

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

DISSERTATION

Aortales Remodeling bei Diät-induzierter Adipositas und  
mögliche pharmakologische Interventionen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friedrich Krüger

aus Karlsburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Th. Unger  
2. Prof. Dr. med. J. Scholze  
3. Prof. Dr. med. N. Marx

Datum der Promotion: 29.01.2010

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau der arteriellen Gefäßwand.....	1
1.1.1 Vasculäres <i>Remodeling</i> .....	3
1.2 Extrazelluläre Matrix.....	5
1.3 Proteolytische Aktivität .....	6
1.3.1 Matrix-Metalloproteinasen .....	6
1.3.2 TIMPs.....	9
1.3.3 Cathepsine .....	10
1.4 Physiologie des Fettgewebes.....	11
1.4.1 Pathologie des Fettgewebes: Adipositas.....	12
1.4.2 Tumor Nekrose Faktor-alpha in der adipozytären Biologie .....	14
1.4.3 PVAT: Auswirkungen der Adipositas auf das Gefäßsystem.....	15
1.5 Renin-Angiotensin-System.....	16
1.5.1 AT-1-Antagonisten: Telmisartan.....	18
1.6 Hypothese und Zielsetzung.....	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material .....	21
2.1.1 Chemikalien und Substanzen.....	21
2.1.2 Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur.....	21
2.1.3 Kits .....	22
2.1.4 Nukleinsäureanalytik, Primer.....	22
2.1.5 Antikörper .....	23
2.1.6 Versuchstiere und Zelllinien .....	24
2.1.7 Puffer und Lösungen .....	24
2.1.8 Ausgewählte Geräte und Zusatzmaterialien.....	26
2.2 Methoden .....	28
2.2.1 Tiere .....	28

---

2.2.1.1	Glukose- und Insulintoleranztest .....	28
2.2.1.2	Blutdruckmessung .....	29
2.2.1.3	Sonographie der Aorta .....	29
2.2.1.4	Präparation.....	29
2.3	Zellkultur.....	30
2.4	Protein- und RNA-Extraktion .....	31
2.4.1	Konzentrationsbestimmung.....	32
2.5	Gelelektrophorese und Western Blot.....	32
2.5.1	Durchführung.....	32
2.5.2	Präparation der Polyacrylamidgele.....	33
2.5.3	SDS-Page: Gelelektrophorese .....	34
2.5.4	Western-Blot.....	34
2.5.5	Immunreaktion.....	35
2.5.6	Entwicklung .....	35
2.6	<i>Real-time RT PCR</i> .....	35
2.6.1	Reverse Transkription .....	38
2.7	Histologie .....	38
2.7.1	Paraffinschnitte.....	38
2.7.2	Weigert-Färbung .....	39
2.7.3	Immunohistochemie .....	40
2.8	Statistische Berechnungen.....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1	Metabolische Ergebnisse .....	42
3.2	Einfluss der HFD auf die strukturelle Integrität der Aorta .....	43
3.2.1	Aortales <i>outward Remodeling</i> nach HFD .....	43
3.2.2	Strukturelle Degeneration nach HFD.....	44
3.2.3	PVAT und HFD.....	48
3.3	Proteasen-Aktivität in der Aorta nach HFD.....	49
3.3.1	Matrix-Metalloproteinasen .....	49
3.3.1.1	Gelatinasen .....	49
3.3.1.2	MMP-3 und MMP-12 .....	51
3.3.2	Tissue inhibitors of metalloproteinases .....	52

---

3.3.3	Cathepsine .....	54
3.4	Zytokine.....	56
3.5	Proteolytische und proinflammatorisch Aktivität des peri- vaskulären Fettgewebes – Quelle für Proteasen und Zytokine .....	58
3.5.1	TNF-alpha-Stimulation in 3T3-L1-Prädipozyten .....	59
3.5.2	Cathepsine in 3T3-L1-Zellen .....	59
3.5.3	MMPs in 3T3-L1-Zellen .....	61
3.6	Stimulation von VSMCs.....	63
3.7	Telmisartan-Effekte im HFD-Mausmodell.....	65
3.7.1	Sonographischer Nachweis aortaler Dilatation nach HFD.....	65
3.7.2	Telmisartan mindert dilatative Effekte der HFD .....	66
3.7.3	Blutdruck-Effekte von Telmisartan und HFD .....	68
3.7.4	Strukturelle Histologie nach Telmisartan-Behandlung.....	68
3.7.5	Separation von Media und Adventitia mit PVAT.....	72
3.7.5.1	TNF-alpha-Expression nach Telmisartan-Behandlung.....	72
3.7.5.2	CD68-Expression nach Telmisartan-Behandlung.....	73
3.7.5.3	Expression der Gelatinasen nach Telmisartan-Behandlung.....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
4.1	Auswahl des Tiermodells .....	76
4.2	Auswahl des Zellkulturmodells .....	77
4.2.1	Anpassung des Zellkulturmodells: TNF-alpha, PVAT und Media .....	78
4.3	HFD verursacht <i>outward Remodeling</i> der Aorta.....	79
4.3.1	Grundlage des <i>outward Remodelings</i> ist eine erhöhte proteolytische Aktivität: Auswahl der Proteasen.....	80
4.3.2	HFD ist assoziiert mit einem proinflammatorischen Status in Gefäßwand und PVAT.....	82
4.4	TNF-alpha-Aktivierung von Prädipozyten induziert Proteolyse im Fettgewebe.....	84
4.4.1	TNF-alpha-aktivierte Adipozyten triggern proteolytische Aktivität in VSMCs.....	85
4.5	AT-1-Rezeptor Blockade .....	87
4.5.1	AT-1-Rezeptor-Blockade reduziert <i>outward Remodeling</i> .....	88

4.5.2	AT-1-Rezeptor-Blockade reduziert HFD-assoziierte pro-inflammatorische und proteolytische Aktivität in Media und PVAT .....	90
4.5.3	Telmisartan hemmt die proteolytische Aktivierung in Adipozyten nach TNF-alpha –Stimulation .....	91
4.5.4	Potentielle Signalwege der Telmisartanwirkung .....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
	Danksagung .....	108
	Eidesstattliche Erklärung .....	109
	Lebenslauf.....	110

## Abkürzungsverzeichnis

18s	18s Untereinheit mitochondrialer mRNA
AA	Aorta abdominalis
AAA	abdominelles Aortenaneurysma
ADRF	Adipocyte derived relaxing factor
Ak	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
AS	Aminosäure
AT-1	Angiotensin Typ 1-Rezeptor
ARB	Angiotensin Typ 1-Rezeptor Blocker
BMI	Body Mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]
CRP	C-reaktives Protein
DEPP	Decidual Protein induced by Progesterone
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECM	Extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTT	Glukosetoleranztest
GluT-4	Glukose-Transporter Subtyp 4
HFD	Hoch-Fett-Diät
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-1 $\beta$	Interleukin-1beta
ITT	Insulintoleranztest
IRS-1	Insulin Receptor Substrate
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MetS	Metabolisches Syndrom
MHC II	Major Histocompatibility Complex Class II
MMP	Matrixmetalloproteinase
Pio	Pioglitazon

PPAR $\gamma$	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor gamma
PVAT	Perivaskuläres Fettgewebe (Perivascular Adipose Tissue)
RAS	Renin-Angiotensin-System
<i>rt RT</i> PCR	real-time Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
RT	Raumtemperatur
SD	Standard-Diät
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMA	Smooth-Muscle Antigen
SNP	Sodium-Nitroprussid
Telmi	Telmisartan
TIMP	Gewebshemmer der MMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TZD	Thiazolidindione
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen (Vascular Smooth Muscle Cells)

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der arteriellen Gefäßwand

Die Arterienwand ist ein dynamisches, heterogen geschichtetes System. Sie setzt sich aus Endothelzellen (EC), glatten Muskelzellen (VSMC), Fibroblasten und unterschiedlichen Funktionszellen zusammen, die zu einem Komplexsystem über autokrine Interaktionen verbunden sind. Anatomisch-histologisch ist die Arterienwand in drei Schichten (Abbildung 1-1) unterteilt <sup>1</sup>:

Die Intima wird durch eine einzelne Schicht aus polygonalen ECs gebildet, die unter der endothelialen Basalmembran die Wand zum Lumen hin abgrenzen.

Die Media bildet den muskulären und elastischen Teil der Gefäßwand. Speziell die aortale Media besteht zum Großteil aus elastischen Fasern, die sich konzentrisch um das Lumen anordnen. In peripheren Versorgungs- und Widerstandsgefäße hingegen weist die Tunica media einen hohen Anteil an VSMCs auf. Die lamelläre Einheit der Media wird von einer elastischen Lamelle und der angrenzenden intralamellären Zone gebildet und entspricht der funktionellen Basis. Die elastischen Lamellen stehen untereinander über zarte Fasern in Verbindung. Über lamina elastica interna und externa grenzt sich die Media von Intima und Adventitia ab. Die glatten Muskelzellen verlaufen spiralg und inserieren in den elastischen Lamellen. Weitere mechanische Stabilität erhält die Gefäßwand über intermediäre Kollagenfasern. Die Organisation der einzelnen Elemente erfolgt in der Extrazellulären Matrix (ECM). Das elastisch-muskuläre System ist verantwortlich für die Elastizität und Zugfestigkeit der Aorta.

Die Adventitia als äußerste Schicht grenzt die Gefäßwand von der Umgebung ab. Hauptzelltyp sind die Fibroblasten. Des Weiteren enthält sie auch terminale Nervenendigungen sowie Bindegewebsstrukturen mit Gewebsmakrophagen. Die Adventitia ist von kleinen Blut- und Lymphgefäße (*vasa vasorum*) durchsetzt. Sie wirkt modulatorisch zwischen Gefäßwand und umliegendem Bindegewebe. An die Adventitia grenzt das perivaskuläre Fettgewebe (PVAT) an, welches das Gefäß einbettet <sup>1,2</sup>.

Alle drei Schichten tragen über spezifische Funktionen zur vaskulären Homöostase bei und reagieren auf äußere Veränderungen. Die Endothelzellen der Intima regulieren Vasotonus und Blutgerinnung, kontrollieren Austauschvorgänge und haben

antithrombogene Funktionen<sup>3</sup>.

Die Media ist verantwortlich für den Vasotonus, der durch Faktoren moduliert wird, die in Endothel und Adventitia synthetisiert werden<sup>4</sup>.

Die Adventitia bildet ein weiteres biologisches Prozesszentrum für Schlüsselregulatoren vaskulärer Funktion und Struktur. Adventitielle Fibroblasten proliferieren als Antwort auf Verletzungen oder Stress. Des Weiteren sind sie befähigt sich zu Myofibroblasten zu differenzieren und in andere Schichten der Gefäßwand zu migrieren, sie beeinflussen die ECM, sie synthetisieren und sezernieren Moleküle mit weiten parakrinen Effekten und sie exprimieren Rezeptoren, die die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten und Progenitor-Zellen stimulieren<sup>5</sup>.

Die Gefäßwand als mehrschichtiges System ist ein hochdifferenzierter, stoffwechselaktiver Regulator - fähig Mikromilieuänderungen zu registrieren und adäquate Reaktionen zu initiieren. Über die lokale Produktion von Mediatoren erfolgt eine kontinuierliche strukturelle und funktionelle vaskuläre Modulation.

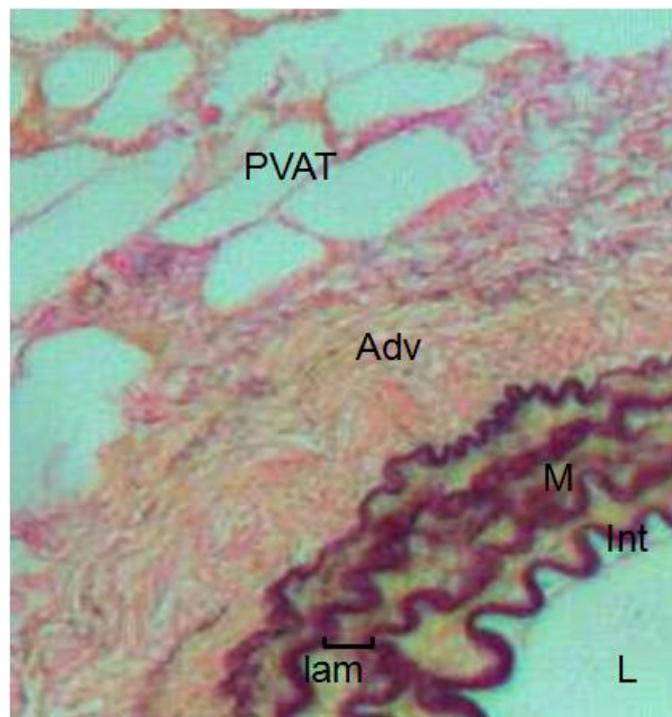


Abbildung 1-1: **Aufbau der Arterienwand.**

Ausschnitt aus einem Querschnitt der Aorta abdominalis der Maus. Färbung: Weigert-Sirius-Red, 40x Vergrößerung. PVAT – perivaskuläres Fettgewebe, Adv – Adventitia, M – Media, lam – lamelläre Einheit (markiert durch Klammer), Int – Intima, L – Lumen.

### 1.1.1 Vaskuläres *Remodeling*

Die Gefäßwand ist ein aktives Organ: zur Adaptation an veränderte intra- sowie extraluminale Bedingungen ist ein ständiger Umbau innerhalb der Wand (*Remodeling*) notwendig. Diese Umbauvorgänge finden in der Extrazellulären Matrix (ECM) statt.

Vaskuläres *Remodeling* ist ein dynamischer Prozess struktureller Veränderungen. Streng reguliert, ist der physiologische Vorgang in eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse, wie Gefäßwachstum, Angiogenese, Wundheilung, nach Training oder in der Schwangerschaft eingeschaltet. Aber auch pathologische Veränderungen wie Hypertension, ischämische Erkrankungen, Aneurysmen und Tumorwachstum sind entscheidend durch erhöhtes *Remodeling* charakterisiert. *Remodeling* ist die Interaktion von lokalen Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Substanzen und hämodynamischen Stimuli. Ein geordnetes *Remodeling* ist absolute Voraussetzung für die Wahrung des sensiblen Verhältnisses zwischen Elastizität und Stabilität der Gefäßwand. Pathologien entwickeln sich aus einer Dysregulation dieser Umbauvorgänge<sup>6</sup>.

Vaskuläres *Remodeling* betrifft primär die Media des Gefäßes. Diese Schicht ist konstituiert aus lamellären Einheiten, bestehend aus einer elastischen Lamelle mit einem umgebenden Ring glatter Muskulatur und bildet so die strukturelle und funktionelle Basis des arteriellen Systems. Elastizität und Stabilität werden durch die Komponenten der Media vermittelt und sind betroffen bei Veränderungen in diesem System. Neben dem physiologischen *Remodeling* werden unterschiedliche Formen pathologischen *Remodelings* unterschieden. Folge all dieser Formen ist eine Verschiebung der Ratio von Wanddicke und Lumen-Diameter. Eine mögliche Veränderung ist die Zunahme der Wanddicke als Antwort auf erhöhten Druck im Gefäß (*inward Remodeling*). Dies kann durch Erhöhung der Muskelmasse erfolgen oder aber durch ein *Remodeling* anderer zellulärer und nicht-zellulärer Bestandteile der Gefäßwand. Folge dieser Veränderungen ist eine Erhöhung der vaskulären Reagibilität sowie des peripheren Gefäßwiderstands. Eine zweite Form ist das *outward Remodeling*. Die Veränderungen betreffen hierbei vornehmlich die Dimension des Gefäßlumens. Eine Restrukturierung zellulärer und nicht-zellulärer Bestandteile der Gefäßwand kann unter pathologischen Bedingungen mit Zellverlust und dysregulierter Proteolyse der arteriellen Matrix einhergehen. Als Resultat verminderter struktureller Integrität dilatiert die Gefäßwand<sup>7,8</sup>.

Das *inward Remodeling* beschreibt eine vaskuläre Mediahypertrophie bei konstantem

Lumen und repräsentiert hypertensive Veränderungen der kleinen Arterien und Arteriolen. Ein *outward Remodeling* hingegen findet sich vor allem in den großen Arterien und hier speziell bei aneurysmatischer Degeneration<sup>9</sup>.

Ein Gefäß-*Remodeling* bewirkt andauernde strukturelle Veränderungen des vaskulären Phänotyps - unter anderem als Antwort auf chronische hämodynamische Stimuli. Wesentlicher Bestandteil dieser Veränderungen ist die Degradation der ECM. Ein struktureller Wandel innerhalb der Matrix ist grundlegend für vaskuläres *Remodeling*. Auf molekularer Ebene ereignen sich sehr früh destruktive Veränderungen im konnektiven Gewebe. Im Rahmen dieser extrazellulären Reorganisation werden die VSMCs befähigt zu proliferieren und zu wandern. Weiterhin wird die Infiltration inflammatorischer Zellen ermöglicht sowie die proteolytische Aktivität weiter erhöht und degenerative Prozesse beschleunigt<sup>10</sup>. Dramatischer Endpunkt proteolytischen, inflammatorischen und degenerativen *outward Remodelings* in der Aorta abdominalis kann - als Resultat eines progressiven Missverhältnisses zwischen biomechanischen und biologischen Faktoren - die Ausbildung eines Aneurysmas sein<sup>11</sup>. Es werden zwei Wege in der Genese aneurysmatischer Veränderungen unterschieden. Voraussetzung für das arteriosklerotische Aneurysma sind arteriosklerotische Veränderungen der Intima. Die zweite Form ist das inflammatorische Aneurysma, welches definitionsgemäß ohne arteriosklerotische Plaques entsteht. Die für das inflammatorische Aneurysma pathognomischen Faktoren besitzen auch für das *outward Remodeling* Gültigkeit. Es wurden vier vaskuläre, für den pathologischen *Remodeling*-Vorgang entscheidende Faktoren erkannt<sup>12</sup>:

1. Chronische Entzündung in der äußeren Aortenwand, einhergehend mit Neovaskularisation und erhöhter Produktion proinflammatorischer Zytokine.
2. Exzessive, dysregulierte lokale Produktion von Matrix-abbauenden Proteasen.
3. Progressive Zerstörung der strukturellen Matrix-Proteine, im besonderem Elastin und Kollagen mit nachfolgender Schwächung und Dilatation der Aortenwand.
4. Erhöhung der Apoptoserate mit sukzessivem Verlust der glatten Muskulatur in der Media.

Die Integrität der Wandstrukturen ist absolute Voraussetzung für die physiologische Gefäßfunktion. Durch die Dysregulation des *Remodeling*-Systems kommt es zum sukzessiven Verlust dieser Integrität.

Ein frühes Anzeichen des *outward Remodeling* ist das Einwandern inflammatorischer Zellen in Media und Adventitia. Verantwortlich für diesen Prozess sind Faktoren wie

lokale Gewebshypoxie<sup>13</sup>, oxidativer Stress<sup>14</sup>, Prostaglandine<sup>15</sup> und Leukotriene<sup>16</sup> sowie mikrobielle Infektionen mit einer assoziierten Erhöhung spezifischer Zytokine und Chemokine als immunologische Antwort auf die Degradation von Elastin<sup>17-19</sup>.

Die Infiltration inflammatorischer Zellen wird also durch die *Remodeling*-Prozesse in der Matrix ausgelöst und bedingt selbst wiederum weitere Abbauvorgänge in der Matrix. In dieser Schleife aus Inflammation und Proteolyse vollzieht sich schrittweise über strukturelle Veränderungen konnektiver Wandbestandteile in der extrazellulären Matrix ein phänotypischer Wandel des Gefäßes.

## 1.2 Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) ist eine dynamische Umgebung für alle Zellen mit essentieller Bedeutung für den geordneten Ablauf zelluläre Funktion. Die ECM formt die Gewebsarchitektur über die Sequestrierung von Gewebswasser durch Bindung an Proteine und die Organisation einzelner Zellen zu Verbänden. Doch erschöpft sich ihre Funktion nicht in der bloßen Schaffung einer strukturellen Umgebung für die Zellen: die ECM ist elementar für das Wachstum, die Differenzierung sowie die Zellmigration. Weiterhin interagieren Zellen mit der ECM über zahlreiche Rezeptoren. Somit beeinflusst die Matrix zelluläre Entwicklung und vermittelt Reaktionen auf extrazelluläre Stimuli<sup>20, 21</sup>.

Die ECM besteht vorwiegend aus fibrillären Proteinen (Kollagen, Elastin, Laminin), strukturellen Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen. Doch gibt es deutliche Unterschiede in der spezifischen Zusammensetzung zwischen den verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Organs.

Die arterielle Matrix enthält einen besonders großen Anteil an Elastin, das von den VSMC produziert und in die ECM sezerniert wird. Elastin macht bis zu 50 Prozent des Trockengewichtes der Aorta aus<sup>6</sup>. Ein weiterer wichtiger stabilitätsbildender extrazellulärer Bestandteil der Media ist polymeres Kollagen. Extrazelluläres Elastin und Kollagen sind Angriffspunkte der sensibel regulierten proteolytischer Aktivität.

Signale der ECM regulieren Gefäßwachstum und -formation sowohl während Entwicklung und Wachstum als auch unter pathologischen Bedingungen: sie sorgen für die Balance zwischen Gefäßaufbau und vaskulärer Degradation. Weiterhin sind

Bestandteile der ECM verantwortlich für die Chemotaxis und Migration externer Zellen. Geordnete Abläufe sind bedeutend für die Stabilität des vaskulären Systems<sup>22</sup>.

Strukturelle Veränderungen innerhalb der ECM werden in jedem Organ durch Proteolyse und morphogenetische Restitution vermittelt. Der regulierten proteolytischen Aktivität kommt die entscheidende Bedeutung in diesem System zwischen physiologischer Anpassung und pathologisch dysregulierter Degradation zu.

### **1.3 Proteolytische Aktivität**

Integrität und Stabilität der ECM sind durch das Strukturgerüst fibrillärer Proteine gewährleistet. Dieses Gerüst unterliegt einem ständigem Auf- und Abbau.

Strenge Regulationsmechanismen steuern die Abbauvorgänge. Das proteolytische System setzt sich aus zahlreichen unterschiedlichen Enzymen und deren Gegenspielern zusammen. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), deren spezifischen Konterparts die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs) sowie die Cathepsin-Familie<sup>23</sup>.

Dysregulationen der proteolytischen Aktivität führen zu einer strukturellen Schwächung wesentlicher Bestandteile der ECM mit weitreichenden Folgen für die nachgeordneten Strukturen.

#### **1.3.1 Matrix-Metalloproteinasen**

Matrix-Metalloproteinasen spielen eine entscheidende Rolle beim Abbau von konnektiven Proteinen und extrazellulären Makromolekülen. Sie werden von Mesenchymzellen, Monozyten, Makrophagen und Tumorzellen als Zymogen synthetisiert und auf verschiedene Stimuli hin aktiviert. Als stark regulierte Enzyme stehen sie unter strenger Kontrolle mit sehr geringer basaler Konzentration. Erst bei aktiven *Remodeling*-Vorgängen innerhalb der ECM kommt es zu einem drastischen Anstieg der MMP-Konzentration. Über ihren regulatorischen Eingriff in die Homöostase der ECM entfalten die MMPs ein weites Wirkungsspektrum: Zellwachstum, -differenzierung, -beweglichkeit, Apoptose, Angiogenese, sowie die Modulation von

Immunität und Chemokinaktivität werden funktionell von MMPs beeinflusst<sup>24</sup>.

Die MMPs gehören der Familie der Endopeptidasen an. Sie sind charakterisiert durch die Bindung von Zink-Ionen an ihrer aktiven Seite, Calcium-Abhängigkeit und die Interaktion mit spezifischen Inhibitoren (TIMPs). Es sind aktuell 26 Unterarten der MMPs bekannt, von denen 23 im Menschen nachgewiesen werden konnten. Diese MMPs sind alle - obgleich strukturell homolog - Produkt unterschiedlicher Gene. Unterschieden werden vier Hauptklassen: Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13 und MMP-18), Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-19 und MMP-20) und MMPs vom Membran Typ (MMP-14, MMP-15, MMP-16 und MMP-17)<sup>25 26</sup>.

Die Klasseneinteilung erfolgte auf Basis der jeweils bevorzugten Substrate. Jedoch gibt es deutliche Überschneidungen innerhalb der Aktivitäten zwischen den einzelnen Klassen, so dass einzelne MMPs die Funktionen anderer übernehmen können.

Die unterschiedlichen MMP-Klassen setzen sich aus einer konservierten Grundstruktur zusammen (Abb. 1-2): einem Signalpeptid, der Propeptidomäne, der katalytischen Domäne, der flexiblen Gelenkregion (*hinge*) sowie bei der Mehrheit einer C-terminalen Hämapexin-ähnlichen Domäne.

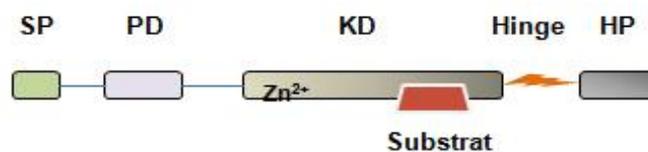


Abbildung 1-2: **Schematischer Aufbau der unterschiedlichen MMPs.**

Dargestellt ist die minimale MMP-Struktur mit Hämapexin-Komplex. SP: Signalpeptid, PD: Propeptidomäne, KD: Katalytische Domäne, HP: Hämapexin (nach Rafetto *et al.*<sup>25</sup>)

Die Propeptidomäne enthält ein hochkonserviertes Cystein-Motiv (PRCGXPD), welches die Thiol-Gruppe enthält, die als vierter, inaktivierender Ligand des katalytischen Zinkatoms fungiert und so für die Erhaltung der latenten Zymogenform notwendig ist. Erst der „*cysteine switch*“, die proteolytische Zerstörung des Cystein-Zink-Motivs durch Ersatz der Thiolgruppe durch Wassermoleküle, führt zur Hydrolyse des Propeptids und zur Aktivierung der MMP<sup>27</sup>.

Die katalytische Domäne enthält eine zinkbindende Aminosäuresequenz bestehend

aus 3 Histidin-Molekülen (HEXGHXXGXXH). Die Hämopexin-ähnliche C-terminale Domäne ist Bindungsstelle für die spezifischen Inhibitoren und in die Substratspezifität involviert<sup>28</sup>.

Die Aktivierung der MMPs erfolgt durch Abspaltung der Propeptiddomäne vom inaktiven Zymogen. Hierzu sind andere aktivierte MMPs oder Mitglieder anderer Proteasen-Familien notwendig. Ebenso vermögen Biomoleküle, die die Cystein-Zink-Interaktion stören (reaktive Oxygene, oxidiertes Gluthation, SDS) sowie Hitze und niedrige pH-Werte MMPs zu aktivieren<sup>29, 30</sup>.

MMPs werden in einer Vielzahl von Zellen, einschließlich Makrophagen, Adipozyten oder VSMCs produziert. Sie werden entweder sezerniert oder in der Plasmamembran, über Glykosaminoglykane verankert, an der Zelloberfläche gebunden.

Die Fähigkeit bestimmter MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12) Elastin zu hydrolysieren ist von großer Bedeutung für die arterielle Gefäßwand. *Remodeling*-Vorgänge im kardiovaskulären System sind essentiell für langfristige Adaption an veränderte Bedingungen, sowie Regenerations- und Reparaturprozesse<sup>10, 31</sup>. MMPs vermitteln in diesen Prozessen den Umbau der ECM. Besonders betroffen ist hierbei die elastin- und kollagenreiche *lamina media* der arteriellen Gefäße. Weitere Effekte der MMPs auf Endothel- und Muskelzellen der Gefäßwand sind ebenfalls beschrieben<sup>32</sup>. Eine unbalancierte Steigerung der MMP-Expression in der Gefäßwand führt zu einer erhöhten *Remodeling*-Rate und somit zu einem Verlust elastischer Funktionen und aortaler Dilatation im Sinne eines *outward Remodelings*<sup>33</sup>. MMPs haben weitreichende Bedeutung für die Entwicklung unterschiedlicher Pathologien in der Gefäßwand. Sie sind wesentlich beteiligt an der Entstehung aneurysmatischer Malformationen<sup>16</sup>, der Destabilisierung arteriosklerotischer Plaques<sup>34</sup>, Varikosis<sup>35</sup> sowie auch an angiogenetischen Prozessen<sup>36</sup>. Jedoch nicht nur im Gefäßsystem haben die MMPs eine herausragende Bedeutung: Umbauvorgänge in der ECM sind allgegenwärtige Prozesse und elementar für Wachstum und Entwicklung aller Gewebe. So ist beispielsweise das Fettgewebe ein Ort aktiver Umbauprozesse, die durch MMPs vermittelt werden<sup>37, 38</sup>. Besondere Anforderungen an die MMP-vermittelte Dynamik der ECM stellt auch das adipozytäre Mikromilieu wachsender Fettdepots im Rahmen der Adipositas. Die Adipogenese geht einher mit einer stark erhöhten *Remodeling*-Rate in der ECM sowie vielfältigen dynamischen Zell-Matrix-Interaktionen<sup>39</sup>. Weiterhin konnte für MMP-2 eine Assoziation des Expressionsgrades mit dem Alter nachgewiesen werden<sup>40</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität der MMPs streng reguliert. Auf Transkriptionsebene erfolgt die Induktion der Genexpression durch Zytokine, Interferone und Wachstumsfaktoren<sup>41</sup>. Posttranskriptional kann die Stabilität der mRNA über Wachstumsfaktoren reguliert werden. Posttranslational als inaktive Pro-Fomen sezerniert, sind weitere proteolytische Aktivierungsschritte notwendig („*cysteine switch*“). Plasmin gilt als ein solcher proteolytischer Aktivator. Aber auch aktivierte MMPs selbst können eine Aktivierung anderer MMP-Zymogen bewirken<sup>42</sup>. Schließlich wird ihre Wirkung zusätzlich durch spezifische Gegenspieler (TIMPs) balanciert. Erst ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs bewirkt eine Dysregulation der proteolytischen Aktivität und führt somit zu pathologischen Veränderungen innerhalb der ECM.

Die balancierte Aktivität der MMPs reguliert die Umbauprozesse in der ECM. Ein Ungleichgewicht führt zu pathologischen *Remodeling*-Prozessen.

### 1.3.2 TIMPs

Die Aktivität der MMPs wird auf Ebene der Genexpression, der Zymogen-Aktivierung und über spezifische Hemmung aktiver Enzyme reguliert.

TIMPs sind diese spezifischen Gegenspieler der MMPs und wesentlich beteiligt an einem geordneten Ablauf von Matrixdestruktion und –neufornation. Sie modulieren die Proteolyse der ECM durch direkten Einfluss auf die Proteinasen über die Blockierung aktiver MMPs wie aber auch der Aktivierung der Prometalloproteinasen. Ein Ungleichgewicht im Zusammenspiel zwischen beiden Gruppen führt zu einer Dysregulation der Matrixorganisation und ist die Voraussetzung für zahlreiche Pathologien. Neben ihrer Funktion als direkte MMP-Gegenspieler haben die TIMPs anti-angiogene Eigenschaften, fördern das Zellwachstum und stimulieren die Steroidsynthese<sup>43</sup>.

Bislang sind vier spezifische Inhibitoren charakterisiert (TIMP-1, -2, -3, und -4). Die vier TIMPs haben elementare Ähnlichkeiten und ein Molekulargewicht von etwa 21 kDa. Sie bestehen aus zwei funktionell und strukturell unterschiedlichen Domänen: Die N-terminale Domäne (125 AS) allein ist ein effektiver Inhibitor für alle MMPs. An der C-terminalen Domäne (65 AS) finden sich zwei separate Enzymbindungsstellen für die

Hämopexin-Domänen der Proformen von MMP-2 und MMP-9. Die reversible Bindung an der C-terminalen Domäne erhöht die Aktivität des TIMP-Komplexes<sup>42, 44</sup>.

MMPs und TIMPs bilden eine hochaffine, nicht-kovalente, reversible Komplexbindung. Die Anlagerung des entsprechenden TIMPs erfolgt entlang der kompletten aktiven Seite der katalytischen Domäne des MMPs. Über eine Chelatbindung wird das an das katalytische Zink gebundene Wassermolekül komplexiert<sup>45</sup>.

Die unterschiedlichen TIMPs hemmen sämtliche MMPs. Auch die TIMPs unterliegen einer strengen Regulation. Diese erfolgt vor allem über Zytokine. Eine besondere Rolle kommt hierbei TNF- $\alpha$  zu. Die Regulation erfolgt gegenläufig zu der der MMPs<sup>46</sup>.

