist ein pleiotropes Zytokin, welches unter verschiedenen Konditionen, wie Inflammation und Tumoren, hochreguliert wird (Lorenzen *et al.* 2011). Es ist zudem an der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen zu Entzündungsherden beteiligt (Giachelli *et al.* 1998). Neben klassischen Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$  und IL-1 (Patarca *et al.* 1993) wird die OPN-Expression durch Angiotensin II, TGF $\beta$  und Hypoxie gesteigert (Ricardo *et al.* 2000, Hullinger *et al.* 2001, Sodhi *et al.* 2001). Darüber hinaus spielt OPN eine wichtige Rolle bei der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Gadeau *et al.* 1993) und trägt so zu den Umbauprozessen pulmonaler Gefäße unter Hypoxie bei (Burke *et al.* 2009). Auch im Lungengewebe von Ratten mit Hypoxie-induzierter PH und Patienten mit PAH konnten erhöhte Werte von OPN gemessen werden (Lorenzen *et al.* 2011). Des Weiteren scheint die OPN-Konzentration mit der Mortalität in PH-Patienten sowie dem rechtsventrikulären *Remodeling* und der rechtsventrikulären

Dysfunktion assoziiert zu sein (Rosenberg *et al.* 2012). Im Einklang mit der Literatur zeigte sich im MCT-induzierten PH-Modell der Ratten ein Anstieg der OPN-Genexpression in der Lunge (Hoshikawa *et al.* 2005). Pioglitazon war hier dazu in der Lage, die OPN-Genexpression signifikant zu verringern, was vermutlich über eine unterdrückte OPN-Promotoraktivität durch PPAR $\gamma$  nach Aktivierung durch Pioglitazon stattfindet (Oyama *et al.* 2002).

In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *SmPpary*-Mausmodell zeigte sich ein HFD-induzierter signifikanter Anstieg der Makrophagenzahl gemessen durch F4/80 und nicht CD68 aufgrund besserer Spezies-spezifischer Antikörperbindung in der Lunge, welcher auch durch die Behandlung mit Pioglitazon signifikant reduziert werden konnte. Die Regulation von OPN wurde in den Mäusen nicht wie bei den Ratten beschrieben anhand der Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht, sondern in Form OPN-positiver Bereiche der Lunge mittels immunohistochemischer Färbung. Dabei führte vor allem der PPAR $\gamma$ -*knockout*, neben einem deutlich geringeren Effekt durch die HFD, zu einem Anstieg der OPN-positiven Fläche in der Lunge. Pioglitazon führte in diesem Mausmodell, analog zu den eigenen Daten in Ratten, zur Reduktion des OPN-Anstiegs.

Damit zeigt sich sowohl MCT-induziert im Rattenmodell als auch HFD-induziert im *SmPpary*-Mausmodell eine erhöhte Inflammation in Form einer erhöhten Makrophagenzahl und im Rattenmodell zusätzlich eine erhöhte OPN-Genexpression in der Lunge. Die PPAR $\gamma$ -Aktivierung über die 14-tägige therapeutische Pioglitazon-Behandlung ist dazu in der Lage, diese Inflammation in beiden Modellen zu reduzieren.

#### **4.3. Typ 2 Diabetes, Insulinresistenz und pulmonale Hypertonie – existiert ein kausaler Zusammenhang?**

In der Literatur gibt es Hinweise auf eine Assoziation zwischen PAH und Insulinresistenz, Glukoseintoleranz bzw. metabolischem Syndrom (Hansmann *et al.* 2007, Zamanian *et al.* 2009, Pugh *et al.* 2011, Belly *et al.* 2012). So zeigt sich im Vergleich zur restlichen Bevölkerung, in der 0,6 % Menschen von PH betroffen sind, unter Diabetikern mit 1,1 % eine signifikant höhere Prävalenz der PH (Movahed *et al.* 2005). Betrachtet man andersherum die Gruppe der PAH-Patienten, so kann man unter diesen mit 23-26 % eine höhere Prävalenz für Diabetes beobachten als in der restlichen Bevölkerung (19 %) (Grinnan *et al.* 2016). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass eine mit der PAH assoziierte metabolische Dysregulation einen negativen Einfluss auf den prognostischen Verlauf der Erkrankung hat (Mathew 2014). Der zugrundeliegende pathogenetische Zusammenhang konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Zudem ist nicht bekannt, ob eine Therapie der metabolischen Dysfunktion die PAH-Symptome verbessern kann. Weiterhin ist unklar, ob diese beiden Krankheiten in einem kausalen Zusammenhang auftreten, also eine Erkrankung die Entstehung oder Symptomatik der anderen beeinflusst, oder sie unabhängig voneinander aber über gleiche Mechanismen ausgelöst werden.

Bei beiden Krankheitsbildern spielt Inflammation eine ursächliche Rolle. Diese könnte ihren Ursprung im Fettgewebe haben, welches neben dem Einfluss auf den Lipid- und Glukosemetabolismus zudem pro- und anti-inflammatorische Adipokine produziert, die auf die vaskuläre Funktion und die Angiogenese wirken (Mathew 2014). Auch könnte eine Hypoxie durch respiratorische Krankheiten, die

zur Entstehung der PAH führen kann, ursächlich für die gleichzeitige Entstehung einer Glukoseintoleranz sein, einem frühen Indikator für eine Störung der glykämischen Kontrolle (Hjalmarson *et al.* 1996, Stoohs *et al.* 1996, Vgontzas *et al.* 2000). Andererseits zeigen *in vivo* Untersuchungen mit übergewichtigen Patienten, dass eine moderate Hypoxie über zehn Nächte zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität führt (Lecoultre *et al.* 2013).

In dem in dieser Arbeit untersuchten Mausmodell mit PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und der Schwere der PH. Dabei korreliert der rechtsventrikuläre Druck sowohl signifikant mit der *area under the curve* (AUC) des ITTs als auch tendenziell mit der des GTTs. Die Korrelation zwischen Insulinresistenz und PH lässt jedoch aufgrund der einmaligen Messung des rechtsventrikulären Druckes zum Ende des Versuches keine Rückschlüsse auf eine Kausalität zu. Da es sich bei der Messung des RVSP um eine invasive Kathetermessung handelt, konnte diese im Versuchsverlauf nicht mehrfach durchgeführt werden. Um dennoch Informationen über eine mögliche Rechtsherzhypertrophie gemessen als Wandstärke und zusätzliche Funktionen des rechten Herzen in Form der Auswurfleistung zu erhalten, könnten künftig bildgebende Verfahren wie beispielsweise Echokardiographie im Versuchsverlauf eingesetzt werden (Cheng *et al.* 2014). Gerade die funktionellen Daten würden die RVSP-Messungen am Ende des Versuches, für die Beurteilung der Schwere der sich im Tiermodell entwickelnden PH und eventuelle Therapieerfolge, ergänzen.

Ein weiterer Einflussfaktor, der eine Verbindung zwischen Insulinresistenz und PAH erklären könnte, stellt der Rezeptor BMPR2 dar. Eine Mutation im Gen von BMPR2 ist für 80% der HPAH verantwortlich (Austin und Loyd 2014). Weiterhin ist bekannt, dass die Expression von BMPR2 in Patienten mit IPAH auch ohne Mutation reduziert ist (Dewachter *et al.* 2009). In der Signalkaskade liegt PPAR $\gamma$  unterhalb von BMPR2 (Hansmann und Zamanian 2009). Und unterhalb von PPAR $\gamma$  befinden sich in der Kaskade ApoE (Akiyama *et al.* 2002) und Adiponektin (Yang *et al.* 2002). ApoE ist am reversen Cholesterin-Transport in den Makrophagen beteiligt und hemmt genau wie Adiponektin, welches einen Einfluss auf die endotheliale Inflammation hat, die Funktion des PDGF $\beta$ -Rezeptors (Assad und Hemnes 2015). Wenn diese Hemmung gestört wird, kommt es zu einer Fehlregulation von Proliferation und Überleben der vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen (Heldin und Westermark 1990). Die PAH ist zudem durch reduziertes PPAR $\gamma$  und ApoE gekennzeichnet (Geraci *et al.* 2001, Ameshima *et al.* 2003). Neben BMPR2-Mutationen oder pulmonalen Krankheiten sind solche niedrigen Level von PPAR $\gamma$ , ApoE und Adiponektin wiederum mit Adipositas, Typ 2 Diabetes und Insulinresistenz assoziiert (Eto *et al.* 1989, Park *et al.* 1997, Arita *et al.* 1999). In einem Mausmodell mit ApoE-defizienten Mäusen unter HFD konnte gezeigt werden, dass sich die Schwere der PAH umgekehrt proportional zum Adiponektinspiegel verhält (Hansmann *et al.* 2007). In Übereinstimmung mit der Literatur führte die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch Rosiglitazon (Kim *et al.* 2006, Majura *et al.* 2007), oder wie im hier untersuchten SmPpar $\gamma$ -Mausmodell durch Pioglitazon, zu einem Anstieg des Adiponektinspiegels. Hansmann *et al.* haben im Zusammenhang mit dem erhöhten Adiponektinspiegel eine Verbesserung der Insulinresistenz und Verringerung der Symptome der PAH nachgewiesen, wobei die Kausalität dieser Beobachtung offen bleibt. Darüber hinaus prägt sich in Adiponektin-*knockout* Mäusen eine PAH altersbedingt ohne weitere äußere Einflüsse aus (Summer *et al.* 2009). Im hier untersuchten Mausmodell mit PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen und unter HFD konnte eine Korrelation zwischen Adiponektin-Serumspiegel

und RVSP nicht gezeigt werden. Dies lag vermutlich vor allem daran, dass der RVSP nur sehr leicht durch die HFD bzw. den *knockout* verändert war, was eine potenzielle Korrelation nur eingeschränkt nachweisbar macht. Im Gegensatz zu Ergebnissen aus Tiermodellen scheint Adiponektion in PAH-Patienten mit adversen Effekten assoziiert zu sein (Santos *et al.* 2014). So konnte ein hoher Adiponektinspiegel mit einer verschlechterten Überlebensrate in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beobachtet werden (Kistorp *et al.* 2005). Die Pioglitazon-Behandlung im *SmPpary*-Mausmodell geht mit einem erhöhten Adiponektin-Serumspiegel einher. Eine Korrelation zwischen Adiponektin-Serumspiegel und RVSP, als Maß für die Schwere der PH, zeigt sich hingegen nicht.

#### 4.4. Wirkung der Hochfettdiät auf die Insulinwirkung

In der Literatur wurde die Interaktion zwischen der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) DEP-1 mit verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) gezeigt (Palka *et al.* 2003, Lampugnani *et al.* 2006, Kappert *et al.* 2007, Tarcic *et al.* 2009). Um erstmals eine direkte Interaktion von DEP-1 mit dem Insulinrezeptor nachweisen zu können, wurde in dieser Arbeit der *Proximity-Ligation-Assay* (PLA) verwendet. Mit diesem können Protein-Protein-Interaktionen sowie post-translationale Protein-Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen, untersucht werden, sofern entsprechende Antikörper zur Detektion verfügbar sind. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Insulin-induzierte Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor erfolgt. Die Limitierung des PLA liegt darin, dass mit dieser Methode die räumliche Nähe zweier Proteine von < 30 nm, nicht aber eine unmittelbare physische Interaktion nachgewiesen werden kann (Leuchowius *et al.* 2011). Die Vorteile und die einfache Durchführung, bei der es allerdings einer umfangreichen Validierung der Antikörper bedarf, die hohe Sensitivität und vor allem die Möglichkeit, die Interaktion von Proteinen *in situ* zu untersuchen und zu quantifizieren, machen diese Methode dennoch sehr attraktiv (Soderberg *et al.* 2006, Jarvius *et al.* 2007). So kann man den PLA auch zur Quantifizierung einzelner Proteine, wie auch ihrer subzellulären Verteilung und interzellulären Schwankung nutzen (Jarvius *et al.* 2007).

