

## 4. Diskussion

AT<sub>1</sub>- Antagonisten binden im nM- Bereich selektiv an den AT<sub>1</sub>- Rezeptor (Abschnitt 1.6.3.). Über die Blockade des Angriffs von Angiotensin II an diesem Rezeptor kommt es zu den beschriebenen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System [229]. Durch die Verringerung der Inzidenz von Typ-II- Diabetes unter der Therapie mit AT<sub>1</sub>- Antagonisten und durch deren Einflüsse auf die Fettzellendifferenzierung (Abschnitt 1.7./1.8.) entwickelte sich die Hypothese einer zusätzlichen Wirkung dieser Substanzen, die unabhängig von der Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors ist. Als prominenter Interaktionspartner wurde PPAR $\gamma$  untersucht, das eine zentrale Rolle bei der Fettzellendifferenzierung spielt. Zu Beginn dieser Arbeit war außer der AT<sub>1</sub>- Rezeptorblockade kein anderer molekularer Angriffspunkt dieser Substanzen bekannt. Es sollte daher im Zuge der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welchen Einfluß die AT<sub>1</sub>- Antagonisten auf die PPAR $\gamma$ - vermittelte Fettzellendifferenzierung haben und Interaktionen mit dem nukleären Transkriptionsfaktor näher zu charakterisieren.

AT<sub>1</sub>- Antagonisten verstärkten konzentrationsabhängig die Differenzierung von murinen und humanen Präadipozyten, wobei Telmisartan und Irbesartan die potenteste Wirkung aufwiesen. Eprosartan zeigte keine adipogenen Effekte. Eine Aktivitätssteigerung von endogenem PPAR $\gamma$  durch AT<sub>1</sub>- Antagonisten war unabhängig von der AT<sub>1</sub>- Rezeptorblockade und von der Anwesenheit des AT<sub>2</sub>- Rezeptors. Die Aktivitätssteigerung kam durch eine direkte Interaktion dieser Substanzen mit der PPAR $\gamma$ - LBD zustande, und deren Aktivierung korrelierte mit den Einflüssen auf die Fettzellendifferenzierung, wobei AT<sub>1</sub>- Antagonisten als partielle Agonisten im Vergleich zu den Thiazolidindionen wirkten. Durch Untersuchung von Protein- Protein Interaktionen konnte eine direkte Bindung dieser Substanzen an die PPAR $\gamma$ - LBD und eine selektive Kofaktorrekutierung gezeigt werden. Genexpressionsstudien identifizierten neben gleichartig regulierten PPAR $\gamma$ - Zielgenen, auch unterschiedlich regulierte Gene in Adipozyten. Entsprechend der PPAR $\gamma$ - Aktivierung, erhöhten AT<sub>1</sub>- Antagonisten die Insulin- unabhängige/abhängige Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten.

#### 4.1. Die Auswahl der Zellmodelle

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der verstärkten Lipideinlagerung durch AT<sub>1</sub>-Antagonisten stellte sich die Frage nach dem passenden Zellmodell. Primärkulturen können sowohl von Nagern als auch vom Menschen durch Isolierung von im Fettgewebe enthaltenen Präadipozyten gewonnen werden, die dann durch Hormonstimulation *in-vitro* zu Adipozyten differenzieren. Um jedoch die grundlegenden Effekte valide zu untersuchen, wurde die murine 3T3-L1 Präadipozyten Zelllinie gewählt, da deren PPAR $\gamma$ - abhängige Differenzierungskaskade am detailliertesten untersucht ist und die kultivierten Präadipozyten mit gleichbleibenden Effizienzen differenziert und transfiziert werden können (Abschnitte 1.5.5. und 3.1.). Die Ergebnisse wurden später in humanen Primärzellkulturen auf Validität überprüft. Weiterhin wurden PC12W Zellen und embryonale Fibroblasten der AT<sub>2</sub>(-/-)- Maus zur Wirkung der Substanzen in Angiotensinrezeptor- defizienten Systemen verwendet. Wegen ihrer leichten Transfizierbarkeit dienten PC12W und COS-7 Zellen zur Untersuchung der PPAR $\alpha/\gamma$  Transaktivierung.

#### 4.2. AT<sub>1</sub>- Antagonisten verstärken Adipogenese unabhängig vom RAS

Sowohl murine 3T3-L1 als auch humane Adipozyten exprimieren alle Komponenten des RAS [230], wobei auch die lokale Generierung von Angiotensin II diskutiert wird [153]. Untersuchungen während der Differenzierung bewiesen, dass sowohl AT<sub>1</sub>- als auch AT<sub>2</sub>- Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene in murinen und humanen Adipozyten exprimiert sind [151, 231]. Durch Stimulation dieser Rezeptoren durch Angiotensin II wurden funktionelle Auswirkungen untersucht. So zeigte sich während der Differenzierung humaner Präadipozyten ein hemmender Effekt von hohen Konzentrationen Angiotensin II auf Lipideinlagerung und die Expression von Markergenen [142]. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von ausdifferenzierten murinen und humanen Adipozyten zu einer Stimulation der Lipogenese und zur Erhöhung der Expression des Fettsäuresynthasegens [152] und zur Freisetzung von Prostazyklin, das als wichtiger Faktor für die lokale Fettgewebsentwicklung diskutiert wird [232, 233]. Diese sehr gegensätzlichen Wirkungen werden mit Unterschieden in der Expression der Angiotensinrezeptorsubtypen in Abhängigkeit von der Spezies und des Differenzierungsgrades der Zellen erklärt [40, 154]. Somit hat das lokale RAS in

den Adipozyten neben einer Regulation des lokalen Blutstroms auch Einfluß auf metabolische Funktionen der Zellen [153, 230].

