

Aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Regulation des Peroxisom-Proliferator-
aktivierten Rezeptors alpha durch
Angiotensin II Rezeptorantagonisten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nikolaj Simon Willy Frost

aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Kintscher
2. Prof. Dr. K. G. Parhofer
3. Priv.-Doz. Dr. Ph. Stawowy

Datum der Promotion: 4. Juli 2008

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Metabolisches Syndrom und Adipositas	1
1.1.1 Das Metabolische Syndrom.....	1
1.1.2 Adipositas	6
1.2 Bedeutung der Leber	10
1.2.1 Intermediärstoffwechsel und Syntheseleistungen	10
1.2.2 Fettsäurekatabolismus	11
1.2.3 Die Nichtalkoholische Fettleber.....	13
1.2.4 Insulinresistenz und hepatische Lipidspeicherung	15
1.3 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren.....	17
1.3.1 Struktur und Subtypen	18
1.3.2 Wirkmechanismus	19
1.3.3 Expressionsmuster und Funktion.....	20
1.3.4 PPARs und der Intermediärstoffwechsel der Leber	25
1.3.5 Posttranslationale Regulation von PPAR α und γ	26
1.3.6 PPAR α -Liganden	27
1.4 AT₁-Antagonisten	30
2 HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG.....	33
3 MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1 Material	34
3.1.1 Chemikalien und Substanzen.....	34
3.1.2 Kits.....	35
3.1.3 Nukleinsäuren und Nukleotide	35
3.1.4 Primer.....	35
3.1.5 Molekulargewichtsmarker	37
3.1.6 Enzyme	38
3.1.7 Antikörper.....	38
3.1.8 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	38
3.1.9 Zelllinien und Versuchstiere	39
3.1.10 Ausgewählte Zusatzmaterialien	39
3.1.11 Puffer und Lösungen.....	40
3.1.12 Material und Geräte.....	40
3.2 Methoden	41
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	41
3.2.1.1 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.2.1.2 Real-Time PCR.....	42
3.2.1.3 RT-Reaktion zur cDNA-Synthese	44
3.2.1.4 Kultivierung von Bakterien	44
3.2.1.5 Isolation von Plasmid-DNA	45

3.2.1.6	Isolation von mRNA	45
3.2.1.7	Kontrolle der mRNA-Qualität	46
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	46
3.2.2.1	Proteinisolation.....	46
3.2.2.2	Immunpräzipitation	46
3.2.2.3	Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen	47
3.2.2.4	Western Blotting.....	47
3.2.3	Zellkulturtechniken und Transfektionen	48
3.2.3.1	Kultivierung der Zelllinien	48
3.2.3.2	Transiente Transfektion von adhärennten Zellkulturen.....	49
3.2.3.3	Bestimmung der Luziferaseaktivität und β -Gal-Aktivität in Reporterassays.....	49
3.2.4	Versuchstiere.....	49
3.2.5	Statistische Berechnungen	50
4	ERGEBNISSE.....	51
4.1	Einfluss der AT₁-Blocker auf die PPARα-Ligandenbindungsdomäne.....	51
4.2	Einfluss des AT₁-Blockers Telmisartan auf die PPARα-Zielgenexpression in vitro	53
4.2.1	PPAR α -Zielgenexpression in HepG2-Zellen.....	54
4.2.2	PPAR α -Zielgenexpression in AML12-Zellen.....	57
4.3	Einfluss des AT₁-Blockers Telmisartan auf die PPARα-Zielgenexpression in vivo	58
4.3.1	Zielgenexpression in Lebern von C57BL/J6 Mäusen	59
4.3.2	Zielgenexpression im M. soleus von C57BL/6J-Mäusen.	62
4.3.3	Stimulation der Acsl1-Proteinexpression in vivo durch Telmisartan.....	63
4.4	Die Bedeutung des AT₁-Rezeptors bezüglich der PPARα-Zielgenexpression in HepG2-Zellen..	63
4.5	Die Regulation von PPARα durch Liganden	65
4.5.1	Regulation der Proteinexpression von PPAR α durch Telmisartan.....	65
4.5.2	Stabilisierung des PPAR α -Proteins durch den Liganden in HepG2-Zellen	66
4.5.3	Stimulation der mRNA-Expression von PPAR α durch Telmisartan	67
4.5.3.1	Regulation der PPAR α -mRNA in HepG2-Zellen	67
4.5.3.2	Regulation der PPAR α -mRNA in Lebern von C57BL/6J Mäusen	69
4.6	Der Einfluss von PPARγ in Lebern von C57BL/6J-Mäusen	70
4.7	Leberfunktionsparameter in einem ernährungsbedingten Übergewichtsmodell der Maus (C57BL/6J).....	72
5	DISKUSSION	77
5.1	Die Auswahl der Zellmodelle.....	77
5.2	AT₁-Antagonisten und die PPARα-LBD.....	78
5.3	Telmisartan und PPARα-Zielgene	79
5.4	Die Rolle der Angiotensinrezeptoren für die PPARα-Aktivierung durch AT₁-Antagonisten ...	83
5.5	Telmisartan und PPARα.....	84
5.6	Telmisartan und PPARγ in der Leber.....	86
5.7	Bestimmung von Leberfunktionsparametern.....	87

5.8	Ausblick	88
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	ABSTRACT.....	91
8	LITERATURVERZEICHNIS	92
9	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	106
9.1	Abbildungen	106
9.2	Tabellen.....	107
10	CURRICULUM VITAE.....	108
11	DANKSAGUNG	112
12	ERKLÄRUNG	113

Abkürzungsverzeichnis

18s	18s-Untereinheit mitochondrialer mRNA
ACE	Angiotensinkonversionsenzym
ACOX	Acyl-CoA Oxidase
ACD	Acyl-CoA Dehydrogenase
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
AF-1/-2	Aktivierungsfunktion 1, bzw. 2
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ARB	Angiotensin II Rezeptorblocker
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AT ₁ R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT ₂ R	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
ATP III	<i>Adult Treatment Panel 3</i> (Programm zur Behandlung der Hypercholesterinämie des <i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>)
BMI	<i>Body Mass Index</i>
CACT	Carnithin-Acylcarnithin-Translokase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Bezeichnung für Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen)
CD 36	Glykoprotein IV (Adipozytenmarker)
CoA	Coenzym A
CPT	Carnithin-Palmitoyl-Transferase
CYP	Cytochrom P 450
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNL	De-novo Lipogenese
DR	<i>Direct Repeat</i>
dRQ	de-Ritis-Quotient (ASAT/ALAT-Verhältnis)
EC ₅₀	Konzentration eines Agonisten, die 50 % der maximalen Aktivierung erzeugt

Gal4-System	Transaktivierungssystem basierend auf dem Hefe Gal4-Transkriptionsfaktor
GAPDH	Gyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
HbA _{1c}	Glykosilierte Unterfraktion des Hämoglobin A ₁
HDL	<i>High-Density-Lipoprotein</i>
HFD	Hochfettdiät (60 % der Energie aus Fett)
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	<i>Knock-Out</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
L-PBE	L-Peroxisomales Bifunktionelles Enzym
LTB ₄	Leukotrien B ₄
M	Molar
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydroeen
NAFL	Nicht-alkoholische Fettleber
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
ND	Normaldiät (10 % der Energie aus Fett)
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	<i>PPAR Response Element</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RXR	9-cis Retinsäurerezeptor
SCP	<i>Sterol Carrier Protein</i>

SREBP	<i>Sterol Response Element Binding Protein</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TZD	Thiazolidindion
UCP	<i>Uncoupling Protein</i>
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
VLACD	<i>Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

1 Einleitung

1.1 Metabolisches Syndrom und Adipositas

1.1.1 Das Metabolische Syndrom

1923 wurde durch den Schweden Kylin die Trias aus Hypertonie, Hyperurikämie und Hyperglykämie beschrieben und damit erstmals die Existenz eines Syndroms aus heterogenen Stoffwechselkrankheiten und Hypertonie postuliert [1]. Beschreibungen gehen jedoch bereits bis ins 17. Jahrhundert zurück. Der Franzose Camus fasste den Symptomkomplex aus Gicht, Diabetes und Hyperlipidämie 1966 als „trisyndrome métabolique“ zusammen [2]. Die erste Definition im modernen Sinn, wie sie in geänderter Form auch heute noch gültig ist, geht auf Hanefeld und Leonhardt 1981 zurück. Sie prägten auch den Begriff „Metabolisches Syndrom“ [3]. Reaven verwendete in der Banting Lecture 1988 den Begriff des „Syndrome X“, um mit der mathematischen Variablen „x“ dem weitgehenden Unwissen über die Bedeutung der Insulinresistenz Ausdruck zu verleihen [4]. Er sah diese als gemeinsame Ursache von Typ-2-Diabetes, Hypertonie, kardiovaskulären Veränderungen, nicht-alkoholischer Fettleber (NAFL), Schlafapnoesyndrom, sowie verschiedenen Karzinomen an. Die Adipositas wird allerdings nicht erwähnt. Diese erscheint erst wieder 1991 in Ferraninis Definition des „Insulinresistenzsyndroms“ [5].

Seitdem die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1988 das Metabolische Syndrom erstmals eingehend beschrieb, beruht deren heutige Definition auf folgenden Kriterien: Einer der vier Hauptfaktoren Diabetes, Nüchternhyperglykämie, herabgesetzte Glukosetoleranz oder Insulinresistenz müssen durch mindestens zwei der folgenden Nebenkriterien ergänzt werden: Hypertriglyzeridämie, Dyslipoproteinämie, zentrale Adipositas, Mikroalbuminurie und Hypertonie [6]. Die zentrale Stellung des Diabetes in der WHO-Definition ist häufig kritisiert worden, da es hierdurch unmöglich wird, die Diagnose für Patienten zu reservieren, deren Diabetes sich erst zukünftig manifestieren

wird und für die das metabolische Syndrom ein wichtiger Marker sein kann. Dem entgegen müssen bei der Definition des „National Cholesterol Education Program Expert Panel, Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllt werden: Abdominal betonte Adipositas, Hypertriglyzeridämie, Dyslipoproteinämie, Hypertonie und Nüchternhyperglykämie. Davon ausgehend hat das „American College of Endocrinology“ (ACE) 2003 eine eigene Definition, basierend auf der NCEP ATP III Definition, vorgestellt. In dieser kommt der Insulinresistenz und folglich der Hyperglykämie mehr Bedeutung zu [7]. Die „International Diabetes Federation“ (IDF) hat kürzlich ein globales System ethnienpezifischer Faktoren vorgeschlagen [8], in dem ein für die Volksgruppe spezifischer Bauchumfang mit in die Bewertung einfließt, da die Prävalenz des Metabolischen Syndroms bei Untersuchungen in den USA und Kanada stark von der ethnischen Abstammung abhängig war [9, 10].

Die „Deutsche Adipositas Gesellschaft“ hat für ihre Definition des Metabolischen Syndroms [11] die Richtlinien der „American Heart Association“ (AHA) und des „National Heart, Lung and Blood Institute“ (NHLBI) übernommen [12]:

erhöhter Taillenumfang	Männer \geq 102 cm Frauen \geq 88 cm
erhöhte Triglyzeride (nüchtern)	\geq 150 mg/dl (1,7 mmol/L) oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung erhöhter Triglyzeride
niedriges HDL-Cholesterin (nüchtern)	Männer $<$ 40 mg/dl (1,0 mmol/L) Frauen $<$ 50 mg/dl (1,3 mmol/L) oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung von niedrigem HDL-Cholesterin
Bluthochdruck	\geq 130 mm Hg systolischer Blutdruck oder \geq 85 mm Hg diastolischer Blutdruck oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung

erhöhte Nüchternblutglukose	bestehenden Bluthochdrucks ≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/L) oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung erhöhter Nüchternblutglukose
-----------------------------	---

In den Vereinigten Staaten ist das Metabolische Syndrom mit geschätzten 55 Millionen Betroffenen oder 27,4 % der über Zwanzigjährigen zu einem der dringlichsten Probleme im Gesundheitswesen geworden [13]. Schätzungen gehen davon aus, dass im Jahr 2025 weltweit etwa 300 Millionen Menschen einen Typ-2-Diabetes aufweisen werden, der eindeutig mit dem Metabolischen Syndrom korreliert ist [14]. Die Prävalenz nimmt altersabhängig bei Frauen und Männern zu [13]. Zusätzlich spielen Übergewicht und körperliche Inaktivität eine wichtige Rolle [15].

Folgen des Metabolischen Syndroms sind ein erhöhtes Risiko für chronische Niereninsuffizienz [16], Typ-2-Diabetes mellitus [10, 17] und gesteigerte Morbidität und Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen [18, 19]. Dabei nimmt das Risiko für chronische Niereninsuffizienz mit der Anzahl der Risikofaktoren zu [16]. Die „Botnia Studie“ unter annähernd 5.000 Diabetikern in Finnland und Schweden ergab nach einem Follow-up von 6,9 Jahren bei Vorliegen des Metabolischen Syndroms ein 81 % höheres Risiko an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben [18]. Daten von 6.255 Personen zwischen 30 und 74 Jahren aus dem „National Health and Nutrition Examination Survey II“ (NHANES II, vgl. 1.1.2) zeigten, dass das Metabolische Syndrom mit einem erhöhten Risiko einhergeht, an koronarer Herzkrankheit (KHK) oder einem anderen kardiovaskulären Ereignis wie Herzinfarkt oder Schlaganfall zu versterben. Gleichzeitig stieg die Gesamtmortalität der betroffenen Patienten [20]. Sattar et al. berichteten nach einer Analyse von 6.447 männlichen Probanden der „West of Scotland Coronary Prevention Study“ (WOSCOP) von einem 1,8-fach höheren Risiko bei bestehendem Metabolischen Syndrom an KHK zu erkranken. Das Risiko für die Neumanifestation eines Typ-2-Diabetes lag sogar 3,5-fach höher. Jeder zusätzliche Faktor des Syndroms erhöhte dabei das Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis auf bis zu 3,7-fach bei vier bis fünf Risikofaktoren [21].

Der wichtigste therapeutische Ansatz zu Beginn der Behandlung des Metabolischen Syndroms ist die Implementierung von Lebensstiländerungen. Vermehrte körperliche Aktivität und eine Veränderung des Essverhaltens mit nachfolgender Gewichtsverminderung reduzieren das Risiko des Fortschreitens einer gestörten Glukosetoleranz zum Diabetes um bis zu 58 % und vermindern zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Dyslipidämie und arterielle Hypertonie. Dies konnte beim „U.S. Diabetes Prevention Program“ [22] und der „Finnish Diabetes Prevention Study“ [23] gezeigt werden. Eine Sekundäranalyse des „U.S. Diabetes Prevention Program“ bestätigte diese Daten und ergab nach Lebensstiländerung ebenfalls ein geringeres Auftreten des Metabolischen Syndroms. Durch Sport und diätetische Maßnahmen verminderte sich das Risiko unter den Teilnehmern, die zu Beginn kein Metabolisches Syndrom aufwiesen, um 41 % im Vergleich zur Kontrollgruppe [24].

Alternativ steht die Pharmakotherapie zur Behandlung der Einzelkomponenten des Metabolischen Syndroms zur Verfügung. So konnten Blutdruckkontrolle und Verringerung des LDL-Cholesterins kardiovaskuläre Ereignisse bei 30 bis 74-jährigen US-Amerikanern um bis zu 81 % reduzieren [25]. Eine effiziente antihypertensive Therapie ist angesichts einer Prävalenz des Bluthochdrucks von über 50 % bei Patienten mit Metabolischem Syndrom außerordentlich wichtig [26]. Für diese Patienten wird aufgrund des hohen kardiovaskulären Risikos eine Behandlung mit ACE-Hemmern oder AT₁-Antagonisten (ARBs) gerade auch im Hinblick auf zusätzliche metabolische Effekte als Erstlinientherapie empfohlen (vgl. 1.4). Weiterhin kommt der kausalen Behandlung der Insulinresistenz mittels Durchbrechung der Glukolipotoxizität besondere Bedeutung zu. Diese kann auf zwei Arten erfolgen: Einerseits ist die direkte Behandlung der Dyslipidämie möglich, andererseits kann die Insulinsensitivität verbessert werden. Gerade die mit Hilfe der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktaseinhibitoren (Statine) erreichte Erniedrigung der LDL-Fraktion ist eindeutig von prognostischem Vorteil hinsichtlich der Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK). Doch trotz der steigenden Verwendung von Statinen treten gerade bei Typ-2-Diabetikern und Patienten mit Metabolischem Syndrom vermehrt koronare Ereignisse auf. Dies hat zur genaueren Untersuchung des beim Metabolischen Syndrom vorherrschenden „Lipidquartetts“ aus Hypertriglyzeridämie, niedrigem HDL, hohem LDL und einer Ansammlung an Cholesterin-reichen Remnants (z.B. Apolipoprotein B) geführt. Klinische Studien scheinen nahezu legen, dass speziell Patienten mit

Insulinresistenzsyndromen von Fibraten profitieren, die anders als die Statine auch die Triglyzeridspiegel senken, das HDL-Cholesterin steigern sowie das LDL-Cholesterin moderat senken [27-31]. Eine Vermehrung des HDL-Cholesterins ist auch mit Nikotinsäure/ Niacin über eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Apolipoprotein A-I möglich. Diese führt zu einem verstärkten retrograden Cholesterintransport. Gleichzeitig wird die VLDL-Synthese gehemmt. Der klinische Nutzen durch die Senkung der kardiovaskulär bedingten Mortalität konnte im 1966 begonnenen „Coronary Drug Project“ (CDP) erbracht werden [32]. Ein großer Nachteil von Niacin ist jedoch die Auslösung einer Flush-Symptomatik bei über 80 % der Patienten. Erst die Einführung von Retardpräparaten brachte hier eine Besserung. Diese scheinen jedoch wiederum hepatotoxisch zu sein, so dass Niacin insgesamt kein Medikament der ersten Wahl ist. Auch die drei Gallensäurederivate Cholestyramin, Cholestipol und Cholesevelam finden in der Therapie der Dyslipidämie Verwendung. Diese binden Gallensäuren im Darmlumen und unterbrechen damit deren enterohepatischen Kreislauf, so dass vermehrt Cholesterin zur Neusynthese von Gallensäuren verbraucht wird. Neuere Ansätze sind das Ezetimib, welches die Translokation von Cholesterin aus dem Darmlumen in die Enterozyten verhindert, sowie Inhibitoren des Cholesterinester-Transferproteins (CETP), wie JTT-705 und Torcetrapib, die signifikante Anstiege des HDL-Cholesterins bewirken können [33].

Die zweite wichtige Säule in der Behandlung des Metabolischen Syndroms ist die Therapie der Insulinresistenz. Das Mittel der Wahl ist hier das Biguanid Metformin. Im Rahmen des „U.S. Diabetes Prevention Program“ verminderte eine Behandlung hiermit ein Fortschreiten von verminderter Glukosetoleranz zu Diabetes, war aber mit 31 % weitaus weniger effektiv als eine Änderung des Lebensstils [22, 24]. Diese sollte selbstverständlich an erster Stelle stehen, um „Überernährung, Bewegungsmangel und soziokulturellen Faktoren“ entgegenzuwirken, welche schon Hanefeld und Leonhardt 1981 erwähnten. Realistischerweise muss für die Zukunft jedoch von einem sich weiter verstärkenden Wunsch nach einer „Polypille“ ausgegangen werden. Ein Schritt hierzu könnten so genannte bimodale Substanzen darstellen, die neben ihrer Hauptwirkung weitere pleiotrope Effekte aufweisen und somit der Behandlung des heterogenen Clusters „Metabolisches Syndrom“ eher gerecht werden.

Allerdings gibt es auch kritische Stimmen, welche die Existenz eines Metabolischen Syndroms in Frage stellen oder zumindest die zusammengefassten Einzelsymptome als schlecht definiert und missverständlich kritisieren. So veröffentlichten die europäische und die amerikanische Diabetesgesellschaft eine gemeinsame Stellungnahme, die nach einer Literaturrecherche zu dem Ergebnis kam, dass das Metabolische Syndrom unpräzise definiert sei. Demnach seien Zweifel an seiner prädiktiven Wertigkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen berechtigt. In der Veröffentlichung warnten die Autoren davor, den Begriff Metabolisches Syndrom als Krankheitsdefinition zu verwenden und den Eindruck aufkommen zu lassen, die Gesamtheit der Symptome sei mit einem höheren Risiko verbunden als die Einzelkomponenten [34].

Zusammenfassend werden die vier zum Metabolischen Syndrom vereinigten Symptome zentrale Adipositas, Hypertonie, Hypertriglyzeridämie und Dyslipidämie, sowie Hyperglykämie zu einer, wenn nicht sogar der großen Herausforderung der Medizin in der westlichen Welt werden. Wenngleich gezeigt wurde, dass eine alleinige Änderung der Lebensgewohnheiten weitaus effektiver ist als alle derzeitigen pharmakologischen Ansätze, muss wohl davon ausgegangen werden, dass letztere weiter zunehmen werden. Gerade hier können Substanzen mit pleiotropen Effekten von Vorteil sein.

1.1.2 Adipositas

Wie im vorangegangenen Abschnitt deutlich wurde, trägt die Adipositas maßgeblich zur Entstehung des Metabolischen Syndroms bei. Die Weltgesundheitsorganisation definiert die Adipositas über den „Body Mass Index“ BMI, den Quotienten aus Körpergewicht (in kg) und quadrierter Körpergröße (in m²) [35]. Nach WHO-Kriterien entspricht ein BMI zwischen 18,5 und 24,9 dem Normalgewicht, ab 25 kg/m² spricht man von Übergewicht. In Fünferschritten werden die einzelnen Schweregrade definiert: 25,0 bis 29,9: Präadipositas; 30,0 bis 34,9 Adipositas Grad I; 35,0 bis 39,9 Adipositas Grad II; ≥ 40,0 Adipositas Grad III. Die einzelnen Stufen sind jeweils mit einem steigenden Risiko für Folgeerkrankungen und -schäden vergesellschaftet.

Die zweite wichtige Komponente neben dem Ausmaß des Übergewichts ist das Fettverteilungsmuster. Hier wirkt sich gerade die abdominal betonte Adipositas ungünstig aus [36]. Mithilfe der Magnetresonanztomografie (MRT) lässt sich das Ausmaß der viszeralen Adipositas eindeutig bestimmen. In der klinischen Routine hat sich mittlerweile die sehr einfach durchzuführende Messung des Taillenumfangs etabliert. Pouliot und Kollegen untersuchten 1994 81 Männer und 70 Frauen hinsichtlich einer Übereinstimmung von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertriglyzeridämie, Dyslipoproteinämie und Hyperglykämie mit anthropometrischen Korrelaten. Dabei stellte sich heraus, dass das Ausmaß des Bauchfettdepots leicht mit Hilfe des Taillenumfangs oder des Sagittaldurchmessers des Bauches bestimmt werden kann. Beide korrelieren auch besser mit dem Bauchfett als der Quotient aus Taillen- und Hüftumfang, der so genannten „waist-to-hip Ratio“, bzw., pathophysiologisch mit Nüchtern- und postprandialen Insulinspiegeln und damit dem kardiovaskulären Risiko [37]. Lean et al. bestätigten 1995 die Korrelation von Taillenumfang und viszeraler Adipositas und schlugen Grenzmaße getrennt für Männer und Frauen vor: So sollten Männer mit einem Bauchumfang von ≥ 94 cm und Frauen von ≥ 80 cm nicht weiter an Gewicht zunehmen und Männer ab einem Bauchumfang von ≥ 102 cm, Frauen ab ≥ 88 cm ihr Gewicht reduzieren [38]. Es hat sich gezeigt, dass diese beiden Grenzwerte mit einem steilen Anstieg des kardiovaskulären Risikos assoziiert sind, bzw. mit einem BMI von ≥ 25 , bzw. 30 kg/m^2 korrelieren.

Die Zahl übergewichtiger Erwachsener wird aktuell auf 1,1 Milliarden, die der Adipösen auf 312 Millionen weltweit geschätzt [39]. Derzeit werden in den USA über 60 % der Bevölkerung als übergewichtig angesehen ($\text{BMI} \geq 25$). Nach unterschiedlichen Untersuchungen fallen 18-30 % mit einem BMI von ≥ 30 in die Kategorie fettleibig oder adipös [40-42]. Daten hierzu werden durch das „National Centre for Health Statistics“ (NCHS) mit statistischen Erhebungen, so genannten „National Health and Nutrition Examination Surveys“ (NHANES), seit 1960 ermittelt (vgl. Abbildung 1.1). Stieg die Anzahl der Übergewichtigen von NHANES I (1960-62) bis III (1988-94) nicht an, so ist bei den Adipösen eine deutliche Steigerung in den vergangenen 30 Jahren sichtbar. Waren es bei NHANES II (1976-80) nur 14,5 % der Population, so betrug dieser Wert bei NHANES III schon 22,5 %. Bis 2002 hatte sich der Anteil der Bevölkerung mit einem $\text{BMI} \geq 30$ mehr als verdoppelt.

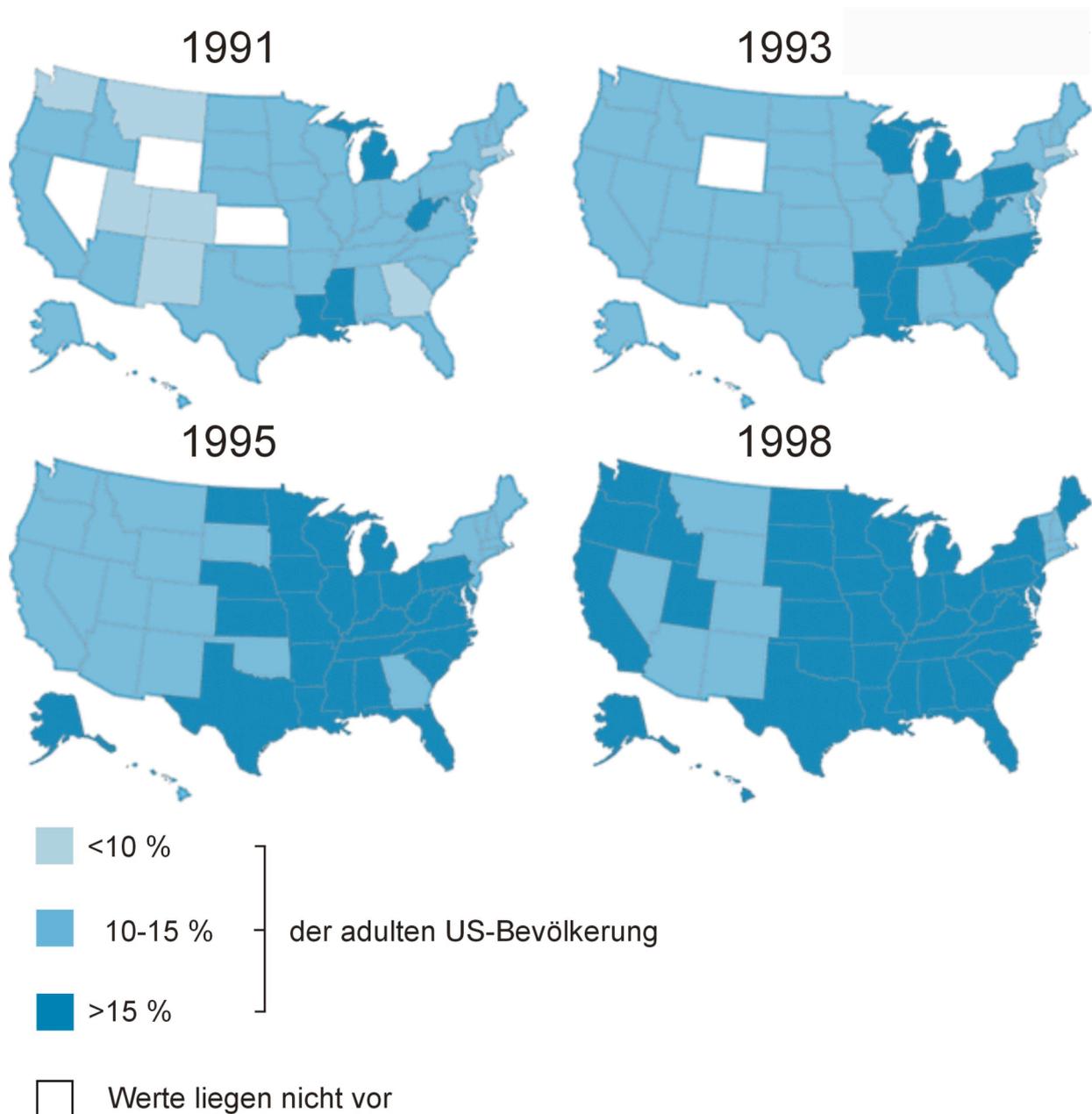


Abbildung 1.1: Entwicklung der Adipositas in den USA zwischen 1991 und 1998. Nach Daten von Mokdad et al. [42]

Auch in Deutschland nimmt die Prävalenz der Adipositas kontinuierlich zu. Zwischen 1985 und 1998 wurden hierzu Daten aus vier Bundesgesundheitsveys erhoben.

Weiterhin liegen die Werte des Telefonsurveys 2003 vor. Demnach stieg die Anzahl adipöser Männer zwischen 1985 und 2003 von 16,2 auf 22,5 %, die der Frauen von 16,2 auf 23,3 %. [43]. Interessant ist hier die weitgehende Übereinstimmung hinsichtlich der Geschlechtsprävalenz, gilt doch ansonsten über alle Altersgruppen verteilt und weltweit, dass Frauen aus biologischen Gründen eher zu Übergewicht neigen als Männer und einen höheren durchschnittlichen BMI aufweisen [44].

Aktuelle Zahlen belegen eine deutliche Beeinträchtigung der Lebenserwartung durch Übergewicht und Adipositas. Eine Auswertung der „Framingham Heart Study“ (1948-90) durch Peeters und Kollegen hinsichtlich einer Lebenszeitverkürzung durch Adipositas ergab für 40-jährige Männer eine Reduktion von 5,8 Jahren, für gleichaltrige Frauen sogar von 7,1 Jahren [45]. Zunehmend wurde deutlich, dass das Risiko für Komorbiditäten tatsächlich schon ab einem BMI von 21 kg/m² beginnt [44]. Das Risiko für Bluthochdruck liegt bei Adipositas bis zu 5-fach höher [46]. Davon betreffen 85 % der Fälle Personen mit einem BMI über 25 kg/m² [47]. Ab einem BMI von 21 kg/m² entwickelt sich fortschreitend eine Dyslipidämie, die einen Anstieg des LDL-Cholesterins zur Folge hat. Dies vermehrt das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wie Schlaganfall oder KHK. Die „Asia-Pacific Cohort Collaboration Study“ unter mehr als 300.000 Personen ergab für jeden zusätzlichen BMI-Punkt eine 9-prozentige Differenz für ischämische Herzereignisse und von 8 % für Schlaganfälle [44]. Eine weitere seit Jahren offensichtliche Verbindung besteht zwischen Übergewicht und Typ-2-Diabetes. So haben 90 % der neu manifestierten Typ-2-Diabetiker einen BMI über 23 kg/m² [48]. Gleichzeitig nimmt das Risiko mit dem Alter zu. In Japan weisen 50 % der 70-jährigen Frauen mit einem BMI von 28 kg/m² einen Typ-2-Diabetes auf [44]. Weitere Folgen von Übergewicht sind Schlafapnoe [49], Arthritis [50], Nichtalkoholische Fettleber (vgl. 1.2.3) und ein erhöhtes Risiko für Brust-, Dickdarm-, Nierenzell-, Speisehals- und Gebärmutterhalskrebs. Den Anteil, den Übergewicht und Inaktivität an diesen Krebsarten haben, schätzt die WHO auf bis zu 25 % [51]. Ebenfalls nicht zu vernachlässigen sind die sozialen Folgen des Übergewichts. So verdienen Übergewichtige weniger und finden schwerer einen Ehepartner oder eine Arbeitsstelle [52]. Carpenter et al. fanden ein geschlechtsspezifisches Beziehungsmuster von Übergewicht und Depression. So sind übergewichtige Frauen depressiver als Normalgewichtige. Bei Männern verhält es sich umgekehrt. Ab einem BMI von ≥ 30 kg/m² sind sie weniger anfällig für eine Depression, Selbstmordversuche oder

Selbsttötung. Die Wahrscheinlichkeit nimmt allerdings ab einem BMI von weniger als 21 kg/m² signifikant zu [53].