### 1.3.3 Cathepsine

Nachdem lange Zeit angenommen worden war, MMPs wären die dominanten Akteure der Reorganisation der ECM, weisen neue Forschungsergebnisse den Cathepsinen eine bedeutende biologische Rolle in diesem System zu<sup>47, 48</sup>. Die Cathepsine („Verdauere“) gehören wie die MMPs zu den Proteasen. Sie besitzen hochspezifische, direkte proteolytische Aktivität, die sie intrazellulär - primär im sauren Milieu der Lysosomen - entfalten<sup>49</sup>. Darüber hinaus haben sie große Bedeutung für den Katabolismus intrazellulärer Proteine und die Prozessierung von Pro-Hormonen. Cathepsine sind beteiligt an der Degradation der ECM, der Antigenpräsentation über MHC-II und der Vermittlung TNF- $\alpha$ -induzierter Apoptose. Nicht nur in Makrophagen sondern auch VSMCs und ECs exprimiert, sind sie proteolytische Partner der MMPs<sup>50</sup>. Weiterhin spielen die Cathepsine eine wesentliche Rolle in der Spaltungskaskade gewebständiger RAS unter Umgehung von ACE<sup>51</sup>. Dieser alternative Signalweg der Angiotensin II-Genese ist von großer Bedeutung für die lokalen Mechanismen des RAS und darüberhinaus auch für pathologische Veränderungen der Gefäßwand. Zusätzlich beeinflussen Cathepsine auch die adipozytäre Differenzierung und beteiligen sich am fettgeweblichen Umbau im Rahmen der Adipositas<sup>52</sup>.

Die Klassifizierung der einzelnen Cathepsine erfolgt nach der katalytisch bedeutsamen Aminosäure im aktiven Zentrum: es werden Cystein-, Aspartat- und Serin-Proteasen unterschieden.

Cathepsin B ist eine lysosomale Cystein-Protease aus der Familie der Papain-Enzyme

mit Endo- sowie Exopeptidasenaktivität. Die proteolytische Prozessierung des Pro-Cathepsin B - vermittelt durch Cathepsin D oder autokatalytisch im sauren Milieu - resultiert in der 24 kDa schweren aktiven Protease. Das Wirkspektrum der Cathepsine ist breit. Unter anderem bewirken sie die Degradation von extrazellulärem Kollagen und Proteoglykanen <sup>47</sup>.

Cathepsin D ist eine Aspartat-Endopeptidase, die bei einem pH-Optimum von 3,0 bis 5,0 normalerweise in endosomalen und lysosomalen Organellen lokalisiert ist. Innerhalb dieser Lysosome ist es verantwortlich für die Degradation phagozytierter Proteine, in den Endosomen proteolysiert Cathepsin D verschiedene Substrate im Sinne einer biologischen Aktivierung <sup>53</sup>. Unter bestimmten Bedingungen wird Cathepsin D ins Zytosol transloziert, wo es proapoptotisch wirkt <sup>54</sup>. Weiterhin hat Cathepsin D einen festen Platz in dem Multiproteinase-komplex, der verantwortlich ist für die Degradation der ECM <sup>55</sup>.

Wie MMPs sind auch Cathepsine stark regulierte Proteasen. Sie werden als Prä-Pro-Enzyme synthetisiert. Das Pro-Cathepsin entsteht nach Entfernung des Präpeptids im Endoplasmatischen Retikulum. Das aktive Cathepsin entsteht schließlich nach proteolytischer Abspaltung des Propeptids im sauren Milieu des Lysosom <sup>56</sup>.

Cathepsine sind neben ihren direkten proteolytischen Fähigkeiten auch in die Initiation proteolytischer Kaskaden involviert. Sie aktivieren die zymogenen Formen von Kollagenasen und Gelatinasen und inaktivieren TIMPs <sup>57</sup>.

## 1.4 Physiologie des Fettgewebes

Die primäre Funktion des Fettgewebes ist die Speicherung von Energien in Form von Fett. Triglyceride bilden das Energiereservoir in Adipozyten. Bei systemischen Energiemangelzuständen sind sie in Form von freien Fettsäuren mobilisierbar und bilden somit einen festen Bestandteil des energetischen Haushalts.

Das Fettgewebe ist jedoch nicht nur Energiedepot: Adipozyten bilden das Fundament benachbarter Epithelzellen. Sie erfüllen eine Schutzfunktion durch Polsterung der Gefäße und Nerven oder ganzer Organe. Das Fettgewebe ist aber auch ein endokrines Organ, das eine Vielzahl bioaktiver Moleküle synthetisiert und in den systemischen Blutkreislauf sezerniert <sup>58, 59</sup>. Dies sind vor allem Adipokine (Leptin, Adiponectin) und

proinflammatorische Faktoren wie Zytokine (TNF- $\alpha$ ), Chemokine (MCP-1), Interleukine (IL1- $\beta$ , IL-6) sowie Wachstumsfaktoren, Plasminogen Activator Inhibitor I, Lipoproteinlipasen und auch Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems. Weiterhin besitzt das Fettgewebe zahlreiche Rezeptoren und wird so durch andere Hormonsysteme beeinflusst<sup>60-62</sup>.

Das Fettgewebe besteht nicht nur aus Adipozyten, sondern auch aus deren Vorläuferzellen, den Präadipozyten, Endothelzellen sowie Makrophagen, welche die stromovaskuläre Fraktion des Fettgewebes bilden. Wesentlichen Anteil an der endokrinen Funktion des Fettgewebes haben die integrierten Makrophagen und Endothelzellen. Das Fettgewebe nimmt eine aktive Rolle in der Regulation physiologischer und pathologischer Prozesse des Metabolismus ein. Darüberhinaus ist es wesentlich für die lokale als auch systemische Immunologie und Inflammation<sup>63</sup>.

#### 1.4.1 Pathologie des Fettgewebes: Adipositas

Adipositas bezeichnet die krankhafte Vermehrung des Fettgewebes. Ein verallgemeinerndes Maß für die Körpermasse ist der Body-Mass-Index (BMI). Obgleich individuelle Faktoren wie Statur, Fett- und Muskelgewebe nicht berücksichtigt werden ist eine grobe Bewertung möglich.

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpermasse in kg}}{(\text{Körpergröße in m})^2}$$

Ein BMI zwischen 19 und 25 gilt als normalgewichtig. Werte zwischen 25 und 30 werden als übergewichtig bewertet. Oberhalb von 30 beginnt die Adipositas.

Fettleibigkeit und die assoziierten metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen stellen ein immer größer werdendes Problem in der Medizin dar. Seit 1980 hat sich die Prävalenz der Fettleibigkeit in Europa verdreifacht<sup>48, 64</sup>.

Adipositas ist das Resultat einer positiven Energiebilanz als Folge einer langfristigen Verschiebung von Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch. Es kommt zu einer Akkumulation von Triglyceriden in Fettdepots mit Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten. Die funktionelle Bedeutung dieses Depots als Reserve in Zeiten reduzierten Nahrungsangebotes ist heute in der industrialisierten Welt weitgehend erloschen. Übergewicht (BMI 25-30) und Adipositas (BMI>30) sind weitverbreitete

Krankheiten mit dramatischen Auswirkungen auf die Gesamtmortalität. Sie wirken schädigend auf eine Vielzahl von Systemen, einschließlich kardiovaskulär (Endothelschäden, KHK, Hypertonus)<sup>40, 64-67</sup>, respiratorisch (Schlaf-Apnoe), gastrointestinal (Reflux, Gallensteine), metabolisch (Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, Hypercholesterinämie)<sup>68, 69</sup>, immunologisch<sup>70</sup> und onkologisch (erhöhte Inzidenz von Brust-, Endometriums- und Darmkrebs)<sup>71, 72</sup>.

Adipozyten produzieren eine Reihe von Adipokinen, die auf lokaler (auto-/parakrin) und systemischer Ebene (endokrin) wirken. Diese Faktoren sind Zytokine, Wachstumsfaktoren, Adiponektin, Resistin, Adipsin, Leptin, plasminogen activator inhibitor-1, Lipoproteinlipase und auch Komponenten des Gerinnungssystems sowie des Renin-Angiotensin-Systems<sup>73</sup>.

Bei einer exzessiven Erhöhung der Fettmasse kommt es zu deutlichen Veränderungen der zirkulierenden Konzentrationen adipozytär produzierter Biomoleküle. Zytokine, Chemokine und Hormon-ähnliche Proteine werden vom Fettgewebe gebildet und sezerniert. Sie wirken auf metabolischer Ebene und modulieren auch inflammatorische und strukturelle Prozesse<sup>74</sup>. Bei Adipositas ist die Synthese der Biomoleküle dysreguliert. Deutliche Effekte sind auf lokaler Ebene (auto- und parakrine Funktion) wie auch systemisch (endokrine Funktion) nachweisbar.

Fettgewebliches Wachstum ist verbunden mit einer großen Belastung des extrazellulären Systems. Differenzierende Adipozyten bilden zelluläre Erweiterungen, sie migrieren aus dem Stroma und etablieren Zell-Zell-Verbindungen. Die Adipozyten organisieren sich in dreidimensionalen multizellulären Verbänden. Hierzu ist eine Reorganisation der ursprünglichen Ordnung der ECM notwendig. Große Bedeutung für die Degradation fettgeweblicher ECM kommt dem MMP-System zu. Speziell die Remodellierung der adipozytären Basalmembran, die Voraussetzung für das Wachstum ist wird durch ihre proteolytische Aktivität gewährleistet. Weiterhin sind MMPs in die Zytokinaktivierung und proinflammatorische Reaktion involviert<sup>37</sup>.

Die erhöhte Produktion proinflammatorischer Faktoren führt zu einer milden systemischen Inflammation. Deshalb wird die Adipositas zu den milden Entzündungskrankungen gerechnet<sup>75</sup>. Verantwortlich für die erhöhte Konzentration proinflammatorischer Faktoren ist die mit Adipositas assoziierte Infiltration des Fettgewebes mit Makrophagen, die neben den Adipozyten selbst eine Quelle für Zytokine darstellen. Die Zahl der Makrophagen ist auch in Relation zum Fettgewebe normalgewichtiger Kontrollgruppen im Fettgewebe bei Adipositas erhöht. Diese

Makrophagen sind sowohl morphologisch als auch funktionell aktiviert <sup>76</sup>.

Doch auch die Adipozyten selbst reagieren sensitiv auf inflammatorische Veränderung in ihrem Milieu. Sie sind Zielzellen inflammatorischer Pathogene, welche die Synthese und Sekretion von Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen in Adipozyten stimulieren <sup>77</sup>.

Die Konzentration von TNF- $\alpha$  ist direkt korreliert mit Adipositas und Insulinresistenz <sup>78</sup>.

Adipositas ist der grundlegende Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Dysregulationen auf Ebene der adipozytären Biomoleküle sind ursächlich für die Veränderungen, die das Krankheitsbild des metabolischen Syndroms bilden <sup>79</sup>. Das Metabolische Syndrom (MetS) ist ein komplexes Krankheitsbild mit rasch steigender Prävalenz. Es setzt sich aus folgenden pathologischen Veränderungen zusammen <sup>80</sup>:

- Abdominelle Adipositas
- Atherogene Dyslipidämie
- Bluthochdruck
- Insulinresistenz mit Glukoseintoleranz
- Prothrombotischer sowie proinflammatorischer Status

Ein zusätzlicher Diabetes mellitus Typ 2 findet sich im fortgeschrittenen Stadium des Metabolischen Syndroms. Eine Erhöhung der Insulinresistenz, die mit einer Zunahme der Körperfettmasse einhergeht, gilt als ursächlich für die Vielzahl pathologischer Veränderung, weshalb das Metabolische Syndrom auch Insulinresistenz-Syndrom genannt wird. Das Metabolische Syndrom stellt einen kombinierten Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Ausgangspunkt der krankhaften Veränderungen ist die Adipositas <sup>79</sup>.

#### **1.4.2 Tumor Nekrose Faktor-alpha in der adipozytären Biologie**

Der proinflammatorische Status ist entscheidend beteiligt an der Pathogenese des Metabolischen Syndroms <sup>81</sup>. Das Fettgewebe ist ein Produzent inflammatorischer Zytokine wie CRP, Interleukin-6 oder TNF- $\alpha$ . Die immunomodulatorischen und inflammatorischen Funktionen von TNF- $\alpha$  sind gut bekannt <sup>82</sup>. Mittels dieser Eigenschaften hat TNF- $\alpha$  dominanten Einfluss auf den intermediären Stoffwechsel und

wird als Schlüsselzytokin in der Pathogenese der Adipositas und deren Folgeerscheinungen angesehen<sup>83</sup>.

TNF- $\alpha$ , als 51 kDa-Trimer sezerniert, ist als 17 kDa-Protein wirksam. Der Name entstammt seiner ursprünglichen Identifikation als proapoptotischer Faktor in Tumorzellen<sup>84</sup>. Das Zytokin besitzt bedeutende proinflammatorische Eigenschaften und hat großen Einfluss in der Vermittlung angeborener wie auch erworbener Immunität und im System aus Zellproliferation und apoptotischen Prozessen. Hinzu kommen spezielle metabolische Funktionen mit großer Bedeutung für das Fettgewebe. TNF- $\alpha$  entfaltet seine Wirkung nach Bindung an zwei Rezeptoren (Tumor Necrosis Factor Receptor I und II bzw. p55 und p75), die auf den Membranen aller kernhaltigen Zellen exprimiert sind<sup>85</sup>.

Besonders das fettgewebliche TNF- $\alpha$  steht im Fokus aktueller Forschung. Seine metabolische Rolle ist von großer klinischer Relevanz. Die gesteigerte Expression von TNF- $\alpha$  im Rahmen der Adipositas ist von zahlreichen systemisch kritischen Konsequenzen begleitet. So bewirkt TNF- $\alpha$  eine Erhöhung der Insulinresistenz indem es die Aktivität der Insulinrezeptortyrosinkinase 1 (IRS-1) und die Expression des Glukosetransporter 4 (GLUT-4) herabreguliert. Weiterhin wirkt es Transkriptionfaktoren wie PPAR $\gamma$  entgegen. Zudem stimuliert TNF- $\alpha$  die Lipolyse und induziert so indirekt auch diabetogene Effekte<sup>86</sup>. Diese Vorgänge beschreiben die endokrinen Effekte von TNF- $\alpha$ .

Den größten Anteil an der TNF- $\alpha$ -Produktion und -Sekretion im Fettgewebe haben, neben den Adipozyten selbst, die stromovaskulären Zellen – im speziellen die Makrophagen. TNF- $\alpha$  ist somit ein auto-parakriner Faktor im adipozytären Gewebe<sup>74</sup>.

### **1.4.3 PVAT: Auswirkungen der Adipositas auf das Gefäßsystem**

Die endokrinen Eigenschaften des Fettgewebes mit nachhaltigen systemischen Einflüssen lassen auch auf lokaler Ebene Funktionen des Fettgewebes vermuten, die über eine bloße Schutz- und Stützfunktion für die Organe hinausgehen. Produktion unterschiedlicher Adipokine und lokale Sekretion aus dem Fettgewebe beeinflussen benachbarte Organe. Über parakrine Signalwege wirkt das viszerale Fett so direkt auf Funktion und Struktur einzelner Gewebe<sup>64</sup>.

Die Adventitia mit dem angeschlossenen perivaskulären Fettgewebe (PVAT), das alle Arterien umgibt, rückt in letzter Zeit in den Fokus der Gefäßforschung<sup>87</sup>. Über unterschiedliche Wege moduliert diese äußerste Schicht des Gefäßes dessen Struktur und Funktion. Das periadventitielle Fett spielt auf parakrinem Weg eine bedeutende Rolle in der vasomotorischen Regulation der Gefäßwand. Im besonderen Maße sind antikontraktile Effekte des PVAT beschrieben. Die dilatativen Effekte sind zurückzuführen auf funktionell-elektrophysiologische Veränderungen in der Gefäßwand: Einbau sowie Öffnung von Ca- und K-Kanälen, ADRF, NO, Acetylcholin und Endothelfaktoren<sup>66</sup>.

Aortale Adventitia mit PVAT und Endothel stehen über *vasa vasorum* in Verbindung. Die mit Adipositas assoziierte dysregulierte inflammatorische Aktivität des Fettgewebes findet sich auch im PVAT und vermittelt gemeinsam mit oxidativem Stress und Insulinresistenz im Gefäßsystem einen entzündlichen Phänotyp<sup>67</sup>. Im Rahmen von Gefäßuntersuchungen bei kardiovaskulären Erkrankungen sind Populationen multipler exogener Zellen in der Adventitia auffällig. Dies sind vor allem Monozyten, Makrophagen und T-Zellen, die den inflammatorischen Status vermitteln<sup>88, 89</sup>. Weiterhin existiert ein signifikanter Zusammenhang zwischen der inflammatorischen Invasion in der Adventitia und dem Aortendurchmesser<sup>33</sup>. Die funktionelle Aktivierung der Adventitia ist charakteristisch für unterschiedliche vaskuläre Pathologien. Sie gilt als früher Vorbote der Gefäßerkrankungen<sup>90</sup>.

## 1.5 Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine zentrale Rolle in der Modulation von vaskulärem Tonus und Struktur sowie renaler Funktionen (Abb. 1-3). Es ist von höchster Bedeutung für das kardiovaskuläre System. Ausgangssubstrat des Systems ist das  $\alpha$ 2-Globulin Angiotensinogen, das, durch die in der Niere gebildete Protease Renin gespalten, Angiotensin I bildet. Aus diesem Dekapeptid wird nach Abspaltung zweier Aminosäuren durch die Peptidase *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II), dem hauptsächlichen Effektor mit druckregulatorischen, trophischen und proinflammatorischen Funktionen, abgespalten<sup>91</sup>. Ang II entfaltet seine Wirkung via zweier unterschiedliche Rezeptoren mit teilweise

gegensätzlicher Funktion: AT-1 und AT-2-Rezeptor <sup>92</sup>.

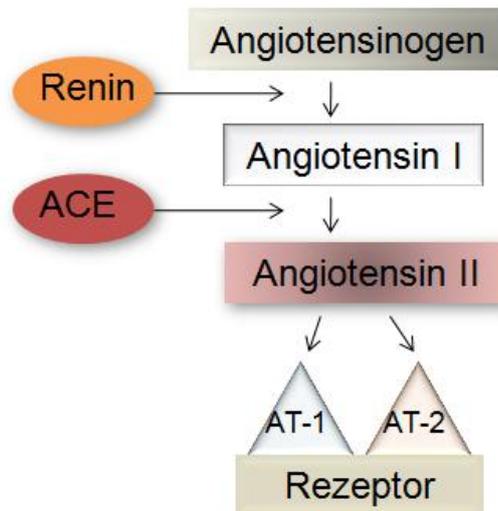


Abbildung 1-3: **Renin-Angiotensinsystem.**

Eine Vielzahl von Studien belegen zusätzliche Wirkungen des Ang II, die über dieses klassische RAS hinausgehen. So erfüllt Ang II nicht nur zirkulatorische Funktionen, sondern wird auch auf lokaler Ebene produziert und entfaltet hier auch seine Wirkung <sup>93</sup>. Viele unterschiedliche Gewebe (Herz, Gefäß, Gehirn, Fett) verfügen über lokale organspezifische Angiotensin-generierende Systeme mit parakriner Wirkung <sup>94, 95</sup>.

Auch das Fettgewebe verfügt über ein eigenes lokales Renin-Angiotensin-System. Es ist nach der Leber der bedeutendste Produzent von Angiotensinogen <sup>96</sup>. Hormonelle und metabobliche Veränderungen im Rahmen von Adipositas sind assoziiert mit Expression und Sekretion adipozytären Angiotensinogens. Das lokale RAS des Fettgewebes ist direkt involviert in die Pathophysiologie der Adipositas: auf lokaler Ebene adipozytärer Homöostase als auch systemisch im Sinne des metabolischen Syndroms <sup>97</sup>. Das RAS bildet somit einen wichtigen Verbindungspunkt zwischen dysregulierten Fettgewebe und assoziierten vaskulären Pathologien. Von großer Bedeutung für die Aktivität des RAS ist die Sensitivität des Fettgewebes gegenüber Insulin. Resistenz gegenüber Insulin in der Vermittlung durch TNF- $\alpha$  ist assoziiert mit hohen Konzentrationen von Angiotensinogen <sup>98</sup>.

Die Expressionsraten von Angiotensinogen-mRNA sind in viszeralen Fettdepots höher als in subkutanen. Im Rahmen einer präzisen Lokalisation der aortalen Expression von Angiotensinogen auf mRNA-Ebene konnten hohe Konzentrationen vor allem im PVAT

gefunden werden, während die einzelnen Abschnitte der Aortenwand nur geringe Aktivität aufwiesen<sup>99, 100</sup>.

Die vaskuläre Wirksamkeit des RAS beeinflusst die Biologie der Gefäßwand nachhaltig. Durch Angiotensin II als hochpotenten Vasokonstriktor reguliert es den Vasotonus. Zudem stimuliert Angiotensin II die Produktion von Zytokinen und induziert eine inflammatorische Aktivierung der VSMC<sup>101</sup>. Weiterhin induziert es die Synthese von MMPs und trägt so maßgeblich zur proteolytischen Aktivität und *Remodeling*-Vorgängen in der Gefäßwand bei<sup>102</sup>.

Die vielfältigen nützlichen Effekte von Eingriffen in das RAS mittels ACE-Hemmern oder AT-1-Rezeptor-Blockern (ARBs) sind nicht allein durch deren blutdrucksenkenden Eigenschaften zu erklären. Vielmehr beeinflussen sie ein weitläufiges System mit großer Bedeutung in der Verknüpfung adipozytärer und kardiovaskulärer Pathologien.

### 1.5.1 AT-1-Antagonisten: Telmisartan

Der Großteil der Ang II-Effekte wird durch Anlagerung an den AT-1- bzw. AT-2-Rezeptor vermittelt<sup>103</sup>. Es handelt sich um membranständige Rezeptoren mit 7 transmembranären Domänen. Die Bindung an den AT-1-Rezeptor ist entscheidend für die Ang II-vermittelte Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung, Zytokinfreisetzung, MMP-Aktivierung und VSMC-Proliferation<sup>104</sup>. Angiotensin-Typ-1-Rezeptor-Blocker wirken über eine kompetitive Antagonisierung von Angiotensin II durch Blockade dessen Bindung an den Angiotensin-Typ 1-Rezeptor und finden einen weiten Einsatz in der Therapie des Bluthochdrucks. Großer Vorteil der AT-1-Antagonisten gegenüber ihren Vorgängern den ACE-Hemmern ist die ausbleibende Affektation des Bradykininsystems, da keine Interaktion mit ACE stattfindet.

AT-1-Antagonisten leiten sich strukturell von Imidazolderivaten ab. Die unterschiedlichen Antagonisten entstehen durch den Austausch des Imidazolrings durch eine andere funktionelle Gruppe.

Große klinische Studien belegen weiterhin günstige Effekte RAS-Antagonistischer Maßnahmen hinsichtlich der Insulinsensitivität (Ramipril: HOPE<sup>105</sup>; Losartan: LIFE<sup>106</sup>; Telmisartan: ONTARGET<sup>107</sup>).

Hemmung des ACE bewirkt eine Steigerung der Insulinsensitivität über den Bradykinin-

Signalweg und eine erhöhte NO-Synthese <sup>108</sup>. Mögliche weitere Mechanismen insulinsensitivierender Effekte nach Eingriffen in die Kaskade des RAS mit Hemmung der Angiotensin II-Wirkung sind: Steigerung der Adiponectin-Konzentration <sup>66</sup>, Hemmung proinflammatorischer Aktivierung <sup>101</sup> und Minderung der Entstehung freier Sauerstoffradikale <sup>109</sup>. Dennoch bleiben die genauen Mechanismen und eine Beteiligung an weiteren positiven systemischen Effekten spekulativ. Die nachgewiesenen positiven Effekte hinsichtlich der Insulinsensitivität nach Einnahme von AT-1-Antagonisten sind weiterhin nicht vollständig geklärt.

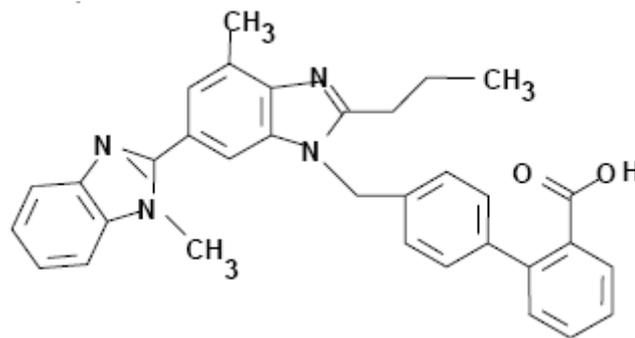


Abbildung 1-4: **Telmisartan**.

Telmisartan enthält den Biphenylgrundkörper der Sartane, allerdings ist der Tetrazolring gegen eine Säuregruppe ausgetauscht (nach Wienen *et al.* <sup>110</sup>).

Telmisartan hat sich in unterschiedlichen Studien als besonderes Mitglied der ARB-Familie erwiesen. Experimentell konnte eine Verstärkung der Differenzierung muriner Präadipozyten unter Telmisartan nachgewiesen werden <sup>111, 112</sup>. Verantwortlich für diesen Effekt ist eine Aktivierung des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors gamma (PPAR $\gamma$ ), einer Unterfamilie der nukleären Hormonrezeptoren <sup>113</sup>. PPAR $\gamma$  spielt eine bedeutende Rolle in der transkriptionellen Regulation von Glukose- und Lipidmetabolismus und somit in der Vermittlung von Insulinsensitivität. Die hohe Lipophilie des Telmisartan begünstigt diesen besonderen Effekt des ARBs. Telmisartan fungiert als partieller PPAR $\gamma$ -Agonist und weist somit insulinsensitivierende Eigenschaften unabhängig von der AT-1-Blockade auf <sup>112</sup>.

## 1.6 Hypothese und Zielsetzung

Es existiert eine enge Verbindung zwischen vaskulären Erkrankungen und Adipositas. Adipositas ist eine metabolische und inflammatorische Pathologie, die mit einer grundlegenden Beeinflussung des kardiovaskulären Systems im Sinne eines Metabolischen Syndroms einhergeht<sup>43</sup>.

Die Vielzahl fettgeweblicher Viszeral-Komplexe in unterschiedlichen Organsystemen führt zu einer systemischen Distribution adipozytärer Dysregulation. Die unmittelbare Nachbarschaft von Organen und spezifischem Fettgewebe und dessen parakrinen Eigenschaften machen eine unmittelbare Organaffektation durch das viszerale Fett wahrscheinlich.

Adipositas als intensiver Umgestaltungsvorgang im Fettgewebe stellt hohe Anforderungen an das proteolytische System<sup>39</sup>. Es finden sich verstärkt *Remodeling*-Prozesse. Diese sind auch charakteristisch für adaptive Veränderungen des Gefäßsystems. Proteolytische Dysregulation stellt eine große Gefahr für die Integrität des Gefäßes dar. Eine großen klinischen Studie ergab eine Assoziation von Adipositas und vergrößerten Aortendurchmessern<sup>114</sup>.

Vor diesem Hintergrund ergab sich als Hypothese für diese Arbeit die Möglichkeit eines parakrinen Übergreifens des dysregulierten *Remodelings* im PVAT bei Adipositas auf die benachbarte Gefäßwand. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit Adipositas tatsächlich eine Dilatation der Aorta verursacht und welche struktur-morphologischen und molekularbiologischen Veränderungen sich in der Aortenwand finden.

Die schrittweise Annäherung an die Ziele erfolgte über:

1. Die morphologische und molekularbiologische Untersuchung der Mauseorta nach forcierter PVAT-Beeinflussung durch Diät-induzierte Adipositas mit besonderem Fokus auf strukturellen Veränderungen der extrazellulären Matrix.
2. Die Untersuchung proteolytischer und inflammatorischer Aktivität in Aorta und Adipozyten.
3. Die Prüfung einer möglichen pharmakologischen Intervention durch den AT-1-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	QA-Agarose™, Q-BIOgene, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen, D
Ampicillin (D-[-]-alpha-Aminobenzylpenicillin)	Sigma, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol 70%, 90%, 96%, 100%	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid (1% m/v)	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Sigma, Taufkirchen, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva ,Heidelberg, D
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
10x PCR-Puffer und MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Promega GmbH, Mannheim, D
Paraffin Typ 9	Microm GmbH, Walldorf, D
Ponceau-S	Sigma, Taufkirchen, D
Proteaseinhibitoren Complete-Mini	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Pioglitazon	Takeda, Osaka, Japan
Resorcinfuchsin	Chroma, Münster, D
Restore™ Western stripping buffer	Pierce, Rockford, USA
Sodium-Nitroprussid	Sigma, Taufkirchen, D
Telmisartan	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, D
TEMED	Sigma, Taufkirchen, D
Trizma-Base	Sigma, Taufkirchen, D
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween 20	Sigma, Taufkirchen, D
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha)	Biosource, Belgium, NL
Weigert A+B	Chroma, Münster, D
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, D

#### 2.1.2 Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen, D
Dexamethason (2mM)	Sigma, Taufkirchen, D
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM, mit 4,5 g/l Glucose; 0,58 g/l L-Glutamin; 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fötales bovines Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe, D

Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma, Taufkirchen, D
Insulin	Sigma, Taufkirchen, D
Isobutylmethylxanthin (IBMX, 50mM)	Sigma, Taufkirchen, D

### 2.1.3 Kits

BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Perbio Science, Piece, Bonn, D
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham-Pharmacia, Freiburg, D
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
NucleoSpin® RNA/Protein Kit	Macherey-Nagel, Düren, D

### 2.1.4 Nukleinsäureanalytik, Primer

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega, Mannheim, D
Random Primer	Promega, Mannheim, D
RNasin® Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim, D
Sybr® Green I	Sigma, Taufkirchen, D
ultra-pures Wasser (u.p. H <sub>2</sub> O)	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNase-/ DNase-frei	

#### Primer

Alle Primer wurden mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) entworfen, basierend auf entsprechenden Sequenzdaten, die aus den Datenbanken NCBI (<http://www.pubmed.gov>) und Ensembl (<http://www.ensembl.org>) bezogen wurden. Dabei wurden die Primersequenzen so gewählt, dass diese eine Exon-Exon-Grenze des Zielgens überspannten. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass es sich bei dem späteren Amplifikat ausschließlich um mRNA handelte. Die Prüfung der Spezifität und der Ausschluss unerwünschter Amplifikate erfolgte, indem die jeweiligen Primer gegen das gesamte Organismusgenom „geblastet“ wurden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Alle Primer wurden von Sigma (Taufkirchen, D) bezogen.

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'	Annealing-Temp. (°C)
Mouse 18S rRNA	GCTTGC GTT GATT AAGTCCCTG	AGTTCGACCGTC TTCTCAGC	60
Mouse MMP-2	CGCTCAGATCCGT GGTGAG	GGCTTGT CACGT GGTGTCAC	60
Mouse MMP-3	AGAAGGAGGCAG CAGAGAACC	GCAATGGGTAG GATGAGCACAC	60
Mouse MMP-9	GACAGGCACTTCA CCGGCTA	CCCGACACACA GTAAGCATTCTG	60
Mouse Cathepsin B	CAACGTGGAGGTG TCTGCTGAA	TGTCCAGAAGTT CCATGCTCCAG	60
Mouse Cathepsin D	CTGAGTGGCTTCA TGGGAAT	CCTGACAGTGGA GAAGGAGC	60
Mouse Alpha-SMA	CTTCCAGCCATCT TTCATTGG	TCAATATCACAC TTCATGATGCTG TT	60
Mouse TNF-alpha	CTATGGCCCAGAC CCTCACA	TTGCTACGACGT GGGCTACA	60
Mouse CD 68	AGGGTGG AAGAAA GGTAAAGC	AGAGCAGGTCAA GGTGAACAG	60
Mouse DEPP	CCTGACTGCTGAC TTACAGCTATGA	TCCCGAATCGTT GGCAAAT	60
Rat 18S rNA	CCGCAGCTAGGAA TAATGGAATA	TCTAGCGGCGC AATACGAAT	60
Rat MMP-2	GACGCTGGGAGC ATGGAG	TTACGCGGACCA CTTGTCC	60
Rat MMP-9	CTTCTCTGGGCGC AAAATG	CCGGTGACCAG GGTTACCT	60

Tabelle 2-1: Verzeichnis der verwendeten Primersequenzen.

### 2.1.5 Antikörper

Antikörper	Wirt/Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Cathepsin B	Rabbit polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
Cathepsin D	Rabbit polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
GAPDH	Mouse monoclonal IgG	1:500	Chemicon
IL-1 $\beta$	Rabbit polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
MMP-2	Mouse polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
MMP-3	Rabbit polyclonal IgG	1:1000	Chemicon
MMP-9	Mouse polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz

MMP-12	Mouse polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
TIMP-1	Rabbit polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
TIMP-3	Rabbit polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
TNF- $\alpha$	Goat polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz

Tabelle 2-2: verwendete Primärantikörper (Western Blot).

Antikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit	Donkey HRP	1:2000	Amersham
Anti-goat	Rabbit HRP	1:2000	Dako
Anti-mouse	Rabbit HRP	1:2000	Dako

Tabelle 2-3: verwendete Sekundärantikörper (Western Blot).

