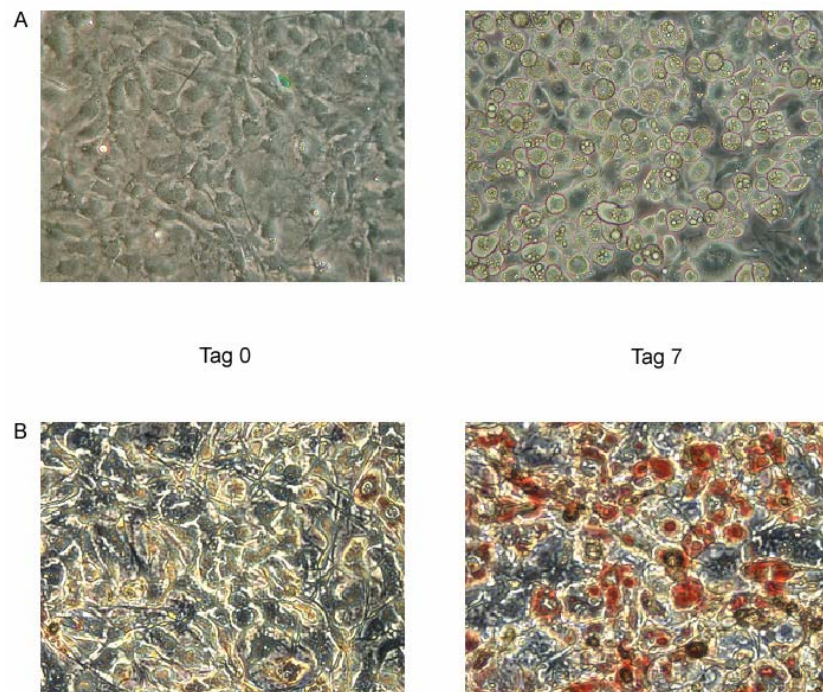


## 3. Ergebnisse

Für die *in-vitro* Experimente wurde in dieser Arbeit die 3T3-L1 Zelllinie ausgewählt. Sie stellt ein sehr gutes und vielfach verwendetes Modell zur Untersuchung der Adipozytenfunktionen inclusive deren Konversion aus Präadipozyten dar [136] und wird aus Swiss-3T3 Mausembryos gewonnen [137, 138]. In Kultur besitzen differenzierte 3T3-L1 Adipozyten die meisten Charakteristika von Fettzellen aus Tiergewebe [139]. Auch die Bildung und das Aussehen ihrer Fettröpfchen ist gut mit denen in Gewebefettzellen vergleichbar [137].

### 3.1. Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten

Um die nachfolgenden Experimente durchführen zu können, wurden die 3T3-L1 Zellen zunächst zu Adipozyten differenziert. Dafür wurden die 3T3-L1 Präadipozyten in DMEM kultiviert und 2 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz differenziert, um nach 7 Tagen vollständig differenzierte 3T3-L1 Adipozyten zu erhalten (siehe 2.2.1.). Zur Kontrolle der erfolgreichen Differenzierung wurde die Bildung der für Adipozyten charakteristischen Fettröpfchen lichtmikroskopisch ohne und mit Hilfe der Oil-Red-O-Färbung nachgewiesen (Abbildung 3.1.).



**Abbildung 3.1.:** Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.

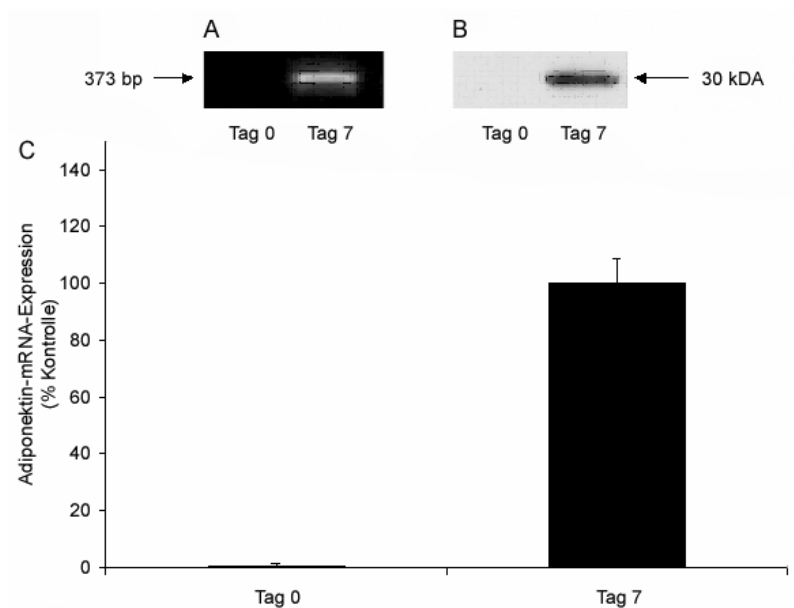
Die Fotos zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von kultivierten 3T3-L1 Zellen (100-fache Vergrößerung). **A:** Die beiden oberen Bilder sind die von undifferenzierten Zellen an Tag 0 (links) und von ausdifferenzierten Adipozyten an Tag 7 (rechts). **B:** Die unteren Bilder zeigen eine Färbung der Zellen mit Oil-Red-O an den gleichen Tagen.

Auf dem Bild links oben erkennt man eindeutig die konfluenten 3T3-L1 Präadipozyten kurz vor Zugabe des Differenzierungscocktails an Tag 0. Sie enthalten noch keine Fetttropfen. Sie sind im Bild rechts oben (Tag 7) deutlich zu erkennen, was mit der Ausdifferenzierung der Zellen zu Adipozyten einhergeht. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe der Oil-Red-O-Färbung, die Fetteinlagerungen in Zellen rot anzufärben vermag, noch einmal verifiziert. Das Bild unten links zeigt dies bei Zellen an Tag 0, auf dem noch keine Rotfärbung zu erkennen ist. Auf dem Bild von Tag 7 (unten rechts) kann man dagegen die während der Differenzierung gebildeten Fetttropfen durch die rote Färbung gut erkennen.

### 3.2. Adiponektinexpression in 3T3-L1 Zellen

Um den Einfluss der Ang II-Stimulation sowie der RAS-Blockade auf die Expression des Adiponektins studieren zu können, musste weiterhin festgestellt werden, ob dieses Adipozytokin auch in den 3T3-L1 Zellen produziert wird.

Dazu wurden sowohl aus nicht differenzierten 3T3-L1 Präadipozyten (Tag 0), als auch aus 3T3-L1 Adipozyten (Tag 7) RNA und Proteine isoliert (siehe 2.2.2. und 2.2.3.). Aus der RNA wurde nach der gelelektrophoretischen Qualitätskontrolle mittels RT-Reaktion die entsprechende cDNA gewonnen, um damit die Transkription des Adiponektins mittels semiquantitativer PCR (siehe 2.2.2., Abbildung 3.2. A) und quantitativer Realtime-PCR nachweisen zu können (siehe 2.2.2., Abbildung 3.2. C = Expression in % im Verhältnis zu der am Tag 7 incl. *Standard Error Of The Mean* [SEM] aus mind. 3 unabhängigen Experimenten). Die Proteine wurden nach der Konzentrationsbestimmung mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, um dann mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western-Blot (siehe 2.2.3.) das Vorhandensein des Adiponektins auch auf Proteinebene nachzuweisen (Abbildung 3.2. B).



**Abbildung 3.2.:** Adiponektinexpression in 3T3-L1 Zellen.

**A** zeigt das mittels semiquantitativer RT-PCR amplifizierte und im Gel aufgetragene, 373 bp große Adiponektin-Amplikon an Tag 0 (links) und an Tag 7 (rechts). In **B** ist die durch Western-Blot ermittelte Adiponektin-Proteinexpression an Tag 0 (links) und an Tag 7 (rechts) dargestellt. Die Adiponektinbande im Western-Blot hat eine Größe von 30 kDa. Die Abbildung **C** stellt die mittels quantitativer realtime-PCR ermittelte Adiponektin-mRNA-Expression im prozentualen Verhältnis zum Tag 7 dar (links: Tag 0, rechts: Tag 7).

Abbildung 3.2. zeigt die Adiponektinexpression in 3T3-L1 Zellen. Daraus ist gut zu erkennen, dass Adiponektin in ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene vorhanden ist. Dies stellt damit die Basis für eine Analyse der Adiponektinexpression und dessen Beeinflussung durch Ang II-Stimulation und RAS-Blockade in diesem Zellmodell her. An Tag 0 konnte dagegen weder die Präsenz der Adiponektin-mRNA noch die des Proteins nachgewiesen werden.

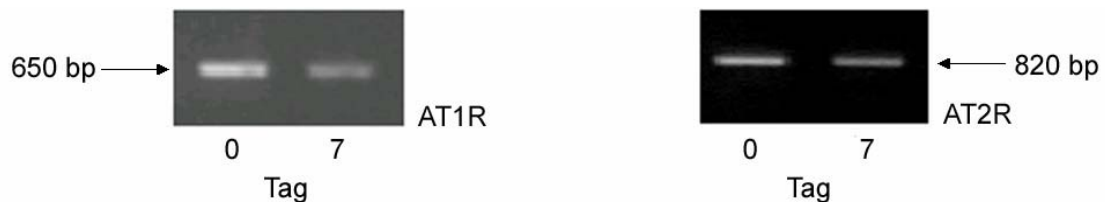
Diese Ergebnisse dienen weiterhin als Nachweis für das Funktionieren der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Analyse der Adiponektin-mRNA- und

Proteinexpression in 3T3-L1 Zellen, weil sie die Ergebnisse anderer Arbeiten [81, 82] bestätigten.

### 3.3. AT-Rezeptorexpression in 3T3-L1 Zellen

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die AT-Rezeptoren auch in diesem Zellsystem vorhanden sind und somit für die Modulation durch Ang II und die AT-Rezeptorantagonisten zur Verfügung stehen.

Dafür wurden die Zellen sowohl unmittelbar vor der Differenzierung (Tag 0), als auch im adipozytären Zustand (Tag 7) isoliert und daraus RNA gewonnen (siehe 2.2.2.). Nach der RNA-Qualitätskontrolle wurde sie dann mit Hilfe einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben und mittels semiquantitativer PCR die AT1R- und AT2R-mRNA-Expression der 3T3-L1 Zellen untersucht (siehe 2.2.2., Abbildung 3.3.).



**Abbildung 3.3.:** AT-Rezeptorexpression in 3T3-L1 Zellen.

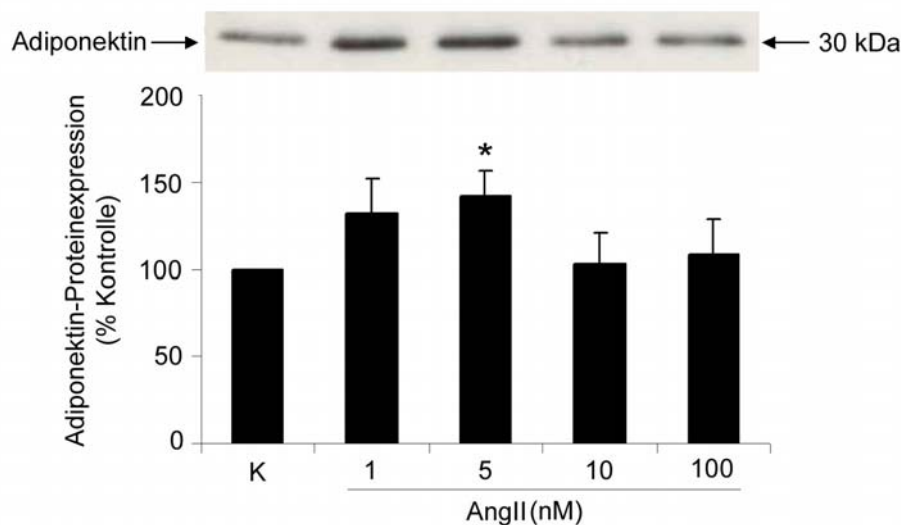
Die PCR-Gele zeigen die mRNA-Expression des AT1R (linkes Bild) und des AT2R (rechtes Bild). Auf der linken Bande jedes Gels wurde jeweils das Amplikon des undifferenzierten Zustands (Tag 0) und auf der rechten Bande das PCR-Produkt der Adipozyten aufgetragen (Tag 7).

Abbildung 3.3. zeigt die AT-Rezeptorexpression im 3T3-L1 Zellmodell. Daraus ist ersichtlich, dass sowohl der AT1R, als auch der AT2R in den Zellen exprimiert ist. Beide Rezeptoren kommen im prä- und im adipozytären Zustand vor. Damit sind die Zellen für die Untersuchung der Effekte der Ang II-Stimulation sowie der RAS-Blockade auf deren Adipozytenfunktion geeignet.

### 3.4. Einfluss von Ang II auf die Adiponektinexpression in 3T3-L1 Zellen

Für die Analyse der Wirkung von Ang II auf die Adiponektinexpression wurden differenzierte 3T3-L1 Adipozyten (Tag 7) für 16 Stunden mit DMEM, welches nur 0,5 % Serum enthielt, behandelt, um den Zellstoffwechsel auf ein basales Niveau zu reduzieren (siehe 2.2.1.). Danach wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Ang II bzw. Vehikel behandelt, um dann an den entsprechenden Zeitpunkten die RNA oder die Proteine zu isolieren. Die Adiponektinexpression wurde wiederum mittels semiquantitativer PCR bzw. mittels Western-Blot (siehe 2.2.2. bzw. 2.2.3.) bestimmt.