1.2 Bedeutung der Leber

1.2.1 Intermediärstoffwechsel und Syntheseleistungen

Der Leber kommt als einem der größten Organe eine herausragende Bedeutung im Intermediärstoffwechsel zu. Postprandial ist sie außer für Lipide, welche über den Ductus thoracicus und den rechten Venenwinkel den Blutkreislauf erreichen, die erste Anlaufstation für im Intestinaltrakt resorbierte Nährstoffe. In dieser resorptiven Phase werden unter dem Einfluss von Insulin Monosaccharide zu Glykogen umgewandelt und gespeichert, sowie Triglyzeride, Sphingo- und Phospholipide synthetisiert. Der besondere Status der Leber im Lipidstoffwechsel drückt sich in ihrer Fähigkeit aus, die Spiegel der drei im Blut vorkommenden Fettformen (unveresterte Fettsäuren, Glyzeride und Ketonkörper) zu regulieren, indem sie den quantitativen Anteil von Fettsäureaufnahme, Veresterung und Oxidation moduliert. Das Schicksal der Fette in der Leber hängt dabei vom Energiestatus des Organismus ab. Die VLDL-Synthese im Rahmen der Reesterung spielt im anabolen Zustand, wenn ausreichend Kohlenhydrate und Fette vorliegen, die größte Rolle. Bei niedrigen Kohlenhydrat- aber hohen Fettsäurespiegeln werden dagegen im Rahmen der Fettsäureoxidation Ketonkörper gebildet [54]. Schließlich ist die Leber das zentrale Organ für den Aminosäurenstoffwechsel. Hier wird unter anderem ein Großteil der Gerinnungsfaktoren, das Albumin, Akute-Phase-Proteine, blutdruckregulierende Proteine des Kallikrein-Kinin-Systems und Angiotensinogen synthetisiert. Obwohl viele Organe zur Biotransformation befähigt sind, ist die Leber auch hierfür der wichtigste Ort. Unerlässlich dafür ist ihre exkretorische Funktion. Täglich werden für die Ausscheidung verschiedenster Substanzen ungefähr 0,6 l Gallenflüssigkeit gebildet. In der postresorptiven Phase oder beim Fasten werden die anabolen Vorgänge durch katabole ersetzt. Parallel dazu setzt die Glukoneogenese ein, um im Zusammenspiel mit der Glykogenolyse die Glukosehomöostase des Körpers aufrecht zu erhalten. Lipide

werden der Fettsäureoxidation zugeführt, um den Energiebedarf des Organismus zu decken [55].

1.2.2 Fettsäurekatabolismus

Fettsäuren werden durch Oxidationsschritte in ihrer Kettenlänge reduziert und damit ab- und umgebaut. Eine grobe Einteilung der beteiligten Oxidationssysteme ist anhand der Kettenlänge der Fettsäuren möglich. Hierbei unterscheidet man die mitochondriale und peroxisomale β -Oxidation, sowie die ω -Oxidation am glatten endoplasmatischen Retikulum. Die dem Herz- und Skelettmuskel als Hauptenergiequelle dienende β -Oxidation macht dabei quantitativ den größten Anteil aus [56]. Die hepatische β -Oxidation hingegen stellt im Fastenzustand Ketonkörper zur Verfügung, die den peripheren Organen, insbesondere dem Gehirn, bei niedrigen Glukosespiegeln als Energiequelle dienen [57].

Die mitochondriale β -Oxidation ist für die Oxidation von kurzkettigen ($<C_8$), mittellangen (C_8 - C_{12}) und langkettigen (C_{14} - C_{20}) Fettsäuren verantwortlich und trägt somit über die ATP-generierende oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung bei. Da langkettige Fettsäuren den Großteil des mit der Nahrung zugeführten Fettes ausmachen, stellen sie den Hauptteil der exogen zugeführten Energie dar und dienen im lipolytischen Zustand als essentielle Substrate [58]. Die Enzyme der mitochondrialen β -Oxidation verstoffwechseln aktivierte Fettsäuren, so genannte Acyl-CoA Ester. In einem ersten Schritt werden deshalb ATP-abhängig die Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen (ACS) aktiviert. Je nach Kettenlänge wird ein anderes Enzym verwendet, Kurz- (ACSS) und Mittellangketten-Acyl-CoA Synthetase (ACSM) in der mitochondrialen Matrix, sowie die Langketten-Acyl-CoA Synthetase (ACSL) in der äußeren Mitochondrienmembran. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der mitochondrialen β -Oxidation ist die Carnitin-abhängige Durchschleusung der Fettsäuren durch die beiden Mitochondrienmembranen [59, 60]. Dieses Enzymsystem besteht aus drei Einzelkomponenten: Carnitinpalmityltransferase 1 (CPT1) in der äußeren Membran, CPT2 in der inneren Membran und als Bindeglied die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT). CPT1 wird in 3 Isoformen, der Leber- (CPT1a), Muskel- (CPT1b) und Gehirnvariante (CPT1c) exprimiert. CPT1a kommt in den meisten Geweben vor,

CPT1b in Herz, Skelettmuskel, weißem und braunem Fettgewebe, sowie in den Hoden [61, 62]. CPT1a und b werden simultan im Herzgewebe exprimiert [62]. Die anderen beiden Enzyme weisen keine Isoformen auf. CPT1 wird durch Insulin und Malonyl-CoA gehemmt [63], die Muskelform dabei weitaus stärker als die Leberform [64]. Malonyl-CoA ist im postprandialen Zustand bei erhöhten Insulin- und niedrigen Glukagonspiegeln ausreichend vorhanden und führt zur Hemmung von CPT1, so dass die mitochondriale β -Oxidation nur im Fastenzustand aktiviert wird. Die Fettsäuren werden vollständig zu Acetyl-CoA oxidiert, das dann für den Krebszyklus oder die Ketonkörpersynthese zur Verfügung steht. Die eigentliche β -Oxidation besteht aus zwei Komponenten. Deren erste ist die Kettenverkürzung an der inneren Mitochondrienmembran durch zwei Proteine, die „very long chain acyl-CoA dehydrogenase“ (VLCAD) und einen trifunktionalen Komplex aus Langkettenenoyl-CoA-Hydratase, Langketten-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Langketten-3-Ketoacyl-CoA-Thiolase. Die aus diesen ersten vier Schritten resultierenden optimal verkürzten Fettsäuren werden durch die zweite Komponente in der Matrix vollständig zu Acyl-CoA oxidiert. Der erste Schritt wird von Kurz-, Mittel- oder Langkettendehydrogenasen katalysiert, an den sich Degradationsschritte durch die Enzyme der ersten Komponente anschließen. Im zweiten Schritt der Oxidation sind diese Enzyme jedoch separat vorhanden und bilden keinen Komplex.

β -Oxidation außerhalb der Mitochondrien wurde erstmals 1969 in Peroxisomen keimender Rhizinussamen [65] und 1976 in Peroxisomen von Rattenlebern [66] beschrieben. Es handelt sich vor allem um Fettsäuren mit einer Kettenlänge von $>C_{20}$, da Mitochondrien das Enzym zu deren Aktivierung fehlt [67]. Der klassische Weg besteht aus den drei Enzymen Acyl-CoA-Oxidase (ACOX), Enoyl-CoA-Hydratase/ L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (zusammengefasst als Peroxisomales Bifunktionelles Enzym, L-PBE) und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase. Über ihn werden unverzweigte Fettsäuren abgebaut, während verzweigt-kettige Fettsäuren, Intermediate der Gallensäuresynthese, sowie Di- und Trihydroxykoprostanoiden über einen Alternativweg verstoffwechselt werden. Dieser besitzt ebenfalls eine ACOX und ein PBE (D-PBE), die funktionell ähnlich aber strukturell verschieden sind. Der abschließende thiolytische Schritt wird durch SCPx (Sterol-Carrier-Protein) katalysiert, das Thiolaseaktivität und Lipidcarrierfunktion vereint.

Der dritte Weg, um Fettsäuren abzubauen, besteht in der mikrosomalen ω -Oxidation mit einer höchsten Affinität für Laurinsäure ($C_{12:0}$). Die ω -Hydroxylierung der Fettsäuren wird durch Enzyme der CYP4A Familie katalysiert. In menschlicher Leber und Niere wird die Isoform CYP4A11 exprimiert, in Mäuselebern CYP4A10 und 14, in Rattenlebern CYP4A1, 2, und 3 [68]. Die entstandenen ω -Hydroxyfettsäuren werden zu Dicarboxysäuren dehydrogeniert und durch eine Acyl-CoA-Synthetase im Endoplasmatischen Retikulum zu Acyl-CoAs umgewandelt. Beim Menschen werden diese aktivierten Fettsäuren hauptsächlich durch die peroxisomale ACOX in der klassischen β -Oxidation verwertet.

1.2.3 Die Nichtalkoholische Fettleber

Insulinresistenz führt in der Leber zu einer Anhäufung von Fetten, da die Lipidspeicherung in Adipozyten durch Insulin nicht mehr ausreichend vermittelt werden kann und eine gesteigerte Lipolyse einsetzt. Eine normale Leber weist weniger als 5 % Hepatozyten mit Fettakkumulation auf. Werte darüber werden als Steatosis hepatis (Fettleber) bezeichnet und wenn Alkohol als Ursache ausgeschlossen werden kann (<20 g/d bei Frauen, <30g/d bei Männern) ist die Diagnose nichtalkoholische Fettleber (NAFL) zu stellen [69]. Typisch für die NAFL ist eine makrovesikuläre Steatosis im Gegensatz zur mikrovesikulären Steatosis, die eher bei mitochondrialen Defekten auftritt, beispielsweise Alkoholschäden, Valproinsäurehepatotoxizität oder dem Reye-Syndrom durch Acetylsalicylsäure. Kommen zur Fettansammlung noch Entzündungszeichen oder nekro-inflammatorische Veränderungen hinzu, spricht man von nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH) [70]. Pathophysiologisch werden Sauerstoffradikale (ROS), eine unzureichende anti-oxidative Abwehr dagegen und strukturelle Veränderungen der Mitochondrien verantwortlich gemacht [71]. Histologisch sind aufgeblähte Hepatozyten, Mallorykörperchen und verschiedene Fibroestadien typisch. NASH-Patienten haben ein erhöhtes Zirrhoserisiko, weswegen dieses Krankheitsbild auch von der NAFL abgegrenzt wird [72].

In den Vereinigten Staaten weisen bis zu 34 % der weißen Erwachsenen eine NAFL auf, 2-3 % eine NASH [70, 73, 74]. Browning et al. wiesen mithilfe einer multiethnischen, populationsgewichteten Stichprobe an 2.287 US-Amerikanern eine

Abhängigkeit der NAFL von der Rasse nach. Am stärksten betroffen waren mit 45 % die Hispanier, was auf die höhere Prävalenz von Diabetes und Insulinresistenz in dieser Volksgruppe zurückgeführt wurde. Schwarze wiesen mit 24 % die geringsten Werte auf [74]. Insgesamt sind Männer etwa 1,8-fach stärker betroffen als Frauen. Bei vorbestehendem Typ-2-Diabetes steigt die Prävalenz der NAFL auf bis zu 50 % [75]. Weil allerdings Symptome und Zeichen fehlen, liegt die Dunkelziffer wohl weitaus höher [73]. Die NAFL wird heutzutage als häufigste Lebererkrankung in den Vereinigten Staaten, möglicherweise sogar weltweit angesehen.

Das am häufigsten beklagte Symptom ist ein diffuses Völlegefühl im rechten Oberbauch. Die Leberbiopsie ist der Goldstandard der Diagnosesicherung und dazu die einzige Möglichkeit, eine isolierte Steatosis von einer Steatohepatitis abzugrenzen. Laborchemische Parameter der Leberschädigung liegen bei der NAFL häufig im Normalbereich. So waren in der Untersuchung von Browning et al. die Serumwerte der Alanin-Aminotransferase, die zur Diagnose herangezogen werden, in 79 % der Fälle mit Steatosis hepatis normal [74]. Allgemein wurde bisher ein ASAT/ALAT-Quotient (de-Ritis-Quotient) <1 als Marker für das Vorliegen einer NAFL angenommen, während Werte >1 eine AFL, ausgeprägte Virushepatitis oder Zirrhose jedweder Genese anzeigen [76]. Allerdings scheint den Aminotransferasen aufgrund einer hohen Rate falsch negativer Ergebnisse eine ausreichende Sensitivität zum Ausschluss einer NAFL oder NASH zu fehlen [74, 77]. Bestehen allerdings erst einmal erhöhte Werte und können andere Ursachen wie Hepatitis, Alkohol oder Hämochromatose ausgeschlossen werden, dann besteht der Verdacht auf das Vorliegen einer NAFL [78].

Die Prognose der NAFL ist variabel und scheint überwiegend mit dem Schweregrad der initialen Leberbiopsie zu korrelieren. Während die einfache Steatosis/ NAFL wenig Progressionstendenz zeigt, liegt der Anteil der klinischen und histologischen Verschlechterung bei der NASH höher: 20 % der NASH-Patienten entwickeln eine Zirrhose, davon erhalten 30 bis 40 % eine Lebertransplantation oder versterben an den Komplikationen [79]. Die größten Risikofaktoren für eine fortschreitende Leberzirrhose sind dabei Adipositas, Typ-2-Diabetes, Alter über 45 Jahre und ein de-Ritis-Quotient >1 . Hinsichtlich der Mortalität rangiert der Leber-assoziierte Tod bei Patienten mit histologisch gesicherter NASH zusammen mit der KHK an erster Stelle [72]. Darüber

hinaus scheint die chronische Inflammation der NASH zu kardiovaskulären Veränderungen zu prädisponieren.

90 % der Patienten mit NAFL weisen mindestens ein Zeichen des Metabolischen Syndroms auf, ein Drittel zeigt die volle Ausprägung, so dass die NAFL heute als Leberkomponente des Metabolischen Syndroms aufgefasst wird [80]. Seit der Erstbeschreibung einer Assoziation zwischen NAFL und Insulinresistenz 1999 durch Marchesini et al. [81] wird diese heute zusammen mit der Adipositas [82] als größter Risikofaktor für die NAFL angesehen [83, 84]. Jimba et al. untersuchten im Rahmen eines allgemeinen Gesundheitschecks 1.950 erwachsene Japaner hinsichtlich Insulinresistenz und NAFL [85]. 29 % der Untersuchten wiesen generell eine NAFL auf. Mit steigenden Nüchternglukosewerten nahm auch die Prävalenz zu: Probanden mit normalen Nüchternglukosewerten ($<6,1$ mmol/l) hatten in 27 % der Fälle eine NAFL, bei erhöhten Werten zwischen 6,1 und 6,9 mmol/l (entsprechend einer gestörten Nüchternglukose) stieg die Prävalenz auf 43 % an. Bei manifestem Typ-2-Diabetes (Nüchternglukose $\geq 7,0$ mmol/l, bzw. 126 mg/dl) waren 62 % der Patienten betroffen.

Zusammenfassend weisen bis zu einem Drittel der Normalbevölkerung eine NAFL auf, bei Übergewichtigen liegt die Rate mit bis zu 70-80 % weitaus höher. Wurde jahrelang davon ausgegangen, dass es sich um eine rein benigne Assoziation zum Metabolischen Syndrom handele, hat sich mittlerweile gezeigt, dass bis zu ein Drittel der Betroffenen eine Fibrose oder sogar Zirrhose entwickelt. Diese kann letztlich bis zum hepatozellulären Karzinom führen. Das endemische Vorkommen der NAFL lässt deswegen eine gezielte Therapie als vordringlich erscheinen, wie im Folgenden beschrieben wird.

1.2.4 Insulinresistenz und hepatische Lipidspeicherung

Der Mechanismus, welcher der Insulinresistenz zugrunde liegt, ist noch nicht völlig verstanden. Klinisch äußert sie sich in der Unfähigkeit des Organismus, die Glukoseclearance bei einer gegebenen Insulinkonzentration im Plasma aufrechtzuerhalten [82]. Beim Menschen wird der Grossteil der Glukose im Skelettmuskel verstoffwechselt. Nach Aufnahme in die Zelle werden etwa 70 % als

Glykogen gespeichert oder der Glykolyse zugeführt. Randle et al. zeigten 1963, dass Glukose im isolierten Rattenherzmuskel mit Fettsäuren um die Substratoxidation konkurriert und führten die Insulinresistenz auf eine gesteigerte Fettsäureoxidation bei Adipositas zurück [57, 86]. Diese sollte durch eine gesteigerte NADH/NAD⁺-Ratio eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase bewirken. Über höhere intrazelluläre Zitratkonzentrationen (mit konsekutiver Hemmung der Hexokinase II) kämen dann die erhöhten intrazellulären Glukosekonzentrationen bei gleichzeitig verminderter Glukoseaufnahme zustande. ¹³C MRT-Untersuchungen an humanem Skelettmuskel durch Dresner et al. zeigten allerdings nach Lipidinfusion eine signifikant verminderte intrazelluläre Glukosekonzentration bei erhöhten Plasmaspiegeln freier Fettsäuren [87]. Die durch freie Fettsäuren induzierte Insulinresistenz beruht somit wohl eher auf einem verminderten Glukosetransport und nicht auf erhöhten intrazellulären Glukosepiegeln. Bindet Insulin an seinen Rezeptor, führt dies zur Autophosphorylierung desselben und nachfolgend zur Phosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substrat-Proteinen (IRS-Proteinen). Dies aktiviert letztlich die Translokation des spezifischen Glukosetransporters GLUT4 aus einem intrazellulären Pool in die Zellmembran der Myozyten [88]. Die bei gesteigertem Substratangebot in der Zelle vermehrt anfallenden Fettsäuremetabolite wie Diacylglycerol, Acyl-CoAs oder Ceramide führen über die Aktivierung einer Ser-Tyr-Kinasekaskade zur gesteigerten Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten an IRS-1 [89]. Die phosphorylierten Tyrosinreste wiederum verhindern eine Aktivierung der PI-3-Kinase, was zu einem verminderten Glukosetransport führt [90]. Die zur Aufrechterhaltung der Homöostase einsetzende Hyperinsulinämie führt schließlich zu einer gesteigerten Fettmasse und vermehrter Lipolyse, was im Kreislauf einen noch höheren Plasmaspiegel freier Fettsäuren bewirkt. Zusätzlich ist bei der NAFL bei ohnehin erhöhtem Substratangebot aus der Peripherie auch noch die hepatische de-novo-Lipogenese (DNL) gesteigert [91]. Abschließend führt der verminderte Einfluss des Insulins in der Leber zu gesteigerter Glukoneogenese und Lipogenese [92]. Dies wird als Glukolipotoxizität bezeichnet. Zusammenfassend bestehen also enge pathophysiologische Verbindungen zwischen Insulinresistenz und hepatischer Lipidakkumulation im Rahmen des Erkrankungskomplexes der NAFL/NASH.

Die Verbesserung der Insulinsensitivität steht deswegen auch an erster Stelle der Behandlungsansätze für die NAFL/ NASH. Wie schon im Kapitel über die Adipositas

erwähnt, kommt dabei körperlicher Bewegung als effektivster Möglichkeit zur Durchbrechung der Insulinresistenz die Hauptbedeutung zu [23, 24]. Das Ziel ist hier eine schrittweise Gewichtsreduktion um mindestens 10 %. Verschiedene Diäten scheinen die NAFL ebenfalls verbessern zu können. So kann Sojaprotein über eine Modulation von „Sterol Response Element Binding Protein“ (SREBP) protektiv wirken [93]. Auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren und ω -3-Fettsäuren wirken sich positiv auf den Verlauf der NAFL aus. Aus NHANES III ist ebenfalls ein schützender Effekt durch Kaffee- und Teekonsum nachweisbar [94]. Insgesamt sind die Daten zur Ernährung jedoch noch äußerst lückenhaft und bedürfen weiterer Abklärung. In der Pharmakotherapie werden Medikamente verwendet, die die Insulinresistenz verbessern sollen. An erster Stelle stehen hier Metformin und die Thiazolidindione (TZD). Da die TZD jedoch zu einer Gewichtszunahme führen und auch Erhöhungen der Aminotransferasen beobachtet wurden, ist eine weitere Untersuchung dieser Substanzklasse für die Therapie der NASH nötig. In der Erprobung befindet sich auch die antioxidative Therapie mit Vitamin E und C, sowie die Nahrungsergänzung mit S-Adenosylmethionin, Betain und Zink, ohne dass darüber schon Aussagen getroffen werden können [95].

Ein Wirkstoff zur optimalen Behandlung der NAFL/ NASH existiert derzeit also noch nicht, so dass vermehrter körperlicher Anstrengung und einer Lebensstiländerung die größte Bedeutung zukommt. Wie bei der Therapie des Metabolischen Syndroms scheint auch hier ein Präparat mit pleiotropen Effekten erstrebenswert, um multipel kausal und damit wirkungsvoll die Progredienz der NAFL unterbinden zu können.

1.3 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) gehören der Familie ligandenaktivierter Transkriptionsfaktoren an, die auf die Zielgenexpression modulierend einwirken. Dazu gehören beispielsweise die Tyrosin-, Östrogen-, Glukokortikoid- und der Vitamin D-Rezeptor [96]. Derzeit sind 48 nukleäre Rezeptoren beschrieben, doch lediglich bei 24 sind die endogenen/ exogenen Liganden bekannt. Die Anderen werden als so genannte „orphan receptors“ bezeichnet. Der Name PPAR

beruht auf der Beobachtung, dass verschiedene chemische Verbindungen (z.B. Fibrate, Herbizide oder Phtalate) in Nagern zu einer Peroxisomproliferation führten, welche mit der Aktivierung eines Proteins einherging, das im weiteren Verlauf PPAR benannt wurde. [97, 98]. Im Gegensatz zu Nagern führt die Aktivierung des Rezeptors beim Menschen nicht zur Peroxisomproliferation. [99, 100]. Auch zeigte sich in humanen Lebern kein karzinogener Effekt der Peroxisomproliferatoren, welcher in Nagetieren beschrieben wurde [28], so dass heute PPAR-Liganden in der Therapie der Dys- und Hyperlipidämie, sowie des Typ-2-Diabetes klinische Anwendung finden.

1.3.1 Struktur und Subtypen

Nukleäre Rezeptoren bestehen aus drei Hauptdomänen (vgl. Abbildung 1.2). Der NH₂-Terminus wird auch als A/B-Region bezeichnet und beinhaltet eine ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-1), die bei den einzelnen Transkriptionsfaktoren eine unterschiedliche Länge aufweist. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) liegt in der C-Region. Sie besitzt ein zentrales Motiv aus zwei Zinkfingern, das mit Ausnahme zweier „orphan receptors“ (DAX1 und SHP) bei allen nukleären Rezeptoren vorkommt. In der am Carboxyterminus gelegenen E-Region befinden sich die Ligandenbindungsdomäne (LBD), eine ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF-2) und eine Dimerisierungsdomäne. DBD und LBD sind die bei den PPAR-Isoformen am höchsten konservierten Abschnitte. In der zwischen C und E gelegenen D-Region binden Korepressoren. Außerdem besitzt die D-Region eine Gelenkfunktion, welche die DNA-Bindungseigenschaften des Rezeptors modulieren kann. Der F-Region konnte bei den PPARs bis jetzt noch keine Funktion zugeordnet werden. Aktuell sind drei PPAR Subtypen identifiziert worden: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3). Durch die verschiedenartige Verwendung der drei PPAR γ -Promotoren und alternatives Splicing werden zwei PPAR γ -Isoformen gebildet: PPAR γ 1 und das am NH₂-Terminus beim Menschen um 28, bei Nagern um 30 Aminosäuren längere PPAR γ 2.

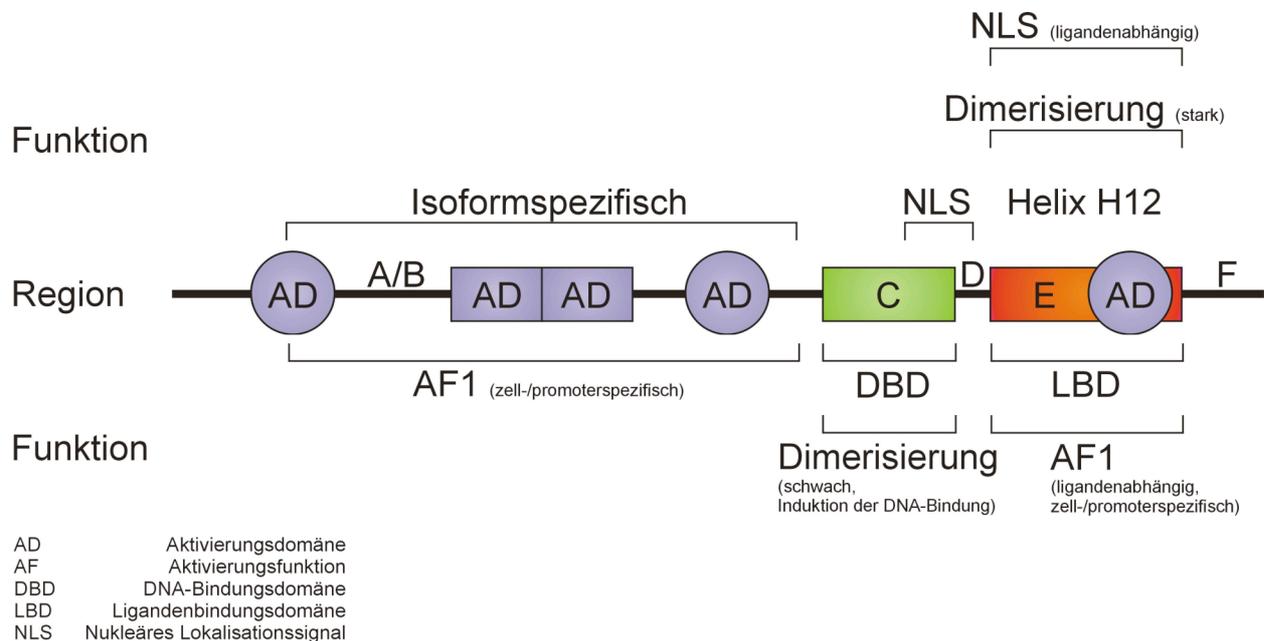


Abbildung 1.2: Struktur nukleärer Rezeptoren, adaptiert nach [96]

1.3.2 Wirkmechanismus

Im nicht-aktiven Zustand ohne Ligandenbindung interagieren sogenannte nukleäre Korepressoren (z.B. Nuclear Receptor Coexpressor, NCoR) mit den PPARs und führen so zu einer Promotor-vermittelten Genrepression [101]. Nach Ligandenbindung dissoziieren diese Korepressoren ab, Koaktivatoren werden rekrutiert [102] und die PPARs heterodimerisieren mit dem 9-cis-Retinsäurerezeptor (RXR). Anschließend erfolgt die Bindung an so genannte „PPAR response elements“ (PPRE) im regulierenden Bereich der Zielgene, um die Gentranskription zu induzieren. Die PPREs gehören zu den „hormone response elements“ (HRE) nukleärer Rezeptoren, die sich durch eine konservierte Struktur auszeichnen und an die zwei Zinkfinger der DBD binden. Sie sind von der Sequenz RGGTCA abgeleitet, wobei das R für eine Purinbase steht. Dementsprechend besteht ein PPRE aus einer direkten Wiederholung (DR) des Kernmotivs AGGTCA, dem ein Nukleotid (1) zwischengeschaltet ist [103] und werden

folglich auch als DR1 bezeichnet. Das erste PPRE wurde im Promotor des Acyl-CoA Oxidase-Gens entdeckt [97, 104], jedoch musste die PPRE-Definition später erweitert werden, da sich im CYP4A6-Gen und dem Malatenzym abweichende PPREs befinden. Die Koaktivatoren interagieren mit dem Rezeptor im AF-2 Bereich über ein konserviertes LXXLL Motiv, wobei das X für eine beliebige Aminosäure steht [105]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der ligandenunabhängigen Rezeptorregulation über die N-terminale AF-1 Domäne. Dies konnte für Insulin sowohl bei PPAR α als auch PPAR γ gezeigt werden [106, 107]. Der erste beschriebene Koaktivator, „steroid receptor coactivator 1“ (SRC1), besitzt ebenso wie CBP/p300 (c-AMP response element binding protein (CREB) binding protein) eine intrinsische Histonacetylase- und deacetylaseaktivität [108, 109] und reguliert somit über die Veränderung der Chromatinstruktur die Gentranskription. Eine zweite Gruppe um PBP/TRAP220 (PPAR binding protein/ thyroid hormone receptor-associated protein, subunit 220) fungiert als Scharnier zwischen dem Rezeptor und der basalen Transkriptionsmaschinerie einschliesslich der RNA Polymerase II [110, 111].

1.3.3 Expressionsmuster und Funktion

PPAR α wird hauptsächlich in der Leber (vgl. Abbildung 1.3), Niere, dem braunen Fettgewebe, sowie Herz und Skelettmuskel exprimiert [97, 112]. Weiter wird es im Magen und Dünndarm, der Retina, Nebenniere und pankreatischen β -Zellen gefunden. Schliesslich ist die Expression in Immunzellen und im Gefäßendothel beschrieben worden [113, 114]. Humane Zellen exprimieren PPAR α etwa zehnfach geringer als Nagetiere [115].

PPAR γ 1 wird in einem zwischen Nagetier und Mensch sehr ähnlichen Muster in Milz, Niere, Leber, Skelettmuskulatur, Darm, Nebenniere und Fettgewebe ausgebildet [112, 116]. Die mit Abstand höchste Expression findet sich im weissen Fettgewebe, wobei PPAR γ 1 bei Nagetieren auch in braunem Fettgewebe vorkommt. PPAR γ 2 wird dagegen nur im weissen Fettgewebe exprimiert.

PPAR β/δ schliesslich findet sich ubiquitär. Die Funktion dieser Isoform ist nur unvollständig bekannt und sehr heterogen. Sie umfasst sowohl regulatorische Prozesse

im Lipidstoffwechsel als auch eine Beteiligung an der Anti-Inflammation [117]. Bei Menschen und Nagetieren wird es teilweise stärker ausgebildet als die anderen beiden Isoformen, mit höheren Konzentrationen in der Plazenta, dem Dickdarm und der Skelettmuskulatur [118]. Bei Nagern ist es zusätzlich die im ZNS und den Testes am stärksten exprimierte Form [112, 119].