### 2.1.6 Versuchstiere und Zelllinien

Laboratory mouse, Stamm: C57BL/6J  
(TVV: G-0348/06; G-0282/04)

Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, D

Maus, Zelllinien:  
3T3-L1 preadipocytes

American Type Culture Collection

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

#### Western Blot Lösungen

1. 4x Trenngelpuffer (100 ml):
  - 75 ml 2M Tris-Cl pH 8,8
  - 4 ml 10% SDS
  - 21 ml dest. H<sub>2</sub>O
  
2. 4x Sammelgelpuffer (100 ml):
  - 50 ml 1M Tris-Cl pH 6,8
  - 4 ml 10% SDS
  - 46 ml dest. H<sub>2</sub>O

## 3. Elektrophoresepuffer (500 ml):

- 1,5 g Trizma base
- 7,2 g Glycin
- 5 ml 10% SDS
- auf 500 ml mit dest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt

## 4. Transferpuffer (Towbin):

- 3,03 g Trizma base
- 14,4 g Glycin
- 200 ml Methanol
- 5 ml 10% SDS
- Auf 1 l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt

## 5. Blockpuffer (100 ml):

- 4 g Milchpulver
- 100 ml TTBS

## 6. Waschpuffer: TTBS (1 l):

- 100 ml 10x TBS pH 7,5
  - o 60,57 g Trizma base
  - o 43,83 g NaCl
  - o 400 ml dest. H<sub>2</sub>O
  - o auf 500 ml mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen
- 1 ml Tween-20
- Auf 1 l mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen

**Argarose-Gelelektrophorese-Puffer**

## 7. 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE):

- 40 mM Tris-HCl
- 5 mM Natriumacetat
- 1 mM EDTA
- ad 1 l H<sub>2</sub>O
- pH-Wert 8,0

## Siriusrotlösung

Stammlösung: 0,5 g Siriusrot auf 500 ml gesättigter Pikrinsäure

Arbeitslösung: (1:20): 5 ml Stammlösung + 95 ml gesättigte Pikrinsäure

## Citratpuffer

- 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat
- 800 ml dest. H<sub>2</sub>O
- pH 6
- ad 1 L H<sub>2</sub>O

## 2.1.8 Ausgewählte Geräte und Zusatzmaterialien

### Elektrophorese und Blotsysteme

Vertikale Elektrophorese-Systeme, Midi und Maxi  
 Horizon<sup>TM</sup>58  
 Semi-Dry Blot-System  
 Horizontale Elektrophorese-Systeme, Mini-Protean<sup>®</sup>

Harnischmacher, Kassel, D

BRL, Gaithersburg, USA  
 Bio-Rad, München, D  
 Bio-Rad, München, D

### Zentrifugen/ Rotoren

Tischzentrifugen Mikro 20, Typ 2004  
 Galaxy Mini  
 Zentrifuge 5415R

Hettich, Zentrifugen, Tuttlingen, D  
 Merck KGaA, Darmstadt, D  
 Eppendorf, Hamburg, D

Kühlzentrifuge Mikro 22R  
 Kühlzentrifuge 5402  
 Schüttler 3005

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D  
 Eppendorf®, Hamburg, D  
 G.F.L®, Burgwedel, D

### Mikroskop

Lichtmikroskop Leica DMIL

Leica GmbH, Wetzlar, D

### Histologie

Einbettautomat Citadel 1000  
 Paraffin Ausgießstation Type EC 350-2  
 Einbettkassetten  
 Rotationsmikrotom HM 325 „cool cut“  
 Microtom-Klingen Feather S35  
 Deckgläser 24x50mm  
 Objektträger: SuperFrost<sup>®</sup> Plus

ThermoShandonElectron, Waltham, USA  
 Microm GmbH; Walldorf, D  
 Roth®; Karlsruhe, D  
 Microm GmbH; Walldorf, D  
 Engelbrecht, Edermünde, D  
 Roth®; Karlsruhe, D  
 Menzel, Braunschweig, D

Kühstation EG 1130  
Metallausgießförmchen  
Paraffin Streckbad

Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, D  
Medite, Burgdorf, D  
Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, D

### Filmmaterial

Hyperfilm™ ECL  
Developer  
Rapid Fixer

Amersham-Pharmacia, Freiburg, D  
AGFA, Düsseldorf, D  
AGFA, Düsseldorf, D

### Membranen und Filter

Hybond™-C, Nitrocellulose membrane  
0,45 Micron  
Sterilfilter 0.2 µm  
3-MM Whatman Filterpapier

Amersham Life Science, GB  
Schleicher&Schuell, Nürnberg, D  
Bio-RAD, Hercules, CA, USA

### Operationszubehör

Diverse Scheren und Pinzetten

Becton Dickenson, Sparks, USA

### Zellkulturzubehör

Zellkulturplatten und serologische  
Pipetten in diversen Größen  
10µL-, 100µL-, 1000µL-Eppendorfspitzen  
2 mL-Kryoröhrchen  
Eppendorfgefäße  
Zentrifugenröhrchen

Becton Dickenson, Sparks, USA  
Nunc, Wiesbaden, D  
Eppendorf, Hamburg, D  
Becton Dickenson, Sparks, USA  
Nunc, Wiesbaden, D  
Eppendorf, Hamburg, D

### Sonstige Geräte

Benchmark-Plus-microplate  
spectrophotometer  
Crurix 60  
Homogenisierer  
Photometer UV – 1202  
ThermoStat-plus  
Thermomixer Comfort  
Inkubationsschüttler Polymax 1040  
Universalwaage BL310  
Feinwaage SC2  
PH-Meter CG 840  
96-Loch Mikrotiter Platte

Biorad, München, D  
AGFA, Düsseldorf, D  
Heidolph RZR 2021, D  
Shimadzu, J  
Eppendorf, Hamburg, D  
Eppendorf, Hamburg, D  
Heidolph Instruments, Nürnberg, D  
Sartorius, Göttingen, D  
Sartorius, Göttingen, D  
Schott, Mainz, D  
Falcon, USA

### Ultraschallgerät

Sono high-resolution imaging system  
Vevo 770  
Ultraschall-Gel Aquasonic 100

VisualSonics Inc., Toronto, Canada  
Parker Laboratories, Fairfield, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiere

Untersuchungsgruppe waren C57BL/6J-Mäuse<sup>115</sup> von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland). Alle Mäuse wurden bei 25°C gehalten innerhalb eines 12-Stunden-hell-dunkel-Zyklus.

4-5 Wochen alte Mäuse wurde über 12 Wochen eine HFD verabreicht (n=13). Hierbei erhielten diese ausgewählten Mäuse die Kost ad libitum<sup>116</sup>. Der Fettanteil an der Gesamtkalorienaufnahme betrug 60% (Altromin, Lage, D). Eine randomisierte Kontrollgruppe erhielt eine Standarddiät mit einem erniedrigten Fettanteil von 10% (n=13). Die metabolische Phänotypisierung erfolgte mittels spezifischer Gewichtsanalyse sowie der Blutentnahme aus der Schwanzvene zur Testung der Insulin- und Glukosetoleranz im Rahmen von Belastungstests (ITT, GTT). Zusätzlich erhielt eine weitere Gruppe neben der HFD Telmisartan 3mg/kgKG/d<sup>117</sup> bzw ein Vehikel (0.5% Tween80/H<sub>2</sub>O) oral per Schlundsonde im 24h-Rhythmus.

#### 2.2.1.1 Glukose- und Insulintoleranztest

Die metabolische Charakterisierung erfolgte mittels Glukosetoleranztest. Hierzu wurde den Tieren nach nächtlicher Nüchternphase und initialer Blutentnahme (Zeitpunkt 0) 2 g/kg Körpergewicht Glukose verabreicht. Jeweils nach 15, 30, 60, 90, 120 und 180 min wurde über Punktion der Schwanzvene Blut zur Blutglukosebestimmung entnommen. Zusätzlich wurde auch ein Insulintoleranztest zur direkten Bestimmung der Insulinsensitivität durchgeführt. Hierfür wurden 0,5 U/kg Körpergewicht Insulin (Actrapid; Novo Nordisk) intraperitoneal appliziert und nach 0, 15, 30, 60, 90, 120 und 180 min Blut aus dem Schwanz zur Glukosebestimmung gewonnen.

### **2.2.1.2 Blutdruckmessung**

Die Blutdruckmessung erfolgte in der 10. Woche der Behandlung in Kooperation mit Martin Hartge per Millar Katheter (Micro-Tip 3F; Millar Instruments) in der Aorta abdominalis. Die graphische Auswertung erfolgte mit dem Programm Chart5 (ADInstruments, Spechbach, D)

### **2.2.1.3 Sonographie der Aorta**

Die Mäuse wurden in der letzten Diätwoche am Vortage der Organentnahme sonographisch untersucht. Hierzu wurden sie mit einem Fluß von 3ml 1,5-2% Isofluran anästhesiert. Die anästhesierten Mäuse wurden auf einer auf 39°C vorbeheizte Untersuchungsplattform in Rückenlage fixiert. Die Anästhesie wurde durch konstanten Fluß von 1,5ml 1,5-2% Isofluran aufrechterhalten. Nach gründlicher Entfernung des Bauchfells mittels Enthaarungscreme (Veet, Reckitt-Beckinser, Mannheim, D) erfolgte die sonographische Begutachtung der abdominalen Aorta mittels des hochauflösenden Vevo 770 Systems (VisualSonics Inc., Toronto, Canada) ausgerüstet mit einem 15mm langen 25MHz-Schallkopf. Bei einer Bildrate von 40Hz konnte ein maximales Blickfeld von 21x21mm beurteilt werden. Die longitudinalen Scans der Aorta wurden an jeweils drei repräsentativen Orten hinsichtlich des Diameters sowohl in Systole als auch Diastole infrarenal ausgemessen. Weiterhin wurden auch suprarenale Sektionen separat vermessen. Die Messungen erfolgten durch zwei unterschiedliche Untersucher, die blind waren für die jeweilige Zugehörigkeit der untersuchten Mäuse. Der endgültige Durchmesser errechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Durchmesser} = (\text{systolischer} + \text{diastolischer Durchmesser}) / 2$$

### **2.2.1.4 Präparation**

Zur Organentnahme wurden die Mäuse anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Brust- und Bauchraum eröffnet. Die Aorta wurde komplett entnommen, in thorakale und abdominale Abschnitte separiert, in HBSS gewaschen

und den geplanten Versuchen entsprechend entweder in 4% Formalin gegeben oder in Flüssigstickstoff gefroren.

Unter mikroskopisch assistierter Sicht wurde die Media sowohl stumpf mittels Pinzetten als auch scharf durch das Skalpell von der Adventitia sowie dem PVAT getrennt.

## 2.3 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden in Kooperation mit Markus Clemenz durchgeführt. 3T3-L1-Präadipozyten wurden in einer 24-Well Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) platziert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Abbildung 2-2 illustriert das weitere Protokoll. Nach 2 Tagen im Zustand der Konfluenz wurde die Differenzierung initiiert (Tag 0). Hierzu wurde der Differenzierungsmix (Dexamethason 1µM, 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) 500µM und Insulin 1µg/ml) zugegeben. Beim Mediumswechsel am 2. Tag wurde das Medium nur noch mit Insulin versetzt. Ab dem 4. Tag enthielt das Medium keine weiteren Zusätze. Nach der Differenzierung zu Adipozyten wurden die Zellen in PBS gewaschen und für 16 h depriviert und anschließend mit TNF-α (10 ng/ml) für 24 h stimuliert oder blieben als Kontrolle ohne zusätzlichen Wirkstoff. TNF-α wurde hierzu während des Mediumwechsels direkt in DMEM gegeben. Ein Teil der mit TNF-α behandelten Adipozyten wurde zusätzlich 30 min vor der Behandlung mit Telmisartan (10µM) stimuliert (nach Schupp *et al.*<sup>112</sup>).

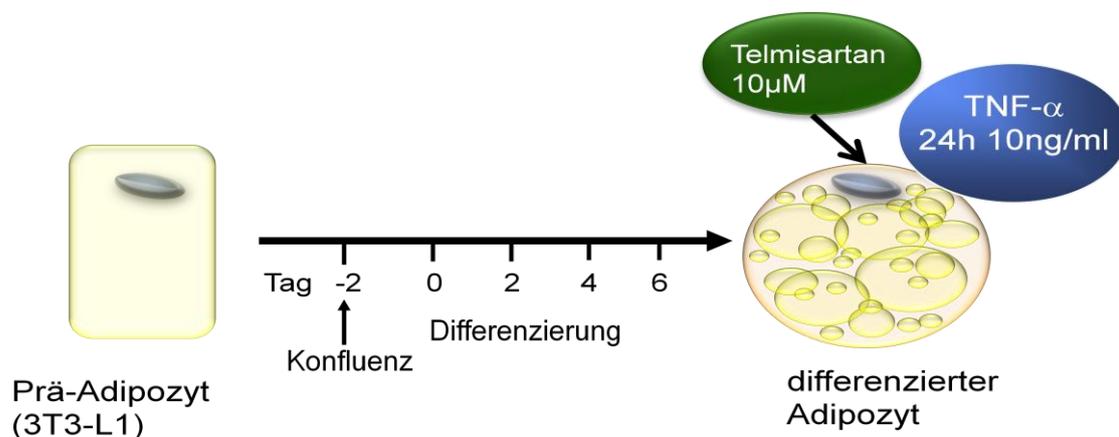


Abbildung 2-1: **Protokoll der 3T3-L1-Zellkultur.**

Adipozyten ohne Stimulation mit TNF-α dienten als Kontrollgruppe. Des Weiteren gab es eine Gruppe mit TNF-α-Stimulation und die dargestellte Gruppe mit TNF-α-Stimulation und Telmisartan-Behandlung.

Am Folgetag der TNF- $\alpha$ -Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Adipozyten dreifach mit PBS gespült und mit jeweils 1 ml 1% DMEM versetzt. Gleichzeitig wurden VSMCs depriviert. Nach 24 h wurde der Überstand der jeweiligen Adipozytengruppen abgesaugt und gepoolt. Je 1 ml des Überstand wurde zur Stimulation der VSMCs in unterschiedlichen Gruppen genutzt (Abb. 2-3). Die VSMCs entstammen aus Isolationsexperimenten aus Rattenaorten und wurden freundlicherweise durch Kooperation innerhalb der Arbeitsgruppe bereitgestellt.

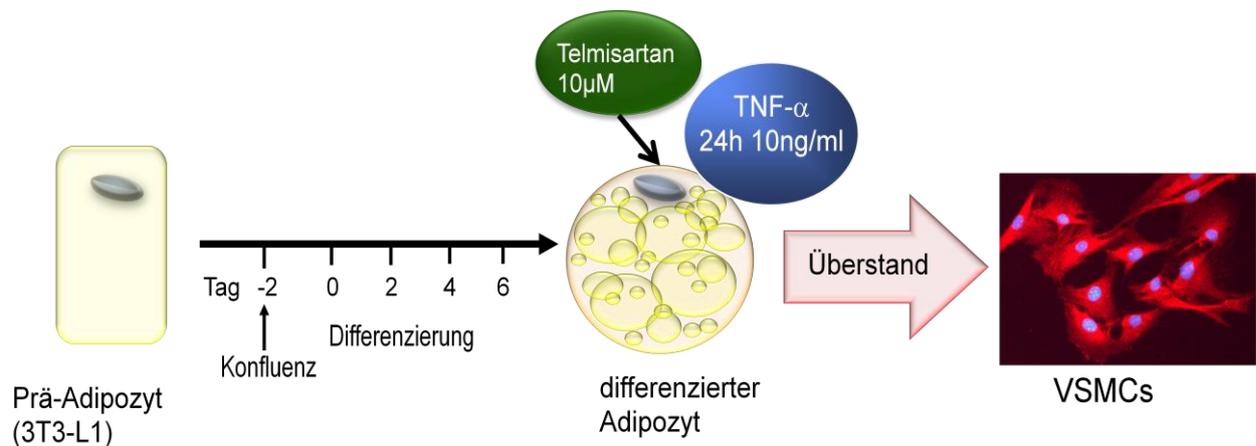


Abbildung 2-2: **Protokoll der 3T3-L1-Zellkultur mit VSMC-Stimulation.**

Die jeweiligen Überstände ergaben sich aus den unterschiedlichen Gruppen der Adipozytenstimulation. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, die mit Telmisartan aber ohne TNF- $\alpha$  stimuliert wurde.

## 2.4 Protein- und RNA-Extraktion

Die Protein- und RNA-Extraktion erfolgte parallel unter Nutzung des NucleoSpin® RNA/Protein Kits.

Zuerst wurden die Präparate homogenisiert. Die Aortenpräparate wurden hierzu nach gründlicher Organsäuberung in 4°C kalten PBS-Puffer in Flüssigstickstoff tiefgefroren und anschließend zermörsert. Zur Homogenisierung der kultivierten Zellen wurde zuerst der Überstand entfernt. Dann wurden die Zellen in PBS gewaschen und abschließend im Zellschaber von der Platte abgelöst. Die Zermörserung erfolgte jeweils unter Zugabe von proteinaseninhibierendem bzw. RNase-inhibierenden Lysepuffern.

Zur Zerstörung der Zellen und Inhibition einer Degradation von RNA und Protein folgte nun die Inkubation in einem Lyse-Puffer. Durch Filtration über eine Silizium-Membran

wurden die RNA-Bestandteile nach Zentrifugation in der Membran gebunden während der Proteinanteil am Boden des Gefäßes gesammelt werden konnte.

Die nun getrennte Aufreinigung der Protein- und RNA-Proben erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Die Qualität der isolierten mRNA wurde durch Bestimmung des Absorptionskoeffizienten gesichert. Hierzu wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm ermittelt und nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 fanden Verwendung in weiteren Experimenten.

### **2.4.1 Konzentrationsbestimmung**

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde das BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent Kit (Perbio Science, Pierce, D) verwendet.

In alkalischer Umgebung komplexieren die Proteine mit den Cu<sup>2+</sup>-Ionen der Bicinchoninsäure (BCA). Dabei werden sie zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert. Anschließend wurde eine Absorptionsmessung bei 562 nm durchgeführt. Durch Abgleich der ermittelten Absorptionswerte mit Standardkurven konnte die Konzentration der Proteine errechnet werden.

## **2.5 Gelelektrophorese und Western Blot**

### **2.5.1 Durchführung**

Western Blots ermöglichen den Nachweis spezifischer Proteine. Hierzu werden Polyacrylamid-Gele angefertigt. Diese Gele enthalten Natriumdodecylsulfat (SDS), das durch Bindung an hydrophobe Regionen der applizierten Proteine deren Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur denaturiert. Zudem werden die Proteine durch diesen Vorgang proportional zu ihrer Masse negativ geladen. Es entsteht so ein konstantes Verhältnis zwischen Ladung des Proteins und dessen Masse.

Über dem Gel wird nun ein elektrisches Feld angelegt. Es kommt zur Wanderung der

Proteine durch das Gel entsprechend ihrer jeweiligen Ladung und somit zur Auftrennung der einzelnen Proteine. Nach Übertragung der Proteinbanden vom Gel auf eine PVDF-Membran können die einzelnen aufgetrennten Banden mit spezifischen Antikörpern gebunden werden. Diese Antikörper werden nun durch Zusatz eines Zweit-Antikörpers gegen den Erst-Antikörper markiert und können dargestellt werden.

## 2.5.2 Präparation der Polyacrylamidgele

Die Laufeigenschaften der Proteine werden entscheidend durch die eingesetzte Acrylamidkonzentration, die den Vernetzungsgrad der Gele bestimmt, beeinflusst. Deshalb wurde die jeweilige Zusammenstellung der Gele den Anforderungen der nachzuweisenden Proteine angepasst. Mit Ausnahme der Blot-Analyse für TNF- $\alpha$ , für die ein 12prozentiges Gel verwendet wurde, wurden ausschließlich 10prozentige Gele verwendet. In Tabelle 2-4 sind die genauen Zusammensetzungen der einzelnen Gele dargestellt.

	10%-Trenngel	12%-Trenngel	5% Sammelgel
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	4,95 ml	6,0 ml	1,3 $\mu$ l
4x Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	
4x Sammelgelpuffer			2,5 ml
10% SDS	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Dest. H <sub>2</sub> O	6,8 ml	5 ml	6,1 ml
10% Ammoniumpersulfat	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	7,5 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l	12 $\mu$ l

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Der Aufbau der Elektrophoresekammer Mini-Protean II (Bio-Rad) erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zwei, vor Gebrauch gründlich gereinigte Glasplatten (12 cm x 10 cm) wurden in die Gelkammer eingeklemmt. In den Zwischenraum der Glasplatten wurde zuerst die Trenngel-Lösung pipettiert. Diese wurde mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach erfolgter Auspolymerisation konnte das Wasser abgegossen werden und die Sammelgel-Lösung aufpipettiert werden. Im direkten Anschluss wurden die Elektrophorese-Kämme eingesetzt, die als Platzhalter für die Probetaschen

dienten. Nach vollständiger Auspolymerisation waren die Gele bereit für den Einsatz in der Elektrophoresekammer.

### **2.5.3 SDS-Page: Gelelektrophorese**

Die Gele wurden jeweils zu zweit, oder unter Einsatz eines Platzhalters in den Klemmrahmen der Laufkammer eingepasst und in den Puffertank eingehängt. Dieser wurde mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Nun konnten die eingesetzten Kämme entfernt werden, so dass die Probetaschen der Gele mit Pufferlösung gefüllt waren und keine Luftblasen enthielten. In die erste Tasche wurde der Molekulargewichtsmarker (4µl) pipettiert. Die restlichen Taschen wurden mit den Proben gemäß ihrer zuvor ermittelten Proteinkonzentrationen gefüllt. Die Proben waren zuvor durch Bromphenolblau angefärbt.

Die Elektrophorese wurde mit 120 V über 90 min, bzw. bis die untere Front des Trenngels erreicht war, durchgeführt.

### **2.5.4 Western-Blot**

Die Western-Blots wurden als Nass-Blots durchgeführt. Hierzu wurden der Blotkäfig mit zwei Schwämmen sowie vier zugeschnittenen Whatman-Filterpapieren in Gelgröße, die zuvor in Transfer-Puffer eingelegt worden waren, präpariert. Zwischen den Schwämmen und jeweils 2 Stück Filterpapier wurden die Membran – diese war zuvor kurz in destilliertem Wasser gespült und anschließend für 10 min im Blotpuffer inkubiert worden - und das Gel so eingelegt, dass keine Luftblasen zurückblieben. Der Käfig wurde in die Blotvorrichtung eingehängt und in den Puffertank gegeben. Dieser wurde mit Transfer-Puffer (Towbin) gefüllt und durch umgebendes Frischeis gekühlt. Der Blotvorgang wurde mit 100 V über 60 min gestartet.

Zur Überprüfung des Erfolgs des Blot-Vorgangs wurde die Membran anschließend mit Ponceau-S angefärbt um die transferierten Proteinbanden darzustellen.

### 2.5.5 Immunreaktion

Nach Waschung in destilliertem Wasser wurde die Membran auf dem Schüttler zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 60 min in Block-Puffer geschwenkt.

Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Erst-Antikörper inkubiert. Hierzu wurde der Antikörper gemäß Empfehlung des Herstellers in der Blockpuffer-Lösung auf ein Endvolumen von 5 ml verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über 24 h. Die genauen Informationen zu den Antikörpern sind in Tabelle 1 dargestellt.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran dreimal für je 10 min in TTBS gewaschen. Anschließend wurde der Zweit-Antikörper – im Verhältnis 1:2000 mit Blockpuffer verdünnt – auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über 30 min. Darauf wurde die Waschprozedur wiederholt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden zur Gewährleistung einer gleichmäßig benetzten Oberfläche auf dem Schüttler durchgeführt.

### 2.5.6 Entwicklung

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte im Fotolabor. Hier wurde die Membran zunächst für eine Minute in Detektionslösung inkubiert. Als Chemilumineszenz diente das ECL-Reagenz zur Auslösung der Peroxidasereaktion. Anschließend wurde die Membran zusammen mit einem Hyperfilm CM in eine Filmkassette gegeben. Die Belichtungszeiten waren von den unterschiedlichen Antikörpern abhängig und lagen zwischen wenigen Sekunden und bis zu 30 Minuten. Die Filmentwicklung erfolgte in der Fotomaschine (Crurix 60).

## 2.6 *Real-time RT PCR*

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der *in-vitro*-Vervielfältigung von Nukleotidsequenzen, die so weiteren molekulargenetischen Verfahren zugänglich sind. Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei dem ein beliebiger DNA-Abschnitt von bis zu 20000 Basenpaaren amplifiziert werden kann, wobei eine Vervielfachung auf bis zu 107

Kopien der Zielsequenz erreicht wird. Benötigt werden für das Verfahren jeweils zwei Oligonukleotidprimer, die die gesuchte Sequenz einrahmen.

Bei der quantitativen *real-time*-PCR wird anstelle der RNA die cDNA amplifiziert. Eine Quantifizierung ist über die Zyklenzahl möglich, bei der eine definierte Menge Amplifikat der Ziel-cDNA entstanden ist. Die *TaqMan RT-PCR* nutzt neben der Taq-Polymerase mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide-Sonde (SYBR Green), die zwischen den beiden PCR-Primern an die Ziel-cDNA hybridisiert. Am 5' Ende der Sonde befindet sich ein Reporter (Fluoreszein), am 3'-Ende ein Quencher (Rhodamin). Ist die Sonde intakt, führt eine Anregung bei 488 nm durch die räumliche Nähe zu einem Fluoreszenz-Energietransfer zwischen Reporter und Quencher, so dass nur die Emission des Quenchers messbar ist. Erst nach der Verdrängung der Sonde durch die Taq-Polymerase während der Extensionsphase der PCR, mit anschließender Ausbildung der Y-förmigen Sekundärstruktur, wird die 5'-3'-Exonuklease aktiviert und die Sonde hydrolysiert. Dies führt zum Auseinanderweichen von Reporter und Quencher und somit zu einem Fluoreszieren des Reporters. Wesentlich sind hierbei die unterschiedlichen Wellenlängenbereiche der Fluoreszenz von Quencher und Reporter. Mit jedem Amplifikationszyklus steigt die Fluoreszenz des Reporters analog zu der Akkumulation der PCR-Produkte an.

Der Anstieg des Reporter-Fluoreszenzsignals wird kontinuierlich im gesamten Verlauf der PCR-Verlauf gemessen. So ist eine gesicherte Quantifizierung in der exponentiellen Phase der Amplifikation möglich.

Die Reaktion wurde in speziellen 96-well *real-time* PCR Platten durchgeführt. Dabei wurde für jeden Reaktionsansatz der Mastermix vorgelegt und die cDNA nachfolgend zugegeben (Tab. 2-5).

<b>Komponente</b>	<b>Eingesetztes Volumen(μL)</b>
2x SYBR Green® Mastermix	10
forward Primer (10 μM)	0,2
reverse Primer (10 μM)	0,2
H <sub>2</sub> O	ad 20
cDNA (2ng/ μL)	1

Tabelle 2-5: **PCR-Reaktionsansatz.**

Zur Überprüfung möglicher Kontamination wurden weitere Reaktionsansätze mit (RT-)-

Kontrolle oder ultra pure H<sub>2</sub>O anstelle der zugesetzten cDNA pipettiert.

Abbildung 2-4 veranschaulicht das verwendete thermale Profil. Im ersten Segment der eigentlichen PCR wurde die cDNA über 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und gleichzeitig die Taq-Polymerase aktiviert. Das zweite Segment diente der Amplifikation: in insgesamt 40 Zyklen wurde zunächst erneut bei 95 °C über 15 Sekunden denaturiert; abgeschlossen wurde jeder Zyklus mit der Primer-Hybridisierung (Annealing) sowie der Synthese (Elongation) bei 60 °C für 60 Sekunden. Nachfolgend wurden die Produkte in einer Schmelzkurvenanalyse getestet. Dafür wurden sie erneut bei 60 °C für 30 Sekunden hybridisiert und anschließend für eine Dauer von jeweils 5 Sekunden stufenweise in 0,5 °C-Schritten auf 99 °C erwärmt. Die PCR-Produkte wurden bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur denaturiert und der Fluoreszenzabfall gemessen. Jede Probe wurde mindestens dreifach gemessen und zu der Expression eines stabil exprimierten Genes (housekeeping-Gene) - die ribosomale Untereinheit 18S - in Relation gesetzt.

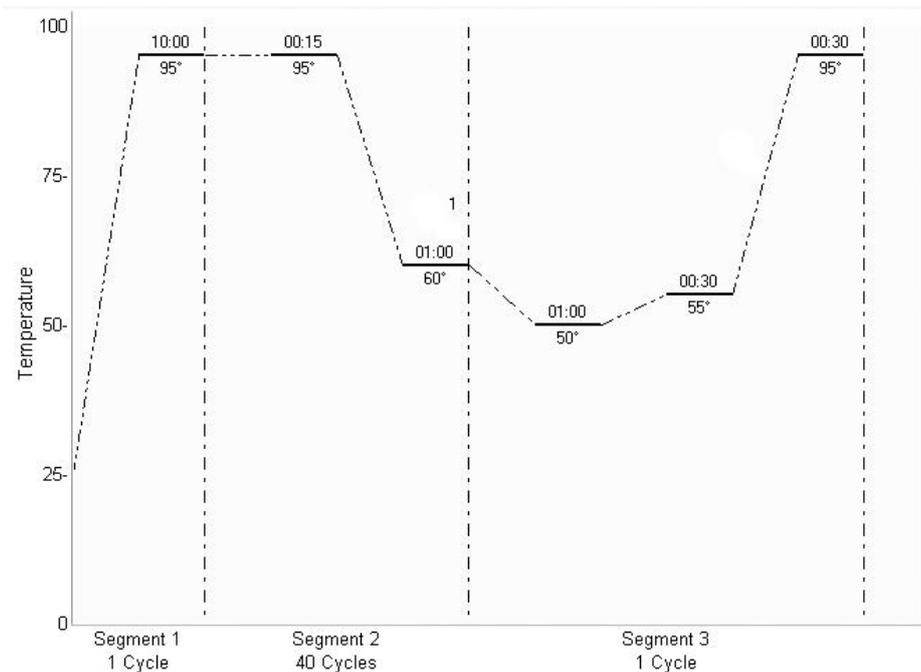


Abbildung 2-3: **Setup der PCR.**

Zur Messung wurde ein ABI7000 Sequence Detection System, ausgerüstet mit der firmeneigenen Software in der Version 2.0, verwendet.

Die quantitative Analyse erfolgte unter Nutzung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Hierbei beschreibt der ct-Wert den festen Schwellenwert („*threshold*“) für die entstandene Fluoreszenz des

Zyklus. Zur Berechnung wurde eine Dreifachbestimmung und arithmetische Mittelung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dann zu einer Standardprobe (100%) unter Bildung des  $\Delta$ CT-Wertes relativiert.

### 2.6.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die isolierte RNA in ihre komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) konvertiert. Dieser Schritt ist für die anschließende *real-time RT* PCR notwendig in der ausschließlich die cDNA als Matrize dient.

Hierzu wurde die RNA unter Einsatz des SuperScript II<sup>®</sup> Protokolls mit Random Primern und dNTPs versetzt und für 5 min bei 65°C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des 5x buffers (4  $\mu$ l) und 0,1 M PTT (2  $\mu$ l) sowie RNAsin (40n/ $\mu$ l). Erneut folgte ein Zwischenschritt über 2 min bei 25°C im Schüttler. Abschließend wurde 1  $\mu$ l SuperScript dazugegeben und für 10 min bei 25°C sowie darauf 50 min bei 42°C geschüttelt. Eine 15minütige Inaktivierung auf dem Schüttler bei 70°C beendete die Transkription.

<u>Komponente</u>	<u>eingesetztes Volumen(<math>\mu</math>L)</u>
Random Primer (100ng)	0,2
dNTPs (10nM)	1
RNA	10,8

Tabelle 2-6: Reaktionsansatz zur reversen Transkription.

## 2.7 Histologie

### 2.7.1 Paraffinschnitte

Die entnommenen Aorten wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd eingelegt. Anschließend wurden sie einige Sekunden in PBS gewaschen und darauf in der Histokinette nach folgendem Protokoll in Paraffin eingebettet:

1. 70% Ethanol; 2 h

2. 90% Ethanol; 2 h
3. 96% Ethanol; 2 h
4. 100% Ethanol; 2 h
5. 100% Ethanol; 2 h
6. Xylol; 20 min
7. Paraffin I; 2 h
8. Paraffin II; 2 h

In der Ausgießstation wurden die Präparate in Metallschälchen platziert, die zuvor mit flüssigem Paraffin gefüllt worden waren. Anschließend konnte die Plastikeinbettkassette als Deckel in das flüssige Paraffin gedrückt werden. Der Paraffingewebeblock wurde nun zunächst zum Aushärten auf die Kühlplatte gestellt und konnte dann im Anschluss aus der Metallkassette ausgebettet werden.

Am Rotationsmikrotom wurden 4µm dicke Schnitte des Paraffingewebeblocks angefertigt. Diese wurden dann im auf 37°C vorbeheizten Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen.

Über Nacht erfolgte die Trocknung und Anbackung der Paraffinschnitte auf den Objektträgern im Wärmeschrank bei 60°C und anschließend die Entparaffinierung mittels Alkoholreihe zur weiteren histologischen Färbung.