Janke und Kollegen inkubierten humane Präadipozyten während der Differenzierung mit verschiedenen Konzentrationen Irbesartan. Die verstärkte Einlagerung von Lipiden und Erhöhung der Expression von Markergenen wurde als Folge der AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade interpretiert [142]. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Experimente widersprechen dieser Hypothese und weisen auf einen zusätzlichen RAS- unabhängigen Effekt dieser Substanzen hin. Wie einleitend beschrieben (siehe 1.7.), erfolgten Differenzierungsexperimente in [142] ohne Inkubation von Angiotensin II, und die Konzentrationen von Irbesartan lagen weit höher, als für die Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors benötigt. Die unter 3.1. und 3.6. beschriebenen adipogenen Effekte der AT<sub>1</sub>-Antagonisten bestätigten diese Beobachtung für die Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten. Die unter 3.2. beschriebene Aktivierung von PPAR $\gamma$ , die mit diesen adipogenen Effekten korrelierte, hatte in einem AT<sub>1</sub>- Rezeptor defizienten Zellsystem Bestand, was ein weiterer Beweis für eine AT<sub>1</sub>- Rezeptor unabhängige Wirkung ist. Entsprechend zeigte Eprosartan keinen Einfluß auf die Differenzierung, obwohl es in Konzentrationen angewendet wurde, die quantitativ alle AT<sub>1</sub>- Rezeptoren blockierten. Die Stimulation der Adipogenese in embryonalen Fibroblasten von AT<sub>2</sub>(-/-)- Mäusen durch AT<sub>1</sub>- Antagonisten, schloss eine AT<sub>2</sub>- Rezeptor vermittelte Freisetzung von Prostazyklin, als adipogenen Mediator, aus.

### **4.3. AT<sub>1</sub>- Antagonisten binden an PPAR $\gamma$**

Während der Anfertigung dieser Arbeit bestätigten Benson SC und Kollegen die Wirkung von Telmisartan auf die Fettzellendifferenzierung und der Expression von Markergenen [165]. Die Aktivierung der PPAR $\gamma$ - LBD im Gal4- System diente ihnen als Grundlage für ein computergestützte Berechnung der Bindung von Telmisartan an PPAR $\gamma$ .

Eine Aktivitätssteigerung des Gal4- Systems kann durch verschiedene Interaktionen mit der PPAR $\gamma$ - LBD hervorgerufen. Zum einen kann eine Änderung der Kofaktorausstattung der Zelle, z.B. eine vermehrte Expression von wichtigen Kofaktoren für die PPAR $\gamma$ - Aktivierung, einen positiven Effekt auf Transaktivierung haben, da die meisten Kofaktoren über das LxxLL Motiv in der AF-2 Domäne der PPAR $\gamma$ - LBD mit dem Transkriptionsfaktor interagieren, und somit im Gal4-System

relevant sind [202, 234]. Dafür müssten die AT<sub>1</sub>- Antagonisten die Expression von Kofaktoren beeinflussen, die dann über eine Interaktion mit der PPAR $\gamma$ - LBD dessen transkriptionelle Aktivität erhöhen. In Expressionsstudien mittels Microarrays konnten keine entscheidenden, von den TZDs abweichenden Regulationen, von Kofaktoren identifiziert werden (Clemenz M, unveröffentlicht). Ein AT<sub>1</sub>- Antagonisten abhängiger Einfluß von Angiotensin II auf das Gal4- System war durch die Aufrechterhaltung der PPAR $\gamma$ - Aktivierung in den Angiotensinrezeptoren- defizienten Zellen ausgeschlossen. Der wahrscheinlichere Mechanismus war die direkte Bindung der Substanzen an die PPAR $\gamma$ - LBD. Verschiedene Versuchsergebnisse unterstützen diese Überlegung: einen positiven Einfluß der AT<sub>1</sub>-Antagonisten auf die Adipogenese, eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität von endogenem PPAR $\gamma$  und eine direkte Interaktion mit der LBD – alles in sehr ähnlicher Weise wie Pioglitazon. Die verminderte Expression von PPAR $\gamma$  am Tag 4 (Abschnitt 3.1.) würde somit eine negative Rückkopplung darstellen. Über diese negative Rückkopplung war für diverse PPAR $\gamma$ - Liganden berichtet worden [181, 235, 236]. Sie konnte in ausdifferenzierten Adipozyten durch Inkubation mit den AT<sub>1</sub>- Antagonisten reproduziert werden (siehe Abschnitt 3.10.4.). Als weiterer Beweis wurden die Zellen mit einem veränderten Differenzierungsmix behandelt, der nur aus Insulin und Dexamethason bestand und bei dem die Differenzierung von der Präsenz eines synthetischen PPAR $\gamma$ - Liganden abhängt [72]. Ohne dessen Zusatz differenzierten die Zellen nur sehr schwach. Durch Hinzufügen von Pioglitazon oder auch Telmisartan bzw. Irbesartan konnte die Adipogenese wieder induziert werden (siehe Abschnitte 3.4.2. und 3.6.).

