

Aus dem Institut für Pharmakologie,
Center for Cardiovascular Research,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung von PPAR γ im Fettgewebe für metabolische
Effekte des Angiotensin Typ 1 Rezeptorantagonisten
Telmisartan

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lucas Dong-Gun Lee

aus Busan, Republik Korea (Südkorea)

Datum der Promotion: 5. Juni 2016

Inhaltsverzeichnis	
ZUSAMMENFASSUNG	5
ABSTRACT.....	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1 EINLEITUNG	10
1.1 DAS MENSCHLICHE FETTGEWEBE UND SEINE FUNKTIONEN	10
1.2 ADIPOSITAS	12
1.3 METABOLISCHES SYNDROM	13
1.4 EINFÜHRUNG: PEROXISOM PROLIFERATOR-AKTIVIERTER REZEPTOR γ	14
1.5 PPAR ALS MITGLIED DER SUPERFAMILIE DER NUKLEÄREN HORMONREZEPTOREN	15
1.6 PPAR-ISOFORMEN UND PPAR γ SPLEIßVARIANTEN	17
1.7 PPAR γ -EXPRESSION IM MENSCHEN.....	18
1.8 MOLEKULARE MECHANISMEN VON PPAR.....	18
1.9 POSTTRANSLATIONALE PPAR γ -MODIFIKATIONEN	20
1.10 PPAR γ -LIGANDEN.....	21
1.10.1 <i>Physiologische Liganden</i>	21
1.10.2 <i>Synthetische Liganden</i>	21
1.11 PPAR γ_2 FUNKTIONEN IM FETTGEWEBE	22
1.12 GLUKOSETRANSPORTER 4 (GLUT4).....	23
1.13 AT $_1$ -REZEPTORANTAGONIST TELMISARTAN	24
1.14 RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM (RAAS).....	24
1.15 HYPOTHESE	25
2 MATERIALIEN UND METHODEN	26
2.1 MATERIALIEN	26
2.1.1 <i>Chemikalien, Substanzen und Kits</i>	26
2.1.2 <i>Primers</i>	27
2.1.3 <i>Enzyme</i>	27
2.1.4 <i>Versuchstiere</i>	27
2.1.5 <i>Diverse chirurgische Utensilien</i>	27
2.2 METHODEN	28
2.2.1 <i>Zucht von FKO-Mäusen ohne fettgewebsspezifisches PPARγ</i>	28

2.2.2	Experimenteller Ablauf.....	29
2.2.3	Metabolischer Käfig zur metabolischen Charakterisierung.....	31
2.2.4	Bestimmung Fettmasse (NMR).....	31
2.2.5	RNA Präparation aus epididymalem Fett.....	31
2.2.6	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	32
2.2.7	Reverse Transkription zur cDNA-Synthese.....	33
2.2.8	Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
2.2.9	Quantitative real time PCR (qRT-PCR).....	35
2.2.10	Standard Real-Time PCR Reaktionsansatz:.....	35
2.2.11	Analyse der qRT-PCR Ergebnisse mit $\Delta\Delta C_T$ -Methode.....	36
2.2.12	Protokoll für Proteinbestimmung aus organischen Geweben.....	36
2.2.13	Statistik.....	37
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	ZUCHT VON FKO-MÄUSEN OHNE FETTGEWEBSSPEZIFISCHES PPAR γ	38
3.2	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DAS KÖRPERGEWICHT VON FKO-MÄUSEN.....	40
3.3	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF HFD-INDUZIERTER ADIPOSITAS BEI FKO-MÄUSEN.....	42
3.4	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DIE NAHRUNGS-AUFNAHME VON FKO-MÄUSEN.....	44
3.5	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DEN ENERGIEVERBRAUCH VON FKO-MÄUSEN.....	46
3.6	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DIE <i>LOCOMOTOR ACTIVITY</i> VON FKO-MÄUSEN.....	47
3.7	TELMISARTAN OHNE SIGNIFIKANTEN EFFEKT AUF RESPIRATORISCHEN QUOTIENTEN.....	48
3.8	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DIE GLUKOSETOLERANZ IN FKO-MÄUSEN.....	49
3.9	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF GLUT4-MRNA EXPRESSION IN FKO MÄUSEN.....	51
4	DISKUSSION.....	52
4.1	KLINISCHE HINWEISE FÜR METABOLISCHE EFFEKTE VON TELMISARTAN.....	52
4.2	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DIE KÖRPERGEWICHTSENTWICKLUNG UND HFD-INDUZIERTER ADIPOSITAS VON FKO-MÄUSEN.....	52
4.3	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF RQ UND EE IN FKO-MÄUSEN.....	54
4.4	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DIE <i>LOCOMOTOR ACTIVITY</i> UND NAHRUNGS-AUFNAHME VON FKO-MÄUSEN.....	55
4.5	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF DIE ORALE GLUKOSETOLERANZ IN FKO MÄUSEN.....	56
4.6	TELMISARTAN OHNE EFFEKT AUF GLUT4 mRNA EXPRESSION IN FKO MÄUSEN.....	56
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	58

6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	73
7	TABELLENVERZEICHNIS.....	74
8	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	75
9	CURRICULUM VITAE	76
10	PUBLIKATIONEN	77
11	DANKSAGUNG.....	78

Zusammenfassung

Das Metabolische Syndrom beschreibt ein Symptomenkomplex aus Bluthochdruck, abdominaler Adipositas, gestörter Glukosetoleranz, Insulinresistenz, atherogener Dyslipidämie, prothrombotischem und proinflammatorischem Allgemeinzustand. Gemeinsam erhöhen sie signifikant das Risiko für Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

Der Peroxisom Proliferator-Aktivierte Rezeptor γ (PPAR γ) ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor mit zentralen Regulationsfunktionen im Lipid- und Glukosestoffwechsel und gilt als vielversprechendes Zielmolekül für potenzielle Therapien des Metabolischen Syndroms.

Telmisartan ist ein Angiotensin Typ 1 Rezeptorantagonist mit partiellem PPAR γ -Agonismus. Zudem wurden in zahlreichen Vorarbeiten diverse, pleiotrope Stoffwechseleffekte von Telmisartan beschrieben. Der hier zugrunde liegende, molekulare Mechanismus ist jedoch nicht eindeutig und wird immer wieder kontrovers diskutiert.

Wir stellten somit die Arbeitshypothese, dass die pleiotropen, metabolisch positiven Effekte von Telmisartan primär durch die Aktivierung des fettgewebsspezifischen PPAR γ erfolgen.

Mit Hilfe der *Cre/loxP*-Technologie wurde somit ein funktionelles *knockout* Mausmodell ohne relevante Expression des fettgewebsspezifischen PPAR γ gezüchtet.

Die anschließenden Analysen der PPAR γ -defizienten Mäuse zeigten eine Abschwächung der positiven metabolischen Effekte von Telmisartan und Pioglitazon, insbesondere auf den Glukosestoffwechsel und das Körpergewicht.

Die downstream Regulation des GLUT4 Gens durch PPAR γ trägt wesentlich zur systemischen Glukosetoleranz bei. Eine Behandlung der FKO-Mäuse mit Telmisartan führte zu keiner relevanten Expressionsänderung von GLUT4-mRNA.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit durch diese tierexperimentellen Daten gezeigt werden, dass der fettgewebsspezifische PPAR γ für die metabolischen Effekte von Telmisartan eine wesentliche Rolle spielt.

Abstract

The metabolic syndrome consists of hypertension, abdominal obesity, impaired glucose tolerance, insulin resistance, atherogenic dyslipidemia, prothrombotic and proinflammatory condition. The combination of these symptoms causes a significant risk for the incidence of diabetes mellitus, cardiovascular morbidity and mortality.

The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a nuclear transcription factor functioning primarily as the master regulator of lipid and glucose metabolism. PPAR γ is being studied extensively as a potential target molecule for metabolic therapeutics.

Telmisartan is an angiotensin type 1 receptor antagonist, but also has been shown to partially activate PPAR γ . Numerous studies could show pleiotropic metabolic effects for Telmisartan. Its underlying mechanism is not yet completely understood and rather remains controversial.

According to our hypothesis, Telmisartan's pleiotropic, metabolic effects are mainly caused through the activation of PPAR γ in adipose tissue.

By the means of *Cre/loxP-technology*, we were able to create a functional knockout mouse model (FKO) without any relevant expression of PPAR γ in adipose tissue.

The following analyses of the PPAR γ -deficient mice showed attenuation of the metabolic effects of Telmisartan and Pioglitazone, particularly in regard to glucose metabolism and body weight.

The downstream regulation of the GLUT4 gene by PPAR γ impacts significantly the systemic glucose tolerance. Treating FKO mice with Telmisartan did not affect the GLUT4-mRNA expression in a significant manner.

In summary, the current data of this *in vivo* mouse study show that the adipose tissue specific PPAR γ plays an important role for the metabolic effects of Telmisartan.

Abkürzungsverzeichnis

13-HODE	13-Hydroxyoctadecadiensäure
15d-PGJ2	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂
18s	18s Untereinheit der mitochondrialen mRNA
9-HODE	9-Hydroxyoctadecadiensäure
ACE	<i>angiotensin-converting-enzyme</i>
ACS	<i>adipose-derived stromal cells</i>
AF-1	ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne 1
AF-2	ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne 2
Akt	Proteinkinase (= Protein Kinase B)
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid
aP2	<i>adipocyte protein 2 = fatty acid binding protein 4 (FABP4)</i>
AT ₁	Angiotensin Typ1
BAT	braunes Fettgewebe (<i>brown adipose tissue</i>)
BMI	<i>body mass index</i> in kg/m ² (Körpergewicht in kg pro Körpergröße ²)
BNP	ventrikuläres B-typ natriuretisches Peptid (<i>brain natriuretic peptide</i>)
Cdk7	<i>cyclin-dependent kinase 7</i>
Cdk9	<i>cyclin-dependent kinase 9</i>
C/EPB α	<i>CCAAT/enhancer binding protein α</i>
CPB	<i>CREB binding protein</i>
CD24	<i>cluster of differentiation 24</i>
CD34	<i>cluster of differentiation 34</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CD137	<i>cluster of differentiation 137</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cre	<i>Cre recombinase</i>
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfat
DR1	<i>direct repeat 1</i>
DR2	<i>direct repeat 2</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

dsDNA	doppelsträngige DNA
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
FGF21	Fibroblastwachstumsfaktor 21 (<i>fibroblast growth factor 21</i>)
FKO	<i>functional knockout</i>
GH	Wachstumshormon (<i>growth hormone</i>)
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GPS2	<i>G-protein pathway suppressor 2</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HFD	fettreiche Diät (<i>high-fat diet</i>)
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
LFD	fettarme Diät (<i>low-fat diet</i>)
loxP	<i>loxP site</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NCoR	<i>nuclear receptor co-repressor 1</i>
NF-κB	Nuklearfaktor-κB
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGFRβ	<i>platelet derived growth factor receptor β</i>
PGC-1	<i>PPARγ coactivator-1</i>
PI 3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PPAR	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor (<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PPRE	<i>PPAR-response element</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
RA	Retinolsäure (<i>retinoic acid</i>)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAR	Retinsäurerezeptor (<i>retinoic acid receptor</i>)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCAT	Subkutanes Fett (<i>subcutaneous adipose tissue</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
Sirt1	<i>sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog)</i>

SMRT	<i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>
SRC1	<i>steroid receptor cofactor 1</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
SVF	<i>stromal vascular fraction</i>
TGF- β	Tumorstromafaktor- β (<i>tumor growth factor-β</i>)
Tif2	<i>transcriptional intermediary factor 2</i>
TNF- α	Tumorstromafaktor- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
TSH	Schilddrüsen stimulierendes Hormon (<i>thyroid stimulating hormone</i>)
UCP1	<i>uncoupling protein-1</i>
VAT	Viszerales Fettgewebe (<i>visceral adipose tissue</i>)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
WAT	weißes Fettgewebe (<i>white adipose tissue</i>)
Zfp423	Gen für Adipogenese

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Fettgewebe und seine Funktionen

Das menschliche Fettgewebe besteht im wesentlichen aus Bindegewebe, Adipozyten und einer *stromal vascular fraction* (SVF) [1]. Nach aktuellem Kenntnisstand entspricht die SVF einer heterogenen Ansammlung von mesenchymalen Zellen: Vorläuferzellen, hämatopoetische Stammzellen, Fibroblasten und vor allem *adipose-derived stromal cells* (ASC) [1]. Die ASC Fraktion besitzt multipotente Eigenschaften und ähnelt den *mesenchymal stromal cells* (MSC) vom Knochenmark [1]. Deswegen ist diese Zellpopulation Tatbestand intensiver Forschungsaktivität, insbesondere im Bereich der regenerativen Medizin [2].

Die Adipozyten des menschlichen Fettgewebes werden als braun, weiß oder „beige“ beschrieben [3]. Das weiße Fettgewebe (WAT) polstert, je nach Lokalisation, Organe (z. B. Augapfel) und Körperregionen (z. B. Ferse), die besonders mechanischer Belastung standhalten müssen [4]. Darüber hinaus reguliert es die allgemeine Energiehomöostase des gesamten Organismus [4]. So können z. B. überschüssige, freie Fettsäuren als Triglyzeride in den univakuolären Adipozyten gespeichert werden [5]. Während der Hungerphase können diese Fettsäuren per Lipolyse zur peripheren β -Oxidation (z. B. Leber oder Skelettmuskulatur) wieder frei gesetzt werden [6]. Die resultierenden Acetyl-CoA Moleküle und Ketone liefern die essenzielle Zellenergie [6]. Außerdem synthetisiert und sezerniert das Fettgewebe eine Reihe von unterschiedlichen Adipokinen, Peptiden, Glykoproteinen, Cytokinen, Rezeptoren und Enzymen (s. Tabelle 1) und ist somit zusätzlich ein endokrines Organ [7].

Secreted proteins	Receptors	Enzymes and transporters
Leptin	Peptide and glycoprotein	Lipid metabolism
Adiponectin	Insulin	Lipoprotein lipase
Resistin (in rodents)	Glucagon	Apolipoprotein E
Angiotensinogen	Thyroid stimulating hormone	Cholesterol ester transfer protein
TNF- α	Growth hormone	Adipocyte fatty acid binding protein
IL-6	Angiotensin-II	CD36
Adipsin	Gastrin/cholecystokinin B	
Acylation stimulating protein	Adiponectin	Glucose metabolism
Fasting-induced adipose factor	Cytokine	Insulin receptor substrate 1,2
PAI-1	IL-6	Phosphatidylinositol 3-kinase
Tissue factor	TNF- α	Protein kinase B (Akt)
Monocyte chemoattractant protein-1	Leptin	GLUT4
Transforming growth factor- β		Protein kinase λ/ζ
Visfatin	Nuclear	
Vaspin	PPAR γ	Glycogen synthase kinase-3 α
Retinol binding protein-4	Glucocorticoid	
	Estrogen	Steroid metabolism
	Progesterone	Aromatase
	Androgen	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1
	Thyroid	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase
	Vitamin D	
	Nuclear factor- κ B	

Tabelle 1 Liste von Adipokinen, Peptiden, Glykoproteinen, Cytokinen, Rezeptoren, Enzymen und Transporterproteine des weißen Fettgewebes (WAT) [7].

Im Gegensatz zu weißen Adipozyten beinhalten braune Adipozyten untypisch hohe Konzentrationen an Mitochondrien, in deren innere Membranen das Thermogenin bzw. *uncoupling protein-1* (UCP1), ein aktiv katalysierender Symporter für langkettige Fettsäuren und Protonen, integriert ist [8]. Die Entkoppelung der Atmungskette von der ATP-Synthase durch das UCP1 führt zur biochemischen Dissipation bzw. *nonshivering* Thermogenese [9]. Hierdurch kann beispielsweise das braune Fettgewebe (BAT) bei Säuglingen den abrupten Abfall der Körpertemperatur unmittelbar nach der Geburt teilweise kompensieren [10]. Mit dem Wachstum bildet sich zwar das BAT deutlich zurück, kann aber weiterhin in signifikanten Massen bei Erwachsenen supraklavikulär und spinal gefunden werden [11, 12]. Insbesondere Menschen unter chronischer Kälteexposition oder mit einem Phäochromozytom scheinen betroffen zu sein [13, 14]. In einer multivariaten Analyse von Ouellet et al. zeigten BMI, Alter, Umgebungstemperatur und die Erkrankung an Diabetes mellitus einen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität dieser BAT-Depots von Erwachsenen [15]. Aufgrund zahlreicher Ähnlichkeiten zwischen braunen und weißen Adipozyten wurde eine gemeinsame Herkunft diskutiert [3]. Entgegen dieser intuitiven Annahme konnte

gezeigt werden, dass braune Adipozyten und Myozyten von gleichen oder zumindest ähnlichen Vorläuferzellen abstammen [16].

Beige Adipozyten kommen vor allem in inguinalen, parametrialen und retroperitonealen WAT-Depots von Nagetieren vor [17]. Sie ähneln morphologisch braunen Adipozyten und können auf chronischen Kältereiz oder Sympathikusaktivierung mit einer signifikanten UCP1 Expression reagieren [18]. Dieser Prozess wird als *browning* bezeichnet [19] und kann unter anderem auch durch diverse Hormone initiiert werden: Trijodthyronin, Gallensäuren, FGF21, atriales natriuretisches Peptid (ANP), ventrikuläres B-Typ natriuretisches Peptid (BNP), Cardiotrophin-1 und Irsin. Bei Bedarf können diese beige Adipozyten jederzeit die Funktion eines konventionellen Energiespeichers wieder aufnehmen [20]. Eine selektive Ablation des BATs kann zur kompensatorischen Induktion von beigen Adipozyten führen [21].

1.2 Adipositas

Die verschiedenen Grade des Übergewichts werden mit Hilfe des *Body-Mass-Index* (BMI) definiert. Der BMI errechnet sich aus dem Körpergewicht geteilt durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat (kg/m^2) [22]. Laut der *World Health Organization* (WHO) entspricht ein $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ dem klassischen Übergewicht, ein $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ dem Adipositas Grad I, ein $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$ dem Adipositas Grad II und ein $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ Adipositas Grad III, welches gleich bedeutend für Adipositas per magna bzw. morbide Adipositas ist [23].

Eine genetische Prädisposition, die Lebensweise, das soziale Umfeld, die persönliche Appetitkontrolle, der Energieverbrauch, die Nahrungsmittelverfügung sowie die Nahrungsmittelqualität tragen in unterschiedlicher Ausprägung zum Krankheitsbild bei [24].

Im Adipositas Mausmodell und bei Menschen mit einer *non-syndromic* Adipositas konnten mehr als 600 Loci mit monogenetischen Defekten nachgewiesen werden [25]. Polygenetische Störungen bei Erwachsenen werden mit einer Prävalenz von 30 – 70 % beschrieben [26, 27]. Pathophysiologisch wurde unter anderem die Erschöpfung der Triglyzeridspeicherkapazität des subkutanen Fettgewebes (SCAT) mit Dysregulation der ektopischen Fettverteilung beschrieben [28]. Die ektopische Fettanreicherung, insbesondere des viszeralen Fettgewebes (VAT), wurde mit kardiovaskulären und

metabolischen Risikofaktoren [29] sowie allgemeiner Mortalität assoziiert [30]. Steatosis hepatis, Demenz, obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom oder einige bösartige Tumorentitäten sind weitere Beispiele von Adipositas assoziierten Komorbiditäten [31-33].

Die „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ vom Robert Koch Institut berichtete, das 2010 in Deutschland 23,3 % Männer und 23,9 % Frauen im Alter zwischen 18 und 79 Jahren per definitionem adipös waren [34]. Und der Trend erscheint zunehmend, wie eine steigende Prävalenz über die letzten zwei Dekaden beweist [34]. Gleichermäßen veröffentlichte die *National Center for Health Statistics* (NCHS) in den Vereinigten Staaten von Amerika dieses Jahr eine Adipositasprävalenz von 33,5 % für Männer und 36,1 % für Frauen [35]

1.3 Metabolisches Syndrom

Das Metabolische Syndrom definiert ein Symptomenkomplex aus Bluthochdruck, abdominaler Adipositas, gestörter Glukosetoleranz, Insulinresistenz, atherogener Dyslipidämie, prothrombotischem und proinflammatorischem Allgemeinzustand [36]. Gemeinsam erhöhen sie signifikant das Risiko für Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität [37]. Laut der WHO beträgt die geschätzte Mortalitätsrate für diese spezifische Patientenkohorte 35 Millionen Menschen pro Jahr [38]. In Deutschland entstanden 2008 durch einen Patienten mit metabolischem Syndrom dreimal höhere Krankheitskosten als durch einen regulären Bluthochdruckpatienten (1114 € vs. 385 €) [39]. Einer Hochschätzung zufolge sind weiter zunehmende Krankheitskosten zu erwarten [39]. Alles Gründe, weshalb die WHO seit 2008 mit konkret definierten Maßnahmen versucht dieser weltweiten sozioökonomischen Herausforderung entgegenzuwirken [38].

1.4 Einführung: Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor γ

Peroxisomen sind intrazelluläre Vesikel (0,1 – 1 μm Durchmesser) mit diversen Funktionen und existieren in nahezu allen eukaryontischen Zellen [40].

In den 60er-Jahren konnte gezeigt werden, dass die Verfütterung einer Reihe von synthetischen Substanzen – Herbizide, industrielle Plastikweichmacher, Fibrate (z. B. Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat, Ciprofibrat), Wy-14,643 – an Nagetieren (Ratten, Mäuse) zu einer hepatischen Peroxisomproliferation, Heparhyperplasie [41] und zur Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen führen kann [42].