**Ang II induziert dosisabhängig die Adiponektin-Proteinexpression.** Zunächst wurden die 3T3-L1 Adipozyten nach dem Entzug des Serums im DMEM für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Ang II behandelt und die Proteine aus ihnen isoliert. Danach wurde die Adiponektin-Proteinexpression im Western-Blot ermittelt. Die Abbildung 3.4. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



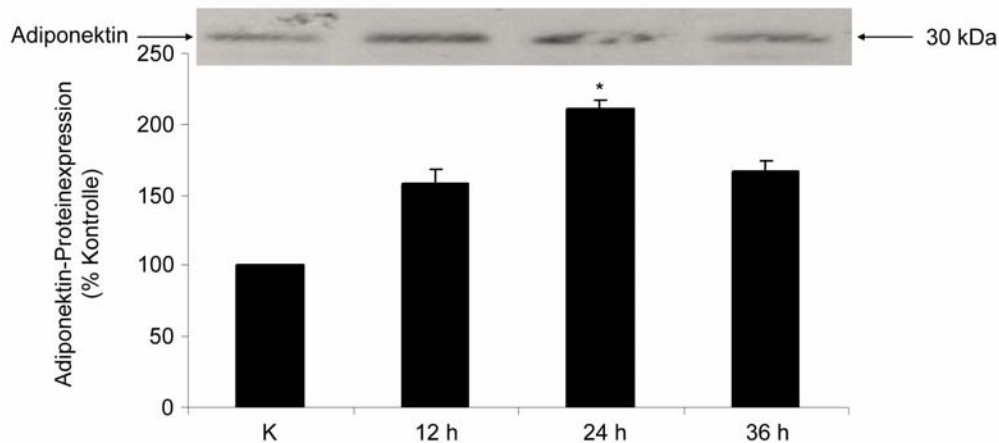
**Abbildung 3.4.:** Adiponektin-Proteinexpression nach einem Ang II-Dosisverlauf.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression im prozentualen Verhältnis zu vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K) nach Ang II-Stimulation mit einer Konzentration von 1, 5, 10 bzw. 100 nM. Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Die fast 1,5-fache Induktion mit 5 nM Ang II ist im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Aus Abbildung 3.4. ist ersichtlich, dass Ang II die Adiponektin-Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten dosisabhängig zu induzieren vermag. Schon bei einer Konzentration von 1 nM ist sie erhöht und findet ihr Maximum in einer etwa 1,5-fachen, statistisch signifikanten Erhöhung bei einer Ang II-Konzentration von 5 nM. Niedrigere bzw. höhere Ang II-Konzentrationen beeinflussten die Adiponektin-Proteinexpression nicht.

**Ang II induziert zeitabhängig die Adiponektin-Proteinexpression.** Um zu überprüfen, ob die Ang II-induzierte Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression auch zeitabhängig verläuft, wurden die unter Serumentzug stehenden 3T3-L1 Adipozyten mit 5 nM Ang II behandelt und die Proteine zu verschiedenen Zeiten isoliert. Danach wurde die Adiponektin-Proteinexpression

wieder mittels Western-Blot ermittelt. Die Abbildung 3.5. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.5.:** Adiponektin-Proteinexpression nach einem Ang II-Zeitverlauf.

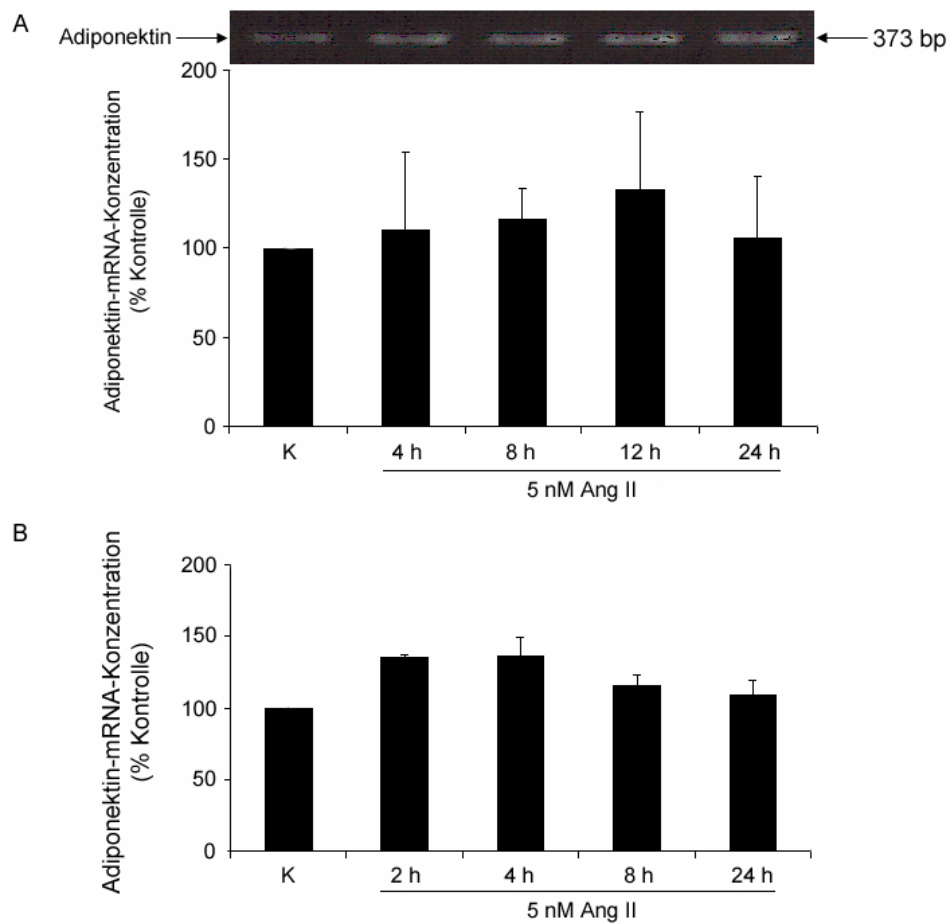
Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression im prozentualen Verhältnis zu vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K) nach Ang II-Stimulation mit einer Konzentration von 5 nM für 12, 24 und 36 h. Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Die Induktion mit 5 nM Ang II nach 24 h ist im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Ang II-induzierte Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression verläuft auch zeitabhängig, wie man aus Abbildung 3.5. erkennen kann. Sie ist 12 h nach der Stimulierung mit Ang II schon erhöht und erreicht nach 24 Stunden das im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikante Maximum. Nach 36 h fällt die Adiponektin-Proteinexpression bereits wieder.

**Kein Einfluss von Ang II auf die Adiponektin-mRNA-Expression.** Danach wurde analysiert, ob die gefundene Induktion der Adiponektinexpression durch Ang II auf eine erhöhte Adiponektin-mRNA-Konzentration und damit auf eine erhöhte Produktion des Adiponektinproteins zurückzuführen ist. Dazu wurden die unter Serumentzug stehenden 3T3-L1 Adipozyten ebenfalls mit einer Konzentration



von 5 nM Ang II behandelt und die mRNA an verschiedenen Zeitpunkten isoliert. Nach RNA-Isolierung, -Qualitätskontrolle, -Konzentrationsbestimmung und Umschreibung in cDNA wurde sowohl mit Hilfe der semiquantitativen PCR (siehe 2.2.2., Abbildung 3.6. A), als auch mittels quantitativer Realtime-PCR (siehe 2.2.2., Abbildung 3.6. B) die Adiponektin-mRNA-Konzentration im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle bestimmt. Die Grafik stellt die daraus resultierenden Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.



**Abbildung 3.6.:** Adiponektin-mRNA-Expression nach einem Ang II-Zeitverlauf.

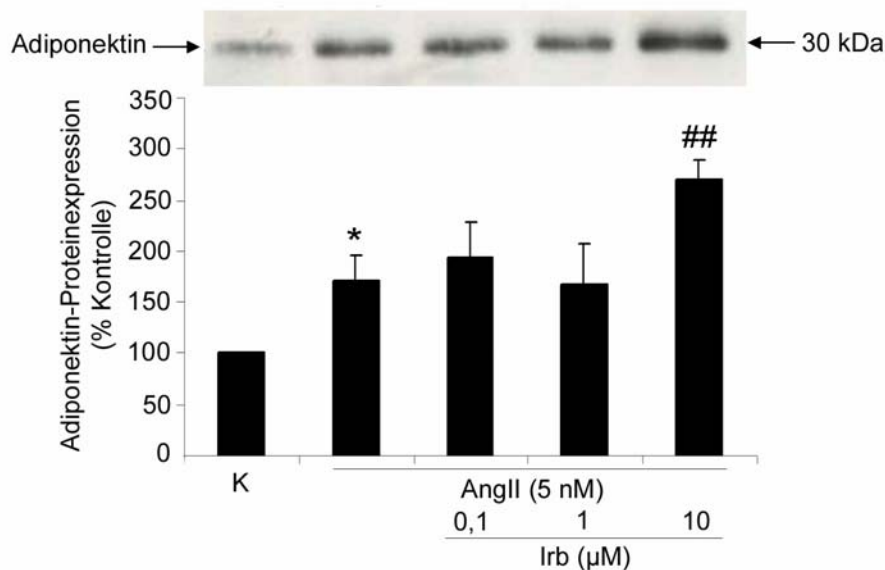
**A** zeigt die durch semiquantitative RT-PCR ermittelte Adiponektin-mRNA-Expression im prozentualen Verhältnis zu vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K) nach Ang II-Stimulation mit einer Konzentration von 5 nM für 4, 8, 12 und 24 h. Über den Balken ist das entsprechende, repräsentative PCR-Amplikon zu sehen. In **B** ist der entsprechende Zeitverlauf mit den Zeitpunkten 2, 4, 8, 24 h für die mittels quantitative Realtime-PCR ermittelte Adiponektin-mRNA-Expression abgebildet. Einheit ist auch hier das prozentuale Verhältnis zu vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Als weitere Kontrolle für die jeweiligen Methoden diente die unter 3.3. ermittelte Adiponektin-mRNA-Expression von 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten.

Die gefundene Induktion der Adiponektin-Proteinexpression durch Ang II ist nicht auf eine erhöhte Adiponektin-mRNA-Konzentration zurückzuführen, was aus Abbildung 3.6. ersichtlich ist. So konnte weder zu einem frühen Zeitpunkt, noch nach 24 h, als die Adiponektin-Proteinkonzentration ihr Maximum erreichte, eine statistisch signifikante Steigerung der Adiponektin-mRNA-Expression festgestellt werden.

### 3.5. Einfluss der Blockade des Renin-Angiotensin-Systems auf die Adiponektinexpression

**AT1R-Blockade steigert die Ang II-induzierte Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression.** Um herauszufinden, welcher Angiotensinrezeptor die Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression vermittelt, wurde im nächsten Schritt der AT1R und der AT2R mit pharmakologischen Inhibitoren blockiert.

Hierfür wurden die Zellen eine halbe Stunde vor der Behandlung mit 5 nM Ang II unterschiedlich konzentrierten Lösungen des AT1-Antagonisten Irbesartan ausgesetzt. Nach der Zugabe des Ang II wurden die Zellen für 24 h inkubiert und anschließend deren Proteine isoliert, um dann mittels Western-Blot die Adiponektin-Proteinexpression zu bestimmen. Die Abbildung 3.7. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.7.:** Adiponektin-Proteinexpression nach AT1R-Blockade und Ang II-Stimulation.

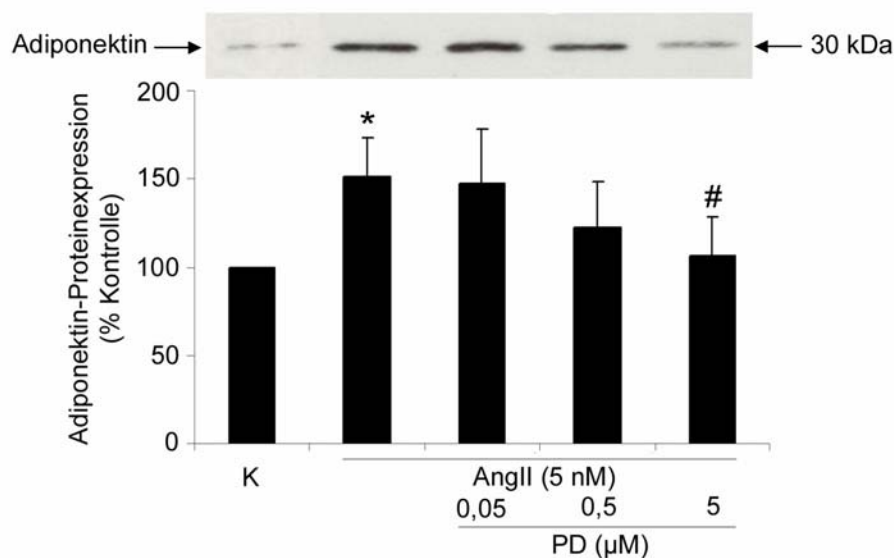
Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit Irbesartan (Irb)-Konzentrationen von 0,1; 1 und 10  $\mu\text{M}$  und anschließender Ang II-Stimulation (5 nM) für 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichten sowohl die jeweiligen Induktionen mit 5 nM Ang II im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle ( $p < 0,05$ ), als auch die Vorbehandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Irb im Verhältnis zur alleinigen Behandlung mit Ang II ( $p < 0,01$ ).

Diese Experimente lieferten das Ergebnis, dass die Ang II-induzierte Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression durch vorherige Inhibierung des AT1R noch weiter verstärkt wird. So konnte durch 30-minütige Präinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Irbesartan eine deutliche und hochsignifikante Erhöhung der Proteinkonzentration des Adiponektins erreicht werden, was durch niedrigere Irbesartankonzentrationen nicht gelang.

**AT2R-Blockade inhibiert die Ang II-induzierte Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression.** Die eben beschriebenen Experimente ließen vermuten, dass

durch die AT1R-Blockade das vorhandene Ang II vermehrt am AT2R binden könnte. Somit könnte die gefundene, Ang II-induzierte Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression über den AT2R vermittelt sein.

Um dies zu überprüfen, wurden die ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten 30 min vor der Ang II-Stimulation (5 nM) mit unterschiedlichen Konzentrationen des selektiven und potenten AT2R-Antagonisten PD 123319 (PD) über 24 h behandelt. Aus den Zellen wurden dann die Proteine isoliert und einem Adiponektin Western-Blot unterzogen. Die Abbildung 3.8. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



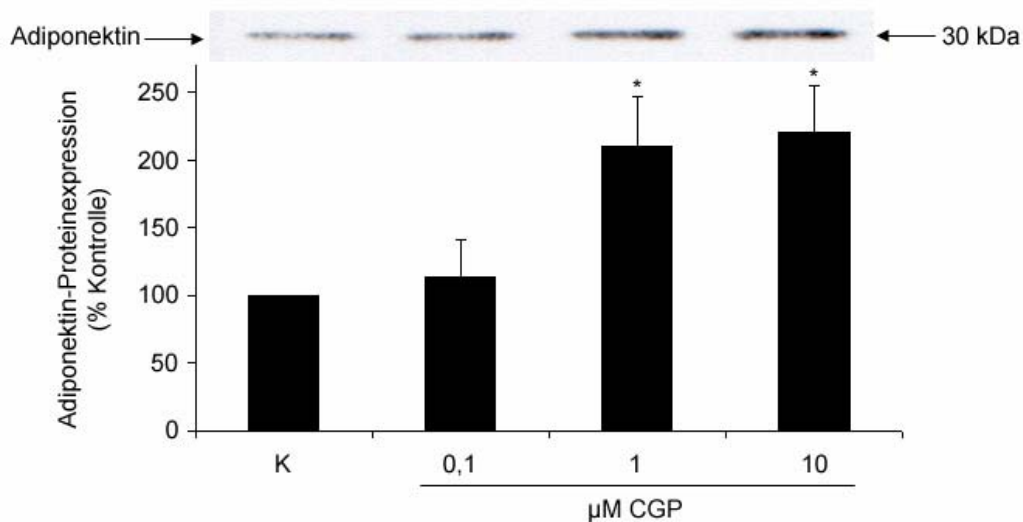
**Abbildung 3.8.:** Adiponektin-Proteinexpression nach AT2R-Blockade und Ang II-Stimulation.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit PD-Konzentrationen von 0,05; 0,5 und 5 μM und anschließender Ang II-Stimulation (5 nM) für 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte sowohl die Induktion mit 5 nM Ang II im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle ( $p < 0,05$ ), als auch die Vorbehandlung mit 5 μM PD im Verhältnis zur alleinigen Behandlung mit Ang II ( $p < 0,05$ ).