Mit Hilfe des PLA konnte in dieser Arbeit auch eine verstärkte Phosphorylierung des Insulinrezeptors in ASO-DEP-1 behandelten Mäusen gezeigt werden, was als indirekter Hinweis auf eine Interaktion zwischen dem Insulinrezeptor und der PTP DEP-1 gewertet werden kann. Darüber hinaus konnte in C57/BL6 Mäusen eine HFD-induzierte Vergrößerung der pankreatischen Inseln gezeigt werden, die durch den *knockout* von DEP-1 verhindert wurde. Dies spricht für eine negative Regulation von DEP-1 in der Insulin-Signaltransduktion bzw. eine Beeinflussung des globalen DEP-1-*knockouts* auf metabolische Veränderungen unter diätetisch-verursachte reduzierte Insulinsensitivität. Damit zeigen diese Versuche, dass DEP-1 eine mögliche Zielstruktur zur Behandlung der Insulinresistenz darstellen könnte.

#### 4.5. Tiermodelle zur Untersuchung der PH

Zur Untersuchung der PH im Tier gibt es verschiedene Modelle, die jedoch alle nicht das komplette Spektrum der in der Klinik beobachteten Veränderungen, die mit der PH einhergehen, widerspiegeln (Maarman *et al.* 2013). Dies liegt nicht zuletzt daran, dass es in der Klasse I der PH (=PAH) selbst eine große Heterogenität bei den Formen der PAH gibt (Ryan *et al.* 2013).

Generell ist es schwierig die PH aus dem Tiermodell mit der in Patienten zu vergleichen, da sie im Patienten häufig erst sehr spät und damit im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Daher spiegeln Tiermodelle eher milde Formen der PH wider, welche im Patienten häufig noch unentdeckt bleiben (Benisty 2002). Man geht darüber hinaus davon aus, dass Tiermodelle mit mehreren Auslösern für die PH die in Patienten vorkommende PH besser imitieren (Maarman *et al.* 2013).

Es existieren eine Reihe von Tiermodellen, wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendete MCT-Modell oder die chronische Hypoxie zusammen mit SU-5416, einem VEGF-Rezeptor Antagonisten, die zur experimentellen Untersuchung der PH eingesetzt werden. Beide Modelle zeigen in Ratten eine Endotheldysfunktion, ein Ungleichgewicht der Endothel-Proliferation/Apoptose sowie Tendenz zu einem glykolytischen Metabolismus. Dabei spiegelt das Hypoxie-Modell mit SU-5416 die histologischen Veränderungen am besten im Vergleich zu PAH-Patienten wider, wohingegen sich im MCT-Modell das Rechtsherzversagen, welches zur hohen Mortalität bei den PAH-Patienten führt, manifestiert (Ryan *et al.* 2013). Darüber hinaus zeichnet sich das MCT-Modell durch eine gute Reproduzierbarkeit bei geringem Kostenaufwand aus (Maarman *et al.* 2013). In murinen Modellen der PH kann man hingegen molekulare Mechanismen besser untersuchen, wobei die PH in diesen Modellen im Hinblick auf pulmonal-arterielles *Remodeling* und Rechtsherzhypertrophie nicht sehr stark ausgeprägt ist und es zudem technisch schwieriger ist, die Tiere zu katheterisieren und bildgebende Verfahren einzusetzen. Zusammengefasst lassen sich in allen bisher bekannten Modellen der PH jeweils nur Teilaspekte der PAH, wie man sie in Patienten beobachten kann, untersuchen. Um den Effekt der PPAR $\gamma$ -Aktivierung sowohl auf vaskuläre wie auch kardiale Veränderungen und Inflammation untersuchen zu können, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit zum einen das bereits gut etablierte MCT-Rattenmodell gewählt und zum anderen ein Mausmodell, bei dem untersucht wurde, welchen Einfluss eine HFD alleine und in Kombination mit einem *knockout* von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen auf die Entstehung der PH hat.

#### 4.6. Pulmonale Hypertonie in Frauen

In den hier untersuchten Tiermodellen wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht. Die PAH tritt beim Menschen jedoch häufiger bei Frauen als bei Männern auf und das Verhältnis schwankt dabei je nach Patientenpopulation zwischen 1,9 : 1 (Humbert *et al.* 2006) und 4,1 : 1 (Badesch *et al.* 2010, Benza *et al.* 2010). Auch hinsichtlich einer BMPR2-Mutation-assoziierten PAH liegt das Risiko für Frauen höher, wobei sich hier ein Verhältnis von 2,7 : 1 zeigt (Loyd *et al.* 1995). Interessanterweise zeigt sich bei gleichen hämodynamischen Messwerten ein um zirka 18 % reduziertes Mortalitätsrisiko für weibliche gegenüber männlichen Patienten (Lai *et al.* 2014). Welchen Einfluss Östrogen bei diesen Beobachtungen spielt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Bisherige Untersuchungen produzierte zudem diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse. Trotz der höheren Inzidenz für PAH bei Frauen zeigen Tierversuche einen protektiven Effekt bei einer Behandlung mit 2-Methoxyestradiol (Tofovic *et al.* 2005).

Daneben gibt es offensichtlich auch Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren. So zeigt ein Versuch in Mäusen, dass weibliche Tiere einen höheren Adiponektinspiegel aufweisen und dadurch besser vor der Ausbildung der PH geschützt sind. Darüber hinaus haben in diesem Modell nur

die männlichen Mäuse, nicht aber die weiblichen, eine Insulinresistenz ausgebildet (Hansmann *et al.* 2007). Somit zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Adiponektinspiegel und der Insulinresistenz sowie der PAH. Die Tatsache, dass es in diesem Maus-Modell nicht möglich war eine Insulinresistenz in den weiblichen Tieren zu induzieren und es möglicherweise einen protektiven Östrogen-Effekt bei der Entstehung der PAH gibt, hat zur Entscheidung, in der vorliegenden Arbeit zunächst nur männliche Tiere in die Versuche einzubeziehen, mit beigetragen. Dies schließt nicht aus, in künftigen Untersuchungen weibliche Tiere zu untersuchen, um einen geschlechtsspezifischen Effekt sowohl des PPAR $\gamma$ -*knockouts* als auch des HFD-induzierten Anstiegs des RVSP herauszuarbeiten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine Erkrankung mit hoher Mortalität und bisher unzureichenden Therapiemöglichkeiten. Sie geht mit vaskulären und daraus resultierenden rechtsventrikulären Druck (RVSP)-Änderungen sowie kardialen Umbauprozessen einher. Es gibt Hinweise auf eine Assoziation der PAH zur Insulinresistenz (IR). In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob die Therapie mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon, welcher bereits klinisch als Insulin-*Sensitizer* eingesetzt wird, vorteilhaft bei der Behandlung der PAH eingesetzt werden könnte. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein PPAR $\gamma$ -*knockout* in glatten Gefäßmuskelzellen eine pulmonale Hypertonie (PH) unter insulinresistenten Bedingungen auslöst.

Die PH wurde dazu in Ratten mittels Monocrotalin (MCT)-Injektion induziert. MCT führte zur Ausbildung einer deutlichen PH mit rechtsventrikulären Drücken über 70 mmHg. Die therapeutische Pioglitazon-Behandlung reduzierte den RVSP und die Muskularisierung kleiner pulmonaler Gefäße. Zudem reduzierte Pioglitazon die MCT-induzierten kardialen Veränderungen, bezüglich Fulton's Index, Kardiomyozytengröße und BNP-Expression. Die MCT-bedingten Veränderungen, wie gesteigerte Makrophageninfiltration und Osteopontin-Expression, wurden durch Pioglitazon ebenfalls reduziert.

In einem weiteren Modell in Mäusen wurde die Rolle von PPAR $\gamma$  in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) durch einen PPAR $\gamma$ -*knockout* in VSMCs sowie der Einfluss einer Hochfettdiät (HFD) auf die Entstehung der PH untersucht. Neben metabolischen Veränderungen, wie verringerter Glukosetoleranz und Insulinsensitivität, führte die HFD zu einem Anstieg des RVSP und der Kardiomyozytengröße im rechten Ventrikel sowie Fibrose und Inflammation in der Lunge. Der PPAR $\gamma$ -*knockout* in VSMCs resultierte ebenfalls in metabolischen Veränderungen, was *in vivo* und *in vitro* durch eine reduzierte Insulinsensitivität gekennzeichnet war. Daneben kam es durch den *knockout* zu erhöhter Muskularisierung kleiner pulmonaler Gefäße sowie kardialen und pulmonal inflammatorischen Veränderungen. Es zeigte sich zudem eine Korrelation zwischen Insulinsensitivität und der Schwere der PH. Pioglitazon führte im Mausmodell zu einem Anstieg der Fettmasse und des Adiponektin-Serumspiegels und reduzierte die Makrophageninfiltration sowie fibrotische Veränderungen in der Lunge. Der RVSP und die Glukosehomöostase wurden durch die Pioglitazon-Behandlung nicht beeinflusst.

Weiterhin wurde die Rolle der Phosphatase DEP-1 im Insulin-*Signaling* erstmals in einem HFD-Modell mit IR untersucht. In einem therapeutischen Ansatz mit Antisense-Oligonukleotiden gegen DEP-1 konnte *in situ* die Insulin-induzierte Rekrutierung von DEP-1 zum Insulinrezeptor und dessen Dephosphorylierung durch DEP-1 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit ein Einfluss von DEP-1 im Insulin-*Signaling* gezeigt und DEP-1 als mögliche neue molekulare Zielstruktur zur Behandlung der HFD-induzierten IR identifiziert. Zum anderen konnte ein HFD-induzierter Anstieg des RVSP in Mäusen sowie ein Einfluss von PPAR $\gamma$  in VSMCs auf den Glukosemetabolismus und pulmonal vaskuläres *Remodeling* sowie ein Zusammenhang zwischen PH und IR gezeigt werden. Pioglitazon reduzierte pulmonale Inflammation und Fibrose. In Ratten, nicht jedoch in Mäusen, verringerte Pioglitazon zudem den RVSP sowie vaskuläre und kardiale Veränderungen. Die Möglichkeit der PH-Therapie durch eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung über Pioglitazon wird durch die Daten dieser Arbeit zum Teil unterstützt.



## 6. SUMMARY

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by vascular remodeling and increased right ventricular (RVSP) pressure, resulting in cardiac changes leading to high mortality. Clinical and experimental observations suggest a connection between PAH and insulin resistance (IR). The aim of this project was to test whether the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonist pioglitazone, which is known for its insulin sensitizing effects, could be used to treat PAH. Moreover it was tested whether PPAR $\gamma$  knockout in vascular smooth muscle cells leads to pulmonary hypertension (PH) under insulin resistant conditions.