### **2.7.2 Weigert-Färbung**

Ein Teil der Präparate wurde nach Weigert-Sirius-Rot angefärbt. Durch die Färbung mit der Weigert-Methode erscheinen elastische Fibrillen der Media rot-braun. Die Sirius-Rot-Färbung färbt zusätzlich die kollagenen Komponenten an. Somit ist eine Beurteilung des strukturellen Fasergerüsts der Media möglich. Es wurde gemäß folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Entparaffinierung durch Xylol; 10-15 min sowie die absteigende Alkoholreihe:  
abs. Alkohol 10 sek – 96% Alkohol 10 sek – 80% Alkohol 10 sek
2. Resorcinfuchsin; 20-30 min
3. In H<sub>2</sub>O spülen

4. Differenzierung in 1-2% HCl-Alkohol, 20 sek; anschließend in H<sub>2</sub>O spülen
5. In dest. H<sub>2</sub>O spülen
6. Weigert A+B, 1 min; anschließend in H<sub>2</sub>O spülen
7. 1-2% HCl-Alkohol; 10 sek
8. In H<sub>2</sub>O bläuen; 5 min
9. In dest. H<sub>2</sub>O spülen
10. Siriusrotlösung 3 min
11. Entwässerung durch aufsteigende Alkoholreihe: 96% Alkohol; 10 sek – abs. Alkohol; 10 sek + Xylol

Nachdem die gefärbten Präparate getrocknet waren, wurden die Objektträger mit einem Deckglas versehen.

Die struktur-morphologische Beurteilung erfolgte unter Erhebung definierter Scores (Tab. 3-1) in Adaptation der Scores aus Experimente an humanen Aorten durch Schlatman *et al.*<sup>118, 119</sup>.

### 2.7.3 Immunohistochemie

Zur Beurteilung der Expressionsmuster unterschiedlicher Proteingruppen wurde ein Teil der Schnitte immunohistochemisch behandelt. Mittels dieses Verfahrens ist es möglich die genaue Lokalisation der untersuchten antigenen Komponenten im Präparat festzustellen. Hierzu binden spezifische Antikörper an die antigenen Determinanten. Die gebunden Antikörper wiederum werden über markierte Sekundär-Antikörper dargestellt. Die Immunfärbung wurde nach der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt. Hierbei wird die starke Affinität des Avidins zu Biotin zur Komplexbildung aus biotinylierten Sekundär-Antikörpern und dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) genutzt.

Es kamen die gleichen Antikörper zum Einsatz, die auch beim Western Blot genutzt wurden. Das folgende Protokoll wurde strikt befolgt:

1. Entparaffinisieren: 3x10 min Xylol, 10 min abs. Alkohol, 5 min 96% Alkohol, 5 min 80% Alkohol, 5 min 70% Alkohol, 5 min H<sub>2</sub>O
2. Citratpuffer 2 min bei 600 Watt vorerwärmen

3. Schnitte in Citratpuffer 5 min bei 600 Watt erwärmen
4. 50 ml H<sub>2</sub>O auffüllen um Austrocknung zu vermeiden, erneut 5 min bei 600 Watt
5. Nach Abkühlung der Schnitte im Citratpuffer: Spülen in PBS
6. Inkubation über 30 min in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol
7. 3 x spülen in PBS
8. Schutz der Schnitte mit Liquid Blocker, anschließend Inkubation über 30 min in 0,015% Blocking Serum
9. Erstantikörper in Blocking-Serum verdünnen (1:100) und auf die Schnitte geben. Über Nacht im Kühlraum inkubieren lassen (ein Kontrollschnitt wurde nur mit PBS bedeckt und diente als Negativkontrolle)
10. 3 x PBS spülen
11. Zweitantikörper in Blocking-Serum verdünnen (1:200), auf die Schnitte geben und 1h bei RT inkubieren, anschließend 3 x PBS spülen
12. 30 min ABC-Reagenz von Vector bei RT, anschließend 3 x PBS spülen
13. 3 min AEC-Reagenz von Vector bei RT, anschließend 3 x PBS spülen
14. 1-5 min in Mayers-Hämalaun färben
15. unter Leitungswasser spülen
16. mit Hydromount eindecken (flüssiges Eindeckmedium)

Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop.

## 2.8 Statistische Berechnungen

Sämtliche Untersuchungsergebnisse wurden mittels Students-*t*-Test auf Signifikanz geprüft. Dabei galten p-Werte kleiner 0,05 als signifikant. Zur Darstellung wurden die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) verwendet.

Als Programme zur Berechnung der Statistik und graphischer Darstellung der Daten wurden Excel 2007 und Microsoft PictureManager benutzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Metabolische Ergebnisse

Der Erfolg der Diät wurde durch die Erhebung metabolischer Parameter überwacht. Das Körpergewicht der Mäuse nach HFD war durch eine signifikante Zunahme der Fettmasse erhöht. Nach 12 Wochen HFD wiesen die Mäuse eine Gewichtszunahme von 15 Prozent auf (Abb. 3-1).

Des Weiteren konnten in funktionellen Untersuchungen metabolische Dysregulationen nach HFD dargestellt werden. HFD-Mäuse wiesen signifikante Veränderungen im Glukose- und Insulintoleranztest (GTT, ITT) auf (Abb. 3-2). Die Mäuse der HFD-Gruppe wiesen nach 12 Wochen Diät eine moderat aber signifikant erhöhte Glukosetoleranz auf (Abb. 3-2a). Ebenso konnte eine signifikante Abnahme der Insulinsensitivität nach HFD nachgewiesen werden (Abb. 3-2b).

Diese Daten belegen die Entwicklung eines pathologisch veränderten Metabolismus nach 12 Wochen HFD.

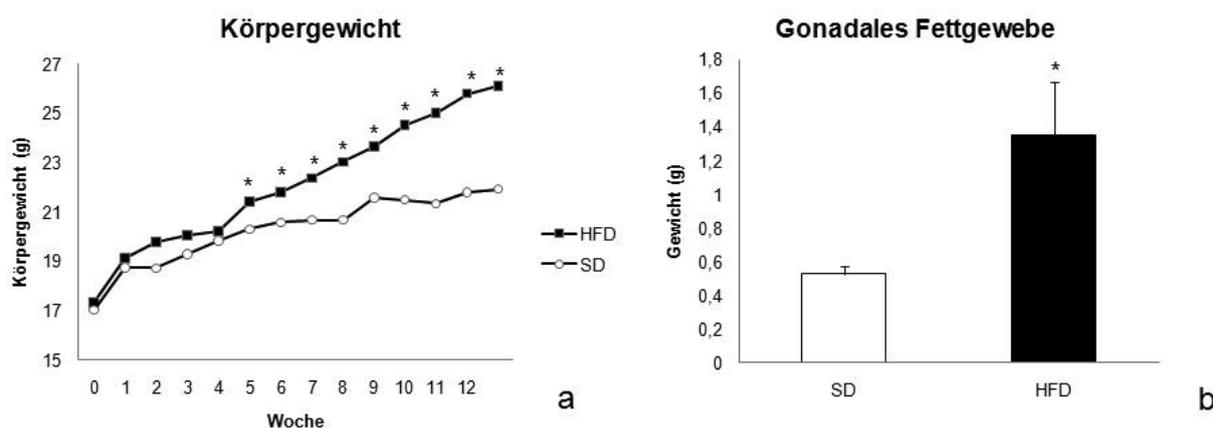


Abbildung 3-1: Effekte der HFD auf Körpergewicht und gonadales Fettgewebe.

a) stellt die absolute Gewichtszunahme im Verlauf der HFD in Bezug auf die Zeit dar. b) zeigt die Gewichtszunahme des gonadalen Fettgewebes als Mittelwert  $\pm$  SEM,  $p^* < 0,05$  ( $n=5$ ).

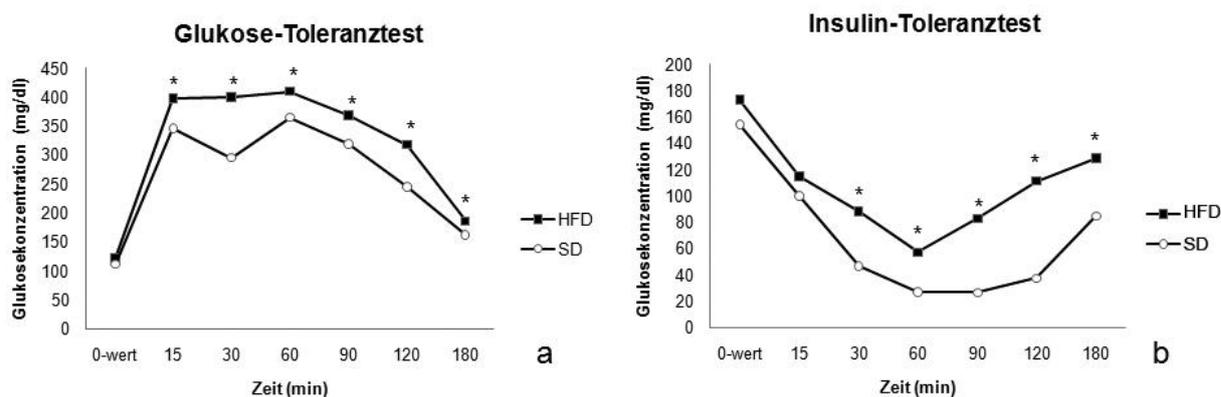


Abbildung 3-2: **Entwicklung von Glukosetoleranz und Insulinsensitivität.**

Der GTT wurde mit 2g/kg Körpergewicht Glukose durchgeführt. Für den ITT wurden 0,5 Einheiten Insulin/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Beide Tests wurden in der 12. Woche durchgeführt. Nachfolgend wurde jeweils Blut der Schwanzvene mittels Glukosometer analysiert. Dargestellt sind die jeweiligen Glukosekonzentrationen beider Untersuchungen,  $p^* < 0,05$  ( $n=5$ ).

## 3.2 Einfluss der HFD auf die strukturelle Integrität der Aorta

### 3.2.1 Aortales outward Remodeling nach HFD

Die histologischen Untersuchungen erfolgten an Präparaten der Aorta abdominalis, die mittels Elastica-Färbung nach Weigert-Sirius-Rot angefärbt worden waren, hinsichtlich strukturell-morphologischer Veränderungen.

In der Histologie der abdominalen Aortenschnitte fand sich in den Präparaten der HFD-Gruppe eine im Vergleich zur SD-Gruppe auffällige Dilatation (Abb 3-3). Mikroskopisch ließ sich eine signifikante 1,5fache ( $p < 0,05$ ) Vergrößerung des aortalen Lumens nach HFD im Vergleich zu SD ermitteln (Abb. 3-4).

Es fand sich ebenfalls eine mit der HFD assoziierte Verdickung der aortalen Media (Abb. 3-4). Die Mediadicke nach HFD war um das 1,5fache erhöht ( $p < 0,05$ ).

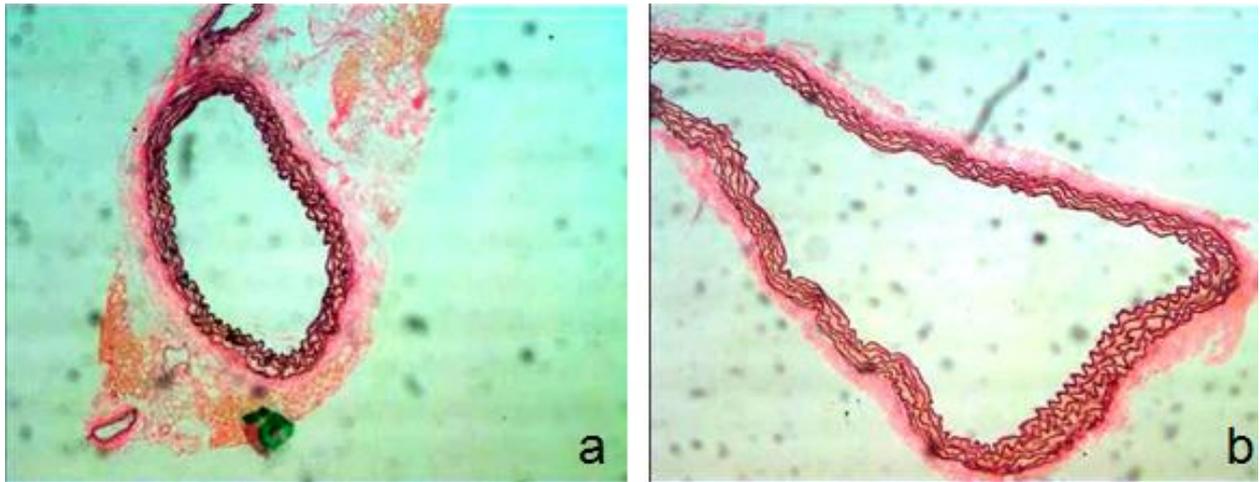


Abbildung 3-3: **Aortale Dilatation nach HFD.**

a) AA aus SD-Maus b) AA aus HFD-Maus. 5x Vergrößerung, Elastica-Färbung nach Weigert-Sirius-Rot.

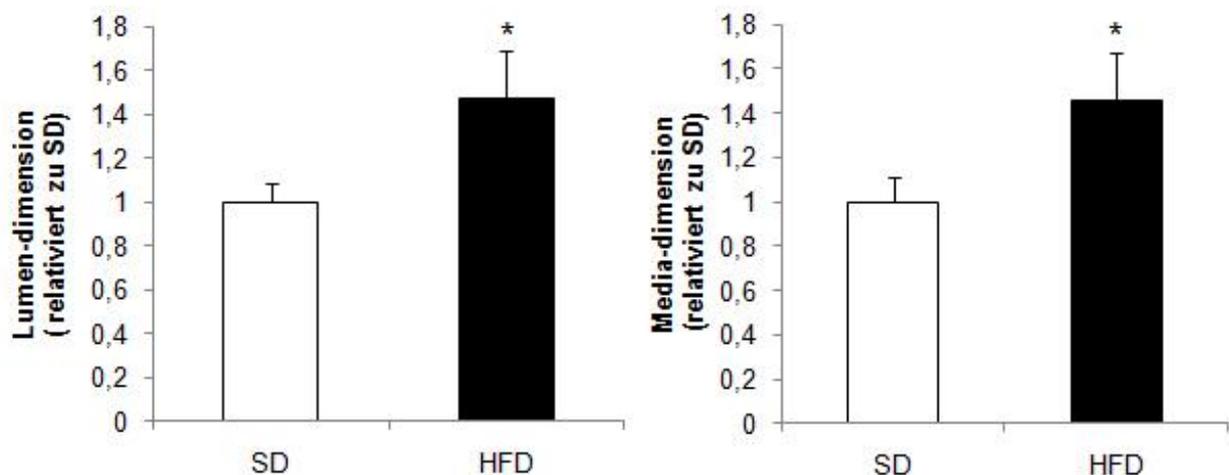


Abbildung 3-4: **Lumen und Media-Dimensionen der Aorta nach HFD.**

Graphische Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Messungen des Lumenumfangs und der Mediadicke unter Relativierung der HFD-Werte auf SD. Die Lumendimension wurde mittels Ausmessung des inneren Lumenumfangs ermittelt. Die Mediadimension ergab sich aus gemittelten Dickenmessungen der Media an mindestens 3 repräsentativen Wandabschnitten,  $p^* < 0,05$  ( $n=10$ ).

### 3.2.2 Strukturelle Degeneration nach HFD

Schwerpunkt unserer histologischen Untersuchungen waren die strukturellen Veränderungen in der Aortenwand.

Die mikroskopische Untersuchung der strukturellen Bestandteile der Aortenwand war detailliert in der 40fachen Vergrößerung möglich (Abb. 3-5).

Abbildung 3-5b zeigt einen deutlichen strukturellen Integritätsverlust nach HFD: findet sich in Abbildung 3-5a (SD) noch ein geordneter Aufbau der Media mit integrem elastischen Netzwerk, sind die elastischen Lamellen nach HFD in Abb. 3-5b diffus fragmentiert und die Media mit zystischen Lipiddepots durchsetzt. Das elastische Lamellennetz der Media ist durch zahlreiche Abbrüche strukturell geschwächt. Die Strukturschwächen sind zystisch durch Fett gefüllt.

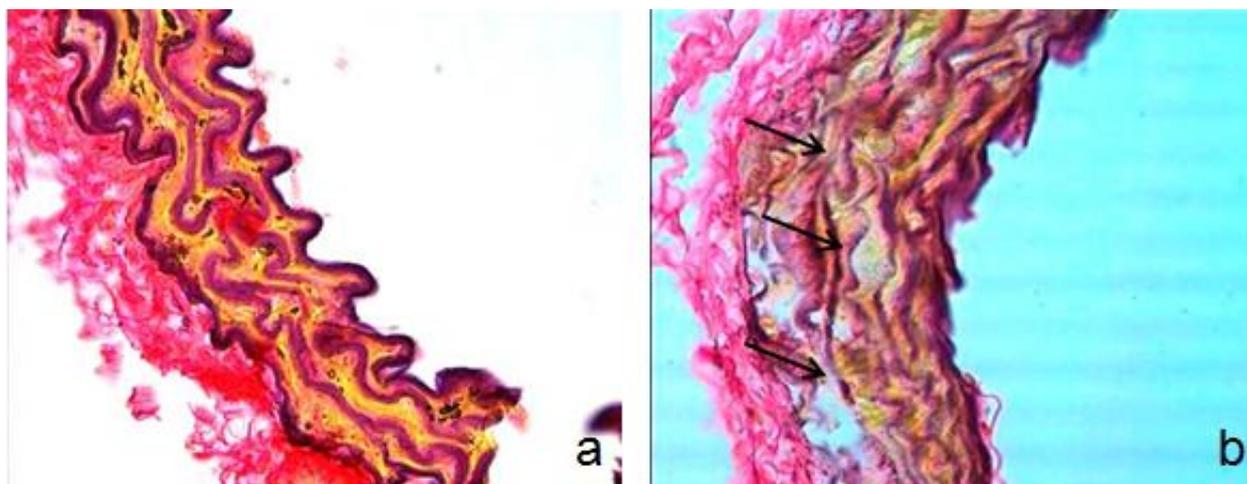


Abbildung 3-5: **Histologische Auswirkungen der HFD in der Aortenwand.**

a) SD-Maus, AA, intaktes, homogenes Elastinfasernetz der Media b) HFD-Maus, AA, diffuse Fragmentation und Auflösung des Fasernetzes mit Fetteinlagerungen. Die Pfeile markieren den diffusen Zersetzungsprozess. 40x, Färbung nach Weigert-Sirius-Rot.

Es folgte die Beurteilung definierter Merkmale dysregulierten *Remodelings*. Dies sind:

1. Erhöhte Zahl an Fragmentationen mit Auflösung der Mediaintegrität.
2. Nachfolgender zystischer Degeneration durch Einlagerung von Lipiddepots.
3. Inflammatorische Infiltration (Aortitis).
4. Dilatation der Aortenwand.

Die Beurteilung dieser Parameter erfolgte mittels semiquantitativer Scores in Anlehnung an das System von Schlatman *et al.*<sup>118, 119</sup>. Hierzu wurden Fragmentationen in der Übersichtsvergrößerung sowie zystische Einlagerungen in 40x-Vergrößerung ausgezählt und bepunktet (Tabelle 3-1).

Fragmentationen	Punkte
<5	1

Lipiddepots	Punkte	5-10	2
<2	1	>10	3
2-5	2		
>5	3		

Tabelle 3-1: **Bewertungsmaßstab für die Erhebung der semiquantitativen Scores.**

Zur quantitativen Beurteilung des Elastinanteils an der Media wurden repräsentative normierte Quadrate der Media in der 40x-Vergrößerung als standardisiertes Schwarz-Weiß-Bild mit dem Programm Image-J densitometrisch ausgewertet (Abb. 3-8).

Die semiquantitativ-histologische Auswertung der HFD-Aorten im Vergleich zu den SD-Aorten zeigte signifikant erhöhte Scores für Fragmentationen (Abb. 3-6) sowie zystische Einlagerungen (Abb. 3-7).

Abbildung 3-8 veranschaulicht den Auflösungsprozess in der Media. Der Elastinanteil in den Aorten nach SD war um das 1,9fache signifikant höher als der in den Aorten nach HFD.

Diese strukturiert-histologischen Untersuchungen belegen ein HFD-assoziiertes *outward Remodeling* der Media als Folge des Integritätsverlusts durch Fragmentation des Elastinnetzwerkes und zystischer Degeneration der Media.

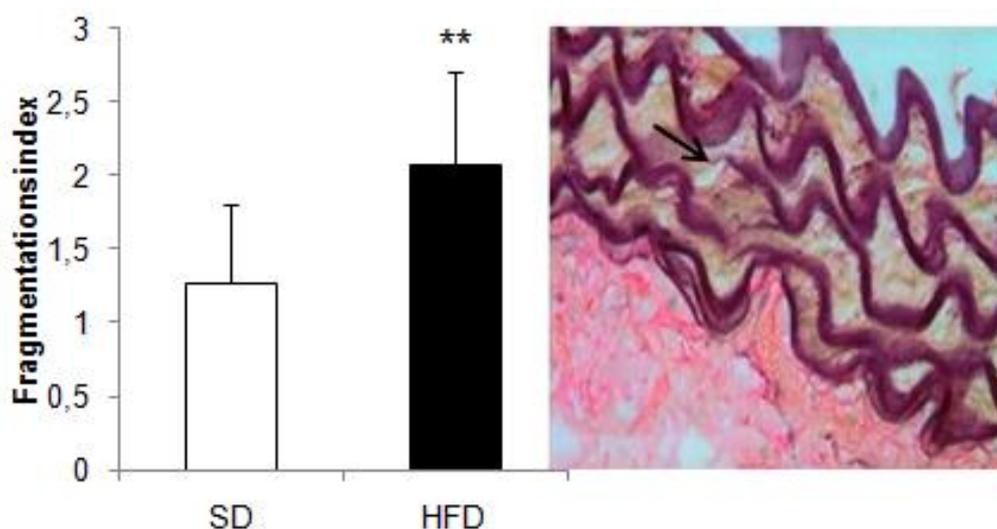


Abbildung 3-6: **Fragmentationsindex.**

Semiquantitativer Score (s. Tab. 3-1). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Scores  $\pm$  Standardabweichung entsprechend der quantitativen Fragmentation ausgewerteter

Aorten. Pfeil markiert fragmentierte Elastinfibrille in AA. 40x, HFD, Weigert-Sirius-Rot-Färbung,  $p^{**}<0,01$  (n=10 SD, n=6 HFD).

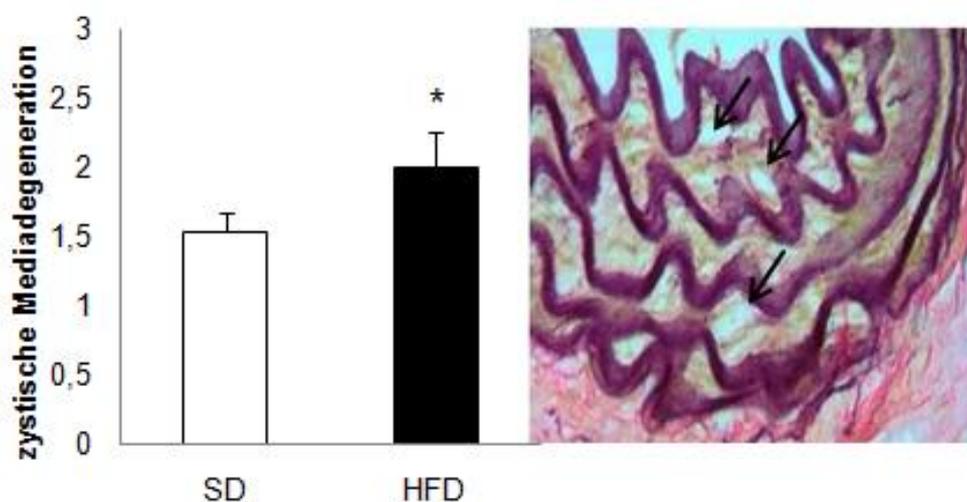


Abbildung 3-7: **Zystische Mediadegeneration.**

Semiquantitativer Score (s. Tab. 3-1); Das Diagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Scores entsprechend der ausgezählten Lipiddepots ausgewerteter Aorten. Pfeile markieren eingelagerte Lipiddepots in AA als Zeichen der Degeneration. 40x, HFD, Weigert-Sirius-Rot-Färbung,  $p^{*}<0,05$ (n=10 SD, n=6 HFD).

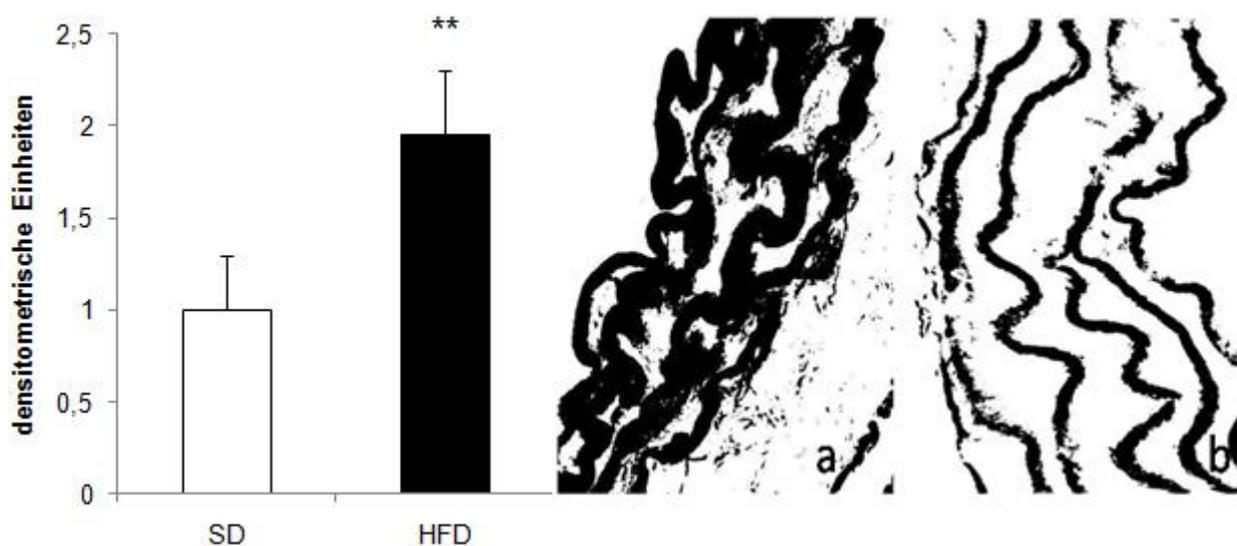


Abbildung 3-8: **Elastin-Fraktion.**

Normierte Schwarz-Weiß-Negative der histologischen Aortenbilder wurden densitometrisch vermessen und so der Anteil der elastischen Lamellen an der Media-Struktur ermittelt. Das Diagramm zeigt die

densitometrischen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der ausgewerteten Aorten nach Relativierung auf SD. a) SD b) HFD, Schwarz-Weiß-Negative, 40x Vergrößerung,  $p^{**}<0,01$ (n=10 SD, n=6 HFD).

### 3.2.3 PVAT und HFD

Die Aorten der Mäuse nach HFD waren makroskopisch mit einer deutlich größeren Fettschicht umgeben als die Aorten der Vergleichsgruppe. Der erhöhte Fettanteil – ein weiteres Maß für den Erfolg der Diät - wurde für die folgenden Versuche während der Isolierung reduziert.

Sowohl Adventitia als auch Media der HFD-Mäuse waren auch auf mikroskopischer Ebene deutlich von Fett durchsetzt. Die eindrucklichste Akkumulation von Fett fand sich nach HFD im perivaskulären Fettgewebe, das sich direkt an die Adventitia anschließt (Abb. 3-9).

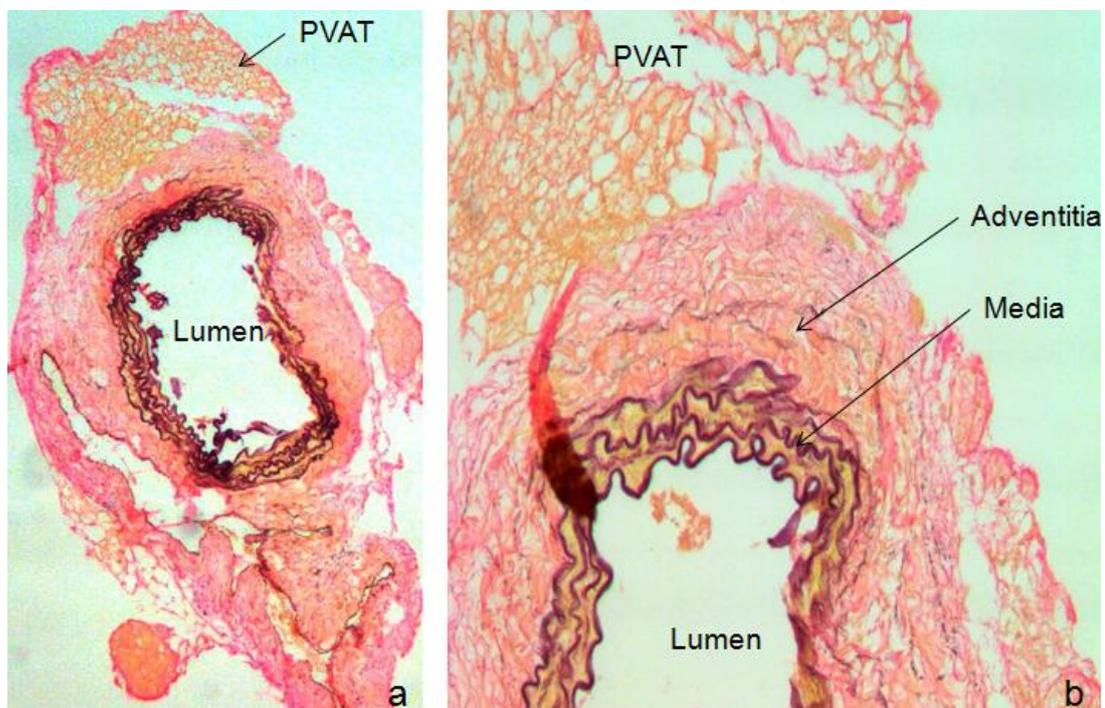


Abbildung 3-9: **Histologische Darstellung des HFD-Einfluss: PVAT.**

Präparat einer Maus-Aorta nach HFD, Weigert-Sirius-Rot-Färbung; a) 5x Vergrößerung; b) 20x Vergrößerung – deutliche Fettanreicherung im PVAT und Depotzystenbildung in der Media.

### 3.3 Proteasen-Aktivität in der Aorta nach HFD

Die Fragmentation des elastischen Netzwerkes sowie allgemeine *Remodeling*-Prozesse werden von Proteasen vermittelt. Unterschiedliche Mitglieder der Proteasen-Familie und ihre Gegenspieler regulieren die Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix und unterliegen strengen Kontrollmechanismen.

Mikroskopisch konnten wir eine Assoziation von HFD mit pathologisch erhöhtem vaskulären *Remodeling* und Fragmentation elastischer Fibrillen der Aortenwand nachweisen.

In den folgenden molekularbiologischen Experimenten untersuchten wir die proteolytische Aktivität in der aortalen Gefäßwand nach SD und HFD.

#### 3.3.1 Matrix-Metalloproteinasen

MMPs sind spezifische Marker proteolytischer Aktivität (siehe 1.3.1). Die Matrixmetalloproteinasen gehören zu den Peptidasen, verantwortlich für den Abbau extrazellulärer Matrixkomponenten wie Kollagen, Elastin, Fibronectin, Laminin und Proteoglykanen. Sie spielen eine bedeutende Rolle im vaskulären *Remodeling*, aber auch bei der Reorganisation des Fettgewebes bei diätinduzierter Adipositas<sup>37</sup>.

Per Immunohistochemie und Immunoblotting testeten wir den Einfluss der HFD auf die Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, sowie des Stromelysins MMP-3 und der Metalloelastase MMP-12 in der Aortenwand. Diese Metalloproteinasen spielen eine besondere Rolle im Rahmen des *outward Remodelings*<sup>11</sup>.

##### 3.3.1.1 Gelatinasen

Die Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) spalten, nach Aktivierung aus der Proform

über den Ras-Signalweg, Kollagen Typ I, II, III, IV, V, VII, X und XI sowie Gelatin Typ I, Aggrecan, Elastin, Laminin und Proteoglykane.

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte durch den Western Blot. Abbildung 3-10 zeigt repräsentative Western Blots und auch die densitometrischen Mittelwerte sowohl für MMP-2 als auch MMP-9.

Bei 63 kDa konnten wir die aktive Form von MMP 2 darstellen. Nach HFD wiesen die Aorten der Mäuse einen 13fach höheren Gehalt von aktiviertem MMP 2 auf als die der Tiere nach SD.

Die aktive Bande von MMP-9 ließ sich bei 92 kDa nachweisen. Erneut fand sich eine signifikant erhöhte Proteinexpression von MMP-9 in den Aorten der Tiere nach HFD im Vergleich zur SD-Gruppe. Die MMP-9-Expression war in HFD-Aorten etwa 1,9fach höher als in denen nach SD.