Später konnte für diese synthetischen Peroxisomproliferatoren ein Bindungsprotein identifiziert werden, der Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptor α (PPAR α) [43]. Im Gegensatz zu den Nagetieren konnte beim Menschen keine relevante hepatische Peroxisomproliferation durch Fibrate nachgewiesen werden [44]. Darüber hinaus publizierten Rumi et al. *in vitro* Daten über eine Wachstumsinhibition von humanen hepatozellulären Karzinomzellen durch eine ligandenabhängige PPAR γ -Aktivierung [45]. Historisch betrachtet gelangen Isseman und Green 1990 erstmalig den murinen PPAR α zu klonieren [46]. Ein Jahr darauf gelangen Dreyer et al. die Klonierung aller 3 PPAR-Isoformen (α , δ/β , γ) des *Xenopus* (Krallenfrosch) [47]. Ein paar weitere Jahre später wurde der murine PPAR γ durch Zhu et al. kloniert [48]. Im selben Jahr gelangen Sher et al. die Klonierung der cDNA von humanem PPAR γ mittels einer cDNA-Bibliothek von einer humanen Leber [49]. Wenige Jahre darauf erreichten Mukherjee et al. in San Diego die Klonierung der humanen Spleißvarianten PPAR γ_1 und PPAR γ_2 aus einer haematopoetischen Zelllinie, der Plazenta und dem Fettgewebe [50]. Siehe Einleitung 1.6 für Details über PPAR-Isoformen.

1.5 PPAR als Mitglied der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren

Der PPAR gehört zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren wie z. B. auch die Glukokortikoidrezeptoren, deren cDNA erstmals 1985 isoliert wurden [51]. Inzwischen wurden im humanen Genom 48 Gene für nukleäre Hormonrezeptoren identifiziert [52]. Alle nukleären Hormonrezeptoren teilen gewisse Grundzüge hinsichtlich ihrer Molekularstruktur [53]. Die stark vereinfachte Darstellung dieser Grundzüge ist in der Abbildung 1 zusammengefasst [54]. Am Amino-Terminus beginnt die A/B-Domäne mit der ligandenunabhängigen Transaktivierungsdomäne (AF-1) [55] gefolgt von der C-Domäne, der DNA-Bindungsdomäne mit stets zwei hoch konservierten Zinkfingermotiven, die den Rezeptor zu spezifischen *DNA response elements* dirigiert [56]. Die D-Domäne verbindet die DNA-Bindungsdomäne mit der E-Domäne, in der die Ligandenbindungsdomäne [53] und die ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-2) vereint vorliegen [57]. Zuallerletzt schließt sich der E-Domäne die F-Domäne am Carboxy-Terminus an [53].

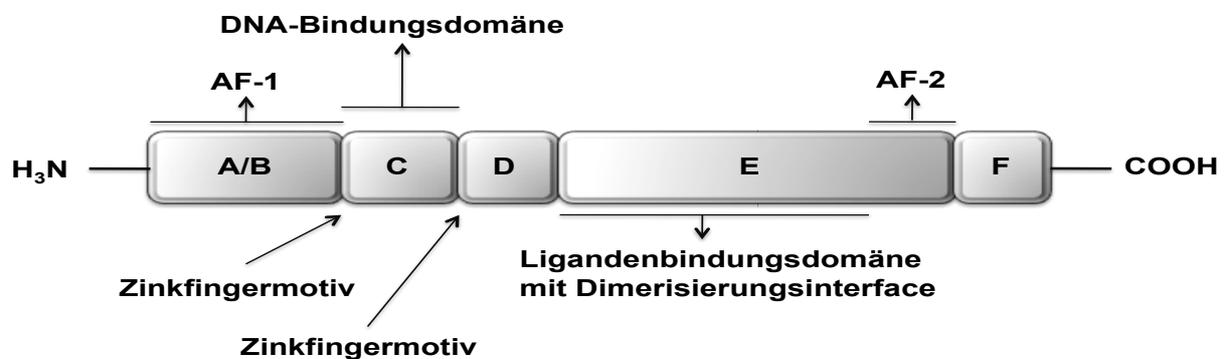


Abbildung 1 Schematischer Aufbau aller nukleären Rezeptoren. Links mit dem Amino-Terminus beginnend und mit dem Carboxy-Terminus endend. AF-1 entspricht der ligandenunabhängigen Transaktivierungsfunktion, AF-2 der ligandenabhängigen Transaktivierungsfunktion. Zwischen zwei Zinkfingermotiven befindet sich die DNA-Bindungsdomäne [54].

Trotz der ähnlichen Molekularstruktur unterscheiden sich die nukleären Hormonrezeptoren in folgenden Aspekten: Funktion, intrazelluläre Lokalisation, Ligandentypen, Dimerisierungsform und DNA-Bindungsmodus [58]. Anhand der letzten zwei genannten Aspekte werden sie grob in vier Klassen kategorisiert (s. Abbildung 2) [58].

Klasse-1-Rezeptoren werden durch Liganden aktiviert und dimerisieren sich anschließend mit einem zweiten gleichen Rezeptor, wonach deren DNA-Bindungsdomänen an DNA-Halbseiten von Zielgenen docken [58]. Diese DNA-Halbseiten sind als *Inverted Repeats* organisiert [58] und beschreiben Nukleotidsequenzen in der DNA, deren komplementäre Sequenzen spiegelbildlich etwas weiter *downstream* im selben DNA-Strang erneut vorkommen [59].

Klasse-2-Rezeptoren dagegen bilden nach Ligandenaktivierung heterodimere Proteinkomplexe, welche überwiegend an *Direct Repeats* von Zielgenen docken [58]. Im Vergleich zu *Inverted Repeats* sind *Direct Repeats* gleichgerichtete Nukleotidsequenzen die weiter *downstream* im selben DNA-Strang wiederholt auftreten [60]. Hierzu zählen alle nichtsteroidalen ligandenabhängige nukleäre Rezeptoren, wie z. B. der Vitamin-D-Rezeptor, Retinsäurerezeptor und der PPAR [58].

Klasse-3-Rezeptoren (*dimeric orphan receptors*) binden nach Aktivierung durch unbekannte Liganden als Homodimere ebenfalls an *Direct Repeats* [58].

Aktivierte Klasse-4-Rezeptoren (*monomeric orphan receptors*), deren Liganden ebenfalls noch nicht identifiziert werden konnten, binden als Monomere an *extended core sites* der DNA [58].

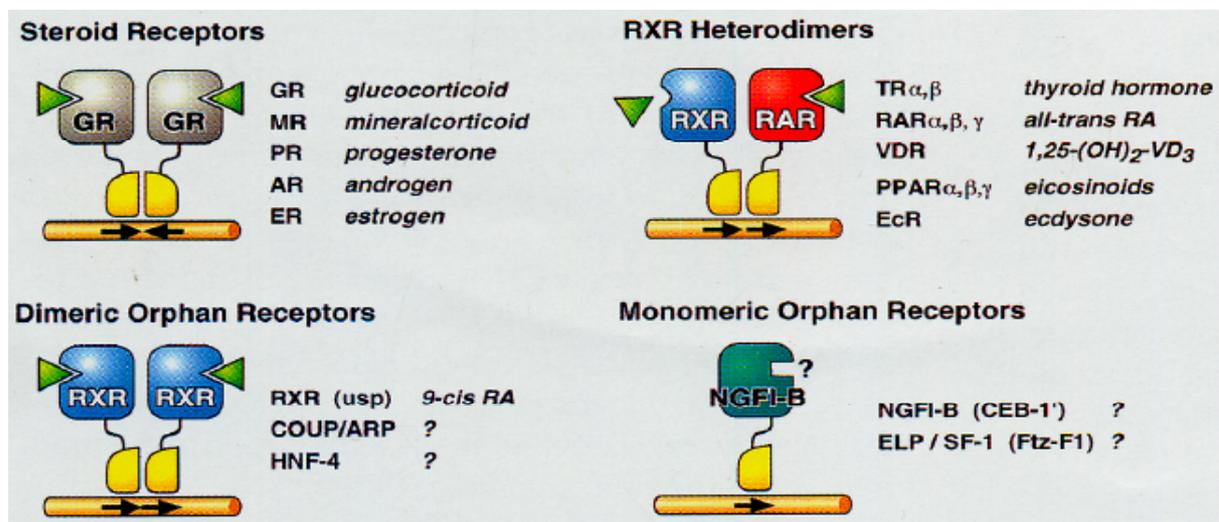


Abbildung 2 Die 4 Klassen der nukleären Hormonrezeptoren mit jeweiligen Beispielen dargestellt [58].

1.6 PPAR-Isoformen und PPAR γ Spleißvarianten

Bislang sind 3 verschiedene Isoformen des PPAR identifiziert und charakterisiert: PPAR α (NR1C1), PPAR δ/β (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3) [61].

Die Homologie der Ligandenbindungsdomänen und DNA-Bindungsdomänen zwischen den PPAR-Isoformen PPAR α (NR1C1), PPAR δ/β (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3) beträgt 60% – 80% (Abbildung 3). Im „C“- und „D“-Teil wird das anhand von kalkulierter PPAR δ - und PPAR γ -Ligandenbindungsdomänen gezeigt [62].

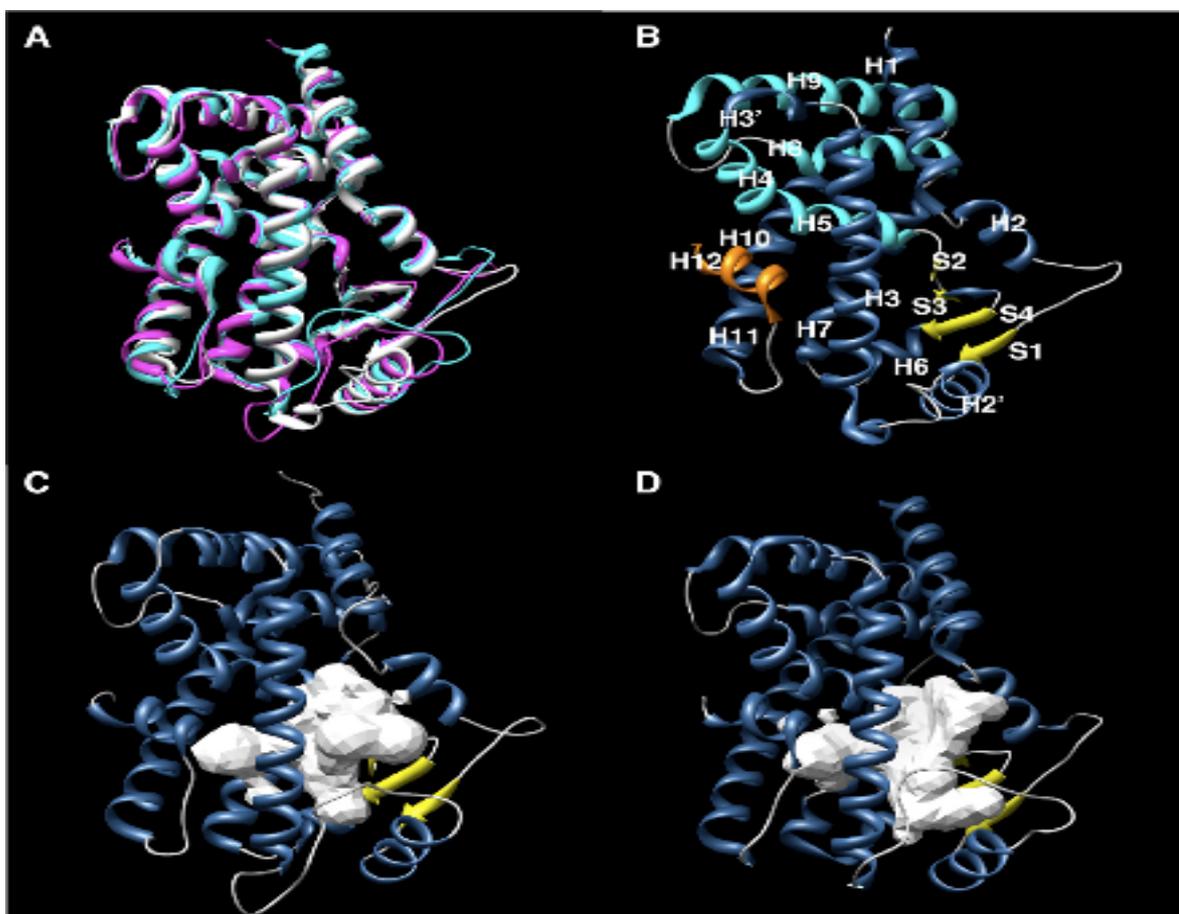


Abbildung 3 3-Dimensionale Tertiärstruktur des PPAR (A) Superposition des PPAR α (weiß), PPAR δ (magenta) und PPAR γ (türkies). (B) PPAR α mit Beschriftung der Sekundärstruktur. (C) PPAR δ mit kalkulierter Ligandenbindungsdomäne. (D) PPAR γ mit kalkulierter Ligandenbindungsdomäne [62].

Das Gen für PPAR γ ist etwa 100 kb groß und enthält 9 Exons [63]. Eine Kombination aus variabler Promotorerkennung und alternativem „*Splicen*“ führt während der Transkription zur Expression von PPAR γ -mRNA Spleißvarianten im Menschen:

PPAR γ_1 , PPAR γ_2 , PPAR γ_3 [63, 64]. Humane PPAR γ_2 -mRNA ist im Vergleich zu PPAR γ_1 -mRNA am Aminoterminus um 28 Aminosäuren länger [65]. Die Translationen der Spleißvarianten PPAR γ_1 - und PPAR γ_3 -mRNAs resultieren in der Synthese von identischen Proteinen [64]. Zudem konnten Gen-Analysen zeigen, dass die cDNA von PPAR γ spezieübergreifend (z. B. Affe, Rind, Schaf, Ziege) hoch konserviert ist, was für die Forschung extrem vorteilhaft ist [66]. Die Ähnlichkeit zwischen humanen und murinen PPAR γ -Proteinen wurde bis zu 99% beschrieben, wobei deren Aminosäuren bis zu 95% identisch sein können [63].

1.7 PPAR γ -Expression im Menschen

Bisher wurde von den 3 genannten PPAR-Isoformen PPAR γ am besten charakterisiert [67]. Das Expressionsausmaß und die Isoformverteilung von PPAR γ im Menschen sind gewebsspezifisch [68]. PPAR γ wird in nahezu allen Geweben exprimiert: Fettgewebe, Leber, Skelettmuskulatur, Prostata, Nieren, Brust, Gonaden, Milz, Nebennieren, Pankreas, Lunge, Dünn- und Dickdarmschleimhaut, Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen, etc. [69]. Die höchste PPAR γ -Expression liegt im Fettgewebe vor [70]. Von den oben genannten Spleißvarianten wird PPAR γ_2 überwiegend im Fettgewebe exprimiert [63]. Die Spleißvariante PPAR γ_1 dagegen wird nahezu ubiquitär im gesamten Organismus exprimiert [63].

1.8 Molekulare Mechanismen von PPAR

Die Transaktivierung und Transrepression von PPAR bzw. von PPAR-Zielgenen kann entweder ligandenabhängig (AF-1) oder ligandenunabhängig (AF-2) erfolgen [71].

In Abwesenheit von passenden Liganden rekrutiert der heterodimere PPAR-RXR α Proteinkomplex [72] diverse Korepressoren in unterschiedlichen Konstellationen: z. B. *Nuclear Co-repressor Receptor* (NCoR), *Silencing-Mediator for Retinoid/Thyroid hormone receptors* (SMRT), Sin3A, *Sirtuin1* (Sirt1), etc. [73-75]. Hierdurch können bestimmte Zielgene reprimiert werden, was als ligandenunabhängige Transrepression bezeichnet wird [76]. Im Gegenteil hierzu beschreibt die ligandenabhängige

Transrepression den aktiven Antagonismus vom ligandenaktivierten PPAR-RXR α Heterodimer auf die Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- κ B [77]. Nach einer ligandenabhängigen Transaktivierung eines PPAR-RXR α Heterodimers löst sich der Korepressorkomplex und es werden stattdessen Koaktivatoren rekrutiert: z. B. *transcriptional mediators/intermediary factor 2* (Tif2), *CREB-binding protein* (CPB), *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1* (PGC-1), Histone Acetyltransferase p300, *steroid receptor coactivator 1* (SRC1) [78, 79]. Die PPAR-DNA-Bindungsdomäne dirigiert den gesamten Komplex zum *PPAR-response element* (PPRE) in *enhancer sites* der Promotorregionen von PPAR-regulierten Genen, wo dann Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie andocken können [80-82]. PPREs sind *Direct Repeats* mit folgender Sequenz: AGGTCA [83]. Diese auf DNA-Halbseiten organisierten *Direct Repeats* werden durch 1 oder 2 Nukleotide (DR1 oder DR2) voneinander getrennt [83]. Über das PPRE werden schließlich PPAR-Zielgene, abhängig vom lokalen oder systemischen Stoffwechselstatus entweder erhöht exprimiert oder reprimiert [84]. In Abbildung 4 sind die Regulationsmechanismen von PPAR-Zielgenen zusammengefasst [85]. Nach erfolgreicher Ligandenaktivierung entsteht charakteristischerweise eine PPAR-mRNA Repression und Proteindegradation, eine Autoregulation im Sinne eines negativen Feedbacks [86, 87]. Analog zur Transrepression ist eine ligandenunabhängige Transaktivierung möglich wie z. B. durch Rezeptorphosphorylierung [88].

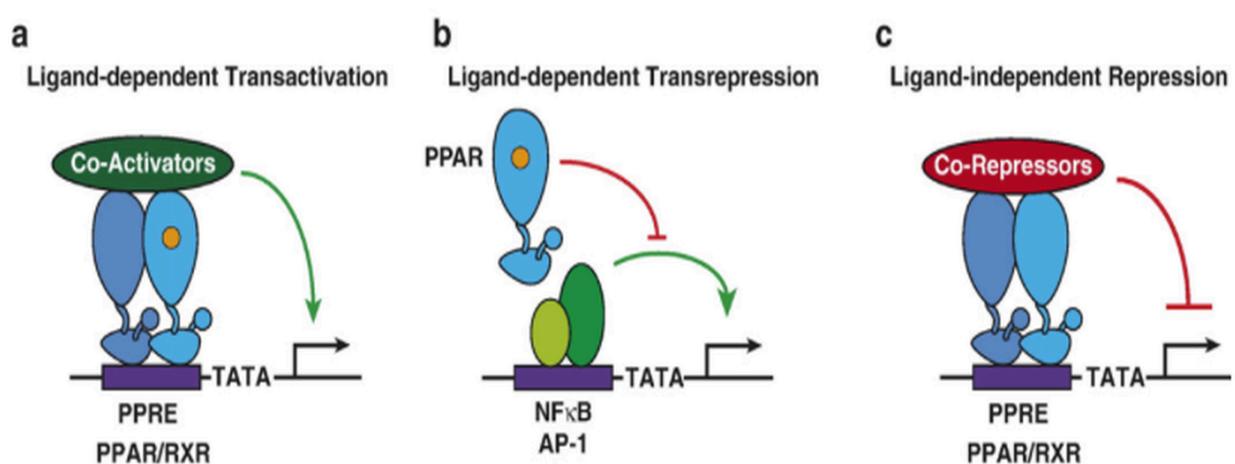


Abbildung 4 Regulationsmechanismen von PPAR-Zielgenen. (a) Nach ligandenabhängiger Aktivierung werden Koaktivatoren rekrutiert und Korepressoren gelöst. Der Transkriptionskomplex bindet schließlich an die PPRE mittels der DNA-Bindungsdomäne für eine erhöhte Expression von PPAR-Zielgenen. (b) Ligandenabhängige Repression von anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP-1. (c) In Abwesenheit eines Liganden bindet der heterodimere PPAR/RXR-Komplex Korepressoren und führt zur Repression [85].

1.9 Posttranslationale PPAR γ -Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen – Phosphorylierung, Acetylierung, Sumoylierung, Ubiquitinylierung - sind ligandenunabhängige Regulationsmechanismen der PPAR γ -Funktion [89]. Zum Beispiel wird die PPAR γ -Ligandenbindung durch eine Phosphorylierung in der AF-1 Domäne durch *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) blockiert [90]. Werden stattdessen die gleichen Aminosäuren (PPAR γ_1 Ser112, PPAR γ_2 Ser82) durch Cdk7 und Cdk9 phosphoryliert, dann kann eine gesteigerte PPAR γ -Funktion gemessen werden [91, 92]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß einer alternativen PPAR γ -Phosphorylierung durch Cdk5 in einer inversen Relation zur TZD-induzierten Insulinsensibilität steht [93]. Nach ligandenabhängiger PPAR γ -Aktivierung wurde die Blockierung der Cdk5 abhängigen PPAR γ -Phosphorylierung beschrieben [93].

Eine weitere posttranslationale PPAR γ -Modifikation wird durch die Sumoylierung beschrieben [94]. Während dieses Prozesses entstehen kovalente Bindungen zwischen *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) und der AF-1 Region von PPAR γ (PPAR γ_2 Lys107, PPAR γ_1 Lys77) mit dem Resultat einer Transkriptionsblockade durch Rekrutierung von Korepressoren [94]. In Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Sumoylierung von PPAR γ an Lys395 die Transkription von inflammatorischen Genen inhibiert [95].