Aus Abbildung 3.8. geht hervor, dass durch vorherige Inhibierung des AT2R mit einer 5  $\mu$ M Lösung des AT2R-Antagonisten PD 123319 die Ang II-induzierte Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression vollständig und statistisch signifikant unterdrückt werden konnte. Auch eine geringere Dosierung von 0,5  $\mu$ M hatte schon eine erniedrigte Adiponektinkonzentration zur Folge. Noch geringere Konzentrationen von PD 123319 beeinflussten die durch Ang II erhöhten Adiponektinkonzentrationen nicht.

**AT2R-Stimulation initiiert die Ang II-induzierte Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression.** In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch vorherige Inhibierung des AT2R mit dem AT2R-Antagonisten PD 123319 die Ang II-induzierte Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression vollständig unterdrückt werden konnte. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Ang II-induzierte Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression über den AT2R vermittelt sein könnte.

Um die Vermutung weiter zu festigen, wurden die 3T3-L1 Adipozyten nun mit unterschiedlichen Konzentrationen des selektiven und potenten AT2R-Agonisten CGP 42112A (CGP) über 24 h behandelt, danach deren Proteine isoliert und ein Adiponektin Western-Blot durchgeführt. Die Abbildung 3.9. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.9.:** Adiponektin-Proteinexpression nach AT2R-Stimulation.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit CGP-Konzentrationen von 0,1; 1 und 10  $\mu\text{M}$  für 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichten die Induktionen mit 1 und 10  $\mu\text{M}$  CGP im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Die in Abbildung 3.9. dargestellten Versuche zeigten, dass die Adiponektin-Proteinkonzentration auch durch Stimulation des AT2R mit dem entsprechenden Agonisten CGP statistisch signifikant auf etwa das Doppelte erhöht werden konnte. Dies geschah bei Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ). Niedrigere CGP-Konzentrationen beeinflussten die Adiponektin-Proteinexpression nicht.

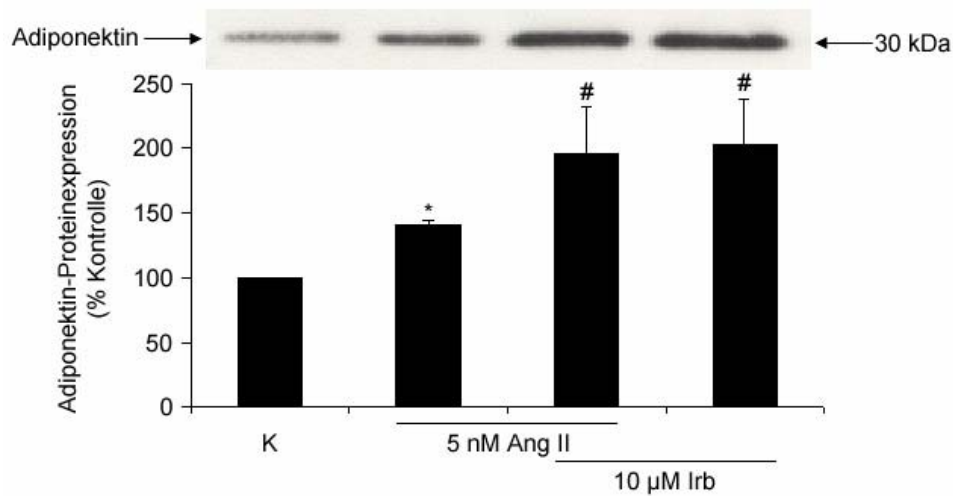
Somit konnte durch die oben beschriebene Stimulation mit CGP die Hypothese der über den AT2-Rezeptor vermittelten, Ang II-induzierten Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression eindrucksvoll verifiziert werden.

Die Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression durch Irbesartan ist unabhängig von dessen AT1R-Blockade. In den vorherigen Untersuchungsreihen wurde dargelegt, dass die Ang II-induzierte Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression über den AT2R vermittelt ist. Ob der potente und hochsignifikante Effekt des Irbesartans auf die Adiponektin-Proteinexpression Ang II-abhängig ist, war allerdings noch unklar.

*Die Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression durch Irbesartan ist unabhängig von exogenem Ang II.*

Um eventuelle Ang II-unabhängige Effekte des Irbesartans auf die Adiponektin-Proteinexpression herauszufinden, wurden die 3T3-L1 Adipozyten zunächst wieder mit oder ohne Irbesartan (10  $\mu$ M) 30 min vorbehandelt und dann mit 5 nM Ang II über 24 h versetzt. In einer weiteren Probe wurde außerdem die Irbesartanbehandlung ohne das nachträgliche Zugeben von Ang II unternommen. Nach Proteinisolation und Western-Blot zeigt die Abbildung 3.10. einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.





**Abbildung 3.10.:** Adiponektin-Proteinexpression nach AT1R-Blockade mit oder ohne Ang II-Stimulation.

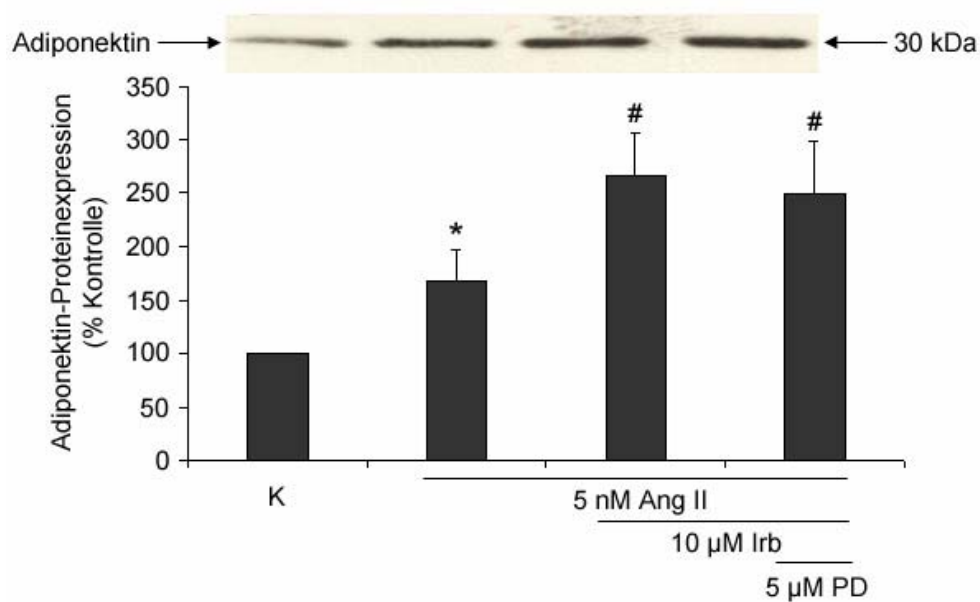
Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit einer Irbesartan (Irb)-Konzentrationen von 10  $\mu$ M und anschließender Ang II-Stimulation (5 nM) für 24 h. Sowohl die Ang II-Behandlung wurde in der Präsenz und Abwesenheit von Irb unternommen (Bande bzw. Balken 2 und 3), als auch die Irb-Zugabe mit oder ohne nachfolgende Ang II-Stimulation (Bande bzw. Balken 3 und 4). Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte sowohl die Induktion mit 5 nM Ang II im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ), als auch die Vorbehandlung mit 10  $\mu$ M Irb einschließlich ( $p < 0,01$ ) bzw. ohne ( $p < 0,05$ ) Ang II-Stimulation im Verhältnis zur alleinigen Behandlung mit Ang II.

Der in Abbildung 3.10. dargestellte Versuch lieferte ein interessantes Ergebnis. So konnte wieder eine signifikante Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression mit einer 5 nM Ang II-Lösung erreicht werden, welche durch Vorbehandlung mit Irbesartan (10  $\mu$ M) auch wiederum deutlich und statistisch signifikant verstärkt wurde. Die gleiche, im Verhältnis zur alleinigen Ang II-Behandlung statistisch signifikante, Erhöhung der Adiponektinkonzentration durch Irbesartan konnte aber auch ohne nachfolgende Stimulation mit Ang II erreicht werden.

Dies lässt den Schluss zu, dass ein deutliches Übergewicht eines Ang II-unabhängigen Effektes von Irbesartan auf die Adiponektin-Proteinexpression existiert, da hier zumindest das exogen hinzugegebene Ang II nicht für die Verstärkung notwendig war.

*Die Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression durch Irbesartan ist unabhängig von vorheriger AT2R-Blockade.*

Ein weiteres Experiment zur Bestätigung dieses Rückschlusses wurde danach unternommen. Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten zunächst wieder mit oder ohne Irbesartan (10  $\mu$ M) 30 min vorbehandelt und dann mit 5 nM Ang II über 24 versetzt. In einer weiteren Probe wurde jedoch zusätzlich - noch einmal 30 min vor der Irbesartangabe - der AT2R durch Zusatz von PD (5  $\mu$ M) inhibiert. Aus den Zellen wurden nachfolgend die Proteine isoliert und anschließend die Adiponektin-Proteinkonzentration mittels Western-Blot ermittelt. Die Abbildung 3.11. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.11.:** Adiponektin-Proteinexpression nach Irbesartan- und Ang II-Behandlung mit oder ohne vorherige AT2R-Inhibierung.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit oder ohne einer Irb-Konzentrationen von 10  $\mu$ M und anschließender Ang II-Stimulation (5 nM) für 24 h (Bande bzw. Balken 2 und 3). Bande bzw. Balken 4 beinhaltet die zusätzliche AT2R-Inhibierung mit 5  $\mu$ M PD. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte sowohl die Induktion mit 5 nM Ang II im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle ( $p < 0,05$ ), als auch die Vorbehandlung mit 10  $\mu$ M Irb einschließlich bzw. ohne vorherige PD-Zugabe im Verhältnis zur alleinigen Behandlung mit Ang II ( $p < 0,05$ ).

Aus Abbildung 3.11. ist ersichtlich, dass auch die durch AT2R-Blockade erfolgte Inhibierung der Ang II-induzierten Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression bei dem potenten Irbesartan-Effekt von untergeordeter Bedeutung ist. So konnte auch in diesem Experiment die Adiponektin-Konzentration wieder durch 5 nM Ang II statistisch signifikant erhöht und durch vorangegangene Irbesartanbehandlung weiter deutlich und signifikant gesteigert werden. Die zusätzliche Inhibierung des AT2R durch Vorbehandlung mit PD bewirkte aber keine Abschwächung des Irbesartaneffekts was einen

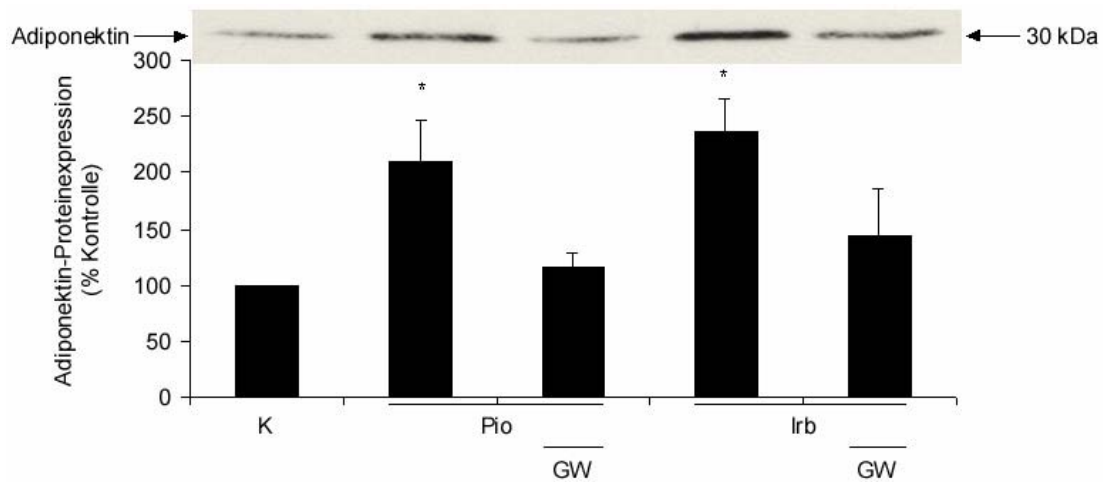
starken, AT-Rezeptor-unabhängigen Einfluss auf die Adiponektin-Proteinkonzentration wahrscheinlicher macht.

### 3.6. Einfluss vom PPAR $\gamma$ auf die Adiponektin-expression in 3T3-L1 Adipozyten

In den vorangegangenen Versuchsreihen konnte die potente und hochsignifikante Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression durch Irbesartan nicht auf dessen AT1R-Blockade zurückgeführt werden. Da wir kürzlich nachweisen konnten, dass die AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan eine AT1R-unabhängige Aktivierung des PPAR $\gamma$  hervorrufen [140] und Adiponektin als PPAR $\gamma$ -Zielgen identifiziert wurde [96, 97, 141], lag die Vermutung nahe, dass die durch Irbesartan verursachte Stimulation der Adiponektinexpression über diesen Rezeptor vermittelt wird.