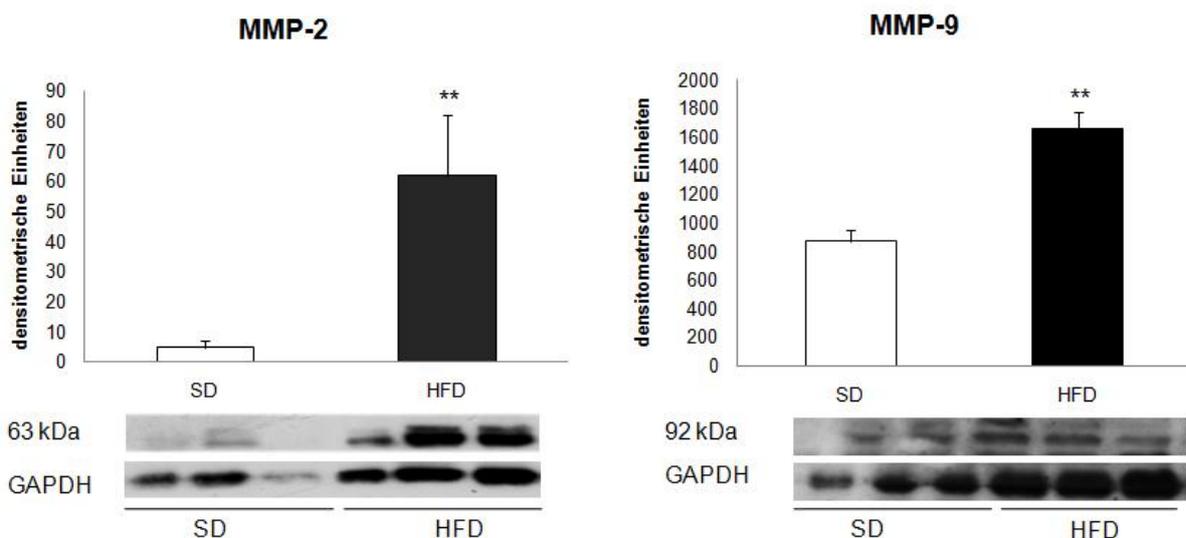


Abbildung 3-10: **Effekt der HFD auf die aortale MMP-2 und MMP-9-Expression.**

Densitometrische Western Blot-Auswertung mindestens 3 unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM, sowie repräsentative Blots und deren housekeeping-Bezug auf GAPDH,  $p^{**} < 0,01$ .

Um die MMPs histologisch zu lokalisieren, führten wir eine immunohistochemische Färbung gegen MMP-2 durch.

Es gelang die Färbung gegen MMP-2 in der Media sowie den perivaskulären Fettdepots der Aorta von HFD-Tieren (Abb. 3-11b+c). In den Vergleichspräparaten nach SD war immunohistochemisch die Aktivität deutlich reduziert (Abb. 3-11a).

Kontrollfärbungen bestätigten eine isolierte Anfärbung der untersuchten Proteine.

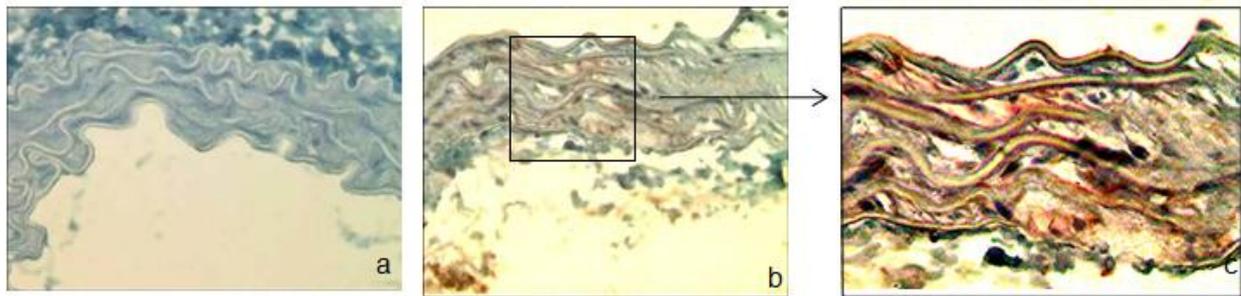


Abbildung 3-11: **MMP-2-Immunohistochemie.**

Immunohistochemische Färbung der Mauseorta gegen MMP-2 (rot). a) SD-Maus AA (20x): keine Anfärbung gegen MMP-2, b) HFD-Maus AA (20x): nachweisliche Aktivität von MMP-2 in der Media sowie in der angeschnittenen Adventitia, c) vergrößerter Ausschnitt aus b.

### 3.3.1.2 MMP-3 und MMP-12

Stromelysin-1 (MMP-3) findet sich in VSMC und Fibroblasten, es ist erhöht bei arteriellen Gefäßerkrankungen und Hypertonie. Die Metalloelastase MMP-12 wird in Makrophagen gebildet. Sie spaltet neben Kollagen Typ IV auch Elastin, Fibronectin, Gelatin und Laminin und ist ein Marker inflammatorischer Infiltration.

Abbildung 3-12 zeigt repräsentative Western Blots für MMP-3 und MMP-12 und die densitometrischen Mittelwerte.

Bei 55 kDa konnten wir die aktive Form des MMP-3 nachweisen. Und erneut fand sich eine signifikant erhöhte Konzentration in den abdominellen Aorten der Mäuse nach HFD. Die Proteinexpression von MMP-3 war nach HFD 3,5fach höher als nach SD.

Die aktive Bande für MMP-12 liegt bei 59 kDa. Auch MMP-12 war nach HFD signifikant erhöht. Die MMP-12-Expression war nach HFD um das 3,1fache erhöht im Vergleich zur SD-Gruppe.

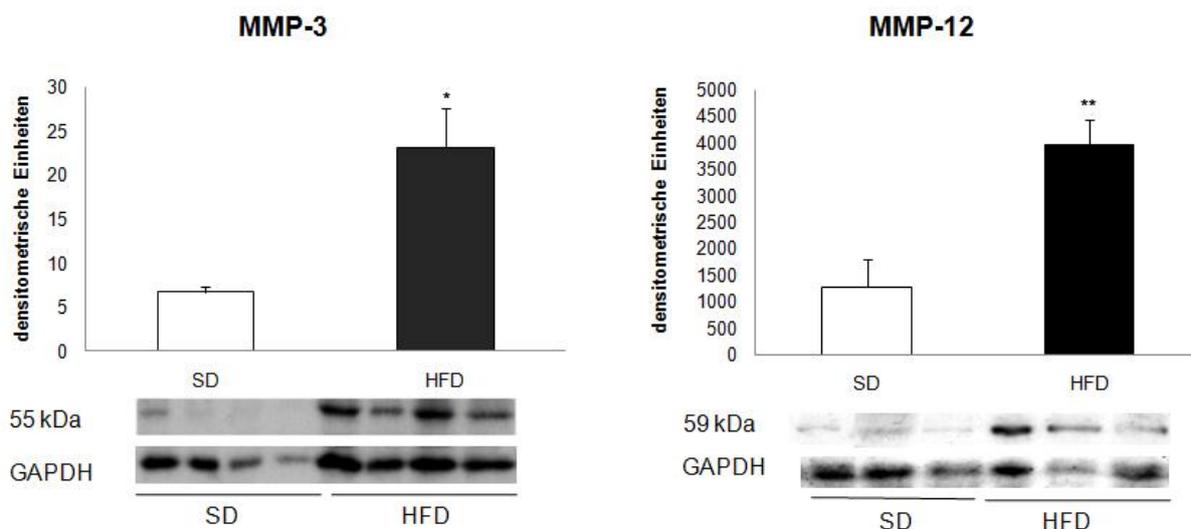


Abbildung 3-12: **Effekt der HFD auf die aortale MMP-3 und MMP-12-Expression.**

Densitometrische Western Blot-Auswertung mindestens 3 unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM, sowie repräsentative Blots und deren housekeeping-Bezug auf GAPDH,  $p^* < 0,05$ ,  $p^{**} < 0,01$ .

### 3.3.2 Tissue inhibitors of metalloproteinases

Zur genauen Einordnung der MMP-Aktivitäten untersuchten wir zusätzlich auch deren direkte Gegenspieler die TIMPs. Diese hemmen spezifisch MMPs und sorgen so für die Balance zwischen Matrixdestruktion und –formation. Wir untersuchten TIMP-1 und TIMP-3.

TIMP-1 ist ein 28 kDa Glykoprotein. Uns gelang die Darstellung der aktiven Bande im Western Blot (Abb. 3-13). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SD- und HFD-Tieren. Und auch für das 30 kDa große Protein TIMP-3 ließen sich keine signifikanten Änderungen im Expressionsmuster nach HFD nachweisen.

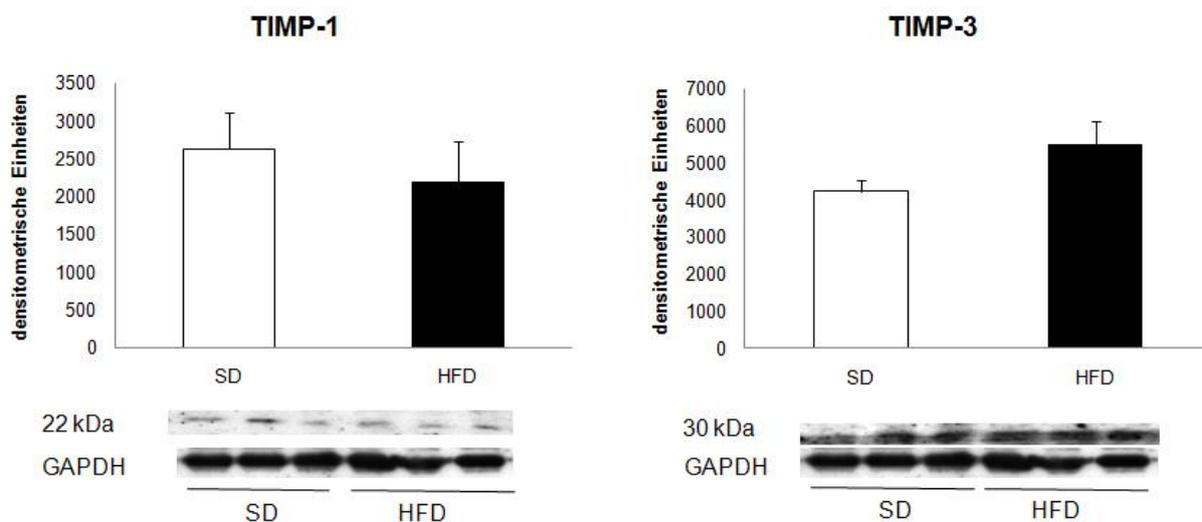


Abbildung 3-13: **Effekt der HFD auf die aortale TIMP-Expression.**

Densitometrische Western Blot-Auswertung mindestens 3 unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM, sowie repräsentative Blots und deren housekeeping-Bezug auf GAPDH,  $p=n.s.$

Immunohistochemische Kontrollexperimente bestätigten die Ergebnisse des Western Blots. Es fanden sich keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Detektion von TIMP-1 zwischen SD- und HFD-Aorten, die als adäquate Reaktion auf die verschiedenen hohen MMP-Aktivitäten zu werten wären (Abb. 3-14). Sowohl in den SD-Mäusen als auch in den HFD-Mäusen gelang eine schwache Anfärbung gegen TIMP-1 in der aortalen Media. Kontrollfärbungen bestätigten eine isolierte Anfärbung der untersuchten Proteine.

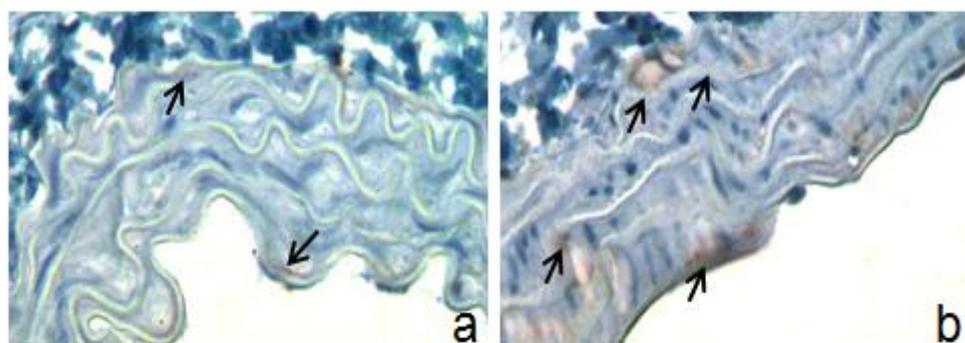


Abbildung 3-14: **TIMP-1-Immunohistochemie.**

Immunohistochemische Färbung der Mauseorta gegen TIMP-1. a) SD-Maus AA b) HFD-Maus AA: nur schwache Anfärbung sowohl in der SD- als auch HFD-Maus. Pfeile markieren angefärbte Aktivitätsareale, 40x.

### 3.3.3 Cathepsine

Die Cathepsine sind ein weiteres Mitglied der Familie proteolytischer Enzyme. Sie enthalten unterschiedlichen Klassen von Proteasen, nach denen sie klassifiziert werden. Cathepsin B gehört zur Klasse der lysosomalen Cystein-Proteasen, Cathepsin D zu den Aspartyl-Proteasen. Sie kommen lysosomal vor und sind an den metabolischen Prozessen der Zelle – wie Peptid-Synthese und Protein-Abbau – beteiligt (s. 1.3.3).

Cathepsin B wird in den luminalen Endothelzellen exprimiert: es ist ein Marker des sekretorischen Zelltodes. Cathepsin B wird als latente Proform sezerniert nach proteolytischer Spaltung in eine Einzelkette und Deglykosylierung entsteht die 25 kDa-aktiv-Form. Uns gelang die Darstellung von Cathepsin B bei 25 kDa als aktive Form (Abb 3-15).

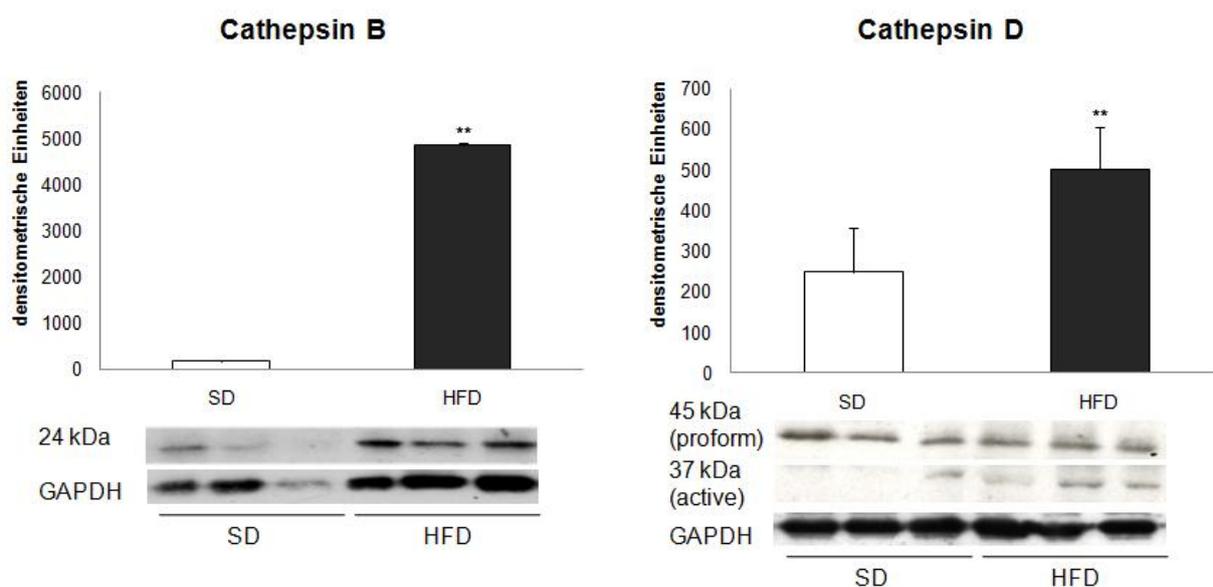


Abbildung 3-15: **Effekt der HFD auf aortale Cathepsin B- und -D-Expression.**

Densitometrische Western Blot-Auswertung mindestens 3 unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM, sowie repräsentative Blots und deren housekeeping-Bezug auf GAPDH. Für Cathepsin D ist zusätzlich die gleichmäßig exprimierte Proform im Blot dargestellt,  $p^{**} < 0,01$ .

Immunohistochemisch gelang uns die Bestätigung der Immunoblotting-Ergebnisse: die Anfärbung gegen Cathepsin B gelang deutlich in der Media der HFD-Aorten. SD-Aorten ließen sich dagegen kaum anfärben (Abb. 3-16). Kontrollfärbungen bestätigten eine isolierte Anfärbung der untersuchten Proteine.

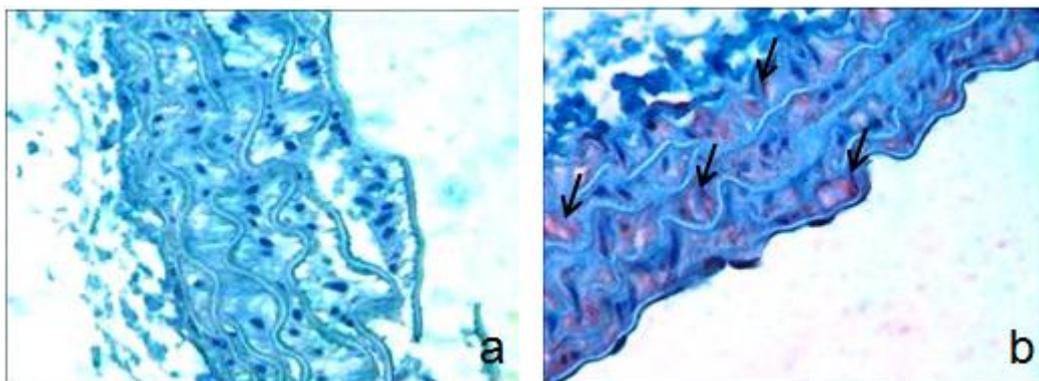


Abbildung 3-16: **Cathepsin B-Immunohistochemie.**

Immunohistochemische Färbung gegen Cathepsin B. a) SD-Maus AA b) HFD-Maus AA: deutliche Anfärbung der Media in HFD-Tieren. 20x, Pfeile markieren angefärbte Aktivitätsareale.

Cathepsin D bewirkt die Spaltung von Peptidbindungen bevorzugt hydrophober Aminosäuren. Cathepsin D stellte sich in der mittleren Bande bei 45 kDa für alle aufgetragenen Proben – sowohl HFD als auch SD - deutlich dar. Hiermit wiesen wir die inaktive einkettige Proform des Cathepsins nach. Nach weiterer proteolytischer Prozessierung in Endosom und Lysosom entsteht die *mature*-Form des Cathepsin D. Wir konnten deren schwere Kette bei 37 kDa nachweisen (Abb. 3-15). Erneut ließ sich diese für die HFD-Proben deutlicher darstellen als für die SD-Proben: die Aktivität von Cathepsin D war nach HFD signifikant erhöht. Die Cathepsin-D-Expression war nach HFD auf das doppelte gesteigert.

Auch für Cathepsin D konnten diese Resultate in der Immunohistochemie histologisch reproduziert werden. Die HFD-Media war deutlich stärker angefärbt als die SD-Media (Abb. 3-17). Kontrollfärbungen bestätigten eine isolierte Anfärbung der untersuchten Proteine.

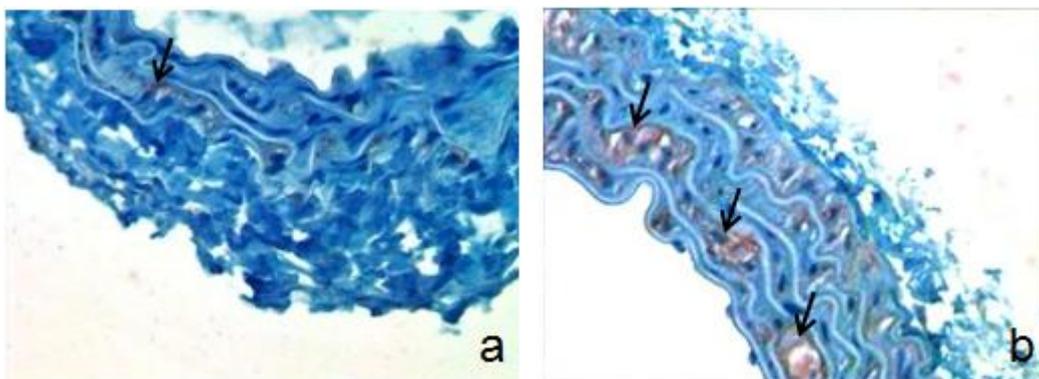


Abbildung 3-17: **Cathepsin D-Immunohistochemie.**

Immunohistochemische Färbung gegen Cathepsin D. a) SD-Maus b) HFD-Maus: deutlich stärkere Anfärbung der Media nach HFD. 20x, AA, Pfeile markieren angefärbte Aktivitätsareale.

### 3.4 Zytokine

Die Degradierung der ECM wird teilweise durch proinflammatorische Faktoren ausgelöst. Zytokine stimulieren die Expression von Proteasen und haben direkten Einfluss auf das Derangement zwischen MMPs und TIMPs<sup>120, 121</sup>. Wir untersuchten die Zytokine TNF-alpha sowie Interleukin-1 beta.

TNF- $\alpha$  spielt eine entscheidende Rolle in Inflammation und Immunprozessen aber auch bei Adipositas und Insulinresistenz. Weiterhin reguliert TNF- $\alpha$  die Aktivität zahlreicher Mediatoren und nimmt so eine Schlüsselstellung in der Kontrolle von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose sowie proteolytischer Aktivität ein.

TNF- $\alpha$  stellte sich im Western Blot als Bande bei 17 kDa dar. Die Aktivität nach HFD im Vergleich zur SD-Gruppe war signifikant um das 1.5fache erhöht (Abb. 3-18).

Immunohistochemisch ließ sich die Media deutlich anfärben (Abb. 3-19). Weiterhin konnte in der Immunhistochemie nach HFD eine starke Anfärbung gegen TNF- $\alpha$  in Adventitia sowie perivaskulärem Fettgewebe aufgezeigt werden.

Kontrollfärbungen bestätigten eine isolierte Anfärbung der untersuchten Proteine.

Interleukin-1 $\beta$  ist mit allgemeinen Entzündungsreaktionen assoziiert. Es spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Immunantwort. Über Interleukin-1 $\beta$  wird die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen vermittelt.

Für IL-1 $\beta$  stellten sich zwei starke aber unspezifische Banden bei 72 und 28 kDa dar. Bei 44 kDa war die Bande für das Fusions-Protein nachweisbar. In den Proben der HFD-Mäuse war die Aktivität von IL-1 $\beta$  gegenüber der SD-Gruppe signifikant um das 23fache erhöht (Abb. 3-18).

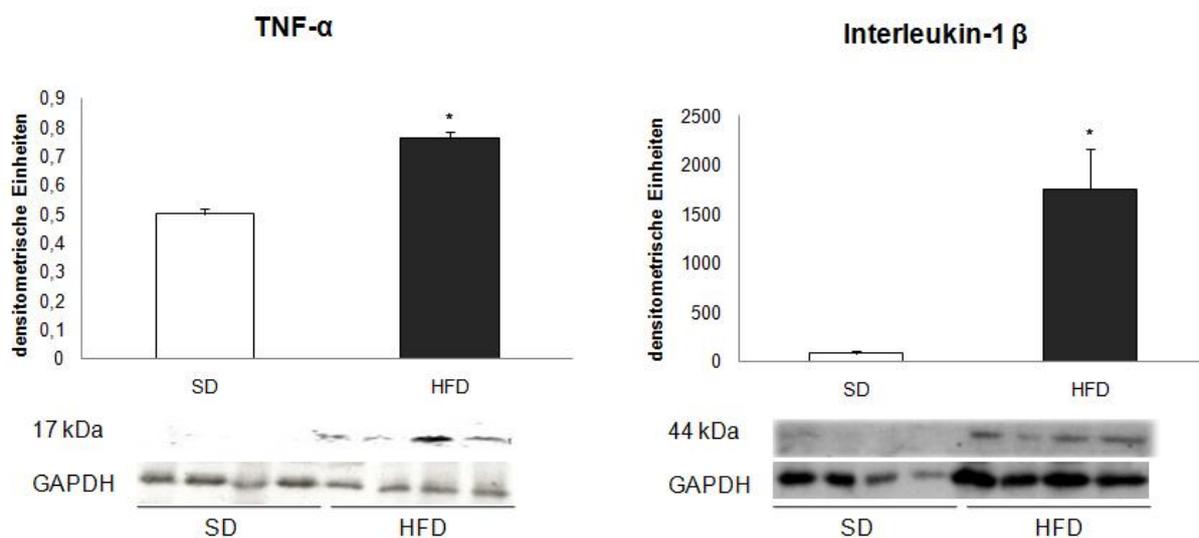


Abbildung 3-18: **Effekt der HFD auf TNF- $\alpha$ - und Interleukin-1 $\beta$ -Expression.**

Densitometrische Western Blot-Auswertung mindestens 3 unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM, sowie repräsentative Blots und deren housekeeping-Bezug auf GAPDH,  $p^* < 0,05$ .

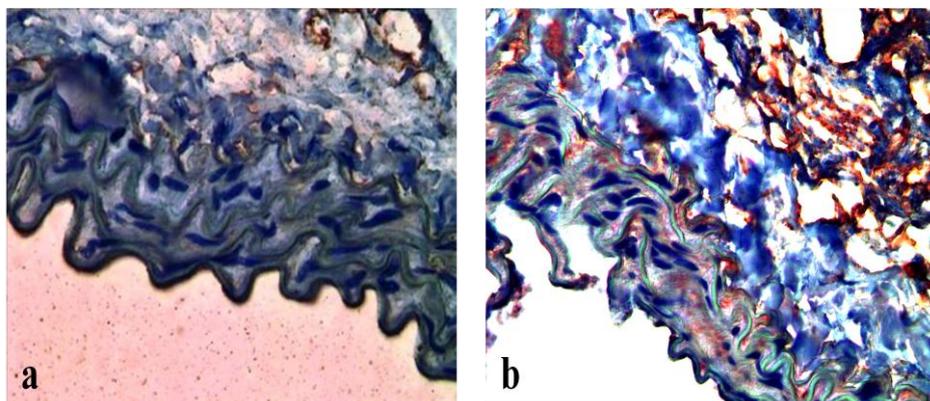


Abbildung 3-19: **TNF- $\alpha$ -Immunohistochemie.**

Immunohistochemische Färbung der Mousaorta gegen TNF- $\alpha$ . a) SD-Maus AA b) HFD-Maus AA: diffuse Anfärbung nach HFD sowohl in der Media als auch in der Adventitia und dem perivaskulären Fettgewebe (rötliche Färbung), 20x.

### 3.5 Proteolytische und proinflammatorisch Aktivität des peri-vaskulären Fettgewebes – Quelle für Proteasen und Zytokine

Zur ganzheitlichen Untersuchung der Aorta wurde das PVAT während der Isolierung nur anteilig reduziert. In der immunohistochemischen Färbung war so eine Darstellung sämtlicher Wandschichten (Intima, Media, Adventita) sowie des angeschnittenen PVAT in der unmittelbaren Umgebung möglich.

Neben der bereits beschriebenen erhöhten proteolytischen und proinflammatorischen Aktivität in der Media, war die hohe Konzentration von Proteasen und Cytokinen im benachbarten Fettgewebe besonders eindrücklich. Gegen sämtliche untersuchten Proteasen sowie TNF- $\alpha$  war das PVAT stark anfärbbar (Abb. 3-20).

Für die vorliegende Arbeit stellte sich nun die Aufgabe, Zusammenhänge zwischen der erhöhten Proteolyse im Fettgewebe und der proteolytischen Aktivität in der Media nachzuweisen. Ist die proteolytische Aktivität im PVAT Quelle der Proteolyse in der benachbarten Aortenwand?

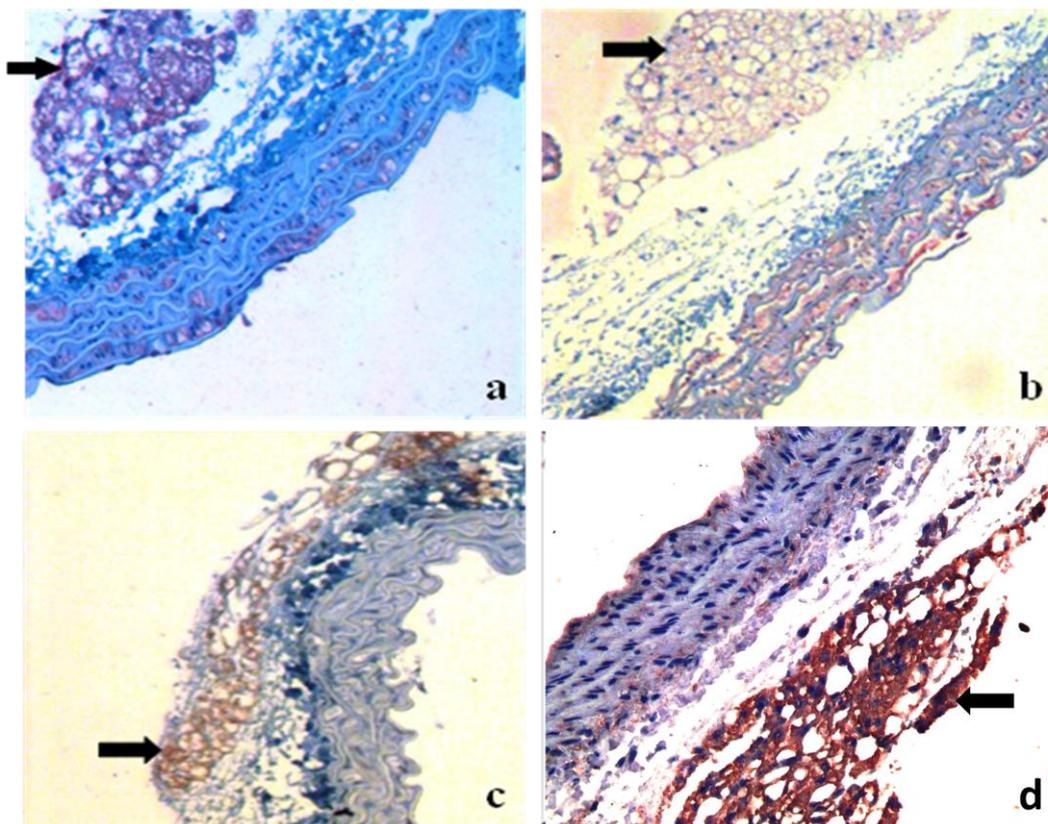


Abbildung 3-20: **Immunohistochemischer Nachweis proteolytischer und proinflammatorischer Aktivitäten nach HFD im PVAT.**

immunohistochemische Färbungen gegen a) Cathepsin B, b) Cathepsin D, c) MMP-2, d) TNF- $\alpha$ ; Pfeile markieren die kräftig angefärbten, als PVAT organisierten Adipozyten, 20x.

### 3.5.1 TNF-alpha-Stimulation in 3T3-L1-Prädipozyten

Um die Zustände, die wir im Tiermodell histologisch und molekularbiologisch darstellen konnten, zu simulieren, wurden 3T3-L1-Prädipozyten Serum-depriviert und anschließend über 24h mit TNF- $\alpha$  inkubiert. Es sollte so die stark erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration im PVAT nach HFD nachvollzogen werden, um so dessen Rolle innerhalb der proteolytischen Aktivierung zu untersuchen. Nach erfolgreicher Differenzierung wurden die Adipozyten für 16 Stunden depriviert und anschließend mit DMSO bzw. TNF- $\alpha$  und den unterschiedlichen Effektoren behandelt. Zum Einsatz kam der AT1-Antagonisten Telmisartan (10 $\mu$ M), der sich durch seine besondere Lipophilie besonders eignete und dessen antiinflammatorischen und antiproteolytischen Effekte im Gefäßsystem sowie insulinsensitivierenden Eigenschaften als partiellen PPAR $\gamma$ -Agonisten im Fettgewebe bereits beschrieben sind<sup>111</sup> (vgl. 1.5.1). Zum Vergleich nutzten wir den synthetischen Voll-PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon (10 $\mu$ M) aus der Gruppe der Glitazone. Glitazone bewirken eine Umstrukturierung des Fettgewebes mit Neudifferenzierung zu kleineren insulinsensitvierten Adipozyten.

Es gab somit vier unterschiedliche Gruppen: 1. unstimulierte Adipozyten, die als Kontrollgruppe dienten, 2. TNF- $\alpha$ -stimulierte Adipozyten, 3. TNF- $\alpha$ -stimulierte Adipozyten die zusätzlich mit Telmisartan behandelt worden waren und 4. TNF- $\alpha$ -stimulierte Adipozyten mit zusätzlicher Pioglitazon-Behandlung.

Ziel war es den Einfluss der TNF- $\alpha$ -Stimulation auf die Aktivität der Proteasen zu untersuchen. Die unterschiedlichen Effektoren sollten mögliche Signalkaskaden aufdecken und die Rolle von TNF- $\alpha$  weiter beleuchten. Mittels quantitativer *real-time RT-PCR* und Western-Blot wurden Expression und Aktivität von ausgewählten MMPs und Cathepsinen bestimmt.

### 3.5.2 Cathepsine in 3T3-L1-Zellen

Hinsichtlich der Cathepsin-Familie untersuchten wir Cathepsin B und Cathepsin D, welche wir bereits in den Gewebe-Western-Blots ausgewertet hatten.

Wir konnten mittels *real-time RT-PCR* mRNA der Cathepsine in den unstimulierten Adipozyten (Control) nachweisen. Nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  fand sich eine signifikante Steigerung der Expressionrate.

Die zusätzliche Behandlung mit Telmisartan oder Pioglitazon bewirkte eine Reduktion der Expression sowohl von Cathepsin B als auch Cathepsin D (Abb. 3-21).