Weitere Hinweise für eine direkte Interaktion lieferten Experimente mit aufgereinigtem PPAR $\gamma$ - Protein. So änderte Telmisartan das Muster trypsinverdauresistenter Fragmente von PPAR $\gamma_2$  (Abschnitt 3.10.3.), was durch eine direkte Bindung dieser Substanz an das Protein hervorgerufen sein musste. Obwohl die benötigten Konzentrationen von Telmisartan hoch waren, (ca. das 10-20 fache des EC<sub>50</sub>- Wert) wird Rosiglitazon in anderen Arbeiten in vergleichsweise hohe Konzentrationen verwendet [178, 206] (10 $\mu$ M entspricht mehr als dem 100fachen des EC<sub>50</sub>- Wertes). Weiterhin konnten Irbesartan wie auch Telmisartan die Rekrutierung von Korepressoren und Kofaktoren durch PPAR $\gamma$  in GST-pull down und FRET- Experimenten regulieren, Charakteristika, die für typische PPAR $\gamma$ - Liganden beschrieben sind [37, 85]. Durch die Untersuchung dieser isolierten Protein- Protein Interaktionen wurde eine Bindung der Substanzen an PPAR $\gamma$  bestätigt. Die Freisetzung eines endogenen PPAR $\gamma$ - Liganden [71] durch AT<sub>1</sub>-

Antagonisten während der Fettzellendifferenzierung wurde durch die beschriebene Identifizierung einer direkten Interaktionen dieser Substanzen mit dem PPAR $\gamma$ - Protein unwahrscheinlich, kann aber als zusätzlicher Mechanismus nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.4. Kristallisation der PPAR $\gamma$ - LBD mit gebundenem Ligand**

Die Kristallisation der PPAR $\gamma$ - LBD wurde zuerst in Anwesenheit von Pioglitazon durchgeführt, um ein bekanntes TZD bei den gegebenen Bedingungen zum Vergleich heranziehen zu können. Es war eine ähnliche räumliche Anordnung zu erwarten, wie die für Rosiglitazon [226], da sich beide Substanzen nur geringfügig in einem Bereich ihrer Struktur unterscheiden, der nicht für Interaktionen mit der AF-2 Domäne verantwortlich ist [226] (Abschnitt 1.6.8.). Die publizierten Kristallstrukturen zeigten einen PPAR $\gamma$ -Homodimer bestehend aus Molekül A in einer aktiven, d.h. ligandgebundenen Konformation, und Molekül B in einer inaktiven Konformation, dessen Bindungsstelle unbesetzt war [227, 237]. PPAR $\gamma$  ist jedoch nur in Form eines Heterodimers mit RXR $\alpha$  in der Lage, eine DNA- Bindung einzugehen [226].

Die Identifizierung von Pioglitazon im Molekül B ist die erste Beschreibung eines gebundenen Liganden in dieser inaktiven Proteinkonformation (Abschnitt 3.13.). Bisher wurde kein Ligand identifiziert, der in beiden Molekülen mit unterschiedlicher räumlicher Anordnung gebunden ist. Rosiglitazon kann sich in Molekül B nicht parallel zu Helix-3 anordnen, was womöglich auf die leicht abweichende Struktur zurückzuführen ist. Obwohl Unterschiede zwischen den Interaktionen mit Koaktivatoren für Rosiglitazon und Pioglitazon beschrieben sind [234], muss die Bedeutung dieser doppelten Bindung im Homodimer in weiteren Experimenten untersucht werden.

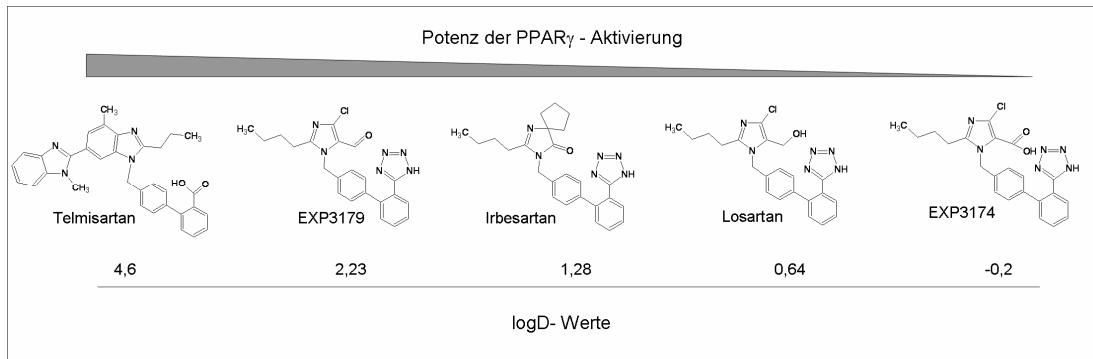
#### 4.5. Struktur- Wirkungsbeziehung bezüglich der PPAR $\gamma$ -Aktivierung