Der Ubiquitinylierung von PPAR γ ist ein weiterer Regulationsmechanismus auf Proteinebene, welcher durch die Exposition von Adipozyten mit Interferon- γ beschleunigt werden kann [86]

1.10 PPAR γ -Liganden

1.10.1 Physiologische Liganden

Die Identifikation von physiologischen Liganden gelang durch *in vitro* Studien. Hier konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren und zum Teil auch deren Derivate wie z. B. die mehrfach ungesättigten Eicosanoide physiologische Liganden sind. Das 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) wurde 1995 als erster natürlicher PPAR γ -Ligand entdeckt [96]. Später kamen dann die pathophysiologisch oxidierten Metabolite der Linolsäure hinzu, die Hauptbestandteile der oxidierten *low density* Lipoproteine sind: 9-Hydroxyoctadecadiensäure (9-HODE), 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE). Ein weiterer endogener PPAR γ -Ligand ist die Nitrolinolsäure [61, 97]. Inwiefern diese Liganden *in vivo* tatsächlich eine Rolle spielen ist bislang noch ungeklärt.

1.10.2 Synthetische Liganden

Thiazolidinedione (TZD) - Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon – sind orale Antidiabetika mit hoher Bindungsaffinität für PPAR γ [98]. Sie optimieren die periphere Insulinsensibilität durch Erhöhung der insulinabhängigen Expression von GLUT4 [99] und *c-Cbl associating protein* (CAP) [100] in peripheren Geweben (Fettgewebe, Leber, Skelettmuskulatur) mit konsekutiver Senkung der Insulinplasmakonzentration. Zusätzlich kommt es durch ein Remodelling der Adipozyten von „groß“ zu „klein“ zur reduzierten Sekretion von TNF- α und freien Fettsäuren [101, 102].

Es wurden jedoch erhebliche Nebenwirkungen für TZDs beschrieben: periphere Ödembildung, Gewichtszunahme, erhöhtes Risiko für Herzinfarkt [103], pathologische Knochenfrakturen [104] und Harnblasenkarzinom [105]. Wegen fataler Hepatotoxizität wurde das erste TZD Troglitazon bereits 3 Jahre nach seiner Zulassung in 1997 vom US-amerikanischen Markt zurückgezogen [106]. Die Indikation für eine antidiabetische Behandlung mit Rosiglitazon wurde zunächst 2010 in den USA streng auf Patienten ohne medikamentöse Alternativen beschränkt [107]. Auf der Basis neuer Daten kam es jedoch 2013 zur Revision und zum vollständigen Aufheben dieser Einschränkung durch die FDA (U. S. Food and Drug Administration) [108]. In Europa wurde Rosiglitazon 2010 durch die EMA (European Medicines Agency) suspendiert [109]. Für Pioglitazon zeigte sich in einer großen retrospektiven Kohortenstudie in Frankreich ein signifikant erhöhtes

Risiko für Blasenkrebs, weshalb es 2011 in Frankreich zum Verschreibungsverbot kam [110]. In Deutschland ist Pioglitazon weiterhin zugelassen, aber mit strenger Kontraindikation bei bestehendem Blasenkrebs, Blasenkrebs in der Vorgeschichte oder unklarer Makrohämaturie [111].

DRF-2593 (Balaglitazon) [112] und RS5444 (Efatutazon) [113] sind selektive PPAR γ -Modulatoren (SSPAR γ M). Deren PPAR γ -Aktivierung führt zu einer spezifischen Konstellation von Kofaktoren, welche in einer gewebsspezifischen und protomotorselektiven Genexpression resultiert [114].

Indomethazin, ein nicht-steroidales Antirheumatikum, kann in hohen Konzentrationen ebenfalls PPAR γ aktivieren und somit die Adipogenese beeinflussen [115]. Schupp et al. und Benson et al. konnten unabhängig voneinander zeigen, dass einige Angiotensin Typ 1 Rezeptorantagonisten, wie z. B. Irbesartan und Telmisartan, einen partiellen PPAR γ -Agonismus mit metabolischen Effekten besitzen [116, 117].

1.11 PPAR γ_2 Funktionen im Fettgewebe

PPAR γ_2 ist fettgewebsspezifisch und reguliert Stoffwechselgene für die Adipogenese, Glukose- und Lipidhomöostase [67]. PPAR γ_2 ist essenziell für die Adipogenese, wie an PPAR γ_2 defizienten Mäusen bewiesen [118]. Ohne PPAR γ_2 fehlen relevante Proteine für die Adipogenese, wie z. B. *adipocyte fatty acid binding protein* (aP2) [119], *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) [120] und Lipoprotein Lipase (LPL) [121]. Zudem konnte gezeigt werden, dass PPAR γ_2 defiziente Adipozyten in Mäusen nur wenige Tage überleben und durch PPAR γ_2 exprimierende Adipozyten ersetzt werden [122]. Eine PPAR γ_2 Aktivierung in reifen Adipozyten induziert deren Apoptose und stimuliert die Differenzierung von weiteren „kleinen“, insulinsensiblen Adipozyten [123]. Große Adipozyten setzen Fettsäuren frei und fördern die systemische Insulinresistenz, wogegen kleine Adipozyten freie Fettsäuren aus dem Plasma aufnehmen [123]. Dieses geschieht durch eine vermehrte Expression von CD36 und *fatty acid binding protein* (FABP) [124]. Menschen mit PPAR γ_2 „*missense*“ Punktmutationen entwickeln partielle Lipostrophien [125].

Darüber hinaus reguliert PPAR γ_2 die Synthese und Sekretion von Adipokinen (Adipsin, TNF- α , Leptin, Resistin, Adiponektin, etc.). Zum Beispiel führt eine PPAR γ_2 -Aktivierung

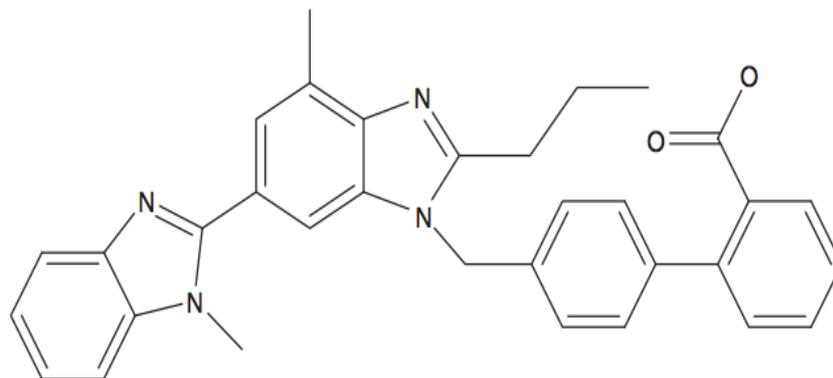
in 3T3-L1 Präadipozyten zu einer Inhibition der Leptinexpression [126] und in Nagetieren sowie auch bei Menschen dagegen zu einer Induktion der Adiponektinexpression [127, 128]. Adiponektin induziert die β -Oxidation von freien Fettsäuren in der Leber und in der Skelettmuskulatur, inhibiert die hepatische Glukoneogenese und stimuliert die intrazelluläre Glukoseaufnahme [129]. Resistin, TNF- α und Interleukin-6 (IL-6) sind Zytokine, die eine chronische Entzündung im Fettgewebe verursachen und werden durch PPAR γ_2 inhibiert [130].

1.12 Glukosetransporter 4 (GLUT4)

Zur strengen Regulation des systemischen Glukosespiegels existieren eine Reihe von Glukosetransportproteinen (GLUT): 1 – 13 [131]. Der insulinabhängige GLUT4 wird in Fettgeweben, Skelett- und Herzmuskel am höchsten exprimiert [132]. Heterozygote GLUT4^{+/-} Mäuse zeigen eine verminderte GLUT4-Expression im Skelettmuskel und Fettgewebe wodurch eine systemische Insulinresistenz und Diabetes mellitus entstehen können [133]. In der Abwesenheit von Insulin durchlaufen GLUT4-Proteine ein kontinuierliches Recycling, wodurch der Großteil der Proteine intrazellulär konzentriert wird [134]. Infolge einer Insulinstimulation kommt es zur gesteigerten GLUT4-Exozytose und gleichzeitig zur reduzierten GLUT4-Endozytose [135]. Das Resultat ist eine signifikant vermehrte GLUT4-Expression auf der entsprechenden Zelloberfläche [135]. Trotz unvollständiger PPRE-Sequenz in der GLUT4-Promotorregion konnte eine direkte Bindung vom PPAR γ -RXR-Komplex als „*silencer*“ nachgewiesen werden [136]. In Adipozyten von Ratten und Menschen konnte gezeigt werden, dass der PPAR γ -RXR-Komplex das GLUT4-Gen durch Bindung an *cis*-Elemente des GLUT4-Promotors reprimiert [136]. Erst eine Ligandenaktivierung von PPAR γ führt zur Dissoziation des reprimierenden PPAR γ -RXR-Komplexes und folglich zur Erhöhung der GLUT4-Expression [136]. Im adipösen Tiermodell mit Diabetes mellitus konnte eine signifikant reduzierte GLUT4-Expression durch eine Behandlung mit dem synthetischen PPAR γ -Agonisten Troglitazon (s. Einleitung 1.10.2) vollständig wiederhergestellt werden [137].

1.13 AT₁-Rezeptorantagonist Telmisartan

AT₁-Rezeptorantagonisten werden in der Behandlung des arteriellen Bluthochdrucks angewandt [138]. Studien zufolge genügt eine einzige tägliche orale Dosierung um den Bluthochdruck effizient zu senken und zeichnen sich durch sehr gute Patientenverträglichkeit aus [139, 140]. Telmisartan ist solch ein hoch selektiver AT₁-Rezeptorantagonist ($K_i = 3,7 \text{ nM}$) ohne intrinsische Rezeptoraktivität und ohne relevante Affinität für den AT₂-Rezeptor ($K_i > 10,000 \text{ nM}$) [141]. Im Vergleich zu den anderen AT₁-Rezeptorantagonisten besitzt Telmisartan die größte Lipophilie und längste Halbwertszeit [140]. Die empirische Formel von Telmisartan lautet $C_{33}H_{30}N_4O_2$ und die molekulare Masse beträgt 514,63 Daltons [140]. Die chemische Strukturformel ist in Abbildung 5 dargestellt [139].



4'-[(1,4'-dimethyl-2'-propyl[2,6'-bi-1H-benzimidazol]-1'-yl)methyl]-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid

Abbildung 5 Chemische Strukturformel und chemische Bezeichnung von Telmisartan [139].

Dieses Medikament wurde erstmalig für die Bluthochdrucktherapie am 10. November 1998 in den USA [142] und kurz darauf im selben Jahr am 11. Dezember in Europa zugelassen [143].

1.14 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) registriert Blutdruckveränderungen über diverse Mechanismen: renale Barorezeptoren in den afferenten Arteriolen, Natriumchloridkonzentrationsmessung durch Macula densa Zellen des

juxtaglomerulären Apparates, Sympathikusstimulation über adrenerge β_1 -Rezeptoren, negativer Feedbackmechanismus des Angiotensin II direkt auf die Zellen des juxtaglomerulären Apparates [144]. Bei Hypotension hydrolysiert das Renin, welches hauptsächlich in Fibroblasten des juxtaglomerulären Apparates synthetisiert und gespeichert wird, das α_2 -Globulin Angiotensinogen, welches wiederum hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird, zum Decapeptid Angiotensin I [144]. Die ubiquitäre Metalloprotease „*angiotensin converting enzyme*“ (ACE) kürzt das Decapeptid Angiotensin I zum Octapeptid Angiotensin II [144]. Das Angiotensin II bindet an verschiedene Typen des Angiotensin-II Rezeptors, z. B. Typ 1 (AT₁-Rezeptoren) oder Typ 2 (AT₂-Rezeptoren) [144]. AT₁-Rezeptoren führen unter anderem zum gewünschten Blutdruckanstieg durch Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur von Widerstandsgefäßen (Arteriolen) [145]. Zusätzlich stimuliert es die Aldosteronsekretion aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, welches die renale Natriumresorption erhöht [146]. Aus osmotischen Gründen folgt das intratubuläre Wasser des Ultrafiltrats den Natriumionen ins peritubuläre Gefäßbett und führt zur intravasalen Volumenvergrößerung bzw. Blutdruckerhöhung [144]. Der *negative Feedback* zur Renin-Sekretion erfolgt direkt über den AT₁-Rezeptor und durch die erreichte Blutdruckerhöhung [146].

1.15 Hypothese

Interessanterweise konnten Benson et al. und Schupp et al. für den Angiotensin Typ 1 Rezeptorantagonisten Telmisartan *in vitro* einen partiellen PPAR γ -Agonismus mit pleiotropen Effekten im Metabolismus und in der Adipogenese zeigen [116, 117]. *In vivo* Daten von Erbe et al. lassen jedoch den Zweifel aufkommen, dass die *in vitro* beschriebene partielle PPAR γ -Modulation eine ausreichende Erklärung für die metabolischen Effekte von Telmisartan darbietet [147]. Bis dato existieren keine eindeutigen Daten, die eine definitive Aussage über das genaue Ausmaß der partiellen PPAR γ -Modulation im Fettgewebe als Erklärung für die insulinsensibilisierenden Effekte von Telmisartan ermöglichen.

Hieraus ergibt sich unsere Arbeitshypothese:

Die fettgewebsspezifische Defizienz von PPAR γ führt *in vivo* zur signifikanten Abschwächung der metabolischen Effekte von Telmisartan.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Substanzen und Kits

Chemikalie/Substanz/Kit	Firma	Ort	Land
BCA™ Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA	USA
BCA™ Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA	USA
Dimethylsulfoxid	Sigma	Taufkirchen	Deutschland
dNTP-Set 100 mM	Qiagen	Hilden	Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase – Buffer Pack	Promega GmbH	Mannheim	Deutschland
PCR-Puffer / MgCl ₂	Invitrogen Life Technologies Promega GmbH	Karlsruhe Mannheim	Deutschland Deutschland
Pioglitazon	Takeda	Osaka	Japan
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Warrington	United Kingdom
Complete Protease Inhibitors Cocktail Tablets	Roche Diagnostics	Mannheim	Deutschland
QIAzol® Lysis Reagent	Qiagen	Hilden	Deutschland
Random Primer	Promega GmbH	Mannheim	Deutschland
qRT-PCR Puffer	Promega GmbH	Mannheim	Deutschland
Telmisartan	Boehringer-Ingelheim	Ingelheim	Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	Hilden	Deutschland

Tabelle 2 Verzeichnis verwendeter Chemikalien, Substanzen und Kits inklusive Herstellerangabe.

2.1.2 Primers

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Annealing Temp. (C°)
mPPAR γ_1	AgAAgCggTgAACCACTgAT ATTC	AgAggTCCACAgAgCTgATTC C	60
mPPAR γ_2	TgggTgAAACTCTgggAgATT C	gAgAggTCCACAgAgCTgATT CC	60
mGLUT 4	TTCCA gCAgATCggCTCTgA	AAgACATTgTTggCCAgCAT	60
m18S	ACCTggTTgATCCTgCCAgT Ag	TTAATgAgCCATTCgCAgTTT C	60

Tabelle 3 Verwendete Forward und Reverse Primer von der Firma Tib-MolBiol (Berlin, Deutschland).

2.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller	Ort	Land
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Hilden	Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH	Mannheim	Deutschland
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega GmbH	Mannheim	Deutschland
Proteaseinhibitoren	Roche Diagnostics	Mannheim	Deutschland

Tabelle 4 Verzeichnis verwendeter Enzyme inklusive Herstellerangabe.

2.1.4 Versuchstiere

Mus musculus Stämme - JAX® Mice von The Jackson Laboratory

(Charles River Germany, Sulzfeld, Deutschland) :

- B6.129-PPAR γ 2Rev / J (PPAR γ fl/fl Cre⁻Cre⁻)
- B6.Cg-TG (Fabp4-Cre) 1Rev / J (PPAR γ wt/wt Cre⁺Cre⁻)

2.1.5 Diverse chirurgische Utensilien

Operationslampe, operative Präparierscheren, Fadenscheren, chirurgische und anatomische Pinzetten, diverse Nahtmaterialien etc. (Becton Dickensen, Sparks, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zucht von FKO-Mäusen ohne fettgewebsspezifisches PPAR γ

Der Tierversuchsantrag (Aktenzeichen G0335/10) wurde gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes der Tierversuchskommission des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo Berlin) vorgelegt. Am 25.03.2011 wurde der Tierversuch offiziell durch die LaGeSo Berlin genehmigt. Die anschließende Beschaffung und Haltung der Versuchstiere erfolgten gemäß den internen Vorschriften für experimentelle Haltung von Tieren der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité. Die Versuchstierhaltungseinrichtung war ein metabolisches Käfigsystem von TSE Systems GmbH (Bad Homburg, Germany) mit einer kontrollierten Umgebungstemperatur von 25°C und einem 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus.

Mit Hilfe der *Cre/loxP*-Technologie wurden FKO-Mäusen (*functional knockout*) ohne fettgewebsspezifisches PPAR γ generiert [148]. Hierbei wird das PPAR γ -Gen theoretisch zwischen 2 *loxP sites*, Nukleotidsequenzen aus jeweils 34 Basenpaaren, in einem spezifischen Mausstamm flankiert und somit für eine spezifische Exonuklease, i.e. Cre Enzym (Cre = „*Causes recombination*“), markiert. Der Phänotyp dieses Stammes entspricht dem Wildtyp. Kreuzt man nun diesen Stamm mit einem transgenen Stamm, welcher das Cre Enzym exprimiert, dann kommt es zur Genexzision zwischen den *loxP sites*. Abhängig vom Promotor kann die Cre Expression gewebsspezifisch exprimiert und somit gewebsspezifische Gene entfernt werden [149]. In unserem Falle war die Cre Promotorregion aP2 kontrolliert, wodurch der fettgewebsspezifische PPAR γ entfernt werden konnte [148]. Siehe Abbildung 6 für eine graphische Zusammenfassung.

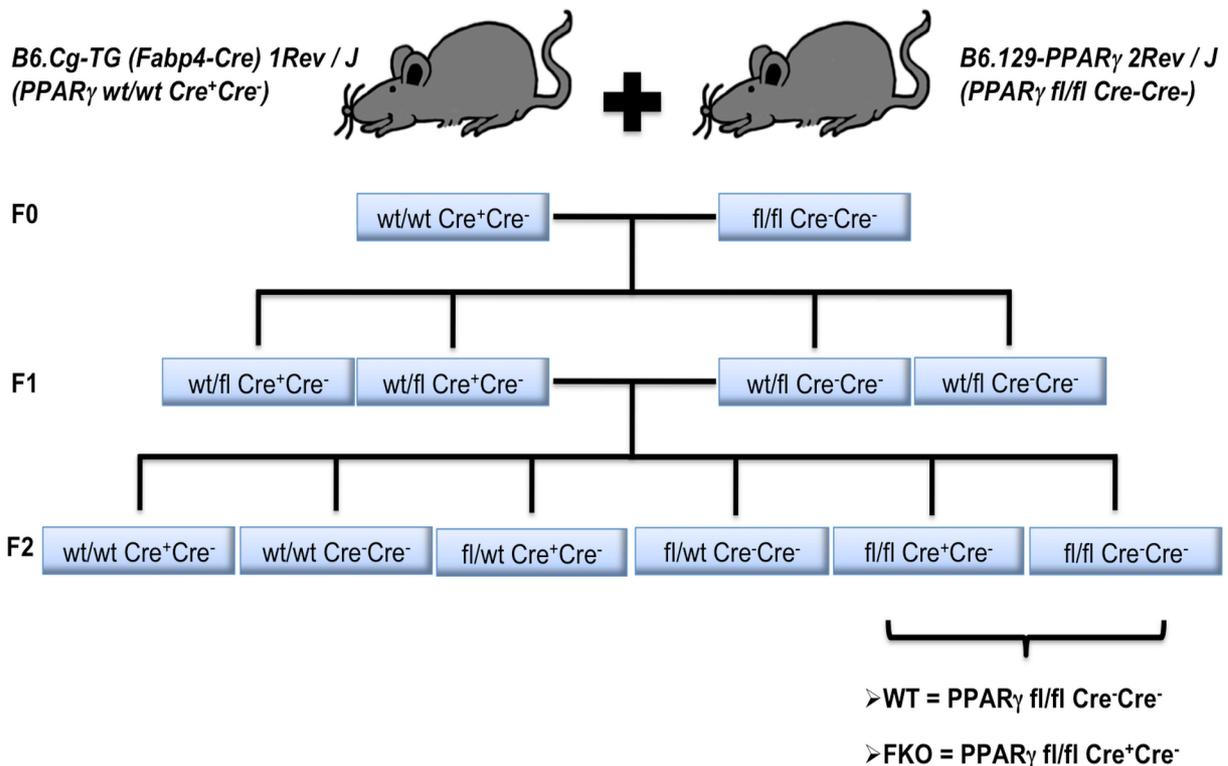


Abbildung 6 *Cre/loxP*-Technologie. Kreuzungsschema mit Stammbaum (Generationen F0 – F2) von B6.129-PPAR $_{\gamma}$ 2Rev / J ($PPAR_{\gamma}$ fl/fl Cre⁻Cre⁻) mit B6.Cg-TG (*Fabp4-Cre*) 1Rev / J ($PPAR_{\gamma}$ wt/wt Cre⁺Cre⁻) zur Generierung von Mäusen ohne fettgewebsspezifisches PPAR $_{\gamma}$ (FKO): fl/fl Cre⁻Cre⁻ [150]. PPAR $_{\gamma}$ = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor; fl: fettgewebsspezifisches PPAR $_{\gamma}$ -Gen flankiert von *loxP* sites = floxed; Cre = Causes recombination enzyme; *Fabp4* = fatty acid binding protein 4; wt = wildtype; FKO = functional knockout.