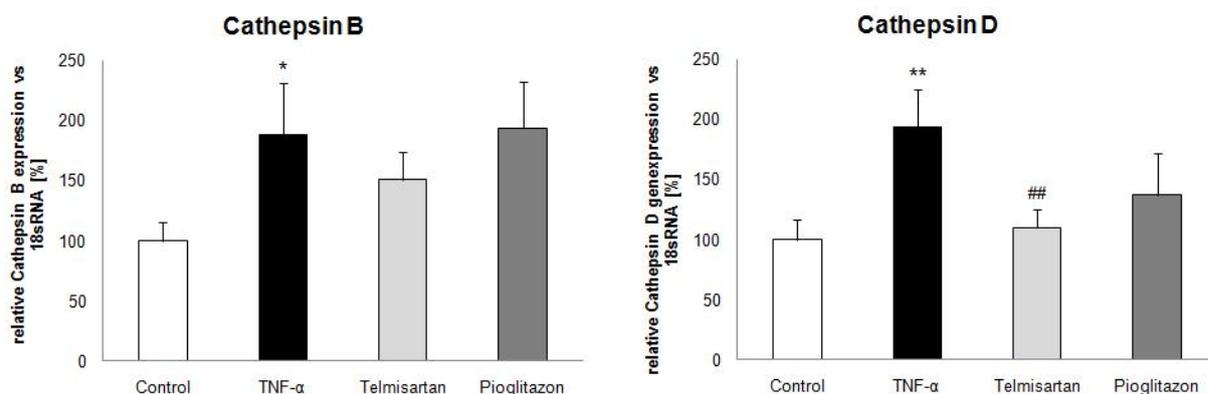


Abbildung 3-21: Analyse der adipozytären Cathepsin B- und D-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation.

Resultate der *real-time RT* PCR-Analyse nach 24h Inkubation, normalisiert auf 18S rRNA. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten sind angegeben in Prozenten relativ zur mRNA-Expression un behandelter Adipozyten (Control),  $p^{**}<0,01$  vs. Control,  $p\#<0,05$  vs. TNF- $\alpha$ .

Die PCR-Ergebnisse für Cathepsin B und D ließen sich per Western Blot auf Ebene der Proteinexpression bestätigen. Die Cathepsin-Expression in den Adipozyten war nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  erhöht. Eine Behandlung mit Telmisartan oder Pioglitazon reduzierte die Aktivität der Cathepsine (Abb. 3-22).

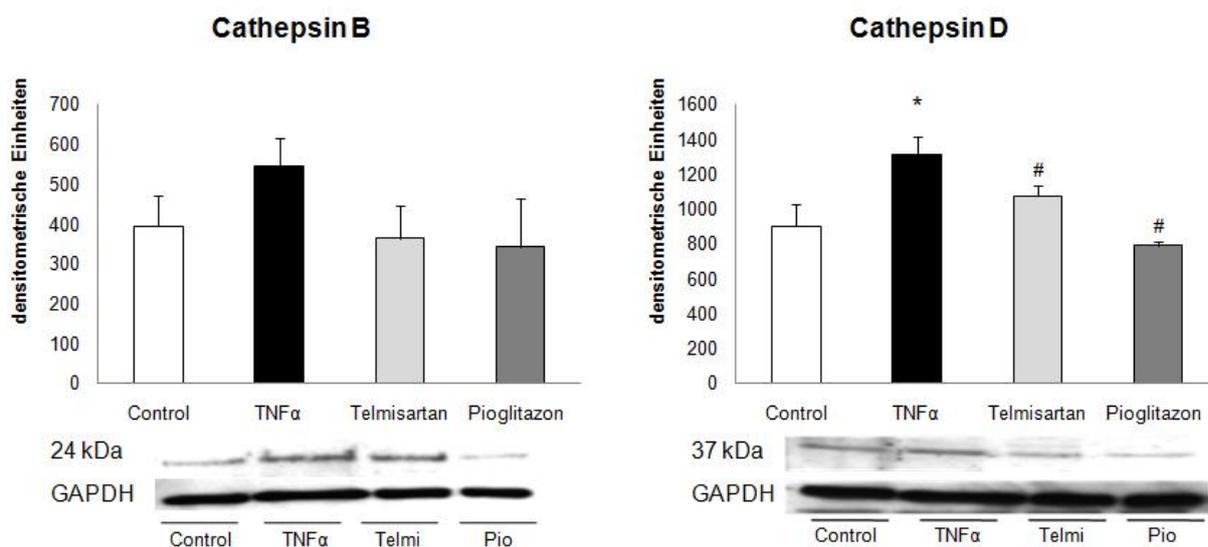


Abbildung 3-22: Analyse der adipozytären Cathepsin B- und D-Proteinexpressionslevel nach TNF- $\alpha$ -Stimulation sowie Telmisartan- und Pioglitazonwirkungen.

Densitometrische Western Blot-Auswertung mindestens 3 unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM, sowie repräsentative Blots und deren housekeeping-Bezug auf GAPDH,  $p^{*}<0,05$  vs. Control,  $p\#<0,05$  vs. TNF- $\alpha$ .

### 3.5.3 MMPs in 3T3-L1-Zellen

Erneut untersuchten wir die Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 sowie -3. Diese waren nachweislich in den unstimulierten Adipozyten (Control) exprimiert. Unstimulierte Adipozyten waren über MMP-2, MMP-9 und MMP-3 proteolytisch aktiv. Diese Aktivität war nach TNF- $\alpha$ -Stimulation signifikant erhöht. Eine zusätzliche Behandlung sowohl mit Telmisartan als auch Pioglitazon führte zu einer Senkung der Expressionsrate der unterschiedlichen MMPs (Abb. 3-23 und 3-24).

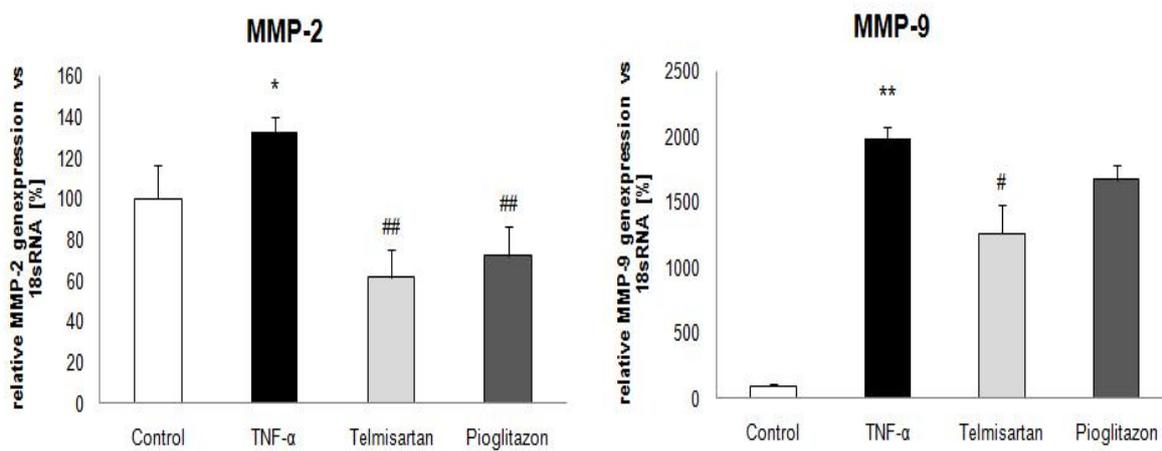


Abbildung 3-23: Analyse der adipozytären MMP-2- und MMP-9-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation.

Resultate der *real-time RT* PCR-Analyse nach 24h Inkubation, normalisiert auf 18S rRNA. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten sind angegeben in Prozenten relativ zur mRNA-Expression unbehandelter Adipocyten (Control),  $p^{**}<0,01$  vs. Control;  $p\#<0,05$  vs. TNF- $\alpha$ ;  $p\#\#\#<0,01$  vs. TNF- $\alpha$ .

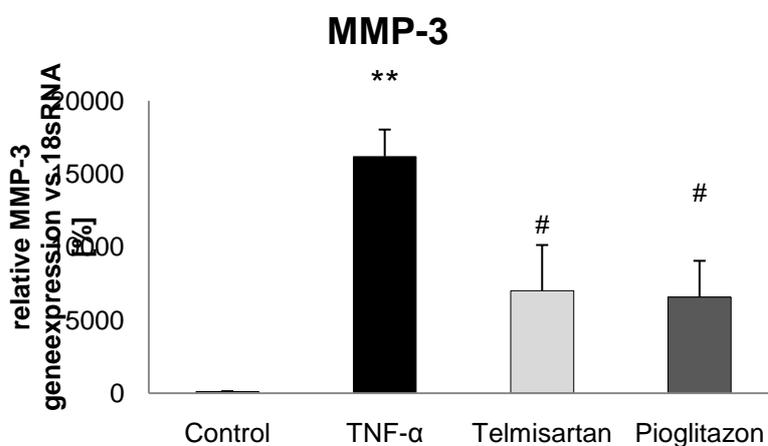


Abbildung 3-24: Analyse der adipozytären MMP-3-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation.

Resultate der *real-time RT-PCR*-Analyse nach 24h Inkubation, normalisiert auf 18S rRNA. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten sind angegeben in Prozenten relativ zur mRNA-Expression un behandelter Adipozyten (Control)  $p^{**}<0,01$  vs. Control;  $p\#<0,05$  vs. TNF- $\alpha$

Aufgrund der zahlreichen Hemmungsmechanismen der MMP-Aktivität sowohl auf Translations- und Transkriptionsebene als auch auf Ebene der Proformen testeten wir zusätzlich exemplarisch für MMP-2 und MMP-3 die tatsächliche Proteinexpression mittels Western Blot (Abb. 3-25).

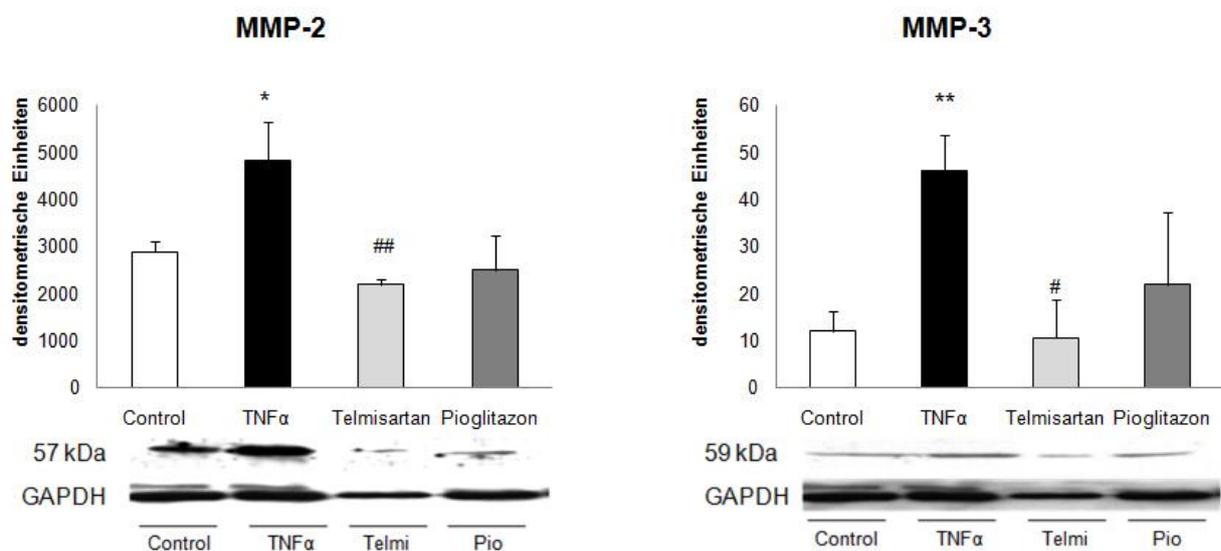


Abbildung 3-25: **Analyse der adipozytären MMP-2- und MMP-3-Proteinexpressionslevel nach TNF- $\alpha$ -Stimulation sowie Telmisartan- und Pioglitazonwirkungen**

densitometrische Western Blot-Auswertung mindestens 3 unabhängiger Experimente  $\pm$  SEM, sowie repräsentative Blots und deren housekeeping-Bezug auf GAPDH,  $p^{**}<0,01$  vs. Control;  $p\#<0,05$  vs. TNF- $\alpha$ ;  $p\#\#<0,01$  vs. TNF- $\alpha$ .

Auch auf Ebene der Proteinexpression war die Aktivität von MMP-2 und MMP-3 nach TNF- $\alpha$ -Stimulation signifikant erhöht. Die zusätzliche Behandlung mit Telmisartan führte zu einer signifikanten Senkung der MMP-Expression etwa auf das Niveau der Kontrolladipozyten. Die Reduktion der Aktivität nach Pioglitazon-Behandlung war nicht signifikant.

### 3.6 Stimulation von VSMCs

Zur weiteren Prüfung einer direkten Wirkung adipozytär sezernierter Faktoren auf die Gefäßwand, erweiterten wir die Zellkulturversuche um einen weiteren Schritt: es wurden die Überstände, die während der Adipozyten-Differenzierung und -Stimulation entstanden waren gesammelt und zur weiteren Inkubation von VSMCs verwendet. Auf diese Art und Weise entstanden 4 unterschiedliche Gruppen von VSMCs deren Stimulationsmedien mit den Überständen folgender Adipozytenreihen versetzt waren: 1. unstimulierten Adipozyten (Control), 2. Telmisartan-stimulierten Adipozyten (10 µm Telmisartan), 3. TNF- $\alpha$ -stimulierten Adipozyten (10 ng/ml TNF- $\alpha$ ) und 4. Überständen von mit Telmisartan und TNF- $\alpha$  behandelten Adipozyten. Dargestellt sind die Ergebnisse der *real-time RT-PCR* für MMP-2 und MMP-9 nach 24 sowie 48 Stunden Stimulation (Abb. 3.26 und 3-27).

Während sich nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede fanden, ergab sich nach 48stündiger Stimulation eine signifikante Erhöhung der MMP-2 und MMP-9-mRNA-Expression in den VSMCs, die mit den Überständen TNF- $\alpha$ -stimulierter Adipozyten inkubiert worden waren. Die Expression von MMP-2 war nach 48 Stunden um das 3fache ( $p < 0,05$ ) die von MMP-9 um das 1,8fache ( $p < 0,05$ ) gesteigert. Eine zusätzliche Behandlung mit Telmisartan verhinderte diese Expressionssteigerung nach 48 Stunden. Telmisartan bewirkte eine Reduktion der MMP-2 Expression um 51 Prozent. Die MMP-9 Expression war um 41 Prozent reduziert. Die Kontrollinkubation durch Telmisartan ohne TNF- $\alpha$ -Stimulation erbrachte keine Unterschiede im Vergleich zur Control-Gruppe.

Die Überstände TNF- $\alpha$ -stimulierter Adipozyten induzierten somit eine proteolytische Aktivität durch MMPs in VSMCs. Eine solche Aktivität fand sich nicht nach Inkubation mit Kontrollüberständen und ließ sich durch Telmisartanbehandlung effektiv abmildern. Eine weitere Validierung dieser Erkenntnisse und den genauen Einfluss von Telmisartan war nun nötig. Eine Überprüfung der Ergebnisse der *in-vitro*-Experimente in einem weiteren *in-vivo*-Modell folgte.

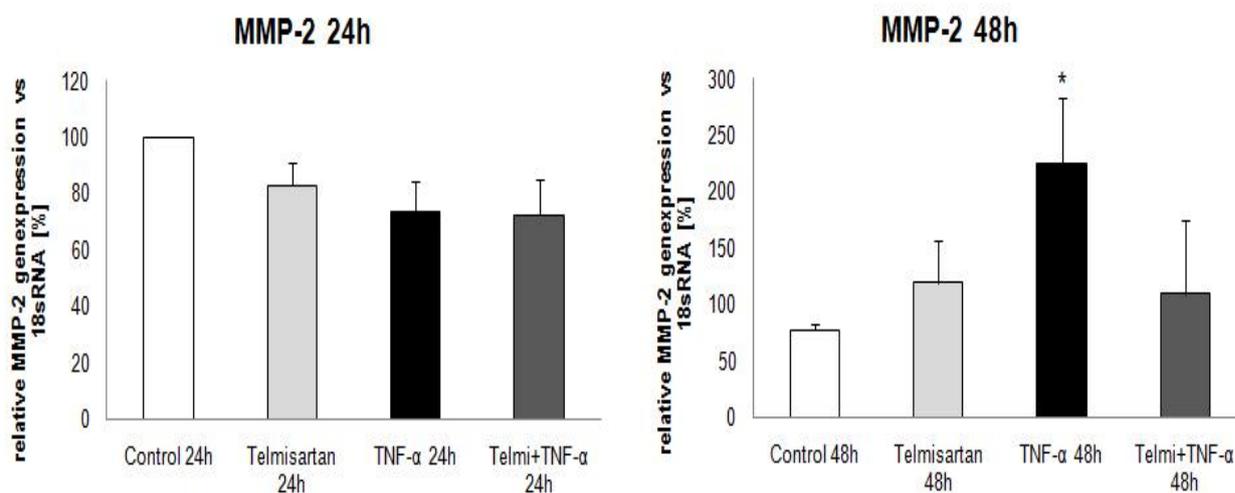


Abbildung 3-26: Analyse der MMP-2-mRNA-Expression in VSMCs nach Inkubation mit adipozytären Überständen nach 24 und 48 Stunden.

Resultate der *real-time RT* PCR-Analyse, normalisiert auf 18S rRNA. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten sind angegeben,  $p^* < 0,05$  vs. Control.

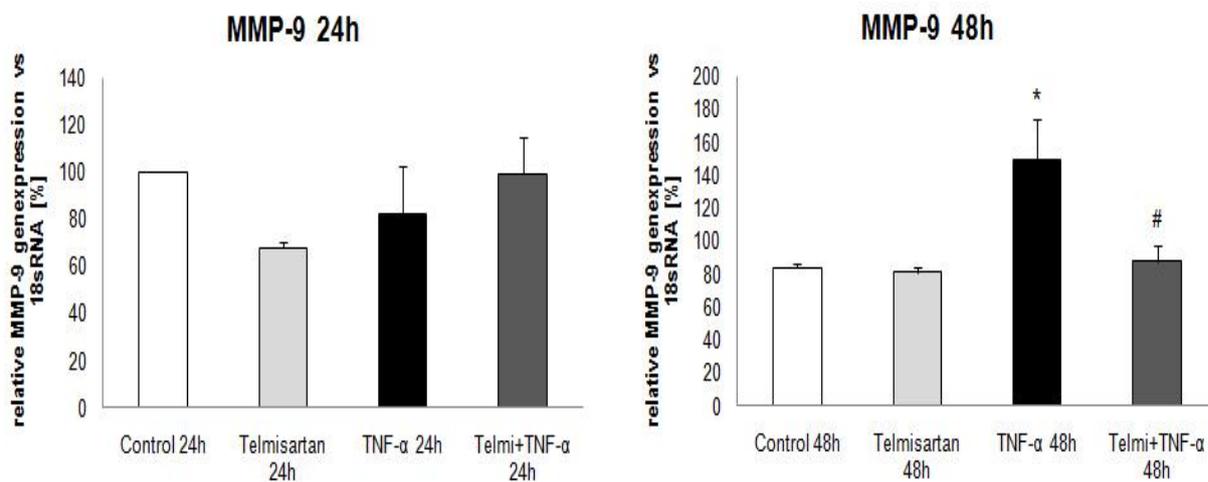


Abbildung 3-27: Analyse der MMP-9-mRNA-Expression in VSMCs nach Inkubation mit adipozytären Überständen nach 24 und 48 Stunden.

Resultate der *real-time RT* PCR-Analyse, normalisiert auf 18S rRNA. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten sind angegeben,  $p^* < 0,05$  vs. Control;  $p\# < 0,05$  vs. TNF- $\alpha$ .

### 3.7 Telmisartan-Effekte im HFD-Mausmodell

Die antiproteolytischen Effekte von Telmisartan, die wir im Zellkulturversuch nachweisen konnten, sollten nun genauer studiert werden. Weiterhin waren wir bemüht, die Reproduzierbarkeit der histologischen Ergebnisse in einem männlichen Mausmodell zu überprüfen. Hierzu wiederholten wir unsere Experimente modifiziert an männlichen Mäusen. Diese erhielten eine 14wöchige HFD unter metabolischer Kontrolle. Zusätzlich wurden Mäuse mit Vehikel (0.5% Tween80/H<sub>2</sub>O), Telmisartan (3mg/kg/d) oder Pioglitazon (10mg/kg/d) behandelt. In der 10. Woche der Diät erfolgte eine Kontrolle der Blutdruckwerte. Am Vortag der Isolierung der Aorta, wurden die Mäuse sonographisch untersucht.

Es folgten anschließend histologische und molekularbiologische Experimente.

#### 3.7.1 Sonographischer Nachweis aortaler Dilatation nach HFD

Die Sonographie ermöglicht die Beurteilung der Dimensionen der Aorta unter *in-vivo*-Bedingungen. Die Beurteilung der Aorta erfolgte im Längsschnitt. Messungen wurden jeweils in supra- sowie infrarenalen Abschnitt der Aorta abdominalis während der Systole als auch der Diastole an je 3 standardisierten Messpunkten durchgeführt.

Die Ausmessung der longitudinalen Aortenscans ergab eine signifikante Erweiterung des Lumens nach HFD sowohl bei Messungen in der Systole als auch in der Diastole (Abb. 3-28). Sowohl in den suprarenalen als auch infrarenalen Bereichen waren die Aorten nach HFD signifikant erweitert. Somit konnte die histologische Dilatation nach HFD *in-vivo* sonographisch bestätigt werden. In der suprarenalen Systole war der aortale Diameter nach HFD um 18 Prozent erhöht (Abb. 3-29).

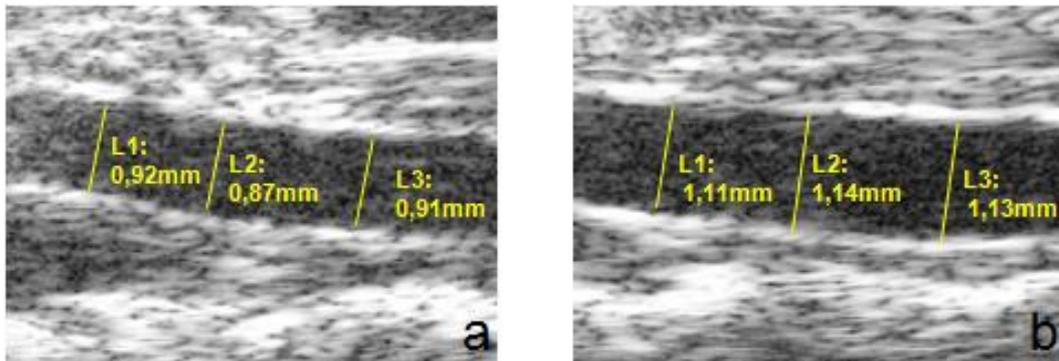


Abbildung 3-28: **Sonographische Analyse des aortalen Diameters nach HFD.**

Abgebildet sind longitudinale Aortenscans (suprarenale Systole) mit Messresultaten, a) SD  
b) HFD Dilatation der Aorta abdominalis nach HFD.

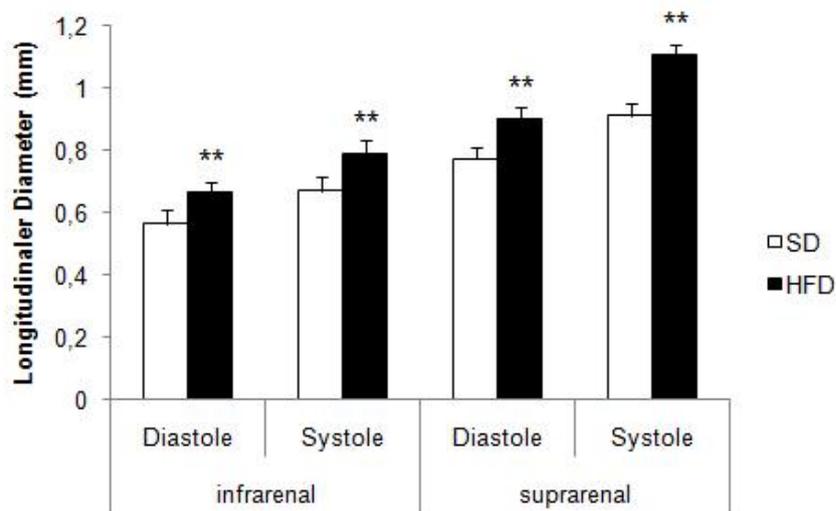


Abbildung 3-29: **Longitudinaler Durchmesser der Aorta.**

Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM der infrarenalen und suprarenalen longitudinalen Durchmesser der Aorta abdominalis sowohl in der Diastole als auch Systole (n=10),  $p^{**} < 0.001$ .

### 3.7.2 Telmisartan mindert dilatative Effekte der HFD

Unter Telmisartanbehandlung gelang die deutlichste Minderung der HFD-assoziierten aortalen Dilatation. Mäuse der Telmisartangruppe wiesen nach HFD einen Aortendurchmesser auf, der dem der SD-Gruppe entsprach (Abb. 3-30 und 3-31).

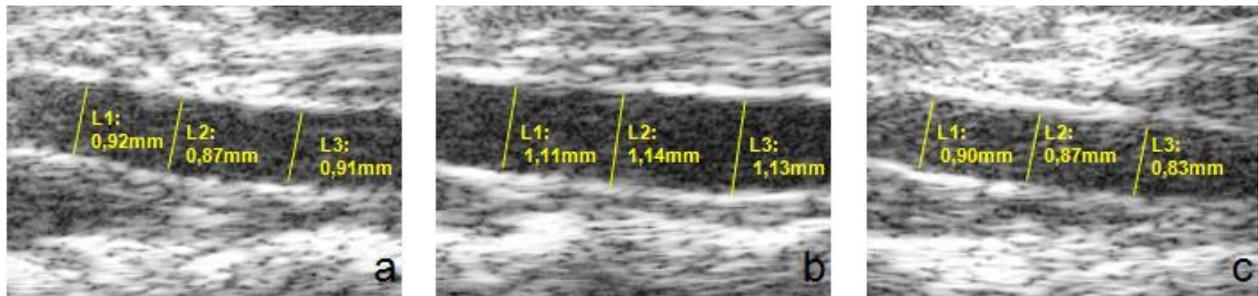


Abbildung 3-30: **Sonographische Analyse des aortalen Diameters nach HFD und Telmisartanbehandlung.**

Abgebildet sind longitudinale Aortenscans (suprarenale Systole) mit Messresultaten, a) SD b) HFD c) Telmisartan.

Eine Behandlung der HFD-Mäuse mit Telmisartan oder Pioglitazon bewirkte eine vollständige Verhinderung der Dilatation nach HFD. Die Ergebnisse fanden sich in Systole und Diastole sowohl infra- als auch suprarenal.

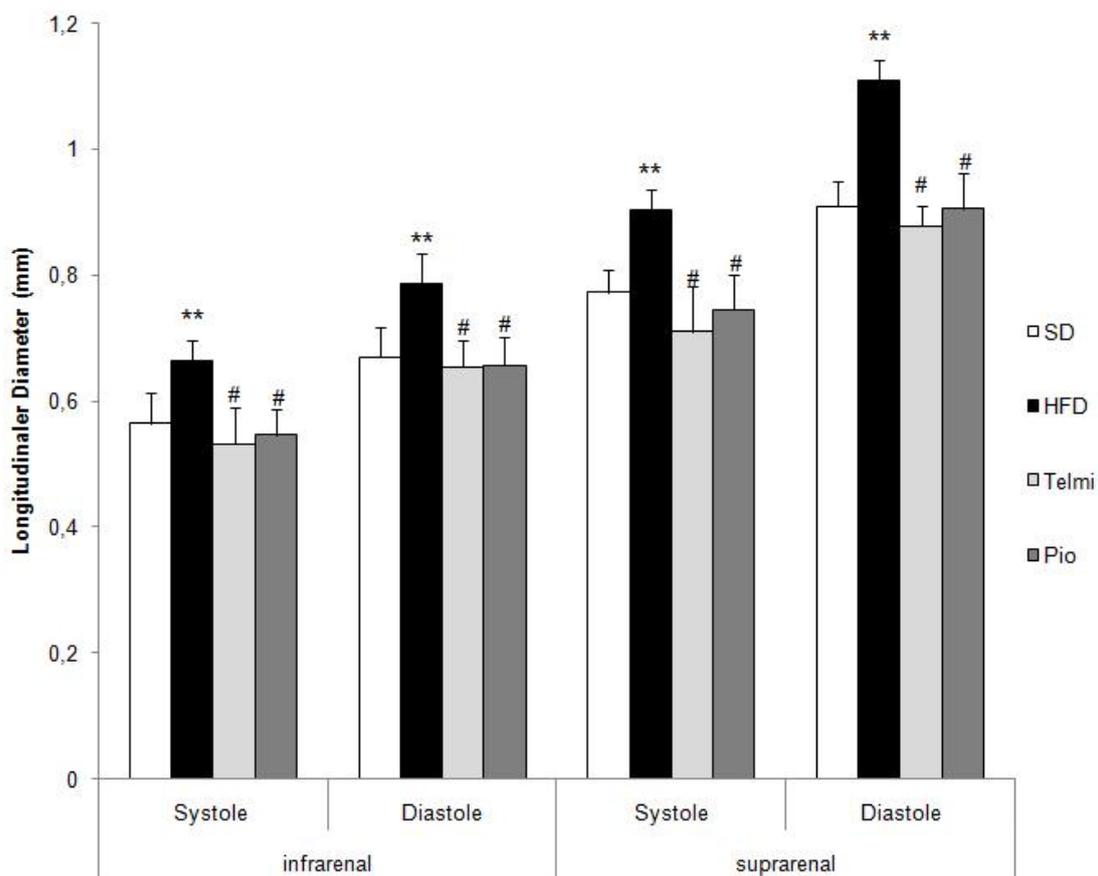


Abbildung 3-31: **Longitudinaler Durchmesser der Aorta nach HFD und Behandlung.**

Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM der infrarenalen und suprarenalen longitudinalen Durchmesser der Aorta abdominalis sowohl in der Diastole als auch Systole (n=10),  $p^{**}<0,01$  vs. SD,  $p\#<0,01$  vs. HFD.

### 3.7.3 Blutdruck-Effekte von Telmisartan und HFD

Die Messung des Blutdrucks ergab im Mittel keine signifikanten Unterschiede zwischen der SD- und HFD-Gruppe. Allein der systolische Blutdruck war moderat aber signifikant erhöht. Im mittleren Blutdruck war ein nicht signifikanter Anstieg um 3,8 Prozent nach HFD zu verzeichnen (Abb.3-32a).

Die Telmisartan-Behandlung hingegen bewirkte eine signifikante Senkung des Blutdrucks sowohl in Systole als auch Diastole. Im mittleren Blutdruck ergab sich ein Absinken um 25 Prozent im Vergleich zur HFD-Gruppe (Abb. 3-32b).

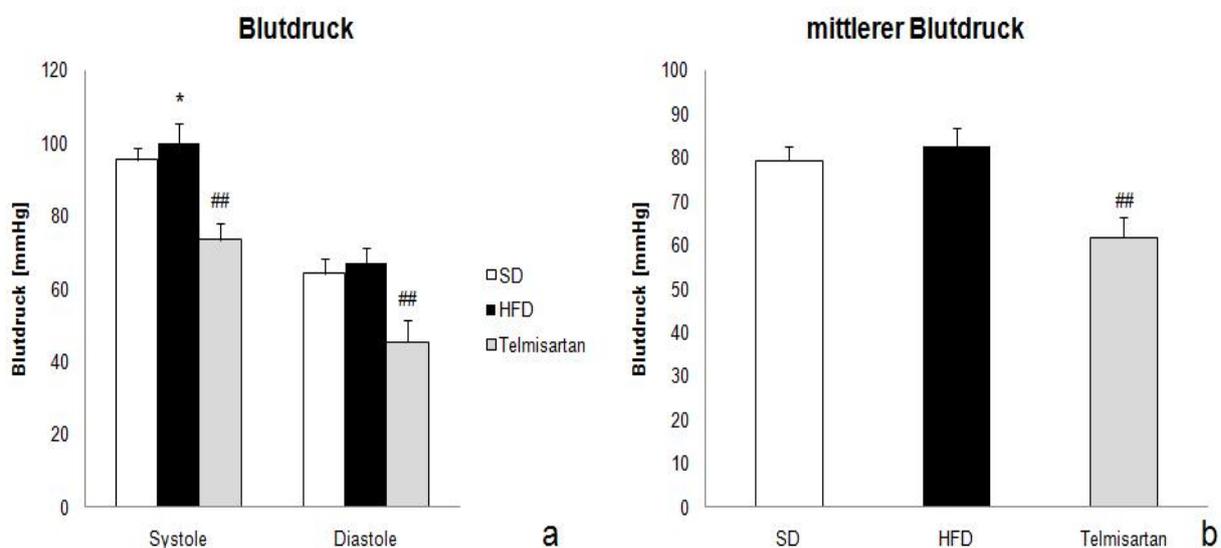


Abbildung 3-32: **Systolischer und diastolischer sowie mittlerer Blutdruck.**

Dargestellt sind die Mittelwerte des systolischen und diastolischen Blutdrucks sowie der mittlere arterielle Blutdruck  $\pm$  SEM (n=10). Die Messungen erfolgten nach 10wöchiger Diät. B) mittlerer arterieller Blutdruck= Diastolischer Druck +  $\frac{1}{3}$ (Systolischer Druck - Diastolischer Druck),  $p^* < 0,05$  vs. SD,  $p_{##} < 0,01$  vs. HFD.