Ein Vergleich der Strukturen von AT<sub>1</sub>- Antagonisten und TZDs zeigte keine grundlegenden Gemeinsamkeiten. Jedoch konnten alle untersuchten AT<sub>1</sub>- Antagonisten mit Biphenylstruktur (Abschnitt 1.4.3.): Telmisartan, Irbesartan, Losartan sowie EXP3179, die PPAR $\gamma$ - LBD aktivieren. Eprosartan, aufgebaut aus einer substituierten Benzylcarbonsäure, hatte weder in Differenzierungs- noch in Transaktivierungsexperimenten eine PPAR $\gamma$ - aktivierende Wirkung. Somit scheint die Biphenylstruktur der AT<sub>1</sub>- Antagonisten eine unabdingbare Voraussetzung für die Interaktion mit PPAR $\gamma$  zu sein. Die in [165] diskutierte Hypothese, dass nur Biphenyl-Nicht-Tetrazole (Telmisartan) die Fähigkeit zur PPAR $\gamma$ - Aktivierung haben, ist durch die Testung höherer Konzentrationen der AT<sub>1</sub>- Antagonisten mit Tetrazolen (Irbesartan, EXP3179), entkräftet. Vorstellbar wäre eine Orientierung des Biphenyls in die Richtung der AF-2 Domäne und möglichen Interaktionen mit bestimmten Aminosäuren, die auch für die TZD- Bindung beschrieben sind [226-228]. Anstelle des Thiazolidindionringes wäre dann entweder eine Säurefunktion (Telmisartan) oder ein Tetrazol (Irbesartan und Losartan) in diese Interaktionen involviert. Eine direkte Interaktion von funktionellen Gruppen der AT<sub>1</sub>- Antagonisten mit der AF-2 Domäne ist jedoch hinsichtlich der moderaten Aktivierung der Fettzellendifferenzierungsvorgänge und der Nichtstabilisierung des Proteins vor partiellem Proteaseverdau (Abschnitt 3.10.3.) [227] eher unwahrscheinlich. Die begonnene Kristallisation der Telmisartan- gebundenen PPAR $\gamma$ - LBD wird diese Frage letztendlich klären.

Es wurde von einer Ähnlichkeit des Losartanmetaboliten EXP3179 mit Indomethazin berichtet [128], das zuvor als ein PPAR $\gamma$ - Ligand mit niedriger Affinität identifiziert worden war [238]. Die experimentelle Untersuchung der Losartanmetaboliten (Abschnitt 3.8.) zeigte einen beträchtlichen Unterschied hinsichtlich der Potenz der PPAR $\gamma$ - Aktivierung, obwohl der strukturelle Unterschied nur in der Oxidation einer Hydroxylgruppe zum Aldehyd bzw. zur Säure lag. Inwieweit diese funktionellen Gruppen direkt an einer Interaktion mit der PPAR $\gamma$ - LBD beteiligt sind, bleibt weiterhin offen.

Durch Vergleich der physikochemischen Eigenschaften zeigte sich eine Korrelation zwischen der PPAR $\gamma$ - Aktivierung und der Substanzlipophilie. AT<sub>1</sub>- Antagonisten

binden an membranständige  $AT_1$ - Rezeptoren, d.h. eine Penetration durch Zellmembranen ist für ihre Rezeptorblockade nicht erforderlich. Um jedoch an einen nukleären Transkriptionsfaktor zu binden, müssen Zell- und Kernmembran passiert werden. In Abbildung 4.1. sind die Substanzen nach Potenz (aus Abschnitt 3.5. und 3.8.) geordnet, und den kalkulierten logD Werten (log p bei pH 7.4), als Maß für der Lipophilie, gegenübergestellt.



**Abb. 4.1.: Korrelation zwischen Potenz der PPAR $\gamma$ - Aktivierung und der Substanzlipophilie**

Je lipophiler die Substanz, desto potenter wird PPAR $\gamma$  aktiviert, mit berechneten logD (logP bei pH7.4) Werten als Maß für die Lipophilie (EXP3174 keine Aktivität <50 $\mu$ M nach [165])

Nur lipophile Vertreter wie Telmisartan, EXP3179 und Irbesartan zeigten Effekte unterhalb einer Konzentration von 10 $\mu$ M im Zellmedium. Ein weiterer Punkt, der diese Beobachtung unterstützt, ist die Wirkung der  $AT_1$ - Antagonisten auf die PPAR $\gamma$ -LBD in GST- pull down und FRET- Experimenten, wobei ein direkter Angriff am Protein, ohne zuvor Membrane penetrieren zu müssen, stattfinden kann (Abschnitt 3.10.5.). Dabei wird DRIP205 durch Telmisartan und Irbesartan zwar wesentlich schwächer rekrutiert als durch Rosiglitazon, zwischen den  $AT_1$ -Antagonisten gibt es jedoch hinsichtlich der benötigten Konzentrationen kaum Unterschiede – im Vergleich einer ca. 10fach potenteren Wirkung von Telmisartan in zellbasierenden Experimenten.