2.2.2 Experimenteller Ablauf

Die WT- und FKO-Mäuse wurden entweder mit fettreicher Spezialnahrung (HFD; N = 60) oder fettarmer Spezialnahrung (LFD; N = 10) ad libitum für 5 Wochen gefüttert. Die Bestandteile der HFD *Research Diets* waren wie folgt: 60 % kcal Fett, 20 % kcal Kohlenhydrate, 20 % kcal Protein [151]. Im Gegenteil hierzu beinhaltete die LFD 10 % kcal Fett, 70 % kcal Kohlenhydraten und 20 % kcal Proteinen [152]. Die induzierte Adipositas wurde zweimal wöchentlich anhand des Körpergewichts und quantitativen Nahrungsaufnahme überwacht. Die HFD *Response Rate* betrug 66,7 %, sodass nach 5 Wochen 40 HFD Mäuse (initial N = 60), jeweils WT und FKO, in folgende 3 Gruppen randomisiert wurden: Vehikelgruppe, Telmisartangruppe, Pioglitazongruppe. Die orale Applikation der Substanzen erfolgte über 4 weitere Wochen. Die Telmisartandosierung pro Tag betrug 3 mg/kg Körpergewicht, die Pioglitazondosierung pro Tag 10 mg/kg

Körpergewicht [153]. Dann erfolgten die metabolische Charakterisierung und letzten Endes die tierschutzgerechte Tötung für weitere Untersuchungen. Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 7 zusammenfassend und graphisch dargestellt. Aufgrund des stringenten Zeitplans dieses tierexperimentellen Projektes wurden die technischen Ausführungen und Optimierungen überwiegend durch die exzellenten Medizintechnischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe unterstützt und durchgeführt.

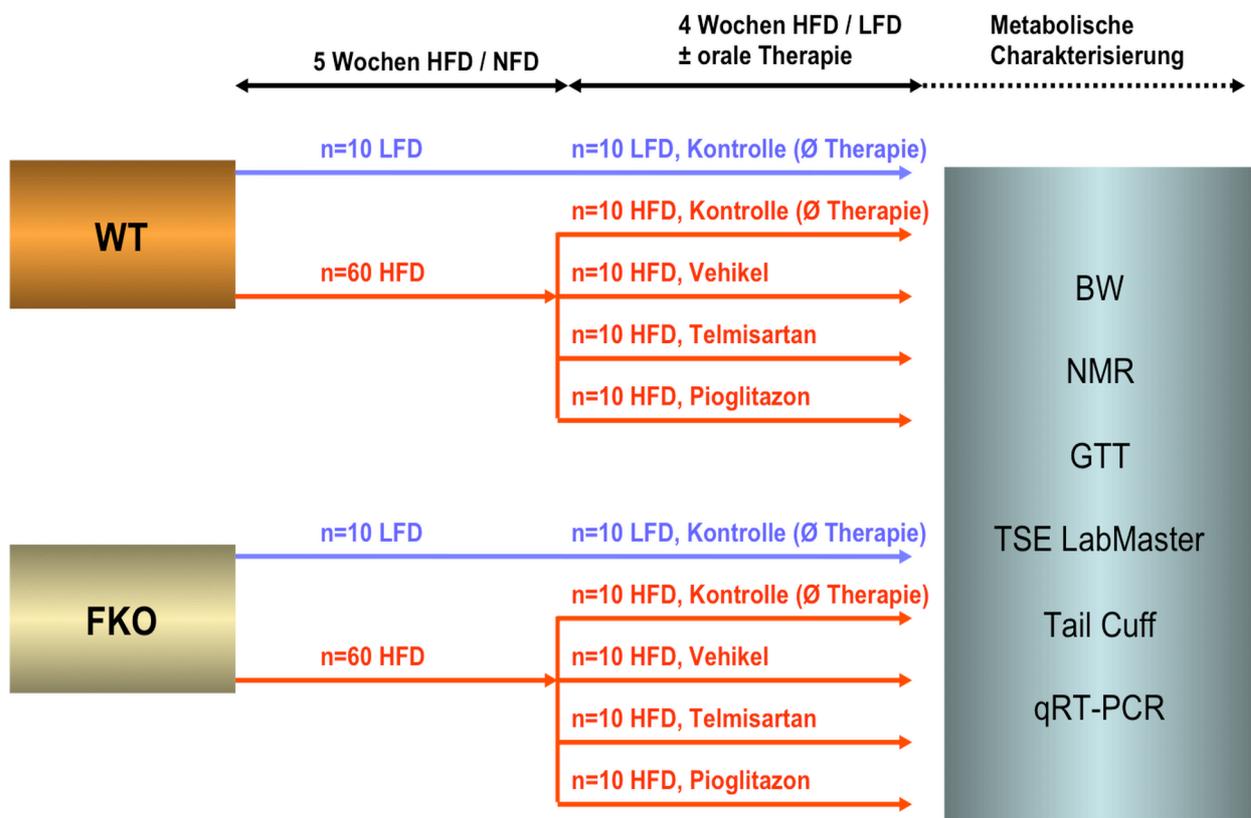


Abbildung 7 Schematische Darstellung des experimentellen Designs. WT = Wildtyp. FKO = *adipose tissue-PPAR γ functional knockout*. HFD = high-fat diet, LFD = low-fat diet. Nach 5 Wochen erfolgte die Randomisierung der HFD Mäuse in 4 Gruppen: HFD ohne Behandlung, HFD mit Vehikelbehandlung, Telmisartanbehandlung, Pioglitazonbehandlung. Abschließend erfolgte die tierschutzgerechte Tötung der Tiere zur metabolischen Charakterisierung.

2.2.3 Metabolischer Käfig zur metabolischen Charakterisierung

Die physische Aktivität, der respiratorische Quotient (RQ) und der Energieverbrauch (EE) der Versuchstiere wurden durch ein kombiniertes, indirektes Kalometriesystem registriert und quantifiziert [154]. Wir benutzten hierfür den TSE LabMaster von TSE Systems GmbH (Bad Homburg, Germany). Nach Adaption der Tiere an die Umgebung wurde die physische Aktivität für 24h mit Hilfe eines multi-dimensionalen Infrarot-Lichtstrahl-Systems registriert [154].

Der respiratorische Quotient wurde aus der produzierten Kohlenstoffdioxidmenge (V_{CO_2}) geteilt durch die verbrauchte Sauerstoffmenge (V_{O_2}) errechnet: $RQ = V_{CO_2} / V_{O_2}$ [155].

Bei einem RQ = 1 werden überwiegend Kohlenhydrate oxidiert, bei einem RQ = 0,81 eher Proteine und bei einem RQ = 0,7 Fett. Ein RQ = 0,87 impliziert die Oxidation von Mischkost [156].

Der Energieverbrauch (EE) [kcal/h/kg] wurde mit der Weir Formel errechnet: $EE = (3,91 \times V_{O_2}) + (1,10 \times V_{CO_2})$ [155]. Der Faktor uN steht für *urinary nitrogen* [g/day], welcher in der Berechnung vernachlässigt werden kann [155]. Die ermittelten EE-Werte wurden mit der Magermasse (*lean body mass*) normiert, um möglichen Confoundereinfluss durch abweichende Körpergewichte oder Magermassen zu vermeiden [154].

2.2.4 Bestimmung Fettmasse (NMR)

Die nicht-invasive Bestimmung des Körperfettanteils der einzelnen, narkotisierten Versuchstiere erfolgte mit Hilfe von *nuclear magnetic resonance* (NMR) [157]. Hierzu wurde das Minispec MQ10© von Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, USA) benutzt.

2.2.5 RNA Präparation aus epidydimaalem Fett

Es wurden 100 mg epidydimales Fettgewebe von den Mäusen abgewogen und in 1 ml Qiazol® Lysis Reagent homogenisiert. Hierzu wurde der Tissue Homogenizer PT 2100 von Polytron® verwendet.

Die RNA-Präparation wurde mit Hilfe vom RNeasy® Mini Kit (250) von Qiagen durchgeführt. Zunächst wurden die Proben in entsprechenden Eppendorf Tubes® kurzzeitig in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Komplettierung aller Proben bei

-80°C gelagert. Nach Vorbereitung aller Proben wurden diese aufgetaut, mittels Vortex erneut homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt wurden 200 µl Chloroform zu jeder Probe hinzugegeben und anschließend für erneute 10 Sekunden auf dem Vortex durchmischt. Nach 2-3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 15000 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix aus anfangs aufgelöster DNase-Stock-Solution und RDD-Puffer für alle Proben hergestellt, das heißt 10 µl DNase – 70 µl RDD pro Probe. Nach sanftem Schwenken und kurzer Zentrifugation wurde der Mastermix auf Eis gelagert. Nun wurden die zentrifugierten Proben entnommen und der flüssige Überstand vorsichtig in 200 µl Schritten abpipettiert und in ein neues Eppendorf Tube® überführt, insgesamt ca. 600 µl. Hierzu wurden dann ca. 600 µl Ethanol hinzugegeben und auf dem Vortex gemischt. Hiervon überführten wir 700 µl ins RNeasy-Mini-Spin-Filter-Eppendorf und zentrifugierten bei 10000 rpm für 15 Sekunden. Das Filtrat wurde verworfen. Dieses Prozedere wurde für das initial verbliebene Probenvolumen wiederholt. Jetzt erfolgte die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer, anschließend erneutes Zentrifugieren bei 10000 rpm für 15 Sekunden und Verwerfen des Filtrats. Von dem bereits hergestellten DNase-RDD-Mastermix wurden nun 80 µl direkt auf die Membran hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten einige Waschschrte. Zunächst 500 µl RW1-Puffer mit anschließendem Zentrifugieren bei 10000 rpm für 15 Sekunden, dann Wiederholen mit 500 µl RPE-Puffer. Die resultierenden Filtrate wurden jeweils verworfen. Der letzte Schritt mit 500 µl RPE-Puffer wurde wiederholt, wobei das Zentrifugieren für 2 Minuten durchgeführt wurde. Nach Verwerfen des Filtrats erfolgte eine Trockenzentrifugation bei 10000 rpm für 1 Minute. Der Membranfilter wurde in ein neues 1,5 ml Qiagen-Eppendorf® gesetzt. Dann wurden 40 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut auf die Membran gegeben und die Prozedur wiederholt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.6 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration [ng/µl] der RNA-Proben wurde mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometers© von Thermo Scientific Incorporation (Waltham, Massachusetts, USA) und deren Anleitung durchgeführt.

2.2.7 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Die reverse Transkription ermöglicht die Synthese von *complementary* DNA (cDNA) aus RNA. Die reverse Transkriptase des *avian myeloblastosis virus* (AMV) ist ein heterodimeres Protein und 170 kDa groß. Es besitzt eine intrinsische RNase H Aktivität, die imstande ist RNA/DNA Hybride zu trennen und RNA zu zerstören. Deswegen wird die AMV-RT in der Regel für relativ kurze RNAs (< 5 kb) eingesetzt. Die reverse Transkriptase des *moloney murine leukemia virus* (M-MLV) besitzt keine intrinsische RNase H Aktivität und wird deswegen für die Transkription langer RNAs bevorzugt eingesetzt. Das cDNA Produkt dient anschließend als Vorlage (Template) für eine Polymerasekettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) [158]. Unser Protokoll war wie folgt:

1. 1 µg mRNA-Probe (in dd H₂O zum 37 µl Gesamtvolumen) wurde mit 1 µg Random-Primern (1 µl) für 5 Minuten bei 70°C denaturiert.
2. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf Eis für 5 Minuten. Danach wurden 12 µl eines Master Mixes (s. Tabelle 5 für die Zusammensetzung) zu einem Gesamtvolumen von 50 µl (mRNA Konzentration 20 ng/µl) hinzugefügt.

0,5 µl	RNAsin
10 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
0,5 µl	M-MLV RT RNase H Minus

Tabelle 5 Master Mix (MM) für die Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

3. Abschließend erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei 37°C. Für die cDNA Analyse mittels PCR erfolgte eine 1:4 Probenverdünnung durch dd H₂O zu einer Endkonzentration von 5 ng/µl.

2.2.8 Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die klassische Polymerasekettenreaktion - „*polymerase chain reaction*“ (PCR) – dient zum qualitativen Nachweis von selektiver DNA oder mRNA. Dieses gelingt durch eine massive Vermehrung (Amplifikation). Weil die exponentielle Amplifikation bis zu 10⁻⁸ M

mathematischen Gesetzmäßigkeiten folgt erscheint eine Quantifizierung der nachgewiesenen DNA bzw. mRNA prinzipiell möglich zu sein. Aufgrund von Störanfälligkeiten durch technische Gegebenheiten ist die klassische PCR nicht die Methode der Wahl zur Quantifizierung von nachgewiesener DNA oder mRNA.

Ein Standardprotokoll für eine PCR ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Hierfür wird eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus auqaticus* ohne zusätzliche 3'-5'-Exonukleaseaktivität bzw. einer *proofreading* Aktivität), ein wenig Ausgangs-DNA (*template*), zwei Oligonukleotidprimer (*forward*, *reverse*), Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und eine PCR-Maschine (Thermocycler) benötigt. Zuerst werden die Proben in der sogenannten Denaturierungsphase bei 94°C kurz erhitzt. Hier trennen sich die einzelnen Template- bzw. DNA-Stränge voneinander, um anschließend bei 55°C in der Annealingphase mit den im massiven Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimern zu hybridisieren. Die Temperatur wird dann für den Einsatz der Taq-Polymerase erneut auf 72°C erhöht. Dieses Enzym komplementiert die einzelnen DNA-Hybridstränge. Idealerweise sollte am Ende eines solchen Zyklus die Ausgangs-DNA verdoppelt sein [158].

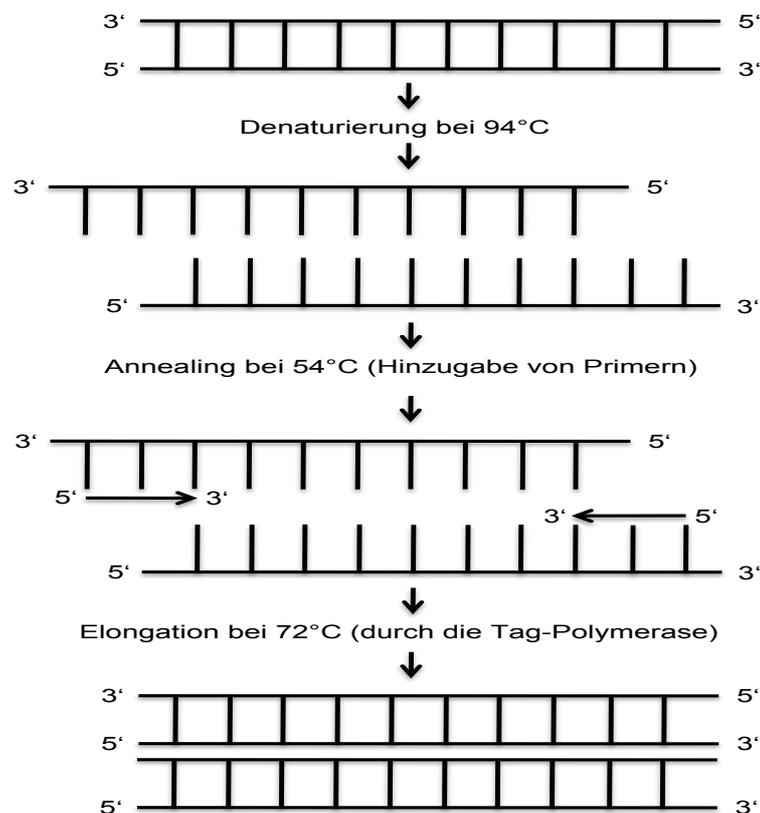


Abbildung 8 Standardprogramm der klassischen quantitativen PCR schematisch dargestellt.

2.2.9 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Im Gegensatz zur klassischen PCR ermöglicht die quantitative real time PCR (qRT-PCR) sowohl absolute als auch relative Quantifizierungen von nachgewiesener DNA. Das grundlegende Prinzip ist eine Fluoreszenzdetektion unter Echtzeitbeobachtung. Hierzu existieren diverse methodische Variationen. Wir benutzen den Farbstoff Sybrgreen®, welcher sich in die dsDNA-Produkte interkaliert. Die gemessene Fluoreszenzintensität, die folglich mit jedem Zyklus zunimmt, korreliert idealerweise mit der vorliegenden DNA-Menge. Die eigentliche Quantifizierung erfolgt jedoch nicht durch die absolute Menge des PCR-Produkts, sondern durch die Amplifikationsrate. In der initialen PCR Phase kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA, die sich im weiteren Verlauf einer linearen Funktion nähert und schließlich stagniert. Der C_T -Wert (*cycle threshold*) entspricht der Zykluszahl mit dem ersten Fluoreszenzsignal, welches sich eindeutig vom Hintergrund abhebt. Wird diese Prozedur für definierte DNA-Templatmengen durchgeführt und trägt man anschließend die ermittelten C_T -Werte gegen den Logarithmus der anfangs eingesetzten DNA-Mengen auf, so erhält man eine Standardkurve, die Rückschluss auf die ursprünglich vorhandene DNA-Menge erlaubt (absolute Quantifizierung) [158]. Dem gegenüber gestellt ist die relative Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak (s. Methoden 2.2.11 für Details) [159].

2.2.10 Standard Real-Time PCR Reaktionsansatz:

12,5 μ l	2x Mastermix (mit SYBR® Green, Applied Biosystems)
0,3 μ l	20 μ M Forward-Primer
0,3 μ l	20 μ M Reverse-Primer

→ Plus ddH₂O ad 20 μ l Gesamtvolumen.

→ + ~ 5 ng cDNA

→ Endgültiges Gesamtvolumen pro Probe: 25 μ l

2.2.11 Analyse der qRT-PCR Ergebnisse mit $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Die qRT-PCR ermöglicht eine absolute und eine relative Quantifizierung der gesuchten DNA-Spuren. Bei unseren Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR führten wir die relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak durch [159]. Das Ziel dieser Auswertung ist die Beurteilung einer relativen Genexpressionsänderung infolge einer spezifischen Behandlung [159]. Eine essenzielle Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen eines *housekeeping* Gens (interne Kontrolle) mit einer konstanten, stabilen Expression [159]. Dann erfolgt die Normierung des C_T -Wertes des Zielgens jeweils mit und ohne Therapie mit dem C_T -Wert des *housekeeping* Gens der Wahl: mitochondriale Untereinheit 18s [159]. Die Änderung der relativen Genexpression als Form der relativen Quantifizierung infolge einer medikamentösen Behandlung errechnet sich schließlich durch die $2^{\Delta\Delta C_T}$ Formel [159]. Im folgenden sind die wesentlichen Schritte der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak aufgelistet [159].

- $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (behandelte Probe) – ΔC_T (unbehandelte Probe)
- ΔC_T (Probe) = ΔC_T (Zielgen) – ΔC_T (*housekeeping* Gen)
- $\Delta\Delta C_T = [\Delta C_T$ (Zielgen, behandelt) – ΔC_T (*housekeeping* Gen, behandelt)] – [ΔC_T (Zielgen, unbehandelt) – ΔC_T (*housekeeping* Gen, unbehandelt)]
 - Relative Genexpression (*fold change*) = $2^{\Delta\Delta C_T}$

2.2.12 Protokoll für Proteinbestimmung aus organischen Geweben

Zunächst wurde das epididymale Fettgewebe aus den Versuchstieren chirurgisch entnommen. Anschließend wurde das Fettgewebe in 10 mg Stücke geteilt und in einem Eppendorf® Tube mit flüssigem Stickstoff zur Lagerung eingefroren. In diesem gefrorenem Zustand wurde das Fettgewebe zermörsert und in neue 2 ml Eppendorf® Tubes überführt und stets auf Eis gelagert. Nun wurden dem homogenisierten Fettgewebe 500 μ l RIPA-Puffer hinzugegeben und mit Hilfe des Sonofikators für 30 Sekunden zusätzlich homogenisieren. Dann wurden alle Proben für 30 – 60 Minuten auf Eis inkubiert, wobei streng geachtet wurde, dass alle 10 Minuten eine kurze Re-Mischung auf dem Vortex durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Eppendorf® Tubes überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.13 Statistik

Die statistische Auswertung und Untersuchung auf Signifikanz erfolgte eigenständig mit Graphpad Prism 6[®]. Wenn nicht explizit aufgeführt bzw. erwähnt, dann wurde in der Regel bei Vorliegen von 2 unabhängigen Variablen eine 2-faktorielle Analyse der Varianz (2-way ANOVA) durchgeführt. Bei Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes zwischen 2 Gruppen im 2-way ANOVA wurde anschließend ein posthoc Bonferroni Test zur Adjustierung des Signifikanzniveaus der Subgruppenanalyse (multiple Paarvergleiche) durchgeführt. Analog hierzu wurde bei nur einer unabhängigen Variable die 1-faktorielle Analyse der Varianz (1-way ANOVA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 gesetzt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde somit als statistisch signifikant determiniert. Die Mittelwerte wurden mit dem jeweiligen Standardfehler (\pm SEM) graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Zucht von FKO-Mäusen ohne fettgewebsspezifisches PPAR γ

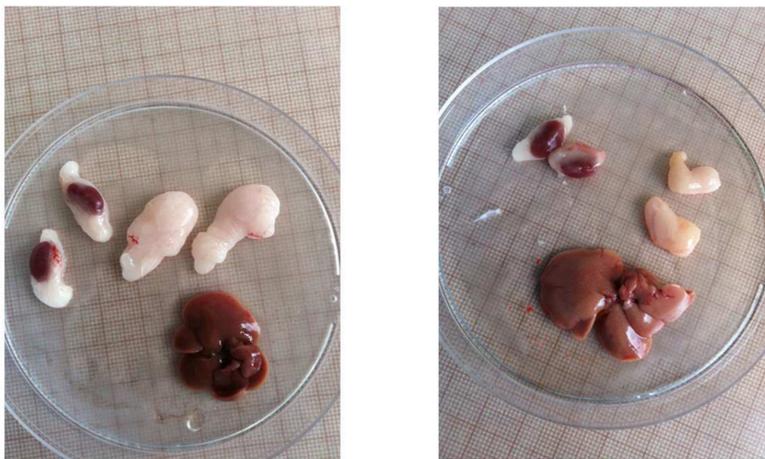
Wie bereits im Methodenabschnitt 2.2.1 beschrieben wurden zunächst mit Hilfe der *Cre/loxP*-Technologie FKO-Mäuse (*functional knockout*) ohne fettgewebsspezifisches PPAR γ generiert. Siehe Abbildung 6 für Details der 6 resultierenden Genotypen. Hiervon wurden folgende 2 Genotypen für diese tierexperimentelle Studie benutzt:

- WT (Wildtyp) = PPAR γ fl/fl Cre⁻ Cre⁻
- FKO (*functional knockout*) = PPAR γ fl/fl Cre⁻ Cre⁺

Nach 5 Wochen Fütterung mit entweder fettarmer LFD (10 % kcal Fett) oder fettreicher HFD (60 % kcal Fett) [151] Spezialnahrung erfolgte die Randomisierung der HFD Mäuse in 4 Gruppen (keine Behandlung, Vehikel, Telmisartan, Pioglitazon) für 4 weitere Wochen. Dann erfolgte die tierschutzgerechte Tötung der Tiere zur metabolischen Charakterisierung (s. Methoden 2.2.2). Die epididymalen Fettpolster (WAT), beide Nieren inklusive Fettkapsel (WAT) und die Leber wurden chirurgisch entfernt. In Abbildung 9 A sind exemplarisch die Organe einer WT- und FKO-Maus gegenüber gestellt. Die perirenaln Fettkapseln der FKO-Maus imponierten nahezu atroph. In ähnlicher Weise waren die epididymalen Fettpolster der FKO-Maus sichtbar unterentwickelt. Des Weiteren war ein farblicher Unterschied zwischen den epididymalen Fettpolstern der FKO- und WT-Maus zu erkennen. Die epididymalen Fettpolster der FKO-Maus waren gelblich-braun und die der WT-Maus weißlich. Die Leber der FKO-Maus war dagegen makroskopisch größer. Zudem glänzte die Oberfläche des Leberparenchyms der FKO-Maus und war farblich heller. Anschließend wurde die Deletion des fettgewebsspezifischen PPAR γ -Gens durch eine Quantifizierung der PPAR γ -mRNA Expression im weißen Fettgewebe (WAT) überprüft. In Abbildung 9 B sind die qRT-PCR Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt. Die PPAR γ -mRNA-Expression im WAT der FKO-Mäuse war signifikant geringer als im WAT der WT-Mäuse ($p < 0,05$; 2-tailed Student T-Test). Die verbliebene Restexpression bis zu 20 % erklärt sich am ehesten durch die

Anwesenheit anderer Zelltypen im WAT mit PPAR γ -mRNA Expression: wie z. B. Endothelzellen, Immunzellen, Fibroblasten, Präadipozyten, Stammzellen [3]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletion des fettgewebsspezifischen PPAR γ -Gens mittels der *Cre/loxP*-Technologie erfolgreich war.