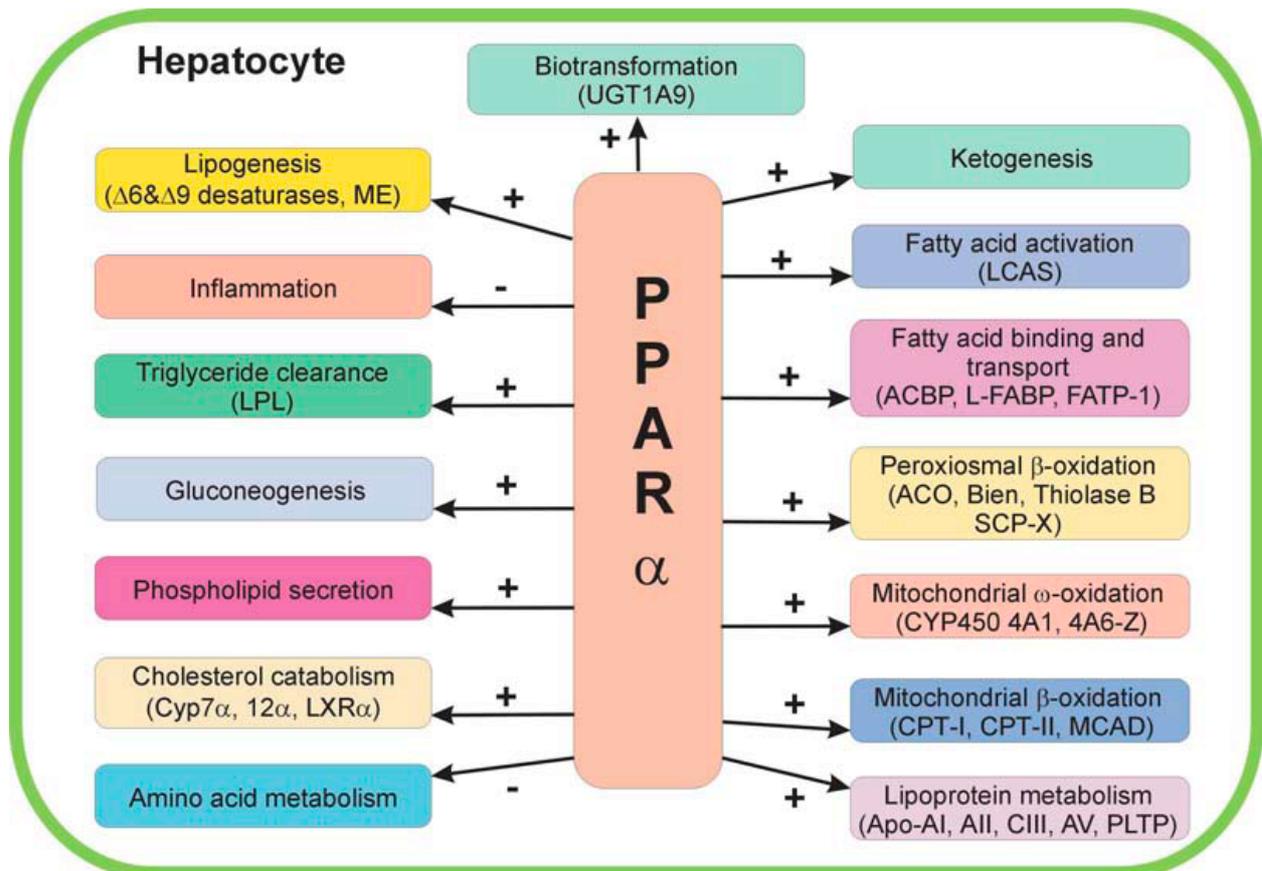


Abbildung 1.3: Funktionen von PPAR α in der Leber, nach [120]

Der Großteil der Expression von PPAR α findet sich in Geweben, die ihren Energiebedarf hauptsächlich durch Fettsäurekatabolismus decken. Bei Nagetieren geht die Vermehrung der Peroxisomen nach fettreicher Nahrung, Kälteexposition oder Stimulation durch Schilddrüsenhormone mit einer Aktivierung vieler mitochondrialer (CPT1 und 2, ACS, ACD) und peroxisomaler Enzyme (ACOX) der β -Oxidation, sowie mikrosomaler Cytochrom P450 ω -Hydroxylasen (CYP4A-Familie) einher [120, 121]. Die

Expression dieser Enzyme, sowie die von Apolipoproteinen und Fettsäuretransportproteinen wird durch PPAR α gesteuert [122, 123]. Es verstärkt durch Gentranskription direkt und durch verminderte Expression des Lipoproteinlipase-Inhibitors Apo C-III indirekt die Aktivität dieses Schlüsselenzyms der Fettsäurehydrolyse [124]. Weiter werden die Apolipoproteine A-I und A-II heraufreguliert, was zu einem Anstieg des Serum-HDL führt. Auf diese Weise werden das Serumcholesterin und die Triglyzeridspiegel reguliert, wie in Versuchen mit PPAR α -knock-out (KO)-Mäusen gezeigt werden konnte [125]. Damit spielt der Transkriptionsfaktor eine herausragende physiologische Rolle in der Kontrolle des Lipidmetabolismus. Allerdings konnte ebenso gezeigt werden, dass PPAR α im diabetischen Herz vermehrt aktiviert ist und über die gesteigerte Fettsäureoxidation kardiotoxisch wirkt und zu Kardiomyopathie führen kann [126].

Weitere Funktionen von PPAR α konnten durch Untersuchungen an PPAR α -KO-Mäusen entdeckt werden. Unter einer normalen Diät zeigen sich kaum Veränderungen im Stoffwechsel. Da diese Tiere jedoch nur marginale Glykogenreserven aufweisen, entwickeln sie beim Fasten schwere Hypoglykämien und eine Hypothermie. Hinzu kommt eine Leberverfettung und es ist keine Steigerung der Ketonkörpersynthese zu verzeichnen [127]. Die Hypothese, dass PPAR α auch in die Glukoneogenese eingreift, konnte dadurch bestätigt werden, dass das Gen der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) ein funktionelles PPRE aufweist [128]. Außerdem übt PPAR α einen direkten Einfluss auf die Pyruvatdehydrogenasekinase 4 (PDK4) aus. Dieses Enzym inaktiviert den Pyruvatdehydrogenasekomplex (und damit die Glykolyse) und führt Pyruvat stattdessen der Glukoneogenese zu [129]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Etomoxir, ein CPT1-Hemmer, in den KO-Mäusen eine letale Hypoglykämie hervorrief. Die Wildtypiere dagegen beantworteten die Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation mit einer Induktion der anderen beiden Fettsäureoxidationswege. Bemerkenswerterweise starben 100 % der männlichen KO-Mäuse, aber nur 25 % der weiblichen, so dass eine geschlechtsabhängige Regulation von PPAR α vermutet werden kann. Die Überlebensrate der männlichen Tiere konnte allerdings durch Vorbehandlung mit 17- β -Östradiol auf 75 % gesteigert werden [130], was eine Beteiligung dieses Hormons vermuten lässt. Die in PPAR α -KO-Mäusen im Fastenzustand beobachtete Hypoglykämie könnte allerdings statt auf einer defekten Glukoneogenese auch auf

einer vermehrten Glukoseverwendung beruhen, da die genetisch veränderten Tiere sogar höhere Glukoneogeneseraten aufweisen [131]: Bekommen PPAR α -KO-Mäuse eine hochkalorische Diät, so entwickeln sie erwartungsgemäß mehr als die Wildtypiere eine Adipositas. Interessanterweise resultiert daraus aber keine Insulinresistenz, die sich stattdessen bei den Wildtypieren entwickelte [132]. Der im braunen Fettgewebe stattfindenden Thermogenese liegt eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch als Thermogenine oder „uncoupling proteins“ (UCP) bezeichnete Proteine zugrunde, so dass weniger Energie in Form von ATP gespeichert, sondern als Wärme abgegeben wird [55]. Verschiedene UCPs konnten als PPAR α -Zielgene identifiziert werden und ein PPAR α -Agonismus war mit einer gesteigerten Thermogenese im braunen Fettgewebe verbunden [133, 134].

Außerdem ist PPAR α in der Lage, Enzyme der Biotransformation zu regulieren. Modulationen sind für alle drei Phasen beschrieben worden, wobei vor allem eine Herunterregulation von Genen des Steroidmetabolismus zu erkennen ist, so dass Interaktionen mit oralen Kontrazeptiva und anderen Steroiden nicht auszuschließen sind [120].

PPAR α spielt auch in der Regulation der Entzündungsreaktion eine Rolle. So aktiviert das chemotaktisch wirksame proinflammatorische Eikosanoid LTB₄ (Leukotrien B₄) via PPAR α seinen eigenen Abbau über die Induktion von β - und ω -Oxidation [135]. Auch die Synthesehemmung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 1 und 6 (IL-1 und -6) über eine verminderte NF- κ B-Aktivität, sowie die Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX2) im Aortenendothel ist beschrieben worden [136], was letztlich über eine verringerte Entzündungsreaktion zu weniger Plaquebildung führen kann. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass PPAR α an der Regulation von Genen der Cholesterinclearance beteiligt ist. So werden der HDL-Rezeptor CLA-1/SR-BI und ABCA1 induziert. Letzterer ist am reversen Cholesterintransport aus Makrophagen beteiligt [137, 138]. Über verminderte NF- κ B-Spiegel scheint PPAR α auch eine Rolle im Alterungsprozess zu spielen. In gealterten Wildtypmäusen und PPAR α -KO-Tieren finden sich erhöhte Spiegel an NF- κ B. Dies führt über zusätzlichen oxidativen Stress und eine gesteigerte Synthese proinflammatorischer Zytokine zu einer beschleunigten Alterung der KO-Tiere [139].

Zusammenfassend wird PPAR α neben seiner Funktion als Energielieferant in katabolen Zuständen – hier werden die Fettsäureoxidation und die Glukoneogenese aktiviert – eine wichtige Beteiligung an der Thermogenese, Biotransformation und eine antiinflammatorische Rolle zugeschrieben, die zu einer reduzierten Atherosklerose führt.

Im Gegensatz zu PPAR γ und δ führt die Aktivierung von PPAR α in Nagetieren zur Peroxisomproliferation. In diesem Zusammenhang ist auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von hepatozellulärem Karzinom (HCC) unter PPAR α -Aktivierung in Nagetieren zu nennen, wohingegen PPAR α -KO-Mäuse kein HCC entwickeln [140]. PPAR α -Aktivierung führt über eine Inhibition der microRNA let-7c zu einer vermehrten Expression des Onkogens c-myc (cyclic AMP response element-binding-protein). MicroRNAs sind nicht-kodierende RNAs, die regulatorisch im Stoffwechsel, der Embryo- und Onkogenese wirken. Let-7c konnte hier als Tumorsuppressorgen identifiziert werden [141]. Weiterhin scheinen in der Fettsäureoxidation entstehende Sauerstoffradikale eine Rolle zu spielen. Dass beim Menschen eine karzinogene Wirkung von PPAR α bis heute nicht nachgewiesen werden konnte hat verschiedene Theorien hervorgebracht: Anfangen von einer PPAR α -Aktivität zwischen 1 und 10 % verglichen mit Nagetierlebern, einer weniger effektiven Proteinaktivierung und unterschiedlicher Kofaktorenregulierung, bis zu einer verminderten Effizienz der humanen PPRES und einer geringeren Bioverfügbarkeit der PPAR α -Agonisten [142]. Auch hier konnte eine Bedeutung der microRNAs durch Gonzalez et al. nachgewiesen werden, indem sie an für PPAR α humanisierten Mäusen die fehlende Suppression von let-7c nach Gabe von WY 14.643 (einem potenten Aktivator) zeigten. Der genaue molekulare Mechanismus der speziesspezifischen let-7c Inhibition bleibt allerdings weiterhin ungeklärt.

1.3.4 PPARs und der Intermediärstoffwechsel der Leber

Wie bereits beschrieben finden sich in der Leber hauptsächlich PPAR α -vermittelte Effekte des Lipidkatabolismus. Die Reichhaltigkeit des Leberparenchyms an PPAR α in der normalen Leber (als Schlüsselfunktion des Fettsäureabbaus) minimiert das Bedürfnis einer zusätzlichen Adipogenese, um Lipide zu speichern. So ist es schlüssig, dass neben funktionell aktivem PPAR α und einem funktionierenden Fettsäureoxidationssystem PPAR γ 1 nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird. Dennoch wird PPAR γ exprimiert und da dessen Funktion unklar war, untersuchten Yu et al. den biologischen Einfluss von stabil überexprimiertem PPAR γ 1 in Mäuselebern von PPAR α -KO-Tieren: Adipozyten-spezifische und mit der Lipogenese im Zusammenhang stehende Gene wurden heraufreguliert und es setzte eine Leberverfettung ein, die mit einer adipogenen Transformation der Hepatozyten einherging [143]. Dennoch war es nicht möglich, diese Gene in den steatotischen Lebern der KO-Mäuse ohne den PPAR γ 1-Hintergrund zu induzieren. Also scheint ein niedriger PPAR γ -Spiegel in den Hepatozyten essentiell zu sein, um eine adipogene Transformation zu verhindern [143]. Memon et al. beobachteten weiterhin, dass ob/ob Mäuse mit defizientem Leptinrezeptor erhöhte PPAR γ -mRNA-Spiegel in der Leber aufweisen [144]. Diese Beobachtungen können beispielsweise eine Rolle für Patienten spielen, die aufgrund von single-nucleotide-Polymorphismen niedrige PPAR α -Spiegel und ein sehr aktives PPAR γ 1 aufweisen und aufgrund dessen an einer Leberverfettung leiden. Dem widersprechen jedoch Untersuchungen von Patsouris et al., die zeigten, dass PPAR α -KO-Mäuse auf Hochfettdiät 20-fach höhere PPAR γ -Spiegel in der Leber aufwiesen als die Wildtypiere auf Normaldiät. In diesem Fall übernahm PPAR γ jedoch neben der gesteigerten Lipogenese PPAR α -Funktionen und wirkte so kompensierend [145].

1.3.5 Posttranslationale Regulation von PPAR α und γ

Extrazelluläre Signale und Umweltveränderungen können den Phosphorylierungsstatus von Zellproteinen verändern. Bei nukleären Rezeptoren spielt die Phosphorylierung für ihre transkriptionelle Aktivität eine herausragende Rolle. So wird PPAR α insulinvermittelt durch die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) phosphoryliert und dadurch aktiviert, während PPAR γ durch Phosphorylierung inaktiviert wird [146, 147]. Die Phosphorylierung an Serin 12 und 21 führt bei PPAR α zu einer gesteigerten Aktivität der AF-1 Region, was vermutlich auf eine vermehrte Interaktion mit dem Kofaktor PGC-1 zurückzuführen ist [148]. PPAR γ 1 wird an Serin 84 und PPAR γ 2 an Serin 112 phosphoryliert, was letztlich die Ligandenaffinität herabsetzt [149].

Eine zweite Möglichkeit zur posttranslationalen Regulation stellt die Geschwindigkeit des Proteinabbaus dar, der hauptsächlich über zwei Systeme stattfindet: In den Lysosomen und über das Ubiquitin-Proteasom-System. Der Abbau in den Lysosomen spielt lediglich für membranständige und extrazellulär aufgenommene Proteine eine Rolle [150]. Im Ubiquitin-Proteasom-System werden dagegen vorwiegend kurzlebige Proteine abgebaut, die den Zellzyklus, die Transkription und die Signaltransduktion regulieren. Diese werden dazu ATP-abhängig kovalent über Lysinreste an das 8 kDa schwere Polypeptid Ubiquitin gebunden. In einem ersten Schritt wird Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym aktiviert (E1), dann an einen Ubiquitincarrier transferiert (E2) und schließlich katalysiert die Ubiquitin-Proteinligase die Bindung des Ubiquitins an das Zielprotein (E3). Anschließend werden die mehrfach ubiquitinierten Proteine im 26S Proteasom abgebaut. Für verschiedene nukleäre Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass sie so abgebaut werden. So zeigen PPAR γ , Östrogen- [151], Progesteron- [152], Glukokortikoid- [152] und Vitamin D₃-Rezeptor [153] eine schnellere Ubiquitinierung nach Ligandenbindung. PPAR γ wird dabei im inaktiven Zustand durch die gebundenen Korepressoren von der Ubiquitinierung geschützt, nur die aktivierte Form beschleunigt den Abbau [154]. Lediglich für PPAR α ist eine Autostimulation gezeigt worden, indem Liganden die Ubiquitinierung vermindern und dadurch den Rezeptor stabilisieren [155].

1.3.6 PPAR α -Liganden

Zu den endogenen Liganden von PPAR α gehören langkettige Fettsäuren. Diese induzieren damit selbstständig ihren eigenen Abbau, wobei ungesättigte Fettsäuren höheraffin gebunden werden als gesättigte. Die Entdeckung, dass Fettsäuren Hormoncharakter haben, indem sie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen, zeigte erstmalig, dass es sich dabei nicht bloß um passive Energiespender handelt. Eine weitere Klasse endogener Liganden stellen die Eikosanoide dar, Fettsäurederivate der Arachidonsäure. Dazu gehören die aus dem Lipoxygenase-Pathway entstehenden Leukotriene (LT) und Hydroxyeikosatetraensäuren (HETE), sowie die aus dem Zykllooxygenase-Pathway stammenden Prostaglandine (PG). Zu den PPAR α -Aktivatoren zählen die chemotaktisch und proinflammatorisch wirksamen 8(S)-HETE und LTB₄ [54]. Im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren zeigen sich jedoch einige Unterschiede im Bindungsverhalten von PPAR α (und auch der anderen beiden Isoformen): So können mehrere Typen von Liganden gebunden werden, dies ist jedoch mit einer geringeren Affinität verbunden und schließlich existieren Überlappungen für Liganden zwischen den drei Isoformen [156].

Zu den synthetischen PPAR α -Liganden zählen die Fibrate, die in den 1970er Jahren zur Therapie der Hyperlipidämie eingeführt wurden, ohne dass damals der Mechanismus bekannt war. Zur Verfügung stehen heute die zuerst eingeführte Substanz Clofibrat, sowie die Analoga Bezafibrat, Fenofibrat, Ciprofibrat und Gemfibrozil. Insgesamt ist die Bedeutung der Fibrate im Verhältnis zu den Statinen jedoch relativ gering. Dies liegt zum einen an der isolierten Indikation der Hyperlipidämie, da Störungen im Cholesterinstoffwechsel wirksamer mit Statinen behandelt werden können, andererseits an ihrem Nebenwirkungsprofil. Vor allem gastrointestinale Beschwerden zählen dazu, aber auch Myalgien, die bis zur Rhabdomyolyse führen können, sowie ein gehäuftes Auftreten von Gallensteinen.

Studien der vergangenen Jahre zeigten ein erhöhtes Risiko für Patienten mit Dyslipidämie an KHK zu erkranken, so dass Fibrate mittlerweile für diese Risikogruppe

empfohlen werden. In der „Helsinki Heart Study“ (HHS) wurde eine Reduktion des KHK-Risikos mit Gemfibrozil unter 4.081 asymptomatischen Männern, darunter 135 Typ-2-Diabetikern, untersucht [30]. Im Vergleich zur Placebogruppe ergab sich durch Verbesserung der Dyslipidämie eine relative Risikoreduktion von nichttödlichem Herzinfarkt oder KHK von 34 % ($p < 0,002$). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch der „Veterans Affairs High Density Lipoprotein-Cholesterol Intervention Trial“ (VA-HIT), eine Studie zur Sekundärprävention, die den Einfluss von Gemfibrozil auf die gemeinsame Inzidenz von nichttödlichem Herzinfarkt und Koronartod bei 2.531 Männern mit KHK und niedrigem HDL-Cholesterin untersuchte [31]. Die der KHK zugeschriebene Mortalität sank hier um 22 %, die Inzidenz von Schlaganfällen um 31 %. In der 2006 abgeschlossenen FIELD-Studie („Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes“) mit 9.795 Typ-2-Diabetikern in Australien, Neuseeland und Finnland konnte Fenofibrat das Risiko für primäre Koronarereignisse (KHK-bedingte Mortalität, nicht tödlicher Myokardinfarkt) nicht signifikant reduzieren, sekundäre Endpunkte wie Schlaganfall und Revaskularisationen jedoch durchaus [29]. Es wird diskutiert, dass das negative Ergebnis der FIELD-Studie auf den bereits sehr hohen Anteil von Patienten zurückzuführen ist, die zu Beginn bereits mit einem Statin vorbehandelt waren. Eine zweite Studie mit Fenofibrat, die ACCORD-Studie („Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes“) in den USA und Kanada mit 10.000 Typ-2-Diabetikern läuft derzeit noch, die ersten Ergebnisse werden 2009/10 vorliegen. Bei ACCORD soll untersucht werden, inwiefern eine alleinige gute Blutzuckereinstellung, Blutzuckereinstellung und Blutdruckkontrolle oder Blutzuckerkontrolle und Kombinationstherapie aus Fenofibrat mit Statin KHK-bedingte Komplikationen reduzieren kann.

Der Lipid-senkende Effekt der Fibrate hat zu einer vermehrten Kombination dieser Wirkstoffgruppe mit den HMG-CoA Reduktasehemmern (Statinen) geführt. So zeigte die SAFARI-Studie („Simvastatin Plus Fenofibrate for Combined Hyperlipidemia“) eine höhere Effektivität der Kombination von Fenofibrat und Simvastatin bei der Therapie der Hypertriglyceridämie als die Statinmonotherapie. Doch traten bei der Verwendung von Gemfibrozil und Statin vermehrt Rhabdomyolysen auf, vermutlich indem Fibrate den myotoxischen Effekt der Statine steigern und zu einer höheren Plasmakonzentration der Statine führen. Demgegenüber konnte eine Rhabdomyolyse in Kombination von Atorvastatin und Fenofibrat nicht beobachtet werden. Von den berichteten Rhabdomyolysefällen traten 88 % der Fälle (533 von 606) in der Kombination von

Gemfibrozil und Cerivastatin auf, lediglich 2,3 % (14 von 606) bei Fenofibrat und Cerivastatin [157].

Auf der Grundlage der bisher beschriebenen Mechanismen ist das Arterioskleroserisiko für Typ-2-Diabetiker höher als für Nicht-Diabetiker. Post-hoc Analysen der HHS und des VA-HIT ergaben einen höheren Nutzen von Fibraten bei Diabetikern, was die prospektive „Diabetes-Atherosclerosis-Intervention Study“ (DAIS) bestätigen konnte. Hier wurde der Einfluss von 200 mg/d Fenofibrat auf die angiographische Progression der Koronarsklerose unter 418 Typ-2-Diabetikern untersucht. Das Ergebnis war eine um 40 % geringere Zunahme des minimalen Gefäßdurchmessers ($p < 0,05$) [27]. Über 70 % der Typ-2-Diabetiker weisen eine Dyslipidämie auf, typischerweise eine Hypertriglyzeridämie und ein niedriges Serum-HDL. Die UKPDS zeigte, dass die Dyslipidämie eine größere prognostische Bedeutung als der Hba_{1c} hat [158]. Dies zeigt sich klinisch daran, dass etwa 80 % der Typ-2-Diabetiker an der KHK und deren Komplikationen versterben.

Für die Fenofibratbehandlung ist eine verbesserte vasomotorische Funktion beschrieben worden. Dies ist neben einem verbesserten Lipidprofil wohl auch auf eine Stimulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS), sowie eine verminderte Expression der (in die Entzündungsreaktion involvierten) induzierbaren NO-Synthase zurückzuführen [159]. Des Weiteren kann Fenofibrat möglicherweise die Entstehung von Angiotensin II-bedingter Hypertonie verhindern, wie bisher in C57BL6J Mäusen gezeigt werden konnte [160].

Zusammenfassend verringert eine Behandlung mit Fibraten signifikant das kardiovaskuläre Risiko, wie in mehreren Studien gezeigt wurde. Das häufig zitierte Risiko einer Rhabdomyolyse im Rahmen der Kombinationstherapie von Fibrat und Statin trat nur bei einer bestimmten Kombination auf, so dass der limitierende Faktor eher in der interindividuell unterschiedlichen Verträglichkeit besteht.

1.4 AT₁-Antagonisten

Eine entscheidende Rolle zur Regulation von Blutdruck und Blutvolumen spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Renin wird aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere bei Abfall des renalen Perfusionsdrucks, bei Hyponatriämie und durch Stimulation sympathischer β_1 -Rezeptoren in das Vas afferens freigesetzt. Hier spaltet es vom in der Leber synthetisierten und im Gefäßsystem zirkulierenden α_2 -Globulin Angiotensinogen das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I ab. Das auf der luminalen Seite des Gefäßendothels nahezu ubiquitär vorkommende Angiotensin-converting enzyme (ACE) spaltet vom carboxyterminalen Ende ein Dipeptid ab, so dass das stark vasokonstriktorische Oktapeptid Angiotensin II entsteht. Die sich anschließende Aldosteronsekretion führt zur tubulären Natrium- und Wasserresorption, Kaliurese und Protonensekretion und erhöht somit den Natrium- und extrazellulären Flüssigkeitsbestand des Körpers [161].

Angiotensin II vermittelt seine Effekte über zwei Rezeptorsubtypen, den AT₁- und AT₂-Rezeptor. Dabei handelt es sich um membranständige Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Eine Aktivierung des AT₁-Rezeptors führt zu Vasokonstriktion, Natriumretention, Aldosteronsekretion, Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur, Aktivierung von Sauerstoffradikalen und proinflammatorischer Zytokine, sowie zur Aktivierung von Matrixmetalloproteasen. Der AT₂-Rezeptor wird als Gegenspieler des ersten aufgefasst. Er vermittelt Vasodilatation, antiinflammatorische Effekte und wirkt regenerativ und zelldifferenzierend.

Mit dem 1981 in Deutschland zugelassenen Captopril, dem ersten Vertreter aus der Klasse der ACE-Hemmer, kam erstmals eine Substanz auf den Markt, die in das RAAS eingreift. Die ACE-Hemmer weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem carboxyterminalen Ende von Angiotensin I auf. Sie blockieren das aktive Zentrum des Enzyms reversibel indem sie als falsche Substrate binden [162]. Ein Nachteil im klinischen Alltag ist jedoch das Auftreten eines trockenen Reizhustens bei bis zu 20 % der behandelten Patienten. Diese Nebenwirkung soll durch die Beeinflussung des

Bradykininstoffwechsels vermittelt sein. Es ist bekannt, dass ACE auch Bradykinin in Spaltprodukte inaktiviert. Erhöhte Bradykininspiegel unter ACE-Hemmung könnten so den Reizhusten vermitteln [163]. Des Weiteren kann Angiotensin II auch bei vollständiger Hemmung des Konversionsenzym durch Einwirkung von gewebeständigen Chymasen entstehen, so dass keine vollständige Blockierung über ACE erfolgen kann.

Nach Identifizierung und Analyse der Rezeptoren des Angiotensin II wurden diese hinsichtlich einer alternativen pharmakologischen Einflussnahme auf das RAAS untersucht. 1995 wurde Losartan als erster AT₁-Antagonist (Synonyme: Angiotensin II Rezeptorantagonist, AT₁-Rezeptorantagonist, Angiotensin-Rezeptorblocker, „Sartan“) in Deutschland zugelassen, wobei Losartan selbst nur Prodrug ist. Mittlerweile sind mehrere Analogsubstanzen auf dem Markt, die keine aktiven Metabolite bilden, so die 1997 eingeführten Substanzen Candesartan, Eprosartan, Irbesartan und Valsartan. 1999 folgte Telmisartan, 2002 schließlich Olmesartan [161].

Neben der Beteiligung des RAAS bei kardiovaskulären Erkrankungen sind die Einflüsse auf metabolische Vorgänge vermehrt in den Vordergrund gerückt. Die Ergebnisse großer klinischer Studien mit ACE-Hemmern und AT₁-Antagonisten zeigten, dass sich diese Substanzen positiv auf Diabetes-assoziierte Symptome wie die Progredienz der diabetischen Nephropathie auswirken [164]. Zusätzlich sank die Inzidenz von neu manifestiertem Typ-2-Diabetes bei Hypertonikern und kardiovaskulären Risikopatienten. Dieser Effekt wurde sowohl bei ACE-Hemmern (CAPPP- und HOPE-Studien) als auch bei AT₁-Antagonisten beobachtet (LIFE-, CHARM-, VALUE-Studien) [165]. Allerdings zeigte sich in der DREAM-Studie, dass Ramipril die Inzidenz von neu manifestiertem Typ-2-Diabetes im Vergleich zur Placebogruppe nicht signifikant reduzieren konnte [166]. Insofern scheint die antidiabetogene Wirkung zumindest hinsichtlich des Ramipril fraglich. Der antidiabetischen Wirkung können dabei zahlreiche unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen: Die bei Adipositas erhöhten Spiegel freier Fettsäuren mit nachfolgender Suppression der Proteinkinase C führen zu einer verminderten Aktivierung der PI-3-Kinase [90]. Dieses Enzym spielt eine herausragende Rolle für eine normale Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme. Dieser Vorgang wird durch Angiotensin II noch verstärkt [167]. In Tierexperimenten konnten sowohl Irbesartan, als auch Valsartan die Glukosetoleranz verbessern. Weiterhin stimuliert die Blockade des

AT₁-Rezeptors die Adipogenese und kann so der Glukolipotoxizität entgegenwirken. Eine Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) reduziert zusätzlich sowohl die bei Adipositas vermehrte Genexpression des AT₁-Rezeptors, als auch die erhöhten Plasmaspiegel an ACE [168].

Weitere Bedeutung kommt dem RAAS in der chronischen, subklinischen Inflammation zu, die mit der Adipositas einhergeht. So sind erhöhte Plasmaspiegel an C-reaktivem Protein (CRP) oder Interleukin-6 (IL-6) mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden. Angiotensin II wirkt über eine verstärkte Aktivität von NF-κB, sowie vermehrter Expression von IL-6 und endothelialen Adhäsionsmolekülen proinflammatorisch [169]. Schließlich spielt oxidativer Stress in der Pathogenese des Diabetes eine wichtige Rolle. Vermehrte freie Fettsäuren und Hyperglykämie führen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien. Die bei Diabetikern verminderte Aktivität der Superoxiddismutase verstärkt diese Entwicklung noch zusätzlich. ROS führen zur Lipidperoxidation, welche selbst wiederum weitere ROS generiert, so dass ein sich selbst erhaltender Prozeß entsteht [168]. Auch die Thrombozytenaktivierung durch ROS trägt zum gesteigerten kardiovaskulären Risiko bei. ROS aktivieren auch das RAAS und führen über eine Stimulation des AT₁-Rezeptors zu einer Vermehrung des oxidativen Stress. Experimentelle Studien mit AT₁-Antagonisten (Valsartan, Losartan) oder ACE-Inhibitoren (Captopril) konnten demnach auch den oxidativen Stress vermindern [170, 171].

Für die AT₁-Antagonisten Losartan, Irbesartan und Telmisartan wurde außerdem gezeigt, dass diese die Differenzierung muriner und humaner Präadipozyten konzentrationsabhängig verstärken und die Aktivität von endogenem PPAR_γ unabhängig von der AT₁-Rezeptorblockade sowie der Anwesenheit des AT₂-Rezeptors steigern. Dadurch ließen sich diese Substanzen als partielle PPAR_γ-Agonisten identifizieren, was einen möglichen Mechanismus für ihre insulinsensitivierende Wirkung darstellt [172, 173].

2 Hypothese und Zielsetzung

2004 untersuchten Derosa und Kollegen den Einfluss von Telmisartan und Eprosartan auf Blutdruckkontrolle, Glukosehomöostase und Plasmalipidprofil an 119 hypertonen Diabetikern, deren Behandlung lediglich durch Diät und körperliche Betätigung erfolgte. Die erste Gruppe erhielt 40 mg Telmisartan täglich, die zweite 600 mg Eprosartan, die dritte wurde mit einem Plazebo behandelt. Nach 12-monatiger Behandlung senkten beide AT₁-Blocker äquipotent den Blutdruck gegenüber der Plazebogruppe signifikant. In keiner der drei Gruppen konnte nach einjähriger Behandlung ein Unterschied hinsichtlich BMI, HbA_{1c}, Nüchternglukose oder Nüchterninsulinkonzentration festgestellt werden. Es zeigte sich allerdings in der mit Telmisartan behandelten Gruppe schon nach sechs Monaten eine signifikante Reduktion des Gesamtcholesterins, der LDL-Unterfraktion sowie der Triglyzeride. Dieser Effekt ließ sich in der mit Eprosartan behandelten Gruppe nicht nachweisen [174]. Weitere Studien unter diabetischen und nicht-diabetischen Hypertonikern bestätigten die signifikante Reduktion der Plasmatriglyzeride und des Gesamtcholesterins unter Behandlung mit Telmisartan [175, 176].