Die strukturellen Unterschiede, die den stark ausgeprägten partiellen Agonismus bzw. die PPAR $\alpha$ - LBD aktivierende Wirkung von Telmisartan (Abschnitte 3.10.1./2.) erzeugen, müssen in zukünftigen Experimenten identifiziert werden.

#### 4.6. Telmisartan und Irbesartan sind selektive PPAR $\gamma$ -Modulatoren

Die selektive Modulation durch nukleäre Hormonrezeptoren basiert auf einer differentiellen Rekrutierung von Kofaktoren und der gewebsspezifischen Expression

dieser Kofaktoren [54]. Das Modell der selektiven Modulation wurde zuerst für die antiöstrogene Therapie des hormonabhängigen Mammakarzinoms etabliert [239].

Der Einsatz von antiöstrogenen Steroiden war mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden. Mit der Entwicklung von Tamoxifen gelang die Synthese einer Struktur, die im Brustgewebe als ein Östrogenantagonist, gleichzeitig hormonagonistisch in anderen Strukturen wirkte, d.h. protektive Effekte auf Knochendichte und Serumcholesterinspiegel hatte. Somit gelang die Trennung von erwünschten Wirkungen von bestimmten Nebenwirkungen der vollen Steroidantagonisten. Obwohl Tamoxifen noch andere Nebenwirkungen besitzt, ist der Nettoeffekt positiv, und es spielt auch heute noch eine wichtige Rolle bei der antiöstrogenen Therapie des Mammakarzinoms [240]. Ursache für diese selektive Wirkung ist die fehlende Wirkung von gebundenem 4-Hydroxytamoxifen auf die Anordnung der AF-2 Domäne des Östrogenrezeptors (ÖR)- $\alpha$  [241]. Diese fehlende Interaktion verhindert die Rekrutierung von Koaktivatoren wie TIF-2 an den 4-Hydroxytamoxifen besetzten ÖR- $\alpha$ . Die damit verbundene Veränderung der AF-2 Aktivierung führt zur Antagonisierung von Genen, die nur durch deren Aktivierung transkriptionell gesteuert werden, und es überwiegt die selektive Genaktivierung über die AF-1 Domäne des ÖR [240]. Außerdem ist die Aktivierung von Zielgenen stark von der Expression des Koaktivators SRC-1 abhängig [242], da dieser Koaktivator durch 4-Hydroxytamoxifen an den ÖR- $\alpha$  rekrutiert wird. Die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Genen ist mit einer hormonantagonistischen Wirkung in der Brust verbunden, nicht aber im Knochen. Tamoxifen wird wegen dieser Unterschiede zu den hormonellen Liganden als ein Selektiver ÖR-Modulator (SERM) bezeichnet. Das Modell der selektiven Aktivierung wird vermehrt auch auf andere nukleäre Rezeptoren, wie auf den Glukokortikoidrezeptor [243] und PPAR $\gamma$ , [37, 206] übertragen.

PPAR $\gamma$ -Liganden, wie FMOCL-Leucine, NC-2100 und MC-555 [84, 85, 87] werden entsprechend den SERMs als selektive PPAR $\gamma$ -Modulatoren (SPPARMs) bezeichnet. Sie zeigen Unterschiede in der Kofaktorrekutierung und induzieren eine submaximale PPAR $\gamma$ -Aktivierung im Vergleich zu den TZDs. Die selektive Rekrutierung von Kofaktoren (Abschnitt 3.10.5.) und die differentielle Genexpression (Abschnitt 3.11.) identifizieren auch Telmisartan und Irbesartan als SPPARMs.

Die Untersuchung der Rekrutierung von DRIP205 und TIF-2 (Abschnitt 3.10.5.) zeigte einen unterschiedlichen Einfluß der Liganden. Die selektive Rekrutierung von TIF-2 in den *in-vitro* Experimenten übersetzte sich funktionell in transkriptionelle Aktivität von



PPAR $\gamma$  in der Zelle (Abschnitt 3.10.6.). TIF-2 spielt eine wichtige Rolle in der PPAR $\gamma$ -vermittelten Aufnahme und Speicherung von Triglyzeriden und der Entstehung von Insulinresistenz, da TIF-2 (-/-)- Mäuse resistent gegenüber einer diätinduzierten Adipositas sind und eine erhöhte Insulinsensitivität aufweisen [187]. Somit könnte eine PPAR $\gamma$ - Aktivierung durch einen selektiven Liganden, die ohne die Rekrutierung von TIF-2 funktionell ist, positive metabolisch Effekte, wie die im knock- out- Modell beobachteten, besitzen.