A



WT Vehicle

FKO Vehicle

B

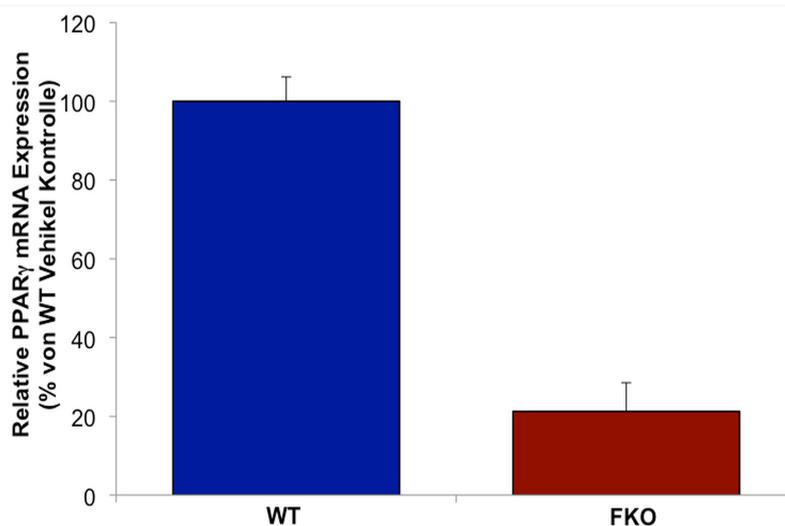


Abbildung 9 A Phänotypische Gegenüberstellung von 2 epidydimalen Fettpolstern (WAT), zwei Nieren mit perirenal Fettkapsel (WAT) und Leber von einer Wildtyp (WT) und fettgewebsspezifischer PPAR γ *knockout* Maus (FKO). B Relative PPAR γ -mRNA Expression von Wildtyp (WT; N = 6) und fettgewebsspezifische PPAR γ *knockout* Mäusen (FKO; N = 5) normiert mit der WT-Vehikelkontrolle. LFD = *low-fat diet*; HFD = *high-fat diet*. Relative PPAR γ -mRNA Expression mit Vehikelbehandlung: * p < 0,05 vs. WT-HFD Vehikel Maus (2-tailed Student T-Test).

3.2 Telmisartan ohne Effekt auf das Körpergewicht von FKO-Mäusen

Das durchschnittliche Ausgangsgewicht der WT-Mäuse betrug $34,1 \text{ g} \pm 0,47$ (s. Abbildung 10). Nach 1 Woche fettreicher HFD-Nahrung konnte eine durchschnittliche Gewichtszunahme von ca. 4,5 g gemessen werden. Nach 5 Wochen erreichten die WT Mäuse durchschnittlich Maximalgewichte von $48,3 \text{ g} \pm 0,69$.

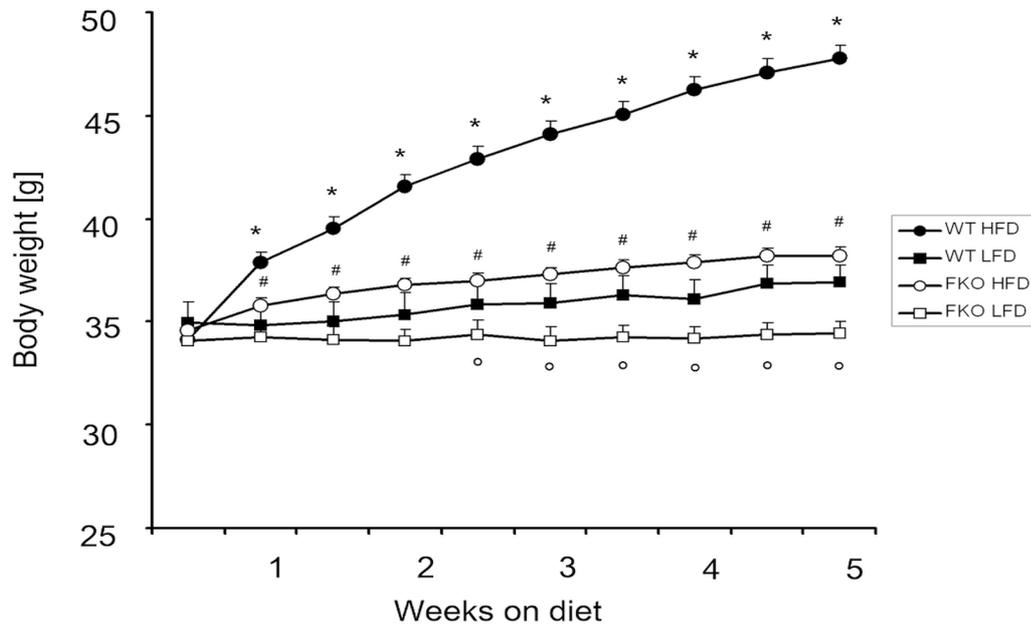
Das durchschnittliche Ausgangsgewicht der WT-Mäuse mit fettarmer LFD-Nahrung war ähnlich: $34,99 \text{ g} \pm 1,018$. Aber nach 5 Wochen hatten diese Tiere lediglich ein durchschnittliches Maximalgewicht von $37,08 \text{ g} \pm 0,486$ erreicht. Die HFD-bedingte Körpergewichtszunahme von den WT-Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den LFD gefütterten WT-Mäusen hoch signifikant ($p < 0,01$).

Das durchschnittliche Ausgangsgewicht der FKO-Mäuse betrug ebenfalls ca. $34,6 \text{ g} \pm 0,346$. Nach 1 Woche HFD-Fütterung nahmen diese Tiere lediglich etwa 1,2 g zu. Nach 5 Wochen wurde immerhin ein durchschnittliches Maximalgewicht von $38,3 \text{ g} \pm 0,389$ erreicht, welches im Vergleich mit dem durchschnittlichen Maximalgewicht der WT Mäuse nach 5 Wochen HFD-Fütterung signifikant kleiner war ($p < 0,01$).

Eine Behandlung mit Telmisartan zeigte weder bei WT- noch bei FKO-Mäusen einen signifikanten Effekt auf das Körpergewicht. Dagegen waren WT-Mäuse am Ende einer Pioglitazonbehandlung signifikant schwerer als zu Beginn der Behandlung ($p < 0,05$). Allgemein waren alle WT-Mäuse, unabhängig von einer Behandlung (Vehikel, Telmisartan, Pioglitazon) hoch signifikant schwerer als die analogen FKO-Mäuse ($p < 0,001$).

Zusammenfassend zeigte sich bei WT- und FKO-Mäusen eine HFD-induzierte Körpergewichtszunahme, wobei die WT-Mäuse signifikant mehr zunahmen als die analogen FKO-Mäuse. Des Weiteren zeigte eine Behandlung mit Telmisartan weder bei den WT- noch bei den FKO-Mäusen einen signifikanten Effekt auf das Körpergewicht.

A



B

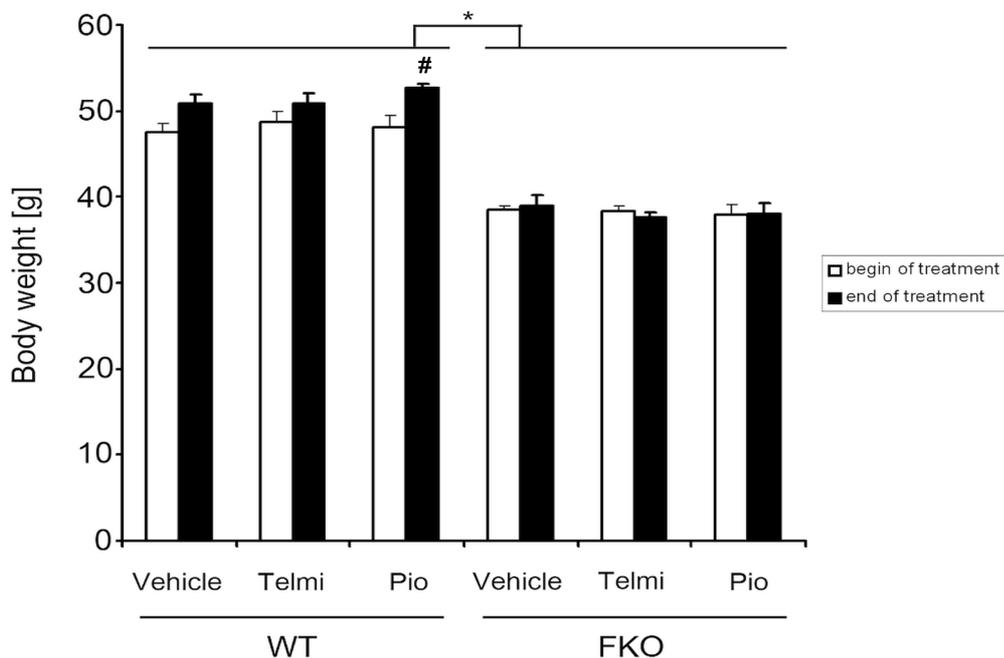


Abbildung 10 A Illustration der Körpergewichtsentwicklung [g] von Wildtyp (WT) und fettgewebsspezifische PPAR γ *knockout* (FKO) Mäusen unter HFD- oder LFD-Fütterung und über einen Zeitraum von 5 Wochen. HFD = *high-fat diet*. LFD = *low-fat diet*. * $p < 0,01$ vs. WT-LFD, # $p < 0,01$ vs. WT-HFD Vehikel, ° $p < 0,01$ vs. FKO-HFD. **B** Durchschnittliches Körpergewicht (BW = *body weight*) [g \pm SEM] vor und nach Behandlung mit Vehikel, Telmisartan und Pioglitazon. * $p < 0,01$; WT Mäuse signifikant schwerer als die FKO Mäuse unabhängig von der medikamentösen Behandlung (Vehikel, Telmisartan, Pioglitazon). # $p < 0,05$ vs. *begin of treatment*.

3.3 Telmisartan ohne Effekt auf HFD-induzierte Adipositas bei FKO-Mäusen

Bei der Untersuchung des Körpergewichts von WT- und FKO-Mäusen zeigte sich bereits unter fettreicher Ernährung eine signifikante Körpergewichtszunahme (s. Ergebnisse 3.2). Zur Klärung einer HFD-induzierten Adipositas wurden jeweils die Fett- und Magermassen [g] der Versuchstiere mittels *nuclear magnetic resonance* (NMR) [157] differenziert bestimmt (s. Abbildung 11).

Erwartungsgemäß wurden bei den FKO-Mäusen signifikant kleinere Fettmassen als bei den WT-Mäusen gemessen ($p < 0,05$). Telmisartan behandelte FKO-HFD Mäuse hatten die kleinste Fettmasse ($5,491 \text{ g} \pm 0,305$), wogegen Pioglitazon behandelte FKO-HFD Mäuse die größte Fettmasse ($6,858 \text{ g} \pm 0,597$) besaßen. Weder die fettreiche HFD-Nahrung noch die Behandlungen mit den gewählten Testsubstanzen (Vehikel, Telmisartan, Pioglitazon) zeigten bei FKO-Mäusen einen signifikanten Effekt auf das Fettgewebsgewicht.

WT-HFD Mäuse entwickelten, verglichen mit WT-LFD Mäusen, signifikant größere Fettmassen ($p < 0,05$). Aber auch bei WT-Mäusen zeigte keiner der genannten Behandlungen einen signifikanten Effekt auf die Fettmasse. Im Gegensatz zu den FKO-Mäusen wurde die durchschnittlich größte Fettmasse bei Pioglitazon behandelten WT-Mäusen gemessen ($24,030 \text{ g} \pm 1,157$).

Die Magermassen (Körpergewicht ohne Fettmasse) der Tiere rangierten zwischen $22,745 \text{ g} \pm 0,545$ und $27,617 \text{ g} \pm 0,442$. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen der WT-Mäuse ließen sich keine signifikante Unterschiede nachweisen.

FKO-HFD Mäuse, die eine Telmisartanbehandlung erhalten hatten, besaßen durchschnittlich größere Magermassen ($p < 0,05$) als deren respektiven WT-HFD Mäuse: WT-HFD Telmisartan $25,067 \text{ g} \pm 0,758$ vs. FKO-HFD Telmisartan $27,325 \text{ g} \pm 0,592$; $p < 0,05$. Ähnliches zeigte sich bei den Mäusen, die lediglich Vehikel als Behandlung erhalten hatten: WT-HFD Vehikel $24,646 \text{ g} \pm 0,641$ vs. FKO-HFD Vehikel $27,617 \text{ g} \pm 0,442$; $p < 0,05$.

Zusammenfassend konnten wir in unseren FKO-Mäusen keine HFD-induzierte Adipositas nachweisen. Eine Behandlung mit Telmisartan oder Pioglitazon blieb bei WT- und FKO-Mäusen ohne signifikanten Effekt.

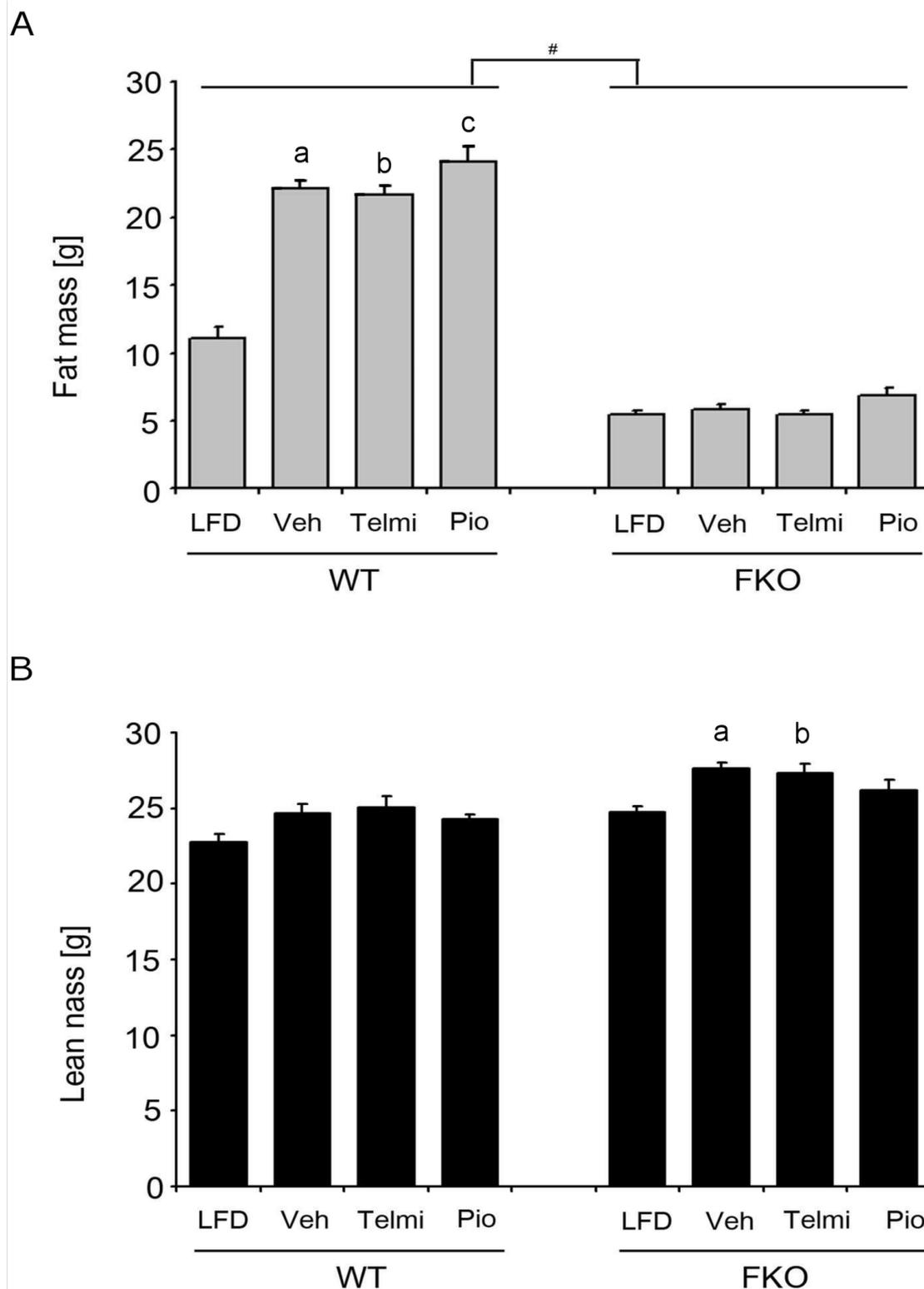


Abbildung 11 A NMR Bestimmung der Fettmassen [g] (Mittelwert \pm SEM) [157]. WT = Wildtyp, FKO = fettgewebsspezifischer PPAR γ *functional knockout*, HFD = *high-fat diet*, LFD = *low-fat diet*. Behandlung der HFD Mäuse mit Vehikel, Telmisartan und Pioglitazon. # $p < 0,005$ WT vs. FKO Mäuse. ^{a, b, c} $p < 0,05$ vs. WT-LFD Mäuse. **B** Analoge Analyse des Magermassen [g] (lean mass). ^a $p < 0,05$ FKO-HFD Vehikel vs. WT-HFD Vehikel. ^b $p < 0,05$ FKO-HFD Telmisartan vs. WT-HFD Telmisartan. ^{a, b} $p < 0,05$ vs. FKO-LFD.

3.4 Telmisartan ohne Effekt auf die Nahrungsaufnahme von FKO-Mäusen

Die Nahrungsaufnahme [g/Tag] der Versuchstiere wurde in Abbildung 12 im Balkendiagramm zusammengefasst. Hier fällt auf, dass WT-HFD Mäuse signifikant weniger Nahrung aufnahmen als WT-LFD Mäuse ($p < 0,001$; 1-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test). Ähnliches konnte bei den FKO-Mäusen beobachtet werden, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass FKO-HFD Mäuse nach erfolgter Vehikelbehandlung deutlich mehr Nahrung futterten als die respektiven WT-HFD Mäuse. Diese Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant. Allgemein zeigte sich für die fettgewebsspezifische PPAR γ Gendeletion (FKO) keinen signifikanten Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Eher scheint die Zusammensetzung der Spezialnahrung (HFD, LFD) eine größere Rolle zu spielen. Demnach futterten FKO-LFD Mäuse deutlich mehr als FKO-HFD Mäuse, und das unabhängig von einer Therapie (Vehikel, Telmisartan, Pioglitazon). Die größere Futteraufnahme der FKO-LFD Mäuse war jedoch statistisch nicht signifikant ($p < 0,05$). Korrespondierend hierzu futterten WT-LFD Mäuse signifikant mehr als die WT-HFD Mäuse, und das ebenfalls unabhängig von der Therapie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder für die fettgewebsspezifische PPAR γ Gendeletion noch für die Behandlung mit Telmisartan signifikante Effekte auf die Nahrungsaufnahme der Mäuse nachgewiesen werden konnten. Vielmehr zeigen unsere Daten, dass die Zusammensetzung der Nahrung die Menge der Nahrungsaufnahme beeinflussen.