### 3.7.4 Strukturelle Histologie nach Telmisartan-Behandlung

In den histologischen Untersuchungen konnten wir die Ergebnisse aus den weiblichen Mäusen auch in den männlichen reproduzieren. Erneut fand sich eine signifikante Dilatation des aortalen Lumens nach HFD. Der mittlere innere Aortendurchmesser war nach HFD um das 1,4fache vergrößert. In den mit Telmisartan behandelten Mäusen war diese Dilatation signifikant verringert (Abb. 3-33 a1, b1, c1; Abb. 3-34). Die

Beurteilung der Media in stärkerer Vergrößerung (Abb. 3-33 a2, b2, c2) ergab in der Tendenz eine Verdickung der Media nach HFD und eine Verschmälerung unter Telmisartan-Behandlung (Abb. 3-34). Weiterhin wurden deutliche strukturelle Veränderungen sichtbar.

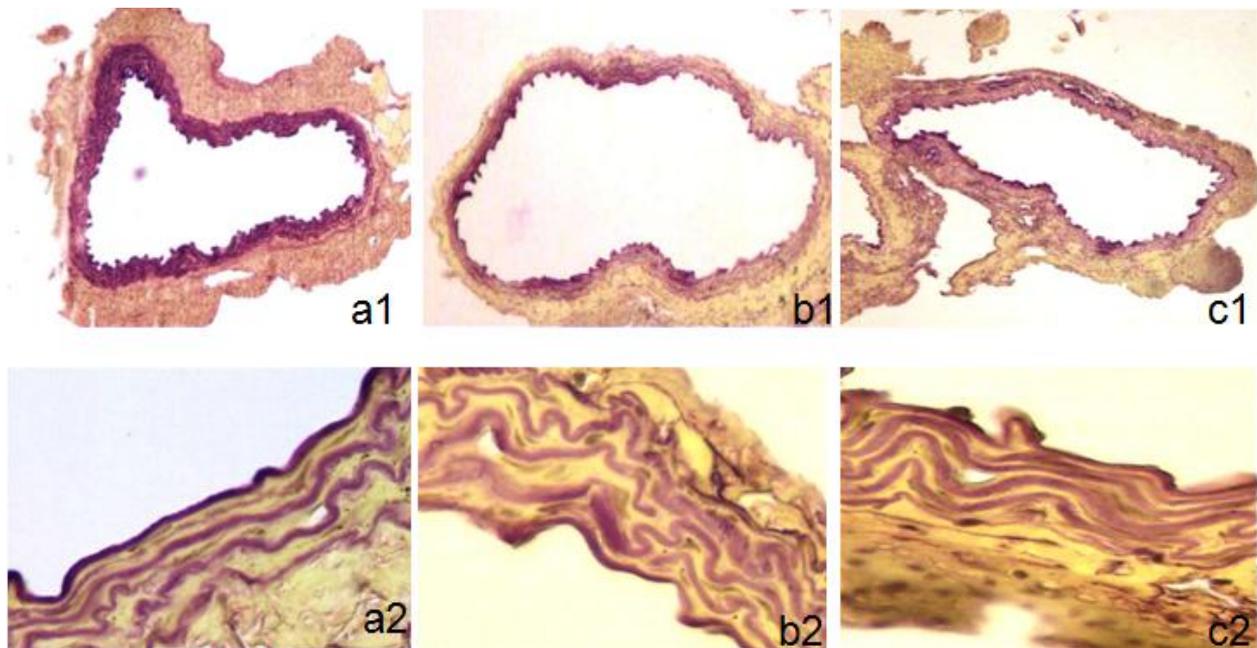


Abbildung 3-33: **Histologischer Vergleich von SD, HFD und HFD mit Telmisartan.**

a) AA-SD; b) AA-HFD; c) AA nach Telmisartanbehandlung. Weigert-Sirius-Rot-Färbung. 1 - 5x-Vergrößerung, 2 - 40x-Vergrößerung.

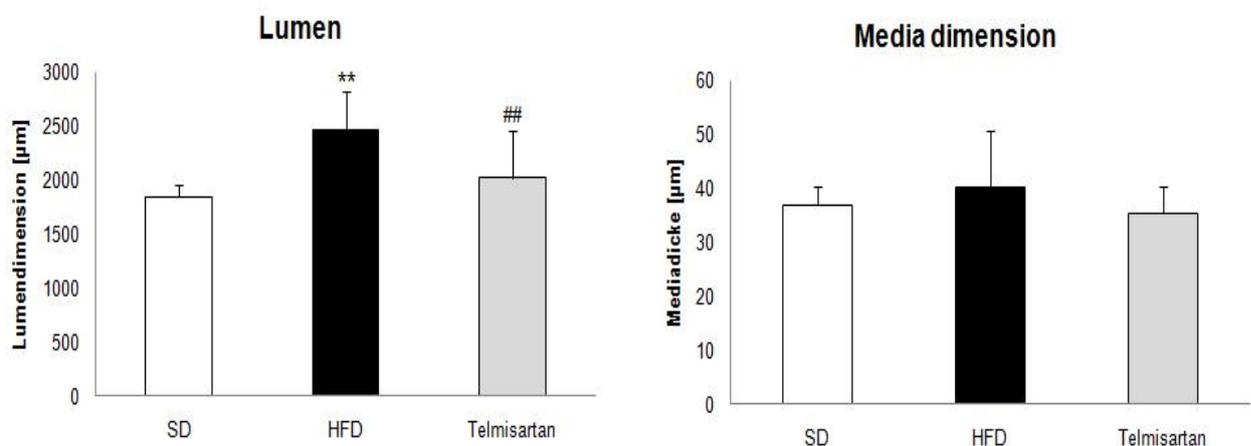


Abbildung 3-34: **Lumen- und Media-Dimension der Aorta abdominalis nach HFD sowie zusätzlicher Telmisartanbehandlung.**

Ermittlung des mittleren inneren Aortendurchmessers (Lumendimension) und der Dicke der Media (n=7), p\*\*<0,01 vs. SD, p##<0,01 vs HFD.

Die Strukturveränderungen wurden erneut durch Scores quantifiziert. In der Erhebung des Fragmentations-Index fand sich - wie in den Vorexperimenten - ein pathologisch erhöhter Grad an Fragmentationen nach HFD. Eine Behandlung mit Telmisartan bewirkte eine signifikante Abmilderung der Auflösungserscheinungen innerhalb der Media. Die Zahl der Fragmentationen ging etwa auf das Niveau der SD-Tiere zurück (Abb. 3-35).

Auch die Zahl der zystischen Einlagerungen war nach HFD signifikant erhöht. Die Telmisartan-Gruppe wies im Vergleich zur SD-Gruppe ebenfalls eine erhöhte Zahl zystischer Einlagerungen auf, jedoch auf niedrigerem Niveau als in der reinen HFD-Gruppe. Diese Daten waren nicht signifikant (Abb. 3-36).

Besonders eindrücklich waren die Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen der Media. Fanden sich bei den HFD-Tieren deutliche Auflösungserscheinungen in der Media mit signifikanter Reduktion und Degeneration des Elastinfasernetzwerks wies die Media der Telmisartan-Gruppe ein sehr kompakt strukturiertes Elastinnetz auf. Der Elastinanteil war sowohl gegenüber der SD- als auch der HFD-Gruppe signifikant erhöht (Abb. 3-37).

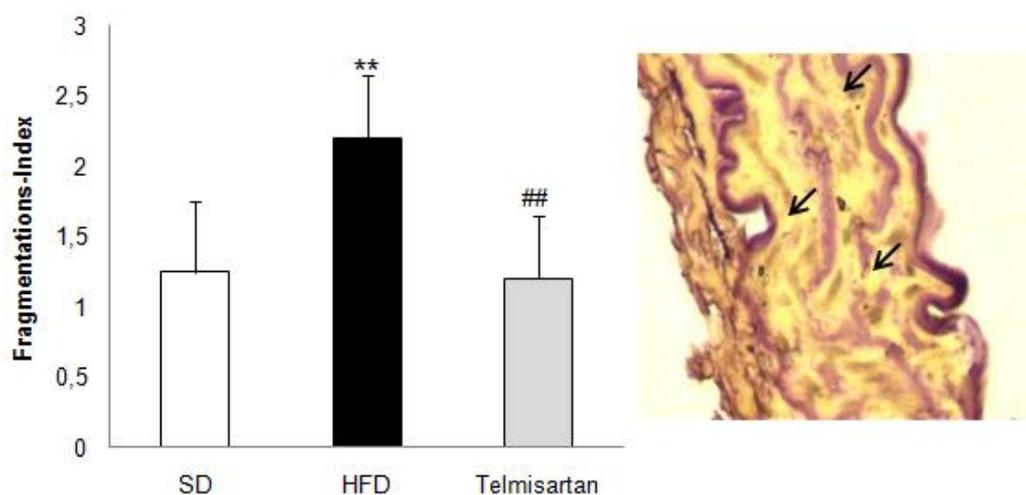


Abbildung 3-35: **Analyse der Telmisartanwirkung auf den Fragmentationsindex.**

Semiquantitativer Score mit Standardabweichung (n=5), (s. Tab. 3-1). Pfeile markieren fragmentierte Elastinfibrillen (AA-HFD, 40x, Weigert-Sirius-Rot-Färbung),  $p^{**} < 0,01$  vs. SD,  $p^{##} < 0,01$  vs. HFD.

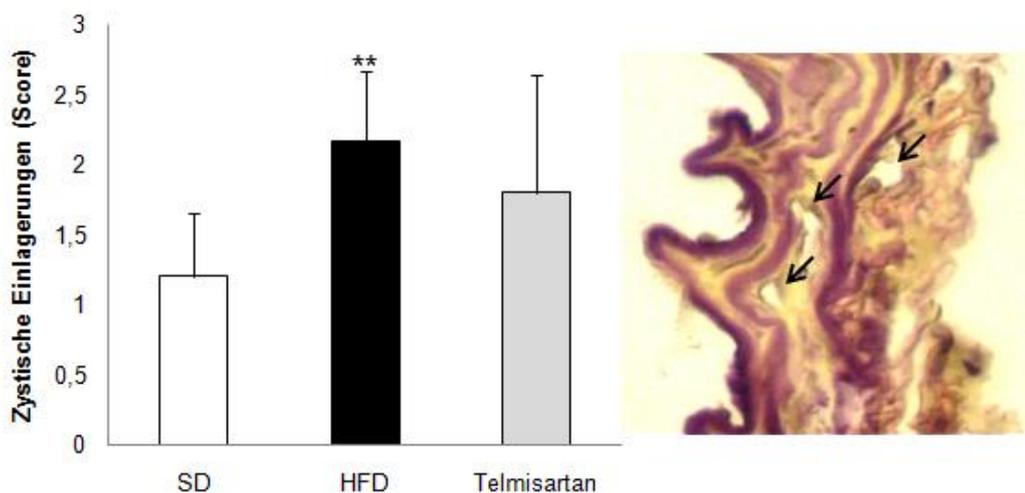


Abbildung 3-36: **Analyse der Telmisartanwirkung auf zystische Einlagerungen nach HFD.**

Semiquantitativer Score mit Standardabweichung (n=5), (s. Tab. 3-1). Pfeile markieren zystische Einlagerungen (AA-HFD, 40x, Weigert-Sirius-Red-Färbung),  $p^{**}<0,01$  vs. SD.

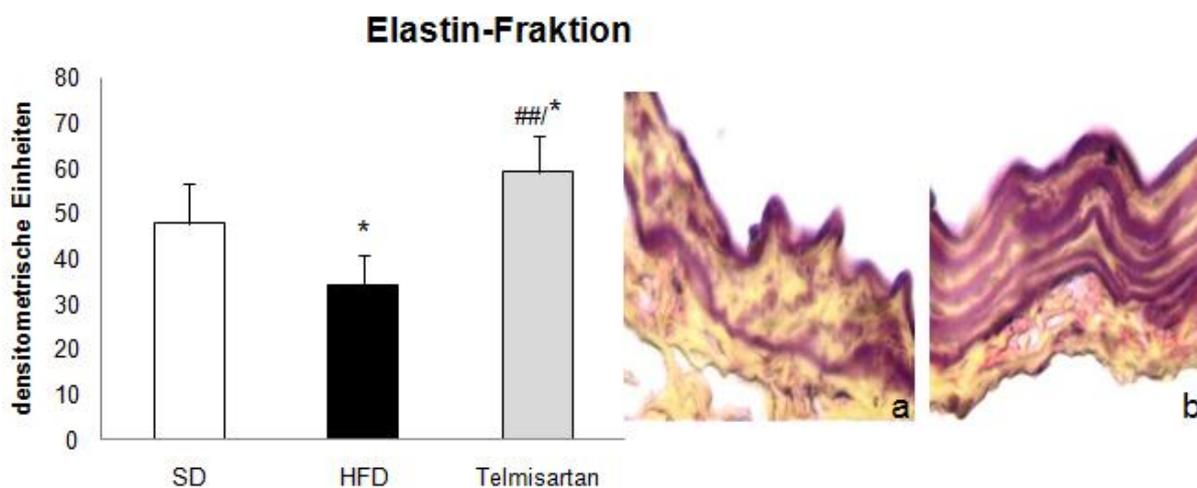


Abbildung 3-37: **Analyse der Telmisartanwirkung auf die Elastin-Fraktion.**

Densitometrische Messung des Elastinanteils der Media mittels normierter Schwarz-Weiß-Negativausschnitte. Gezeigt ist der repräsentative Mittelwert mit Standardabweichung (n=5). Die Bilder demonstrieren den strukturellen Elastinverlust nach HFD: a) AA-HFD b) AA-HFD + Telmisartan, 40x, Weigert-Sirius-Rot-Färbung,  $p^{*}<0,05$  vs. SD,  $p^{##}<0,01$  vs. HFD.

### 3.7.5 Separation von Media und Adventitia mit PVAT

Für die folgenden molekularbiologischen Untersuchungen wurde die Media von der umgebenden Adventitia mit PVAT unter mikroskopischer Sicht separiert. Somit war eine exakte Lokalisation der Expressionsmuster möglich. Der Erfolg dieser Maßnahme gelang über den Nachweis unterschiedlicher Expressionsraten der jeweiligen gewebstypischen genetischen Marker mittels *real-time RT-PCR*: SMA (smooth-muscle antigen) konnte in der muskelstarken Media nachgewiesen werden, während das PVAT fettgewebstypisches DEPP (Decidual Protein induced by Progesterone) exprimierte (Abb. 3-38).

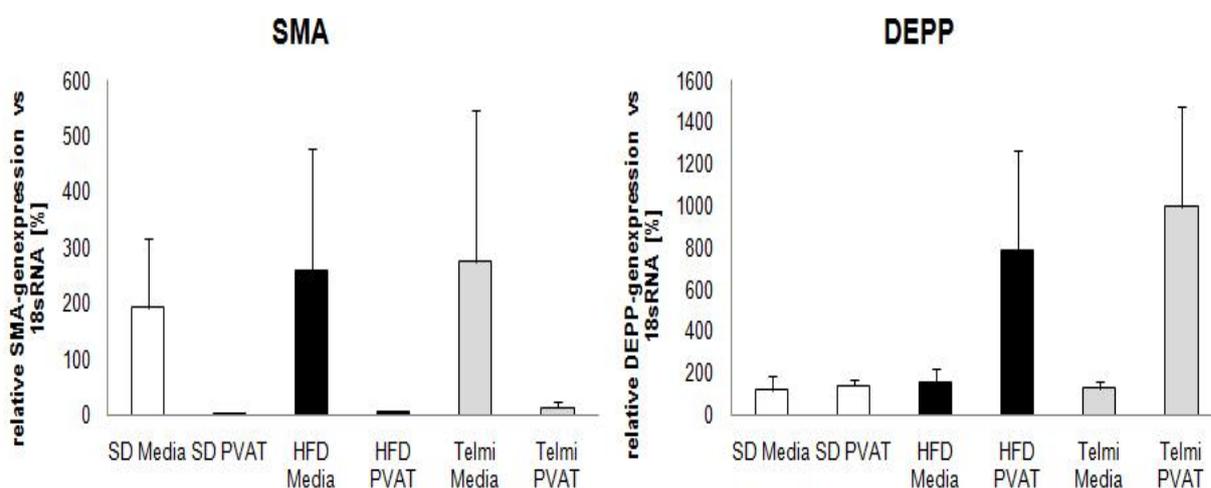


Abbildung 3-38: **Analyse der SMA- und DEPP-mRNA-Expression in Media und PVAT.**

Resultate der *real-time RT PCR*-Analyse, normalisiert auf 18S rRNA  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten.

#### 3.7.5.1 TNF-alpha-Expression nach Telmisartan-Behandlung

Auf mRNA-Ebene fand sich sowohl in Media als auch PVAT eine basale Expression von TNF- $\alpha$  in den Kontrollpräparaten nach SD. Sowohl in der Media als auch im PVAT konnte eine signifikant erhöhte Expressionsrate von TNF- $\alpha$  nach HFD gegenüber der SD-Gruppe festgestellt werden. In der Media stieg die Expressionsrate um das 5fache ( $p < 0,05$ ). Im PVAT sogar um das 6fache ( $p < 0,05$ ).

Die Expression war in der Telmisartan-Gruppe in der Media und im PVAT signifikant reduziert. Hier blieb das Expressionsniveau etwa im Bereich der basalen Expression der SD-Gruppe (Abb. 3-39). Somit bewirkte die Behandlung mit Telmisartan eine signifikante Reduktion HFD-assoziiierter TNF- $\alpha$ -Expression in Media und PVAT.

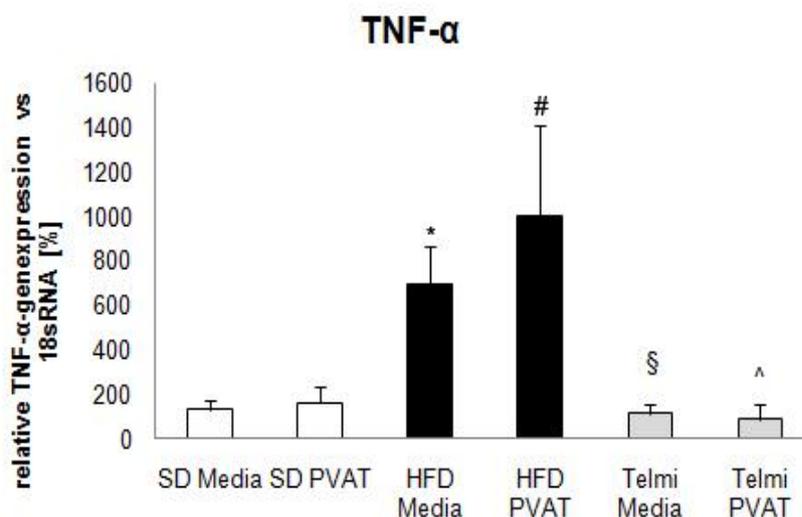


Abbildung 3-39: **Analyse der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression in Media und PVAT.**

Resultate der *real-time RT* PCR-Analyse, normalisiert auf 18S rRNA  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten.  $p^* < 0,05$  vs. SD Media,  $p\# < 0,05$  vs. SD PVAT,  $p\§ < 0,05$  vs. HFD Media,  $p^{\wedge} < 0,05$  vs. HFD PVAT.

### 3.7.5.2 CD68-Expression nach Telmisartan-Behandlung

CD68 als Marker einer Makrophageninfiltration und inflammatorischer Aktivität war ähnlich reguliert wie TNF- $\alpha$ . Auch für das lysosomale Antigen fand sich eine signifikante Erhöhung der Expression nach HFD in Media (5fach,  $p < 0,05$ ) und PVAT (4fach, n.s). Die Telmisartan-Gruppe hingegen wies eine stark erniedrigte Regulation auf. Diese betraf Media und PVAT (Abb. 3-40). Die Makrophagenaktivität war nach HFD in Media und PVAT im Vergleich zur SD-Gruppe stark erhöht, während sich durch eine Behandlung mit Telmisartan Aktivierung und Infiltration der Makrophagen verhindern ließ.

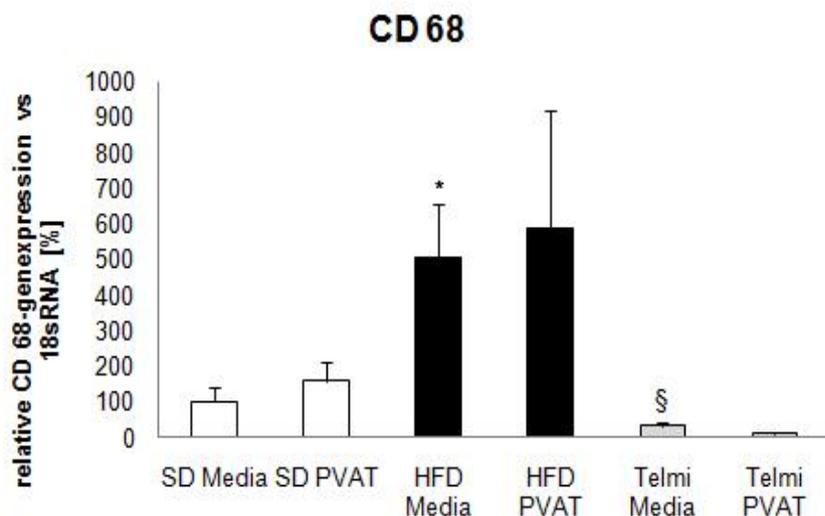


Abbildung 3-40: **Analyse der CD68-mRNA-Expression in Media und PVAT**

Resultate der *real-time RT* PCR-Analyse, normalisiert auf 18S rRNA  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten.  $p^* < 0,05$  vs. SD Media,  $p§ < 0,05$  vs. HFD Media.

### 3.7.5.3 Expression der Gelatinasen nach Telmisartan-Behandlung

Auch für die Gelatinasen ließ sich erneut eine Steigerung der mRNA-Expression nach HFD nachweisen. Diese verstärkte Expression von MMP-2 und MMP-9 fand sich nicht in der Telmisartan-Gruppe. Es gelang hier kein Nachweis einer unterschiedlichen Regulation in Media und PVAT (Abb. 3-41).

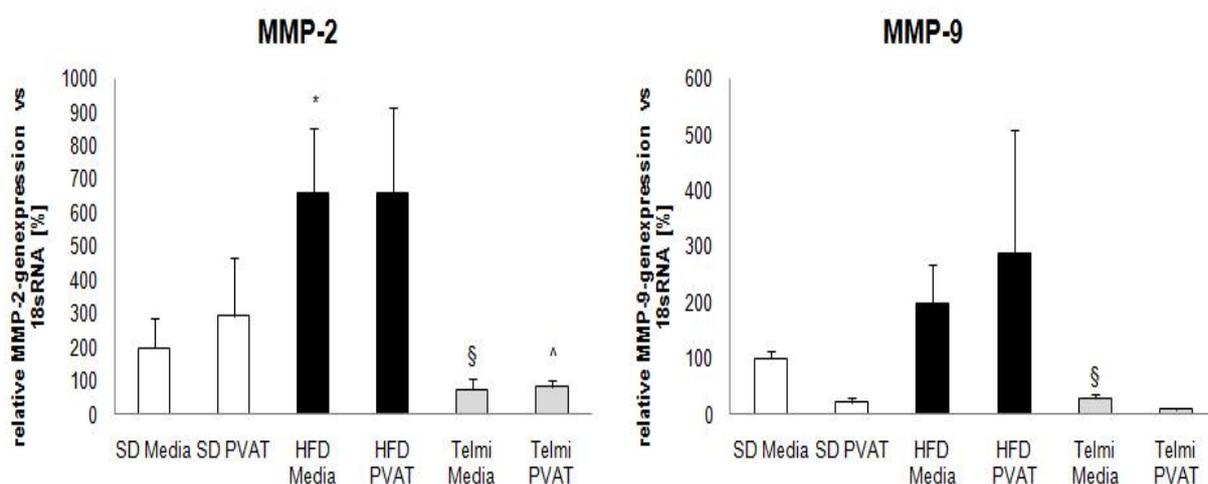


Abbildung 3-41: **Analyse der MMP-2- und MMP-9-mRNA-Expression in Media und PVAT**

Resultate der *real-time RT* PCR-Analyse, normalisiert auf 18S rRNA  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten.  $p^* < 0,05$  vs. SD Media,  $p§ < 0,05$  vs. HFD Media,  $p^{\wedge} < 0,05$  vs. HFD PVAT.

## 4 Diskussion

Adipositas gilt als wesentlicher prädisponierender Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen<sup>79</sup>. Die Kernparameter des Metabolischen Syndroms (Insulinresistenz, Bluthochdruck, Dyslipidämie, Hyperglykämie) bilden dabei zentrale Elemente in der Genese vaskulärer Pathologien. Grundlegende Ursache der krankhaften Veränderungen sind Störungen im strukturellen Gefüge des kardiovaskulären Systems<sup>122</sup>.

Gorter *et al.*<sup>123</sup> zeigten in einer klinischen Studie einen Zusammenhang zwischen intraabdominellen Fett im Rahmen des Metabolischen Syndroms und Gefäßdilatation mit Zunahme des Aortendurchmessers. Neben dieser Verknüpfung einer funktionellen vaskulären Relaxation mit der Akkumulation von intraabdominellen Fett existieren Hinweise für morphologische Veränderungen der Gefäßstruktur bei Adipositas: Die „*Health in Men-Studie*“ von Golledge *et al.*<sup>114</sup> resultierte in einer Assoziation von Adipositas und der Entwicklung abdomineller Aortenaneurysmen. Das Aortenaneurysma bildet die extremste Form vaskulärer Dysregulation sowohl auf funktioneller als auch morphologischer Ebene<sup>11</sup>. Diese klinischen Studien weisen der pathologischen Akkumulation intraabdominellen Fetts im Rahmen von Adipositas eine herausgehobene Rolle in der Entwicklung vergrößerter Aortendurchmesser zu. Das Metabolische Syndrom stellt eine weit fortgeschrittene funktionelle und morphologische Belastung unterschiedlicher Organsysteme dar. Neben dem Fettgewebe ist besonders das kardiovaskuläre System von grundlegenden funktionellen und morphologischen Umgestaltungsprozessen betroffen<sup>124</sup>. *Remodeling*-Vorgänge sind entscheidend für diese Adaptation an veränderte Verhältnisse. Eine Dysregulation dieses sensiblen Systems führt zu einem Struktur- und Funktionsverlust der betroffenen Gewebe. Adipositas stellt hohe Anforderung an dieses System: Sowohl im Fettgewebe<sup>39</sup> als auch in der Gefäßwand<sup>34</sup> finden sich deutlich erhöhte *Remodeling*-Raten. Die Verbindung von Fettgewebe und Gefäßwand findet sich im perivaskulären Fett (PVAT). Beide Gewebe liegen hier in unmittelbarer Nachbarschaft und sind sowohl strukturell als auch funktionell miteinander verbunden.

Neuere experimentelle Studien rücken das PVAT in den Mittelpunkt vaskulärer Forschung. Dieses ist weit mehr als Strukturgewebe mit supportiven Aufgaben für die Gefäßwand: über zahlreiche Signalwege entfaltet es modulatorischen Einfluss auf das Gefäß<sup>90</sup>. Die Zentrierung auf das Endothel als entscheidender Gefäßschicht in der

Modulation vaskulärer Funktionen ist obsolet. Das PVAT ist von funktioneller Bedeutung für physiologische und pathologische Entwicklungen im Gefäßsystem. Lohn *et al.*<sup>66</sup> zeigten in der vergleichenden Präparation aortaler Ringe mit und ohne PVAT die über ATP-abhängige Kalium-Kanäle vermittelte antikontraktile Funktion des adventitiellen Fettgewebes. Gollasch und Dubrovskaja<sup>125</sup> beschrieben in Anlehnung an die tonusregulierenden parakrinen Mechanismen des Endothels über den Endothel derived relaxing factor (EDRF) den adipocytes derived relaxing factor (ADRF), als Konglomerat unterschiedlicher antikontraktiler Effekte des PVAT mit nicht determinierten Ursprung. Die Beeinflussung des Vasotonus durch den ADRF erfolgt sowohl über endothelvermittelte Signalwege, als auch unabhängig vom Endothel auf parakrinem Wege über eine Abschwächung der kontraktile Wirkung unterschiedlicher Vasokonstriktoren. Resultat ist eine Relaxation der Gefäßwand.

Diese Studien belegen funktionelle Veränderungen in der Gefäßwand, die ihren Ursprung im unmittelbar benachbarten perivaskulären Fettgewebe haben. Besonders Dysregulationen innerhalb des PVAT haben direkten und indirekten Einfluss auf die umschlossene Gefäßwand mit Konsequenzen für die vaskuläre Funktionalität und Morphologie<sup>126, 127</sup>.

Vorliegende experimentelle Studien beschäftigen sich primär mit der Beeinflussung glatter Gefäßmuskelzellen. Weiterhin handelt es sich vor allem um funktionell-elektrophysiologische *in-vitro* Experimente mit begrenzter Aussagekraft über *in-vivo* Auswirkungen. Studien über die großen Arterien, wie die Aorta, entstammen zumeist aus klinischen Daten, während es keine experimentellen Arbeiten auf diesem Gebiet gibt. Die konkreten molekularen Geschehnisse hinter den Ergebnissen der klinischen Studien bleiben weiterhin unklar. Ebenfalls nahezu unerforscht sind Möglichkeiten einer Therapie oder Prävention Adipositas-assoziierten Gefäß-*Remodelings*.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer HFD auf morphologische Veränderungen in der aortalen Gefäßwand und deren molekularbiologische Ursachen sowie mögliche pharmakologische Interventionen untersucht.

#### 4.1 Auswahl des Tiermodells

Die HFD ist als valides Mausmodell für das Metabolische Syndrom generell akzeptiert<sup>116</sup>. Das Mausmodell gestalteten wir mit C57BL/6J-Mäusen. Zahlreiche Studien

belegen eine ausdrückliche Eignung dieses Mäusestammes für Adipositas-Experimente<sup>115, 128</sup>.

C57BL/6J-Mäuse weisen nach HFD die entsprechenden phänotypischen und metabolischen (Hyperinsulinämie, Hypercholesterinämie, Glukoseintoleranz) Veränderungen auf, die mit dem humanen Metabolischen Syndrom einhergehen.

Wir nutzten das Modell einer Hoch-Fett-Diät. Hinsichtlich der Entwicklung experimenteller Adipositas erwies sich diese Diät in verschiedenen Studien anderen Mastdiäten mit Eiweiß oder Kohlenhydraten überlegen<sup>41, 48</sup>.

Mundy *et al.* wiesen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt einer Diät und Angiotensin-vermittelten Effekten im Gefäß nach<sup>129</sup>. Aus diesem Grund entschieden wir uns für eine extreme HFD mit einer Zusammensetzung aus 60% Fett, 20% Kohlenhydrate und 20% Protein. Die Fettbasis stammte aus pflanzlichen Ölen. Die Dauer der Diät setzten wir auf 12 Wochen fest und wählten damit eine mittlere Diätdauer<sup>130</sup>.

Die Resultate unserer metabolischen Experimente beweisen den Erfolg der Diät. Nach 3 Monaten Fütterung finden sich adipöse Mäuse mit erhöhter Insulinresistenz.

Im Rahmen des HFD-assoziierten MetS entwickeln Mäuse erhöhte Blutdrücke<sup>129</sup>. Der Blutdruckanstieg erfolgt langsam progressiv. In unserem Modell fanden sich nach 10 Wochen allenfalls diskrete Unterschiede im Blutdruckprofil zwischen den Diät-Gruppen. Unsere Ergebnisse stimmen hierin mit denen von Williams *et al.*<sup>131</sup> überein. Tatsächlich finden sich in anderen Arbeiten signifikante Blutdruckanstiege abhängig von der jeweiligen Diät erst ab der 18. – 32. Diätwoche<sup>132</sup>. Somit ist ein Blutdruckanstieg als Ursache für strukturelle Veränderungen der Aortenwand nach 12wöchiger HFD in unserem Modell auszuschließen.

## 4.2 Auswahl des Zellkulturmodells

Ziel unserer Zellkulturversuche war eine Nachempfindung der *in-vivo*-Situation nach HFD im Fettgewebe. Hierzu nutzten wir die 3T3-L1 Zelllinie, die ein etabliertes Modell zur Untersuchung adipozytärer Differenzierung und Genexpression darstellen. In diesem Zellmodell finden sich wesentliche Charakteristika tierischen Fettgewebes<sup>133</sup>.

In 3T3-L1 Zellen konnte ein lokales Angiotensinogen-generierendes System mit Angiotensinogen<sup>100</sup> sowie Angiotensin und der AT-1-Rezeptor<sup>134</sup> nachgewiesen

werden. Dank dieser Eigenschaften war die Zellkultur mit 3T3-L1 Präadipozyten von großer Bedeutung zur Vervollständigung unserer Erkenntnisse aus dem Tiermodell.