Die Rekrutierung von Koaktivatoren an PPAR $\gamma$  führt zur Steigerung der transkriptionellen Aktivität und damit zu einer verstärkten Expression von Zielgenen [37, 150]. Eine Selektivität der Liganden bezüglich der Rekrutierung könnte direkt mit einer gezielten Änderung der Expression dieser Zielgene verbunden sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch die unterschiedliche Regulation der Zielgenpromotoren von aP2 und GyK durch Koaktivatoren bzw. Korepressoren [150], die in Abhängigkeit des Liganden an PPAR $\gamma$ - gebunden sind. Unterschiedlich regulierte Gene wie C/EBP alpha, EGR-1 und Resistin könnten die Konsequenz einer selektiven Rekrutierung von Kofaktoren sein, obwohl noch keine funktionellen PPREs in deren Promoter identifiziert wurden. Die von Benson und Kollegen berichtete selektive Herunterregulation von ACC2 durch Telmisartan im Muskel [165] unterstreicht dessen Charakterisierung als selektiver Modulator. Auch für andere SPPARMs, wie nTZDpa, wurde über die Induktion einer differentiellen Genexpression in Adipozyten berichtet [206]. In weitergehenden Experimenten soll die Bedeutung der Unterschiede einzelner Genregulationen und deren mechanistischen Grundlagen untersucht werden.

Die Unterschiede in der Insulin- stimulierten Aufnahme von Glukose in die Fettzelle durch die Liganden (Abschnitt 3.12.) könnte eine funktionelle Konsequenz dieser differentiellen Genregulation sein. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die in [244] beschriebene Erhöhung der Insulin- induzierten Aufnahme von Glukose in die Fettzelle durch Telmisartan und Pioglitazon kaum. Eine Ursache dafür könnte die Inkubation mit Telmisartan während des gesamten Differenzierungsvorgangs sein, und nicht, wie in dieser Arbeit, die Inkubation der reifen Adipozyten wie unter 2.2.6. beschrieben.

#### **4.7. Tierexperimente mit AT<sub>1</sub>- Antagonisten**

Eine 2001 veröffentlichte Arbeit beschrieb die Auswirkungen von Irbesartan (50 mg/kg pro Tag) auf die Insulinresistenz in adipösen Zucker- Ratten [245]. Es zeigte sich, dass

nach chronischer Applikation die Glukosewerte, nicht jedoch die Insulinwerte, sanken. Auch im Oralen Glukosetoleranztest (OGTT) zeigten sich erniedrigte Glukose- und Insulinwerte bei den Irbesartan- behandelten Tieren. Diese Effekte könnten über eine PPAR $\gamma$ - Aktivierung durch Irbesartan vermittelt sein, die Rolle der damals diskutierten AT $_1$ - Rezeptorblockade ist noch unklar. Eine Dosis von 25mg/kg pro Tag zeigte kaum Effekte auf metabolische Parameter bei diesen Tieren. Ein Vergleich der Wirkungen von Telmisartan und Losartan in einem diätinduziertem Rattenmodell der Adipositas zeigte, dass Telmisartan (5mg/kg pro Tag), nicht aber Losartan, die Glukose-, Insulin- und Triglyzeridspiegel senken konnten [165]. Im OGTT zeigte nur Telmisartan signifikante Effekte auf die Insulinspiegel. Interessanterweise nahmen die Telmisartan-behandelten Tiere, bei gleicher Futteraufnahme, weniger stark zu als die Tiere in den anderen Gruppen [165], was bereits für andere partielle Agonisten berichtet wurde [206]. Neueste Berichte zeigen die Einflüsse von Telmisartan auf die Fettgewebesmorphologie, d.h. die Umverteilung hin zu mehr kleineren-insulinsensitiveren Adipozyten in Ratten [246]. Dieser Effekt ist für TZDs bereits beschrieben und scheint ein Teil der *in-vivo* Wirkung auszumachen [247]. Wie alle diese Studien zeigten, besitzen Irbesartan und Telmisartan insulinsensitivierende Eigenschaften in verschiedenen Tiermodellen. Die metabolischen Wirkungen von Irbesartan scheinen nur bei hohen Dosen nachweisbar zu sein, was mit dessen geringerer Aktivierungspotenz korreliert (Abschnitte 3.5. und 3.6.)

In weitergehenden Arbeiten unserer Gruppe wird ein diätinduziertes Mausmodell der Adipositas und Insulinresistenz etabliert werden. Im Gegensatz zu der in [165] beschriebenen Studie, wird die Behandlung (Telmisartan, Pioglitazon und Eprosartan) erst in einem späteren Stadium, nämlich nach 3 monatiger Fütterung einer Hochfett-diät, erfolgen. Nach dieser Vorfütterung handelt es sich um adipöse und insulinresistente Mäuse. Untersucht werden die Einflüsse der Behandlung auf metabolische Parameter, Gewichtsentwicklung, Futteraufnahme und Genexpression in verschiedenen Fettdepots sowie in Leber und Muskel. Um die PPAR $\gamma$ - vermittelten Wirkungen von Telmisartan von dessen AT $_1$ - Rezeptorblockade zu unterscheiden, wird eine Kontrollgruppe mit dem nicht PPAR $\gamma$ - aktivierenden Eprosartan behandelt.