Vergleicht man das Wirkprofil von Telmisartan mit dem der Fibrate, so zeigt sich eine weitgehende Analogie. Die sich hieraus ergebende Hypothese ist, dass Telmisartan und eventuell auch andere AT₁-Antagonisten möglicherweise einen zusätzlichen Einfluss auf PPAR α haben, der eine Erklärung für die Veränderungen im Lipidprofil der genannten Studien darstellen könnte.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es daher:

1. die Interaktion von AT₁-Antagonisten mit der PPAR α -Ligandenbindungsdomäne,
2. die Induktion von PPAR α -Zielgenen durch AT₁-Antagonisten in vitro und in vivo, sowie
3. den Einfluss von AT₁-Antagonisten auf PPAR α als Rezeptor zu charakterisieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Substanzen

3-Isobutyl-1-methylxanthin	(Sigma, Taufkirchen, D)
Agarose: Seakem LE Agarose	(FMC Bio-Products, Hamburg, D)
Ampicillin (D (-)-alpha-Aminobenzyl- Penicillin)	(Sigma, Taufkirchen, D)
Bovines Serumalbumin	(Sigma, Taufkirchen, D)
Chloroform	(J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
Coomassiebrillantblau	(Sigma, Taufkirchen)
Dexamethason	(Sigma, Taufkirchen, D)
Dimethylsulfoxid	(Sigma, Taufkirchen, D)
Eprosartan	(Solvay, D)
Ethanol 96 %	(J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
Fenofibrinsäure	(Bart Staels, Lille, F)
Formaldehyd	(J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
Formalinlösung	(Sigma, Taufkirchen, D)
Glutathionsepharose	(Amersham Biosciences, Freiburg, D)
Irbesartan	(Sanofi-Synthelabo, Berlin, D)
Isopropanol	(J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
LB-Agar, Miller (Ausgangssubstanz, pulverisiert)	(Becton Dickensen, Sparks, USA)
LB-Broth, Miller (Ausgangssubstanz, pulverisiert)	(Becton Dickensen, Sparks, USA)
Losartan	(MSD, Haar, D)
MG132	(Calbiochem, Merck, Darmstadt, D)
Paraffin	(Sigma, Taufkirchen, D)

PCR-Puffer und MgCl ₂	(Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D oder Promega GmbH, Mannheim, D)
RT-Puffer	(Promega GmbH, Mannheim, D)
Real-Time Sybergreen® Mastermix	(Applied Biosystems, Darmstadt, D oder von der AG Ruiz des CCR)
Real-Time Taqman® Mastermix	(Applied Biosystems, Darmstadt, D)
Ribonukleaseinhibitor	(Ambion Europe, Huntington, UK)
Skimmed milk powder	(Roth, Karlsruhe, D)
Telmisartan	(Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, D)
WY 14.643	(Biomol, Hamburg, D)

3.1.2 Kits

BCA Protein Assay Reagent Kit	(PerBio Science, Pierce Biotechnology Inc., Bonn, D)
Plasmid DNA Purification	(Macherey-Nagel, Düren, D)
RNA II Extraction Kit	(Macherey-Nagel, Düren, D)

3.1.3 Nukleinsäuren und Nukleotide

dNTP	(Sigma, Taufkirchen, D; Promega GmbH, Mannheim, D)
------	---

3.1.4 Primer

Alle Primer wurden mit Hilfe von computergestützten Datenverarbeitungssystemen erstellt. Das Programm Primerexpress 2.0 der Firma Applied Biosystems wurde für die Erstellung von Primersystemen mit Sonde verwendet, da es optimierte Algorithmen für die Benutzung mit dem Taqman Real-Time PCR System besitzt. Alle Sonden wurden mit 5'-FAM als Farbstoff und 3'-TAMRA als Quencher gelabelt (XT als Verbindungsbase). Bei Primersystemen für SybrGreen, das heißt Systemen ohne Sonde, kam das im Internet frei verfügbare Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) zur Anwendung. Sondensysteme

wurden für die in vitro Versuche verwendet, während SybrGreen bei den in vivo Versuchen zur Anwendung kam. Die Primer und das eingeschlossene Amplikon wurden jeweils gegen das gesamte Organismusgenom geblastet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und auf die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten hin überprüft.

Alle Primer wurden bei Tib-MolBiol (Berlin, D) synthetisiert.

Tabelle 3.1.: Verzeichnis der verwendeten Primer
(h=human, m=Maus, semi=semiquantitative PCR)

<i>Gen</i>	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Revers 3'-5'</i>	<i>Sonde 5'-3'</i>	<i>Annealing-temperatur (°C)</i>
h18s	TTCCAATTA CAGGGCCT CGA	CCTGAGAAAC GGCTACCACA T	CGCAAATTAC CCACTCCCGA CCC	60
hCPT1a	TGCTTTAC AGGCGCAA ACTG	TGGAATCGTG GATCCCAA A	ACCGGGAGGA AATCAAACCA ATTCGTC	60
hPPAR α	CTGCAAGG GCTTCTTT CGG	AATCGCGTTG TGTGTGACAT CC		68
m18s	TTAATGAG CCATTCGC AGTTTTC	ACCTGGTTGA TCCTGCCAGT AG	TGCATGTCTA AGTACGCACG GCCGT	60 (semi 67,3)
mAcsl1	CTCACCAC CTTCTGGT ATGC	AGCCATCGTA CATGGTTCTG A	TGGAAATAGC GGGTACCACT GATGGT	63
mCD36	GATTAATG GCACAGAC GCAGC	TCCGAACACA GCGTAGATAG ACC		60

mCpt1a	CGCACGGA	TGTGCCCAAT	65
	AGGAAAAT	ATTCCTGG	
	GG		
mCpt1b	CAAGTTCA	TCAAGAGCTG	60
	GAGACGAA	TTCTCCGAAC	
	CGCC	TG	
mCyp4a10	CCAGGAAC	GACCCTGGTA	67
	TGCATTGG	GGATCTGGCA	
	GAAA		
mPPAR α	GAAGGGCA	CTGTGATGAC	72
	CACGCGTG	AACGTCTTGT	
	CGAGTTTT	TCCCGAACT	
	CAG		
mPPAR γ	TTGACAGG	GAGCAGAGTC	62
	AAAGACAA	ACTTGGTCAT	
	CGGA	T	

3.1.5 Molekulargewichtsmarker

Semiquantitative PCR

GeneRuler 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D)

GeneRuler 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D)

Western Blotting

Prestained SDS-PAGE Standard (BioRad, München, D)

(Broad Range)

3.1.6 Enzyme

DNase	(Promega, Mannheim, D)
M-MLV RT RNase H Minus	(Promega, Mannheim, D)
RNAsin	(Promega, Mannheim, D)
Taq-Polymerase	(Promega, Mannheim, D)

3.1.7 Antikörper

Anti Maus Acs1 (Kaninchen monoklonal)	(Rosalind Coleman, Chapel Hill, USA)
Anti Maus Gapdh (Kaninchen polyklonal)	(Abcam, Cambridge, UK)
Anti Kaninchen IgG (Meerrettichperoxidase-konjugiert)	(Amersham, Freiburg, D)
Anti Maus IgG (Meerrettichperoxidase-konjugiert)	(Amersham, Freiburg, D)
Anti PPARalpha (Kaninchen polyklonal)	(Sigma, Taufkirchen, D)
Anti Ubiquitin (Maus monoklonal)	(Sigma, Taufkirchen, D)

3.1.8 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bovines Serum Albumin	(Sigma, Taufkirchen, D)
Dulbeccos Modified Eagle Medium (High Gluc.; + L-Glutamin, - Na-Pyruvat)	(Invitrogen, Karlsruhe, D)
DMEM/ F12 (inkl. HEPES und L-Glutamin)	(ATCC, Manassas, USA)
Fötales Rinderserum (FBS)	(Invitrogen, Karlsruhe, D)
Insulin, Transferrin, Na-Selenit (IST)	(Sigma, Taufkirchen, D)
Penicillin (10.000 U/ml)	(Invitrogen, Karlsruhe, D)
Streptomycin (10.000 µg/ml)	(Invitrogen, Karlsruhe, D)
Phosphate-Buffered-Saline (PBS) pH 7,4	(Invitrogen, Karlsruhe, D)
Trypsin/ EDTA	(Invitrogen, Karlsruhe, D)

3.1.9 Zelllinien und Versuchstiere

Homo sapiens, Zelllinie:

HepG2 (ATCC, Manassas, USA)

Mus musculus, Zelllinie:

AML12 (ATCC, Manassas, USA)

Rattus norvegicus, Zelllinie:

COS-7 (ATCC-LGC Promochem, Wesel, D)

Mus musculus, Stamm:

C57BL/6J (Harlan-Winkelmann, Borcheln, D)

3.1.10 Ausgewählte Zusatzmaterialien

Filmmaterial:

Hyperfilm (Amersham, Freiburg, D)

Fotochemikalien (Entwickler, Fixierer) (AGFA Gaevert, Köln, D)

Membranen und Filter:

Hybond-P PVDF Membran (Amersham, Freiburg, D)

Hybond-C extra Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg, D)

Sterilfilter 0,2 µm (Schleicher und Schuell, Nürnberg, D)

Zellkulturzubehör:

Zellkulturplatten und –flaschen in
diversen Größen (Nunc, Wiesbaden, D; BD Bioscience,
Heidelberg, D)

Einmalküvetten

3.1.11 Puffer und Lösungen

Für gebräuchliche molekularbiologische Techniken wurden, sofern nicht extra erwähnt, Puffer und Lösungen nach Standardprotokollen hergestellt [177]. Hierfür wurde nur gereinigtes Wasser (Millipore) verwendet. Nachfolgend sind einige ausgewählte Puffer aufgelistet, die hauptsächlich für die Western-Blot Methode gebraucht wurden.

TBS-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl
TBST-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05 % Tween 20 (v/v)
Blotpuffer:	ddH ₂ O; 48 mM Tris-HCl; 39 nM Glycin; 0,375 % SDS; 20 % Methanol
Trenn-/ Sammel- gelpuffer:	ddH ₂ O; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 10 % SDS-Stammlösung; 30 % Bis-Acrylamid; 10 % Ammoniumpersulfat, TEMED
Probenpuffer:	ddH ₂ O; 0,25 M Tris-HCl pH 6,8; 8,5 SDS; 40 % Glycerol; 20 % 2-Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau
Elektrodenpuffer:	ddH ₂ O; 0,25 M Tris-HCl pH 8,3; 1,92 M Glycin, 1 % SDS (10x)

3.1.12 Material und Geräte

Zellkultur:

Neubauerzählkammer	(Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen,D)
Mikroskop Olympus CK 40	(Olympus, Hamburg, D)
Laminar-Flow-Arbeitsbank: LaminAir 1.2.	(Heto-Holten, Allerod, DK)
CO ₂ -Inkubator: HeraCell 150	(Heraeus, Hanau, D)
Zentrifuge Universal 32 R	(Hettich, Bäch, CH)

RNA-Expressionsbestimmung:

UV-Meter DU 530	(Beckman, Krefeld, D)
2100 Bioanalyzer	(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)
RT-PCR-Cycler: iCycler	(BioRad, München, D)
Real-Time-PCR-Cycler:	
Abi Prism 7000	(Applied Biosystems, Darmstadt, D)
Mx3000P™	(Stratagene, La Jolla, USA)

Western Blotting:

Spektrophotometer SmartSpec	(BioRad, Hercules, USA)
-----------------------------	-------------------------

3.2 Methoden**3.2.1 Molekularbiologische Methoden****3.2.1.1 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

PCR-Ansätze erfordern eine individuelle Anpassung der Reaktionsbedingungen. Die hier dargestellten Inkubationszeiten und Komponentenkonzentrationen sind Richtwerte, die je nach Optimierungsbedarf verändert wurden.

Standard-PCR Reaktionsansatz:

25	ng cDNA / 250 ng genomische DNA
2,5	µl 10x Reaktionspuffer
0,5	µl 10 mM dNTPs
1	µl 50 mM MgCl ₂
0,5	µl 20 µM Forward Primer
0,5	µl 20 µM Reverse-Primer
0,125	µl Taq-Polymerase

ddH₂O ad 25 µl

PCR-Programm:

5 Minuten	94°C	} 34 Zyklen
30 Sekunden	94°C	
30 Sekunden	Annealingtemperatur	
45 Sekunden	72°C	
5 Minuten	72°C	

Jedes später für die Real-Time PCR verwendete Primerpaar wurde standardmäßig mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen und, wenn nötig, nach Bestimmung der optimalen Temperatur in verschiedenen Konzentrationen von Forward und Reverse Primer (Primermatrix) getestet.

3.2.1.2 Real-Time PCR

Im Gegensatz zur semiquantitativen PCR kann bei der Real-Time PCR der gesamte Amplifikationsprozess verfolgt werden. Mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunimmt, kann so direkt auf die enthaltene Menge einer Nukleotidsequenz geschlossen werden. Es wurden unspezifische Detektionssysteme (SybrGreen®) und spezifisch markierte Sonden eingesetzt. Die höhere Genauigkeit und Sensitivität dieser SONDENSYSTEME resultiert aus der sequenzspezifischen Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals. Die SONDENSYSTEME erhalten durch Hybridisierung an die Zielsequenz und Trennung der räumlichen Nähe des Quenchers vom Farbstoff durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Fähigkeit zur Fluoreszenz. SybrGreen® dagegen wird durch Einlagerung in Doppelstränge zur Fluoreszenz befähigt, welche mit dem Amplifikationsprozess korreliert.

Bei den Messungen kamen ein Applied Biosystems Abi Prism 7000 Sequence Detection System oder ein Stratagene Mx3000P zur Anwendung, die beide mit firmeneigener Software ausgerüstet waren (ABI7000 2.0; Mx3000P). Alle Gene wurden mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen, die Annealingtemperaturen wurden entsprechend den Primereigenschaften verändert.

Die geläufigsten Methoden zur Analyse von Real-Time PCR-Daten sind die absolute und die relative Quantifizierung. Eine absolute Quantifizierung bestimmt die eingesetzte Kopienzahl an Molekülen beispielsweise durch Vergleich des PCR-Signals mit einer Standardkurve. Bei der relativen Quantifizierung wird dagegen das PCR-Signal des Zieltranskriptes einer Behandlungsgruppe mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen.

Zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse wurde für die mit Sonde gemessenen Gene eine Standardkurve erstellt, welche die Effizienz der Amplifikation widerspiegelt und zur Berechnung des Gehalts nötig ist. Bei einem optimalen Amplifikationsprozess beträgt der Abstand zwischen den einzelnen Signalen der Standardkurve bei einer Verdünnung von 1:2 einen Zyklus. Die durch den linear verlaufenden Bereich der Amplifikation gehende Linie wird als Schwellenwert = „threshold“ bezeichnet, der zum Erhalt eines Zahlenwertes zum Vergleich der Proben herangezogen wird (ct-Wert).

Zur Auswertung der mit SybrGreen® gemessenen Proben kam die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode zur Anwendung. Diese ist ein effizienter Weg, um die relativen Veränderungen der Genexpression aus Real-Time PCR-Daten zu bestimmen, da hierfür der Platz, den die Standardkurve einnimmt, direkt für die Probenmessung verwendet werden kann. Der ct-Wert beschreibt den Zyklus ct, bei dem die hervorgerufene Fluoreszenz und somit die Targetmenge einen festen Schwellenwert erreicht. Wie viele Amplifikationszyklen erforderlich sind, um die Targetmenge zu bilden, ist von der PCR-Effizienz und der Ausgangsmenge an cDNA abhängig. Für Amplikate, die kleiner als 150 Basenpaare (bp) sind und deren Primer- und Mg^{2+} -Konzentrationen optimiert wurden, ist die Effizienz nahezu eins, das heißt, eine Verdopplung des PCR-Produktes hat mit jedem Zyklus stattgefunden. Die Ermittlung der ct-Werte erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Aus den daraus berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werten wurde anschließend das arithmetische Mittel bestimmt. Das Expressionsniveau wurde jeweils relativ zu einer Probe, die als Standard mit 100 % gesetzt wurde, angegeben.

Standard-Real-Time Reaktionsansatz:

2	ng	cDNA
12,5	µl	2x Mastermix (mit oder ohne SybrGreen®)
0,25	µl	20 µM Forward Primer
0,25	µl	20 µM Reverse Primer
0,25	µl	20 µM Sonde (bei Systemen ohne SybrGreen®)

ddH₂O ad 25 µl

Jede Probe wurde mindestens dreifach gemessen und dann auf die Expression des stabil exprimierten „Housekeeping-Gens“ bezogen. In diesem Fall handelte es sich um die mitochondriale Untereinheit 18S.

3.2.1.3 RT-Reaktion zur cDNA-Synthese

1. 1µg mRNA wurde mit 1 µg Random-Primern in einem Volumen von 13,5 µl versetzt und die Mischung 5 Minuten bei 70°C denaturiert.
2. Die Probe wurde auf 4°C gekühlt und mit folgenden Reagenzien versehen:

0,5	µl	RNasin (Promega)
4	µl	5x First strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)
1	µl	10 mM dNTP-Mix
1	µl	M-MLV RT RNase H Minus (Promega)
3. Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Analyse der cDNA durch PCR.

3.2.1.4 Kultivierung von Bakterien

Die Herstellung und Transformation von Bakterienzellen erfolgte durch eine Polyethylenglykol-abhängige chemische Kompetenz des E. coli Stamms XL1-blue [178]. Dies wurde wie folgt erreicht:

1. Mit 1 ml Übernachtskultur 100 ml LB animpfen, bis OD 0,3-0,6 wachsen lassen
2. 10 Minuten bei 2.500g abzentrifugieren

3. In 7,5 ml IMT resuspendieren, dann 1 Stunde auf Eis inkubieren
4. Aliquotieren und in flüssigem Stickstoff einfrieren

Der eigentliche Transformationsvorgang wird nach folgendem Protokoll induziert:

5. 20 µl KCM 5x mit 80 µl Plasmidlösung (20-100 ng Plasmid) verdünnen
6. 20 Minuten auf Eis und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
7. 1 ml LB-Medium zugeben und 1 Stunde bei 37°C leicht schütteln
8. Auf eine antibiotikahaltige Platte ausstreichen und über Nacht bei 37 Grad wachsen lassen

Die durch die Transformation erworbene Antibiotikaresistenz erlaubt die Selektion der positiven Kolonien, welche dann zu präparativen Zwecken in LB-Medium überführt wurden.

3.2.1.5 Isolation von Plasmid-DNA

Midi-und Maxi-Präparation zu präparativen Zwecken:

Zur Isolation von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken wurden die Kits zur Plasmidextraktion „Maxi“ verwendet und die Präparation nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Mini-Präparation zu analytischen Zwecken:

Hierfür wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit verwendet und die Präparation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.1.6 Isolation von mRNA

Die Isolation von mRNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Nucleo-Spin RNA II Kits gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei wird die RNA an Polymere gebunden, die dann gewaschen werden und mit polarem Lösungsmittel die mRNA wieder freisetzen.

Bei der RNA-Präparation aus Organewebe kam die Trizol®-Methode zur Anwendung. Diese beruht auf dem Prinzip der RNA-Isolation in einem Schritt nach Chomczynski und Sacchi [179]. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

3.2.1.7 Kontrolle der mRNA-Qualität

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten mRNA wurde der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis der Extinktionswerte bei einer Wellenlänge des Lichts von 260 und 280 nm wurde errechnet und nur Proben mit einem Zahlenwert größer 1,6 verwendet. Ein kleinerer Quotient weist auf mögliche Verunreinigungen mit Proteinen, bzw. Salzurückständen hin, die dann beim Umschreiben zu Ungenauigkeiten führen können.

Alternativ wurde die mRNA mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzers qualifiziert und quantifiziert. Dazu wird 1 µl jeder Probe in einem Chip ähnlich einer TBE-Gelelektrophorese einer Elektrophorese unterzogen, vermessen und die Qualität anhand des Quotienten aus 18S und 28S RNA bestimmt.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Proteinisolation

Nach entsprechender Stimulation wurden die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Schabers abgelöst, in ein Eppendorftube überführt und das Pellet in Proteinlysepuffer aufgenommen. Anschließend wurde das Gemisch 30 Minuten bei höchster g-Zahl zentrifugiert und der Überstand, der den gelösten Proteinen entspricht, in ein neues Eppendorfgemäß überführt und einer Immunpräzipitation unterzogen.

Zur Proteinisolation aus Organgewebe kam die Trizol®-Methode zur Anwendung.

3.2.2.2 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation werden Peptide oder Proteine, die spezifisch an einen Antikörper binden, aus Zelllysaten entfernt. Vor der Immunpräzipitation sind die Antikörper normalerweise auf den Sepharosebeads immobilisiert, indem sie an die unlösliche Komponente wie Protein A oder G gebunden sind. Die Wahl des immobilisierten Antikörperbindepoteins hängt von der Spezies ab, in der der Antikörper

ausgebildet wurde. Protein A bindet gut an Kaninchen-, humanes, Meerschweinchen-IgG und Maus-IgG_{2a/b}. Protein G bindet stark an Ziegen-, Schaf- und Hasen-IgG. Um den Antikörper auf der Protein A-Sepharose Matrix zu immobilisieren, wurden die beads in PBS bei Raumtemperatur aufgequollen. Anschließend wurden sie zweifach in PBS gewaschen und auf 50 % (v/v) verdünnt. Nach Zugabe eines geeigneten Antikörpers (2 µg Antikörper auf 50 µl Lösung) erfolgte die Inkubation für zwei Stunden auf einem Tischrotor bei 4°C. Die Zellysate wurden daraufhin für eine halbe Stunde bei 4°C mit der Sepharosemischung inkubiert, um das Lysat zu präabsorbieren. Nach zehnmütiger Zentrifugation (10.000g, 4°C) wurde der Überstand der eigentlichen Immunpräzipitation unterzogen, indem er über Nacht mit neuem Sepharose-Antikörper Mix inkubiert wurde. Abschließend wurde mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen und die übrig bleibenden beads nach restloser Entfernung des RIPA-Puffers mit 1x SDS Gelladepuffer gekocht (2 Minuten, 95°C).

3.2.2.3 Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Gehaltsbestimmung von Proteinen wurde das BCATM Protein Assay Reagent Kit verwendet. Dazu wurden durch Standardkurven lineare Bereiche zwischen Proteingehalt und Absorption des Farbkomplexes ermittelt und für die Berechnung des Gehalts der Proben herangezogen.

3.2.2.4 Western Blotting

Hierbei wurden 40 µg Protein mit 4x oder 6x Laemmlipuffer versetzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel (7-12 %, je nach Proteingröße) geladen, das mit einer darüberliegenden etwa 1,5 cm großen Schicht eines niedrigprozentigen Sammelgels versehen war. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Laemmli [180]. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine unter Verwendung einer Nassblotchkammer auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Transferbedingungen des Blot-Apparaturherstellers wurden befolgt.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine wurden die Membranen mit Ponceaufarbstoff und die Gele mit einer Coomassielösung gefärbt. Die Membran wurde anschließend kurz in ddH₂O entfärbt und in TBS-Puffer mit 5 % Milchpulver für 90

Minuten geblockt. Der Erstantikörper wurde 1:250 (PPAR α), 1:6.000 (Acs11) oder 1:50.000 (GAPDH) in 0,02 % TBST (PPAR α) oder 5 % Blockingreagenz (Milchpulver) verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für zehn Minuten mit TBST-Puffer entfernt. Der Zweitantikörper (Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Maus, bzw. Anti-Kaninchen Antikörper) wurde 1:1.000 verdünnt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST erfolgte die Peroxidasereaktion mit ECL als Chemilumineszenz und die Auflage eines Filmes. Nach entsprechender Inkubationszeit (10 Sekunden bis 40 Minuten) wurde der Film entwickelt und gescannt. Als Ladungskontrolle wurde der Blot mit einem Antikörper gegen das stabil exprimierte 36 kDA schwere Gapdh untersucht.

Der Antikörper gegen Acs11 wurde freundlicherweise von Professor Rosalind A. Coleman (Department of Nutrition, University of North Carolina, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt [181].

3.2.3 Zellkulturtechniken und Transfektionen

3.2.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Kulturmedien:	COS-7	DMEM 10 % FBS 1 % Pen./ Strep.
	HepG2	DMEM 15 % FBS 1 % Pen./Strep.
	AML12	DMEM/ F12 10 % FBS 0.005 mg/ml Insulin 0,005 mg/ml Transferrin 5 ng/ml Selen 40 ng/ml Dexamethason

Die Zellen wurden standardmäßig kultiviert und die Medien alle zwei Tage erneuert.

3.2.3.2 Transiente Transfektion von adhärennten Zellkulturen

Zur transienten Differenzierung der Zellen wurde das Lipofectamin® 2000 Reagenz benutzt. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. In einem ersten Ansatz wurde die Plasmid DNA in OPTIMEM verdünnt, in einem zweiten Ansatz Lipofectamin® 2000 Reagenz in OPTIMEM für fünf Minuten inkubiert. Nach dem Vereinigen der beiden Ansätze und 20 Minuten Inkubation wurde diese Mischung auf die Zellen verteilt, die zuvor mit PBS gewaschen und auf DMEM ohne Antibiotika gesetzt wurden. Die Transfektionszeit betrug zwischen drei und vier Stunden. Anschließend wurde wieder serumhaltiges Medium zugegeben und entsprechend stimuliert.

3.2.3.3 Bestimmung der Luziferaseaktivität und β -Gal-Aktivität in Reporterassays

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität von Reporter genen wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System benutzt. Die Anwendung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Nach der Inkubation für 24 oder 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, im passiven Lysepuffer aufgenommen und kurz an zentrifugiert. Parallel wurden zwei verschiedene Substratlösungen hergestellt, die zum einen für die Firefly-Reporterluziferase und zum anderen für die Renillaluziferase (als Normierung) zur Aktivitätsbestimmung dienen. Nach Messung der Proben im Luminometer wurde aus den beiden Luziferasemessungen der Quotient gebildet.

3.2.4 Versuchstiere

Die in vivo-Versuche erfolgten in Kooperation mit Markus Clemenz, der den nachfolgend beschriebenen 26-wöchigen Versuch durchführte [172]. Männliche C57BL/6J-Mäuse wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 25°C und einem jeweils zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Die Ernährung erfolgte mittels einer Hochfettdiät (60 % der Energie aus Fett) für 16 Wochen, bevor die Randomisierung in eine der drei Behandlungsgruppen erfolgte: In eine mit Vehikel (0,5 % Tween80/ H₂O,

n=10, in den Abbildungen mit K bezeichnet), sowie jeweils eine mit 3 mg/kg/d Telmisartan oder 10 mg/kg/d Pioglitazon behandelte Gruppe (n jeweils 6). Diese Behandlung wurde per Sonde für weitere zehn Wochen durchgeführt. Eine weitere Gruppe (n=6) erhielt für die 26 Wochen des Experiments eine Kontrolldiät (10 % der Energie aus Fett, nachfolgend als ND (Normaldiät) bezeichnet). Wöchentlich wurden das Gewicht gemessen und ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Die Lokalisation und Quantifizierung der Fettdepots erfolgte mittels Magnetresonanztomographie. Vor und nach dem Behandlungszyklus erfolgte unter Isoflurananästhesie eine morgendliche Nüchternblutentnahme durch Punktion der V. retroorbitalis zur Bestimmung der Serumtriglyzeride. Nach Beendigung des Experiments wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen. Die RNA-, bzw. Proteinextraktion erfolgten mit der Trizol®-Methode (vgl. 3.2.1.6).