PH was induced via Monocrotalin (MCT)-injection in rats. MCT led to a strong increase of right ventricular pressure above 70 mmHg and therefore PH. In a therapeutic approach, pioglitazone reduced RVSP, pulmonary muscularization of small vessels and cardiac changes like Fulton's index, cardiomyocyte size and BNP gene expression. Furthermore, pioglitazone reduced MCT induced pulmonary changes, like macrophage invasion and osteopontin gene expression.

In an additional model, the influence of PPAR $\gamma$  in vascular smooth muscle cells (VSMCs) was analyzed via knockout of PPAR $\gamma$  in VSMCs in mice, as well as the potential impact of a high fat diet (HFD) on PH development. HFD-feeding led to metabolic changes, including reduced glucose tolerance and insulin sensitivity. HFD-feeding was accompanied by an increase of RVSP and right ventricular cardiomyocyte size as well as pulmonary fibrotic and inflammatory changes. PPAR $\gamma$ -knockout in VSMCs led also to metabolic changes, which was shown *in vivo* as well as *in vitro* by reduced insulin sensitivity. Furthermore, PPAR $\gamma$ -knockout animals were characterized by increased pulmonary vascular muscularization as well as cardiac and pulmonary inflammatory changes. Moreover, a correlation was detected between insulin sensitivity and the severity of PH, measured as increase of RVSP. Pioglitazone treatment in mice was accompanied by an increase of fat mass and adiponectin serum levels, while reducing macrophage invasion and fibrosis in lung tissue. RVSP and glucose homeostasis remained unchanged in pioglitazone treated animals.

Furthermore, the role of the phosphatase DEP-1 in insulin signaling was examined in an adipositas model with IR. In a therapeutic approach applying antisense oligonucleotides against DEP-1, insulin induced recruitment of DEP-1 to the insulin receptor as well as dephosphorylation of this receptor was detected.

In summary, the data have shown a role of DEP-1 in insulin signaling, which identifies DEP-1 as a novel potential therapeutic target to treat HFD-induced IR. Moreover, an HFD-induced increase of RVSP was detected in mice, as well as VSMC PPAR $\gamma$  knockout related changes in glucose metabolism and vascular remodeling. In addition, the mouse model showed a correlation between PH and IR. Pioglitazone treatment led to reduced pulmonary inflammation and fibrosis. In rats, but not in mice, pioglitazone was able to reduce RVSP as well as vascular and cardiac changes. Taken together, these data are partially in support of the idea of PPAR $\gamma$  activated treatment of PH via pioglitazone.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmad, F., Azevedo, J.L., Cortright, R., Dohm, G.L., Goldstein, B.J., 1997a. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 100 (2), 449-458.
- Ahmad, F., Considine, R.V., Bauer, T.L., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., Goldstein, B.J., 1997b. Improved sensitivity to insulin in obese subjects following weight loss is accompanied by reduced protein-tyrosine phosphatases in adipose tissue. *Metabolism-Clinical and Experimental* 46 (10), 1140-1145.
- Ahmad, F., Considine, R.V., Goldstein, B.J., 1995. Increased abundance of the protein-tyrosine-phosphatase lar accounts for the elevated insulin-receptor dephosphorylating activity in adipose-tissue of obese human-subjects. *Diabetes* 44, A40-A40.
- Ahmad, F., Goldstein, B.J., 1995. Increased abundance of specific skeletal-muscle protein-tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes-mellitus. *Metabolism-Clinical and Experimental* 44 (9), 1175-1184.
- Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sul, H.S., 2009. The skinny on fat: Lipolysis and fatty acid utilization in adipocytes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20 (9), 424-428.
- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., Evans, R.M., 2013. Ppar gamma signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nature Medicine* 19 (5), 557-566.
- Akiyama, T.E., Sakai, S., Lambert, G., Nicol, C.J., Matsusue, K., Pimprale, S., Lee, Y.H., Ricote, M., Glass, C.K., Brewer, H.B., Gonzalez, F.J., 2002. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of abca1, abcg1, and apo e in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Molecular and Cellular Biology* 22 (8), 2607-2619.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T., 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 1;117(6):699-711.
- Ambalavanan, N., Nicola, T., Hagood, J., Bulger, A., Serra, R., Murphy-Ullrich, J., Oparil, S., Chen, Y.F., 2008. Transforming growth factor-beta signaling mediates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling and inhibition of alveolar development in newborn mouse lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295 (1), L86-L95.
- Ameshima, S., Golpon, H., Cool, C.D., Chan, D., Vandivier, R.W., Gardai, S.J., Wick, M., Nemenoff, R.A., Geraci, M.W., Voelkel, N.F., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppar gamma) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. *Circulation Research* 92 (10), 1162-1169.
- Archer, S., Rich, S., 2000. Primary pulmonary hypertension - a vascular biology and translational research "work in progress". *Circulation* 102 (22), 2781-2791.
- Archer, S.L., Gombert-Maitland, M., Maitland, M.L., Rich, S., Garcia, J.G.N., Weir, E.K., 2008. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: A mitochondria-ros-hif-1 alpha-kv1.5 o-2-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294 (2), H570-H578.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257 (1), 79-83.
- Assad, T.R., Hemnes, A.R., 2015. Metabolic dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Current Hypertension Reports* 17 (4).
- Badesch, D.B., Raskob, G.E., Elliott, C.G., Krichman, A.M., Farber, H.W., Frost, A.E., Barst, R.J., Benza, R.L., Liou, T.G., Turner, M., Giles, S., Feldkircher, K., Miller, D.P., Mcgoon, M.D., 2010. Pulmonary arterial hypertension baseline characteristics from the reveal registry. *Chest* 137 (2), 376-387.
- Balasubramaniam, V., Maxey, A.M., Fouty, B.W., Abman, S.H., 2006. Nitric oxide augments fetal pulmonary artery endothelial cell angiogenesis in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (6), L1111-L1116.
- Balavenkatraman, K.K., Jandt, E., Friedrich, K., Kautenburger, T., Pool-Zobel, B., Ostman, A., Bohmer, F.D., 2006. Dep-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene* 25 (47), 6319-6324.
- Bandyopadhyay, D., Kusari, A., Kenner, K.A., Liu, F., Chernoff, J., Gustafson, T.A., Kusari, J., 1997. Protein-tyrosine phosphatase 1b complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *Journal of Biological Chemistry* 272 (3), 1639-1645.

- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., Evans, R.M., 1999. Ppar gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell* 4 (4), 585-595.
- Barst, R.J., Rubin, L.J., Long, W.A., Mcgoon, M.D., Rich, S., Badesch, D.B., Groves, B.M., Tapson, V.F., Bourge, R.C., Brundage, B.H., Koerner, S.K., Langleben, D., Keller, C.A., Murali, S., Uretsky, B.F., Clayton, L.M., Jobsis, M.M., Blackburn, S.D., Shortino, D., Crow, J.W., Primary Pulmonary Hypertension Study, G., 1996. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 334 (5), 296-301.
- Barzilai, N., She, L., Liu, B.Q., Vuguin, P., Cohen, P., Wang, J.L., Rossetti, L., 1999. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* 48 (1), 94-98.
- Belly, M.J., Tiede, H., Morty, R.E., Schulz, R., Voswinckel, R., Tanislav, C., Olschewski, H., Ghofrani, H.A., Seeger, W., Reichenberger, F., 2012. Hba1c in pulmonary arterial hypertension: A marker of prognostic relevance? *J Heart Lung Transplant* 31 (10), 1109-14.
- Benisty, J.I., 2002. Cardiology patient page. Pulmonary hypertension. *Circulation*. 10;106(24):e192-4.
- Benza, R.L., Miller, D.P., Barst, R.J., Badesch, D.B., Frost, A.E., Mcgoon, M.D., 2012. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the reveal registry. *Chest* 142 (2), 448-456.
- Benza, R.L., Miller, D.P., Gomberg-Maitland, M., Frantz, R.P., Foreman, A.J., Coffey, C.S., Frost, A., Barst, R.J., Badesch, D.B., Elliott, C.G., Liou, T.G., Mcgoon, M.D., 2010. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension insights from the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management (reveal). *Circulation* 122 (2), 164-U138.
- Bergman, R.N., Kim, S.P., Catalano, K.J., Hsu, I.R., Chiu, J.D., Kabir, M., Huckling, K., Ader, M., 2006. Why visceral fat is bad: Mechanisms of the metabolic syndrome. *Obesity* 14, 16s-19s.
- Biesalski, H.K., Grimm, P., 2007. Taschenatlas Ernährung. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 62-66
- Blickle, J.F., 2006. Meglitinide analogues: A review of clinical data focused on recent trials. *Diabetes & Metabolism* 32 (2), 113-120.
- Bornfeldt, K.E., Tabas, I., 2011. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metabolism* 14 (5), 575-585.
- Borsting, E., Cheng, V.P.C., Glass, C.K., Vallon, V., Cunard, R., 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists repress epithelial sodium channel expression in the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 302 (5), F540-F551.
- Bouskila, M., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., 2005. Adiponectin: a relevant player in PPARgamma-agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity? *Int J Obes (Lond)*. 29 Suppl 1:S17-23.
- Brady, T.C., Crapo, J.D., Mercer, R.R., 1998. Nitric oxide inhalation transiently elevates pulmonary levels of cgmp, inos mrna, and tnf-alpha. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 275 (3), L509-L515.
- Brand, T., Sharma, H.S., Schaper, W., 1993. Expression of nuclear proto-oncogenes in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 25 (11), 1325-37.
- Burke, D.L., Frid, M.G., Kunrath, C.L., Karoor, V., Anwar, A., Wagner, B.D., Strassheim, D., Stenmark, K.R., 2009. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (2), L238-L250.
- Burkey, B.F., Dong, M., Gagen, K., Eckhardt, M., Dragonas, N., Chen, W., Grosenstein, P., Argentieri, G., de Souza, C.J., 2000. Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: comparison to CL 316,243. *Metabolism*. 49(10):1301-8.
- Cameron, N.E., Eaton, S.E.M., Cotter, M.A., Tesfaye, S., 2001. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44 (11), 1973-1988.
- Camp, H.S., Tafuri, S.R., 1997. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272 (16), 10811-10816.
- Chadt, A., Leicht, K., Deshmukh, A., Jiang, L.Q., Scherneck, S., Bernhardt, U., Dreja, T., Vogel, H., Schmolz, K., Kluge, R., Zierath, J.R., Hultschig, C., Hoeben, R.C., Schürmann, A., Joost, H.G., Al-Hasani, H., 2008. Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat Genet*. 40(11):1354-9.
- Chakraborti, C.K., 2015. Role of adiponectin and some other factors linking type 2 diabetes mellitus and obesity. *World Journal of Diabetes* 6 (15), 1296-1308.
- Chang, L., Villacorta, L., Zhang, J., Garcia-Barrio, M.T., Yang, K., Hamblin, M., Whitesall, S.E., D'alecy, L.G., Chen, Y.E., 2009. Vascular smooth muscle cell-selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion leads to hypotension. *Circulation* 119 (16), 2161-9.
- Channick, R.N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I.M., Frost, A., Tapson, V.F., Badesch, D.B., Roux, S., Rainisio, M., Bodin, F., Rubin, L.J., 2001. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist

- bosentan in patients with pulmonary hypertension: A randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358 (9288), 1119-23.
- Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D., Lazar, M.A., 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (ppar)-gamma - adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135 (2), 798-800.
- Cheng, H.W., Fisch, S., Cheng, S., Bauer, M., Ngoy, S., Qiu, Y., Guan, J., Mishra, S., Mbah, C., Liao, R., 2014. Assessment of right ventricular structure and function in mouse model of pulmonary artery constriction by transthoracic echocardiography. *J Vis Exp.* 3;(84):e51041.
- Choi, K., Kim, Y.B., 2010. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 25 (2), 119-29.
- Christman, B.W., Mcpherson, C.D., Newman, J.H., King, G.A., Bernard, G.R., Groves, B.M., Loyd, J.E., 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary-hypertension. *New England Journal of Medicine* 327 (2), 70-75.
- Clapp, L.H., Finney, P., Turcato, S., Tran, S., Rubin, L.J., Tinker, A., 2002. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic amp generation in human pulmonary artery. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26 (2), 194-201.
- Cohen, P., 2006. Timeline - the twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (11), 867-873.
- Crossno, J.T., Garat, C.V., Reusch, J.E.B., Morris, K.G., Dempsey, E.C., Mcurtry, I.F., Stenmark, K.R., Klemm, D.J., 2007. Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 292 (4), L885-L897.
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R., Mandarino, L.J., 2000. Insulin resistance differentially affects the pi 3-kinase- and map kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105 (3), 311-20.
- Dalozzo, G.E., Barst, R.J., Ayres, S.M., Bergofsky, E.H., Brundage, B.H., Detre, K.M., Fishman, A.P., Goldring, R.M., Groves, B.M., Kernis, J.T., Levy, P.S., Pietra, G.G., Reid, L.M., Reeves, J.T., Rich, S., Vreim, C.E., Williams, G.W., Wu, M., 1991. Survival in patients with primary pulmonary-hypertension - results from a national prospective registry. *Annals of Internal Medicine* 115 (5), 343-349.
- Das, M., Fessel, J., Tang, H., West, J., 2012. A process-based review of mouse models of pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2 (4), 415-33.
- De Backer, O., Elinck, E., Priem, E., Leybaert, L., Lefebvre, R.A., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation alleviates postoperative ileus in mice by inhibition of egr-1 expression and its downstream target genes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331 (2), 496-503.
- Den Hertog, J., Oestman, A., Bohmer, F.D., 2008. Protein tyrosine phosphatases: Regulatory mechanisms. *Febs Journal* 275 (5), 831-847.
- Dewachter, L., Adnot, S., Guignabert, C., Tu, L., Marcos, E., Fadel, E., Humbert, M., Dartevelle, P., Simonneau, G., Naeije, R., Eddahibi, S., 2009. Bone morphogenetic protein signalling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 34 (5), 1100-1110.
- Dickinson, M.G., Kowalski, P.S., Bartelds, B., Borgdorff, M.a.J., Van Der Feen, D., Sietsma, H., Molema, G., Kamps, J.a.a.M., Berger, R.M.F., 2014. A critical role for egr-1 during vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular Research* 103 (4), 573-584.
- Dorfmueller, P., Zarka, V., Durand-Gasselino, I., Monti, G., Balabanian, K., Garcia, G., Capron, F., Coulomb-Lhermine, A., Marfaing-Koka, A., Simonneau, G., Emilie, D., Humbert, M., 2002. Chemokine rantes in severe pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (4), 534-539.
- Doust, J., Lehman, R., Glasziou, P., 2006. The role of BNP testing in heart failure. *Am Fam Physician.* 1;74(11):1893-8.
- Dresdale, D.T., Schultz, M., Michtom, R.J., 1951. Primary pulmonary hypertension .1. Clinical and hemodynamic study. *American Journal of Medicine* 11 (6), 686-705.
- Dromparis, P., Michelakis, E.D., 2013. Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol.*75:95-126.
- Duan, S.Z., Ivashchenko, C.Y., Russell, M.W., Milstone, D.S., Mortensen, R.M., 2005. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circulation Research* 97 (4), 372-379.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L., Kennedy, B.P., 1999. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1b gene. *Science* 283 (5407), 1544-1548.

- Eto, M., Watanabe, K., Ishii, K., 1989. Apolipoprotein-e polymorphism and hyperlipoproteinemia in obesity. *International Journal of Obesity* 13 (4), 433-440.
- Evans, R.M., Barish, G.D., Wang, Y.X., 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine* 10 (4), 355-361.
- Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Hasko, G., Schmidt, H.H.H.W., Stasch, J.P., 2006. No-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: Discovery and therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (9), 755-768.
- Farber, H.W., Loscalzo, J., 2004. Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine* 351 (16), 1655-1665.
- Ferrannini, E., Bjorkman, O., Reichard, G.A., Pilo, A., Olsson, M., Wahren, J., DeFronzo, R.A., 1985. The disposal of an oral glucose-load in healthy-subjects - a quantitative study. *Diabetes* 34 (6), 580-588.
- Forman, B.M., Chen, J., Evans, R.M., 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9), 4312-4317.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M., 1995. 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin j(2) is a ligand for the adipocyte determination factor ppar-gamma. *Cell* 83 (5), 803-812.
- Forssmannfalck, R., 1997. Werner forssman: A pioneer of cardiology. *American Journal of Cardiology* 79 (5), 651-660.
- Fresquet, F., Pourageaud, F., Leblais, V., Brandes, R.P., Savineau, J.P., Marthan, R., Muller, B., 2006. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *British Journal of Pharmacology* 148 (5), 714-723.
- Fu, Y.C., Luo, N.L., Klein, R.L., Garvey, W.T., 2005. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research* 46 (7), 1369-1379.
- Gadeau, A.P., Campan, M., Millet, D., Candresse, T., Desgranges, C., 1993. Osteopontin overexpression is associated with arterial smooth-muscle cell-proliferation invitro. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13 (1), 120-125.
- Galie, N., Barbera, J.A., Frost, A.E., Ghofrani, H.A., Hoeper, M.M., Mclaughlin, V.V., Peacock, A.J., Simonneau, G., Vachiery, J.L., Grunig, E., Oudiz, R.J., Vonk-Noordegraaf, A., White, R.J., Blair, C., Gillies, H., Miller, K.L., Harris, J.H.N., Langley, J., Rubin, L.J., Investigators, A., 2015. Initial use of ambrisentan plus tadalafil in pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine* 373 (9), 834-844.
- Galie, N., Brundage, B.H., Ghofrani, H.A., Oudiz, R.J., Simonneau, G., Safdar, Z., Shapiro, S., White, R.J., Chan, M., Beardsworth, A., Frumkin, L., Barst, R.J., Pulmonary Arterial, H., Response to Tadalafil Study, G., 2009. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119 (22), 2894-903.
- Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J.L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L.A., Trindade, P.T., Zompatori, M., Hoeper, M., Aboyans, V., Vaz Carneiro, A., Achenbach, S., Agewall, S., Allanore, Y., Asteggiano, R. Paolo Badano, L., Albert Barberà, J., Bouvaist, H., Bueno, H., Byrne, R.A., Carerj, S., Castro, G., Erol, Ç., Falk, V., Funck-Brentano, C., Gorenflo, M., Granton, J., lung, B., Kiely, D.G., Kirchhof, P., Kjellstrom, B., Landmesser, U., Lekakis, J., Lionis, C., Lip, G.Y., Orfanos, S.E., Park, M.H., Piepoli, M.F., Ponikowski, P. Revel, M.P., Rigau, D., Rosenkranz, S., Völler, H., Luis Zamorano, J., 2016. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 37(1):67-119.
- Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J.L., Vizza, C.D., Kneussl, M., Manes, A., Sitbon, O., Torbicki, A., Delcroix, M., Naeije, R., Hoeper, M., Chaouat, A., Morand, S., Besse, B., Simonneau, G., Berap, A.P.H., 2002. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: With pulmonary arterial hypertension: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology* 39 (9), 1496-1502.
- Galie, N., Olschewski, H., Oudiz, R.J., Torres, F., Frost, A., Ghofrani, H.A., Badesch, D.B., Mcgoon, M.D., Mclaughlin, V.V., Roecker, E.B., Gerber, M.J., Dufton, C., Wiens, B.L., Rubin, L.J., Hyperten, A.P.A., 2008a. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension - results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (aries) study 1 and 2. *Circulation* 117 (23), 3010-3019.

- Galie, N., Rubin, L.J., Hoepfer, M.M., Jansa, P., Al-Hiti, H., Meyer, G.M.B., Chiossi, E., Kusic-Pajic, A., Simonneau, G., 2008b. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (early study): A double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 371 (9630), 2093-2100.
- Gehart, H., Kumpf, S., Ittner, A., Ricci, R., 2010. Mapk signalling in cellular metabolism: Stress or wellness? *Embo Reports* 11 (11), 834-840.
- Geraci, M.W., Moore, M., Gesell, T., Yeager, M.E., Alger, L., Golpon, H., Gao, B.F., Loyd, J.E., Tuder, R.M., Voelkel, N.F., 2001. Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension - a gene microarray analysis. *Circulation Research* 88 (6), 555-562.
- Ghanaat-Pour, H., Sjöholm, A., 2009. Gene expression regulated by pioglitazone and exenatide in normal and diabetic rat islets exposed to lipotoxicity. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* 25 (2), 163-184.
- Ghofrani, H.A., Galie, N., Grimminger, F., Grunig, E., Humbert, M., Jing, Z.C., Keogh, A.M., Langleben, D., Kilama, M.O., Fritsch, A., Neuser, D., Rubin, L.J., 2013. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine* 369 (4), 330-340.
- Giachelli, C.M., Lombardi, D., Johnson, R.J., Murry, C.E., Almeida, M., 1998. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *American Journal of Pathology*. 152:353-358.
- Giaid, A., Saleh, D., 1995. Reduced expression of endothelial nitric-oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary-hypertension. *New England Journal of Medicine* 333 (4), 214-221.
- Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R.P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W.P., Stewart, D.J., 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary-hypertension. *New England Journal of Medicine* 328 (24), 1732-1739.
- Gien, J., Seedorf, G.J., Balasubramaniam, V., Markham, N., Abman, S.H., 2007. Intrauterine pulmonary hypertension impairs angiogenesis in vitro - role of vascular endothelial growth factor-nitric oxide signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 (11), 1146-1153.
- Ginsberg, H.N., 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation* 106 (4), 453-458.
- Goldstein, B.J., 2002. Protein-tyrosine phosphatases: Emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87 (6), 2474-2480.
- Goldstein, B.J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M.F., Harbeck, M., 2000. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1b - possible facilitation by the formation of a ternary complex with the grb2 adaptor protein. *Journal of Biological Chemistry* 275 (6), 4283-4289.
- Green, D.E., Sutliff, R.L., Hart, C.M., 2011. Is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppargamma) a therapeutic target for the treatment of pulmonary hypertension? *Pulm Circ* 1 (1), 33-47.
- Grinnan, D., Farr, G., Fox, A., Sweeney, L., 2016. The Role of Hyperglycemia and Insulin Resistance in the Development and Progression of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Diabetes Res*. 2016:2481659.
- Grobe, A.C., Wells, S.M., Benavidez, E., Oishi, P., Azakie, A., Fineman, J.R., Black, S.M., 2006. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: Role of nadph oxidase and endothelial no synthase. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (6), L1069-L1077.
- Grundey, S.M., 2016. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med* 26 (4), 364-73.
- Gu, P., Xu, A., 2013. Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 14(1):49-58.
- Guan, Y.F., Hao, C.M., Cha, D.R., Rao, R., Lu, W.D., Kohan, D.E., Magnuson, M.A., Redha, R., Zhang, Y.H., Breyer, M.D., 2005. Thiazolidinediones expand body fluid volume through ppar gamma stimulation of enac-mediated renal salt absorption. *Nature Medicine* 11 (8), 861-866.
- Guignabert, C., Alvira, C.M., Alastalo, T.P., Sawada, H., Hansmann, G., Zhao, M., Wang, L., El-Bizri, N., Rabinovitch, M., 2009. Tie2-mediated loss of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mice causes pdgf receptor-beta-dependent pulmonary arterial muscularization. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (6), L1082-L1090.
- Guo, Z.K., Hensrud, D.D., Johnson, C.M., Jensen, M.D., 1999. Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. *Diabetes* 48 (8), 1586-1592.
- Hansmann, G., Perez, V.a.D., Alastalo, T.P., Alvira, C.M., Guignabert, C., Bekker, J.M., Schellong, S., Urashima, T., Wang, L., Morrell, N.W., Rabinovitch, M., 2008. An antiproliferative bmp-2/ppar gamma/apoe axis in human and murine smcs and its role in pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 118 (5), 1846-1857.