#### **4.8. Klinische Daten**

Verschiedene medikamentöse Interventionen sind in der Lage, die Entstehung oder Progression von Typ-II- Diabetes zu verhindern [135, 138, 248], so auch die

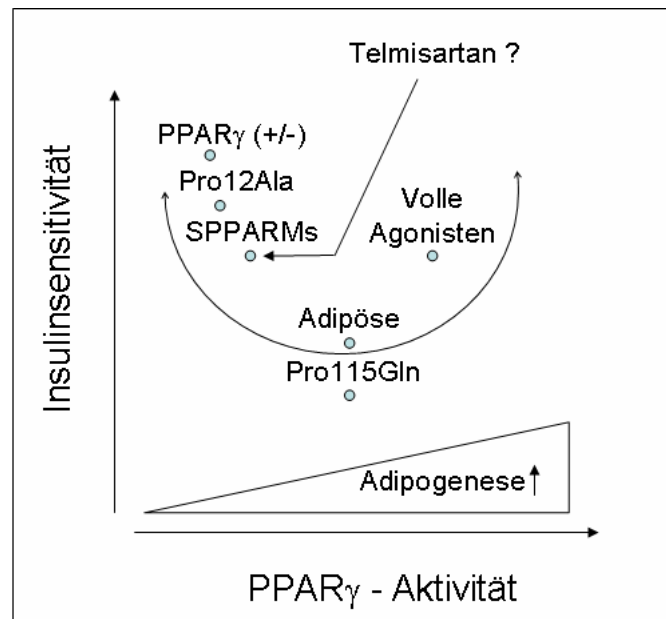
Applikation eines PPAR $\gamma$ - Agonisten [249, 250]. Wie einleitend beschrieben (Abschnitt 1.4.4.), senkten AT $_1$ - Antagonisten die Inzidenz von Typ-II- Diabetes in klinischen Endpunktstudien im Vergleich zu Plazebo oder anderer Standardhypertonie-medikationen. Welchen Beitrag dabei die PPAR $\gamma$ - Aktivierung spielt, ist noch unklar, da die Potenz der verwendeten AT $_1$ - Antagonisten bezüglich ihrer Wirkung auf PPAR $\gamma$  gering ist und somit fraglich ist, ob die erforderlichen Plasmaspiegel mit herkömmlichen Dosierungen der AT $_1$ - Antagonisten erreicht werden können. Interessant ist jedoch die potente PPAR $\gamma$ - Aktivierung des Losartanmetaboliten EXP3179 (Abschnitt 3.8.), was eine Erklärung für die Senkung der Diabeteserkrankungen in der LIFE- Studie trotz der schwachen Potenz von Losartan sein könnte [134]. Wegen seiner höheren Potenz werden mit Standarddosierungen von Telmisartan Plasmakonzentrationen bei Patienten erreicht, die für eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung ausreichen (1 bis 5 $\mu$ M) [117, 251]. Für Irbesartan wurde nach einer einmaligen peroralen Applikation von 50mg eine Maximalkonzentration von ca. 3  $\mu$ M bestimmt, was möglicherweise auch für eine PPAR $\gamma$ - Aktivierung ausreicht [252]. Klinische Studien, die die Wirkung von Telmisartan oder Eprosartan (als nicht PPAR $\gamma$ -aktivierender AT $_1$ -Antagonist) auf die Entstehung von Typ-II- Diabetes untersuchen, existieren bisher nicht bzw. sind noch nicht abgeschlossen [253].

In einer neueren Studie wurde die Wirkung von Telmisartan auf Patienten mit Typ-II-Diabetes mit Eprosartan verglichen [168]. Nur in der Telmisartan- behandelten Gruppe kam es zur Senkung der Gesamtcholesterin-, LDL- Cholesterin- und Triglyzeridspiegel. Keine Unterschiede wurden dagegen bei den Insulin- und Glukosespiegeln beobachtet [168]. Auch im Vergleich mit Nifedipin konnte Telmisartan in einer weiteren Studie das Lipidprofil signifikant verbessern [169]. Diese lipidsenkenden Eigenschaften von Telmisartan könnten über eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  vermittelt sein, da ähnliche Effekte auf die Lipidparameter für Pioglitazon und Rosiglitazon bekannt sind [170, 171]. Die Rolle der PPAR $\alpha$ - Aktivierung durch Telmisartan (Abschnitt 3.10.1.) muss in weiteren Experimenten auf eine Relevanz für die *in-vivo* Situation untersucht werden.

Ob Telmisartan bzw. Irbesartan einen signifikanten Einfluß auf die Insulin- und Glukosespiegel in Patienten mit Typ-II- Diabetes besitzen, ist derzeit noch unklar. Die Daten dazu beschränken sich auf einzelne Fallstudien [254] bzw. auf kleine Gruppen nicht- randomisierter Patienten [255]. Dosissteigerungen bzw. ein längerer Beobachtungszeitraum sind weitere Optionen, um die Effekte dieser AT $_1$ - Antagonisten auf metabolische Parameter aufzuzeigen.