#### **Irbesartan induziert die Adiponektin-Proteinexpression via PPAR $\gamma$ -Aktivierung.**

Um der oben genannten Vermutung nachzugehen, wurden die unter Serumentzug stehenden 3T3-L1 Adipozyten diesmal ohne Ang II und zwar nur mit Irbesartan und dem als Positivkontrolle dienenden Insulinsensitizer und PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon behandelt (je 10  $\mu$ M). Dies geschah jeweils mit oder ohne 30-minütige Präinkubierung mit dem selektiven PPAR $\gamma$ -Antagonist GW 9662 (GW; 30  $\mu$ M). Die Abbildung 3.12. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



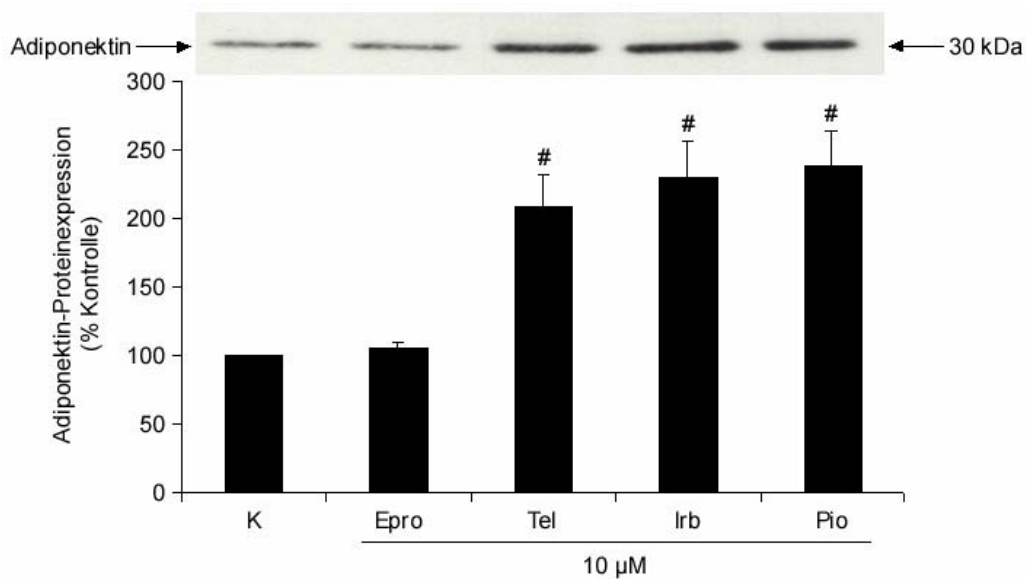
**Abbildung 3.12.:** Adiponektin-Proteinexpression nach Irbesartan- und Pioglitazonstimulation mit oder ohne PPAR $\gamma$ -Blockade.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit Pioglitazon (Pio) und Irbesartan (Irb, jeweils 10  $\mu$ M) für 24 h. Sowohl die Pio-, als auch die Irb-Behandlung wurden mit (Balken bzw. Banden 3 und 5) und ohne (Bande bzw. Balken 2 und 4) Präinkubation mit GW (30  $\mu$ M) durchgeführt. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte sowohl die Induktion mit Pio und Irb im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle ( $p < 0,05$ ), als auch die jeweiligen Vorbehandlungen mit GW im Verhältnis zur alleinigen Stimulation ohne PPAR $\gamma$ -Antagonist ( $p < 0,05$ ).

Die Resultate in Abbildung 3.12. konnten die Vermutung der PPAR $\gamma$ -vermittelten Induktion der Adiponektinexpression durch Irbesartan bestätigen. So konnte erwartungsgemäß die Adiponektin-Proteinexpression mit 10  $\mu$ M Pioglitazon statistisch signifikant auf etwa das Doppelte erhöht werden. Dies geschah, wie unter 3.5. gesehen, sogar noch etwas stärker durch 10  $\mu$ M Irbesartan. Die beiden Induktionen der Adiponektin-Proteinexpression konnten durch Vorbehandlung mit dem PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW verhindert werden, was eine

Involvierung dieses Rezeptors auch in der Irbesartan-induzierten Stimulation der Adiponektin-Proteinexpression deutlich unterstreicht.

**PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten induzieren die Adiponektin-Proteinexpression.** Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass Irbesartan die Adiponektin-Proteinexpression über den PPAR $\gamma$  zu erhöhen vermag. Um diesen Effekt zu verifizieren, behandelten wir die 3T3-L1 Adipozyten mit verschiedenen Sartanen (10  $\mu$ M) für jeweils 24 h. Dieses Experiment basierte auf unserer kürzlich gemachten Erkenntnis, dass nur bestimmte und nicht alle AT1-Antagonisten PPAR $\gamma$ -Zielgene induzieren können [140]. Daher nahmen wir für die Behandlung Eprosartan, welches keinen Einfluss auf den PPAR $\gamma$  hatte, sowie die PPAR $\gamma$ -Zielgene-induzierenden AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan. Als Positivkontrolle wurde wiederum der PPAR $\gamma$ -Agonist und Insulinsensitizer Pioglitazon verwendet (10  $\mu$ M). Die Abbildung 3.13. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.13.:** Adiponektin-Proteinexpression nach Stimulation mit verschiedenen Sartanen.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit jeweils 10  $\mu$ M Eprosartan (Epro), Telmisartan (Tel), Irbesartan (Irb) und Pioglitazon (Pio) für 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte die Induktion mit Telmisartan, Irbesartan und Pioglitazon im Verhältnis zur vehikelbehandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Die in Abbildung 3.13. dargestellte Behandlung der 3T3-L1 Adipozyten mit verschiedenen Sartanen konnte die Fähigkeit bestimmter Sartane, PPAR $\gamma$ -Aktivität zu induzieren, bestätigen. So wurde die Adiponektin-Proteinexpression erheblich und statistisch signifikant durch die Behandlung mit Telmisartan und Irbesartan (10  $\mu$ M) erhöht. Dies konnte auch mit 10  $\mu$ M Pioglitazon erwartungsgemäß bestätigt werden. Eprosartan, welches schon andere PPAR $\gamma$ -Zielgene nicht aktivieren konnte [140], vermochte auch die Adiponektin-Proteinexpression nicht zu steigern.

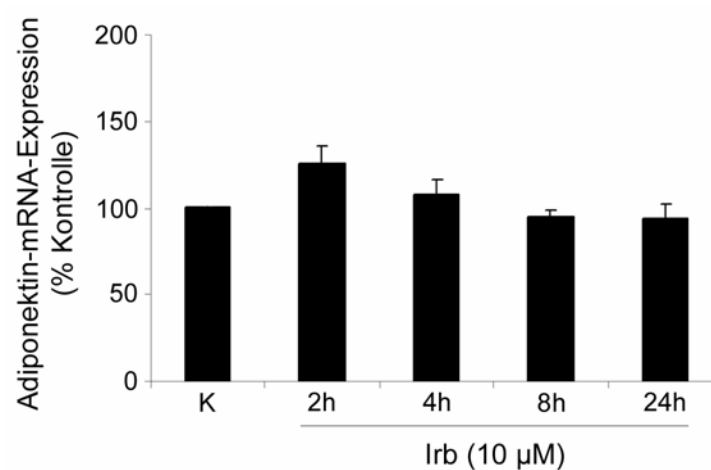
---

### 3.7. Einfluss der PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten auf die Adiponektin-mRNA-Expression

In den unter 3.6. gemachten Studien konnte nachgewiesen werden, dass die PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan in der Lage sind, die Proteinkonzentration des PPAR $\gamma$ -Zielgens Adiponektin zu erhöhen. Da diese AT1-Antagonisten auch die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen induzieren konnten [140], lag es auf der Hand, auch beim Adiponektin den Einfluss dieser Wirkstoffe auf dessen mRNA-Expression zu untersuchen.

**Irbesartan steigert die Adiponektin-mRNA-Expression nicht.** Dafür wurden zunächst die unter Serumentzug stehenden 3T3-L1 Adipozyten mit einer Lösung von 10  $\mu$ M Irbesartan behandelt und zu verschiedenen Zeiten deren RNA isoliert. Die Adiponektin-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Realtime-PCR (2.2.2.) gemessen und mit der vehikelbehandelten Kontrolle verglichen. Die Grafik in der Abbildung 3.14. stellt die daraus resultierenden Mittelwerte der Adiponektin-mRNA-Expression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.





**Abbildung 3.14.:** Adiponektin-mRNA-Expression nach Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Irbesartan.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-mRNA-Expression nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Irbesartan (Irb) und anschließender RNA-Isolation nach 2, 4, 8 und 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Als weitere Kontrolle diente die unter 3.3. bestimmte Expression von Adiponektin-mRNA in 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten.

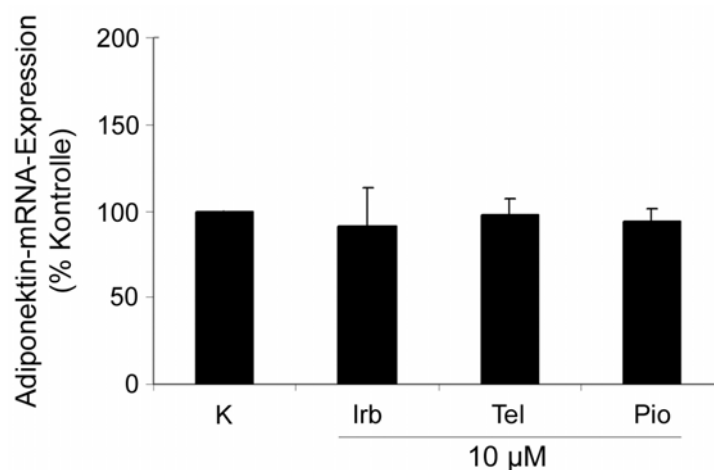
In den für die Induktion der Proteinexpression relevanten Konzentrationen konnte Irbesartan die Expression der Adiponektin-mRNA nicht erhöhen. So konnte weder zu einem frühen Zeitpunkt, noch nach 24 h, als die Adiponektin-Proteinkonzentration also schon ihr Maximum erreichte, eine statistisch signifikante Steigerung der Adiponektin-mRNA-Konzentration festgestellt werden.

Die gefundene Induktion der Adiponektin-Proteinexpression durch Irbesartan ist damit nicht auf eine erhöhte Adiponektin-mRNA-Konzentration zurückzuführen und wird somit eher durch einen posttranskriptionellen Mechanismus reguliert.

**PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten induzieren die Adiponektin-mRNA-Expression nicht.** Zur Bestätigung der gerade beschriebenen Resultate, wurden

3T3-L1 Adipozyten mit Irbesartan, dem ebenfalls PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Telmisartan sowie dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon (alle jeweils 10  $\mu$ M) für 24 h behandelt. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, weil in diesem Zellmodell ebenfalls nach 24 h die mRNA-Expression eines anderen PPAR $\gamma$ -Zielgens [*Adipose protein 2* (aP2)] erhöht werden konnte [140].

Nach der Behandlung wurde die RNA isoliert und nach der Kontrolle, Konzentrationsbestimmung und Umschreibung in cDNA, die Adiponektin-mRNA-Expression mittels quantitativer Realtime-PCR gemessen und mit der vehikelbehandelten Kontrolle verglichen. Die Grafik in der Abbildung 3.15. stellt die daraus resultierenden Mittelwerte der Adiponektin-mRNA-Expression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.



**Abbildung 3.15.:** Adiponektin-mRNA-Expression von 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlung mit verschiedenen PPAR-Aktivatoren.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-mRNA-Expression von 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Irbesartan (Irb), Telmisartan (Tel) und Pioglitazon (Pio) für 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den vehikelbehandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Als weitere Kontrolle der Methode diente die unter 3.3. bestimmte Expression von Adiponektin-mRNA in 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten.

Auch in diesem Versuch konnte keine Stimulation der Adiponektin-mRNA-Expression nach Behandlung mit den verschiedenen PPAR $\gamma$ -aktivierenden Substanzen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.15.).

Dies bestätigt wiederum die bereits gewonnene Erkenntnis, dass die in dieser Arbeit entdeckte Induktion der Adiponektin-Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten nicht auf eine erhöhte Adiponektin-mRNA-Konzentration zurückzuführen ist, sondern eher auf posttranskriptionellen Mechanismen beruht.

### 3.8. Einfluss von Irbesartan auf den Adiponektin-Proteinabbau

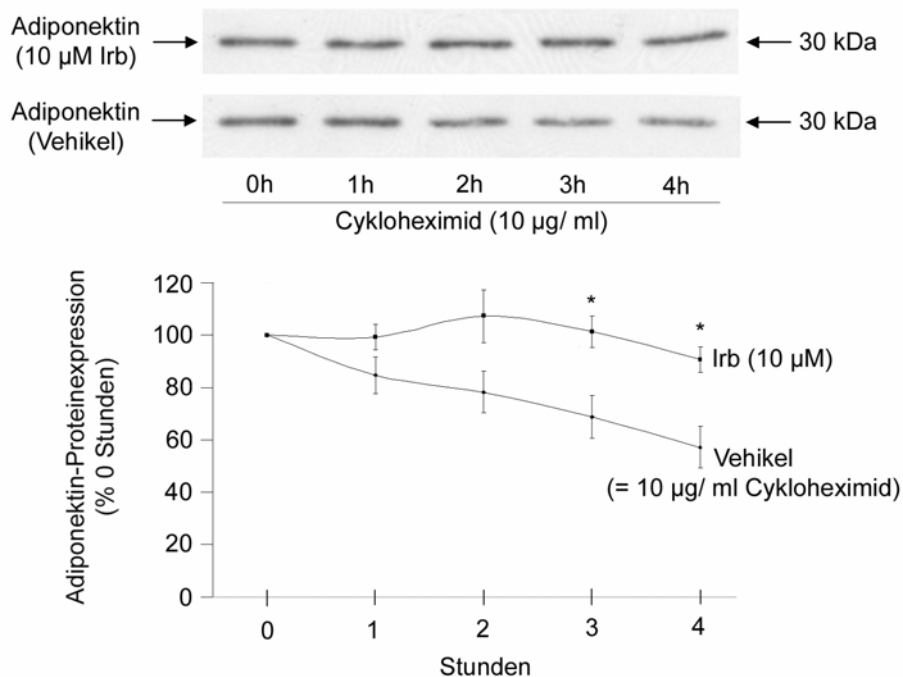
Die unter 3.7. dargestellten Versuche belegten, dass die Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten nicht auf eine erhöhte Adiponektin-mRNA-Konzentration zurückzuführen ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass die im Vergleich zur Kontrolle mit Irbesartan erhöhte Adiponektin-Proteinkonzentration nicht auf eine erhöhte Synthese, sondern auf eine Inhibierung des Abbaus zurückzuführen ist.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die 3T3-L1 Adipozyten mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid behandelt, um den zellulären Adiponektingehalt unabhängig von der Neusynthese zu analysieren.

**Irbesartan verhindert die durch Cycloheximid verursachte Senkung der Adiponektin-Proteinkonzentration.** Inhibiert man die Proteinneusynthese mittels Cycloheximid, so kommt es innerhalb eines definierten Zeitraumes zur Absenkung der Proteinkonzentration, welche größtenteils durch Degradationsprozesse bedingt ist. Unter diesen Bedingungen konnte nun der

Einfluss des AT1-Antagonisten Irbesartan auf den Adiponektin-Proteinabbau untersucht werden. Es wurde zunächst der zeitliche Verlauf des Adiponektin-Proteinabbaus in An- und Abwesenheit von Irbesartan analysiert.