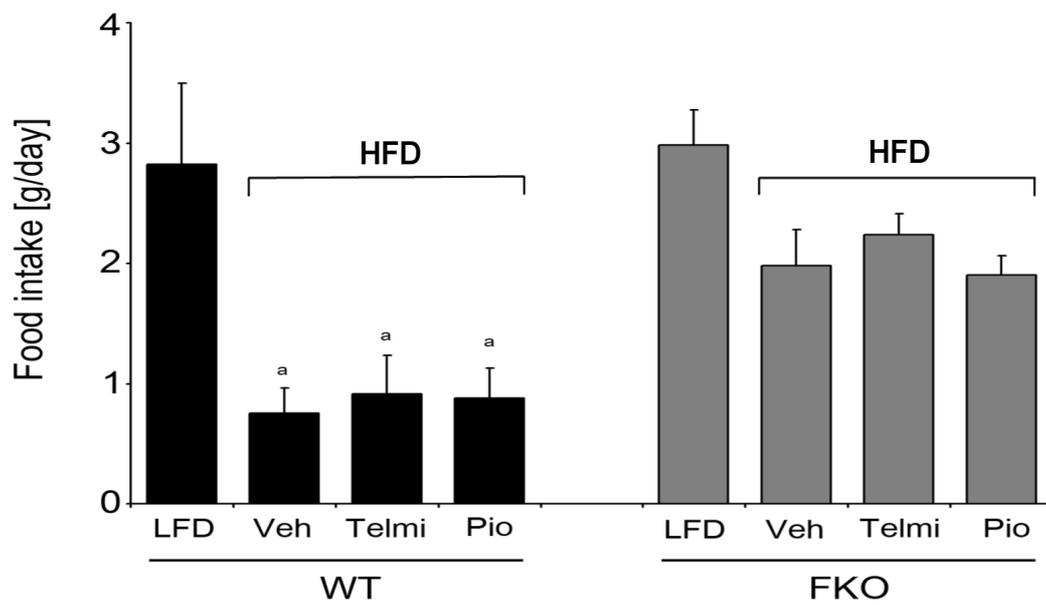


Abbildung 12 Nahrungsaufnahme [g/Tag] der Versuchstiere in Abhängigkeit von Nahrung (LFD = *low-fat diet*; HFD = *high-fat diet*) und Behandlung (Veh = Vehikel, Telmi = Telmisartan, Pio = Pioglitazon). Graphische Darstellung von Mittelwert \pm SEM. ^a $p < 0,01$ vs. WT-LFD Mäuse.

3.5 Telmisartan ohne Effekt auf den Energieverbrauch von FKO-Mäusen

Mäuse sind bekanntermaßen nachtaktive Tiere und schlafen tagsüber. Gemäß dem natürlichen zirkadianen Rhythmus zeigten alle Tiere während der Nachtphase (18 h – 6 h) einen höheren Energieverbrauch (EE). Aber interessanterweise waren die erhöhten EE-Werte zur Nacht nur bei WT-LFD Mäusen, FKO-LFD Mäusen und WT-HFD Mäusen, die eine Pioglitazonbehandlung erhalten hatten, signifikant (s. Abbildung 13) ($p < 0,05$). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die fettreiche HFD-Nahrung bei den betroffenen Tieren mit einem geringeren Energieverbrauch assoziiert war. Alle FKO-Mäuse verbrauchten, unabhängig von einer Behandlung mit Vehikel, Telmisartan oder Pioglitazon, signifikant mehr Energie als die respektiven WT-Mäuse. Die Behandlung mit Telmisartan resultierte zwar in einem erhöhten Energieverbrauch für WT- und FKO-Mäuse, aber dieser Trend war statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend verbrauchten FKO-Mäuse ohne fettgewebsspezifischen PPAR γ signifikant mehr Energie als WT-Mäuse. Eine Behandlung mit Telmisartan zeigte bei beiden, WT und FKO Mäusen, tendenziell gesteigerten Energieverbrauch, aber ohne statistische Signifikanz.

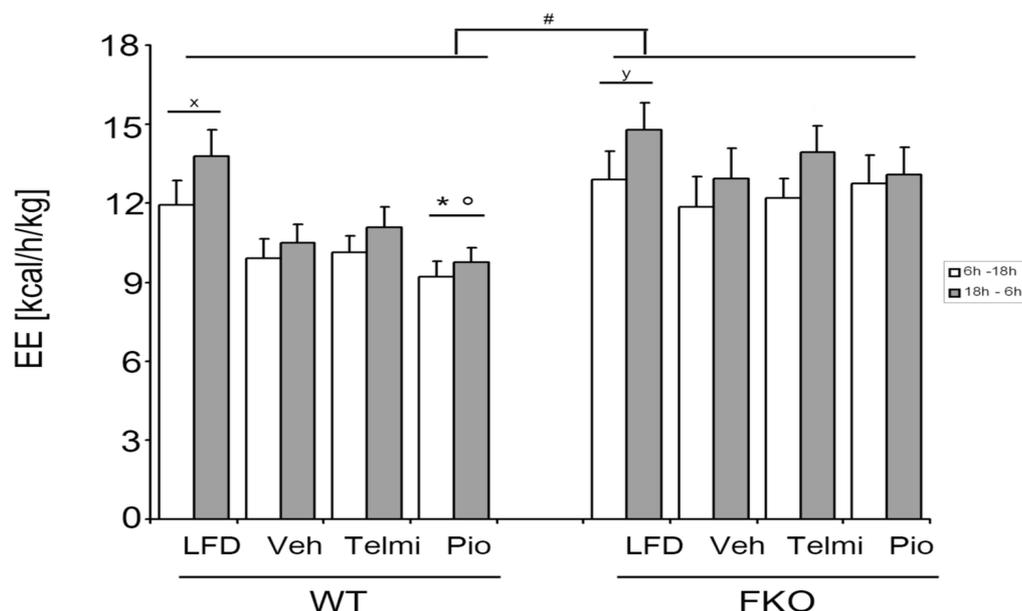


Abbildung 13 Energieverbrauch [kcal/h/kg Körpergewicht] von WT- und FKO-LFD Mäusen, WT- und FKO-HFD Mäusen nach jeweiliger Substanzbehandlung (Vehikel, Telmisartan, Pioglitazon). Mittelwerte \pm SEM im Balkendiagramm. # $p < 0,05$ WT Subgruppen vs. jeweils respektive FKO Gruppen, x, y, \circ $p < 0,05$ vs. Nachtphase (18h-6h)

3.6 Telmisartan ohne Effekt auf die *Locomotor Activity* von FKO-Mäusen

Ähnlich wie beim Energieverbrauch (s. Ergebnisse 3.5) folgten die Versuchsmäuse ihrem natürlichen zirkadianen Rhythmus und waren nachts (18h – 6h) deutlich aktiver als tagsüber (s. Abbildung 14). Lediglich bei den Pioglitazon behandelten FKO Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Bewegungsaktivität (*locomotor activity*) während des Tages und der Nacht.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass FKO-Mäuse deutlich nachtaktiver waren als WT-Mäuse. Dagegen waren WT-HFD Mäuse nachts signifikant bewegungsärmer als WT-LFD Mäuse ($p < 0,001$). Zudem waren WT-HFD Mäuse allgemein träger als WT-LFD Mäuse. Die Behandlung mit Telmisartan oder Pioglitazon führte zu keiner signifikanten Bewegungssteigerung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FKO-Mäuse ohne fettgewebsspezifischen PPAR γ eine größere Bewegungsaktivität (*locomotor activity*) als WT-Mäuse zeigten.

Zudem erscheint die fettreiche HFD-Nahrung bei FKO- und WT-Mäusen zu einer Aktivitätsminderung zu führen.

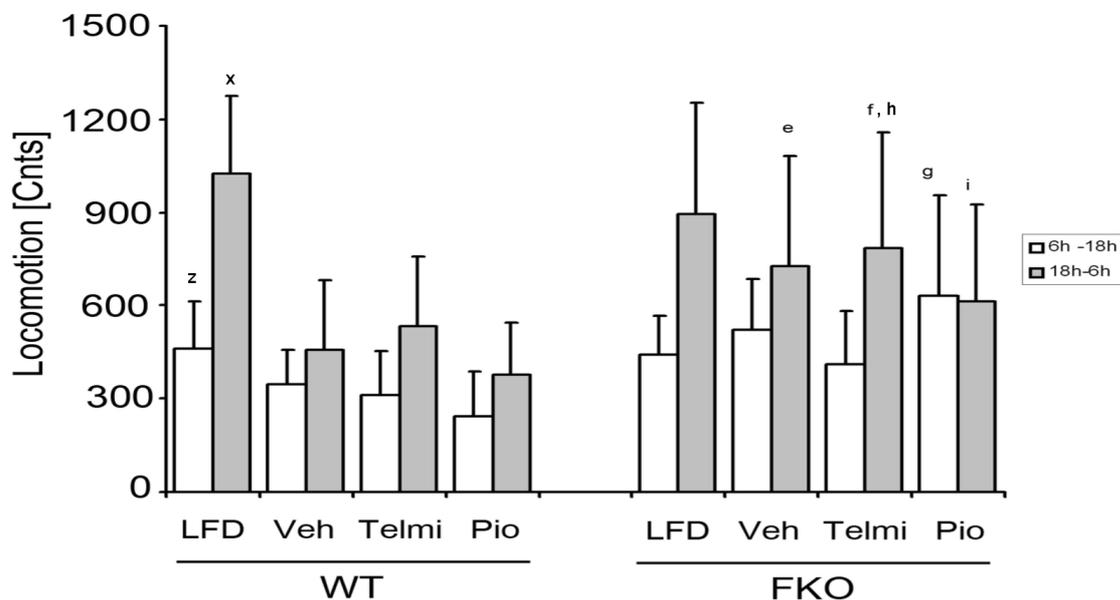


Abbildung 14 Die Bewegungsaktivität (*locomotor activity*) der Mäuse wurden mit einem metabolischen Käfigsystem erfasst. Hier wurden die Unterbrechungen des Infrarotlichts über 2 Zeitintervalle registriert (Tagphase 6 – 18 Uhr, Nachtphase 18 – 6 Uhr). Die Testsubstanzen (Vehikel, Telmisartan, Pioglitazon) wurden nur an HFD-Mäuse verabreicht. Graphische Darstellung von Mittelwerten \pm SEM. ^{z, h} $p < 0,05$ vs. Tag-/Nachtphase. ^x $p < 0,05$ vs. WT-HFD Mäuse, ^{e, f, g, i} $p < 0,05$ vs. WT Mäuse.

3.7 Telmisartan ohne signifikanten Effekt auf respiratorischen Quotienten

Der durchschnittliche respiratorische Quotient (RQ) für WT- und FKO-Mäuse mit fettreicher HFD-Nahrung (60 % kcal Fett) entsprach einer Oxidation von Mischkost (s. Abbildung 15) [151]. Die fettarme LFD-Nahrung beinhaltete 10 % kcal Fett und 70 % kcal Kohlenhydrate [152]. Aufgrund des hohen Kohlenhydratanteils resultierte somit die Verfütterung dieser Spezialnahrung in höheren RQ-Werten. Eine Behandlung mit Telmisartan zeigte weder bei WT- noch bei FKO-Mäusen signifikante Effekte. Zusammenfassend beeinflusste die Zusammensetzung der Nahrung (HFD vs. LFD) und nicht die Behandlung mit Telmisartan maßgeblich den RQ-Wert.

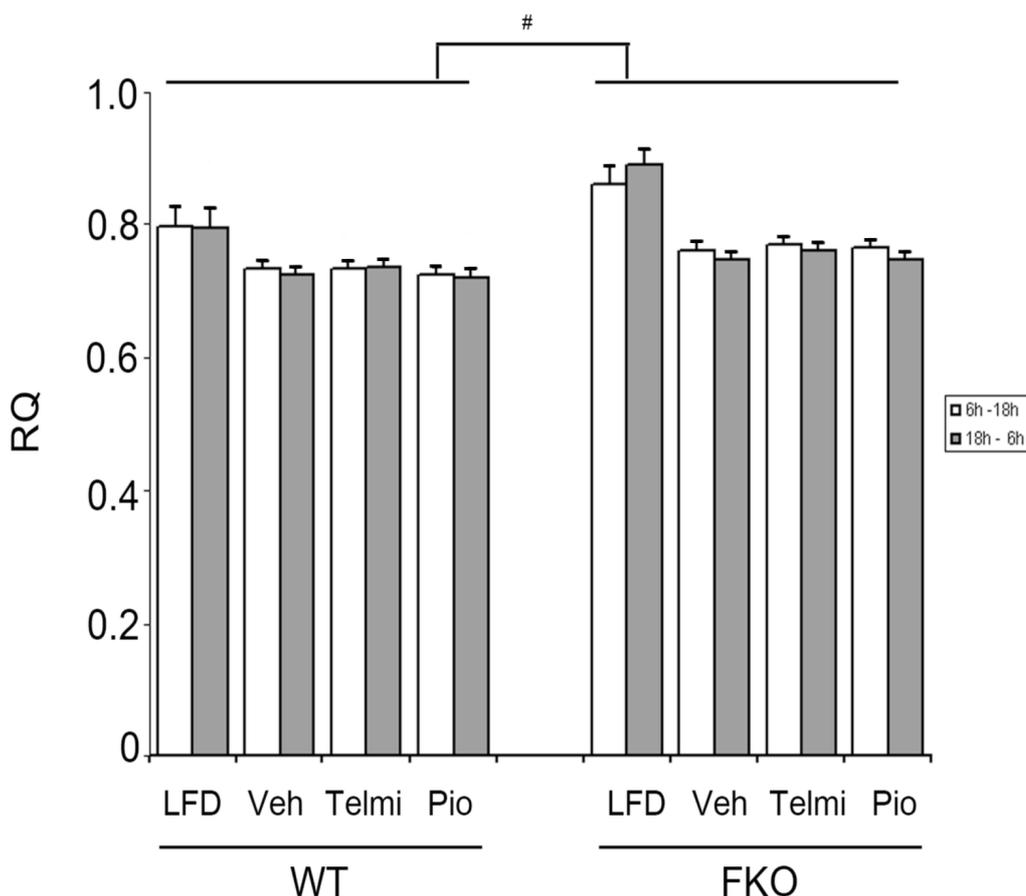


Abbildung 15 Der respiratorische Quotient (RQ) errechnet sich aus der produzierten Kohlenstoffdioxidmenge (V_{CO_2}) geteilt durch die verbrauchte Sauerstoffmenge (V_{O_2}). Die RQ-Werte wurden pro Gruppe zwischen Tag- und Nachphase unterteilt. # $p < 0,05$ WT vs. FKO. WT = Wildtyp; FKO = *functional knockout*.

3.8 Telmisartan ohne Effekt auf die Glukosetoleranz in FKO-Mäusen

Der Effekt von Telmisartan auf die Glukosetoleranz von FKO-Mäusen ohne fettgewebsspezifischen PPAR γ wurde mittels oralen Glukosetoleranztest (OGTT) untersucht. Hierbei wurde den Versuchsmäusen eine konzentrierte Zuckerwasserlösung zum Trinken verabreicht. Anschließend erfolgten in 15-Minuten Takten bis zur 150. Minute Blutentnahmen aus der Schwanzvene zur Bestimmung der Plasma-Glukosekonzentrationen (Abbildung 16).

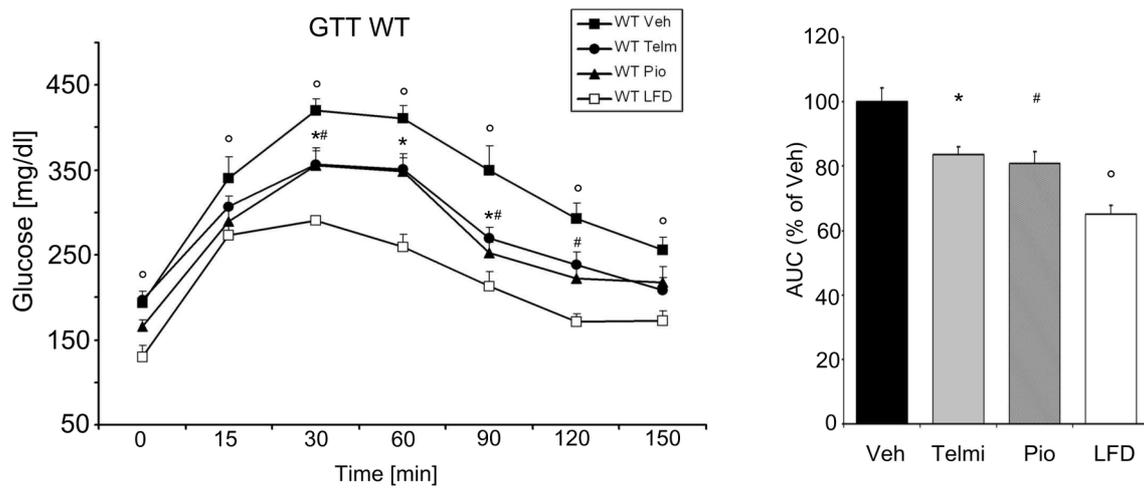
WT-LFD Mäuse zeigten die beste Glukosetoleranz. Bereits zu Beginn des Tests hatten diese Tiere verglichen mit den WT-HFD Vehikel Mäusen einen signifikant niedrigeren Nüchternglukosewert (130,3 mg/dl vs. 193,1 mg/dl; Δ 62,88 mg/dl; $p < 0,05$). Nach 2 h waren bei den WT-LFD Mäusen nahezu normalisierte Plasma-Glukosewerte (171 mg/dl) zu messen.

WT-HFD Mäuse konnten dagegen weiterhin pathologisch erhöhte Plasma-Glukosewerte gemessen werden. Der Unterschied zu den WT-LFD Mäusen war signifikant ($p < 0,05$). Eine Behandlung der WT-HFD Mäuse mit Pioglitazon oder Telmisartan führte zu einer signifikanten Verbesserung der Glukosetoleranz ($p < 0,05$). Über den gesamten Zeitraum zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Telmisartan und Pioglitazon.

Analog zu den WT-Mäusen hatten FKO-LFD Mäuse die beste orale Glukosetoleranz. Interessanterweise zeigten FKO-HFD Mäuse mit Telmisartanbehandlung die schlechteste Glukosetoleranz, jedoch ohne statistische Signifikanz. Es fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen FKO-LFD, FKO-HFD Pioglitazon und FKO-HFD Vehikel Mäusen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass orale Glukosetoleranz der WT-Mäuse unter LFD-Fütterung signifikant besser war als unter HFD-Fütterung. Eine Behandlung mit Telmisartan oder Pioglitazon verbesserten die orale Glukosetoleranz der WT-Mäuse. Bei den FKO-Mäusen konnte weder nach Telmisartan- noch nach Pioglitazonbehandlung ein signifikant positiver Effekt auf die Glukosetoleranz beobachtet werden. Im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen zeigten FKO-HFD Mäuse nach einer Telmisartanbehandlung tendenziell die schlechteste Glukosetoleranz.

A



B

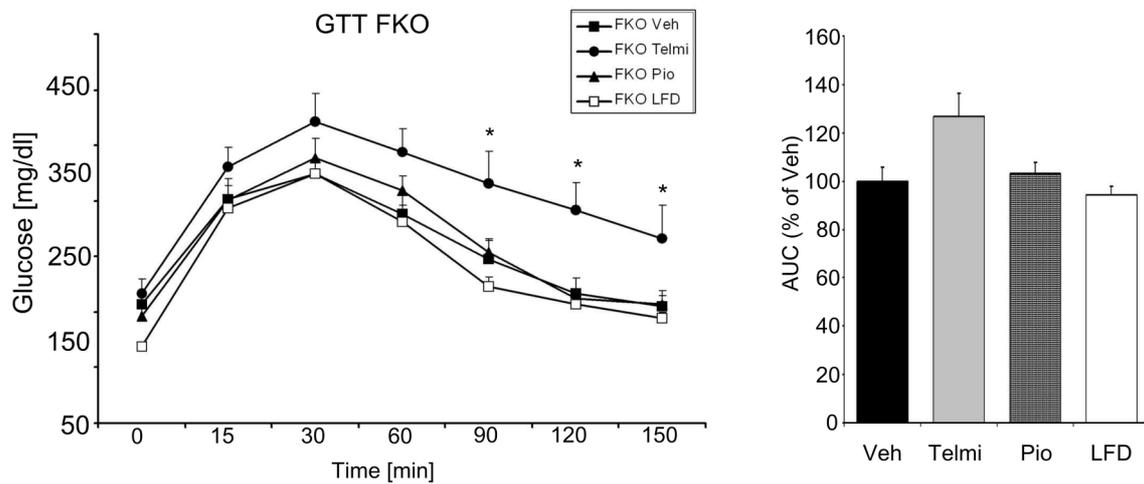


Abbildung 16 A Oraler Glukose Toleranz Test (OGTT) über Zeit (150 Minuten). Hierzu korrelierend die AUC (*area under the curve*) von den OGTT Kurven als Expression der Glukose Abweichung in Prozent von Vehikel behandelten Mäusen. WT Mäuse: *#,° $p < 0,05$ vs. WT-Vehikel (1-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test). **B** FKO Mäuse: * $p < 0,05$ vs. FKO Vehikel Mäuse (1-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test). Kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen AUC-Werten.