3.2.5 Statistische Berechnungen

Die Zellkultur- und Transfektionsexperimente wurden mit Hilfe des parametrischen Student-t-Tests analysiert, da durch bisherige Erfahrungen von einer Normalverteilung der Werte auszugehen ist. Gemäß den Anforderungen wissenschaftlicher Journale wurden Genexpression der genetisch uniformen Zelllinien und Luziferaseaktivitäten in dieser Weise einer konfirmatorischen Datenanalyse auf Signifikanz hin untersucht. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Die graphische Darstellung erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung. Bei Ergebnissen, die durch Experimente mit Zellen aus verschiedenen Versuchstieren generiert wurden, kamen Einweg-ANOVA Tests mit anschließendem multiplen Bonferroni-Vergleich zur Anwendung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Softwareprogramme Excel (Office 2000, Microsoft, Redmond, USA), und SPSS 12.0.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der AT₁-Blocker auf die PPAR_α-Ligandenbindungsdomäne

Um genauere mechanistische Einblicke in die Wirkungsweise der AT₁-Antagonisten zu bekommen, sollte die LBD mittels eines Aktivierungssystems, basierend auf dem Gal4-Transkriptionsfaktor aus der Hefe, untersucht werden. Dort steuert dieser Faktor die Expression des Galaktosidasegens. Gal4 kommt nur in der Hefe vor und beeinflusst die Genexpression bei der Transfektion in Säugerzellen nicht [182]. Der Vektor kodiert ein Funktionsprotein aus der PPAR_α-LBD und dem Gal4-Transkriptionsfaktor. Ein weiterer Vektor besteht aus der Gal4-DBD und einer Luziferase. Nur bei einer direkten Interaktion mit der LBD erhält der Gal4-Transkriptionsfaktor die Fähigkeit zur Bindung an seine DBD und damit zur Expression seiner Luziferase. Dieses Vektorsystem und der Renilla-Luziferasevektor als Referenz wurden in COS-7-Zellen transfiziert und anschließend mit verschiedenen Dosierungen von AT₁-Antagonisten, beziehungsweise den vollen Agonisten für 36 Stunden stimuliert. Unter den AT₁-Antagonisten wurden diejenigen ausgewählt, die kürzlich als partielle PPAR_γ-Agonisten beschrieben worden waren [173]. Als Referenzsubstanzen wurden die PPAR_α-Liganden Fenofibrinsäure, der aktive Metabolit des Fenofibrats [183] und WY 14.643 [184] verwendet. Fenofibrat findet Anwendung in der Behandlung der Hypertriglyzeridämie, sowie zur Senkung des LDL-Cholesterins, während es sich bei WY 14.643 um eine rein experimentell verwendete Substanz handelt. Nach Ablauf der 36-stündigen Stimulation wurde die Luziferaseaktivität vermessen und gegen die Aktivität eines kotransfizierten β-Galvektors abgeglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

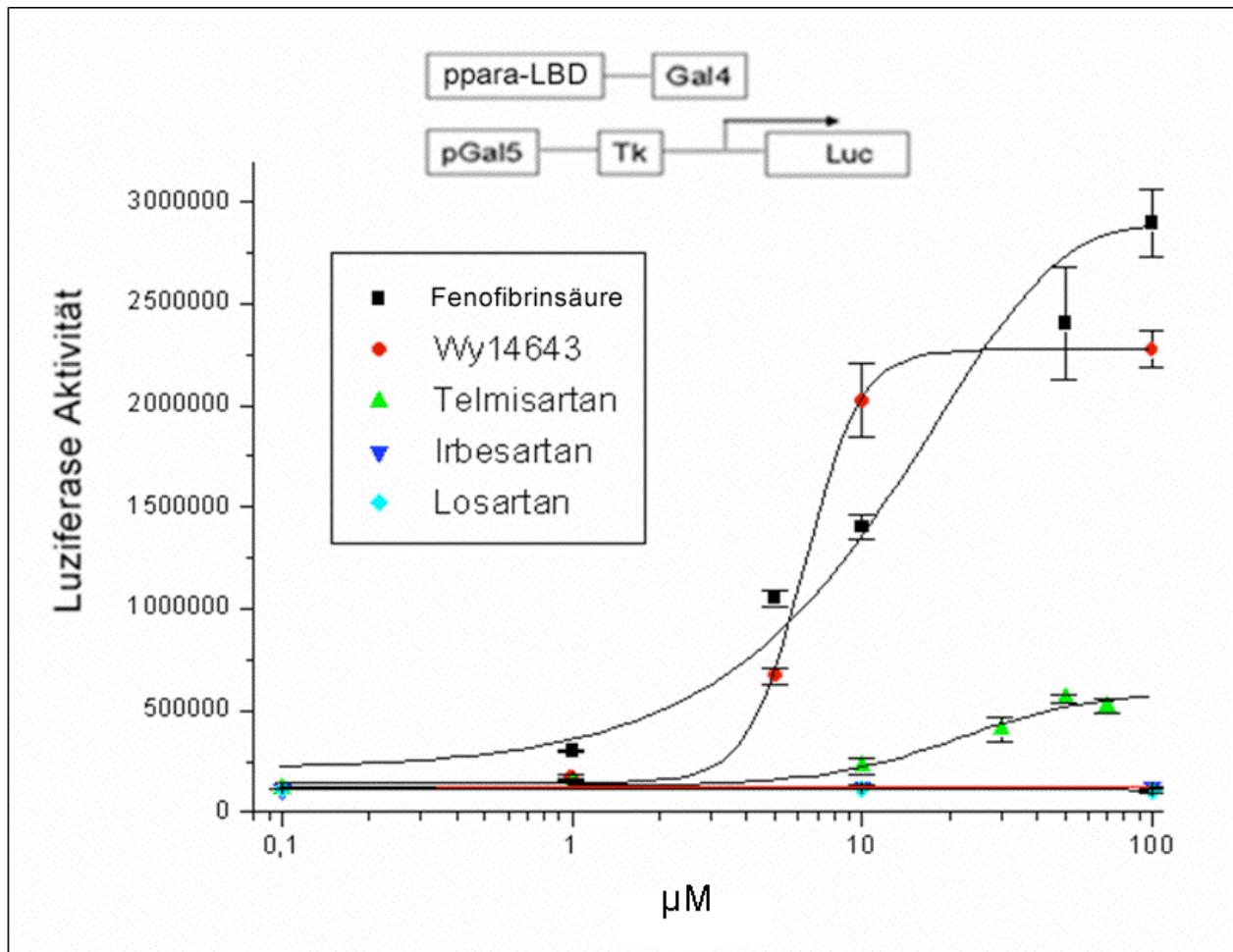


Abbildung 4.1: Aktivierung der PPAR α -LBD durch Liganden

Fenofibrinsäure und WY 14.643 aktivieren, wie in der Literatur beschrieben [185], die PPAR α -LBD im μ M-Bereich. Telmisartan zeigt eine partielle Aktivierung oberhalb von 10 μ M, während Irbesartan und Losartan keine Interaktion mit der PPAR α -LBD aufweisen. Die EC₅₀-Werte und Effizienzen der Aktivierung sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

	EC ₅₀ (µM)	Effizienz, relativ zu Fenofibrinsäure
Fenofibrinsäure	18,2	100 %
WY 14.643	6,4	80 %
Telmisartan	21,8	18 %
Losartan und Irbesartan	-	-

Tabelle 4.1: Vergleich von EC₅₀-Werten und Effizienzen der PPAR α -LBD Aktivierung

4.2 Einfluss des AT₁-Blockers Telmisartan auf die PPAR α -Zielgenexpression in vitro

Den Agonismus eines Liganden kann man entweder direkt anhand von Interaktionsstudien mit dem Rezeptor oder aber durch die Betrachtung von Zielgenen des Rezeptors untersuchen. Jeder nukleäre Rezeptor induziert als Transkriptionsfaktor, je nach dessen metabolischer Funktion, ein bestimmtes Muster an Zielgenen [120]. Die schwache Aktivierung der PPAR α -LBD durch den einzig verbliebenen Agonisten Telmisartan im Gal4-Transaktivierungsversuch warf allerdings die Frage auf, ob sich ein Effekt auf die Zielgenexpression von PPAR α darstellen ließe. Aufgrund des Verteilungsmusters von PPAR α mit der stärksten Aktivität in Lebergewebe [156] wurde die Zielgenexpression deswegen in zwei Leberzelllinien untersucht.

4.2.1 PPAR α -Zielgenexpression in HepG2-Zellen

Für die Analyse der Wirkung von Telmisartan auf die PPAR α -Zielgenexpression wurde die humane Hepatoblastomzelllinie HepG2 ausgewählt, ein etabliertes Zellmodell zur Untersuchung des Leberstoffwechsels [186, 187] und der PPAR α -Zielgenexpression [188, 189]. Um den Zellstoffwechsel auf ein basales Niveau zu reduzieren, wurden die Zellen zunächst für 16 Stunden mit serumarmem (0,5 %) DMEM behandelt, bevor sich die Inkubation mit Telmisartan anschloss. Als Zielgen wurde die Expression der Leberform der Carnitinpalmitoyltransferase-1 (CPT1a) gewählt, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Fettsäureoxidation [59, 60]. Diese schleust aktivierte Fettsäuren (Acyl-CoAs) durch die äußere Mitochondrienmembran. Die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) übergibt diese dann an die in der inneren Mitochondrienmembran sitzende CPT2.

Telmisartan induziert CPT1a nach 48 Stunden. In einem ersten Schritt wurde zunächst ein Zeitverlauf erstellt. Dafür wurde zwischen sechs und 48 Stunden mit 50 μ M Telmisartan oder dem Vehikel DMSO behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR. Als Kontrolle diente die stabil exprimierte 18S Untereinheit, auf die die einzelnen Werte bezogen wurden. Nach sechs Stunden (vgl. Abbildung 4.2) zeigte sich die mRNA-Expression unverändert ($0,09 \pm 0,06$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle), nach zwölf Stunden war sogar eine Herunterregulation ($0,62 \pm 0,05$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle) erkennbar, die jedoch nicht signifikant war. Weitere zwölf Stunden später ließ sich erstmals eine geringe Stimulation feststellen ($1,24 \pm 0,05$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, $p > 0,05$), diese war 48 Stunden nach Versuchsbeginn deutlich ausgeprägt ($2,84 \pm 0,63$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, $p < 0,001$) und erreichte auch ein entsprechendes Signifikanzniveau. Dieser Zeitpunkt wurde dann für den sich anschließenden Dosisverlauf ausgesucht. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich HepG2-Zellen mit 100 μ M WY 14.643 behandelt. Auf Abbildung 4.3 ist die Geninduktion nach 48 Stunden dargestellt. Sie erreicht eine $6,60 \pm 1,60$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,05$).

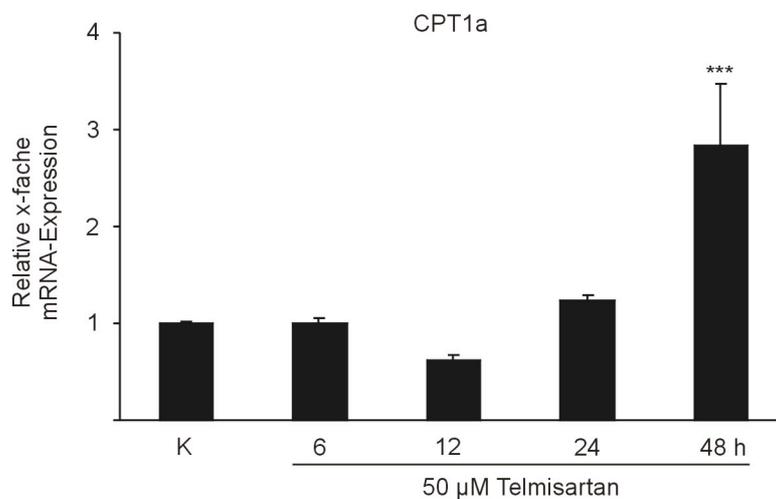


Abbildung 4.2: CPT1a Expression durch Telmisartan in HepG2-Zellen

Darstellung eines Zeitverlaufs mit 50µM Telmisartan für 6, 12, 24 und 48h, wobei die Expression zur Vehikelbehandlung (K) relativiert wurde. Die 2,8 fache Induktion nach 48h ist statistisch signifikant (***) $p < 0,001$, $n=3$).

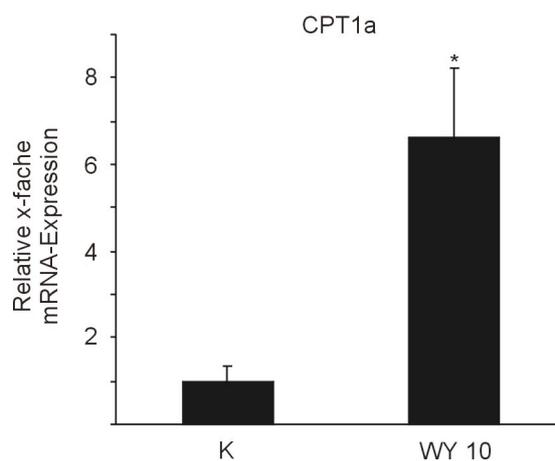


Abbildung 4.3: CPT1a Expression durch WY 14.643 in HepG2-Zellen.

Geninduktion nach 48-stündiger Stimulation mit 100 µM WY 14.643. Die Expression wurde zur Vehikelbehandlung (K) relativiert (* $p < 0,05$, $n=5$).

Telmisartan induziert CPT1a bereits bei 10 μM . Für den Dosisverlauf wurden die Zellen für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Telmisartan, bzw. dem Vehikel DMSO inkubiert (vgl. Abbildung 4.4). Bei der mit 0,1 μM niedrigsten Dosis zeigte sich keinerlei Induktion ($1,08 \pm 0,02$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle), diese war jedoch bereits bei Konzentrationen von 1 μM darstellbar ($1,30 \pm 0,18$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle), jedoch nicht signifikant von der Nullkontrolle verschieden. Bei der mit 10 μM nächsten Stufe wurde dieses Niveau dann bei einer Induktion von $1,53 \pm 0,16$ ($p < 0,05$) erreicht. Eine deutliche Expressionssteigerung war schließlich bei der höchsten Konzentration (50 μM) auszumachen. Hier erreichte die CPT1a mRNA-Expression eine $2,84 \pm 0,63$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,001$).

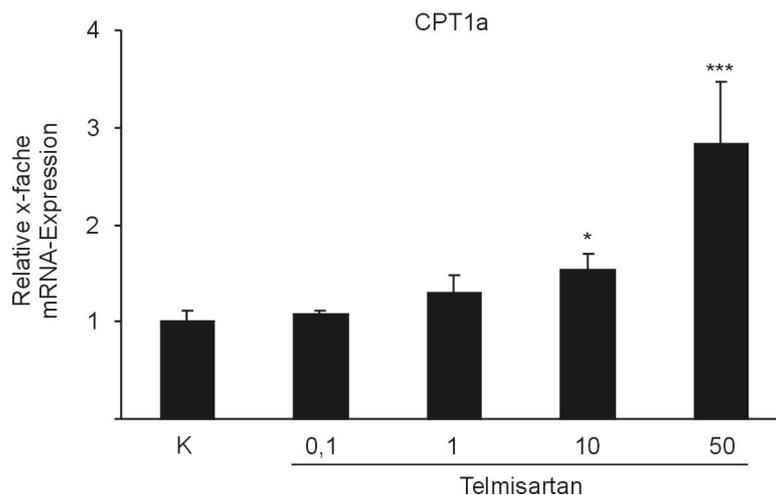


Abbildung 4.4: CPT1a Expression in HepG2-Zellen

Auf dem Diagramm ist ein Dosisverlauf der mRNA-Expression von CPT1a im Verhältnis zu vehikelbehandelten Zellen (K) mit 0,1, 1, 10 und 50 μM Telmisartan nach 48h dargestellt. Die Induktionen mit 10 und 50 μM sind statistisch signifikant (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, $n=3$).

4.2.2 PPAR α -Zielgenexpression in AML12-Zellen

Als zweite Zelllinie wurden murine AML12-Zellen gewählt. Maus- oder Rattenleberzellen eignen sich für die Untersuchung von PPAR α deswegen besonders, weil sie circa zehnfach höhere Spiegel des Transkriptionsfaktors aufweisen als humane Zellen [115]. Als Zielgen wurde die Langketten-Acyl-CoA Synthetase 1 (Acs1) gewählt, da hierzu umfangreiche Voruntersuchungen aus der Literatur bekannt sind [122, 190]. Acs1 wird in Säugetieren in fünf Isoformen exprimiert, wobei das leberspezifische Acs1 außerdem in differenzierten Fettzellen und dem Herzen vorkommt [191]. Das Enzym aktiviert langkettige Fettsäuren und stellt diese der weiteren Verwendung in der β -Oxidation oder Triacylglycerolsynthese zur Verfügung. Die Spezifität für den jeweiligen metabolischen Weg kommt wahrscheinlich durch die zellkompartimentspezifische Expression zu Stande. So wird am Fettsäurekatabolismus beteiligtes Acs1 vorwiegend in Mitochondrien und Mikrosomen exprimiert, während die Synthese im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet [192].

Telmisartan induziert Acs1 in einer Konzentration von 10 μ M. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 0,5-prozentigem DMEM behandelt, bevor die Behandlung mit 10 μ M Telmisartan für 48 Stunden erfolgte. Zusätzlich wurden Zellen als Positivkontrolle mit 10 μ M WY 14.643 behandelt. Abbildung 4.5 zeigt das Ergebnis nach Auswertung mittels Real-Time PCR. Für Telmisartan ergab sich eine Acs1-Induktion von $2,37 \pm 0,1$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,001$), die gleiche Konzentration WY 14.643 zeigte eine Steigerung von $1,46 \pm 0,12$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,01$) gegenüber den mit DMSO (K) behandelten Zellen.

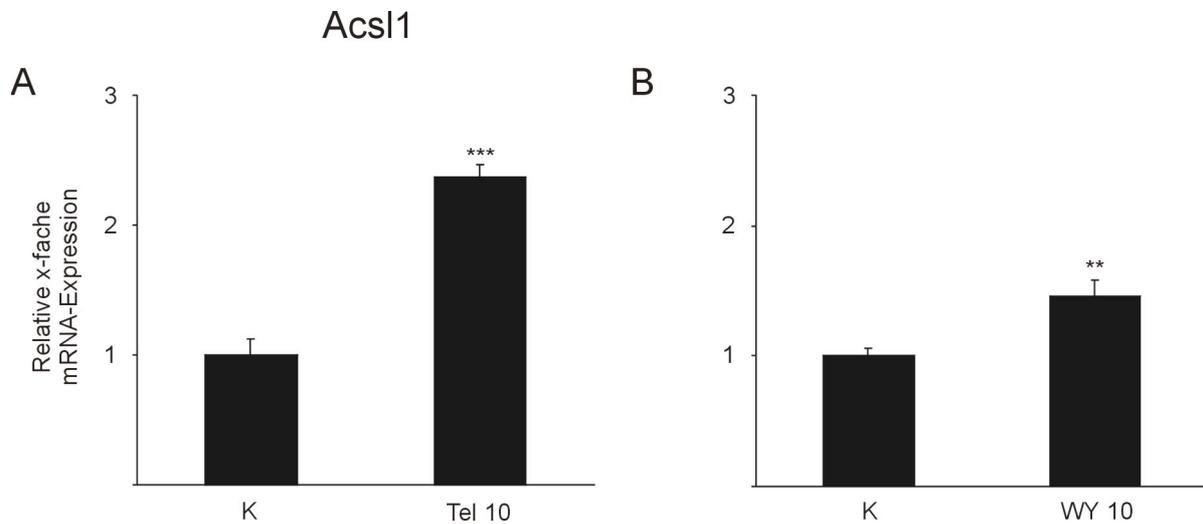


Abbildung 4.5: Acsl1-Expression in AML12-Zellen

Das Diagramm zeigt die mRNA-Expression nach 48-stündiger Behandlung mit

- A) 10 μ M Telmisartan oder
- B) 10 μ M WY 14.643

4.3 Einfluss des AT₁-Blockers Telmisartan auf die PPAR α -Zielgenexpression in vivo

Zur Verifizierung der in den in vitro Experimenten gewonnenen Ergebnisse sollten dieselben Zielgene in vivo überprüft werden. Dazu wurden C57BL/6J-Mäuse hinsichtlich ihrer PPAR α -Zielgenexpression untersucht. Diese Mäuse werden häufig als Tiermodell für das metabolische Syndrom verwendet, da sie unter hochkalorischer Diät Zeichen der Insulinresistenz aufweisen [193]. Die Tiere haben sowohl eine gestörte Insulinsensitivität als auch Glukosetoleranz bei gleichzeitig bestehender Hypertriglyzeridämie. Im Vergleich zu den mit einer Niedrigfettdiät behandelten Mäusen zeigten die Tiere auf Hochfettdiät nach 16 Wochen Diät eine deutliche Insulinresistenz

und gestörte Glukosetoleranz [172]. Unter zehnwöchiger Therapie mit Telmisartan und Pioglitazon verbesserten sich sowohl die Insulinresistenz als auch die Glukosetoleranz [172]. In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Auswirkungen der Telmisartantherapie auf die Expression von PPAR α -Zielgenen im Bereich der Fettsäureoxidation sowie von Leberfunktionsparametern untersucht. Für die Zielgenexpression wurden zunächst die RNA von Leber- und Muskelgewebe (M. soleus) isoliert und mittels quantitativer Real-Time-PCR ausgewertet.

4.3.1 Zielgenexpression in Lebern von C57BL/J6 Mäusen

Die Auswertung der Zielgenexpression erfolgte in den mit Telmisartan, Pioglitazon und Vehikel (K) behandelten Tieren. Als externer Vergleich diente noch die Normaldiätgruppe (ND). Pioglitazon wurde als Vergleich gewählt, da dieses Thiazolidindion zusätzlich zu seinen Eigenschaften als PPAR γ -Ligand auch als schwacher PPAR α -Agonist beschrieben wurde [194]. Die Expressionswerte wurden stets mit den Werten der Hochfettgruppe ohne Therapie abgeglichen und die Signifikanzniveaus für diese berechnet.

Telmisartan induziert Cpt1a und Acs11 in Lebern von C57BL/6J-Mäusen. Die nach der 16-wöchigen Startphase begonnene Behandlung mit Telmisartan ergab eine $3,16 \pm 0,44$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle für Cpt1a ($p < 0,01$, $p < 0,05$ gg. ND (vgl. Abbildung 4.6 A)). Die mit Pioglitazon behandelten Tiere erreichten eine $0,80 \pm 0,18$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle (nicht signifikant). Im Vergleich Hochfettdiät-Normaldiät ergab sich für die Normaldiät eine Expression von $1,50 \pm 0,30$ -fach (nicht signifikant). Telmisartan steigerte die Expression von Acs11 auf das $2,52 \pm 0,34$ -fache vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,001$, $p < 0,001$ vs. Pioglitazon), Pioglitazon zeigte eine Induktion von $1,15 \pm 0,14$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle. Die Tiere auf Normaldiät erreichten ein Expressionsniveau von $0,78 \pm 0,06$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle. (vgl. Abbildung 4.6 B).

Zusätzlich wurde noch die mRNA-Expression von Cyp4a10 gemessen, einem Enzym der mikrosomalen ω -Oxidation, das durch langkettige Fettsäuren und PPAR α -Aktivatoren stark induzierbar ist. In den Lebern der Mäuse zeigte sich, dass die

Hochfettdiät im Vergleich zur Normaldiät die Expression dieses Enzyms ungefähr um das siebenfache steigerte ($1,00 \pm 0,10$ vs. $0,14 \pm 0,02$, $p < 0,001$). Für Telmisartan ließ sich mit einer $1,47 \pm 0,33$ -fachen Induktion vs. unbehandelte Kontrolle (nicht signifikant) lediglich ein Trend zu einer stärkeren Expression ausmachen. Die Geninduktion der mit Pioglitazon behandelten Tiere war mit $1,65 \pm 0,28$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle am stärksten ausgeprägt, jedoch ebenfalls ohne Signifikanz.

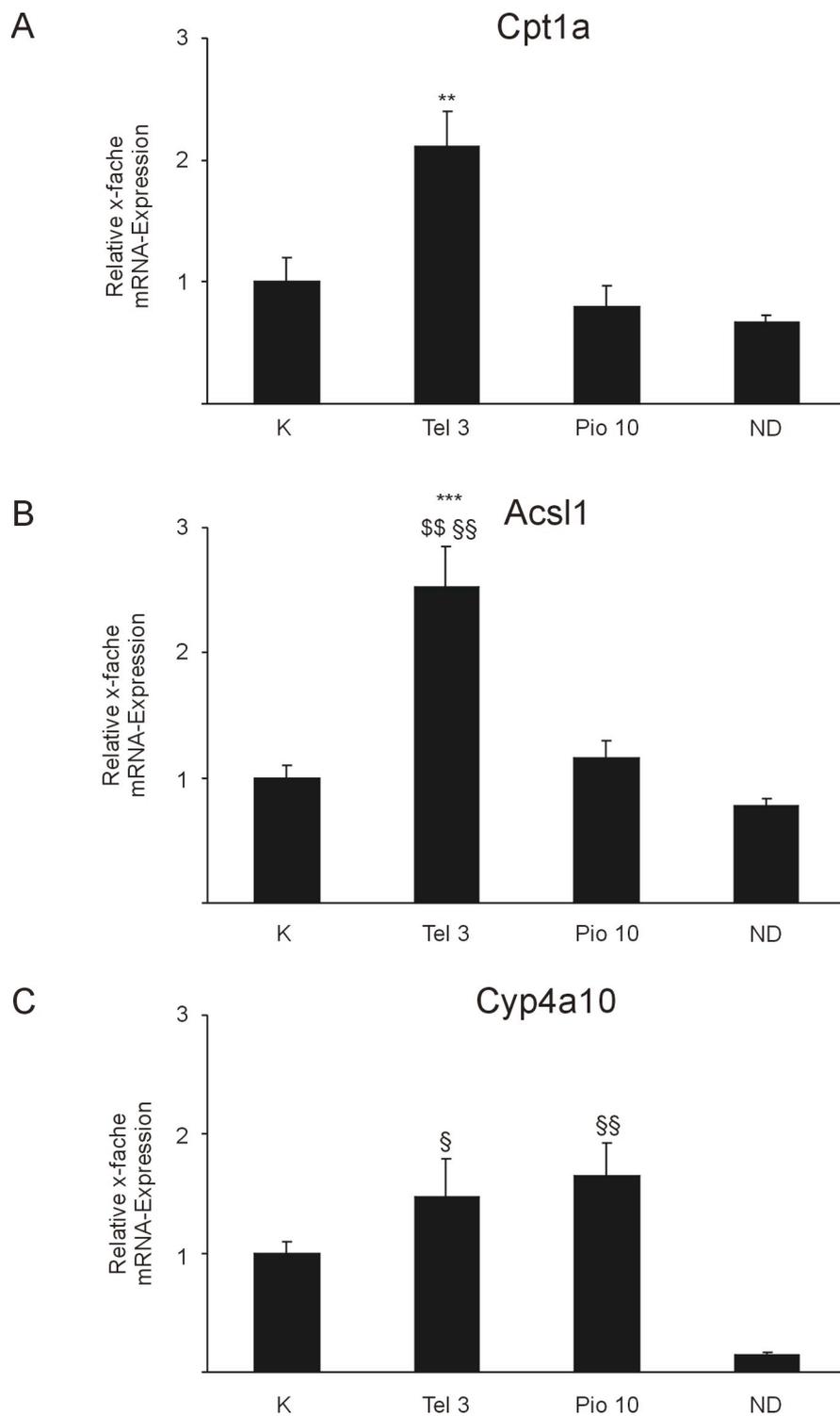


Abbildung 4.6: mRNA-Expression von Cpt1a (A), Acs11 (B) und Cyp4a10 (C) in Lebern von C57BL/6J-Mäusen

Telmisartan induziert die beiden erstgenannten Zielgene signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (K), Acs11 auch gegenüber Pioglitazon. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle; §§ $p < 0,01$ vs. Pioglitazon, §/ §§ $p < 0,05/ 0,01$ vs. ND; $n \geq 6$).

4.3.2 Zielgenexpression im *M. soleus* von C57BL/6J-Mäusen.

Nach der Leber findet sich die höchste Aktivität von PPAR α im quergestreiften Muskel [195]. Um eine mögliche PPAR α -Zielgeninduktion auch dort nachzuweisen, wurde der *M. soleus* vom perimuskulären Fettgewebe getrennt und die muskuläre RNA isoliert. Als Zielgen wurde konsistent zu den Leberanalysen die Cpt1 Muskelform (Mcpt1 oder Cpt1b) gewählt. Diese ist in die Fettsäureoxidation involviert und wird im katabolen Zustand heraufreguliert.

Telmisartan zeigt keine Induktion von Cpt1 im *M. soleus* von C57BL/6J-Mäusen.

Die Behandlung mit Telmisartan ergab im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle eine Herunterregulation auf $0,60 \pm 0,06$ für Cpt1b (vgl. Abbildung 4.7), die jedoch nicht signifikant war. Ein signifikanter Unterschied zwischen Hochfettdiät und Normaldiät zeigte sich ebenfalls nicht ($0,82 \pm 0,06$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle).

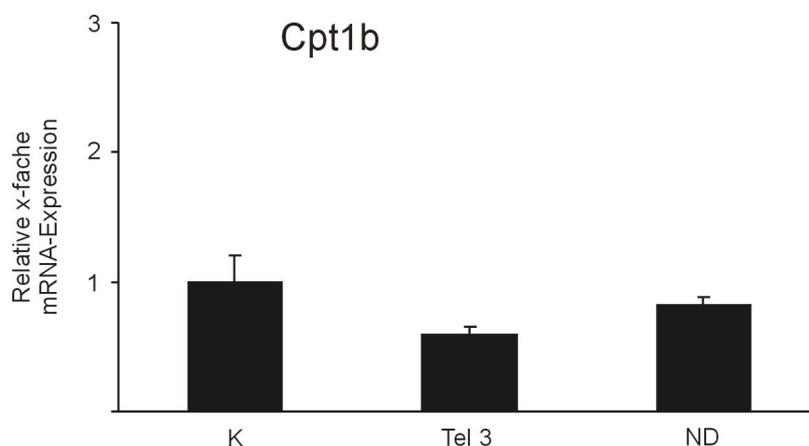


Abbildung 4.7: mRNA-Expression im *M. soleus* von C57BL/6J-Mäusen

4.3.3 Stimulation der Acsl1-Proteinexpression in vivo durch Telmisartan

Die mRNA-Expression macht keine verlässliche Aussage hinsichtlich der Übersetzung des durch den Liganden am Rezeptor ausgelösten Impulses, da die eigentliche metabolische Funktion der translatierten Aminosäuresequenz zukommt. Deshalb sollte nach der mRNA-Quantifizierung die Untersuchung eines Funktionsproteins erfolgen. Dazu wurden aus den Lebern der C57BL/6J-Mäuse Proteine isoliert und mithilfe einer SDS-PAGE und anschließend Western Blot analysiert. Der Antikörper gegen Acsl1 detektiert das Acsl1-Protein bei einem Molekulargewicht von 68 kDa. In Abbildung 4.8 ist konsistent zur RNA Regulation eine deutliche Induktion der Acsl1-Proteinexpression durch Telmisartan zu erkennen.

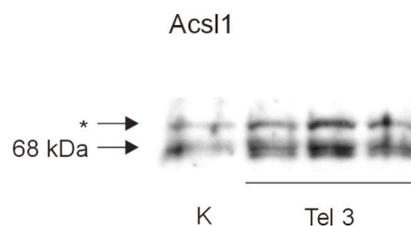


Abbildung 4.8: Acsl1-Proteinexpression in Lebern von C57BL/6J-Mäusen.

Das Protein läuft bei 68 kDa, die darüber liegende Bande (*) bei ungefähr 72 kDa ist unspezifisch.

4.4 Die Bedeutung des AT₁-Rezeptors bezüglich der PPAR_α-Zielgenexpression in HepG2-Zellen

Da Lebergewebe den AT₁-Rezeptor exprimiert, stellte sich die Frage, ob die Effekte von Telmisartan auf die PPAR_α-Zielgenexpression unabhängig von der den AT₁-Rezeptor blockierenden Eigenschaften der Substanz seien. Nachdem kürzlich durch Schupp et. al. gezeigt werden konnte, dass Telmisartan, Irbesartan und Losartan PPAR_γ-Zielgene

unabhängig vom AT₁-Rezeptorantagonismus induzieren [173], sollte dasselbe jetzt auch für PPAR α demonstriert werden. Dazu wurden HepG2-Zellen 30 Minuten vor der Stimulation mit Telmisartan mit 100 μ M Eprosartan behandelt, welches PPAR α -Zielgene nicht induziert. Durch die Vorbehandlung wird angenommen, dass alle AT₁-Rezeptoren ausreichend blockiert sind. Der EC₅₀-Wert für die Blockade des AT₁-Rezeptors durch Eprosartan liegt bei 9,6 nM, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass zum Zeitpunkt der Stimulation mit Telmisartan alle AT₁-Rezeptoren belegt waren. Zur Kontrolle wurden weitere Zellen mit Telmisartan ohne vorherige Blockade mit Eprosartan behandelt. Abbildung 4.9 zeigt, dass die alleinige Behandlung mit Eprosartan CPT1a nicht zu induzieren vermag (1,21 \pm 0,16-fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, nicht signifikant). Wurde daraufhin mit 50 μ M Telmisartan behandelt, stieg die Expression auf 2,84 \pm 0,63-fach vs. unbehandelte Kontrolle an ($p < 0,001$). Das Gleiche gilt für die direkte Stimulation ohne Vorbehandlung (nicht dargestellt), so dass auch für die PPAR α -Zielgenexpression von einer Unabhängigkeit vom AT₁-Rezeptor ausgegangen werden kann.

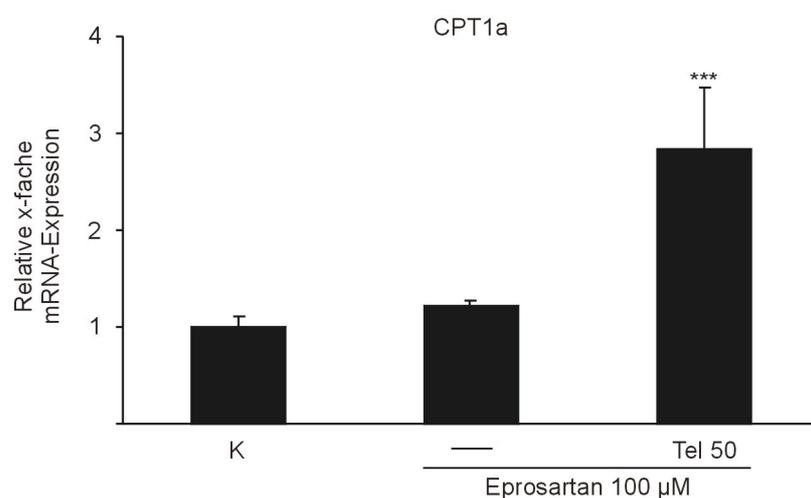


Abbildung 4.9: Unabhängigkeit der CPT1a Genexpression von der AT₁-Rezeptorblockade in HepG2-Zellen.

Die Vorbehandlung mit 100 μ M Eprosartan stimuliert die Genexpression selber nicht, behindert aber auch die durch 50 μ M Telmisartan bedingte Geninduktion nicht (***) $p < 0,001$, $n=3$).