Dafür wurden 3T3-L1 Adipozyten direkt mit 10 µg/ml Cykloheximid über 4 Stunden behandelt und stündlich Proben entnommen. Dies geschah ohne und mit einer 24-stündigen Präinkubierung von 10 µM Irbesartan. Nach der Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung wurde die Adiponektin-Proteinkonzentration in den 3T3-L1 Adipozyten wiederum mit Hilfe eines Western-Blots bestimmt. Die Abbildung 3.16. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.16.:** Adiponektin-Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach einem Zeitverlauf mit Cykloheximid +/- Irbesartan.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Behandlung mit 10 µg/ ml Cykloheximid jeweils ohne (untere Linie bzw. Banden) und mit Irbesartan-Präinkubierung (10 µM, obere Linie bzw. Banden). Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zur Stunde Null (vor Cykloheximidgabe; Bande bzw. Punkt 0). Über den Linien ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte die durch Irbesartan hervorgerufene Stabilisierung der Adiponektin-Proteinkonzentration nach 3 bzw. 4 h im Verhältnis zur Cykloheximid-behandelten Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Der durchgeführte Zeitverlauf mit Cykloheximid in An- und Abwesenheit von Irbesartan konnte beweisen, dass Irbesartan in der Lage ist, die durch Cykloheximid verursachte Senkung der Adiponektin-Proteinkonzentration in den 3T3-L1 Adipozyten aufzuhalten (Abbildung 3.16.). Der Unterschied der Adiponektin-Proteinkonzentration zwischen der Cykloheximid-behandelten Kontrolle und der mit 10 µM Irbesartan präinkubierten Probe wurde nach 3 h statistisch signifikant.

Die in dieser Versuchsreihe gewonnene Erkenntnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Induktion der Adiponektin-Proteinexpression durch Irbesartan durch Inhibierung des Adiponektin-Proteinabbaus vermittelt wird.

### 3.9. Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Adiponektindegradation

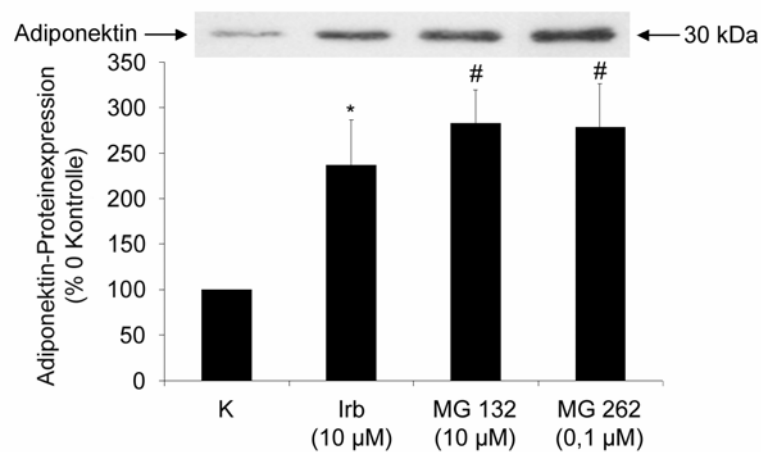
Ein wichtiger Weg des Proteinabbaus in Säugetier-Zellen ist das Ubiquitin-Proteasom-System [142]. In kultivierten Säugetierzellen werden unter optimalen Bedingungen die überwiegende Mehrheit der Proteine über diesen Weg abgebaut [143]. Mit Hilfe von Inhibitoren kann das Ubiquitin-Proteasom-System auf verschiedene Weise blockiert werden, was die Frage des Einflusses auf den Abbau bestimmter Proteine beantworten hilft [143, 144].

**Peptid-Aldehyd-Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems erhöhen die Adiponektin-Proteinkonzentration.** Um herauszufinden, ob auch Adiponektin über diesen Mechanismus abgebaut wird, wurden 3T3-L1 Adipozyten unter den in 3.8. entwickelten Bedingungen zunächst mit den Proteasominhibitoren MG 132 und MG 262 behandelt, die an die aktiven Zentren der, in den  $\beta$ -Untereinheiten des zentralen Proteasompartikels lokalisierten, Peptidasen binden [145].

Dazu wurden die Adipozyten an Tag 7 nach der Differenzierung direkt für 24 h mit 10  $\mu$ M Irbesartan oder Vehikel versetzt. Danach wurden die nicht mit Irbesartan behandelten Zellen mit jeweils 10  $\mu$ M MG 132 bzw. mit 0,1  $\mu$ M des potenteren MG 262 für eine Stunde präinkubiert um die Proteindegradation über das Ubiquitin-Proteasom-System auszuschalten. Zum Schluß wurde bei

allen Proben wieder zusätzlich die Proteinneusynthese durch Zugabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid für 4 h inhibiert.

Nach der Behandlung wurden die Proteine der Adipozyten isoliert und die Adiponektin-Proteinexpression mittels Western-Blot (siehe 2.2.3.) bestimmt. Die Abbildung 3.17. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.17.:** Adiponektin-Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlung mit Cycloheximid und Präinkubierung mit Irbesartan und Proteasominhibitoren.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Präinkubierung mit 10  $\mu\text{M}$  Irbesartan (24 h) bzw. mit den Proteasom-Inhibitoren MG 132 (10  $\mu\text{M}$ ) und MG 262 (0,1  $\mu\text{M}$ ) und nachfolgender Behandlung mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid für 4 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den, nur mit Cycloheximid behandelten, Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte die mit Irbesartan ( $p < 0,05$ ), MG 132 ( $p < 0,01$ ) und MG 262 ( $p < 0,01$ ) präinkubierte Probe im Verhältnis zur nur mit Cycloheximid behandelten Kontrolle.

Aus Abbildung 3.17. ist ersichtlich, dass MG 132 und MG 262 als Peptid-Aldehyd-Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Lage sind, die,

durch das Cycloheximid und die ständige Proteindegradation verursachte, Senkung der Adiponektin-Proteinkonzentration aufzuhalten. Der gleiche Effekt konnte wiederum auch für Irbesartan bestätigt werden. So resultierte die 24-stündige Präinkubierung der 3T3-L1 Adipozyten mit einer 10  $\mu\text{M}$  Lösung des AT1-Antagonisten und PPAR $\gamma$ -Aktivators in einer etwa 2-fach höheren Adiponektinkonzentration ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur nur mit Cycloheximid-behandelten Kontrolle. Diesen Effekt zeigte in sogar noch etwas stärkerer Ausprägung auch die einstündige Präinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  MG 132 und 0,1  $\mu\text{M}$  MG 262 ( $p$  jeweils  $< 0,01$ ).

Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Beweis dafür, dass das Adiponektin über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird und das Irbesartan durch Inhibierung dieses Systems die Fähigkeit besitzen könnte, die Adiponektin-degradation aufzuhalten und so die Proteinkonzentration des Adiponektins zu erhöhen.

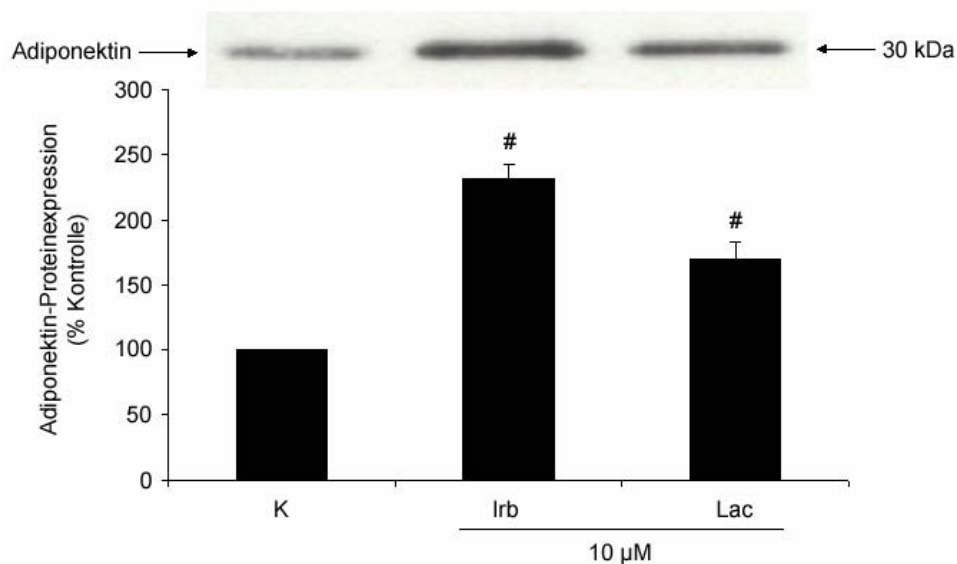
**Der spezifische Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems Lactacystin erhöht die Adiponektin-Proteinkonzentration.** Es wurde gezeigt, dass MG 132 und MG 262 als Peptid-Aldehyd-Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Lage sind, die durch das Cycloheximid und die ständige Proteindegradation verursachte Senkung der Adiponektin-Proteinkonzentration aufzuhalten. Neben den Wirkungen auf das Ubiquitin-Proteasom-System inhibieren die Substanzen ebenfalls Enzyme des lysosomalen Degradationssystems [143]. Daher ist es wichtig, den o.g. Effekt auch mit spezifischeren Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems nachzuweisen.

Lactacystin und sein Derivat *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lakton sind Antibiotika, die aus *Streptomyces*-Bakterienkulturen isoliert werden [146]. Sie unterscheiden sich strukturell von den Peptid-Aldehyd-Inhibitoren und gelten als hochspezifische Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems, indem sie eine



kovalente Bindung mit den Threoninresten in den aktiven Zentren mehrerer im Proteasompartikel lokalisierter Peptidasen eingehen [147].

So wurden die 3T3-L1 Adipozyten in der gleichen Weise wie bei den Versuchen mit den Peptid-Aldehyd-Inhibitoren behandelt und 1 Stunde vor Cycloheximid-Zugabe mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lakton versetzt. Nach der Behandlung wurden erneut die Proteine der Adipozyten isoliert und die Adiponektin-Proteinexpression mittels Western-Blot (siehe 2.2.3.) bestimmt. Die Abbildung 3.18. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.18.:** Adiponektin-Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlung mit Cycloheximid und Präinkubierung mit Irbesartan und *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lakton.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Präinkubierung mit 10  $\mu$ M Irbesartan (Irb; 24 h) bzw. dem Proteasom-Inhibitor *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lakton (Lac; 10  $\mu$ M, 1 h) und nachfolgender Behandlung mit 10  $\mu$ g/ml Cycloheximid für 4 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den nur mit Cycloheximid behandelten Zellen (Kontrolle nach 4 h; Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichten beide Proben im Verhältnis zur nur mit Cycloheximid behandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Das in Abbildung 3.18. gezeigte Experiment legt dar, dass auch *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lakton als sehr spezifischer Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Lage ist, den Adiponektinabbau in der Zelle zu blockieren.

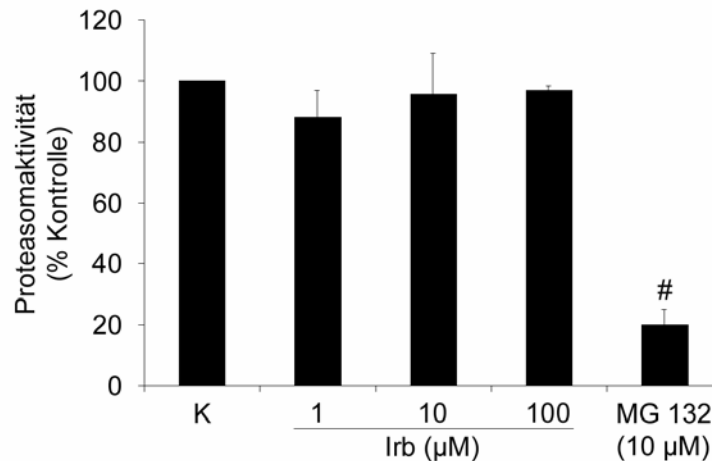
Diese Ergebnisse erhärten die Erkenntnis, dass das Adiponektin über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird und das Irbesartan durch Inhibierung dieses Systems die Fähigkeit besitzen könnte, die Adiponektindegradation aufzuhalten und so die Proteinkonzentration des Zytokins zu erhöhen.

**Irbesartan inhibiert die Proteasomaktivität nicht.** Aufgrund der gerade dargestellten Versuche konnte das System zur Degradation des Adiponektinproteins sowie die proteasominhibierende Eigenschaft des Irbesartans identifiziert werden. Da die Degradation der Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System eine Reihe verschieden lokalisierter und terminierter Teilschritte darstellt [148], könnte Irbesartan an vielen Stellen mit dieser Degradationskaskade interferieren.

Weil sowohl die Peptid-Aldehyd-Inhibitoren, als auch das Lactacystin an die aktiven Zentren mehrerer direkt im zentralen Proteasompartikel lokalisierter Peptidasen binden [145, 147], drängte sich die Analyse einer möglichen direkten Inhibition der Aktivität des zentralen Proteasompartikels durch Irbesartan auf.

Dazu wurden differenzierte 3T3-L1 Adipozyten direkt mit verschiedenen Konzentrationen Irbesartan (1, 10, 100  $\mu$ M) für 24 h, sowie mit 10  $\mu$ M MG 132 als Positivkontrolle 1 h lang präinkubiert, um dann wiederum die Proteinneusynthese mit 10  $\mu$ g/ml Cykloheximid für 4 Stunden auszuschalten. Für die Extraktion des Proteasompartikels wurden die Proteine nach einem speziellen Protokoll isoliert und dann die Proteasomaktivität mittels Emissionsmessung fluorogener Substrate gemessen (siehe 2.2.4.) und mit der vehikelbehandelten

Kontrolle verglichen. Die Grafik in der Abbildung 3.19. stellt die daraus resultierenden Mittelwerte der Proteasomaktivität aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.



**Abbildung 3.19.:** Proteasomaktivität in 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlung mit Cycloheximid und Präinkubierung mit Irbesartan und MG 132.

Das Diagramm zeigt die Proteasomaktivität nach Präinkubierung mit 1, 10 und 100 µM Irbesartan (Irb, 24 h, Balken 2, 3, 4) bzw. dem Proteasominhibitor MG 132 (10 µM, 1 h, Balken 5) und nachfolgender Behandlung mit 10 µg/ml Cycloheximid für 4 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den nur mit Cycloheximid behandelten Zellen (Kontrolle nach 4 h; Balken K). Statistische Signifikanz erreichte die mit MG 132 präinkubierte Probe im Verhältnis zur nur mit Cycloheximid behandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Aus der in Abbildung 3.19. dargestellten Versuchsreihe wird deutlich, dass Irbesartan die Proteasomaktivität nicht direkt beeinflusst. So reduzierten weder 1 noch 10 oder 100 µM Irbesartan die Aktivität des Proteasoms. Dagegen verifiziert der Proteasominhibitor MG 132 die Richtigkeit der Methode, in dem er in der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration (10 µM) die Proteasomaktivität deutlich und statistisch hochsignifikant senkte.

Daraus wird ersichtlich, dass Irbesartan, ungleich zu den hier verwendeten Proteasominhibitoren, die Degradation des Adiponektins über das Ubiquitin-

Proteasom-System an einer anderen Stelle außerhalb des zentralen Proteasompartikels inhibiert.