#### 4.9. Anforderungen an einen modernen PPAR $\gamma$ - Liganden

Wie im Abschnitt 1.5.4. beschrieben, konnte mit Hilfe von transgenen Mausmodellen und durch die Identifizierung von humanen Punktmutationen beträchtliche Fortschritte im Verständnis der Funktion von PPAR $\gamma$  gemacht werden. Weitere Einblicke lieferten die Entwicklung und Untersuchung neuer Liganden. Volle Agonisten, wie die TZDs, verbessern die Insulinsensitivität, die Glukosetoleranz und das Lipidprofil in Patienten mit Typ-2- Diabetes. Die induzierte Zunahme an Fettgewebe ist eine unausweichliche Folge des starken Aktivierungsgrades von PPAR $\gamma$  durch TZDs, ähnlich wie bei der Pro115Gln Punktmutation beobachtet (vgl. Abschnitt 1.6.4.). Die langfristigen Auswirkungen dieser Gewichtszunahme auf die ohnehin meist übergewichtigen/ adipösen Patienten mit Typ-II- Diabetes ist noch unklar. Der Aktivierungsgrad von PPAR $\gamma$  ist nicht linear proportional mit der insulinsensitivierenden Wirkung, sondern scheint im unteren und oberen Bereich ein Maximum aufzuweisen. Trotz einer eher moderaten PPAR $\gamma$ - Aktivierung durch die SPPARMs zeigten diese Substanzen eine potente antidiabetische Wirkung im Tiermodell [85, 87, 206]. Für keinen der erwähnten Modulatoren existieren bisher Daten zur Wirkungen auf die metabolischen Parameter in Patienten mit Typ-II- Diabetes. Der ideale therapeutische Ansatz wäre die Verbesserung der Insulinsensitivität ohne eine Gewichtszunahme der Patienten zu induzieren. Die Ergebnisse von klinischen Studien werden zeigen, ob lipophile AT<sub>1</sub>- Antagonisten wie Telmisartan eine geeignete Alternative zur bisherigen Medikation bei Insulinresistenz darstellen. In Abbildung 4.2. ist die derzeitige Hypothese von Insulinsensitivität und PPAR $\gamma$ - Aktivierung mit verschiedenen genetischen und pharmakologischen Fixpunkten belegt.



**Abb. 4.2.: Hypothetische Rolle der PPAR $\gamma$ - Aktivierung in der Glukosehomöostase**

PPAR $\gamma$  heterozygote Mäuse (PPAR $\gamma$  +/-) und humane Träger der Pro12Ala Punktmutation haben erhöhte Insulinsensitivität, wogegen Adipöse und Träger der Pro115Gln Punktmutation insulinresistent sind. Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch volle Agonisten erhöht die Insulinsensitivität, aber Fettmasse und Körpergewicht nehmen zu. Im Gegensatz dazu haben SPPARMs wie FMOC-L-Leu potente antidiabetische Wirkungen, ohne eine starke Adipogenese und Fettvermehrung wie die TZDs zu bewirken. Telmisartan könnte sich in die insulinsensitivierenden Bereich mit einer moderaten Aktivierung von PPAR $\gamma$  einordnen. (adaptiert aus [13])

Neben diesen modulierenden Eigenschaften auf die PPAR $\gamma$ - Aktivität, sollten neue Liganden ein günstigeres Nebenwirkungsprofil als klassische TZDs besitzen (vgl. Abschnitt 1.3.8.). Die Nebenwirkungen der AT $_1$ -Antagonisten sind in den meisten Studien kaum stärker ausgeprägt als unter Plazebobehandlung [117].

#### **4.10. Metabolische Effekte der AT $_1$ - Antagonisten: ein Ausblick**

Verschiedene klinische Studien zur genauen Untersuchung der metabolischen Effekte der AT $_1$ -Antagonisten sind in Planung bzw. bereits in frühen Phasen [138, 253]. Ein möglicher präventiver Effekt auf die Entstehung von Insulinresistenz und damit auch Typ-II- Diabetes stehen dabei im Vordergrund. Ausserdem würde die Behandlung von mehreren Erkrankungen des metabolischen Syndroms mit nur einer Substanz eine Reduktion der Anzahl von Medikamenten und damit einer verringerten Wahrscheinlichkeit von Neben- und Wechselwirkungen einhergehen. Beides würde die Compliance dieser Substanzen beim Patienten steigern

Neben dem potentiellen Gebrauch bestimmter AT<sub>1</sub>-Antagonisten für die Prävention und Behandlung des Typ-II- Diabetes und des metabolischen Syndroms hat die Entdeckung der PPAR $\gamma$ - aktivierenden Eigenschaften dieser Substanzen eine Reihe von Implikationen für die Entwicklung einer neuen Generation von Substanzen. Krankheiten, die eine dysregulierte Aktivität des RAS und von PPAR $\gamma$  einschließen, wären für eine Anwendung dieser Substanzen prädestiniert. Die für die AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade beschriebene Inhibierung der renalen Na<sup>+</sup>-Retention könnte als Grundlage für die Entwicklung neuer PPAR $\gamma$ - Modulatoren ohne Nebenwirkungen wie Flüssigkeitsretention, periphere Ödeme, und Herzinsuffizienz wie beim Einsatz von TZDs dienen. Es handelt sich deshalb bei den derzeit erhältlichen AT<sub>1</sub>- Antagonisten zumindest um Leitstrukturen, aus denen neue Substanzen mit potenten PPAR $\gamma$ -modulierenden Eigenschaften entwickelt werden können.