4.5 Die Regulation von PPAR α durch Liganden

4.5.1 Regulation der Proteinexpression von PPAR α durch Telmisartan

Nachdem der erste Teil der Arbeit darin bestand, die PPAR α -Zielgeninduktion näher zu untersuchen, sollte im zweiten Teil die Regulation des Rezeptors durch die entsprechenden Liganden näher untersucht werden. Für nukleäre Rezeptoren, wie den Progesteronrezeptor [152], Östrogenrezeptor [196], Retinoiden-X-Rezeptor [197] oder PPAR γ [154] ist in der Literatur eine Herunterregulierung des Proteins durch die entsprechenden Liganden mittels Induktion eines beschleunigten Abbaus beschrieben worden. Für PPAR α hingegen zeigten Blanquart et al. die Heraufregulation des Rezeptors durch Aktivatoren, indem diese das Protein stabilisieren [155]. Dies sollte jetzt auch für Telmisartan mittels Western Blot gezeigt werden. Dafür wurden wieder die Lebern der C57BL/6J-Mäuse verwendet. Abbildung 4.10 zeigt einen repräsentativen Blot mit deutlicher Geninduktion nach Stimulation mit Telmisartan verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Um auch eine Aussage hinsichtlich der Streuung der Messwerte treffen zu können, wurden die Proben der mit Telmisartan behandelten Tiere einzeln aufgetragen. Dargestellt sind drei repräsentative Stichproben, während es sich bei der Kontrollgruppe um die Darstellung des Pools handelt.

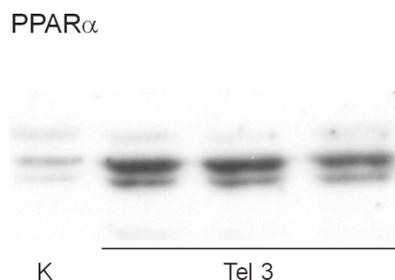


Abbildung 4.10: Western Blot für PPAR α in Lebern von C57BL/6J-Mäusen.

4.5.2 Stabilisierung des PPAR α -Proteins durch den Liganden in HepG2-Zellen

Wie Blanquart et al. zeigen konnten, wird das mit einer Halbwertszeit von einer Stunde sehr kurzlebige PPAR α durch WY 14.643 derart stabilisiert, dass sich die Halbwertszeit verdoppelt. Dies erfolgt durch eine verminderte Ubiquitinierung, so dass weniger Protein dem nachfolgenden Abbau im 26S Proteasom zur Verfügung steht. Bevor die Effekte von Telmisartan analysiert wurden, sollten die Ergebnisse von Blanquart et al. reproduziert werden. Dazu wurden HepG2-Zellen vor der Stimulation mit 100 μ M WY 14.643 für drei Stunden mit dem Proteasominhibitor MG132 (20 μ M) inkubiert, woran sich die fünfstündige Stimulationsphase mit WY anschloss. Das PPAR α -Protein wurde immunpräzipitiert, um sicherzustellen, dass es sich bei dem ubiquitinierten Protein lediglich um PPAR α handelt. Die Auswertung im Western Blot erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen die H-Untereinheit des Ubiquitins. Als Effektivitätskontrolle der Immunpräzipitation wurde auch das native, das heißt, nicht ubiquitinierte PPAR α dargestellt. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen konnte die gesteigerte Proteinmenge nach Proteasomhemmung im Vergleich zum Vehikel (DMSO) nicht eindeutig gezeigt werden, wohl aber im Vergleich zu den nicht mit MG132 behandelten Zellen (vgl. Abbildung 4.11).



Abbildung 4.11: PPAR α wird nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut.

Nach Hemmung des 26S Proteasoms durch MG132 staut sich das ubiquitinierte PPAR α an. Die Ubiquitinierung nach Behandlung mit WY 14.643 (Banden 1 bis 3) für 5 Stunden ist geringer als bei der Kontrolle (Bande 7) ausgeprägt. Dieser Effekt ist ohne Vorbehandlung mit MG132 nicht zu erkennen (Banden 4 bis 6 und 8).

Daraufhin wurden Zellen in einem zweiten Ansatz simultan für 24 Stunden mit 20 μM MG132 und 50 μM Telmisartan behandelt. Nun erfolgte nur noch eine Auswertung hinsichtlich einer in der Menge zur Kontrolle verschiedenen Ubiquitinierung von PPAR α . Auf Abbildung 4.12 ist deutlich zu erkennen, dass die Ubiquitinierung nach Stimulation mit Telmisartan zu- und nicht abnimmt, was so nicht erwartet worden war.

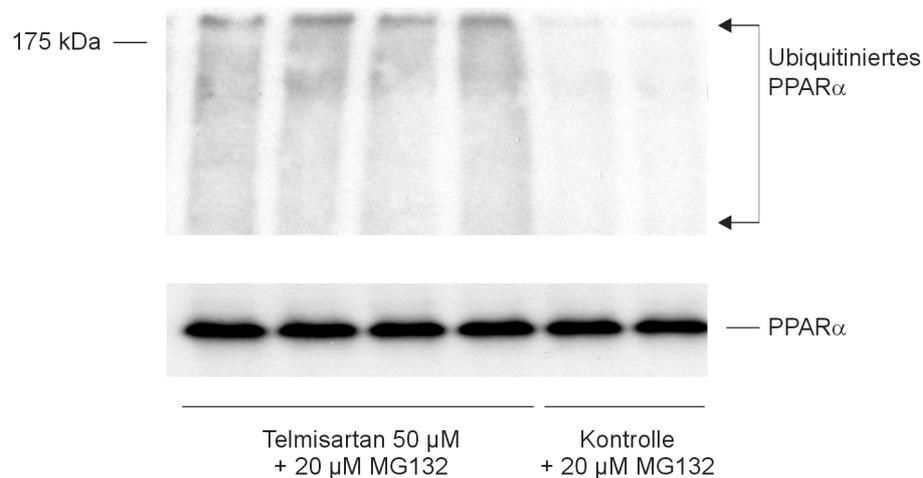


Abbildung 4.12: Ubiquitinierungsstatus von PPAR α nach 24 Stunden Behandlung mit Telmisartan

Im Vergleich zur Kontrolle (Banden 5,6) erfolgt eine beschleunigte Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors nach 24-stündiger Behandlung mit 50 μM Telmisartan (Banden 1 bis 4).

4.5.3 Stimulation der mRNA-Expression von PPAR α durch Telmisartan

4.5.3.1 Regulation der PPAR α -mRNA in HepG2-Zellen

Nachdem der Nachweis der Proteinstabilisierung durch verminderte Ubiquitinierung nicht erbracht werden konnte, sollte untersucht werden, ob die vermehrte Proteinexpression von PPAR α nach Stimulation mit Telmisartan durch eine erhöhte mRNA-Menge bedingt ist und nicht posttranslational erfolgt. Dazu wurden wiederum HepG2-Zellen für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Telmisartan

behandelt und anschließend die mRNA mittels Real-Time PCR hinsichtlich ihrer Expression untersucht (vgl. Abbildung 4.13). Deutlich zu erkennen ist die gesteigerte mRNA-Menge mit zunehmender Konzentration von Telmisartan. Zwar ergab sich noch für 0,1 μM Telmisartan eine verminderte Expression von $0,47 \pm 0,15$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle (nicht signifikant), doch schon mit 1 μM lag diese bei $1,30 \pm 0,17$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle, wurde mit 10 μM auf $1,85 \pm 0,23$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle gesteigert und ergab schließlich für 50 μM eine Induktion von $3,39 \pm 0,38$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,05$).

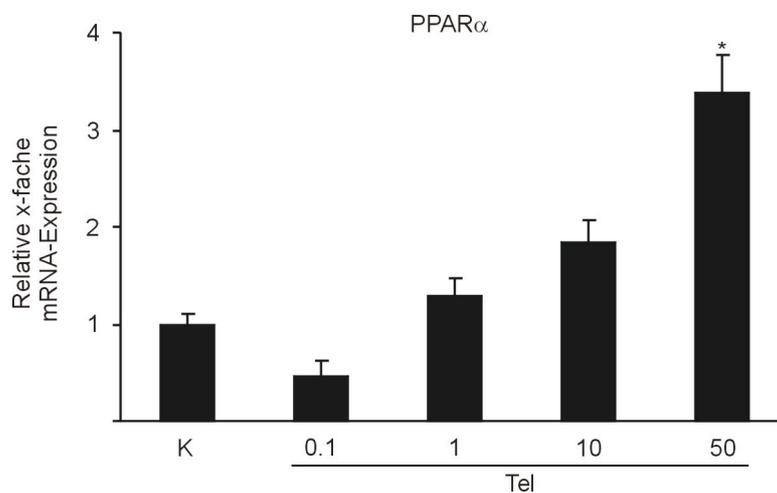


Abbildung 4.13: PPAR α -mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Stimulation mit Telmisartan für 48h.

Eine Behandlung der Zellen mit 100 μM Eprosartan zeigte hingegen konsistent mit der fehlenden Induktion von CPT1a auch keine vermehrte Expression der PPAR α -mRNA. Diese lag bei $1,13 \pm 0,27$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle (vgl. Abbildung 4.14).

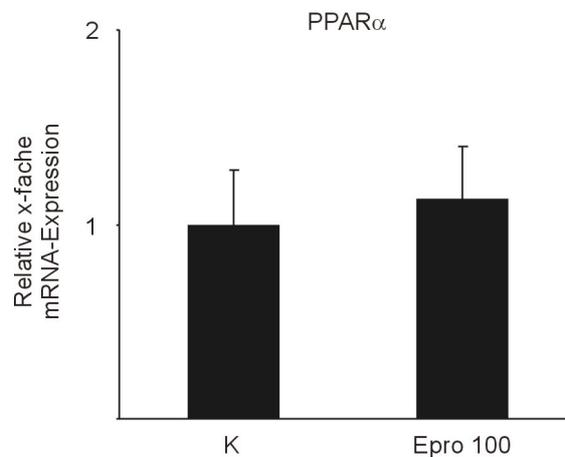


Abbildung 4.14: PPAR α -mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Stimulation mit Eprosartan für 48h.

4.5.3.2 Regulation der PPAR α -mRNA in Lebern von C57BL/6J Mäusen

Zur Verifizierung der in vitro Daten wurde anschließend die PPAR α -mRNA aus den Lebern der Mäuse untersucht. Dazu wurde dieselbe cDNA wie bei der Untersuchung der Zielgene verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 dargestellt. So induziert die Behandlung mit Telmisartan die mRNA-Expression $1,91 \pm 0,19$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,01$, $p < 0,01$ vs. Pioglitazon und Normaldiät). Für Pioglitazon ergibt sich trotz des partiellen PPAR α -Agonismus keinerlei Induktion der mRNA, sondern sogar eine geringfügige Herunterregulierung ($0,71 \pm 0,07$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, nicht signifikant), während die Normaldiätgruppe eine $1,02 \pm 0,08$ -fachen Induktion vs. unbehandelte Kontrolle erreicht.

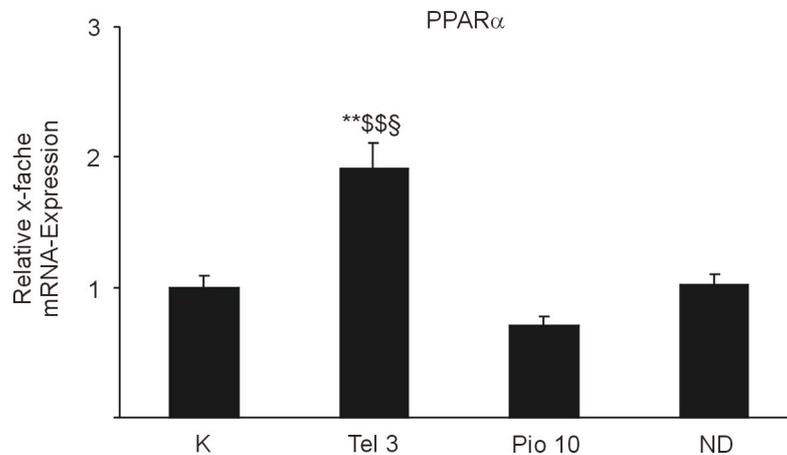


Abbildung 4.15: PPAR α -mRNA-Expression in Lebern von C57BL/6J-Mäusen

Telmisartan induziert PPAR α signifikant gegenüber der Hochfettkontrolle

(** $p < 0,01$; \$\$ $p < 0,01$ vs. Pioglitazon, § $p < 0,05$ vs. ND; $n \geq 6$).

4.6 Der Einfluss von PPAR γ in Lebern von C57BL/6J-Mäusen

Im Verhältnis zu PPAR α wird PPAR γ 1 in vernachlässigbar geringen Mengen in Lebergewebe exprimiert, PPAR γ 2 überhaupt nicht, es sei denn, es liegt eine Leberverfettung mit adipogener Transformation vor. Dennoch sollte die mRNA-Expression von PPAR γ in den Lebern der C57BL/6J-Mäuse untersucht werden, da der in den Versuchen verwendete AT $_1$ -Blocker Telmisartan zusammen mit Irbesartan und dem Losartanmetabolit EXP3179 als selektiver PPAR γ Modulator beschrieben worden ist. Insofern sollte festgestellt werden, inwiefern in der Leber Effekte von PPAR γ vermittelt sein könnten. Als Kriterium diente die mRNA-Expression von PPAR γ -Gesamt. Dazu wurde dieselbe cDNA wie in den vorhergegangenen Versuchen verwendet und mittels Real-Time PCR ausgewertet (vgl. Abbildung 4.16). So wird deutlich, dass sich für die mit Telmisartan behandelten Tiere mit einer $0,96 \pm 0,11$ -fachen Induktion vs.

unbehandelte Kontrolle keinerlei Expressionsunterschied darstellen lässt. Die Normaldiätgruppe liegt geringfügig niedriger ($0,72 \pm 0,11$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle), ohne allerdings signifikant zu sein. Lediglich die Behandlung mit Pioglitazon vermag die Expression von PPAR γ in der Leber signifikant zu reduzieren ($0,35 \pm 0,05$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, $p < 0,05$).

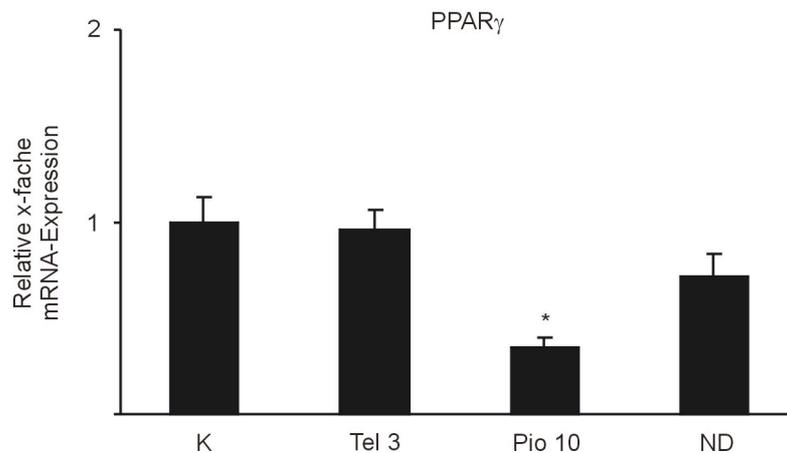


Abbildung 4.16: PPAR γ -mRNA-Expression in Lebern von C57BL/6J-Mäusen

Lediglich Pioglitazon zeigt in der Leber durch Herunterregulation der mRNA PPAR γ -agonistische Eigenschaften.

Zusätzlich wurde mit CD 36, welches auch als Glykoprotein IV bezeichnet wird, ein klassisches PPAR γ -Zielgen untersucht (vgl. Abbildung 4.17). Telmisartan erreichte eine $1,40 \pm 0,23$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, die Normaldiät lag bei einer $0,43 \pm 0,07$ -fachen Induktion vs. unbehandelte Kontrolle. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der PPAR γ -Expression zeigte sich auch hier lediglich für Pioglitazon eine vermehrte Expression ($2,84 \pm 0,29$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, $p < 0,01$).

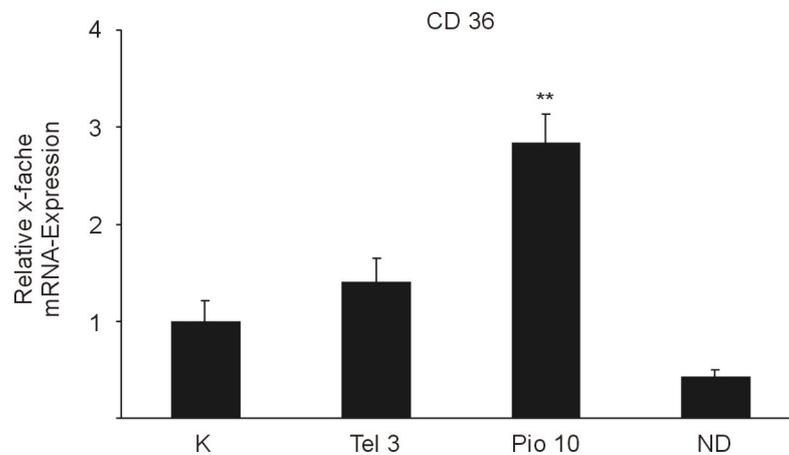


Abbildung 4.17: Expression von CD 36 in Lebern von C57BL/6J-Mäusen.

(**, $p < 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle)

4.7 Leberfunktionsparameter in einem ernährungsbedingtem Übergewichtsmodell der Maus (C57BL/6J)

In der klinischen Routine werden im Rahmen der Leberfunktionsdiagnostik verschiedene Parameter erhoben, um Funktion und Syntheseleistung eingehender zu charakterisieren: Zum Beispiel Albumin für die Syntheseleistung, die Bestimmung des direkten Bilirubins zur Analyse der Konjugationsfähigkeit der Leber, sowie die Transaminasen ALAT (Alanin-Aminotransferase oder früher Glutamat-Pyruvat Transaminase GPT) und ASAT (Aspartat-Aminotransferase oder früher Glutamat-Oxalacetat Transferase GOT) zur Einschätzung des Schweregrades und der Lokalisation des Leberschadens. Weist eine Erhöhung der ALAT eher auf einen zytosolischen Schaden hin, wie er im Rahmen einer Leberverfettung auftreten kann, so zeigt eine erhöhte ASAT eine Leberzellnekrose zum Beispiel während einer akuten Hepatitis an. Die genannten Parameter wurden im Serum der verwendeten Mäuse bestimmt, um Hinweise auf die Auswirkung der Verfettung auf den Stoffwechsel der Leber zu erhalten. Dies geschah im Zentrallabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin,

Campus Virchowklinikum (Institut für Pathobiochemie und Laboratoriumsmedizin, Prof. Dr. R. Tauber) mit Hilfe der für die klinischen Routine verwendeten diagnostischen Apparaturen.

Für Albumin (vgl. Abbildung 4.18 A) waren alle Werte der Hochfettkontrolle ($3,55 \pm 0,10$ g/dl) ähnlich: Telmisartan ($3,43 \pm 0,13$ g/dl) und Pioglitazon ($3,17 \pm 0,13$ g/dl) lagen geringfügig tiefer, ohne signifikant verschieden zu sein. Die Normaldiätgruppe erreichte im Mittel $3,48 \pm 0,10$ g/dl vs. unbehandelte Kontrolle.

Für das Gesamtbilirubin (vgl. Abbildung 4.18 B) ergab sich ein ähnliches Bild: Hochfettkontrolle $0,288 \pm 0,02$ mg/dl, Telmisartan $0,22 \pm 0,04$ mg/dl, Pioglitazon $0,01 \pm 0,06$ mg/dl und Normaldiät $0,23 \pm 0,04$ mg/dl.

Tendenzielle Unterschiede traten bei den Transaminasen auf, die jedoch aufgrund der hohen Streubreite der Messwerte kein Signifikanzniveau erreichten. So lag für die ASAT (vgl. Abbildung 4.19 A) die Hochfettkontrollgruppe bei 112 ± 26 U/l, während Telmisartan und die Normaldiätgruppe niedrigere Werte erreichten (Telmisartan 63 ± 4 U/l, Normaldiät 86 ± 12 U/l). Pioglitazon lag mit 121 ± 21 U/l im Bereich der Kontrollgruppe. Ähnlich zeigte sich auch die ALAT (vgl. Abbildung 4.19 B), wenngleich die Werte insgesamt niedriger lagen: Hochfettkontrolle 42 ± 10 U/l, Telmisartan 16 ± 4 U/l, Pioglitazon 79 ± 19 U/l und Normaldiät 13 ± 2 U/l.

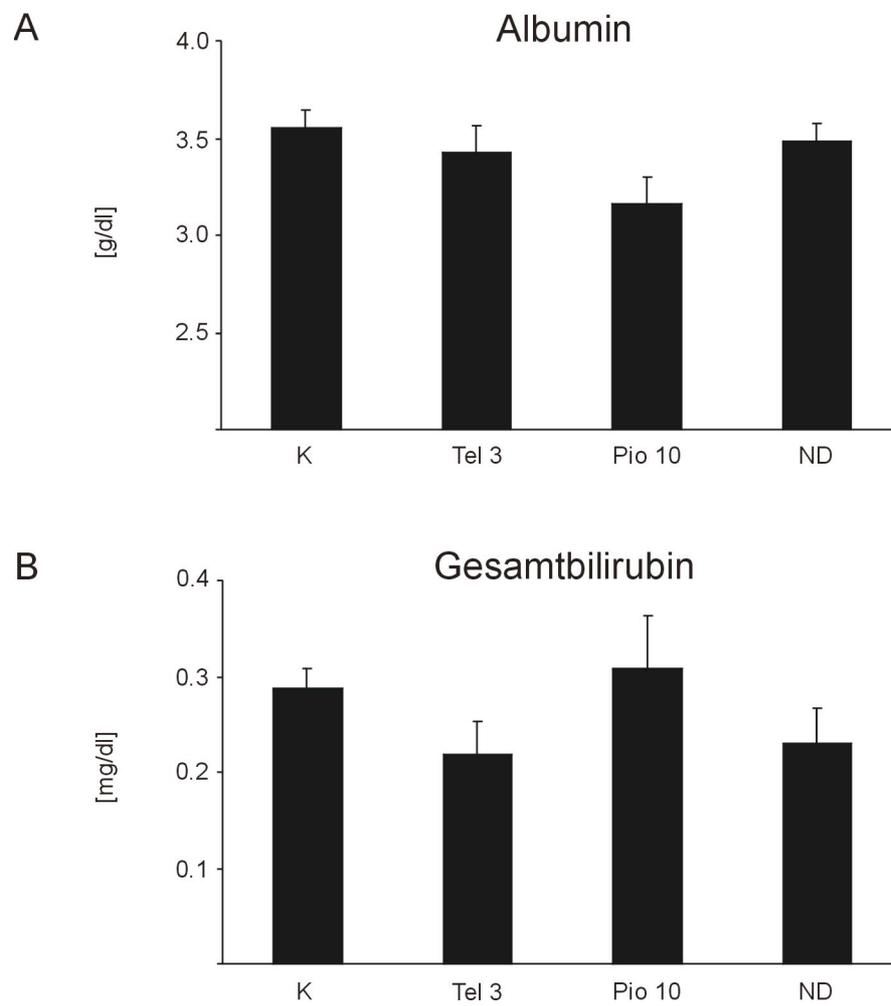


Abbildung 4.18: Bestimmung von Leberfunktionsparametern im Serum von C57BL/6J-Mäusen

- A. Albumin (in g/dl)
- B. Gesamtbilirubin (in mg/dl)

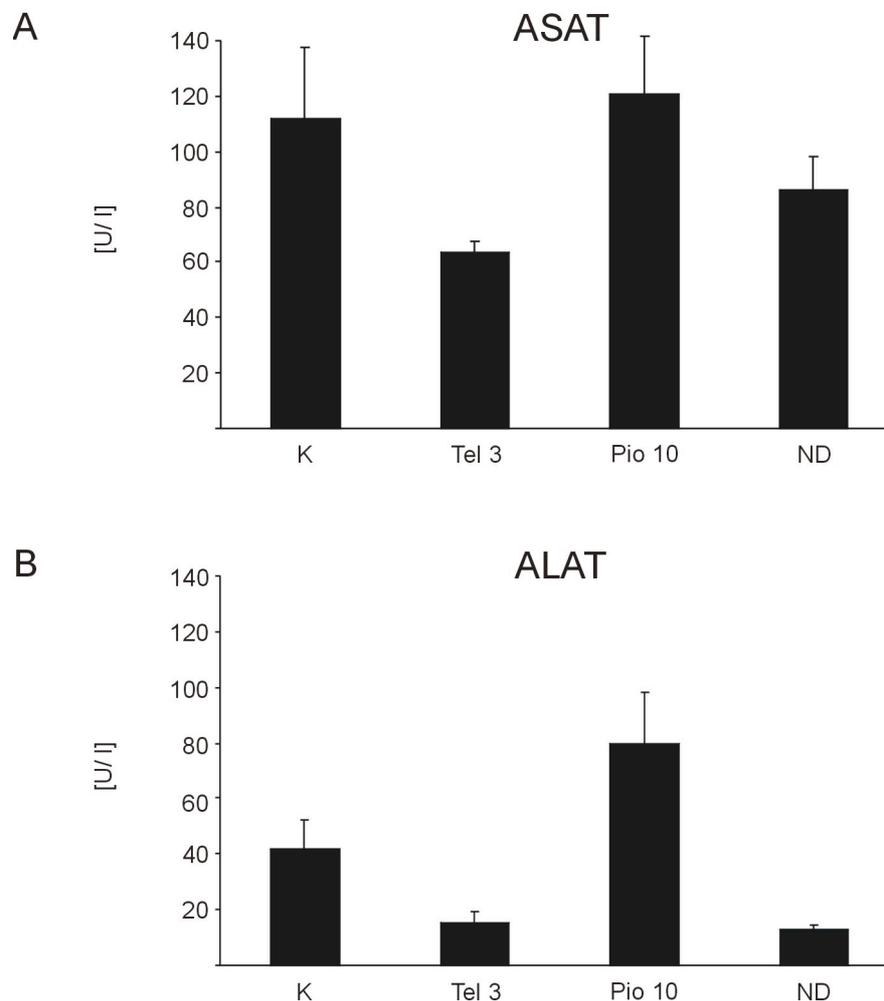


Abbildung 4.19: Bestimmung von Leberfunktionsparametern im Serum von C57BL/6J-Mäusen

A. Aspart-Aminotransferase ASAT (in U/l)

B. Alanin-Aminotransferase ALAT (in U/l)

Der Normalwert des de-Ritis-Quotienten (dRQ) aus ASAT und ALAT liegt im gesunden Lebergewebe bei annähernd 1. Zur Vergleichbarkeit der Werte wurden deshalb die Ergebnisse der Normaldiätgruppe gleich 1 gesetzt. Die Normaldiätgruppe (vgl. Abbildung 4.20) erreichte einen Wert von $1,11 \pm 0,11$, während die Hochfettgruppe bei $0,49 \pm 0,06$ lag. Die mit Telmisartan behandelten Tiere erreichten einen dRQ von $1,08 \pm$

0,34 ($p < 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle), während die Pioglitazongruppe mit $0,28 \pm 0,03$ sogar noch unter dem Wert der Kontrollgruppe lag.

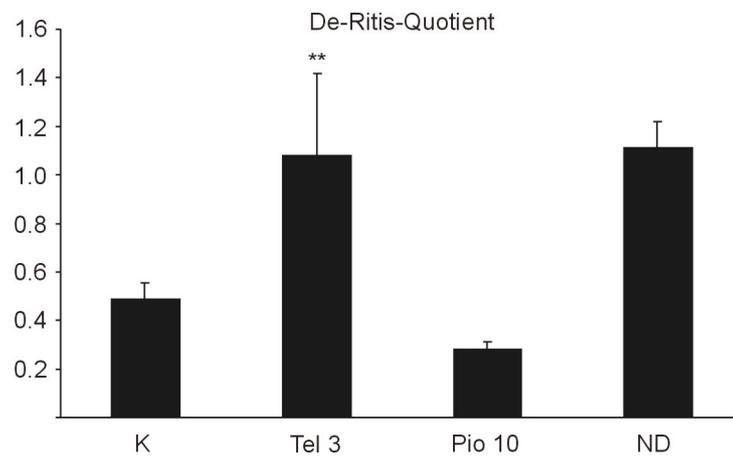


Abbildung 4.20: Bestimmung des de-Ritis-Quotienten (ASAT/ALAT) im Serum von C57BL/6J-Mäusen

(** $p < 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle)

5 Diskussion

AT₁-Antagonisten binden selektiv an den AT₁-Rezeptor. In großen klinischen Studien der vergangenen Jahre konnten jedoch Effekte gezeigt werden, die über den Antagonismus am AT₁-Rezeptor nicht hinreichend erklärt werden konnten, wie beispielsweise die geminderte Inzidenz von Typ-2-Diabetes [165, 198]. Die Hypothese eines von der AT₁-Rezeptorfunktion unabhängigen Mechanismus führte in in vitro Studien zur Identifizierung eines selektiven PPAR_γ-Agonismus bei einer Untergruppe der AT₁-Antagonisten. Dieser konnte eine erste Erklärung für die verbesserte Insulinsensitivität bei diesen Patienten liefern [173, 199]. Eine 2004 durchgeführte Studie von Derosa und Kollegen zeigte zusätzlich selektiv für Telmisartan im Vergleich zu Eprosartan eine Verbesserung des Lipidprofils im Serum von 119 hypertonen Typ-2-Diabetikern. Die Autoren führten die unterschiedlichen Ergebnisse von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzeriden auf den möglichen Einfluss von PPAR_γ und die sehr hohe Lipophilie von Telmisartan zurück, die ein Alleinstellungsmerkmal des Wirkstoffs in der Gruppe der AT₁-Antagonisten darstellt. Die Veränderungen im Lipidprofil durch Telmisartan konnten in weiteren Studien bestätigt werden [175, 176]. Aufgrund der Analogien im Wirkprofil von Telmisartan mit der seit langem bekannten Wirkung der Fibrate stellte sich jedoch auch die Frage eines Agonismus von Telmisartan an PPAR_α.

5.1 Die Auswahl der Zellmodelle

Für die Untersuchung der PPAR_α-Transaktivierung wurden COS-7-Zellen wegen ihrer leichten Transfizierbarkeit und ihrer für diesen Zweck etablierten Funktion verwendet. Die sich anschließende Untersuchung des Einflusses von Telmisartan auf die Expression von PPAR_α-Zielgenen erfolgte in zwei Leberzelllinien des Menschen und der Maus, da sich in Gewebeanalysen laut Literatur die höchsten PPAR_α-Spiegel in der Leber darstellen ließen. Humane HepG2-Zellen finden seit langem Verwendung für die

Untersuchung von PPAR α in Leberzellen [186-189]. Zusätzlich zu einer humanen Zelllinie wurde eine murine wegen der durchschnittlich zehnfach höheren Expressionsspiegel des Transkriptionsfaktors ausgewählt [115].