### 3.10. Einfluss von Irbesartan auf die Adiponektinexpression und die Insulin-Sensitivität *in-vivo*

Die vorangegangene Arbeit deckte auf, dass PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten wie Irbesartan in der Lage sind, die Adiponektinkonzentration in 3T3-L1 Adipozyten, also *in-vitro*, zu erhöhen. Um jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Einfluss des Irbesartans auf die Adiponektinexpression und der gleichzeitigen Verbesserung der Insulinsensitivität durch die Behandlung herstellen zu können, mussten die hier vorgestellten Ergebnisse in einem *in-vivo* Modell überprüft werden.

Dafür wurden homozygote Leptinrezeptor-defiziente (*fa/ fa*) Zucker Fatty (ZF)-Ratten [149, 150] herangezogen, die ein Modell der Adipositas-induzierten Insulinresistenz verkörpern [151]. Die ZF-Ratte entstand spontan bei der Kreuzung von Sherman- und Merck-Stamm-M-Ratten [149]. Der Defekt des Leptinrezeptors liegt in der extrazellulären Domäne und wird autosomal rezessiv vererbt [152, 153]. Homozygote (*fa/fa*) Tiere sind hyperphag, insulinresistent und extrem adipös.



Abbildung 3.20.: Zucker-Fatty (ZF)-Ratten am Versuchsende (12 Wochen alt).

So wurden 14 8-9 Wochen alte Tiere dieses Stamms für 21 Tage oral mit entweder 50 mg je kg Körpergewicht (KG) Irbesartan oder Vehikel (gleiche Lösung ohne Irbesartan) behandelt (siehe 2.2.5.) und deren Adiponektin- und Insulinspiegel sowie zusätzliche metabolische Parameter vor und nach der Behandlung bestimmt (siehe 2.2.5.).

Alle ermittelten Werte der Tiere vor (Tag 0) und nach der Behandlung (Tag 21) sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt und werden in den folgenden Punkten besprochen.

Tabelle 3.1. A: Durchschnittswerte  $\pm$  SEMs der Tiere vor der Behandlung (Tag 0).

|                                     | <u>Prä-Behandlung</u> |                             |                               |                                  |                           |                               |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
|                                     | Körpergewicht<br>(g)  | Nüchterninsulin<br>(ng/ ml) | Nüchtern glukose<br>(mmol/ l) | HOMA-Index<br>(mmol/ l x ng/ ml) | Triglyceride<br>(mmol/ l) | Adiponektin<br>( $\mu$ g/ ml) |
| Kontrollgruppe (n=7)<br>$\pm$ SEM   | 344,6 $\pm$ 10,4      | 13,9 $\pm$ 2,6              | 5,9 $\pm$ 0,3                 | 3,59 $\pm$ 0,8                   | 2,2 $\pm$ 0,3             | 6,56 $\pm$ 0,54               |
| Irbesartangruppe (n=7)<br>$\pm$ SEM | 348,9 $\pm$ 4,2       | 13,7 $\pm$ 1,2              | 6,1 $\pm$ 0,3                 | 3,62 $\pm$ 0,33                  | 2,2 $\pm$ 0,1             | 5,85 $\pm$ 0,54               |

Tabelle 3.1. B: Durchschnittswerte  $\pm$  SEMs der Tiere nach der Behandlung (Tag 21).

|   | Postbehandlung    |                          |                            |                               |                        |                            |
|---|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------------|
|   | Körpergewicht (g) | Nüchterninsulin (ng/ ml) | Nüchtern glukose (mmol/ l) | HOMA-Index (mmol/ l x ng/ ml) | Triglyceride (mmol/ l) | Adiponektin ( $\mu$ g/ ml) |
| Kontrollgruppe (n=7)<br>$\pm$ SEM; * = p < 0,05   | 447 $\pm$ 10,4*   | 12,8 $\pm$ 2,5           | 6,6 $\pm$ 0,3              | 3,89 $\pm$ 0,9                | 4,6 $\pm$ 0,6*         | 5,26 $\pm$ 0,47*           |
| Irbesartangruppe (n=7)<br>$\pm$ SEM; * = p < 0,05 | 427,6 $\pm$ 6,3*  | 8,8 $\pm$ 0,8*           | 6,1 $\pm$ 0,2              | 2,4 $\pm$ 0,2*                | 3,3 $\pm$ 0,1          | 5,79 $\pm$ 0,7             |

\* Statistische Signifikanz gegenüber der gleichen Gruppe am Tag 0 (p < 0,05).

Irbesartan hat keinen Einfluss auf das Körpergewicht von *fa/ fa* ZF- Ratten. Die Grafik in der Abbildung 3.21. stellt die aus den Körpergewichten der Ratten in den jeweiligen Behandlungsgruppen resultierenden Mittelwerte (n=7) dar.

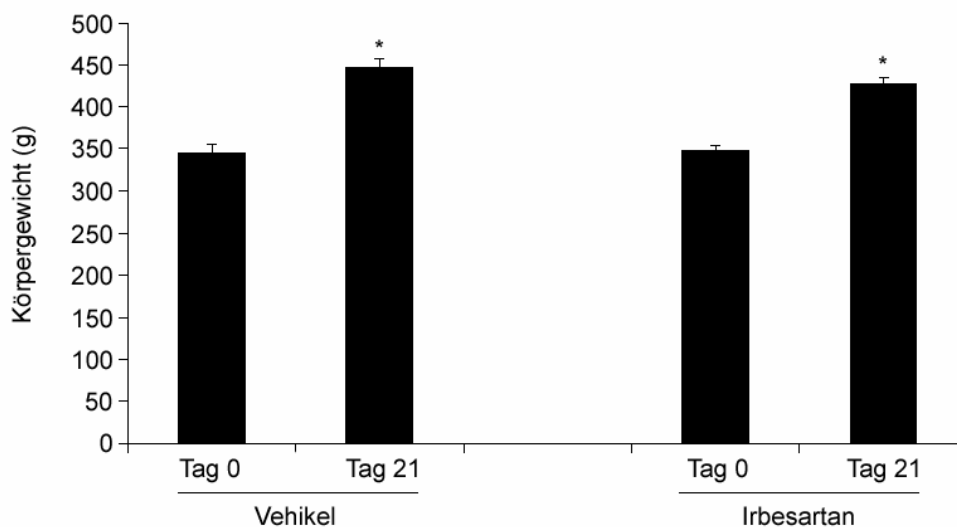


Abbildung 3.21.: Körpergewichte von *fa/ fa* ZF-Ratten während der Irbesartanbehandlung.

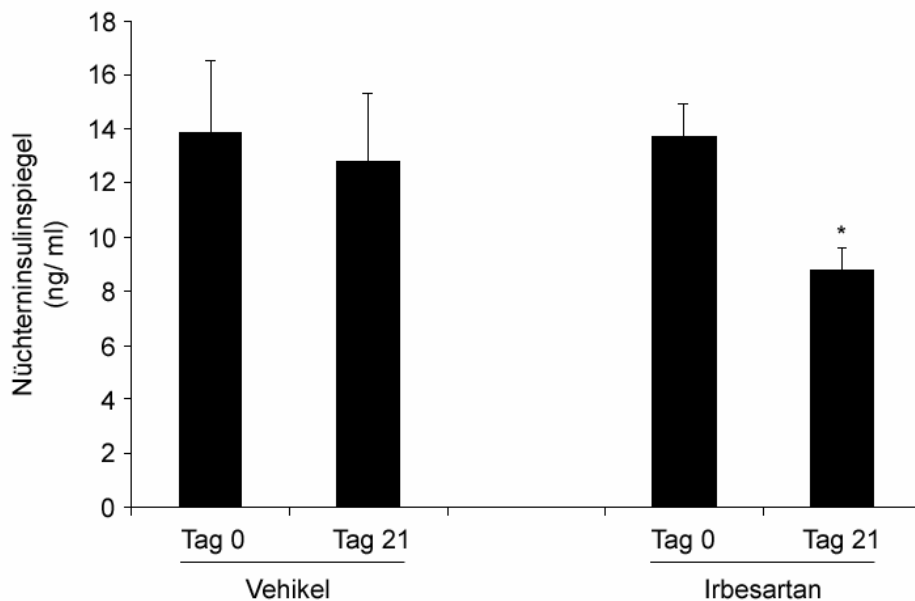
Das Diagramm zeigt das Körpergewicht in g von *fa/ fa* ZF-Ratten vor (Tag 0) und nach der Behandlung (Tag 21) mit Vehikel (Balken 1 und 2) sowie mit 50 mg/ kg KG Irbesartan (Balken 3 und 4). Statistische Signifikanz erreichten jeweils die Werte nach der Behandlung im Verhältnis zu den Gewichten davor (p<0,05).

Während des Behandlungszeitraums nahm das Körpergewicht statistisch signifikant im Verhältnis zum Tag 0 zu ( $p < 0,05$ , Tabelle 3.1., Abbildung 3.21.). Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden, was einen Einfluss des Irbesartans auf das Körpergewicht ausschließt.

**Irbesartan senkt den Blutdruck in *fa/fa* ZF-Ratten.** Um feststellen zu können, ob Irbesartan in den verwendeten Konzentrationen den Blutdruck auch effektiv zu senken vermag, wurde nach der Behandlung (Tag 21) der arterielle Blutdruck mittels invasiver Messung in der abdominalen Aorta bestimmt (siehe 2.2.5., Tabelle 3.1.).

Die Messung zeigte, dass die vehikelbehandelten Tiere einen mittleren arteriellen Blutdruck von  $87 \pm 2,5$  mmHg und die Irbesartan-behandelten Tiere einen mittleren arteriellen Blutdruck von  $70 \pm 2$  mmHg aufwiesen und Irbesartan damit den arteriellen Blutdruck statistisch signifikant senken konnte ( $p < 0,05$ ).

**Irbesartan senkt den Nüchterninsulinspiegel in *fa/fa* ZF-Ratten.** Eines der wichtigsten in diesem Tierversuch ermittelten Parameter war der Nüchterninsulinspiegel (Tabelle 3.1.). Die Grafik in der Abbildung 3.22. stellt die aus den ermittelten Insulinwerten der Ratten in den jeweiligen Behandlungsgruppen resultierenden Mittelwerte ( $n=7$ ) dar.



**Abbildung 3.22.:** Nüchterninsulinspiegel von *fa/ fa* ZF-Ratten während einer Irbesartan-behandlung.

Das Diagramm zeigt die Nüchterninsulinspiegel in ng/ ml von *fa/ fa* ZF-Ratten vor (Tag 0) und nach der Behandlung (Tag 21) mit Vehikel (Balken 1 und 2) sowie mit 50 mg/ kg KG Irbesartan (Balken 3 und 4). Statistische Signifikanz erreichte der Wert nach der Behandlung mit Irbesartan im Verhältnis zu dem Nüchterninsulinspiegel davor ( $p < 0,05$ ).

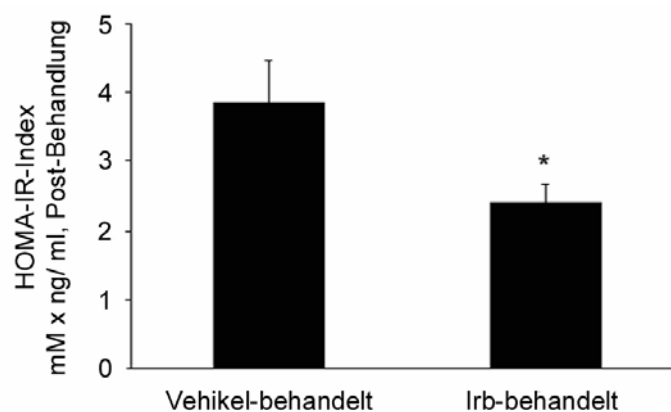
Die Abbildung 3.22. macht deutlich, dass die Nüchterninsulinspiegel der Ratten nach der 3-wöchigen Behandlung mit Irbesartan signifikant geringer waren als davor ( $13,7 \pm 1,2$  ng/ ml vs.  $8,8 \pm 0,8$  ng/ ml), während man in der Vehikelgruppe keinen signifikanten Unterschied nach der Behandlung feststellen konnte ( $13,9 \pm 2,6$  ng/ ml vs.  $12,8 \pm 2,5$  ng/ ml).

Die oben genannten Daten weisen darauf hin, dass Irbesartan die Insulinresistenz in diesem Tiermodell verbessern kann und machen eine genauere Ermittlung dieser erforderlich.



Irbesartan senkt den HOMA-IR in *fa/ fa* ZF Ratten. Die bereits festgestellte Senkung der Nüchterninsulinspiegel durch Irbesartanbehandlung machte eine Ermittlung der Insulinresistenz in diesen Tieren zwingend erforderlich. Dies geschah durch Berechnung des HOMA-IR-Indexes (Homeostasis Model Assessment Index for Insulin Resistance, [41]) für die einzelnen Tiere nach der Behandlung (Tag 21). Dazu wurde mit Hilfe der Nüchternglucose- und der Nüchterninsulinspiegel über ein mathematisches Modell die Insulinresistenz berechnet (siehe 2.2.5.).

Die Abbildung 3.23. stellt die aus den ermittelten HOMA-IR-Indizes der Ratten in den jeweiligen Behandlungsgruppen resultierenden Mittelwerte (n=7, in mmol/ l x ng/ ml) dar.



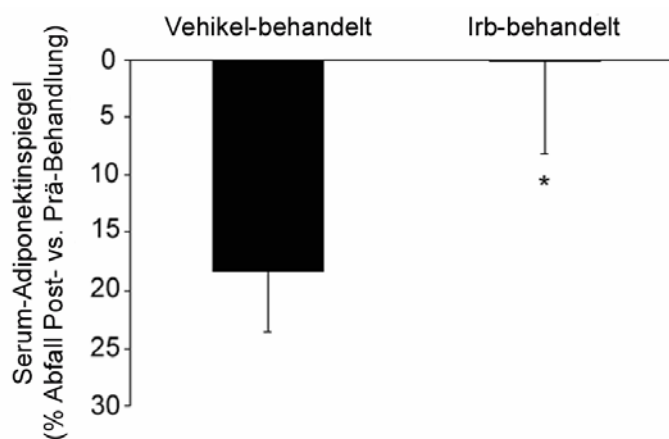
**Abbildung 3.23.:** HOMA-IR Indizes von *fa/ fa* ZF-Ratten während einer Irbesartanbehandlung.

Das Diagramm zeigt die HOMA-IR Indizes (mmol/l x ng/ml) von *fa/ fa* ZF-Ratten nach der Behandlung (Tag 21) mit Vehikel (Balken 1) sowie mit 50 mg/ kg KG Irbesartan (Balken 2). Statistische Signifikanz erreichte der Wert der mit Irbesartan-behandelten Gruppe im Verhältnis zu den Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ).