- Hansmann, G., Wagner, R.A., Schellong, S., Perez, V.a.D., Urashima, T., Wang, L., Sheikh, A.Y., Suen, R.S., Stewart, D.J., Rabinovitch, M., 2007. Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Circulation* 115 (10), 1275-1284.
- Hansmann, G., Zamanian, R.T., 2009. Ppargamma activation: A potential treatment for pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 1 (12), 12ps14.
- Hassoun, P.M., Mouthon, L., Barbera, J.A., Eddahibi, S., Flores, S.C., Grimminger, F., Jones, P.L., Maitland, M.L., Michelakis, E.D., Morrell, N.W., Newman, J.H., Rabinovitch, M., Schermuly, R., Stenmark, K.R., Voelkel, N.F., Yuan, J.X.J., Humbert, M., 2009. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 54 (1), S10-S19.
- Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H.M., Mueller, E., Spiegelman, B.M., 2000. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *Journal of Biological Chemistry* 275 (24), 18527-18533.
- He, W.M., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J.M., Evans, R.M., 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26), 15712-15717.
- Heldin, C.H., Westermark, B., 1990. Platelet-derived growth factor: Mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* 1 (8), 555-66.
- Hjalmarsen, A., Aasebo, U., Birkeland, K., Sager, G., Jorde, R., 1996. Impaired glucose tolerance in patients with chronic hypoxic pulmonary disease. *Diabetes & Metabolism* 22 (1), 37-42.
- Hoeper, M.M., Huscher, D., Ghofrani, H.A., Delcroix, M., Distler, O., Schweiger, C., Grunig, E., Staehler, G., Rosenkranz, S., Halank, M., Held, M., Grohe, C., Lange, T.J., Behr, J., Klose, H., Wilkens, H., Filusch, A., Germann, M., Ewert, R., Seyfarth, H.J., Olsson, K.M., Opitz, C.F., Gaine, S.P., Vizza, C.D., Vonk-Noordegraaf, A., Kaemmerer, H., Gibbs, J.S.R., Pittrow, D., 2013. Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: Results from the compera registry. *International Journal of Cardiology* 168 (2), 871-880.
- Hofmann, C., Lorenz, K., Braithwaite, S.S., Colca, J.R., Palazuk, B.J., Hotamisligil, G.S., Spiegelman, B.M., 1994. Altered gene-expression for tumor-necrosis-factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin-resistance. *Endocrinology* 134 (1), 264-270.
- Hollenberg, A.N., Susulic, V.S., Madura, J.P., Zhang, B., Moller, D.E., Tontonoz, P., Sarraf, P., Spiegelman, B.M., Lowell, B.B., 1997. Functional antagonism between ccaat/enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *Journal of Biological Chemistry* 272 (8), 5283-5290.
- Hoshikawa, Y., Matsuda, Y., Suzuki, S., Okada, Y., Tabata, T., Matsumura, Y., Kondo, T., 2005. Osteopontin may be responsible for pulmonary vascular remodeling. *Chest*. 128(6 Suppl):621S.
- Howard, B.V., 2002. Dietary fat and diabetes: A consensus view. *American Journal of Medicine* 113, 38-40.
- Hullinger, T.G., Pan, Q., Viswanathan, H.L., Somerman, M.J., 2001. Tgf beta and bmp-2 activation of the opn promoter: Roles of smad- and hox-binding elements. *Experimental Cell Research* 262 (1), 69-74.
- Humbert, M., Monti, G., Brenot, F., Sitbon, O., Portier, A., Grangeotkeros, L., Duroux, P., Galanaud, P., Simonneau, G., Emilie, D., 1995. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary-hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151 (5), 1628-1631.
- Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., Yaici, A., Weitzenblum, E., Cordier, J.F., Chabot, F., Dromer, C., Pison, C., Reynaud-Gaubert, M., Haloun, A., Laurent, M., Hachulla, E., Cottin, V., Degano, B., Jais, X., Montani, D., Souza, R., Simonneau, G., 2010a. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 122 (2), 156-163.
- Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., Yaici, A., Weitzenblum, E., Cordier, J.F.O., Chabot, F., Dromer, C., Pison, C., Reynaud-Gaubert, M., Haloun, A., Laurent, M., Hachulla, E., Simonneau, G., 2006. Pulmonary arterial hypertension in france - results from a national registry. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (9), 1023-1030.
- Humbert, M., Sitbon, O., Yaici, A., Montani, D., O'callaghan, D.S., Jais, X., Parent, F., Savale, L., Natali, D., Gunther, S., Chaouat, A., Chabot, F., Cordier, J.F., Habib, G., Gressin, V., Jing, Z.C., Souza, R., Simonneau, G., Arterial, F.P., 2010b. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* 36 (3), 549-555.
- Imai, T., Takakuwa, R., Marchand, S., Dentz, E., Bornert, J.M., Messaddeq, N., Wendling, O., Mark, M., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., Metzger, D., 2004. Peroxisome proliferator-activated

- receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13), 4543-4547.
- Irwin, D.C., Garat, C.V., Crossno, J.T., MacLean, P.S., Sullivan, T.M., Erickson, P.F., Jackman, M.R., Harral, J.W., Reusch, J.E.B., Klemm, D.J., 2014. Obesity-related pulmonary arterial hypertension in rats correlates with increased circulating inflammatory cytokines and lipids and with oxidant damage in the arterial wall but not with hypoxia. *Pulm Circ.* 4(4): 638–653.
- Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Makishima, M., Shimomura, I., 2003. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52 (7), 1655-1663.
- Jarvis, M., Paulsson, J., Weibrecht, I., Leuchowius, K.J., Andersson, A.C., Wahlby, C., Gullberg, M., Botling, J., Sjoblom, T., Markova, B., Ostman, A., Landegren, U., Soderberg, O., 2007. In situ detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor beta using a generalized proximity ligation method. *Molecular & Cellular Proteomics* 6 (9), 1500-1509.
- Johnson, L.N., Lewis, R.J., 2001. Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical Reviews* 101 (8), 2209-2242.
- Kang, S., Tsai, L.T.Y., Rosen, E.D., 2016. Nuclear mechanisms of insulin resistance. *Trends in Cell Biology* 26 (5), 341-351.
- Kappert, K., Paulsson, J., Sparwel, J., Leppanen, O., Hellberg, C., Ostman, A., Micke, P., 2007. Dynamic changes in the expression of dep-1 and other pdgf receptor-antagonizing ptps during onset and termination of neointima formation. *Faseb Journal* 21 (2), 523-534.
- Katz, L.D., Glickman, M.G., Rapoport, S., Ferrannini, E., DeFronzo, R.A., 1983. Splanchnic and peripheral disposal of oral glucose in man. *Diabetes* 32 (7), 675-679.
- Kawanami, D., Matoba, K., Sango, K., Utsunomiya, K., 2016. Incretin-based therapies for diabetic complications: Basic mechanisms and clinical evidence. *Int J Mol Sci* 17 (8).
- Keane, M.M., Lowrey, G.A., Ettenberg, S.A., Dayton, M.A., Lipkowitz, S., 1996. The protein tyrosine phosphatase dep-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Research* 56 (18), 4236-4243.
- Kelley, D.E., Goodpaster, B., Wing, R.R., Simoneau, J.A., 1999. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 277 (6), E1130-E1141.
- Kelley, E.E., Baust, J., Bonacci, G., Golin-Bisello, F., Devlin, J.E., St Croix, C.M., Watkins, S.C., Gor, S., Cantu-Medellin, N., Weidert, E.R., Frisbee, J.C., Gladwin, M.T., Champion, H.C., Freeman, B.A., Khoo, N.K.H., 2014. Fatty acid nitroalkenes ameliorate glucose intolerance and pulmonary hypertension in high-fat diet-induced obesity. *Cardiovascular Research* 101 (3), 352-363.
- Kim, E.K., Lee, J.H., Oh, Y.M., Lee, Y.S., Lee, S.D., 2010. Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Respirology* 15 (4), 659-668.
- Kim, S.G., Ryu, O.H., Kim, H.Y., Lee, K.W., Seo, J.A., Kim, N.H., Choi, K.M., Lee, J., Baik, S.H., Choi, D.S., 2006. Effect of rosiglitazone on plasma adiponectin levels and arterial stiffness in subjects with prediabetes or non-diabetic metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* 154(3):433-40.
- Kim, T., Yang, Q., 2013. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. *World J Cardiol* 5 (6), 164-74.
- Kissebah, A.H., 1997. Central obesity: Measurement and metabolic effects. *Diabetes Reviews* 5 (1), 8-20.
- Kistorp, C., Faber, J., Galatius, S., Gustafsson, F., Frystyk, J., Flyvbjerg, A., Hildebrandt, P., 2005. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 112 (12), 1756-1762.
- Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M., Heitz, P.U., 1985. Islet pathology and the pathogenesis of type-1 and type-2 diabetes-mellitus revisited. *Survey and Synthesis of Pathology Research* 4 (2), 110-125.
- Komar, C.M., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (ppars) and ovarian function - implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3.
- Kovalenko, M., Denner, K., Sandstrom, J., Persson, C., Gross, S., Jandt, E., Vilella, R., Bohmer, F., Ostman, A., 2000. Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase dep-1. *Journal of Biological Chemistry* 275 (21), 16219-16226.
- Lai, Y.C., Potoka, K.C., Champion, H.C., Mora, A.L., Gladwin, M.T., 2014. Pulmonary arterial hypertension the clinical syndrome. *Circulation Research* 115 (1), 115-130.
- Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Gagliani, M.C., Tacchetti, C., Dejana, E., 2006. Vascular endothelial cadherin controls vegfr-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *Journal of Cell Biology* 174 (4), 593-604.



- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S.R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S.M., Mitch, W.E., Harrison, D.G., 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 111 (8), 1201-1209.
- Lane, K.B., Machado, R.D., Pauculo, M.W., Thomson, J.R., Phillips, J.A., Loyd, J.E., Nichols, W.C., Trembath, R.C., Consortium, I.P., 2000. Heterozygous germline mutations in *bmpr2*, encoding a *tgf-beta* receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nature Genetics* 26 (1), 81-84.
- Law, R.E., Goetze, S., Xi, X.P., Jackson, S., Kawano, Y., Demer, L., Fishbein, M.C., Meehan, W.P., Hsueh, W.A., 2000. Expression and function of *ppar gamma* in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101 (11), 1311-1318.
- Lecoultre, V., Peterson, C.M., Covington, J.D., Ebenezer, P.J., Frost, E.A., Schwarz, J.M., Ravussin, E., 2013. Ten nights of moderate hypoxia improves insulin sensitivity in obese humans. *Diabetes Care* 36 (12), e197-8.
- Leuchowius, K.J., Weibrecht, I., Soderberg, O., 2011. In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry. *Curr Protoc Cytom Chapter 9, Unit 9 36*.
- Lewis, J.D., Ferrara, A., Peng, T., Hedderson, M., Bilker, W.B., Quesenberry, C.P. Jr, Vaughn, D.J., Nessel, L., Selby, J., Strom, B.L. 2011. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. 34(4):916-22.
- Li, M.X., Li, Z.F., Sun, X.Z., Yang, L., Fang, P., Liu, Y., Li, W., Xu, J., Lu, J.M., Xie, M.X., Zhang, D.X., 2010. Heme oxygenase-1/*p21waf1* mediates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling inhibition of proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Febs Journal* 277 (6), 1543-1550.
- Liu, Y., Tian, X.Y., Mao, G., Fang, X., Fung, M.L., Shyy, J.Y., Huang, Y., Wang, N., 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ameliorates pulmonary arterial hypertension by inhibiting 5-hydroxytryptamine 2B receptor. *Hypertension*. 60(6):1471-8.
- Lorenzen, J.M., Nickel, N., Kramer, R., Golpon, H., Westerkamp, V., Olsson, K.M., Haller, H., Hoepfer, M.M., 2011. Osteopontin in patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Chest* 139 (5), 1010-1017.
- Loyd, J.E., Butler, M.G., Foroud, T.M., Conneally, P.M., Phillips, J.A., Newman, J.H., 1995. Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary-hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152 (1), 93-97.
- Lu, M., Sarruf, D.A., Talukdar, S., Sharma, S., Li, P.P., Bandyopadhyay, G., Nalbandian, S., Fan, W.Q., Gayen, J.R., Mahata, S.K., Webster, N.J., Schwartz, M.W., Olefsky, J.M., 2011. Brain *ppar-gamma* promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nature Medicine* 17 (5), 618-U140.
- Lund, S.A., Giachelli, C.M., Scatena, M., 2009. The role of osteopontin in inflammatory processes. *Journal of Cell Communication and Signaling* 3 (3-4), 311-322.
- Maarman, G., Lecour, S., Butrous, G., Thienemann, F., Sliwa, K., 2013. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulm Circ*. 3(4):739-56.
- Machado, R.D., Aldred, M.A., James, V., Harrison, R.E., Patel, B., Schwalbe, E.C., Gruenig, E., Janssen, B., Koehler, R., Seeger, W., Eickelberg, O., Olschewski, H., Elliott, C.G., Glissmeyer, E., Carlquist, J., Kim, M., Torbicki, A., Fijalkowska, A., Szewczyk, G., Parma, J., Abramowicz, M.J., Galie, N., Morisaki, H., Kyotani, S., Nakanishi, N., Morisaki, T., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O., Soubrier, F., Coulet, F., Morrell, N.W., Trembath, R.C., 2006. Mutations of the *tgf-beta* type ii receptor *bmpr2* in pulmonary arterial hypertension. *Human Mutation* 27 (2), 121-132.
- Mackenzie, R.W.A., Watt, P., 2016. A molecular and whole body insight of the mechanisms surrounding glucose disposal and insulin resistance with hypoxic treatment in skeletal muscle. *Journal of Diabetes Research*.
- Madaan, T., Akhtar, M., Najmi, A.K., 2016. Sodium glucose cotransporter 2 (*sglt2*) inhibitors: Current status and future perspective. *Eur J Pharm Sci* 93, 244-252.
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., Kuriyama, H., Hotta, K., Nakamura, T., Shimomura, I., Matsuzawa, Y., 2001. *Ppar gamma* ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50 (9), 2094-2099.
- Mam, V., Tanbe, A.F., Vitali, S.H., Arons, E., Christou, H.A., Khalil, R.A., 2010. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 332(2):455-62.
- Marchesi, C., Rehman, A., Rautureau, Y., Kasal, D.A., Briet, M., Leibowitz, A., Simeone, S.M.C., Ebrahimian, T., Neves, M.F., Offermanns, S., Gonzalez, F.J., Paradis, P., Schiffrin, E.L., 2013.

- Protective role of vascular smooth muscle cell ppar gamma in angiotensin ii-induced vascular disease. *Cardiovascular Research* 97 (3), 562-570.
- Marvyn, P.M., Bradley R.M., Mardian E.B., Marks K.A., Duncan R.E., 2016. Data on oxygen consumption rate, respiratory exchange ratio, and movement in C57BL/6J female mice on the third day of consuming a high-fat diet. *Data Brief*.7:472-5.
- Mason, C., Foster-Schubert, K.E., Imayama, I., Kong, A., Xiao, L.R., Bain, C., Campbell, K.L., Wang, C.Y., Duggan, C.R., Ulrich, C.M., Alfano, C.M., Blackburn, G.L., Mctiernan, A., 2011. Dietary weight loss and exercise effects on insulin resistance in postmenopausal women. *American Journal of Preventive Medicine* 41 (4), 366-375.
- Mathew, R., 2014. Pulmonary hypertension and metabolic syndrome: Possible connection, ppargamma and caveolin-1. *World J Cardiol* 6 (8), 692-705.
- Mclaughlin, V.V., Archer, S.L., Badesch, D.B., Barst, R.J., Farber, H.W., Lindner, J.R., Mathier, M.A., Mcgoon, M.D., Park, M.H., Rosenson, R.S., Rubin, L.J., Tapson, V.F., Varga, J., Harrington, R.A., Anderson, J.L., Bates, E.R., Bridges, C.R., Eisenberg, M.J., Ferrari, V.A., Grines, C.L., Hlatky, M.A., Jacobs, A.K., Kaul, S., Lichtenberg, R.C., Lindner, J.R., Moliterno, D.J., Mukherjee, D., Pohost, G.M., Rosenson, R.S., Schofield, R.S., Shubrooks, S.J., Stein, J.H., Tracy, C.M., Weitz, H.H., Wesley, D.J., Members, W.C., Members, A.T.F., 2009. Accf/aha 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the american college of cardiology foundation task force on expert consensus documents and the american heart association. *Circulation* 119 (16), 2250-2294.
- Medina-Gomez, G., Gray, S.L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell, M., Curtis, R.K., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Yeo, G.S.H., Lopez, M., Seppanen-Laakso, T., Ashcroft, F.M., Oresic, M., Vidal-Puig, A., 2007. Ppar gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *Plos Genetics* 3 (4).
- Medina-Gomez, G., Virtue, S., Lelliott, C., Boiani, R., Campbell, M., Christodoulides, C., Perrin, C., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Dixon, J., Zahn, D., Thresher, R.R., Aparicio, S., Carlton, M., Colledge, W.H., Kettunen, M.I., Seppanen-Laakso, T., Sethi, J.K., O'rahilly, S., Brindle, K., Cinti, S., Oresic, M., Burcelin, R., Vidal-Puig, A., 2005. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 isoform. *Diabetes* 54 (6), 1706-1716.
- Meng, Y., Chen, C., Tian, C., Du, J., Li, H.H., 2015. Angiotensin ii-induced egr-1 expression is suppressed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand 15d-pgj(2) in macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry* 35 (2), 689-698.
- Menke, A., Casagrande, S., Geiss, L., Cowie, C.C., 2015. Prevalence of and trends in diabetes among adults in the united states, 1988-2012. *Jama-Journal of the American Medical Association* 314 (10), 1021-1029.
- Michelakis, E.D., 2014. Pulmonary arterial hypertension yesterday, today, tomorrow. *Circulation Research* 115 (1), 109-114.
- Michelakis, E.D., Wilkins, M.R., Rabinovitch, M., 2008. Emerging concepts and translational priorities in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 118 (14), 1486-1495.
- Mingone, C.J., Gupte, S.A., Iesaki, T., Wolin, M.S., 2003. Hypoxia enhances a cgmp-independent nitric oxide relaxing mechanism in pulmonary arteries. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 285 (2), L296-L304.
- Mittal, M., Roth, M., Konig, P., Hofmann, S., Dony, E., Goyal, P., Selbitz, A.C., Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Kwapiszewska, G., Kummer, W., Klepetko, W., Hoda, M.a.R., Fink, L., Hanze, J., Seeger, W., Grimminger, F., Schmidt, H.H.H.W., Weissmann, N., 2007. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic nadph oxidase subunit nox4 in the pulmonary vasculature. *Circulation Research* 101 (3), 258-267.
- Moncada, S., Higgs, E.A., Vane, J.R., 1977. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin-x), a potent inhibitor of platelet-aggregation. *Lancet* 1 (8001), 18-21.
- Mori, Y., Murakawa, Y., Okada, K., Horikoshi, H., Yokoyama, J., Tajima, N., Ikeda, Y., 1999. Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22 (6), 908-912.
- Movahed, M.R., Hashemzadeh, M., Jamal, M.M., 2005. The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients with type ii diabetes mellitus. *Chest* 128 (5), 3568-71.
- Mura, M., Zhao, Y., Azad, S., Yun, Z., Mak, S., Parker, J., Singer, L.G., Keshavjee, S., De Perrot, M., Granton, J.T., 2013. Osteopontin lung expression is a marker of disease severity in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 32 (4), S18-S18.
- Naderi, N., Boobejame, P., Bakhshandeh, H., Amin, A., Taghavi, S., Maleki, M., 2014. Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension, is it a novel disease modifier? *Res Cardiovasc Med* 3 (3), e19710.
- Nagaya, N., Nishikimi, T., Okano, Y., Uematsu, M., Satoh, T., Kyotani, S., Kuribayashi, S., Hamada, S., Kakishita, M., Nakanishi, N., Takamiya, M., Kunieda, T., Matsuo, H., Kangawa, K., 1998.

- Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 31(1):202-8.
- Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., Rossetti, L., Scherer, P.E., 2006. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 281 (5), 2654-60.
- Nesto, R.W., Bell, D., Bonow, R.O., Fonseca, V., Grundy, S.M., Horton, E.S., Le Winter, M., Porte, D., Semenkovich, C.F., Smith, S., Young, L.H., Kahn, R., 2004. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure. *Diabetes Care* 27 (1), 256-263.
- Neumann, A., Weill, A., Ricordeau, P., Fagot, J.P., Alla, F., Allemand, H. 2012. Pioglitazone and risk of bladder cancer among diabetic patients in France: a population-based cohort study. *Diabetologia.* 55(7):1953-62.
- Nisbet, R.E., Bland, J.M., Kleinhenz, D.J., Mitchell, P.O., Walp, E.R., Sutliff, R.L., Hart, C.M., 2010. Rosiglitazone attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in a mouse model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42 (4), 482-490.
- Nishina, P.M., Wang, J., Toyofuku, W., Kuypers, F.A., Ishida, B.Y., Paigen, B., 1993. Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice. *Lipids* 28 (7), 599-605.
- Orchard, T.J., Forrest, K.Y.Z., Ellis, D., Becker, D.J., 1997. Cumulative glycemic exposure and microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus - the glycemic threshold revisited. *Archives of Internal Medicine* 157 (16), 1851-1856.
- Ostman, A., Hellberg, C., Bohmer, F.D., 2006. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Reviews Cancer* 6 (4), 307-320.
- Ostman, A., Yang, Q., Tonks, N.K., 1994. Expression of dep-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell-density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (21), 9680-9684.
- Oyama, Y., Akuzawa, N., Nagai, R., Kurabayashi, M., 2002. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res.* 22:90(3):348-55.
- Palka, H.L., Park, M., Tonks, N.K., 2003. Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase dep-1. *Journal of Biological Chemistry* 278 (8), 5728-5735.
- Park, K.S., Ciaraldi, T.P., Abramsarter, L., Mudaliar, S., Nikoulina, S.E., Henry, R.R., 1997. Ppar-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type ii diabetic subjects. *Diabetes* 46 (7), 1230-1234.
- Patarca, R., Saavedra, R.A., Cantor, H., 1993. Molecular and cellular basis of genetic-resistance to bacterial-infection - the role of the early t-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Critical Reviews in Immunology* 13 (3-4), 225-246.
- Paulin, R., Michelakis, E.D., 2014. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research* 115 (1), 148-164.
- Pawlak, R., Chabielska, E., Golutowski, J., Azzadin, A., Buczko, W., 1998. Nitric oxide and prostacyclin are involved in antithrombotic action of captopril in venous thrombosis in rats. *Thrombosis and Haemostasis* 79 (6), 1208-1212.
- Perros, F., Montani, D., Dorfmueller, P., Durand-Gassel, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., Mazmanian, M., Fadel, E., Mussot, S., Mercier, O., Hervé, P., Emilie, D., Eddahibi, S., Simonneau, G., Souza, R., Humbert, M., 2008. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 178(1):81-8.
- Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., Ridker, P.M., 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama-Journal of the American Medical Association* 286 (3), 327-334.
- Pugh, M.E., Robbins, I.M., Rice, T.W., West, J., Newman, J.H., Hemnes, A.R., 2011. Unrecognized glucose intolerance is common in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 30 (8), 904-911.
- Pullamsetti, S.S., Savai, R., Janssen, W., Dahal, B.K., Seeger, W., Grimminger, F., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Schermuly, R.T., 2011. Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clinical Microbiology and Infection* 17 (1), 7-14.
- Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., Nicolls, M.R., 2014. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research* 115 (1), 165-175.
- Reaven, G., Abbasi, F., McLaughlin, T., 2004. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Progress in Hormone Research*, Vol 59 59, 207-223.
- Rendell, M., 2004. The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 64 (12), 1339-1358.

- Ricardo, S.D., Franzoni, D.F., Roesener, C.D., Crisman, J.M., Diamond, J.R., 2000. Angiotensinogen and at(1) antisense inhibition of osteopontin translation in rat proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 278 (5), F708-F716.
- Rich, S., Dantzker, D.R., Ayres, S.M., Bergofsky, E.H., Brundage, B.H., Detre, K.M., Fishman, A.P., Goldring, R.M., Groves, B.M., Koerner, S.K., Levy, P.C., Reid, L.M., Vreim, C.E., Williams, G.W., 1987. Primary pulmonary-hypertension - a national prospective-study. *Annals of Internal Medicine* 107 (2), 216-223.
- Robbins, A.L., Savage, D.B., 2015. The genetics of lipid storage and human lipodystrophies. *Trends in Molecular Medicine* 21 (7), 433-438.
- Rocchi, S., Tartaredeckert, S., Sawkaverhelle, D., Gamha, A., Vanobberghen, E., 1996. Interaction of sh2-containing protein tyrosine phosphatase 2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-i receptor: Studies of the domains involved using the yeast two-hybrid system. *Endocrinology* 137 (11), 4944-4952.
- Rosenberg, M., Meyer, F.J., Gruenig, E., Lutz, M., Lossnitzer, D., Wipplinger, R., Katus, H.A., Frey, N., 2012. Osteopontin predicts adverse right ventricular remodelling and dysfunction in pulmonary hypertension. *European Journal of Clinical Investigation* 42 (9), 933-942.
- Rosenkranz, S., 2015. Pulmonary hypertension 2015: Current definitions, terminology, and novel treatment options. *Clinical Research in Cardiology* 104 (3), 197-207.
- Rubin, L.J., Mendoza, J., Hood, M., Mcgoon, M., Barst, R., Williams, W.B., Diehl, J.H., Crow, J., Long, W., 1990. Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med* 112 (7), 485-91.
- Ryan, K.K., Li, B., Grayson, B.E., Matter, E.K., Woods, S.C., Seeley, R.J., 2011. A role for central nervous system ppar-gamma in the regulation of energy balance. *Nature Medicine* 17 (5), 623-U145.
- Ryan, J.J., Marsboom, G., Archer, S.L., 2013. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol*.218:105-49.
- Salton, S.R., 2005. Teaching resources. Protein phosphatases. *Sci STKE* 2005 (273), tr8.
- Santos, M., Reis, A., Goncalves, F., Ferreira-Pinto, M.J., Cabral, S., Torres, S., Leite-Moreira, A.F., Henriques-Coelho, T., 2014. Adiponectin levels are elevated in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clinical Cardiology* 37 (1), 21-25.
- Sastry, B.K.S., Narasimhan, C., Reddy, N.K., Raju, B.S., 2004. Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension - a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Journal of the American College of Cardiology* 43 (7), 1149-1153.
- Schermuly, R.T., Dony, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W., Grimminger, F., 2005. Reversal of experimental pulmonary hypertension by pdgf inhibition. *Journal of Clinical Investigation* 115 (10), 2811-2821.
- Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Wilkins, M.R., Grimminger, F., 2011. Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology* 8 (8), 443-455.
- Sears, I.B., Macginnitie, M.A., Kovacs, L.G., Graves, R.A., 1996. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: Regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Molecular and Cellular Biology* 16 (7), 3410-3419.
- Sharma, M., Pinnamaneni, S., Aronow, W.S., Jozwik, B., Frishman, W.H., 2014. Existing drugs and agents under investigation for pulmonary arterial hypertension. *Cardiology in Review* 22 (6), 297-305.
- Simonneau, G., Barst, R.J., Galie, N., Naeije, R., Rich, S., Bourge, R.C., Keogh, A., Oudiz, R., Frost, A., Blackburn, S.D., Crow, J.W., Rubin, L.J., Treprostinil Study, G., 2002. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 165 (6), 800-4.
- Simonneau, G., Gatzoulis, M.A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R.F., Olschewski, H., Robbins, I.M., Souza, R., 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62 (25 Suppl), D34-41.
- Singh, T.P., Rohit, M., Grover, A., Malhotra, D., Vijayvergiya, R., 2006. A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study to evaluate the efficacy of oral sildenafil therapy in severe pulmonary artery hypertension. *American Heart Journal* 151 (4).
- Sitbon, O., Jais, X., Savale, L., Cottin, V., Bergot, E., Macari, E.A., Bouvaist, H., Dauphin, C., Picard, F., Bulfon, S., Montani, D., Humbert, M., Simonneau, G., 2014. Upfront triple combination therapy in pulmonary arterial hypertension: A pilot study. *European Respiratory Journal* 43 (6), 1691-1697.
- Smith, S.R., De Jonge, L., Volaufova, J., Li, Y., Xie, H., Bray, G.A., 2005. Effect of pioglitazone on body composition and energy expenditure: a randomized controlled trial. *Metabolism*. 54(1):24-32.

- Soccio, R.E., Chen, E.R., Lazar, M.A., 2014. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab.* 7;20(4):573-91.
- Soderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstrale, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G., Landegren, U., 2006. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods* 3 (12), 995-1000.
- Sodhi, C.P., Phadke, S.A., Battle, D., Sahai, A., 2001. Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis: Role of osteopontin. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 280 (4), F667-F674.
- Standley, P.R., Rose, K.A., 1994. Insulin and insulin-like growth factor-1 modulation of glucose transport in arterial smooth muscle cells: implication of GLUT-4 in the vasculature. *Am J Hypertens.* 7(4 Pt 1):357-62.
- Stenmark, K.R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W.J., Mcmurtry, I.F., 2009. Animal models of pulmonary arterial hypertension: The hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (6), L1013-L1032.
- Stoohs, R.A., Facchini, F., Guilleminault, C., 1996. Insulin resistance and sleep-disordered breathing in healthy humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (1), 170-174.
- Summer, R., Fiack, C.A., Ikeda, Y., Sato, K., Dwyer, D., Ouchi, N., Fine, A., Farber, H.W., Walsh, K., 2009. Adiponectin deficiency: A model of pulmonary hypertension associated with pulmonary vascular disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (3), L432-L438.
- Suzuki, Y.J., Steinhorn, R.H., Gladwin, M.T., 2013. Antioxidant therapy for the treatment of pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal* 18 (14), 1723-6.
- Tabima, D.M., Frizzell, S., Gladwin, M.T., 2012. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radical Biology and Medicine* 52 (9), 1970-1986.
- Tahrani, A.A., Barnett, A.H., Bailey, C.J., 2016. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.*
- Tai, T.a.C., Jennermann, C., Brown, K.K., Oliver, B.B., Macginnitie, M.A., Wilkison, W.O., Brown, H.R., Lehmann, J.M., Kliwer, S.A., Morris, D.C., Graves, R.A., 1996. Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated gamma promotes brown adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 271 (47), 29909-29914.
- Taichman, D.B., Ornelas, J., Chung, L., Klinger, J.R., Lewis, S., Mandel, J., Palevsky, H.I., Rich, S., Sood, N., Rosenzweig, E.B., Trow, T.K., Yung, R., Elliott, C.G., Badesch, D.B., 2014. Pharmacologic therapy for pulmonary arterial hypertension in adults chest guideline and expert panel report. *Chest* 146 (2), 449-475.
- Tajsic, T., Morrell, N.W., 2011. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr Physiol.* 1(1):295-317.
- Talati, M., Hemnes, A., 2015. Fatty acid metabolism in pulmonary arterial hypertension: Role in right ventricular dysfunction and hypertrophy. *Pulmonary Circulation* 5 (2), 269-278.
- Tarcic, G., Boguslavsky, S.K., Wakim, J., Kiuchi, T., Liu, A., Reinitz, F., Nathanson, D., Takahashi, T., Mischel, P.S., Ng, T., Yarden, Y., 2009. An unbiased screen identifies dep-1 tumor suppressor as a phosphatase controlling egfr endocytosis. *Current Biology* 19 (21), 1788-1798.
- Teichert-Kuliszewska, K., Kutryk, M.J.B., Kuliszewski, M.A., Karoubi, G., Courtman, D.W., Zucco, L., Granton, J., Stewart, D.J., 2006. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival - implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circulation Research* 98 (2), 209-217.
- Tofovic, S.P., Salah, E.M., Mady, H.H., Jackson, E.K., Melhem, M.E., 2005. Estradiol metabolites attenuate monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 46 (4), 430-437.
- Tokola, H., Hautala, N., Marttila, M., Magga, J., Pikkarainen, S., Kerkela, R., Vuolteenaho, O., Ruskoaho, H., 2001. Mechanical load-induced alterations in b-type natriuretic peptide gene expression. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 79 (8), 646-653.
- Tomaru, T., Steger, D.J., Lefterova, M.I., Schupp, M., Lazar, M.A., 2009. Adipocyte-specific expression of murine resistin is mediated by synergism between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and ccaat/enhancer-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 284 (10), 6116-6125.
- Tonks, N.K., 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(11):833-46.
- Tontonoz, P., Spiegelman, B.M., 2008. Fat and beyond: The diverse biology of ppar gamma. *Annual Review of Biochemistry* 77, 289-312.
- Tseng, C.H., Tseng, F.H. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and bladder cancer: lessons from animal studies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol* 30(4):368-402.