5.2 AT₁-Antagonisten und die PPAR α -LBD

Für die Untersuchung der Aktivierbarkeit der PPAR α -LBD durch verschiedene AT₁-Antagonisten wurde ein Transaktivierungsassay basierend auf dem Gal4-Transkriptionsfaktor gewählt. Die Aktivitätsbestimmung der LBD nukleärer Rezeptoren mittels Messung der Luziferaseaktivität stellt ein gängiges Modell der Rezeptoraktivierbarkeit dar. Zu Beginn der Arbeit existierten noch keine Voruntersuchungen, inwiefern AT₁-Blocker PPAR α aktivieren können. Aufgrund von Kristalluntersuchungen von PPAR α und γ ist jedoch eine konservierte Bindungsstruktur der beiden Rezeptoren im Bereich der AF2-Helix bekannt, an der der Ligand gebunden wird [200]. Nachdem aus Transaktivierungsassays bekannt war, dass die Substanzen Telmisartan, Irbesartan und Losartan die PPAR γ -LBD aktivieren und später auch die direkte Interaktion zwischen Rezeptorprotein und Telmisartan mit Hilfe eines Trypsinverdau gezeigt werden konnte [172, 173], lag es nahe, dies hier auch für PPAR α zu untersuchen. Es zeigte sich jedoch im Vergleich zu den bekannten Agonisten Fenofibrinsäure und WY 14.643 für Telmisartan nur eine sehr schwache Aktivierung mit einer EC₅₀ von 21,8 μ M und einer zu Fenofibrinsäure relativen Effizienz von 18 %, während Losartan und Irbesartan keine Aktivierung aufwiesen. Dabei ist der EC₅₀-Wert von Telmisartan natürlich sehr hoch verglichen mit der entsprechend benötigten Konzentration für den AT₁-Rezeptor, die für alle Antagonisten im nM-Bereich liegt. Doch ist für die PPARs bekannt, dass sie ihre Liganden in zellulären Assays im μ M-Bereich binden [156]. Auch bei Schupp et al. lag für Telmisartan, Irbesartan und Losartan die für die Aktivierung der PPAR γ -LBD errechnete EC₅₀ bei 5, 37, bzw. >50 μ M und war für Pioglitazon mit 0,2 μ M sehr gering [173]. Hervorzuheben ist allerdings, dass in der zitierten Arbeit eine maximale Stimulation von über 50 % im Verhältnis zum vollen Agonisten Pioglitazon erreicht wurde, so dass die Frage einer Aktivierung der PPAR α -LBD durch Telmisartan nicht zufrieden stellend gelöst werden konnte. Jedoch schließt eine, wenn auch nur geringe Aktivierung eine Zielgentranskription nicht aus, da

der Nachweis einer aktivierten LBD nur indirekte Rückschlüsse auf die Aktivität des Rezeptors zulässt. Es sind keine Aussagen über die strukturelle Konformation von Rezeptor und Wirkstoff möglich, die bei den nukleären Rezeptoren nachweislich eine Rolle spielt, so gezeigt am Beispiel der selektiven Progesteron-Rezeptor-Modulatoren (SPRMs), die je nach Bindungsstelle agonistische und antagonistische Effekte ausüben [201]. Auch für PPAR γ sind substanzabhängig selektiv den Rezeptor modulierende Effekte beschrieben worden [172, 202].

Insofern sollte im nächsten Schritt der Einfluss von Telmisartan auf die Zielgenexpression von PPAR α in den genannten Leberzelllinien untersucht werden.

5.3 Telmisartan und PPAR α -Zielgene

Die in humanen HepG2-Zellen durchgeführten Zeit- und Dosisverläufe zeigten eine Stimulation der mRNA-Synthese nach ungefähr 48 Stunden, die dann im Dosisverlauf für eine Konzentration von 10 μ M eine Expression von $1,53 \pm 0,16$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,05$) und bei 50 μ M Maximalwerte von $2,84 \pm 0,63$ -fach vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,001$) für CPT1a ergaben. Als Positivkontrolle diente eine ebenfalls 48-stündige Inkubation mit dem vollen Agonisten WY 14.643, die mit einer sechsfachen Induktion des Zielgens einherging. Dies ist konsistent mit Ergebnissen aus der Literatur. So erzielten Lawrence et al. nach 48-stündiger Stimulation von HepG2-Zellen mit Fenofibrinsäure ebenfalls eine etwa sechsfache Induktion von CPT1a, Hsu et al. mit 50 μ M WY 14.643 in stabil PPAR α überexprimierenden HepG2-Zellen eine vierfache Induktion [203, 204].

Generell besteht jedoch das Problem, dass HepG2-Zellen nur etwa maximal 70 % des PPAR α -mRNA-Gehalts aufweisen wie primäre humane Hepatozyten, deren Gehalt wiederum nur etwa 10 % der Mäuseleber beträgt. Deswegen sollten die Ergebnisse in der Mauszelllinie AML12 validiert werden. Hier wurde wieder nach 48-stündiger Inkubation mit 10 μ M Telmisartan eine $2,37 \pm 0,1$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle des Zielgens Acs11 ($p < 0,001$) erreicht. Martin et al. hatten in AML12-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 250 μ M Fenofibrinsäure eine etwa 24-fache

Geninduktion erzielt, die nach 48 Stunden noch auf das 40-fache anstieg. Die dabei verwendete Dosis lag allerdings sehr hoch, so dass kein direkter Vergleich mit den verwendeten 10 μM Telmisartan möglich ist. Erstaunlich ist jedoch, dass Telmisartan in der 10 μM Dosierung eine stärkere Genexpression hervorruft als das wieder zur Kontrolle in derselben Dosierung eingesetzte WY 14.643, das lediglich eine $1,46 \pm 0,12$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle bewirkte ($p < 0,01$). Dieser Effekt beruht möglicherweise auf der selektiven Modulation von $\text{PPAR}\alpha$ durch Telmisartan. Eine unterschiedliche Kofaktorrekutierung bedingt auch eine unterschiedliche Genregulation, wie durch Schupp et al. für $\text{PPAR}\gamma$ gezeigt werden konnte [172]. Im Fall von $\text{PPAR}\alpha$ ist diese selektive Modulation auch als wahrscheinlich anzusehen.

Allerdings waren die Konzentrationen für Telmisartan in den Zellversuchen sehr hoch und damit auch außerhalb der Dosierung in der Hypertoniebehandlung. Im Folgenden sollten die in vitro Daten in einem Tiermodell validiert werden, um die Relevanz der in den Zellversuchen gewonnenen Ergebnisse unter Beweis zu stellen. Um die Auswirkungen von alimentärer Adipositas anhand eines Tiermodells beobachten zu können, erschien die Wahl eines Modells angebracht, das dem beim Menschen beobachteten Verlauf am nächsten kommt. Das Übergewicht entsteht also aufgrund einer hochkalorischen Diät und zu wenig Bewegung. Aus diesem Grund schieden genetisch bedingte Modelle wie die „Zucker diabetic fatty rat“ mit defizientem Leptinrezeptor oder KO-Tiere grundsätzlich aus. Letztlich fiel die Wahl auf C57BL/J6 Wildtypmäuse, da diese typischerweise nach Fütterung einer hochkalorischen Diät ein gestörtes Lipidprofil und einen Diabetes mellitus entwickeln. Diese werden nicht durch einen Hypertonus begleitet, was in unserem Fall bedeutete, dass die Effekte der AT_1 -Blockade nicht über eine Senkung des Blutdruckes vermittelt sein können [193, 205, 206].

In dieser Arbeit wurden Leber- und Muskelgewebe der mit Telmisartan, Pioglitazon oder Vehikel behandelten Tiere ex vivo hinsichtlich der Expression von $\text{PPAR}\alpha$ -Zielgenen untersucht. Bestimmt wurden in den Lebern die schon in den Zellversuchen verwendeten Gene *Cpt1a* und *Acs1*. Sowohl die Ergebnisse für *Cpt1a* ($3,16 \pm 0,44$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle), als auch *Acs1* ($2,52 \pm 0,34$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle) bestätigten die bereits in den Zellversuchen gefundenen

Ergebnisse. Mit Pioglitazon war Acs11 nicht induzierbar, was vermuten lässt, dass PPAR γ in der Leber keinen ausreichenden Effekt vermitteln kann, da Acs11 in Abhängigkeit seiner Lokalisation und Verwendung im Metabolismus, über PPAR γ anabol wirken kann [191, 192]. Oder aber die Pioglitazon zugeschriebene schwache intrinsische PPAR α -Aktivität reicht in diesem Fall nicht aus [194]. Der grundsätzliche Einfluss von PPAR γ in der Leber war jedoch noch gesondert zu klären. Bei Cyp4a10 zeigte sich, dass schon die Hochfettdiät alleine das Transkriptionslevel relativ zur Normaldiät siebenfach steigerte ($1,00 \pm 0,10$ vs. $0,14 \pm 0,02$). Die Behandlung mit Telmisartan brachte hier keine weitere Erhöhung. Eine stärkere Expression des Cytochroms in der Hochfettdiätgruppe ist verständlich, da Fettsäuren in der Nahrung die mikrosomale ω -Oxidation direkt aktivieren [207]. Die starke Induktion von Cyp4a10 durch eine Hochfettdiät konnte bereits durch Patsouris und Kollegen gezeigt werden [145], während sich in einer Studie von Westerbacka et al. kein verändertes Expressionsniveau für CPT1a in Lebern von NAFL-Patienten relativ zur Kontrolle zeigte [207]. Diese Ergebnisse decken sich mit den in unserer Studie gefundenen Resultaten. Auch für den neuen dualen PPAR α/γ -Agonisten Chiglitazar ist eine Heraufregulation von Cyp4a10 in Lebern adipöser MSG-Ratten beschrieben worden, ein Effekt, der durch Rosiglitazon allein nicht herbeizuführen war [208]. Dass Telmisartan keine weitere Induktion von Cyp4a10 brachte, beruht vermutlich auch hier wie bereits beschrieben auf einer selektiven Modulation.

Als zweites Organ wurde quergestreifte Muskulatur aus dem M. soleus untersucht, da PPAR α nach der Leber auch im Muskel eine herausragende Rolle spielt. Als Bestätigung der in den Leberproben gemachten Beobachtungen sollte die Genexpression von Cpt1b untersucht werden. Doch ließ sich für Telmisartan kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellen.

Eine Erklärung für das vollkommen unterschiedliche Aktivierungsmuster von PPAR α -Zielgenen in den beiden Geweben liefert die Pharmakokinetik von Telmisartan. Wie in der Einleitung beschrieben, ist Telmisartan der mit Abstand lipophilste AT $_1$ -Antagonist. Das zeigt sich unter anderem anhand der Eliminationsgeschwindigkeit der einzelnen Substanzen. Diese beträgt für Eprosartan, Valsartan, Candesartan und Irbesartan zwischen fünf und 15 Stunden, für Telmisartan aber 24 Stunden und mehr, da es im

Plasma zu über 99 % in gebundener Form vorliegt und stark im Gewebe akkumuliert. Wie stark diese Anreicherung im Gewebe wirklich ist, untersuchten Shimasaki und Kollegen 1999 anhand der Absorption, Distribution und Proteinbindung von mit ^{14}C markiertem Telmisartan in Ratten. Dazu erhielten die Tiere oral 1 mg/kg KG radioaktiv markiertes Telmisartan, dessen Radioaktivität dann in den einzelnen Kompartimenten bestimmt wurde. Es zeigte sich 30 Minuten nach Verabreichung die höchste Konzentration im Dünndarm ($35 \pm 6 \mu\text{M}$), gefolgt von Magen ($30 \pm 17 \mu\text{M}$) und Leber ($24 \pm 2 \mu\text{M}$). Mit großem Abstand erst reicherte es sich in sehr geringen Mengen im Skelettmuskel an ($0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Nach 24 Stunden waren in der Leber immer noch Konzentrationen von $1,85 \pm 0,81 \mu\text{M}$ messbar, während der Nachweis im Muskel nicht mehr gelang. Erhielten die Tiere wiederholt dieselbe Dosis einmal täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen, so ergab sich folgendes Bild: Die höchsten Konzentrationen lagen nach vier Stunden, wenn auch etwas geringer als nach einmaliger Applikation, wieder im Magen, Dünndarm und der Leber, in der Muskulatur war der Wirkstoff nur minimal nachweisbar [209]. Unter Beachtung, dass in diesem Versuch (1 mg/kg KG) eine niedrigere Dosierung als in dem in unserer Arbeit ausgewerteten verwendet wurde (3 mg/kg KG), ist dennoch ersichtlich, dass von den untersuchten Geweben nur in der Leber entsprechende Spiegel des Pharmakons erreicht werden, die PPAR α -Zielgene aktivieren können. Hier lag die Grenze sowohl in den HepG2- als auch AML12-Zellen im Bereich von $10 \mu\text{M}$, wenngleich nicht auszuschließen ist, dass schon geringere Konzentrationen signifikante Expressionswerte hervorrufen können. Jedoch lag die nächst niedrigere Dosierung bei $1 \mu\text{M}$ und hier konnte kein Effekt erzielt werden.

Ein weiterer Grund für die fehlende Genaktivierung im Skelettmuskel ist in der letzten Zeit vermehrt in den Vordergrund gerückt: Demnach ist im Muskel nicht alleine PPAR α für die Energiegewinnung mittels Fettsäureoxidation zuständig, sondern PPAR δ spielt hier ebenso eine Rolle [210, 211]. Es wird vermutet, dass beide Rezeptoren im Skelettmuskel synergistisch wirken [212], das Ausmaß und die Aufteilung sind jedoch noch weitgehend unklar. Es gibt allerdings Hinweise, dass PPAR α eine Rolle bei hohem Substratangebot und fehlender Bewegung spielt, der Einfluss von PPAR δ dagegen zunehmend bei körperlicher Anstrengung an Bedeutung gewinnt [213].

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der mRNA-Expression auf Proteinebene überprüft, da letztlich das Protein die Funktion im Stoffwechsel übernimmt und anhand der mRNA-Expression keine zuverlässige Aussage hinsichtlich einer Funktionsinduktion oder -repression getroffen werden kann. Mittels Western Blot wurde die Expression des Acsl1-Proteins überprüft, die eine verstärkte Expression unter Telmisartanstimulation verglichen mit der Kontrolle zeigte.

Insgesamt zeigen diese Versuche sowohl auf der mRNA-Ebene als auch im Protein eine Aktivierung von PPAR α -Zielgenen in der Leber durch Telmisartan, nicht jedoch im Skelettmuskel. Kürzlich wurde die Induktion von Ucp1 durch Telmisartan in einem Diät-induzierten Adipositasmodell der Maus beschrieben [214]. Dieses Protein ist an der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung bei der Thermogenese im braunen Fettgewebe beteiligt. Wie in der Einleitung erwähnt, zählen die Uncouplingproteine ebenfalls zu den PPAR α -Zielgenen. Die Autoren nahmen diesen Effekt als PPAR γ -vermittelt an, wenngleich bis jetzt der stringente Beweis für dessen physiologische Kontrolle von Ucp1 aussteht [214, 215].

5.4 Die Rolle der Angiotensinrezeptoren für die PPAR α -Aktivierung durch AT $_1$ -Antagonisten

Hepatozyten und Kupffer-Sternzellen exprimieren sowohl den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT $_1$ R) als auch den Angiotensin II Typ 2 Rezeptor (AT $_2$ R). Über den AT $_1$ R wirkt Angiotensin II profibrotisch auf das Leberparenchym und führt zu Kontraktion und Proliferation der Kupffer-Sternzellen. Eingehend ist die Wirkung von Angiotensin II auf die Tetrachlorkohlenstoff-induzierte Leberfibrose beschrieben worden [216, 217]. Während die Existenz eines funktionellen RAAS im Fettgewebe mittlerweile gezeigt worden ist, in dem Angiotensin II über den AT $_1$ R einen antilipolytischen Effekt vermittelt und über den AT $_2$ R entgegengesetzt wirkt, ist die Rolle des RAAS auf den Lipidstoffwechsel der Leber bis jetzt ungeklärt.

Aufgrund des genannten Effekts des AT $_1$ R im Fettgewebe erscheint es unwahrscheinlich, dass der in den Studien von Derosa, Inoue und Mori berichtete Effekt

eines verbesserten Lipidprofils über den AT₁R vermittelt wird. Hier wäre eher das Gegenteil zu erwarten. Da der Rezeptor in humanen Hepatozyten allerdings exprimiert wird, war dessen Beteiligung an den genannten Effekten auszuschließen. Dazu wurden HepG2-Zellen mit Eprosartan in entsprechenden Konzentrationen vorbehandelt, die quantitativ alle AT₁R blockierten. Dies hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die Genexpression von CPT1a, während die mit Telmisartan behandelten Zellen nach Eprosartanvorbehandlung den erwarteten Anstieg aufwiesen, was letztlich als Hinweis auf die Unabhängigkeit der beschriebenen Effekte vom AT₁R gewertet wurde.

Kürzlich konnte in AT₂R^{y/-}-Mäusen gezeigt werden, dass auch der AT₂R keinen Einfluss auf den Fettstoffwechsel der Leber ausübt, solange die Tiere gefüttert wurden, was im Einklang mit der äußerst geringen Expression des Rezeptors in der Leber steht [218]. Der in den Wildtyptieren beim Fasten einsetzende Zustrom freier Fettsäuren in die Leber mit gesteigerter β -Oxidation war in den KO-Tieren jedoch deutlich abgeschwächt. mRNA-Analysen zeigten hier stark verminderte Expressionen von Cpt, Acox und PPAR α , was vermutlich an der Heraufregulation des AT₁R in den KO-Tieren lag. Hier wurden erhöhte mRNA-Spiegel des Rezeptors gemessen. Über einen vermehrten Einfluss des AT₁R in den KO-Tieren wurden antilipolytische Effekte vermittelt, so dass dadurch der zirkulierende Pool freier Fettsäuren abfiel, was letztlich zur verminderten β -Oxidation führte. Dieser prinzipielle Unterschied zwischen Wildtyp- und KO-Tieren blieb auch nach Valsartanbehandlung bestehen, wenngleich in beiden Gruppen die Konzentration freier Fettsäuren im Plasma dadurch anstieg [218]. Diese Beobachtungen stützen die These, dass der Einfluss von Telmisartan auf die Klärung lipämischen Blutes nicht über das RAAS vermittelt wird.

5.5 Telmisartan und PPAR α

Nachdem im ersten Teil der Arbeit der Einfluss des AT₁-Antagonisten Telmisartan auf die Expression von PPAR α -Zielgenen untersucht worden war, sollte im zweiten Teil die Wirkung auf den Transkriptionsfaktor selbst näher untersucht werden. Diese ist insofern von Bedeutung, da eine Veränderung der Expression einen indirekten Einfluss auf die Aktivität von PPAR α hat.

In den Lebern der Mäuse zeigte sich im Western Blot eine Heraufregulation des PPAR α -Proteins in den mit Telmisartan behandelten Tieren, nicht jedoch in der mit Pioglitazon behandelten Gruppe. Die Frage einer posttranslationalen Regulation durch Telmisartan sollte mittels Immunpräzipitation und anschließender Antikörpermarkierung von ubiquitiniertem PPAR α erfolgen, da aus der Literatur die Stabilisierung des Proteins durch den Liganden mit konsekutiv verminderter Ubiquitinierung bekannt war [155, 219]. Kürzlich konnten verschiedene Arten von Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems identifiziert werden. Am häufigsten werden Peptidaldehyde, wie beispielsweise das MG132 verwendet [220]. Wenn solche Inhibitoren eine Senkung der Konzentration eines Proteins aufhalten können oder diese sogar steigern, deutet dies auf eine proteasomvermittelte Degradation hin. Das machten sich auch Blanquart et al. zunutze, indem sie mit MG132 eine Stabilisierung von PPAR α erzielen konnten [155]. Ein positiver Nebeneffekt ist, dass durch den gehemmten Abbau Prozesse der Ubiquitinierung besser analysiert werden können und schwache inhibitorische oder stimulatorische Effekte nach Behandlung mit den entsprechenden Substanzen verstärkt werden und deutlicher zu erkennen sind.

Interessanterweise zeigte sich in HepG2-Zellen nach Telmisartanbehandlung genau der entgegen gesetzte Effekt: Anstelle einer Verminderung konnte eine verstärkte Ubiquitinierung beobachtet werden. Dies entspricht eher dem Muster der PPAR γ -Ubiquitinierung nach Aktivierung [154], gleichzeitig war aber eine höhere PPAR α -Proteinkonzentration in den Lebern der mit Telmisartan behandelten Tieren festgestellt worden. Dies wiederum widerspricht dem Verhalten als PPAR γ -Ligand, da nach dessen Aktivierung eine rasche Degradation des Proteins beschrieben ist [154]. Das E6-assoziierte-Protein (E6-AP), eine der bei der kovalenten Bindung des Ubiquitins an das Zielprotein beteiligten E3-Ligase, besitzt eine generelle Koaktivatoraktivität für nukleäre Rezeptoren, so dass ein ligandenspezifisches Bindungsverhalten einzelner Substanzen diesen Effekt erklären könnte [221]. Zudem wird immer deutlicher, dass verschiedene Signale bei der Degradation zusammenwirken, wie die Acetylierung und multiple Phosphorylierung. Cerivastatin ist beispielsweise kein direkter PPAR α -Ligand, aktiviert den Rezeptor aber über einen veränderten Phosphorylierungsstatus [222]. Solche Effekte sind für Telmisartan bisher nicht untersucht worden, könnten aber eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede sein.

Daraufhin wurde untersucht, ob die vermehrte PPAR α -Proteinexpression bereits durch eine gesteigerte mRNA-Synthese bedingt sein könnte. Ein in HepG2-Zellen durchgeführter Dosisverlauf schien dies zu bestätigen, denn die Expression stieg konzentrationsabhängig an und erreichte bei 50 μ M Telmisartan eine $3,39 \pm 0,38$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle ($p < 0,05$). Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die mRNA-Analyse in den Lebern der Mäuse. Auch hier stimulierte Telmisartan die PPAR α -Expression, während sich mit Pioglitazon kein Effekt erzielen ließ. Die transkriptionelle Regulation von PPAR α konnte bereits Anfang der 1990er Jahre demonstriert werden. So zeigten Lemberger et al. die Induktion der PPAR α -mRNA durch Glukokortikoide in primären Rattenleberzellen [223]. TNF α führte hingegen bei Beier et al. in Rattenlebern zu einer Suppression der PPAR α -mRNA [224]. Wie eingangs erwähnt wurde, trägt das Expressionsniveau zur Aktivität des Rezeptors bei, so dass die Diskrepanz zwischen der geringen direkten Aktivierung (der PPAR α -LBD) durch Telmisartan und der vermehrten Zielgenexpression auch über die gesteigerte Expression erklärt werden kann. Denn letztendlich konnte gezeigt werden, dass Telmisartan sowohl in vitro als auch in vivo die PPAR α -Proteinkonzentration über eine konzentrationsabhängig gesteigerte mRNA-Synthese erhöht. Inwiefern noch eine posttranslationale Modifizierung zur weiteren Stabilisierung des Proteins beiträgt, bleibt unklar.

5.6 Telmisartan und PPAR γ in der Leber

Ein niedriger PPAR γ -Spiegel in der Leber scheint unabdingbar für die Verhinderung einer adipogenen Transformation des Organs zu sein. Jedoch kann PPAR γ in PPAR α -KO-Tieren kompensatorisch Funktionen von PPAR α übernehmen [143, 144]. Inwiefern PPAR γ aber unter normalen Expressionspiegeln von PPAR α eine Rolle im Lipidstoffwechsel der Leber spielt ist ungeklärt. Deswegen wurde die Expression von PPAR γ in den Mäuselebern gemessen, um einen Hinweis auf die Zielgenbeeinflussung zu erhalten. Wie zu erwarten war, reduzierte die Behandlung mit Pioglitazon den PPAR γ -Spiegel ($0,35 \pm 0,05$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle, $p < 0,05$), während weder für Telmisartan noch für die Normaldiättiere eine Veränderung in Bezug auf die Hochfettkontrollen auftrat. Dies scheint verständlich unter der Betrachtung, dass es sich bei Telmisartan lediglich um einen partiellen PPAR γ -Agonist handelt. Insofern

reichen die sehr geringen Expressionsspiegel von PPAR γ im Leberparenchym offensichtlich nicht aus, damit Telmisartan agonistisch wirken kann. In Übereinstimmung hiermit führte Telmisartan auch nicht zu einer Aktivierung des PPAR γ -Zielgens CD 36, während Pioglitazon eine $2,84 \pm 0,29$ -fache Induktion vs. unbehandelte Kontrolle bewirkte.

Für die PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon und Pioglitazon konnte kürzlich eine Verbesserung der histologischen Leberbefunde bei NAFL und NASH gezeigt werden [225, 226]. Ein direkter PPAR γ -vermittelter Effekt in der Leber ist dabei nicht anzunehmen, da sonst mit einer weiteren Zunahme der Verfettung gerechnet werden müsste [143, 144]. Vielmehr ist wohl der systemische PPAR γ -Effekt mit Verbesserung der Insulinsensitivität hierfür verantwortlich. In diesem Licht besehen erscheint die Kombination von hepatischer PPAR α -Aktivierung und systemischer PPAR γ -Wirkung von Telmisartan auch als mögliche weitere therapeutische Option für die NAFL/NASH infrage zu kommen.

5.7 Bestimmung von Leberfunktionsparametern

Abschließend wurden im Serum der Mäuse die Transaminasen, Bilirubin und Albumin bestimmt, da aufgrund des enormen Gewichtsunterschieds zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zumindest eine starke Leberverfettung, wenn nicht sogar eine Funktionseinschränkung zu erwarten war. Doch zeigte sich bei Albumin und Bilirubin überhaupt kein Unterschied in der Serumkonzentration, bei den Transaminasen waren zumindest Tendenzen erkennbar, aufgrund der hohen Streubreite erreichten sie jedoch keine Signifikanz. Wie zu erwarten war, wurden die höchsten Werte bei der ASAT in der Gruppe der Hochfettdiätkontrollen erreicht (112 ± 26 U/l). während die mit Telmisartan behandelten Tiere stets im Bereich der Normaldiät lagen. Der aus ASAT und ALAT errechnete de-Ritis-Quotient lag in der Normaldiätgruppe bei $1,11 \pm 0,11$, die Hochfettdiät führte hier zu einer signifikanten Reduktion auf $0,49 \pm 0,06$, während die Behandlung mit Telmisartan diesen Wert wieder normalisieren konnte ($1,08 \pm 0,33$). Dies könnte auf den hier vorliegenden Einfluss von PPAR α in der Fettsäureoxidation hinweisen, die der Leber einen Schutzmechanismus vor einem übergroßen

Substratangebot und der drohenden Verfettung bietet. So zeigte die Verwendung von Fibraten sowohl in Tierversuchen als auch in klinischen Studien eine Verminderung der Leberverfettung bei Vorliegen einer NAFL [227, 228].

5.8 Ausblick

AT₁-Antagonisten konnten die Inzidenz von Typ-2-Diabetes in klinischen Studien im Vergleich zu Plazebo- oder Standardhypertoniemedikationen vermindern. Die mittlerweile bekannte PPAR_γ-Aktivierung einiger Antagonisten könnte hierbei eine Rolle spielen, aber auch die in dieser Arbeit untersuchten Effekte auf PPAR_α und dessen Zielgene, zumindest was den AT₁-Antagonisten Telmisartan betrifft. Welchen Beitrag die über PPAR_α vermittelte Verminderung der Glukolipotoxizität spielt, ist noch zu klären, da die Potenz, mit der Telmisartan PPAR_α aktiviert, noch unter der für PPAR_γ liegt. Ein Vorteil für PPAR_α in dieser Hinsicht ist jedoch die Tatsache, dass Telmisartan stark im Lebergewebe akkumuliert, und zwar in weit größerem Ausmaß als im Fettgewebe, so dass der Plasmaspiegel keine Aussage hinsichtlich der Genaktivierung in den einzelnen Organen machen kann. Ob die erforderlichen Spiegel in der Leber mit Standarddosierungen erreicht werden können, bleibt abzuwarten, doch könnten die derzeit verwendeten Dosierungen von 40 und 80 mg Telmisartan täglich gegebenenfalls erhöht werden. Die Ergebnisse klinischer Studien werden zeigen, ob Telmisartan oder noch zu entwickelnde lipophile AT₁-Antagonisten in der Lage sind, ein gestörtes Lipidprofil derart zu verbessern, dass sie eine Alternative in der Medikation darstellen können. Die Behandlung mehrerer Komponenten des Metabolischen Syndroms mit einer einzigen Substanz würde somit auch mit einer verringerten Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Wechsel- und Nebenwirkungen einhergehen, was die Patientencompliance wesentlich fördern würde.

6 Zusammenfassung

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) gehören zur Familie nukleärer Transkriptionsfaktoren und vermitteln ihre Wirkung über die Zielgentranskription. Kürzlich konnte für eine bestimmte Gruppe der antihypertensiv wirkenden Angiotensin II Rezeptorblocker (ARB), einschließlich Losartan, Irbesartan und Telmisartan, ein partieller Agonismus für PPAR γ nachgewiesen werden. Neuere klinische Studien zeigten, dass Telmisartan zu einer Verbesserung des Lipidprofils führt, die der Wirkungsweise der Fibrate ähnelt, was auf eine zusätzliche Aktivierung von PPAR α hinweisen könnte. Dieser Rezeptor spielt eine herausragende Rolle in der Kontrolle des Lipidmetabolismus über eine Aktivierung der Fettsäureoxidation. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen möglichen Agonismus der ARBs an PPAR α näher zu charakterisieren.

Im Gal4-Transaktivierungsassay aktivierte von den oben genannten ARBs lediglich Telmisartan die PPAR α -LBD, dies jedoch relativ schwach verglichen mit dem vollen Agonisten Fenofibrinsäure. Es schlossen sich Untersuchungen über die Zielgenaktivierung in humanen HepG2- und murinen AML12-Leberzellen, sowie in Lebern eines Diät-induzierten Adipositasmodells (DIO) der Maus (C57BL/6J) an. Hier führte Telmisartan zu einer signifikanten Induktion der Zielgene Cpt1a und Acsl1. Dies konnte nicht im murinen Skelettmuskel beobachtet werden, was der Telmisartan besonderen Pharmakokinetik mit starker Akkumulation im Lebergewebe zugeschrieben wurde. Eine mögliche Beteiligung von PPAR γ sowie des AT $_1$ -Rezeptors konnten ausgeschlossen werden. Neben der schwachen Aktivierung der LBD führte Telmisartan zu einer deutlichen Induktion der PPAR α -mRNA und des Proteins in vitro und in vivo. Weitere Untersuchungen der Ubiquitinierung in HepG2-Zellen konnten zeigen, dass die vermehrte Expression transkriptionell bedingt ist. Im Serum der DIO-Mäuse normalisierte die ARB-Behandlung den de-Ritis-Quotienten, einen Marker für Leberzellschädigung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Telmisartan in vitro und in vivo selektiv in der Leber PPAR α -agonistische Effekte entfaltet. Dies ist ein weiterer Hinweis für zusätzliche pleiotrope Effekte und kann möglicherweise in Kombination mit dem systemischen PPAR γ -Effekt das Behandlungsspektrum von Telmisartan zukünftig erweitern.

7 Abstract

Peroxisome Proliferator activated receptors (PPAR) belong to the superfamily of ligand-activated transcription factors. Their effects on metabolism are mediated via activation of various target genes. Recently a subgroup of the antihypertensive angiotensin receptor blockers (ARBs) including losartan, irbesartan and telmisartan, was identified as partial agonists of PPAR γ . New clinical studies have demonstrated that a treatment with telmisartan results in an improvement of dyslipidemia suggesting additional activation of PPAR α . So the aim of the present study was to investigate a possible PPAR α agonism of the mentioned ARBs.

In the Gal4-transactivation assay only telmisartan activated the PPAR α -LBD moderately compared to the full agonist fenofibric acid. Subsequent studies on target gene activation in HepG2 and AML12 liver cells, and in livers from diet-induced obese (DIO) mice (C57BL/6J) showed a pronounced induction of the target genes Cpt1a and Acs11. No stimulation was observed in the murine skeletal muscle, an effect possibly related to the lipophilic pharmacokinetics of telmisartan with high concentrations in the liver. A possible effect of hepatic PPAR γ and the AT1 receptor could be negated. Neither telmisartan led to an induction of hepatic PPAR γ target genes nor did a blockade of the AT1 receptors result in hepatic target gene regulation. After treatment with telmisartan a marked induction of PPAR α -mRNA and protein was observed which was transcriptionally mediated. Additionally telmisartan normalised the AST/ALT-ratio, a marker for liver cell damage, in serum samples of DIO mice.