Die oben dargestellte Abbildung macht die statistisch signifikante Senkung des HOMA-IR Indexes der mit Irbesartan behandelten Tiere im Vergleich zu dem der Vehikel-Kontrolltiere deutlich ( $2.4 \pm 0.2$  vs.  $3.9 \pm 0.9$  mmol/ l x ng/ ml,  $p < 0.05$ ). Diese Berechnung bewies indirekt, dass eine Irbesartanbehandlung die Insulinresistenz in adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten signifikant verbessern kann.

**Irbesartan stabilisiert die Adiponektin-Plasmaspiegel in *fa/ fa* ZF Ratten.** Im Folgenden wurde die Adiponektinkonzentration aus dem Plasma, welches vor (Tag 0) und nach der Behandlung (Tag 21) aus den Tieren gewonnen wurde, mittels ELISA bestimmt (siehe 2.2.6.) und die erhaltenen Werte gruppenweise miteinander verglichen.

Die Grafik in der Abbildung 3.24. stellt die, aus den ermittelten Adiponektin-Plasmaspiegeln der Ratten in den jeweiligen Behandlungsgruppen resultierenden, Mittelwerte ( $n=7$ ) der während der Behandlungszeit auftretenden Senkung der Adiponektinkonzentrationen dar.



**Abbildung 3.24.:** Adiponektindepletion von *fa/ fa* ZF-Ratten während der Irbesartanbehandlung.

Das Diagramm zeigt die prozentuale Senkung der Adiponektinspiegel von *fa/ fa* ZF-Ratten während der 21-tägigen Behandlung mit Vehikel (Balken 1) sowie mit 50 mg/ kg KG Irbesartan (Balken 2). Statistische Signifikanz erreichte der Wert der mit Irbesartan behandelten Gruppe im Verhältnis zu den Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ).

Die Ermittlung der Adiponektin-Plasmaspiegel (Abbildung 3.24.) lieferte das interessante Ergebnis, das die im Verlauf des Wachstums und der Gewichtszunahme der adipösen *fa/fa* ZF-Ratten auftretende Senkung der Adiponektin-Plasmaspiegel durch eine Irbesartanbehandlung in statistisch signifikantem Ausmaß aufgehalten werden kann. So fielen die Adiponektinkonzentrationen in den vehikelbehandelten Tieren während der 3-wöchigen Behandlungszeit um fast 20 % (Tag 0: 6,6 µg/ ml, Tag 21: 5,3 µg/ ml), während die Plasmaspiegel in der Irbesartangruppe annähernd konstant blieben (Tag 0: 5,9 µg/ ml, Tag 21: 5,8 µg/ ml).

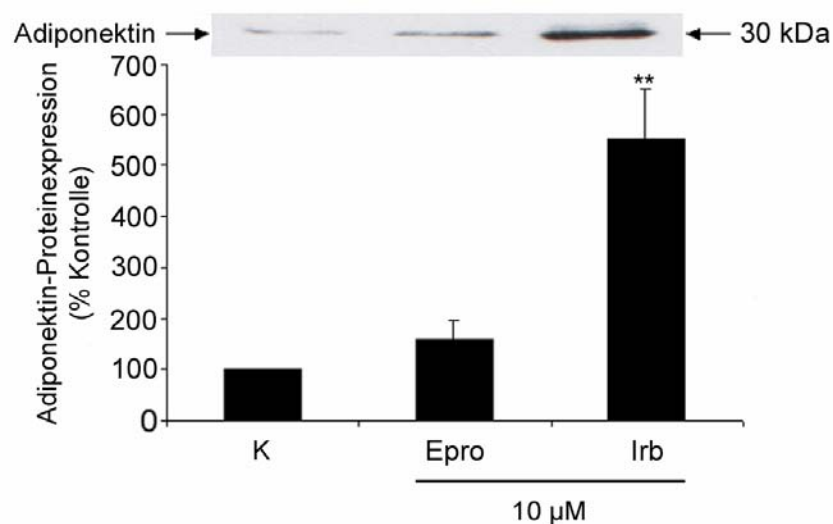
Außerdem erhöhten sich die Triglyzeridkonzentrationen in der Vehikelgruppe während des Behandlungszeitraums signifikant ( $2,1 \pm 0,2$ -fach,  $p < 0,05$ ), während die Irbesartanbehandlung dies deutlich abmildern konnte ( $1,5 \pm 0,1$ -fach). Die Nüchtern-Glucosespiegel änderten sich während des Versuchs allerdings nicht (Tabelle 3.1.).

Die in diesem Tiermodell unter Irbesartanbehandlung aufgetretene Verbesserung der metabolischen Parameter der Insulinsensitivität, die mit einer deutlichen Abschwächung einer Adiponektindepletion gekoppelt waren, liefert damit den *in-vivo* Beweis für die bisher beschriebenen *in-vitro* Ergebnisse.

***Ex-vivo* Behandlung von Fettgewebe aus ZF-Ratten mit Irbesartan induziert die Adiponektin-Proteinexpression.** Im vorher beschriebenen Tierversuch konnte der positive Einfluss des AT1-Antagonisten Irbesartan auf die metabolischen Parameter der Insulinsensitivität sowie auf die Adiponektin-Plasmaspiegel gezeigt werden. Ob Irbesartan in diesem Tiermodell allerdings direkt auf das zirkulierende Adiponektin im Plasma einwirkte oder, ähnlich wie in den Experimenten in 3T3-L1 Adipozyten, seine Wirkung am Entstehungsort des Adiponektins, also am Fettgewebe entfaltete, konnte mit den bisherigen Versuchen jedoch noch nicht geklärt werden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde aus nicht behandelten, adipösen *fa/fa* ZF-Ratten Fettgewebe entnommen, gewaschen, klein geschnitten und sofort in einem speziellen, serumarmen Medium für 24 h inkubiert, welches entweder Vehikel, 10  $\mu$ M Eprosartan oder 10  $\mu$ M Irbesartan enthielt (siehe 2.2.5.). Nach der Proteinisolation aus den einzelnen Fettgewebstückchen wurde wiederum mittels Western-Blot die Adiponektin-Proteinexpression ermittelt.

Die Abbildung 3.25. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



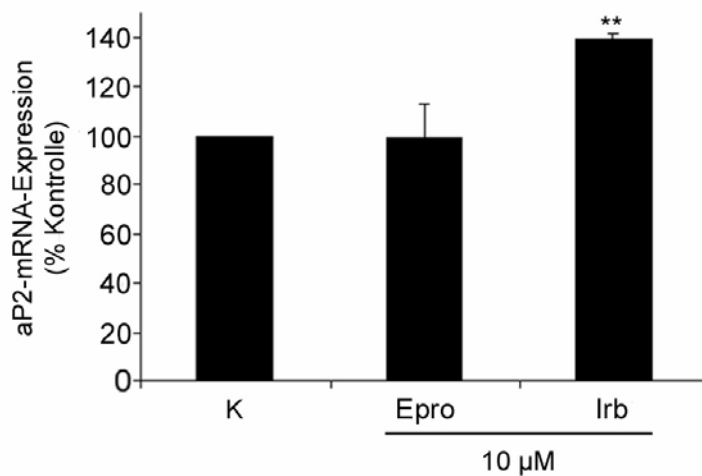
**Abbildung 3.25.:** Adiponektin-Proteinexpression in epididymalem Fettgewebe aus *fa/fa* ZF-Ratten nach *ex-vivo* Epro- bzw. Irbesartan-Behandlung.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression nach Fettgewebsentnahme und Behandlung mit 10  $\mu$ M Eprosartan (Epro) bzw. Irbesartan (Irb) für 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den mit Vehikel behandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte die mit Irbesartan behandelte Probe im Verhältnis zu der mit Vehikel behandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Die Abbildung 3.25. zeigt die *ex-vivo* Behandlung von epididymalem Fettgewebe aus adipösen *fa/fa* ZF-Ratten mit 10  $\mu$ M Epro- und Irbesartan. Wie eindeutig zu erkennen ist, war der AT1-Antagonist und partielle PPAR $\gamma$ -Agonist Irbesartan auch in diesem Experiment fähig, die Adiponektin-Proteinexpression statistisch hochsignifikant zu steigern. Der nicht PPAR-aktivierende AT1-Antagonist Eprosartan war hingegen nicht in der Lage, die Adiponektinkonzentration signifikant zu erhöhen.

***Ex vivo*-Behandlung von Fettgewebe aus ZF-Ratten mit Irbesartan induziert die aP2-Expression.** Es konnte bereits gezeigt werden, dass der PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonist Irbesartan auch direkt im Fettgewebe der ZF-Ratten die Adiponektin-Proteinexpression zu induzieren vermag, während der nicht-PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonist Eprosartan dazu nicht in der Lage war. Um zu verifizieren, dass dieser, direkt im *ex-vivo*-behandelten Fettgewebe auftretende, Effekt der AT1-Antagonisten ebenso wie in den *in-vitro* Experimenten PPAR $\gamma$ -vermittelt ist, wurde im entnommenen Fettgewebe der ZF-Ratten auch die Expression des typischen PPAR $\gamma$ -Zielgens Adipose-Protein 2 (aP2), analysiert.

Dazu wurden aus den mit Epro- bzw. Irbesartan behandelten Fettgewebestückchen die mRNA isoliert und nach RNA-Qualitätskontrolle, -Konzentrationsbestimmung und Umschreibung in cDNA die aP2-mRNA-Expression mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht (siehe 2.2.2.) und mit der vehikelbehandelten Kontrolle verglichen. Die Grafik in der Abbildung 3.26. stellt die daraus resultierenden Mittelwerte der Adiponektin-mRNA-Expression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.



**Abbildung 3.26.:** aP2-mRNA-Expression in epididymalem Fettgewebe aus *fa/fa* ZF-Ratten nach *ex-vivo* Epro- bzw. Irbesartan-Behandlung.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-mRNA-Expression nach Fettgewebsentnahme und Behandlung mit 10  $\mu$ M Eprosartan (Epro) bzw. Irbesartan (Irb) für 24 h. Die Einheit ist das prozentuale Verhältnis zu den mit Vehikel behandelten Zellen (Bande bzw. Balken K). Statistische Signifikanz erreichte die mit Irbesartan behandelte Probe im Verhältnis zu der mit Vehikel behandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Die Abbildung 3.26. zeigt, dass durch Irbesartanbehandlung auch die mRNA-Expression des PPAR $\gamma$ -Zielgens aP2 statistisch hochsignifikant induziert wird, während der nicht-PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten Eprosartan keinen Effekt zeigte. Dies lässt den Schluss zu, dass Irbesartan auch im Fettgewebe die Adiponektin-Proteinexpression durch Modulation des PPAR $\gamma$  deutlich zu steigern vermag.

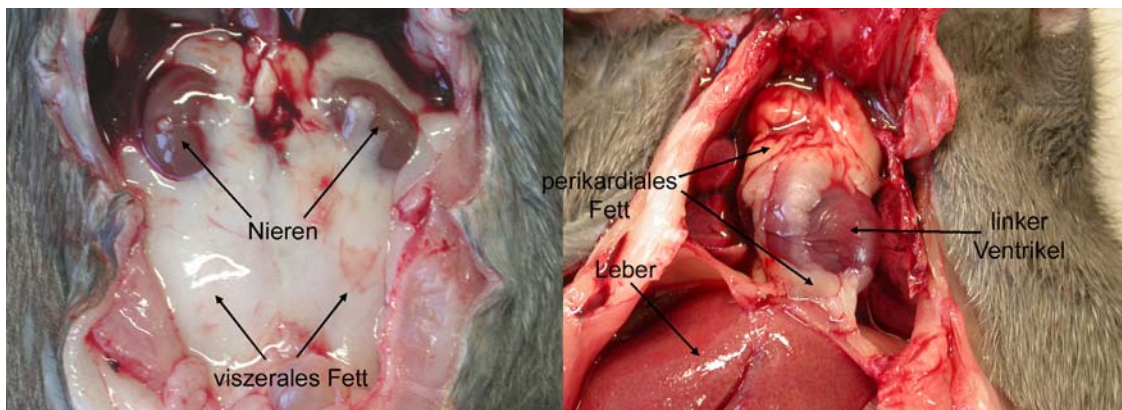
### 3.11. Gewebsspezifische Adiponektinverteilung in adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten

In den letzten Jahren wurde begonnen, die verschiedenen Fettdepots bezüglich der Pathogenese und Pathophysiologie der mit ihnen assoziierten Krankheiten differenziert zu betrachten. So konnte gezeigt werden, dass die Insulinaktivität in Patienten mit viszeraler Adipositas deutlich gesenkt ist [154] und dass sich diese in verschiedenen, insulinresistenten Rattenmodellen durch Entnahme von viszeralem Fett deutlich verbessern lässt [155]. Außerdem korreliert die Insulinresistenz mit der Fettdepotmasse am besten beim viszeralen Fett [156]. Dort sind auch verschiedene, mit der Insulinresistenz in Verbindung gebrachte Markergene, wie zum Beispiel das Resistin, im Gegensatz zum subkutanen Fett deutlich erhöht [155].

Da zur Expression von Adiponektin in den einzelnen Fettdepots sowie zu den eventuell daraus resultierenden, unterschiedlichen physiologischen Auswirkungen noch wenig bekannt ist, wurde im oben genannten Rattenmodell die Adiponektinexpression in verschiedenen Fettgeweben untersucht.

**Massive Akkumulation von perikardialem Fettgewebe in adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten.** Nach der Beendigung des unter 3.10. beschriebenen Tierversuchs und der nachfolgenden Obduktion der Tiere, wurde neben der erwarteten, deutlich erhöhten viszeralen Fettmasse auch eine massive Akkumulation von perikardialem Fett festgestellt (siehe Abbildung 3.27.).

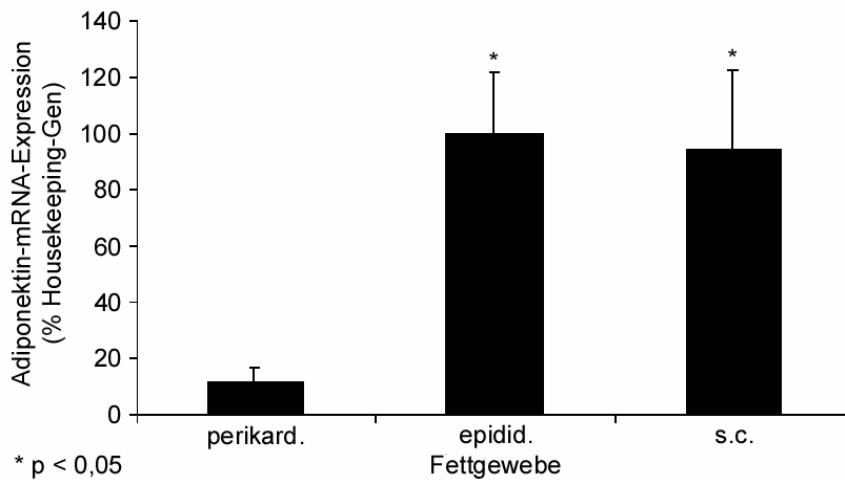
Deswegen wurde für diese Arbeit nicht nur der Vergleich zwischen der Adiponektin-Proteinexpression des viszeralen und der des subkutanen Fettgewebes, sondern auch mit der des perikardialen Fettgewebes interessant.