3.9 Telmisartan ohne Effekt auf GLUT4-mRNA Expression in FKO Mäusen

Wie bereits in der Einleitung 1.12 erläutert wird der Glukosetransporter GLUT4 durch PPAR γ reguliert [99]. Wir untersuchten somit auf mRNA-Ebene den Effekt von Telmisartan auf die GLUT4-mRNA Expression im epidydimalen Fettpolster in Abwesenheit vom fettgewebsspezifischen PPAR γ . Die Ergebnisse sind in Form eines Balkendiagramms in Abbildung 17 zusammenfassend dargestellt.

Analog zu den PPAR γ -mRNA Expressionsdaten (s. Ergebnisse 3.1) zeigten FKO-Mäuse eine deutlich geringere GLUT4-mRNA Expression als die respektiven WT-Mäuse. Im Vergleich zu den LFD-Mäusen zeigte sich auch diese geringere GLUT4-mRNA Expression bei allen HFD-Mäusen. Eine Behandlung mit Telmisartan oder Pioglitazon führte zu keiner signifikanten Steigerung der GLUT4-mRNA Expression. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Behandlung mit Telmisartan zu keiner signifikanten Steigerung der GLUT4-mRNA Expression im epidydimalen Fettgewebe führt.

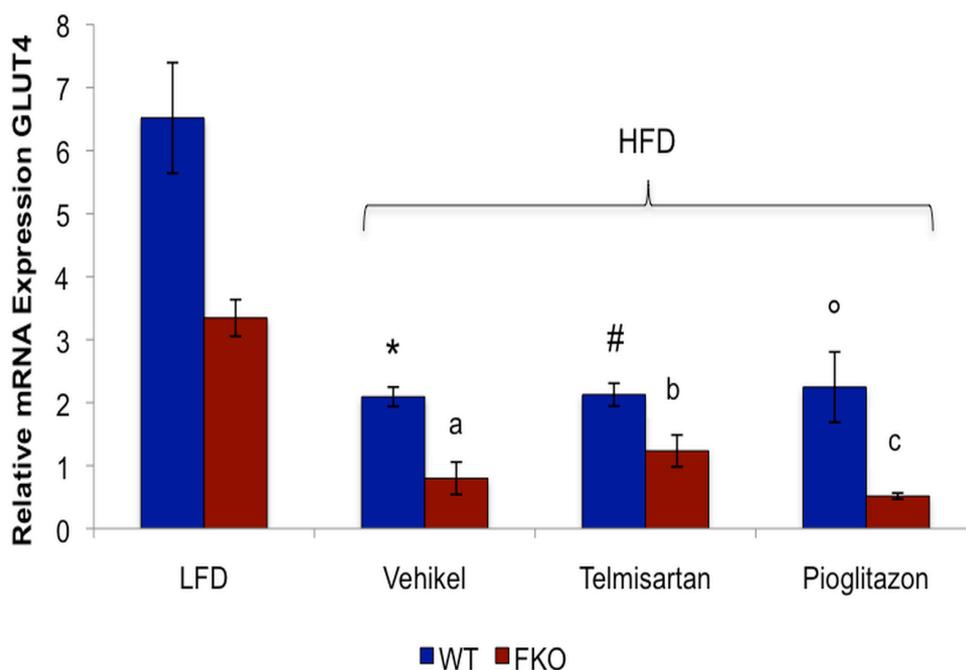


Abbildung 17 Relative mRNA-Expressionen von GLUT4 in WT- und FKO-Mäusen als Mittelwerte \pm SEM: *^{#,°} p < 0,05 vs. WT-LFD; ^{a,b,c} vs. FKO-LFD, p < 0,05. Nur HFD-Mäuse wurden mit Vehikel, Telmisartan oder Pioglitazon behandelt.

4 Diskussion

4.1 Klinische Hinweise für metabolische Effekte von Telmisartan

Interessanterweise konnte in einer Meta-Analyse von 2012 gezeigt werden, dass eine antihypertensive Therapie mit AT₁-Rezeptorantagonisten - Candesartan, Losartan, Valsartan - zur signifikanten Inzidenzsenkung eines Diabetes mellitus Typ 2 führte [160]. Ähnliche metabolische Effekte konnten insbesondere für Telmisartan, einem weiteren AT₁-Rezeptorantagonisten, gezeigt werden. So wurden bei Bluthochdruckpatienten mit Diabetes mellitus Typ 2 unter Telmisartantherapie (täglich 40 mg oral) signifikant reduzierte Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterinen, low-density Lipoproteinen und Triglyzeriden gemessen [161]. Außerdem konnte man bei Bluthochdruckpatienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine Reduktion der Plasma-Glukosekonzentration mit gleichzeitiger Steigerung der Plasma-Adiponektinkonzentration messen [162]. Insulinsensibilisierende Effekte von Telmisartan konnten insbesondere bei Patienten mit den klassischen Risikofaktoren des metabolischen Syndroms gezeigt werden [163, 164]. Darüber hinaus zeigten Ergebnisse der Multicenter ONTARGET-Studie keinen signifikanten Unterschied bezüglich der blutdrucksenkenden Potenz von Telmisartan verglichen mit dem ACE-Inhibitor Ramipril [165]. Andererseits sollte kritisch berücksichtigt werden, dass die parallel durchgeführte TRANSCEND-Studie keine signifikante Prävention des Diabetes mellitus Typ 2 durch Telmisartan zeigte [166]. Trotz dieser Kontroverse gibt die Summe der bisherigen klinischen Daten von Telmisartan Hinweise für metabolische Effekte.

4.2 Telmisartan ohne Effekt auf die Körpergewichtsentwicklung und HFD-induzierte Adipositas von FKO-Mäusen

Wir stellten uns somit die Frage inwiefern der fettgewebsspezifische PPAR_γ für die zuvor beschriebenen pleiotropen Effekte von Telmisartan eine Rolle spielt. Ergo untersuchten wir diverse Stoffwechsellaspekte im FKO Mausmodell ohne relevante Expression von fettgewebsspezifischem PPAR_γ.

Als erstes betrachteten wir die Entwicklung des Körpergewichts bei FKO-Mäusen unter streng kontrollierten Bedingungen, wo unsere Daten zeigen konnten, dass FKO-Mäuse,

trotz fettreicher HFD-Nahrung nur eine relativ geringe Körpergewichtszunahme verzeichneten (s. Abbildung 10). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die Deletion des fettgewebsspezifischen PPAR γ -Gens die HFD-induzierte Körpergewichtszunahme attenuiert wurde. Auch He et al. konnten bereits 2003 im fettgewebsspezifischen PPAR γ *knockout* Mausmodell zeigen, dass diese Tiere unter HFD-Fütterung signifikant weniger an Gewicht zunahmten als die Kontrolltiere [150]. Zidek et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen und erklärten sich die geringere Körpergewichtszunahme der FKO-HFD Mäuse durch die signifikant kleinere Gesamtkörperfettmasse [167]. In Anbetracht dieser Vorarbeiten sollte man annehmen, dass Telmisartan als partieller PPAR γ -Agonist [116, 117] ohne fettgewebsspezifischen PPAR γ keine signifikanten Effekte auf das Körpergewicht von FKO-Mäusen zeigt. Passend zu dieser Annahme zeigten unsere Daten keine Effekte von Telmisartan auf das Körpergewicht von FKO-Mäusen. Interessanterweise konnten auch keine Effekte von Telmisartan auf das Körpergewicht von WT-HFD Mäusen registriert werden. Daher stellt sich hier die Frage, ob Telmisartan überhaupt das Körpergewicht von Mäusen beeinflussen kann. Diesbezüglich erscheint die Datenlage kontrovers. Zum Beispiel konnten Ushijima et al. in adipösen KK-A y /TaJcl Mäusen zeigen, dass eine Telmisartanbehandlung keine signifikanten Auswirkungen auf die Körpergewichtsentwicklung hatte [168]. Andererseits konnten Schupp et al. zeigen, dass eine Telmisartanbehandlung in der selben täglichen Telmisartandosis, wie bei unseren Experimenten (3 mg/kg Körpergewicht) im Adipositasmausmodell signifikant geringere Körpergewichtszunahmen gemessen wurden [153]. Eine Erklärung liegt womöglich im unterschiedlichen Versuchsaufbau. Zum Beispiel fütterten Schupp et al. ihre Mäuse für 16 Wochen mit HFD-Nahrung (vs. 5 Wochen bei uns), wodurch deren Tiere ein deutlich höheres Ausgangsgewicht als unsere Tiere besaßen und somit eventuell nicht wesentlich mehr zunehmen konnten [117]. Außerdem wurden deren Mäuse für insgesamt 10 Wochen mit Telmisartan behandelt (vs. 4 Wochen bei uns) [117]. Somit könnte man spekulieren, dass eine längere HFD-Fütterung mit einer längeren Telmisartanbehandlung auch bei unseren WT-HFD Mäusen in einer geringeren Körpergewichtszunahme resultieren würde. Weitere Vorarbeiten von Rong et al. konnten keine Effekte von Telmisartan auf die Nahrungsaufnahme, Körpergewicht und Fettgewebe im murinen Lipodystrophiemodell (A-ZIP/F-1 Mäuse) zeigen [169]. Die Daten von Rong et al. implizieren somit die Notwendigkeit von WAT bzw.

fettgewebsspezifischen PPAR γ für die Entfaltung der pleiotropen Effekte von Telmisartan auf den Stoffwechsel der Versuchstiere. Kamari et al. konnten in hypertensiven, hyperinsulinämen und hyperlipidämen Ratten zeigen, dass eine Behandlung mit Telmisartan deren Körpergewichtszunahme signifikant reduzierte [170]. Könnten diese Effekte von Telmisartan auf das Körpergewicht von Nagetieren auch PPAR γ -unabhängig sein? *In vitro* Daten von Shiota et al. postulieren z. B. einen PPAR γ -unabhängigen, metabolischen Effekt von Telmisartan: die Aktivierung des AMPK-Sirt1 Signalwegs [171]. Oder ist womöglich der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor involviert? Diesbezüglich konnten Rong et al. positive metabolische Effekte von Telmisartan gegen alimentäre Adipositas, Insulinresistenz und Fettleber in Angiotensin II Typ 1 Rezeptor defizienten Mäusen (*At1a* oder *Agtr1a*) zeigen [172].

Besitzt Telmisartan diese positiven Effekte gegen alimentäre bzw. HFD-induzierte Adipositas auch in unseren FKO-Mäusen? Zumindest deuten *in vivo* Daten von Jones et al. daraufhin, dass die Deletion des fettgewebsspezifischen PPAR γ -Gens vor einer HFD-induzierten Adipositas schützen kann [148]. Die überschüssige Fettspeicherung erfolgte mutmaßlich in viszeralen Organen, wie z. B. der Leber [148]. Dieses könnte erklären, warum das Leberpräparat unserer FKO-Maus hypertroph und verfettet imponierte (Abbildung 9). Im Vergleich zu den Lebern der Kontrolltiere waren die Lebern der *knockout* Mäuse durchschnittlich 1,5-fach schwerer mit signifikant größerem Fettgehalt [148]. He et al. konnten ähnliche Daten über die Entwicklung von Fettlebern in 14 Monate alten A-ZIP/F1 Mäusen (Lipodystrophiemodell) zeigen, die ebenfalls kein fettgewebsspezifischen PPAR γ exprimierten [150].

4.3 Telmisartan ohne Effekt auf RQ und EE in FKO-Mäusen

Sell et al. konnten zeigen, dass eine PPAR γ -Aktivierung in abgemagerten und adipösen Mäusen zu einer Sympatikus-abhängigen Thermogenese bzw. zu erniedrigten RQ-Werten führte [173]. Wir konnten zeigen, dass der partielle PPAR γ -Agonist Telmisartan ohne fettgewebsspezifischen PPAR γ keinen signifikanten Effekt auf die Oxidation der Nährstoffe bzw. den RQ-Wert besaß. Wie zu erwarten war der RQ-Wert vom Nahrungsangebot und der Tagesphase abhängig.

Bezüglich des Energieverbrauchs (EE) zeigten unsere EE-Daten einen Tagesphase-abhängigen Energieverbrauch der Tiere (nachts > tagsüber). Außerdem verbrauchten unsere FKO-Mäuse signifikant mehr Energie als unsere WT-Mäuse (s. Abbildung 13). Jones et al. konnten dagegen zeigen, dass die Fütterung von fettreicher (HFD) Nahrung an deren PPAR γ *knockout* Mäusen in einem höheren Energieverbrauch (EE) resultierte [148]. Wie bei Jones et al. verbrauchten unsere FKO-HFD Mäuse signifikant mehr Energie als WT-LFD Mäuse. Vergleicht man jedoch die FKO-HFD Gruppen mit der FKO-LFD Gruppe, so ließ sich bei den FKO-HFD Mäusen ein geringerer Energieverbrauch messen. Telmisartan zeigt erwartungsgemäß bei den FKO-Mäusen keinen Effekt.

4.4 Telmisartan ohne Effekt auf die *Locomotor Activity* und Nahrungsaufnahme von FKO-Mäusen

Unsere EE-Daten zeigten, dass die FKO-Mäuse mehr Energie verbrauchten als die WT-Mäuse. Dementsprechend war die Bewegungsaktivität (*locomotor activity*) von FKO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant erhöht (s. Abbildung 14). Wie zu erwarten zeigte Telmisartan bei den FKO-Mäusen keinen Effekt.

Die größere Bewegungsaktivität und der höhere Energieverbrauch von den FKO-Mäusen korreliert mit der größeren Nahrungsaufnahme verglichen mit den WT-Mäusen. In den bereits mehrfach erwähnten Vorarbeiten von Jones et al. wurde gezeigt, dass kein signifikanter Unterschied in der Nahrungsaufnahme und Bewegungsaktivität zwischen FKO- und Kontrolltieren unter Standardfütterung (vergleichbar mit unserer LFD Fütterung) vorlag [148]. Wurden die Versuchstiere jedoch mit fettreicher Nahrung (HFD) gefüttert, so nahmen die FKO Mäuse allgemein weniger Nahrung zu sich, aber signifikant mehr als die respektiven Kontrolltiere [148]. Gleiches galt für die Bewegungsaktivität [148], was auch unseren Ergebnissen entspricht (s. Abbildung 14). Andere Vorarbeiten von Rong et al. konnten ebenfalls in deren Angiotensin II Typ 1 Rezeptor defizienten Mäusen mit alimentärer Adipositas zeigen, dass eine Telmisartanbehandlung die Nahrungsaufnahme nicht signifikant beeinflussen konnte [172].

4.5 Telmisartan ohne Effekt auf die orale Glukosetoleranz in FKO Mäusen

Unsere OGTT Daten zeigten bei den WT-HFD Mäusen eine verbesserte Glukosetoleranz nach Behandlung mit Telmisartan oder Pioglitazon. Korrelierend hierzu zeigten weder Telmisartan noch Pioglitazon einen signifikanten Effekt bei den respektiven FKO-HFD Mäusen. Dieses Ergebnis impliziert wiederum die Notwendigkeit von fettgewebsspezifischen PPAR γ für die metabolische Wirkungsentfaltung von Telmisartan.

Bereits 2005 konnten Schupp et al. zeigen, dass Telmisartan im ernährungsbedingten Adipositasmausmodell die Glukosetoleranz und Insulinsensibilität verbesserten [153]. Ähnliches konnten Nagel et al. in einer Interventionsstudie zeigen, wo eine tägliche orale Telmisartantherapie von 40 mg bei Patienten mit nachgewiesener Insulinresistenz und abdomineller Adipositas zur signifikanten Besserung der Glukostoleranz führte [174]. Zidek et al. konnten ebenfalls zeigen, dass Telmisartan nur in Anwesenheit von PPAR γ im WAT in WT Mäusen die Glukosehomeostase durch signifikant gesteigerte Lipogenese erzielte [167]. In deren FKO Mäusen ohne fettgewebsspezifischen PPAR γ war dieser Effekt entsprechend nicht mehr nachweisbar [167]. Rong et al. konnten in deren Angiotensin II Typ 1 Rezeptor defizienten Mäusen mit alimentärer Adipositas zeigen, dass eine Behandlung mit Telmisartan signifikant den Glukose- und Insulinspiegel senken konnte [172]. Zusammenfassend deuten unsere OGTT Daten und die Ergebnisse von Nagel et al., Zidek et al. sowie Rong et al. darauf hin, dass der fettgewebsspezifische PPAR γ eine Voraussetzung für die Telmisartan-induzierte Verbesserung der Glukosetoleranz erscheint.

Es sollte jedoch kritisch erwähnt werden, dass Rong et al. in einer anderen Untersuchung zeigen konnten, dass Telmisartan auch in fettlosen A-ZIP/F-1 Mäusen (Lipodystrophie Mausmodell) die Glukosetoleranz verbesserte [169].

4.6 Telmisartan ohne Effekt auf GLUT4 mRNA Expression in FKO Mäusen

Wie bereits zuvor schon erwähnt konnte Rong et al. in Angiotensin II Typ Rezeptor defizienten Mäusen zeigen, dass Telmisartan die HFD-induzierte Insulinresistenz und pathologische Lipidanreicherung in der Skelettmuskulatur und Leber wesentlich verbesserte [172]. Es musste also einen molekularen Mechanismus unabhängig vom

Angiotensin II Typ Rezeptorantagonismus existieren. Ushijima et al. konnten ebenfalls metabolische Effekte von Telmisartan in adipösen, diabetischen KK-A^y/TaJcl Mäusen zeigen, die aber anscheinend PPAR_γ-unabhängig waren [168]. Zum Beispiel wurden keine signifikanten Expressionsänderungen von PPAR_γ Zielgenen (*aP2*, *fasn*) gemessen [168]. Des Weiteren konnten sie trotz PPAR_γ Blockade mit GW9662 weiterhin metabolische Effekte nachweisen [168]. Zwar bewirkte Telmisartan auch eine signifikante Erhöhung der Adiponektin-Plasmakonzentration, aber der gleiche Effekt wurde auch für Valsartan (ohne bekannten PPAR_γ Agonismus) nachgewiesen [168]. Die Autoren schlussfolgerten, dass PPAR_γ *in vivo* keine relevante Rolle in der Ausbildung der oben genannten metabolischen Effekte von Telmisartan spielt [168]. Auch wenn wiederum nur *in vitro*, so konnten Furukuwa et al. jedoch eindeutig in 3T3-L1 Adipozyten zeigen, dass Telmisartan die Expression von aP2, Insulinrezeptor und GLUT4 insulinunabhängig und signifikant erhöhte [175].

Wir stellten die Hypothese auf, dass sich Telmisartans metabolischen Effekte hauptsächlich durch die Aktivierung vom fettgewebsspezifischen PPAR_γ im WAT erklären lassen. Unsere GLUT4-mRNA Expressionsanalysen konnten dieses nur bedingt unterstützen. Zwar zeigte eine Behandlung mit Telmisartan keinen signifikanten Effekt auf die GLUT4-mRNA Expression im WAT vom fettgewebsspezifischen PPAR_γ *knockout* Mausmodell, aber dieses war auch der Fall im WAT der WT-Mäuse. Vorausgesetzt das eine erhöhte GLUT4 mRNA Expression auch zu einer erhöhten Translation von GLUT4 Proteinen resultiert, widersprechen unsere Ergebnisse denen von Furukuwa et al., die eine erhöhten GLUT4 Translokation an die Plasmamembran von 3T3-L1 Adipozyten infolge einer Telmisartaninkubation zeigen konnten [175]. Entscheidend für den insulinsensibilisierenden Effekt über eine erhöhte GLUT4 Expression ist am Ende die Translokation. Diesen molekularen Schritt haben wir in unserer Studie nicht untersucht, aber sollte zur weiteren metabolischen Charakterisierung geklärt werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-8.
2. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
3. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
4. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;205(2):194-208.
5. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
6. Schulz H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1081(2):109-20.
7. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2006;14 Suppl 5:242S-9S.
8. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 2012;151(2):400-13.
9. Cannon B, Nedergaard J. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 1:S7-16.
10. Dawkins MJ, Scopes JW. Non-shivering thermogenesis and brown adipose tissue in the human new-born infant. *Nature*. 1965;206(980):201-2.
11. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-17.
12. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518-25.

13. Huttunen P, Hirvonen J, Kinnula V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 1981;46(4):339-45.
14. English JT, Patel SK, Flanagan MJ. Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology*. 1973;107(2):279-81.
15. Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhil-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC, et al. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of ¹⁸F-FDG-detected BAT in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):192-9.
16. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism*. 2007;6(1):38-54.
17. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998;102(2):412-20.
18. Brito NA, Brito MN, Bartness TJ. Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;294(5):R1445-52.
19. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
20. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
21. Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, et al. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*. 2013;495(7441):379-83.
22. Garrow JS, Webster J. Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *International journal of obesity*. 1985;9(2):147-53.
23. Committee WE. *Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry*. Geneva: World Health Organization, 1995.
24. Bluher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;117(6):241-50.

25. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* (Silver Spring, Md. 2006;14(4):529-644.
26. Hainer V, Zamrazilova H, Spalova J, Hainerova I, Kunesova M, Aldhoon B, et al. Role of hereditary factors in weight loss and its maintenance. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 1:S1-15.
27. Romao I, Roth J. Genetic and environmental interactions in obesity and type 2 diabetes. *J Am Diet Assoc*. 2008;108(4 Suppl 1):S24-8.
28. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28 Suppl 4:S12-21.
29. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;116(1):39-48.
30. Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med*. 2008;359(20):2105-20.
31. LeRoith D, Novosyadlyy R, Gallagher EJ, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S. Obesity and type 2 diabetes are associated with an increased risk of developing cancer and a worse prognosis; epidemiological and mechanistic evidence. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008;116 Suppl 1:S4-6.
32. Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Carnevale Schianca GP, Bartoli E. Metabolic characteristics of glucose intolerance: the critical role of obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008;116(2):86-93.
33. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444(7121):875-80.
34. Kurth B-M. Erste Ergebnisse aus der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS). *Bundesgesundheitsblatt*. 2012;55:980-90.
35. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity among adults: United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief*. 2013(131):1-8.
36. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, American Heart A, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109(3):433-8.

37. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(14):1113-32.
38. Organization WH. 2008–2013 Action plan for the global strategy for the prevention and control of noncommunicable diseases. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2008.
39. Wille E, Scholze J, Alegria E, Ferri C, Langham S, Stevens W, et al. Modelling the costs of care of hypertension in patients with metabolic syndrome and its consequences, in Germany, Spain and Italy. *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care.* 2011;12(3):205-18.
40. Smith JJ, Aitchison JD. Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(12):803-17.
41. Hess R, Staubli W, Riess W. Nature of the hepatomegaly effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature.* 1965;208(5013):856-8.
42. Reddy JK, Rao S, Moody DE. Hepatocellular carcinomas in acatalasemic mice treated with nafenopin, a hypolipidemic peroxisome proliferator. *Cancer Res.* 1976;36(4):1211-7.
43. Lalwani ND, Alvares K, Reddy MK, Reddy MN, Parikh I, Reddy JK. Peroxisome proliferator-binding protein: identification and partial characterization of nafenopin-, clofibric acid-, and ciprofibrate-binding proteins from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(15):5242-6.
44. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet.* 1999;354(9173):141-8.
45. Rumi MA, Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Hamamoto S, Kazumori H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2001;84(12):1640-7.
46. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347(6294):645-50.
47. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 1992;68(5):879-87.
48. Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem.* 1993;268(36):26817-20.

49. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 1993;32(21):5598-604.
50. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR, Jr. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem*. 1997;272(12):8071-6.
51. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. 1985;318(6047):635-41.
52. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet*. 2001;17(10):554-6.
53. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999;64(5):310-9.
54. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1269-304.
55. Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 1986;46(5):645-52.
56. Berg JM. DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell*. 1989;57(7):1065-8.
57. Hollenberg SM, Evans RM. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 1988;55(5):899-906.
58. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835-9.
59. Warburton PE, Giordano J, Cheung F, Gelfand Y, Benson G. Inverted repeat structure of the human genome: the X-chromosome contains a preponderance of large, highly homologous inverted repeats that contain testes genes. *Genome Res*. 2004;14(10A):1861-9.
60. Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*. 1995;375(6528):203-11.
61. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*. 2000;43(4):527-50.
62. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta*. 2007.

63. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18779-89.
64. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998;438(1-2):55-60.
65. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz M, Moller DE, et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochemical and biophysical research communications.* 1996;224(2):431-7.
66. Boon Yin K, Najimudin N, Muhammad TS. The PPARgamma coding region and its role in visceral obesity. *Biochemical and biophysical research communications.* 2008;371(2):177-9.
67. Leonardini A, Laviola L, Perrini S, Natalicchio A, Giorgino F. Cross-Talk between PPARgamma and Insulin Signaling and Modulation of Insulin Sensitivity. *PPAR Res.* 2009;2009:818945.
68. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, 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.* 1997;46(8):1319-27.
69. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):999-1013.
70. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest.* 1997;99(10):2416-22.
71. Powell E, Kuhn P, Xu W. Nuclear Receptor Cofactors in PPARgamma-Mediated Adipogenesis and Adipocyte Energy Metabolism. *PPAR Res.* 2006;2007:53843.
72. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(4):1440-4.
73. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 1997;89(3):373-80.

74. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004;429(6993):771-6.
75. Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RN. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13600-5.
76. Yoon HG, Chan DW, Huang ZQ, Li J, Fondell JD, Qin J, et al. Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J*. 2003;22(6):1336-46.
77. Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(8):321-7.
78. Ge K, Guermah M, Yuan CX, Ito M, Wallberg AE, Spiegelman BM, et al. Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature*. 2002;417(6888):563-7.
79. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development*. 2006;20(11):1405-28.
80. Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(2):55-60.
81. Westin S, Rosenfeld MG, Glass CK. Nuclear receptor coactivators. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)*. 2000;47:89-112.
82. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9(2):140-7.
83. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 1992;358(6389):771-4.
84. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, et al. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25252-9.
85. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):926-35.

86. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18527-33.
87. Camp HS, Whitton AL, Tafuri SR. PPARgamma activators down-regulate the expression of PPARgamma in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 1999;447(2-3):186-90.
88. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. 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.* 1997;272(32):20230-5.
89. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013;19(5):557-66.
90. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(16):10811-6.
91. Compe E, Drane P, Laurent C, Diderich K, Braun C, Hoeijmakers JH, et al. Dysregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor target genes by XPD mutations. *Molecular and cellular biology.* 2005;25(14):6065-76.
92. Iankova I, Petersen RK, Annicotte JS, Chavey C, Hansen JB, Kratchmarova I, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Molecular endocrinology.* 2006;20(7):1494-505.
93. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Bostrom P, Laznik D, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature.* 2010;466(7305):451-6.
94. Shimizu M, Yamashita D, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Molecular and cellular biochemistry.* 2006;286(1-2):33-42.
95. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 2005;437(7059):759-63.

96. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995;83(5):813-9.
97. Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, et al. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(7):2340-5.
98. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*. 1995;270(22):12953-6.
99. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest*. 1998;101(1):22-32.
100. Baumann CA, Chokshi N, Saltiel AR, Ribon V. Cloning and characterization of a functional peroxisome proliferator activator receptor-gamma-responsive element in the promoter of the CAP gene. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9131-5.
101. Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med*. 1999;16(3):179-92.
102. Kadowaki T, Hara K, Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. The role of PPARgamma in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Journal of diabetes and its complications*. 2002;16(1):41-5.
103. Komajda M, McMurray JJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Pocock SJ, et al. Heart failure events with rosiglitazone in type 2 diabetes: data from the RECORD clinical trial. *Eur Heart J*. 2010;31(7):824-31.
104. Rosen CJ. The rosiglitazone story--lessons from an FDA Advisory Committee meeting. *N Engl J Med*. 2007;357(9):844-6.
105. Turner RM, Kwok CS, Chen-Turner C, Maduakor CA, Singh S, Loke YK. Thiazolidinediones and associated risk of Bladder Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis. *British journal of clinical pharmacology*. 2013.
106. Isley WL. Hepatotoxicity of thiazolidinediones. *Expert Opin Drug Saf*. 2003;2(6):581-6.
107. FDA Drug Safety Communication: Updated Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) to Restrict Access to Rosiglitazone-containing Medicines including Avandia, Avandamet, and Avandaryl [Internet]. U.S. Department of Health and Human

- Services News. U.S. Food and Drug Administration. 2011 [cited June 24, 2015]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm255005.htm>.
108. FDA Drug Safety Communication. FDA requires removal of some prescribing and dispensing restrictions for rosiglitazone-containing diabetes medicines [Internet]. U. S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 2013 [cited June 22, 2015].
109. European Medicines Agency recommends suspension of Avandia, Avandamet and Avaglim [press release]. London: European Medicines Agency 2010.
110. Press Release. Use of Medications Containing Pioglitazone (Actos®, Competact®) Suspended. [Internet]. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. 2011 [cited June 22, 2015]. Available from: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/4e293bcd0814c025b94d46d7502a0958.pdf.
111. Pioglitazon (Actos®, Competact®, Tandemact®): Leitfaden für die Verordnung und das Risikomanagement [Internet]. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. 2012 [cited June 22, 2015]. Available from: <http://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RI/2012/RI-pioglitazon.html>.
112. Agrawal R, Jain P, Dikshit SN. Balaglitazone: a second generation peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma (gamma) agonist. Mini reviews in medicinal chemistry. 2012;12(2):87-97.
113. Chen L, Bush CR, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, et al. RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. Molecular and cellular endocrinology. 2006;251(1-2):17-32.
114. Zhang F, Lavan BE, Gregoire FM. Selective Modulators of PPAR-gamma Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects. PPAR Res. 2007;2007:32696.
115. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Biol Chem. 1997;272(6):3406-10.
116. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. Hypertension. 2004;43(5):993-1002.

117. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation*. 2004;109(17):2054-7.
118. Zieleniak A, Wojcik M, Wozniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2008;56(5):331-45.
119. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93(2):241-52.
120. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(1):351-7.
121. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 1996;15(19):5336-48.
122. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4543-7.
123. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*. 1998;101(6):1354-61.
124. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem*. 1999;274(7):3970-7.
125. Gurnell M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2005;19(4):501-23.
126. Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):5793-6.
127. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(2):84-9.

128. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 2002;51(10):2968-74.
129. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288-95.
130. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.
131. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell metabolism*. 2007;5(4):237-52.
132. Birnbaum MJ. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell*. 1989;57(2):305-15.
133. Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, et al. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med*. 1997;3(10):1096-101.
134. Dugani CB, Klip A. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO reports*. 2005;6(12):1137-42.
135. Holman GD, Cushman SW. Subcellular localization and trafficking of the GLUT4 glucose transporter isoform in insulin-responsive cells. *Bioessays*. 1994;16(10):753-9.
136. Karnieli E, Armoni M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(1):E38-45.
137. Furuta M, Yano Y, Gabazza EC, Araki-Sasaki R, Tanaka T, Katsuki A, et al. Troglitazone improves GLUT4 expression in adipose tissue in an animal model of obese type 2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 2002;56(3):159-71.
138. Destro M, Cagnoni F, Dognini GP, Galimberti V, Taietti C, Cavalleri C, et al. Telmisartan: just an antihypertensive agent? A literature review. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12(17):2719-35.
139. Deppe S, Boger RH, Weiss J, Benndorf RA. Telmisartan: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6(7):863-71.

140. Battershill AJ, Scott LJ. Telmisartan: a review of its use in the management of hypertension. *Drugs*. 2006;66(1):51-83.
141. Wiene W, Huel N, Van Meel JC, Narr B, Ries U, Entzeroth M. Pharmacological characterization of the novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, BIBR 277. *Br J Pharmacol*. 1993;110(1):245-52.
142. Maung K, J. Z. Clinical Review. NDA 20-850 Efficacy Supplement SE1-025 Micardis® (telmisartan) tablets. NDA (New Efficacy Supplement). USA: U.S. Food and Drug Administration, 1/OND DO; 2009 Contract No.: 20-850.
143. Agency EM. Summary of product characteristics, Micardis®. Agency EM; 2011.
144. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*. 2007;13(8 Suppl B):9-20.
145. Miura S, Saku K, Karnik SS. Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res*. 2003;26(12):937-43.
146. Peach MJ. Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action. *Physiological Reviews*. 1977;57(2):313-53.
147. Erbe DV, Gartrell K, Zhang YL, Suri V, Kirincich SJ, Will S, et al. Molecular activation of PPARgamma by angiotensin II type 1-receptor antagonists. *Vascul Pharmacol*. 2006;45(3):154-62.
148. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, et al. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):6207-12.
149. Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol*. 2009;Chapter 19:Unit 19 2 2 1-7.
150. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15712-7.
151. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.
152. Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Antao N, Baynard T, Woods JA. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;296(5):E1164-71.

153. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, et al. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes*. 2005;54(12):3442-52.
154. Benz V, Bloch M, Wardat S, Bohm C, Maurer L, Mahmoodzadeh S, et al. Sexual dimorphic regulation of body weight dynamics and adipose tissue lipolysis. *PLoS One*. 2012;7(5):e37794.
155. da Rocha EE, Alves VG, da Fonseca RB. Indirect calorimetry: methodology, instruments and clinical application. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006;9(3):247-56.
156. Westerterp KR. Food quotient, respiratory quotient, and energy balance. *The American journal of clinical nutrition*. 1993;57(5 Suppl):759S-64S; discussion 64S-65S.
157. Lewis DS, Rollwitz WL, Bertrand HA, Masoro EJ. Use of NMR for measurement of total body water and estimation of body fat. *Journal of applied physiology*. 1986;60(3):836-40.
158. Müllhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. 5 ed. München: Elsevier GmbH; 2006.
159. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
160. Elliott WJ, Meyer PM. Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis. *Lancet*. 2007;369(9557):201-7.
161. Derosa G, Ragonesi PD, Mugellini A, Ciccarelli L, Fogari R. 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*. 2004;27(7):457-64.
162. Suksomboon N, Poolsup N, Prasit T. Systematic review of the effect of telmisartan on insulin sensitivity in hypertensive patients with insulin resistance or diabetes. *J Clin Pharm Ther*. 2012;37(3):319-27.
163. Derosa G, Fogari E, D'Angelo A, Cicero AF, Salvadeo SA, Ragonesi PD, et al. Metabolic effects of telmisartan and irbesartan in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome treated with rosiglitazone. *J Clin Pharm Ther*. 2007;32(3):261-8.
164. Vitale C, Mercurio G, Castiglioni C, Cornoldi A, Tulli A, Fini M, et al. Metabolic effect of telmisartan and losartan in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Cardiovascular diabetology*. 2005;4:6.
165. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the

- ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9638):547-53.
166. Barzilay JI, Gao P, Ryden L, Schumacher H, Probstfield J, Commerford P, et al. Effects of telmisartan on glucose levels in people at high risk for cardiovascular disease but free from diabetes: the TRANSCEND study. *Diabetes care*. 2011;34(9):1902-7.
167. Zidek V, Mlejnek P, Simakova M, Silhavy J, Landa V, Kazdova L, et al. Tissue-Specific Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Expression and Metabolic Effects of Telmisartan. *Am J Hypertens*. 2013.
168. Ushijima K, Takuma M, Ando H, Ishikawa-Kobayashi E, Nozawa M, Maekawa T, et al. Effects of telmisartan and valsartan on insulin sensitivity in obese diabetic mice. *European journal of pharmacology*. 2013;698(1-3):505-10.
169. Rong X, Li Y, Ebihara K, Zhao M, Aini W, Kusakabe T, et al. An adipose tissue-independent insulin-sensitizing action of telmisartan: a study in lipodystrophic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(3):1096-103.
170. Kamari Y, Harari A, Shaish A, Peleg E, Sharabi Y, Harats D, et al. Effect of telmisartan, angiotensin II receptor antagonist, on metabolic profile in fructose-induced hypertensive, hyperinsulinemic, hyperlipidemic rats. *Hypertens Res*. 2008;31(1):135-40.
171. Shiota A, Shimabukuro M, Fukuda D, Soeki T, Sato H, Uematsu E, et al. Activation of AMPK-Sirt1 pathway by telmisartan in white adipose tissue: A possible link to anti-metabolic effects. *European journal of pharmacology*. 2012;692(1-3):84-90.
172. Rong X, Li Y, Ebihara K, Zhao M, Naowaboot J, Kusakabe T, et al. Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia*. 2010.
173. Sell H, Berger JP, Samson P, Castriota G, Lalonde J, Deshaies Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology*. 2004;145(8):3925-34.
174. Nagel JM, Tietz AB, Goke B, Parhofer KG. The effect of telmisartan on glucose and lipid metabolism in nondiabetic, insulin-resistant subjects. *Metabolism: clinical and experimental*. 2006;55(9):1149-54.
175. Furukawa H, Mawatari K, Koyama K, Yasui S, Morizumi R, Shimohata T, et al. Telmisartan increases localization of glucose transporter 4 to the plasma membrane and increases glucose uptake via peroxisome proliferator-activated receptor gamma in 3T3-L1 adipocytes. *European journal of pharmacology*. 2011;660(2-3):485-91

6 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 SCHEMATISCHER AUFBAU ALLER NUKLEÄREN REZEPTOREN [54].	15
ABBILDUNG 2 DIE 4 KLASSEN DER NUKLEAREN HORMONREZEPTOREN [58].	16
ABBILDUNG 3 3-DIMENSIONALE TERTIÄRSTRUKTUR DES PPAR [62].	17
ABBILDUNG 4 REGULATIONSMECHANISMEN VON PPAR-ZIELGENEN [85].	19
ABBILDUNG 5 CHEMISCHE STRUKTURFORMEL UND BEZEICHNUNG VON TELMISARTAN [139].	24
ABBILDUNG 6 <i>CRE/LOXP</i> -TECHNOLOGIE. KREUZUNGSSCHEMA MIT STAMMBAUM	29
ABBILDUNG 7 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES EXPERIMENTELLEN DESIGNS.	30
ABBILDUNG 8 STANDARDPROGRAMM DER KLASSISCHEN QUANTITATIVEN PCR.	34
ABBILDUNG 9 A PHÄNOTYPISCHE GEGENÜBERSTELLUNG VON 2 EPIDYDIMALEN FETTPOLSTERN (WAT), ZWEI NIEREN MIT PERIRENALER FETTKAPSEL (WAT) UND LEBER VON EINER WILDTYP (WT) UND FETTGEWEBSSPEZIFISCHER PPAR γ <i>KNOCKOUT</i> MAUS (FKO). B RELATIVE PPAR γ -MRNA EXPRESSION VON WILDTYP (WT; N = 6) UND FETTGEWEBSSPEZIFISCHE PPAR γ <i>KNOCKOUT</i> MÄUSEN (FKO; N = 5).	39
ABBILDUNG 10 A ILLUSTRATION DER KÖRPERGEWICHTSENTWICKLUNG [G]. B DURCHSCHNITTLICHES KÖRPERGEWICHT (BW = <i>BODY WEIGHT</i>) [G \pm SEM]	41
ABBILDUNG 11 A NMR BESTIMMUNG DER FETTMASSEN [G] (MITTELWERT \pm SEM) [157]. B ANALOGE ANALYSE DES MAGERMASSEN [G] (LEAN MASS).	43
ABBILDUNG 12 NAHRUNGS-AUFNAHME [G/TAG] DER VERSUCHSTIERE IN ABHÄNGIGKEIT VON NAHRUNG (LFD = <i>LOW-FAT DIET</i> ; HFD = <i>HIGH-FAT DIET</i>) UND BEHANDLUNG (VEH = VEHIKEL, TELMI = TELMISARTAN, PIO = PIOGLITAZON).	45
ABBILDUNG 13 ENERGIEVERBRAUCH [KCAL/H/KG KÖRPERGEWICHT] DER VERSUCHSTIERE	46
ABBILDUNG 14 DIE BEWEGUNGS-AKTIVITÄT (<i>LOCOMOTOR ACTIVITY</i>) DER VERSUCHSTIERE	47
ABBILDUNG 15 DER RESPIRATORISCHE QUOTIENT (RQ)	48
ABBILDUNG 16 A ORALER GLUKOSE TOLERANZ TEST (OGTT) ÜBER ZEIT (150 MINUTEN). HIERZU KORRELIEREND DIE AUC (<i>AREA UNDER THE CURVE</i>)	50
ABBILDUNG 17 RELATIVE MRNA-EXPRESSIONEN VON GLUT4 IN WT- UND FKO-MÄUSEN	51

7 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 LISTE VON ADIPOKINEN, PEPTIDEN, GLYKOPROTEINEN, CYTOKINEN, REZEPTOREN, ENZYMEN UND TRANSPORTERPROTEINE DES WEIßEN FETTGEWEBES (WAT) [7].	11
TABELLE 2 VERZEICHNIS VERWENDETER CHEMIKALIEN, SUBSTANZEN UND KITS.....	26
TABELLE 3 VERWENDETE FORWARD UND REVERSE PRIMER	27
TABELLE 4 VERZEICHNIS VERWENDETER ENZYME.	27
TABELLE 5 MASTER MIX (MM) FÜR DIE REVERSE TRANSKRIPTION ZUR cDNA-SYNTHESE	33

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lucas Dong-Gun Lee, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung von PPAR γ im Fettgewebe für metabolische Effekte von Angiotensin Typ 1 Rezeptorantagonisten Telmisartan“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Ergebnissen entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Publikationen

1) Schupp M, **Lee LD**, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T, Kintscher U. Regulation of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Activity by Losartan Metabolites. Hypertension 2006;47(3):586-589.

2) **Lee LD**, Mafura B, Lauscher JC, Seeliger H, Kreis ME, Gröne J. Antiproliferative and apoptotic effects of telmisartan in human colon cancer cells. Oncology letters 2014;8(6): 2681-2686.

11 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle in erster Linie bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. U. Kintscher für die Möglichkeit dieser Dissertationsarbeit herzlich bedanken. Durch diese Arbeit hat Prof. Kintscher mir kritisches, wissenschaftliches Denken und Arbeiten übermittelt, Fähigkeiten die durchgehend im chirurgischen Alltag einer universitären Klinik praktische Anwendung finden. Ferner hat Prof. Kintscher mir nicht nur dieses Thema mitsamt den Herausforderungen anvertraut, sondern unentwegt trotz großer Hindernisse mit sehr großer Geduld unterstützt. Ein weiteres, besonderes Dankeschön geht an Frau PD Dr. rer. nat. A. Foryst-Ludwig, die mich in allen technischen Aspekten ausgebildet hat. Bei technischen Schwierigkeiten stand sie mir stets hilfreich zu Rat. Nicht zuletzt möchte ich mich zutiefst bei Beata Höft und Christiane Sprang für die exzellenten Ausführungen der Experimente bedanken.

Nun möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich besonders bei meiner Frau Ye Jeong, meinen Eltern und meinen beiden Schwestern zu bedanken, die mich in allen Lebenslagen und in schwierigen Zeiten unentwegt unterstützt haben und niemals den Glauben an mich verloren haben. Diese Dissertation möchte ich somit meiner gesamten Familie und insbesondere meiner Frau Ye Jeong sowie meinen beiden Kindern Julian und Isabelle widmen.