- Tuder, R.M., Cool, C.D., Geraci, M.W., Wang, J., Abman, S.H., Wright, L., Badesch, D., Voelkel, N.F., 1999. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159 (6), 1925-32.
- Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B., Voelkel, N.F., 1994. Exuberant endothelial-cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary-hypertension. *American Journal of Pathology* 144 (2), 275-285.
- Turban, S., Stretton, C., Drouin, O., Green, C.J., Watson, M.L., Gray, A., Ross, F., Lantier, L., Viollet, B., Hardie, D.G., Marette, A., Hundal, H.S., 2012. Defining the contribution of amp-activated protein kinase (ampk) and protein kinase c (pkc) in regulation of glucose uptake by metformin in skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 287 (24), 20088-20099.
- Upton, P.D., Morrell, N.W., 2009. Tgf-beta and bmpr-ii pharmacology-implications for pulmonary vascular diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 9 (3), 274-280.
- Van Beekum, O., Fleskens, V., Kalkhoven, E., 2009. Posttranslational modifications of ppar-gamma: Fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity* 17 (2), 213-219.
- Van De Laar, F.A., Lucassen, P.L., Akkermans, R.P., Van De Lisdonk, F.H., Rutten, G.E., Van Weel, C., 2005. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes - results from a cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 28 (1), 154-163.
- Van Der Feen, D.E., Dickinson, M.G., Bartelds, B., Borgdorff, M.a.J., Sietsma, H., Levy, M., Berger, R.M.F., 2016. Egr-1 identifies neointimal remodeling and relates to progression in human pulmonary arterial hypertension. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 35 (4), 481-490.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 22;324(5930)
- Van Loon, L.J.C., Greenhaff, P.L., Teodosiu, D.C., Saris, W.H.M., Wagenmakers, A.J.M., 2001. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *Journal of Physiology-London* 536 (1), 295-304.
- Vazquez, A., Liu, J.X., Zhou, Y., Oltvai, Z.N., 2010. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The warburg effect revisited. *Bmc Systems Biology* 4.
- Vgontzas, A.N., Papanicolaou, D.A., Bixler, E.O., Hopper, K., Lotsikas, A., Lin, H.M., Kales, A., Chrousos, G.P., 2000. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: Relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (3), 1151-1158.
- Vidalpuig, A., Jimenezlinan, M., Lowell, B.B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J.S., Moller, D.E., 1996. Regulation of ppar gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *Journal of Clinical Investigation* 97 (11), 2553-2561.
- Virtue, S., Vidal-Puig, A., 2008. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *Plos Biology* 6 (9), 1819-1823.
- Vonk Noordegraaf, A., Galie, N., 2011. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 20 (122), 243-53.
- Walchli, S., Curchod, M.L., Gobert, R.P., Arkinstall, S., Van Huijsduijnen, R.H., 2000. Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor - a brute force approach based on "substrate-trapping" mutants. *Journal of Biological Chemistry* 275 (13), 9792-9796.
- Walker, L.A., Walker, J.S., Glazier, A., Brown, D.R., Stenmark, K.R., Buttrick, P.M., 2011. Biochemical and myofilament responses of the right ventricle to severe pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301 (3), H832-H840.
- Wasserman, D.H., Kang, L., Ayala, J.E., Fueger, P.T., Lee-Young, R.S., 2011. The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. *Journal of Experimental Biology* 214 (2), 254-262.
- Wayman, N.S., Hattori, Y., McDonald, M.C., Mota-Filipe, H., Cuzzocrea, S., Pisano, B., Chatterjee, P.K., Thiemermann, C., 2002. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (ppar-gamma and ppar-alpha) reduce myocardial infarct size. *Faseb Journal* 16 (9), 1027-1040.
- Waypa, G.B., Marks, J.D., Guzy, R.D., Mungai, P.T., Schriewer, J.M., Dokic, D., Ball, M.K., Schumacker, P.T., 2013. Superoxide generated at mitochondrial complex iii triggers acute responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (4), 424-432.
- Weinstein, S.P., Holand, A., Oboyle, E., Haber, R.S., 1993. Effects of thiazolidinediones on glucocorticoid-induced insulin-resistance and glut4 glucose-transporter expression in rat skeletal-muscle. *Metabolism-Clinical and Experimental* 42 (10), 1365-1369.
- Weir, E.K., Lopez-Barneo, J., Buckler, K.J., Archer, S.L., 2005. Mechanisms of disease - acute oxygen-sensing mechanisms. *New England Journal of Medicine* 353 (19), 2042-2055.
- West, D.B., Boozer, C.N., Moody, D.L., Atkinson, R.L., 1992. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* 262 (6 Pt 2), R1025-32.

- West, J., Niswender, K.D., Johnson, J.A., Pugh, M.E., Gleaves, L., Fessel, J.P., Hemnes, A.R., 2013. A potential role for insulin resistance in experimental pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 41 (4), 861-871.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial-cells. *Nature* 332 (6163), 411-415.
- Yang, W.S., Jeng, C.Y., Wu, T.J., Tanaka, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Wang, J.P., Chen, C.L., Tai, T.Y., Chuang, L.M., 2002. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 25 (2), 376-380.
- Yuan, J.X.J., Rubin, L.J., 2005. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension - the need for multiple hits. *Circulation* 111 (5), 534-538.
- Yudkin, J.S., Stehouwer, C.D.A., Emeis, J.J., Coppack, S.W., 1999. C-reactive protein in wealthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction - a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 19 (4), 972-978.
- Yue, T.L., Chen, J., Bao, W.K., Narayanan, P.K., Bril, A., Jiang, W., Lysko, P.G., Gu, J.L., Boyce, R., Zimmerman, D.M., Hart, T.K., Buckingham, R.E., Ohlstein, E.H., 2001. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 104 (21), 2588-2594.
- Zabolotny, J.M., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Kim, J.K., Pani, M.A., Boss, O., Klamon, L.D., Kamatkar, S., Shulman, G.I., Kahn, B.B., Neel, B.G., 2001. Overexpression of the lar (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (9), 5187-92.
- Zabolotny, J.M., Kim, Y.B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G., Kahn, B.B., 2008. Protein-tyrosine phosphatase 1b expression is induced by inflammation in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 283 (21), 14230-14241.
- Zamanian, R.T., Hansmann, G., Snook, S., Lilienfeld, D., Rappaport, K.M., Reaven, G.M., Rabinovitch, M., Doyle, R.L., 2009. Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 33 (2), 318-24.
- Zhang, B., Berger, J., Zhou, G.C., Elbrecht, A., Biswas, S., Whitecarrington, S., Szalkowski, D., Moller, D.E., 1996. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Biological Chemistry* 271 (50), 31771-31774.
- Zhou, W., Hashimoto, K., Goleniewska, K., O'neal, J.F., Ji, S., Blackwell, T.S., Fitzgerald, G.A., Egan, K.M., Geraci, M.W., Peebles, R.S., Jr., 2007. Prostaglandin i2 analogs inhibit proinflammatory cytokine production and t cell stimulatory function of dendritic cells. *J Immunol* 178 (2), 702-10.

## 8. PUBLIKATIONEN

Aus dieser Dissertation sind folgende Publikationen bzw. Teile von Publikationen hervorgegangen:

**Pioglitazone alleviates cardiac and vascular remodelling and improves survival in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension.**

Behringer A, Trappiel M, Berghausen EM, Ten Freyhaus H, Wellnhofer E, Odenthal M, Blaschke F, Er F, Gassanov N, Rosenkranz S, Baldus S, Kappert K, Caglayan E.

*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016 Apr;389(4):369-79.

*Impact Factor:* 2,55

**Enhanced insulin signaling in density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) knockout mice.**

Krüger J, Brachs S, Trappiel M, Kintscher U, Meyborg H, Wellnhofer E, Thöne-Reineke C, Stawowy P, Östman A, Birkenfeld AL, Böhmer FD, Kappert K.

*Mol Metab.* 2015 Feb 12;4(4):325-36.

*Impact Factor:* 6,799

**Targeting density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) with antisense oligonucleotides improves the metabolic phenotype in high-fat diet-fed mice.**

Krüger J, Trappiel M, Dagnell M, Stawowy P, Meyborg H, Böhm C, Bhanot S, Ostman A, Kintscher U, Kappert K.

*Cell Commun Signal.* 2013 Jul 26;11(1):49.

*Impact Factor:* 3,943

---

Weitere Publikationen im Rahmen der generellen Forschungsarbeit:

**Inhibition of protein tyrosine phosphatases enhances cerebral collateral growth in rats.**

Buschmann I, Hackbusch D, Gatzke N, Dülsner A, Trappiel M, Dagnell M, Ostman A, Hooft van Huijsduijnen R, Kappert K.

*J Mol Med (Berl).* 2014 Sep;92(9):983-94.

*Impact Factor:* 4,686

**Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome.**

Slavic S, Lauer D, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Grzesiak A, Trappiel M, Thöne-Reineke C, Baulmann J, Paulis L, Kappert K, Kintscher U, Unger T, Kaschina E.

*J Mol Med (Berl).* 2013 Jul;91(7):811-23.

*Impact Factor:* 4,686

**Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an essential modifier of glucocorticoid-induced hepatic gluconeogenesis.**

Winkler R, Benz V, Clemenz M, Bloch M, Foryst-Ludwig A, Wardat S, Witte N, Trappiel M, Namsolleck P, Mai K, Spranger J, Matthias G, Roloff T, Truee O, Kappert K, Schupp M, Matthias P, Kintscher U.

*Diabetes.* 2012 Feb;61(2):513-23.

*Impact Factor:* 8,684

*Impact Factor:* ISI Web of knowledge von 2016



## 9. LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

---

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.