**Abbildung 3.27.:** Massive Akkumulation von epididymalem (links) und perikardialem (rechts) Fettgewebe aus adipösen *fa/fa* ZF-Ratten.

**Deutlich niedrigere Adiponektin-mRNA-Expression in perikardialem Fettgewebe.** Auf Grund der unter 3.11. beschriebenen, unterschiedlichen Bedeutung des viszeralen und subkutanen Fettgewebes hinsichtlich der Insulinresistenz wurden nach der Obduktion der adipösen *fa/fa* ZF-Ratten (Kontrollgruppe) Proben aus den verschiedenen Fettdepots entnommen. Nach der Entnahme des Fettgewebes wurde die RNA isoliert und nach Qualitätskontrolle, Konzentrationsbestimmung und der Umschreibung in cDNA die Adiponektin-mRNA-Expression mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt (siehe 2.2.2.). Die gleichen Schritte wurden auch mit Proben des perikardialen Fettgewebes vollzogen und dessen Expression mit der der anderen Fettgewebe verglichen. Die Grafik in der Abbildung 3.28. stellt die daraus resultierenden Mittelwerte der Adiponektin-mRNA-Expression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.





**Abbildung 3.28.:** Adiponektin-mRNA-Expression in perikardialem, epididymalem und subkutanem Fettgewebe von adipösen *fa/fa* ZF-Ratten.

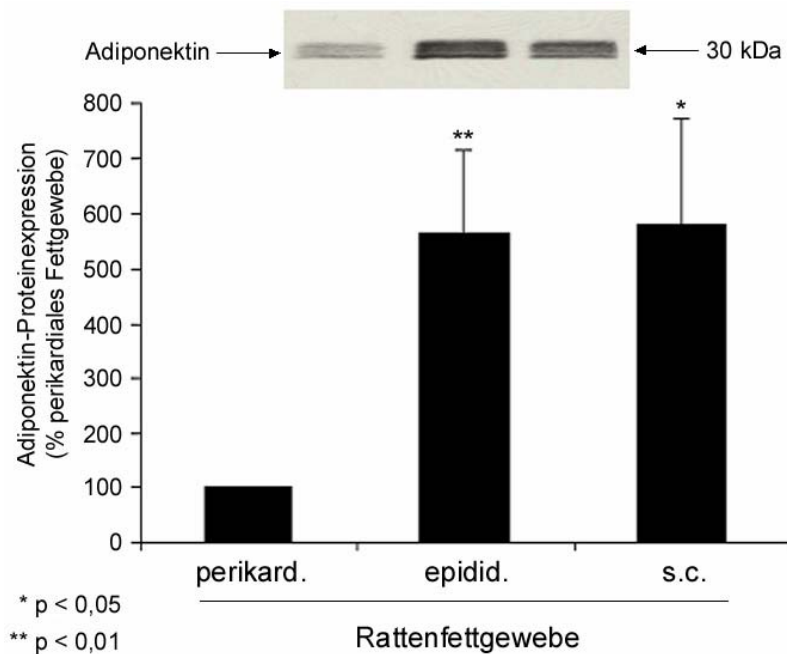
Das Diagramm zeigt die Adiponektin-mRNA-Expression in perikardialem, epididymalem und subkutanem Fettgewebe adipöser *fa/fa* ZF-Ratten im prozentualen Verhältnis zur mRNA-Expression des *Housekeeping*-Gens  $\beta$ -Actin. Statistische Signifikanz erreichte die geringere Adiponektin-mRNA-Expression im perikardialen Fettgewebe im Vergleich zu der in den anderen beiden Fettdepots ( $p < 0,01$ ).

In Abbildung 3.28. fällt vor Allem die deutlich geringere Adiponektin-mRNA-Expression im perikardialen Fettgewebe im Vergleich zu den beiden anderen Fettdepots auf. Unterschiede zwischen der Expression im epididymalen und der im subkutanen Fettgewebe konnten nicht festgestellt werden.

#### **Deutlich niedrigere Adiponektin-Proteinexpression in perikardialem Fettgewebe.**

In dem vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Adiponektin-mRNA-Expression im perikardialen Fettgewebe im Vergleich zu den anderen Fettdepots deutlich geringer ist. Ob sich diese Aussage auch auf die Proteinexpression erweitern lässt, sollte der nachfolgende Versuch klären.

Dafür wurden aus Proben der gleichen Fettgewebe wie für die gerade beschriebene mRNA-Expressionsanalyse Proteine isoliert, deren Konzentration bestimmt und die Adiponektin-Proteinexpression mittels Western-Blot bestimmt (siehe 2.2.3.). Die Abbildung 3.29. zeigt einen repräsentativen Western-Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Adiponektin-Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.29.:** Adiponektin-Proteinexpression in perikardialen, epididymalem und subkutanem Fettgewebe von adipösen *fa/fa* ZF-Ratten.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression in perikardialen, epididymalem und subkutanem Fettgewebe adipöser *fa/fa* ZF-Ratten im prozentualen Verhältnis zur Proteinexpression des perikardialen Fettgewebes. Über den Balken ist der entsprechende, repräsentative Western-Blot zu sehen. Statistische Signifikanz erreichte die geringere Adiponektin-Proteinexpression im perikardialen Fettgewebe im Vergleich zu der im epididymalen ( $p < 0,01$ ) und der im subkutanen Fettgewebe ( $p < 0,05$ ).

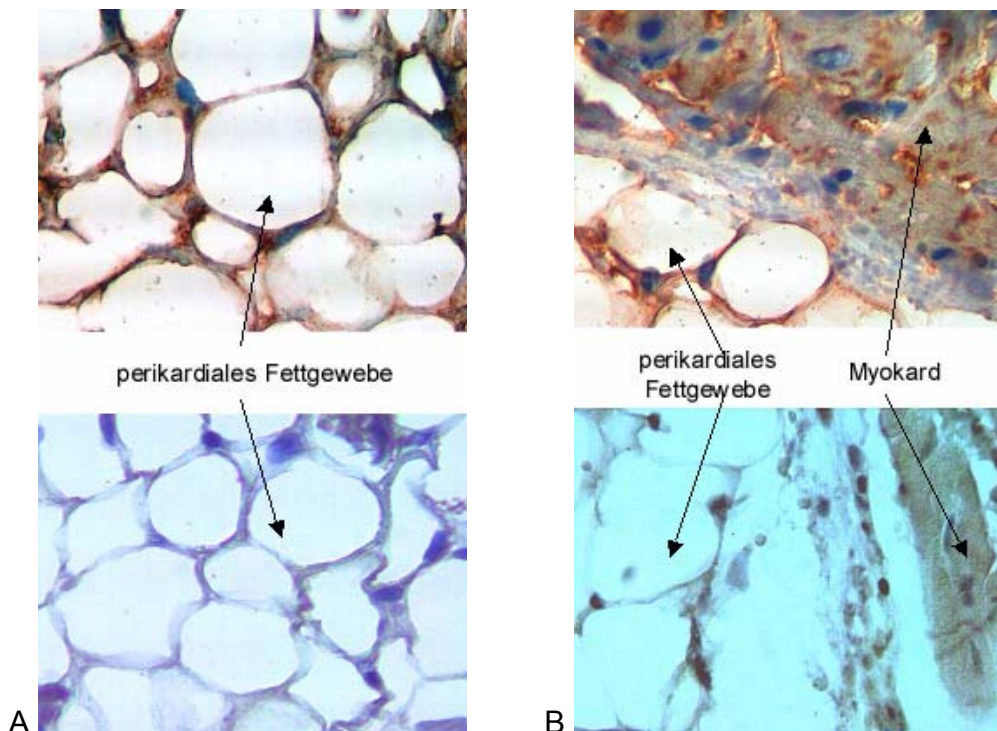
Die im obigen Bild dargestellte Analyse der Adiponektin-Proteinexpression in den ausgewählten 3 Fett-Depots bestätigt die bereits gewonnene Erkenntnis, dass das Adiponektin im perikardialen Fettgewebe im Gegensatz zu dem im epididymalen und subkutanen Fettdepot in deutlich geringerem Maße vorhanden ist. Bei der Adiponektin-Proteinexpression im epididymalen und subkutanen Fettdepot war kein Unterschied erkennbar.

Die in adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten erniedrigte Adiponektinexpression im perikardialen Fettgewebe wirft jedoch die Frage nach der Rolle des Adiponektins in der Herzphysiologie bzw. -pathophysiologie bei diesem Tiermodell auf.

**Adiponektin auch im Myokard der adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten vorhanden.** Um herauszufinden, ob Adiponektin auch in das Myokard der adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten gelangt und eine geringere Expression des Hormons im, das Myokard-umgebenden, perikardialen Fettgewebe dementsprechend negative Auswirkungen auf die Herzfunktion haben könnte, musste zunächst das Vorhandensein des Adiponektins im Myokard nachgewiesen werden.

Dazu wurden dünne Gewebeschnitte aus dem Myokard der Ratten incl. des umgebenden perikardialen Fettgewebes angefertigt (siehe 2.2.8.), diese mit spezifischen Adiponektinantikörpern inkubiert und eine nachfolgende immunohistochemische Färbung des Gewebeschnittes durchgeführt (siehe 2.2.8.).

In Abbildung 3.30. sind die Ergebnisse dieser Färbung zu sehen. Sie zeigt die Adiponektinexpression im perikardialen Fettgewebe (A) und im Myokard (B) der adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten im Vergleich zu der jeweiligen Negativkontrolle (siehe 2.2.8.).



**Abbildung 3.30.:** Durch immunohistochemische Färbung dargestellte Adiponektinexpression in perikardialem Fettgewebe und im Myokard von adipösen *fa/fa* ZF-Ratten.

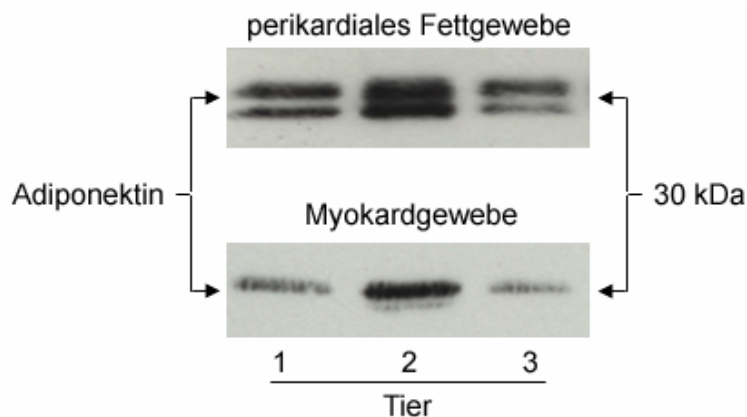
Die Fotos zeigen die Adiponektinexpression in perikardialem Fettgewebe (**A**) und Myokard (**B**) von adipösen *fa/fa* ZF-Ratten bei 40-facher Vergrößerung (obere Fotos). Die unteren Fotos von A und B zeigen jeweils die entsprechenden Negativkontrollen (siehe 2.2.8.).

In dem hier vorgestellten Versuch konnte nachgewiesen werden, dass Adiponektin auch im Myokard adipöser *fa/fa* ZF-Ratten vorhanden ist, was die rote Färbung des Gewebeschnittes im Gegensatz zur Kontrolle belegt (Abbildung 3.30. B). Zusätzlich konnte das Vorhandensein von Adiponektin im perikardialen Fettgewebe bestätigt werden (Abbildung 3.30. A).

Das Vorhandensein des Adiponektins im Myokard stärkt die Vermutung nach spezifischen Funktionen des Hormons in diesem Gewebe sowie nach einer pathophysiologischen Bedeutung einer geringeren Adiponektinexpression im perikardialen Fettgewebe.

Die myokardiale Adiponektin-Proteinexpression korreliert mit der Adiponektin-Proteinexpression in perikardialem Fettgewebe. In den vorangegangenen Untersuchungen konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass die Adiponektinexpression im perikardialen Fettgewebe adipöser *fa/ fa* ZF-Ratten im Vergleich zu der in anderen Fettdepots deutlich verringert ist und das Adiponektin bei diesen Tieren auch im Myokard vorkommt. Da Adiponektin nur im Fettgewebe produziert wird, könnte dies darauf hinweisen, dass das myokardiale Adiponektin direkt aus dem umliegenden perikardialen Fettgewebe stammt.

Um diese naheliegende Vermutung zu bestätigen, wurden die Adiponektin-Proteinexpressionen im perikardialen Fettgewebe und im Myokard von jedem einzelnen Tier miteinander verglichen. Die Abbildung 3.31. zeigt die entsprechenden Adiponektinexpressionen in einem repräsentativen Western-Blot von 3 Tieren.



**Abbildung 3.31.:** Adiponektin-Proteinexpression im perikardialen Fettgewebe und im Myokard adipöser *fa/ fa* ZF-Ratten.

Das Diagramm zeigt die Adiponektin-Proteinexpression im perikardialen Fettgewebe und im Myokard adipöser *fa/ fa* ZF-Ratten wobei jedes im Western-Blot dargestellte Bandenpaar die entsprechende Konzentration im perikardialen Fettgewebe (oben) sowie im Myokard (unten) von einem Tier repräsentiert.

In Abbildung 3.31. kann man erkennen, dass die Adiponektin-Proteinkonzentration im perikardialen Fettgewebe adipöser *fa/fa* ZF-Ratten im Vergleich zu der im Myokard in enger Weise korreliert. Weist das perikardiale Fettgewebe eine hohe Adiponektinkonzentration auf, so ist dies auch im Myokard zu verzeichnen und umgekehrt. Die Korrelation stellt somit einen indirekten Beweis für das perikardiale Fettgewebe als Ursprung für myokardiales Adiponektin adipöser *fa/fa* ZF-Ratten dar.

Die unter 3.11. vorgestellten Versuchsreihen weisen dem perikardialen Fettgewebe im Hinblick auf die Adiponektinexpression eine besondere Bedeutung bei. Die im Vergleich zu anderen Fettdepots beobachtete Adipositas-induzierte Depletion des Adiponektins im perikardialen Fettgewebe spiegelt sich auch in der Adiponektinkonzentration im Herzen wieder und könnte dort auch von physiologischer bzw. pathophysiologischer Bedeutung sein.