In this study we could demonstrate that telmisartan exerts PPAR α agonistic effects in vitro and selectively in livers of DIO mice. Hepatic PPAR α activation may provide an explanation for telmisartan's anti-dyslipidemic actions observed in recent clinical trials.

8 Literaturverzeichnis

1. **Kylin E:** Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom. Zentralblatt für Innere Medizin 44:105-27, (1923).
2. **Camus JP:** Gout, diabetes, hyperlipemia: a metabolic trisyndrome. Rev Rhum Mal Osteoartic. 33(1):10-4, (1966).
3. **Hanefeld M, Leonhardt W:** Das metabolische Syndrom. Dt Gesundh Wesen 36:545-51, (1981).
4. **Reaven GM:** Role of insulin resistance in human disease. Diabetes. 37(12):1595-607, (1988).
5. **DeFronzo RA, Ferrannini E:** Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care. 14:173-94, (1991).
6. **Balkau B, Charles MA:** For the European Group for the Study of Insulin Resistance. Comment on the provisional report from the WHO consultation. Diabet Med. 16(5):442-3, (1999).
7. **Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH et al.:** American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. Endocr Pract. 9(3):237-52, (2003).
8. **International Diabetes Federation:** The IDF consensus world-wide definition of the metabolic syndrome, Available from: http://www.idf.org/webdata/docs/MetSyndrome_FINAL.pdf. (2004).
9. **Anand SS, Yi Q, Gerstein H et al.:** Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease. Circulation. 108(4):420-5, (2003).
10. **Resnick HE, Jones K, Ruotolo G et al.:** Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease in nondiabetic american indians: the Strong Heart Study. Diabetes Care. 26(3):861-7, (2003).
11. **Hauer H, Buchholz G, Hamann A et al.:** Prävention und Therapie der Adipositas. Available from: <http://www.adipositas-gesellschaft.de/daten/Adipositas-Leitlinie-2005.pdf>, (2005).
12. **Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR et al.:** Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation. 112(17):2735-52, (2005).
13. **Ford ES, Giles WH, Mokdad AH:** Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. Adults. Diabetes Care. 27(10):2444-9, (2004).
14. **King H, Aubert RE, Herman WH:** Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care. 21:1414-31, (1998).
15. **Park YW, Zhu S, Palaniappan L et al.:** The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Arch Intern Med. 163(4):427-36, (2003).
16. **Chen J, Muntner P, Hamm LL et al.:** The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. Ann Intern Med. 140(3):167-74, (2004).

17. **Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP et al.:** Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 41(6):715-22, (1992).
18. **Isomaa B, Almgren P, Tuomi T et al.:** Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 24(4):683-9, (2001).
19. **Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA et al.:** The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288(21):2709-16, (2002).
20. **Malik S, Wong ND, Franklin SS et al.:** Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 110(10):1245-50, (2004).
21. **Sattar N, Gaw A, Scherbakova O et al.:** Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*. 108(4):414-9, (2003).
22. **Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE et al.:** Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 346(6):393-403, (2002).
23. **Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG et al.:** Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 344(18):1343-50, (2001).
24. **Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R et al.:** The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med*. 142(8):611-9, (2005).
25. **Wong ND, Pio JR, Franklin SS et al.:** Preventing coronary events by optimal control of blood pressure and lipids in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 91(12):1421-6, (2003).
26. **Israili ZH, Lyoussi B, Hernández-Hernández R et al.:** Metabolic syndrome: treatment of hypertensive patients. *Am J Ther*. 14(4):386-402, (2007).
27. **Diabetes Atherosclerosis Intervention Study Investigators:** Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomized study. *Lancet*. 357(9260):905-10, (2001).
28. **Frick MH, Elo O, Haapa K et al.:** Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 317(20):1237-45, (1987).
29. **Keech A, Simes RJ, Barter P et al.:** Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*. 366(9500):1849-61, (2005).
30. **Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P et al.:** Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment. *Circulation*. 85(1):37-45, (1992).
31. **Robins SJ, Collins D, Wittes JT et al.:** Reaction of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA*. 285(12):1585-91, (2001).
32. **Canner PL, Furberg CD, McGovern ME:** Benefits of niacin in patients with versus without the metabolic syndrome and healed myocardial infarction (from the Coronary Drug Project). *Am J Cardiol*. 97(4):477-9, (2006).
33. **Pahan K:** Lipid-lowering drugs. *Cell Mol Life Sci*. 63(10):1165-78, (2006).

34. **Kahn R, Buse J, Ferrannini E et al.:** The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 28(9):2289-304, (2005).
35. **WHO:** Obesity: preventing and managing the global epidemic, pp. 1-276, WHO Technical Report Series 894, Genf. (2000).
36. **Despres JP, Lemieux I, Prud'homme D:** Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ* 322(7288):716-20, (2001).
37. **Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S et al.:** Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol*. 73(7):460-8, (1994).
38. **Lean ME, Han TS, Morrison CE:** Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ*. 311(6998):158-61, (1995).
39. **James PT, Rigby N, Leach R:** The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 11(1):3-8, (2004).
40. **Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ et al.:** Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 22(1):39-47, (1998).
41. **Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL et al.:** Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 288(14):1772-3, (2002).
42. **Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH et al.:** The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA*. 282(16):1519-22, (1999).
43. **Mensink GB, Lampert T, Bergmann E:** Übergewicht und Adipositas in Deutschland 1984–2003. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48(12):1348-56, (2005).
44. **James WPT, Jackson-Leach R, Ni Mhurchu C:** Overweight and obesity (high body mass index), in *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors*, vol 1, Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A et al., Editors. WHO, Genf, (2004).
45. **Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F et al.:** Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med*. 138(1):24-32, (2003).
46. **Wolf HK, Tuomilehto J, Kuulasmaa K et al.:** Blood pressure levels in the 41 populations of the WHO MONICA Project. *J Hum Hypertens*. 11(11):733-42, (1997).
47. **Kastarinen MJ, Nissinen AM, Vartiainen EA et al.:** Blood pressure levels and obesity trends in hypertensive and normotensive Finnish population from 1982 to 1997. *J Hypertens*. 18(3):255-62, (2000).
48. **Stevens J, Couper D, Pankow J et al.:** Sensitivity and specificity of anthropometrics for the prediction of diabetes in a biracial cohort. *Obes Res*. 9(11):696-705, (2001).
49. **Young T, Palta M, Dempsey J et al.:** The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 328(17):1230-5, (1993).
50. **Rimm AA, Werner LH, Yserloo BV et al.:** Relationship of obesity and disease in 73,532 weight-conscious women. *Public Health Rep*. 90(1):44-54, (1975).
51. **Vainio H, Bianchini F:** Weight control and physical activity. *handbook of cancer prevention*, ed. IARC. Vol. 6. International Agency for Cancer, Lyon, (2002).

52. **Puhl RM, Henderson KE, Brownell KD:** Social consequences of obesity, in Clinical obesity, Kopelman PG Caterson ID, Dietz WH, Editor. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 29-45, (2005).
53. **Carpenter KM, Hasin DS, Allison DB et al.:** Relationships between obesity and DSM-IV major depressive disorder, suicide ideation, and suicide attempts: results from a general population study. *Am J Public Health.* 90(2):251-7, (2000).
54. **Desvergne B, Wahli W:** Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20(5):649-88, (1999).
55. **Löffler G:** Leber, in Biochemie und Pathobiochemie, Löffler G, Petrides PE, Editors. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 1024-39, (1997).
56. **Felig P, Wahren J:** Fuel homeostasis in exercise. *N Engl J Med.* 293(21):1078-84, (1975).
57. **Randle PJ, Garland PB, Hales CN et al.:** The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1:785-9, (1963).
58. **Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M:** Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J.* 320:345-57, (1996).
59. **Foster DW:** The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 1033:1-16, (2004).
60. **Louet JF, Le May C, Pegorier JP et al.:** Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 2):310-6, (2001).
61. **Kolodziej MP, Crilly PJ, Corstorphine CG et al.:** Development and characterization of a polyclonal antibody against rat liver mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (CPT I). Distinction of CPT I from CPT II and of isoforms of CPT I in different tissues. *Biochem J.* 282:415-21, (1992).
62. **Weis BC, Esser V, Foster DW et al.:** Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. The minor component is identical to the liver enzyme. *J Biol Chem.* 269(29):18712-5, (1994).
63. **McGarry JD, Foster DW:** Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem.* 49:395-420, (1980).
64. **Cook GA:** Differences in the sensitivity of carnitine palmitoyltransferase to inhibition by malonyl-CoA are due to differences in Ki values. *J Biol Chem* 259(19):12030-3, (1984).
65. **Cooper TG, Beavers H:** Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J Biol Chem* 244(13):3507-13, (1969).
66. **Lazarow PB, DeDuve C:** A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73(6):2043-6, (1976).
67. **Reddy JK, Mannaerts GP:** Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 14:343-70, (1994).
68. **Powell PK, Wolf I, Lasker JM:** Identification of CYP4A11 as the major lauric acid omega-hydroxylase in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 335(1):219-26, (1996).
69. **Angulo P:** Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 346(16):1221-31, (2002).
70. **Brunt EM:** Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis.* 21(1):3-16, (2001).

71. **Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F et al.:** Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 120(5):1281-5, (2001).
72. **Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T et al.:** Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 116(6):1413-9, (1999).
73. **Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G et al.:** Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis*. 21(1):17-26, (2001).
74. **Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R et al.:** Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 40(6):1387-95, (2004).
75. **Stone BG, Van Thiel DH:** Diabetes mellitus and the liver. *Semin Liver Dis*. 5(1):8-28, (1985).
76. **Cohen JA, Kaplan MM:** The SGOT/SGPT ratio-an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci*. 24(11):835-8, (1979).
77. **Ruhl CE, Everhart JE:** Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*. 124(1):71-9, (2003).
78. **Clark JM, Brancati FL, Diehl AM:** The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 98(5):960-7, (2003).
79. **McCullough AJ:** The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 8(3):521-33, viii, (2004).
80. **Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G et al.:** Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 38(2):536, (2003).
81. **Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM et al.:** Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med*. 107(5):450-5, (1999).
82. **Sanyal AJ:** Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2(1):46-53, (2005).
83. **Neuschwander-Tetri BA:** Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*. 330(6):326-35, (2005).
84. **Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC et al.:** NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 35(2):373-9, (2002).
85. **Jimba S, Nakagami T, Takahashi M et al.:** Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med*. 22(9):1141-5, (2005).
86. **Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB:** Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J*. 93(3):652-65, (1964).
87. **Dresner A, Laurent D, Marcucci M et al.:** Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 103(2):253-9, (1999).
88. **Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR:** Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 103(7):931-43, (1999).

89. **Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW et al.:** Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*. 48(6):1270-4, (1999).
90. **Shulman GI:** Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 106(2):171-6, (2000).
91. **Diraison F, Moulin P, Beylot M:** Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*. 29(5):478-85, (2003).
92. **Saltiel AR, Kahn CR:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414(6865):799-806, (2001).
93. **Torres N, Tovar AR:** The role of dietary protein on lipotoxicity. *Nutr Rev*. 65(6 Pt 2):S64-8, (2007).
94. **Ruhl CE, Everhart JE:** Coffee and tea consumption are associated with a lower incidence of chronic liver disease in the United States. *Gastroenterology*. 129(6):1928-36, (2005).
95. **Cave M, Deaciuc I, Mendez C et al.:** Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem*. 18(3):184-95, (2007).
96. **Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V:** Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*. 3(11):950-64, (2004).
97. **Dreyer C, Krey G, Keller H et al.:** Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68(5):879-87, (1992).
98. **Issemann I, Green S:** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347(6294):645-50, (1990).
99. **Bell DR, Plant NJ, Horley NJ et al.:** Peroxisome proliferators: species differences in response of primary hepatocyte cultures. *Ann N Y Acad Sci*. 804:628-35, (1996).
100. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. IARC Sci Publ. 66:1-514, (1996).
101. **Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL et al.:** Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*. 10(10):1167-77, (1996).
102. **Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J:** An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 55(6-7):932-43, (1999).
103. **Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ et al.:** Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 358(6389):771-4, (1992).
104. **Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG et al.:** The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J*. 11(2):433-9, (1992).
105. **Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S et al.:** A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 387(6634):733-6, (1997).
106. **Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C et al.:** Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem*. 274(15):10505-10, (1997).

107. **Werman A, Hollenberg A, Solanes G et al.:** Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 272(32):20230-5, (1997).
108. **Bannister AJ, Kouzarides T:** The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature.* 384(6610):641-3, (1996).
109. **Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V et al.:** The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell.* 87(5):953-9, (1996).
110. **Spiegelman BM, Heinrich R:** Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell.* 119(2):157-67, (2004).
111. **Zhu Y, Qi C, Jain S et al.:** Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* 272(41):25500-6, (1997).
112. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C et al.:** Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 137(1):354-66, (1996).
113. **Chinetti G, Griglio S, Antonucci M et al.:** Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 273(40):25573-80, (1998).
114. **Marx N, Sukhova GK, Collins T et al.:** PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation.* 99(24):3125-31, (1999).
115. **Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ et al.:** Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol Pharmacol.* 53(1):14-22, (1998).
116. **Fajas L, Auboeuf D, Raspe E et al.:** The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 272(30):18779-89, (1996).
117. **Barish GD, Narkar VA, RM Evans:** PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 116(3):590-7, (2006).
118. **Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L et al.:** Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 46(8):1319-27, (1997).
119. **Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S et al.:** Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem.* 70(4):1366-75, (1998).
120. **Mandard S, Muller M, Kersten S:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci.* 61(4):393-416, (2004).
121. **Reddy JK, Chu R:** Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: pursuit of a phenomenon. *Ann N Y Acad Sci.* 804:176-201, (1996).
122. **Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM et al.:** Coordinate Regulation of the Expression of the Fatty Acid Transport Protein and Acyl-CoA Synthetase Genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272(45):28210-7, (1997).
123. **Motojima K, Passilly P, Peters JM et al.:** Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem.* 273(27):16710-4, (1998).

124. **Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA et al.:** Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest.* 95(2):705-12, (1995).
125. **Peters JM, Hennuyer N, Staels B et al.:** Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem.* 272(43):27307-12, (1997).
126. **Finck BN, Lehman JJ, Leone TC et al.:** The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 109(1):121-30, (2002).
127. **Kersten S, Seydoux J, Peters JM et al.:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 103(11):1489-98, (1999).
128. **Tontonoz P, Hu E, Devine J et al.:** PPARgamma2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 15(1):351-7, (1995).
129. **Wu P, Peters JM, Harris RA:** Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 287(2):391-6, (2001).
130. **Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE et al.:** A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest.* 102(6):1083-91, (1998).
131. **Desvergne B, Michalik L, Wahli W:** Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol.* 18(6):1321-32, (2004).
132. **Guerre-Millo M, Rouault C, Poulain P et al.:** PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* 50(12):2809-14, (2001).
133. **Tong Y, Hara A, Komatsu M et al.:** Suppression of expression of muscle-associated proteins by PPARalpha in brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 14(336):76-83, (2005).
134. **Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N et al.:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem.* 276(2):1486-93, (2001).
135. **Devchand PR, Keller H, Peters JM et al.:** The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* 384(6604):39-43, (1996).
136. **Staels B, Koenig W, Habib A et al.:** Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* 393(6687):790-3, (1998).
137. **Chinetti G, Lestavel S, Bocher V et al.:** PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 7(1):53-8, (2001).
138. **Chinetti G, Lestavel S, Fruchart JC et al.:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha reduces cholesterol esterification in macrophages. *Circ Res.* 92(5):518-24, (2003).
139. **Poynter ME, Daynes RA:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 273(49):32833-41, (1998).

140. **Peters JM, Cattley RC, Gonzalez FJ:** Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis*. 18(11):2029-33, (1997).
141. **Shah YM, Morimura K, Yang Q et al.:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation. *Mol Cell Biol*. 27(12):4238-47, (2007).
142. **Michalik L, Desvergne B, Wahli W:** Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 4(1):61-70, (2004).
143. **Yu S, Matsusue K, Kashireddy P et al.:** Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem*. 278(1):498-505, (2003).
144. **Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K et al.:** Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology*. 141(11):4021-31, (2000).
145. **Patsouris D, Reddy JK, Muller M et al.:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology*. 147(3):1508-16, (2006).
146. **Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM et al.:** The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology*. 137(10):4499-502, (1996).
147. **Hu E, Kim JB, Sarraf P et al.:** Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*. 274(5295):2100-3, (1996).
148. **Barger PM, Browning AC, Garner AN et al.:** p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem*. 276(48):44495-501, (2001).
149. **Shao D, Rangwala SM, Bailey ST et al.:** Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*. 396(6709):377-80, (1998).
150. **Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown,** Glaumann H, Ballard FJ, Editors. Academic Press Invest. 197-203, (1987).
151. **Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP et al.:** Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(5):1858-62, (1999).
152. **Syvala H, Viononen A, Zhuang YH et al.:** Evidence for enhanced ubiquitin-mediated proteolysis of the chicken progesterone receptor by progesterone. *Life Sci*. 63(17):1505-12, (1998).
153. **Masuyama H, MacDonald PN:** Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem*. 71(3):429-40, (1998).
154. **Hauser S, Adelmant G, Sarraf P et al.:** Degradation of the Peroxisome-Proliferator-activated Receptor gamma is Linked to Ligand-dependent Activation. *J Biol Chem* 275(24):18527-33, (2000).
155. **Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC et al.:** Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha (PPARalpha) Turnover by the Ubiquitin-Proteasome System Controls the Ligand-induced Expression of Its Target Genes. *J Biol Chem* 277(40):37254-9, (2002).

156. **Ferre P:** The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*. 53 (Suppl 1):S43-50, (2004).
157. **Staels B, Fruchart JC:** Therapeutic roles of peroxisome-proliferator activated receptor agonists. *Diabetes*. 54(8):2460-70, (2005).
158. **Adler AI, Stevens RJ, Neil A et al.:** UKPDS 59: hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 25(5):894-9, (2002).
159. **Goya K, Sumitani S, Xu X et al.:** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24(4):658-63, (2004).
160. **Vera T, Taylor M, Bohman Q et al.:** Fenofibrate prevents the development of angiotensin II-dependent hypertension in mice. *Hypertension*. 45(4):730-5, (2005).
161. **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T et al.:** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 52(3):415-72, (2000).
162. **Andrews PR, Carson JM, Caselli A et al.:** Conformational analysis and active site modelling of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Med Chem*. 28(3):393-9, (1985).
163. **Israili ZH, Hall WD:** Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med*. 117(3):234-42, (1992).
164. **Barnett AH, Bain SC, Bouter P et al.:** Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 351(19):1952-61, (2004).
165. **Scheen AJ:** Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs*. 64(22):2537-65, (2004).
166. **DREAM Trial Investigators:** Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med*. 355(15):1551-62, (2006).
167. **Velloso LA, Folli F, Sun XJ et al.:** Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(22):12490-5, (1996).
168. **Leiter LA, RZ Lewanczuk:** Of the renin-angiotensin system and reactive oxygen species Type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. *Am J Hypertens*. 18(1):121-8, (2005).
169. **Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer CA et al.:** Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19(7):1623-9, (1999).
170. **Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I et al.:** Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*. 37(2 Part 2):414-8, (2001).
171. **Yavuz DG, Ersöz O, Kuçükkaya B et al.:** The effect of losartan and captopril on glomerular basement membrane anionic charge in a diabetic rat model. *J Hypertens*. 17(8):1217-23, (1999).
172. **Schupp M, Clemenz M, Gineste R et al.:** Molecular Characterization of New Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Modulators With Angiotensin Receptor Blocking Activity. *Diabetes*. 54(12):3442-52, (2005).
173. **Schupp M, Janke J, Clasen R et al.:** Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation*. 109(17):2054-7, (2004).

174. **Derosa G, Ragonesi PD, Mugellini A et al.:** Effects of telmisartan compared with eprosartan on blood pressure control, glucose metabolism and lipid profile in hypertensive, type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled 12-month study. *Hypertens. Res.* 27(7):457-64, (2004).
175. **Inoue T, Morooka T, Moroe K et al.:** Effect of telmisartan on cholesterol levels in patients with hypertension - Saga Telmisartan Aggressive Research (STAR). *Horm Metab Res.* 39(5):372-6, (2007).
176. **Mori Y, Itoh Y, Tajima N:** Telmisartan improves lipid metabolism and adiponectin production but does not affect glycemic control in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Adv Ther.* 24(1):146-53, (2007).
177. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Lab Press, (1989).
178. **Klebe RJ, Harriss JV, Sharp ZD et al.:** A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25(2-3):333-41, (1983).
179. **Chomczynski P, Sacchi N:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9, (1987).
180. **Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5, (1970).
181. **Kim JH, Lewin TM, Coleman RA:** Expression and characterization of recombinant rat Acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. *J Biol Chem* 276(27):24667-73, (2001).
182. **Qi JS, Desai-Yajnik V, Greene ME et al.:** The ligand-binding domains of the thyroid hormone/ retinoid receptor gene subfamily function in vivo to mediate heterodimerization, gene silencing and transactivation. *Mol Cell Biol.* 15(3):1817-25, (1995).
183. **Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H et al.:** Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270(33):19269-76, (1995).
184. **Schoonjans K, Staels B, Auwerx J:** The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Acta.* 1302(2):93-109, (1996).
185. **Mukherjee R, Sun S, Santomena L et al.:** Ligand and coactivator recruitment preferences of peroxisome proliferator activated receptor alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 81(3):217-25, (2002).
186. **Knowles BB, Aden DP:** Human hepatoma derived cell line. The Wistar Institute of Anatomy and Biology (Philadelphia PA). Patent no. 4393133, Application no. 158685, USA (1983).
187. **Busch SJ, Barnhart RL, Martin GA et al.:** Differential regulation of hepatic triglyceride lipase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene expression in a human hepatoma cell line, HepG2. *J Biol Chem* 265(36):22474-9, (1990).
188. **Bisgaier CL, Essenburg AD, Barnett BC et al.:** A novel compound that elevates high density lipoprotein and activates the peroxisome proliferator activated receptor. *J Lipid Res.* 39(1):17-30, (1998).
189. **Yu GS, Lu YC, Gulick T:** Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I β gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J Biol Chem.* 273(49):32901-9, (1998).

190. **Aoyama T, Peters JM, Iritani N et al.:** Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 273(10):5678-84, (1998).
191. **Mashek DG, Bornfeldt KE, Coleman RA et al.:** Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J Lipid Res.* 45(10):1958-61, (2004).
192. **Wang YL, Guo W, Zang Y et al.:** Acyl coenzyme a synthetase regulation: putative role in long-chain acyl coenzyme a partitioning. *Obes Res.* 12(11):1781-8, (2004).
193. **Mills E, Kuhn CM, Feinglos MN et al.:** Hypertension in CB57BL/6J mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Physiol.* 264(1 Pt 2):R73-8, (1993).
194. **Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S et al.:** Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 278(3):704-11, (2000).
195. **Su JL, Simmons CJ, Wisely B et al.:** Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma.* 17(1):47-53, (1998).
196. **Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N:** Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol.* 13(9):1522-34, (1999).
197. **Zhu J, Gianni M, Kopf E et al.:** Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(26):14807-12, (1999).
198. **Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE et al.:** Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 359(9311):995-1003, (2002).
199. **Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI et al.:** Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension.* 43(5):993-1002, (2004).
200. **Cronet P, Petersen JF, Folmer R et al.:** Structure of the PPARalpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure.* 9(8):699-706, (2001).
201. **Olive DL:** Role of progesterone antagonists and new selective progesterone receptor modulators in reproductive health. *Obstet Gynecol Surv.* 57(11 suppl 4):S55-63, (2002).
202. **Rocchi S, Picard F, Vamecq J et al.:** A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol Cell.* 8(4):737-47, (2001).
203. **Hsu MH, Savas U, Griffin KJ et al.:** Identification of peroxisome proliferator-responsive human genes by elevated expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 276(30):27950-8, (2001).
204. **Lawrence JW, Li Y, Chen S et al.:** Differential gene regulation in human versus rodent hepatocytes by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. PPAR alpha fails to induce peroxisome proliferation-associated genes in human cells independently of the level of receptor expression. *J Biol Chem.* 276(34):31521-7, (2001).
205. **Rebuffe-Scrive M, Surwit R, Feinglos M et al.:** Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 42(11):1405-9, (1993).

206. **Stewart-Phillips JL, Lough J.:** Pathology of atherosclerosis in cholesterol-fed, susceptible mice. *Atherosclerosis*. 90(2-3):211-8, (1991).
207. **Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T et al.:** Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes*. 56(11):2759-65, (2007).
208. **Li PP, Shan S, Chen YT et al.:** The PPARalpha/gamma dual agonist chiglitazar improves insulin resistance and dyslipidemia in MSG obese rats. *Br J Pharmacol*. 148(5):610-8, (2006).
209. **Shimasaki M, Yamashita K, Imanishi R et al.:** Pharmacokinetics of ¹⁴C-Telmisartan: Absorption, Distribution and Protein Binding of ¹⁴C Telmisartan. *Xenobio. Metabol. and Dispos*. 14(6):425-36, (1999).
210. **Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D et al.:** Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J*. 17(15):2299-301, (2003).
211. **Holst D, Luquet S, Nogueira V et al.:** Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta*. 1633(1):43-50, (2003).
212. **Pedraza N, Rosell M, Villarroya J et al.:** Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression. *Endocrinology*. 147(10):4695-704, (2006).
213. **Kannisto K, Chibalin A, Glinghammar B et al.:** Differential expression of peroxisomal proliferator activated receptors alpha and delta in skeletal muscle in response to changes in diet and exercise. *Int J Mol Med*. 17(1):45-52, (2006).
214. **Araki K, Masaki T, Katsuragi I et al.:** Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension*. 48(1):51-7, (2006).
215. **Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM et al.:** PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Acta*. 1740(2):293-304, (2005).
216. **Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K et al.:** Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl₄-induced liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 346(3):658-64, (2006).
217. **Ohishi T, Saito H, Tsusaka K et al.:** Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res*. 21(2):147-58, (2001).
218. **Yvan-Charvet L, Even P, Lamandé N et al.:** Prevention of Adipose Tissue Depletion during Food Deprivation in Angiotensin Type 2 Receptor-Deficient Mice. *Endocrinology*. 147(11):5078-86, (2006).
219. **Hirovani M, Tsukamoto T, Bourdeaux J et al.:** Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by the ligand. *Biochem Biophys Res Commun*. 288(1):106-10, (2001).
220. **Lee DH, Goldberg AL:** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*. 8(10):397-403, (1998).
221. **Nawaz Z, O'Malley BW:** Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *Mol Endocrinol*. 18(3):493-9, (2004).
222. **Martin G, Duez H, Blanquart C et al.:** Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest*. 111(7):1423-32, (2001).

223. **Lemberger T, Staels B, Saladin R et al.:** Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 269(40):24527-30, (1994).
224. **Beier K, Völkl A, Fahimi HD:** TNF-alpha downregulates the peroxisome proliferator activated receptor-alpha and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. *FEBS Lett.* 412(2):385-7, (1997).
225. **Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR et al.:** Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology.* 38(4):1008-17, (2003).
226. **Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI et al.:** A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 39(1):188-96, (2004).
227. **Athyros VG, Mikhailidis DP, Didangelos TP et al.:** Effect of multifactorial treatment on non-alcoholic fatty liver disease in metabolic syndrome: a randomised study. *Curr Med Res Opin.* 22(5):873-83, (2006).
228. **Haluzik MM, Lacinova Z, Dolinkova M et al.:** Improvement of insulin sensitivity after peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment is accompanied by paradoxical increase of circulating resistin levels. *Endocrinology.* 147(9):4517-24, (2006).

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 1.1: Entwicklung der Adipositas in den USA zwischen 1991 und 1998. Nach Daten von Mokdad et al. [42].	9
Abbildung 1.2: Struktur nukleärer Rezeptoren, adaptiert nach [95].	19
Abbildung 1.3: Funktionen von PPAR α in der Leber, nach [119].	21
Abbildung 4.1: Aktivierung der PPAR α -LBD durch Liganden	52
Abbildung 4.2: CPT1a Expression durch Telmisartan in HepG2-Zellen	55
Abbildung 4.3: CPT1a Expression durch WY 14.643 in HepG2-Zellen	55
Abbildung 4.4: CPT1a Expression in HepG2-Zellen	56
Abbildung 4.5: Acsl1 Zielgenexpression in AML12-Zellen	58
Abbildung 4.6: mRNA-Expression von Cpt1a (A), Acsl1 (B) und Cyp4a10 (C) in Lebern von C57BL/6J-Mäusen	61
Abbildung 4.7: mRNA-Expression im M. soleus von C57BL/6J-Mäusen	62
Abbildung 4.8: Acsl1-Proteinexpression in Lebern von C57BL/6J-Mäusen	63
Abbildung 4.9: Unabhängigkeit der CPT1a Genexpression von der AT $_1$ -Rezeptorblockade in HepG2-Zellen.	64
Abbildung 4.10: Western Blot für PPAR α in Lebern von C57BL/6J-Mäusen	65
Abbildung 4.11: PPAR α wird nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut	66
Abbildung 4.12: Ubiquitinierungsstatus von PPAR α nach 24 Stunden Behandlung mit Telmisartan	67
Abbildung 4.13: PPAR α -mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Stimulation mit Telmisartan für 48h.	68
Abbildung 4.14: PPAR α -mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Stimulation mit Eprosartan für 48h.	69
Abbildung 4.15: PPAR α -mRNA-Expression in Lebern von C57BL/6J-Mäusen	70
Abbildung 4.16: PPAR γ -mRNA-Expression in Lebern von C57BL/6J-Mäusen	71
Abbildung 4.17: Expression von CD 36 in Lebern von C57BL/6J-Mäusen	72
Abbildung 4.18: Bestimmung von Leberfunktionsparametern im Serum von C57BL/6J-Mäusen	74
Abbildung 4.19: Bestimmung von Leberfunktionsparametern im Serum von C57BL/6J-Mäusen	75
Abbildung 4.20: Bestimmung des de-Ritis-Quotienten (ASAT/ALAT) im Serum von C57BL/6J-Mäusen	76

9.2 Tabellen

Tabelle 3.1: Verzeichnis der verwendeten Primer.....	36
Tabelle 4.1: Vergleich von EC ₅₀ -Werten und Effizienzen der PPAR α -LBD Aktivierung	53

10 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

11 Danksagung

Bei Herrn Professor Kintscher möchte ich mich für die Überlassung des Themas bedanken, welches er stets mit großer Anteilnahme, konstruktiver Kritik und vollem Vertrauen in meine Tätigkeit exzellent betreute.

Große Dankbarkeit verbindet mich weiterhin mit Markus Clemenz, der mich nicht nur in die molekularbiologische Arbeitsweise eingeführt hat, sondern mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch bei Anna Foryst-Ludwig bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung und Expertise. Weiterer Dank gebührt Melanie Timm, Martin Hartge, Frau Sprang und Jan Scheffe für ihre Mitarbeit und Hilfestellung in Detailfragen.

Allen näheren und fernerer Beteiligten der Arbeitsgruppen Kintscher und Unger danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere mit Marlen Katerbaum, Matthias Goebel und Dirk-Jan Enklaar verbinden mich hier schöne Erinnerungen.

Ein tief empfundener Dank gilt meinen Eltern für die Ermöglichung dieses Studiums und ihre Unterstützung über all die Jahre, sowie allen Freunden, die diese Zeit zu etwas Besonderem haben werden lassen.

12 Erklärung

„Ich, Nikolaj Frost, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Regulation des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors alpha durch Angiotensin II Rezeptorantagonisten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 10. Januar 2008

Nikolaj Frost