Das Zytokin TNF- $\alpha$  nimmt die zentrale Stellung in der Vermittlung Adipositas-assoziiierter Effekte ein. Eine Inkubation von 3T3-L1 Zellen mit TNF- $\alpha$  führt über zahlreichen Veränderungen (Lipolyse-Stimulation<sup>135</sup>, Hemmung der Präadipozyten-Differenzierung, Apoptose<sup>136</sup>) zu einer geeigneten *in vitro* Simulation der adipozytären Differenzierungsvorgänge bei Adipositas.

Weiterhin untersuchten wir primäre VSMCs, die wir aus Rattenaorten gewonnen hatten. VSMCs bilden den zellulären Hauptbestandteil der aortalen Media. Sie synthetisieren und sezernieren wesentliche Strukturproteine der Extrazellulären Matrix und sind auch über die Produktion von MMPs und TIMPs an der Regulation von *Remodeling*-Vorgängen der Matrix beteiligt<sup>137</sup>.

#### 4.2.1 Anpassung des Zellkulturmodells: TNF-alpha, PVAT und Media

Adipositas ist assoziiert mit einer Dysregulation der endokrin-metabolischen Eigenschaften des Fettgewebes. Ein maßgebliches Ergebnis dieser Veränderungen ist die Insulinresistenz. Entscheidenden Einfluss auf diese Entwicklung nimmt das Zytokin TNF- $\alpha$ <sup>138</sup>.

Weiterhin gibt es eine anerkannte Verbindung zwischen proinflammatorischer Aktivierung der Gefäßwand über TNF- $\alpha$  und nachfolgenden matrixdegenerativen Strukturschäden<sup>139</sup>.

Im Tiermodell konnten wir signifikant erhöhte Expressionsmuster von TNF- $\alpha$  in Gefäßwand und umgebenden Fettgewebe feststellen. Wir gelangten so zu einer erweiterten Arbeitshypothese, die TNF- $\alpha$  eine Schlüsselrolle in der Vermittlung Adipositas-assoziiierter Vaskulopathien zuschrieb. Adipozytäres TNF- $\alpha$  könnte auf autokrinen Wege im Fettgewebe selbst *Remodeling*-Prozesse triggern, aber auch auf parakrinen Wege in der benachbarten Gefäßwand proteolytische Aktivitäten entscheidend beeinflussen.

Die Bearbeitung der Hypothese erfolgte durch TNF- $\alpha$ -Stimulation von 3T3-L1-Präadipozyten. Mittels dieser Stimulation sollte eine Annäherung an die *in-vivo* Bedingungen gelingen. In einem weiteren Schritt sollten die Signalwege adipozytärer

TNF- $\alpha$ -Wirkung genauer charakterisiert werden. Ziel war es, durch Sammlung der Adipozytenüberstände in der Zellkultur und anschließender Inkubation von VSMCs mögliche parakrine Stimulationen zu simulieren.

### 4.3 HFD verursacht *outward Remodeling* der Aorta

Norman *et al.* <sup>18</sup> wiesen in einer klinischen Studie nach, dass der infrarenale Aortendurchmesser einen unabhängigen Prädiktor nachfolgender kardiovaskulärer Mortalität darstellt. Hierbei ergab sich eine Zunahme kardiovaskulärer Ereignisse bei Zunahme des abdominellen Aortendurchmessers auch unterhalb der Aneurysmen-definierenden Grenze von 30 mm.

Golledge *et al.* <sup>114</sup> wiesen in einer klinischen Studie an über 12000 Männern eine unabhängige Assoziation von Adipositas und AAA nach.

Die sonographische Untersuchungen der Mausearten ergaben eine mit HFD assoziierte signifikante Dilatation des Lumens. Genauere strukturmorphologische Untersuchungen auf histologischer Ebene zeigten alle Zeichen eines *outward Remodelings* in der HFD-Gruppe.

Das *outward Remodeling* ist definiert als vaskuläre Lumendilatation mit reduzierter Wanddicke als Resultat eines Stabilitätsverlustes in der Media <sup>7</sup>. Die dilatativen Prozesse gehen mit einem grundlegenden, andauernden morphologischen Wandel des Phänotyps einher.

Unsere histologischen Untersuchungen bestätigten die sonographisch nachgewiesene Dilatation der Aortenwand nach HFD. Gleichzeitig fand sich jedoch – zumindest in der Gruppe der weiblichen Tiere - eine Verdickung der Media. Diese Veränderungen stellen das Ergebnis degenerativer Veränderungen innerhalb der Gefäßwand dar. Es finden sich sämtliche Merkmale eines dysregulierten Umbaus in der Media: erhöhte Zahl an Fragmentationen mit Auflösung der Mediaintegrität und Elastizitätsverlust, zystische Degeneration mit Einlagerung von Lipiddepots sowie inflammatorische Infiltration im Sinne einer Aortitis. Lutgens *et al.* <sup>140</sup> konnten in einem Atherosklerose-Modell mit hochkalorischer Diät und apoE<sup>-/-</sup> Mäusen ähnliche Degenerationen der aortalen Media beobachten. Die von uns untersuchten Mäuse hatten nach 12 Wochen Diät keine Anzeichen von Arteriosklerose entwickelt, so dass wir in unserem Modell die

Konsequenzen inflammatorischer Aktivität ohne arteriosklerotischen Einfluss in der Aortenwand untersuchen konnten.

Der Verlust der strukturellen Integrität der Media als Folge fragmentierter Elastinfibrillen führt zu einer Auflockerung der Media. Es entstehen Räume, die rasch nachfolgend von Lipiddepots, inflammatorischen Infiltraten und fibrotisch aufgefüllt werden. Somit ist die Verdickung der Media nach HFD nicht das Resultat hypertropher glatter Gefäßmuskelzellen, welche ein Merkmal konzentrischer Stenosierung des *inward Remodeling* sind, sondern die Folge degenerativer Veränderungen in der Media nach HFD. Die Expressionsrate für Smooth muscle antigen war in der Media nach HFD nicht signifikant erhöht. Es fand sich auch keine Verstärkung der lamellären Gliederung mit einer erhöhten Zahl von Elastinfibrillen im Sinne eines strukturellen adaptiven Wachstums nach Veränderung der Hämodynamik.

Zu beachten bleibt, dass der tatsächliche aortale Diameter *in vivo* nicht allein abhängig vom strukturellen Durchmesser ist, sondern weiterhin vom vasomotorischen Tonus und der kontraktilen Aktivität der VSMCs beeinflusst wird. Gefäßdilatation und -konstriktion werden so auf mehreren Ebenen reguliert. Unsere Untersuchungen zeigen einen deutlichen Strukturverlust in der Gefäßwand nach HFD. Unter Berücksichtigung der geringen Veränderung des Vasotonus bei relativ konstantem Blutdruck und des elastischen Phänotyps der Aorta erscheint der strukturelle Integritätsverlust der Media als die entscheidende pathologische Entwicklung der Gefäßwand im Rahmen der HFD und ursächlich für die aortale Dilatation. Diese Gefäßveränderungen eines *outward Remodelings* nach HFD sind als grundlegender phänotypischer Wandel des Gefäßes im Rahmen der Adipositas zu verstehen.

#### **4.3.1 Grundlage des *outward Remodelings* ist eine erhöhte proteolytische Aktivität: Auswahl der Proteasen**

*Remodeling*-Vorgänge werden über die Regulation proteolytischer Aktivität gesteuert. Schlüsselenzyme in diesem System sind die MMPs und deren Gegenspieler die TIMPs<sup>19, 25, 42</sup>.

Für proteolytische Prozesse in der Gefäßwand sind besonders die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wesentlich<sup>16</sup>. Grundlage dieser hervorgehobenen Bedeutung ist die hohe Aktivität gegenüber dem Strukturprotein Elastin, dem biologisch stabilsten Bestandteil

der Gefäßwand. Bedeutungsvoll für diese Eigenschaften ist die strukturelle Besonderheit der katalytischen Domäne: drei repetitive Fibronectin Typ II-ähnliche Sequenzen durchsetzen die Domäne und sind verantwortlich für die hohe proteolytische Aktivität gegenüber Elastin und Kollagen<sup>26</sup>. Longo *et al.*<sup>16</sup> zeigten in MMP-2 bzw. MMP-9 knock-out Mäusen die Erfolglosigkeit eines Aneurysmainduktionsmodells und damit die Notwendigkeit der Gelatinasen für diese extremste Form des *Remodelings*. Weiterhin zeigten sie die Bedeutung einer Interaktion zellulärer Bestandteile mit Makrophagen. Pasterkamp *et al.*<sup>141</sup> berichteten von erhöhten MMP-2 und MMP-9-Expressionsraten in Arealen expansiver Gefäßveränderungen arteriosklerotischer Carotiden.

Adipositas als Ergebnis eines großen Modifizierungsprozesses im Fettgewebe bestehend aus Wachstum, Differenzierung und Modulation des Gewebes stellt hohe Ansprüche an die fettgewebliche extrazelluläre Matrix (ECM). Unterschiedliche Studien schreiben den MMPs (im speziellen den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9<sup>142</sup>) eine besondere Bedeutung in diesem Prozess zu<sup>38</sup>. Nach HFD finden sich signifikant erhöhte MMP-Expressionslevel im Fettgewebe von Mäusen<sup>37</sup>. Besonders eindrückliche Aktivitätserhöhungen belegen Chavey *et al.*<sup>39</sup> für MMP-2, MMP-3 und MMP-12 gefunden.

Die Cathepsine sind wesentlich beteiligt an der proteolytischen Aktivität<sup>47</sup>. Zudem sind Cathepsine von großer Bedeutung für die lokale Bildung von Ang II<sup>93</sup>. In Abweichung von der klassischen Formationskaskade des RAS vermag Cathepsin D Angiotensinogen zu Angiotensin I zu konvertieren. Weiterhin sind die Cathepsine an der Spaltung und Degradation elastischer Lamellen beteiligt<sup>143, 144</sup>.

In unserer Untersuchung war die HFD assoziiert mit einer signifikanten Erhöhung der Expressionsraten von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-12 sowie Cathepsin B und D in der Gefäßwand. Es gelang weiter eine immunohistochemische Lokalisation der Aktivität in der Media und im PVAT.

Die tatsächliche MMP-Aktivität unterliegt einem komplexen Regulationssystem, welches auf unterschiedlichen Ebenen zwischen Transkription und Proteinaktivität moduliert. Neben der semiquantitativen mRNA-Analytik mittels *real-time-RT-PCR* konnten wir mit Hilfe des Western Blots auch Aussagen über die schließliche Proteinexpression treffen und somit die MMP-Aktivitätssteigerung auf unterschiedlichen Ebenen verifizieren.

Interessanterweise blieben auch die ultimativen Gegenregulationsmechanismen über das TIMP-System aus: Es fand sich keine Änderung der Aktivität von TIMP-1 und

TIMP-3 nach HFD. Die gesteigerte MMP-Aktivität wird durch das TIMP-System nach HFD nicht angemessen ausbalanciert: Resultat ist eine dysregulierte Proteolyse der ECM. Dysbalancen im MMP-TIMP-System des Fettgewebes adipöser Mäuse sind bereits beschrieben<sup>39</sup>. Wir konnten dieses Ungleichgewicht auch in der Gefäßwand darstellen: Nach HFD fand sich sowohl im PVAT als auch in der Media eine erhöhte Proteolyserate mit dramatischen strukturellen Konsequenzen für die Gefäßwand. Diese Proteolyse wurde über eine Aktivierung von MMPs und Cathepsinen vermittelt.

Weitere, das Gefäßsystem betreffende Daten, beschreiben eine MMP-Aktivierung ebenfalls ohne Affektion des TIMP-Systems nach Zytokinaktivierung von VSMCs<sup>34</sup>. Zur Einordnung unserer Ergebnisse prüften wir die Zytokin-Aktivität in der Gefäßwand.

#### **4.3.2 HFD ist assoziiert mit einem proinflammatorischen Status in Gefäßwand und PVAT**

Das Konzept eines systemischen proinflammatorischen Status einhergehend mit Adipositas ist weit etabliert<sup>138</sup>.

In unserer Arbeit konnten signifikant erhöhte Aktivitäten der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin 1 $\beta$  sowie des Makrophagenmarkers CD68 und MMP-12 als Marker inflammatorischer Aktivität nach HFD in Media und PVAT gemessen werden. Dem Anspruch einer exakten Lokalisation wurden wir durch weitere Zergliederung des aortalen Gewebes gerecht. Am Mikroskop erfolgte die Freipräparation der Media von umgebender Adventitia mit PVAT. Der Erfolg der Trennung wurde durch den Nachweis gewebespezifischer Genmarker gesichert. Für TNF- $\alpha$  war die Expressionsrate im PVAT noch stärker erhöht als in der Media. Eine Quelle für adipozytäres TNF- $\alpha$  ist der Adipozyt selbst. Eine endogene TNF- $\alpha$ -Produktion, unabhängig von stromalen Komponenten des Fettgewebes konnte in Isolationsmodellen nachgewiesen werden<sup>145</sup>. Dieses wurde jedoch nicht in die Zirkulation gegeben; vielmehr wirkte es lokal als löslicher Faktor.

Eine weitere TNF- $\alpha$ -Quelle bilden die Makrophagen. Unsere Messungen für den Makrophagenmarker CD 68 ergaben eine TNF- $\alpha$ -ähnliche Regulation in PVAT und Media nach HFD. Somit ist eine mögliche Verwicklung der Makrophagen in die Genese des inflammatorischen Milieus wahrscheinlich. Kintscher *et al.*<sup>146</sup> zeigten eine Infiltration von T-Lymphozyten in viszerales Fettgewebe nach Diät-induzierter

Adipositas im Mausmodell. Weiterhin beschrieben Suganami *et al.*<sup>147</sup> kürzlich eine inflammatorische Schleife mit potenzierendem Charakter, in der Makrophagen und adipozytäres TNF- $\alpha$  organisiert sind.

Besonders die erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  war auch immunohistochemisch deutlich in Media und PVAT darstellbar. Zytokinaktivierung und Makrophageninfiltration nach HFD in der Aortenwand bilden das Fundament für den entzündlichen Status des Gefäßes, der konstitutiv für das *outward Remodeling* ist. Unsere Ergebnisse stützen die durch Ozaki *et al.*<sup>148</sup> beschriebene TNF- $\alpha$ -Konzentrationserhöhung in Zonen eines arteriellen *outward Remodelings*. Elastinfragmente, wie sie in den Aorten nach HFD in erhöhter Zahl vorkommen, gelten zudem als Chemotaxine, die eine inflammatorische Reaktion bewirken<sup>149</sup>. Eine inflammatorische Infiltration unterhält somit weiter die Synthese von Zytokinen und Proteasen. Zusätzlich bildet das entzündliche Infiltrat ein eigenes lokales RAS, das Komponenten bereitstellt, die Angiotensin II-Synthese und – Wirkung begünstigen und so die ortsständigen lokalen RAS verstärkt.

Diese Ergebnisse veranlassten uns, die Arbeitshypothese zu erweitern. Das Wachstum des Fettgewebes im Rahmen von Adipositas geht mit einem proinflammatorischen Status sowie erhöhten Umbauvorgängen mit proteolytischer Grundaktivierung einher<sup>74</sup>. Es gibt Hinweise für eine enge Verknüpfung von Makrophagenmigration, MMP-Expression und TNF- $\alpha$ -Aktivität<sup>46</sup>. Weiterhin hatten wir immunohistochemisch HFD-assoziierte Proteolyse und Inflammation sowohl in der aortalen Media als auch im PVAT lokalisieren können. Die gesteigerte proinflammatorische und proteolytische Aktivität in der Media könnte ihren Ursprung im Fettgewebe haben: Auf parakrinem Wege wäre eine Ausweitung der Adipositas-assoziierten *Remodeling*-Vorgänge im Fettgewebe auf das unmittelbar benachbarte Gewebe der Gefäßwand möglich. Somit wäre eine PVAT-getriggerte Induktion proteolytischer Prozesse ursächlich für den mit Adipositas assoziierten Strukturverlust in der Media sein (s. Abb. 4-1). Eine gesonderte Rolle in der Vermittlung dieser Effekte fällt den Zytokinen als Modulatoren der Proteolyse zu<sup>34</sup>.

Henrichot *et al.*<sup>150</sup> konnten in humanen Aorten eine chemotaktische Funktion des PVAT nachweisen, die – vermittelt über IL-8 und MCP-1 – zur Leukozyteninfiltration in die Adventitia beiträgt. Zusätzlich konnte in der Studie gezeigt werden, dass infiltrierte Makrophagen nur eine zusätzliche Quelle für Zytokine sind: isolierte Primär-Adipozyten sezernieren ähnliche Zytokinmengen wie Explantate adipözytären Gewebes mit erhaltener stromaler Komponente.

TNF- $\alpha$  ist ein Schlüsselspieler in der Homöostase des Fettgewebes. Es reguliert Differenzierung, Wachstum und ist verantwortlich für unterschiedliche endokrinologische Veränderungen. Zahlreiche Studien belegen die entscheidende Rolle des TNF- $\alpha$  in der Genese der Insulinresistenz bei Adipositas<sup>86</sup>. Weiterhin besteht im Rahmen der Adipositas eine Diskrepanz zwischen der stark erhöhten TNF- $\alpha$ -Aktivität im Fettgewebe und einem fehlenden Korrelat im Blut. Zytokine sind bekannt eher eine lokale Wirkung über die Ausbildung von Konzentrationsgradienten zu entfalten als systemisch zu agieren. Aus diesen Gründen werden auto- bzw. parakrine Signalwege des adipozytären TNF- $\alpha$  wahrscheinlich<sup>138, 145</sup>.

In unseren immunohistochemischen Versuchen gelang die Lokalisation erhöhter proteolytischer und proinflammatorischer Aktivität nach HFD in der Media wie auch dem umgebenden PVAT. MMPs und Cathepsine sind mit TNF- $\alpha$  kolokalisiert.

Unsere Hypothese einer direkten Beeinflussung der Gefäßwand durch eine adipozytär getriggerte lokale Milieuänderung im Rahmen der HFD sollte nun unter Nutzung der Erkenntnisse über TNF- $\alpha$  weitere Stützung durch ein Zellkulturmodell gewinnen.

Es war eine eingehende Untersuchung der fettgewebs-immanenten Prozesse nötig. In der Zellkultur sollte eine möglichst genaue Simulation der *in-vivo*-Situation erfolgen. Hierzu wurde eine Inkubation der 3T3-L1-Prädipozyten mit TNF- $\alpha$  durchgeführt.

#### **4.4 TNF-alpha-Aktivierung von Prädipozyten induziert Proteolyse im Fettgewebe**

Im Rahmen von Hyperplasie und -trophie der Adipozyten ist das Fettgewebe nach HFD ein Ort intensiver Restrukturierung mit erhöhtem zellulären Stress und Aktivierung inflammatorischer Signalwege. Eine pathologische Vermehrung des Fettgewebes stellt hohe Ansprüche an das proteolytische System mit seinen Gegenspielern um eine Reorganisation des Gewebes zu ermöglichen. Die Umbaumaßnahmen betreffen vor allem Strukturen der Extrazellulären Matrix – diese Reorganisation des Gewebes wird vorrangig durch MMPs vermittelt<sup>37</sup>.

TNF- $\alpha$  vermittelt funktionelle Veränderungen im Fettgewebe nach HFD wie Insulinresistenz und Inflammation. Das Zytokin ist im Rahmen von Adipositas

regelmäßig im Fettgewebe verstärkt exprimiert und entscheidend beteiligt an der Ausbildung metabolischer Pathologien<sup>138, 145</sup>.

Im Zellkulturversuch zeigte sich nach Stimulation der Präadipozyten mit TNF- $\alpha$  eine signifikante Steigerung der Expressionsraten von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 sowie der Cathepsine B und D. Exemplarisch ließen sich die *real-time RT* PCR-Resultate der Cathepsin B- und Cathepsin D- sowie MMP-2- und MMP-3-mRNA-Expressionen per Western Blot auch auf Ebene der Proteinexpression reproduzieren. Es fand sich eine basale Expression der MMPs und Cathepsine in den unstimulierten Adipozyten im Sinne physiologischer Adaptations- und Reorganisationsprozesse. Diese Expressionsraten waren nach TNF- $\alpha$ -Stimulation signifikant erhöht.

Eine TNF- $\alpha$ -Aktivierung - in Simulation der *in-vivo*-Situation - führte zu einem proteolytischen Status innerhalb des Fettgewebes. TNF- $\alpha$  kommt eine Schlüsselposition im fettgeweblichen Restrukturierungsprozess bei Adipositas zu.

Wir konnten somit die nach Auswertung der Immunohistochemie gestellte Hypothese einer Assoziation von TNF- $\alpha$  und erhöhter Proteolyse im Fettgewebe in der Zellkultur bestätigen.

Als weitere Aufgabe stellte sich ein Nachweis parakriner Signalwege, die eine Verbindung zur gesteigerten proteolytischen Aktivität der Gefäßwand ermöglichen könnten.

#### **4.4.1 TNF-alpha-aktivierte Adipozyten triggern proteolytische Aktivität in VSMCs**

Die Annahme parakriner Wirksamkeit des Fettgewebes ist weit verbreitet. Doch der Nachweis tatsächlicher parakriner Interaktionen gestaltet sich als sehr schwierig, da eine Unterscheidung parakriner und endokriner Wege *in-vivo* kaum möglich ist. Es ist bekannt, dass Zytokine ihre Wirkung vorwiegend lokal über Konzentrationsgradienten entwickeln. Löhn *et al.*<sup>66</sup> wiesen erfolgreich nach, dass antikontraktile Effekte des PVAT auf parakrinem Wege vermittelt werden und beschrieben den ADRF. Die genaue Klassifikation des ADRF bleibt dabei ungenau. Vielmehr beschreibt ADRF ein Konglomerat unterschiedlicher Faktoren, die antikontraktil auf die Gefäßmuskulatur wirken. Vorrangig handelt es sich dabei um Faktoren mit elektrophysiologischem Einfluss. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Dilatation der Aortenwand ist strukturell

und basiert auf erhöhter Proteasenaktivität und Inflammation in PVAT und Media. Wobei das PVAT eine herausgehobene Quelle für Proteasen und Zytokine darstellt, die parakrin die Aortenwand beeinflussen.

Yudkin *et al.*<sup>151</sup> beschrieben ähnlich Ergebnisse hinsichtlich der Schlüsselrolle einer lokalen TNF- $\alpha$  –Produktion in der Vermittlung von Insulinresistenz in Skelettmuskel-Arteriolen. Das PVAT wird als Quelle von TNF- $\alpha$ , die Arteriole als Ort der Wirkung beschrieben.

Auch die Studie von Mazurek *et al.*<sup>152</sup> beschreibt parakrine Effekte viszeraler Fettdepots. Es konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  und andere inflammatorische Marker im epikardialen Fettgewebe gegenüber subkutanem Fett signifikant erhöht waren. Diese lokalen Effekte korrelierten nicht mit den zirkulierenden Konzentrationen. Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ und synthetisiert eine Vielzahl unterschiedlicher Adipokine. Die Unterscheidung von endo- und parakrinen Vorgängen ist nur begrenzt möglich.

In den Zellkulturversuchen bot sich uns die Möglichkeit die Überstände der kultivierten Adipozyten-Gruppen zu sammeln. Diese enthielten sämtliche sezernierten Botenstoffe mit möglicher parakriner Wirksamkeit. Die Überstände konnten nun für eine Inkubation von VSMCs genutzt werden.

Eine 24stündige Inkubation zeigte keine Veränderungen in den Expressionsprofilen von MMP-2 und MMP-9. Nach 48 Stunden war jedoch eine signifikante Hochregulation der MMP-Expression in den VSMCs nachweisbar, die mit dem Überstand TNF- $\alpha$  -aktivierter Adipozyten inkubiert worden waren.

In diesen Experimenten gelang uns eine Annäherung an die eng-nachbarschaftlichen Beziehungen zwischen Gefäßmuskelzellen der Media und Adipozyten des PVAT. TNF- $\alpha$ -aktivierte Adipozyten sezernieren Faktoren, die parakrin eine MMP-Expression in VSMCs induzieren (s. Abb 4-1). Möglicherweise erfolgt diese Induktion über TNF- $\alpha$  selbst. Nachweislich wird adipozytäres TNF- $\alpha$  nicht endogen in den Kreislauf sezerniert, sondern akkumuliert parakrin über Konzentrationsgradienten<sup>138</sup>. Des Weiteren sind die MMP-induzierenden Eigenschaften von TNF- $\alpha$  gut bekannt<sup>153</sup>. Somit sehen wir in dem Zytokin zumindest einen von mehreren parakrinen Induktoren Adipositas-assoziiertes proteolytischer Aktivität in der Gefäßwand.

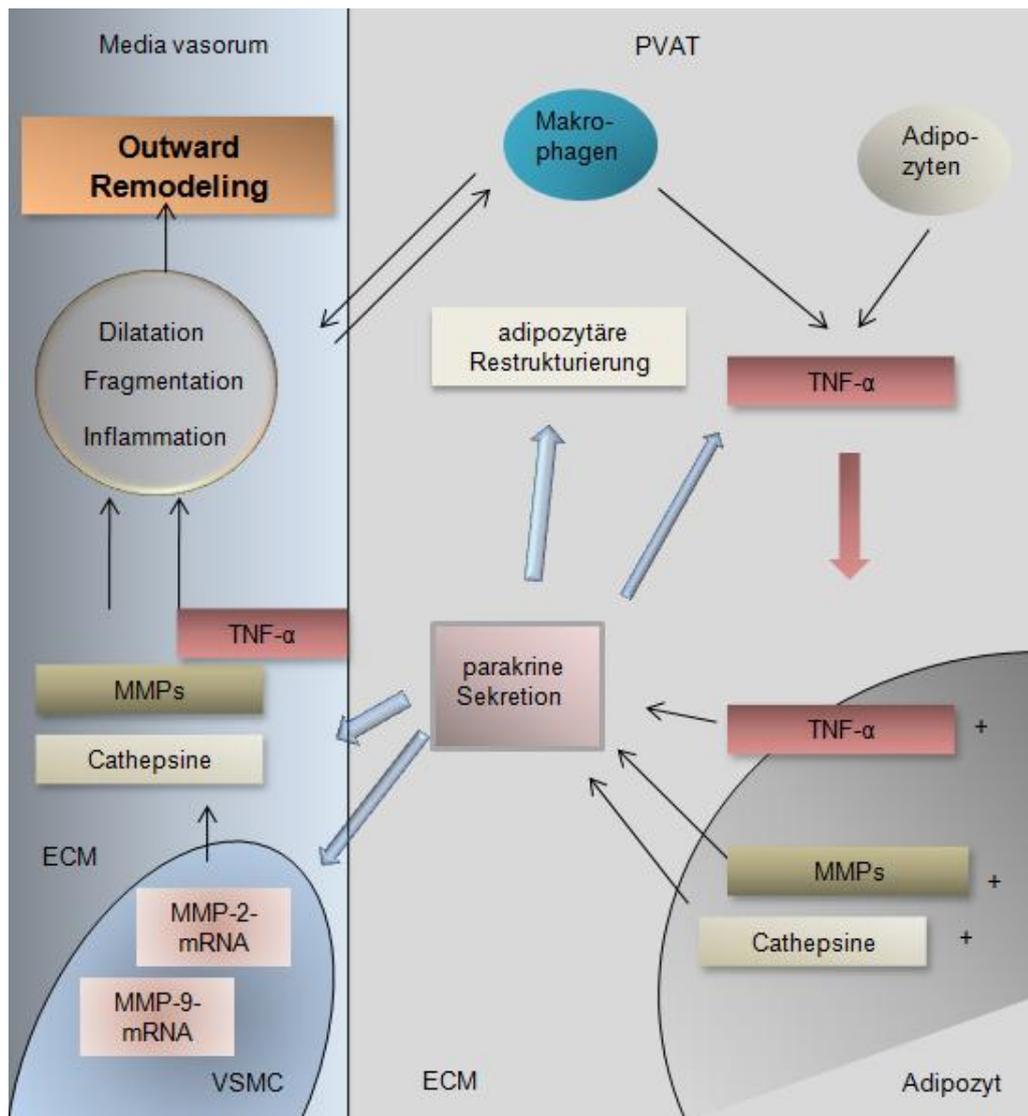


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der parakrinen Effekte des PVAT hinsichtlich der vaskulären Veränderungen nach HFD.

ECM – extrazelluläre Matrix, PVAT – perivaskuläres Fettgewebe, VSMC – glatte Gefäßmuskelzelle

#### 4.5 AT-1-Rezeptor Blockade

Ang II spielt eine herausragende Rolle in der Vermittlung vielfältiger kardiovaskulärer Pathologien. Es beeinflusst neben VSMCs auch Endothelzellen und die ECM. Es ist direkt beteiligt an inflammatorischen, thrombotischen, arteriosklerotischen und fibrotischen Prozessen<sup>154</sup>.

Zusätzlich entfaltet Ang II antagonistische Wirkungen auf den Glukosetransport und Insulinsignalwege mit Folge von Insulinresistenz<sup>155</sup>. Diese Eigenschaften des Ang II legen zusätzlich zu den kardiovaskulären Funktionen eine aktive Beteiligung an den pathologischen Veränderungen im Rahmen der Adipositas nahe<sup>61</sup>. Lokale RAS ergänzen die Wirksamkeit des zirkulierenden RAS auf auto- und parakrinem Wege. Es konnte gezeigt werden, dass wesentliche Komponenten des RAS in Arealen abdominalen Aortenaneurysmen – also Orten extremen *outward Remodelings* - verstärkt exprimiert werden<sup>156</sup>.

AT-1-Antagonisten hemmen die Wirkung des Ang II über eine selektive Blockade des AT-1-Rezeptors. In der Gefäßwand konnte der AT-1-Rezeptor vorrangig in der Adventitia und der glatten Muskulatur der Media, der AT-2-Rezeptor hingegen in den Endothelzellen lokalisiert werden<sup>157</sup>.

Schupp *et al.*<sup>111</sup> konnten eine insulinsensitivierende Funktion von AT-1-Antagonisten über den PPAR $\gamma$ -Weg nachweisen. Kürzlich wurde durch Kaschina *et al.*<sup>144</sup> eine protektive Wirkung von AT-1-Antagonisten für AAA gezeigt. In unserem Arbeitsmodell findet sich eine Kombination beider Funktionen des AT-1-Antagonisten. Lassen sich aneurysmatische Gefäßpathologien mittels Telmisartan abmildern, so ließe sich auch ein *outward Remodeling* abwenden. Und stellte tatsächlich die HFD-assoziierte Insulinresistenz einen ursächlichen Faktor dar, könnten die insulinsensitivierenden Eigenschaften Grundlage einer protektiven Wirkung sein.

Zur Prüfung dieser Hypothesen, bezogen wir zusätzlich den AT-1-Rezeptor-Blocker Telmisartan in unsere Studie mitein. Das Biphenyl-Nicht-Tetrazol Telmisartan hat neben AT-1-antagonisierend Funktionen nachweislich aufgrund seiner hohen Lipophilie gute Wirksamkeit im Fettgewebe und eine hohe Affinität zu PPAR $\gamma$ <sup>111</sup>.

#### **4.5.1 AT-1-Rezeptor-Blockade reduziert *outward Remodeling***

Eine zusätzliche Behandlung mit Telmisartan führte in der HFD-Gruppe zu einer Aufhebung der Dilatation der Aortenwand nach HFD. Sonographisch und histologisch hatte die HFD keinen Einfluss auf den luminalen Durchmesser der Aorten der Telmisartan-Gruppe. Diese Resultate waren vergleichbar mit denen der SD-Kontrollgruppe.

In der histologisch-morphologischen Begutachtung fanden sich in der Telmisartan-Gruppe weiterhin vermehrt zystische Einlagerungen im Sinne von Lipiddepots, als Beleg des Erfolges der HFD. Doch es fehlten sämtliche weiteren mit HFD assoziierten strukturellen Veränderungen in der Aortenwand. In den Aorten der Telmisartan-Gruppe fanden sich nach HFD keine Merkmale des *outward Remodelings*: die Zahl der Elastinfragmentationen sank auf das Niveau der Kontrollgruppe, der Gehalt an Elastin und die strukturelle Dichte der Media stieg sogar über das Kontrollniveau an und der aortale Durchmesser blieb konstant. Auch morphologisch ähnelten diese Aorten denen der SD-Kontrollgruppe. Ähnliche strukturelle Effekte konnten für Telmisartan in einem Aneurysmainduktionsmodell gefunden werden <sup>144</sup>.

In der Telmisartangruppe fand sich ein signifikant gesenkter Blutdruck. Der Blutdruck ist entscheidend involviert in die Ausbildung vaskulärer Pathologien. AT-1-Antagonisten entwickeln ihr blutdrucksenkendes Potential u.a. über eine Vasodilatation vor allem in den peripheren Widerstandsgefäßen <sup>158</sup>. In unseren Untersuchungen der Aorta fanden sich keine Dilatationszeichen nach Telmisartanbehandlung; ganz im Gegenteil konnten wir zeigen, dass eine HFD-assoziierte Dilatation der abdominalen Aorta, die unabhängig von einer Veränderung des Blutdrucks auftrat, durch Telmisartan effektiv verhindert worden war. Die strukturelle Degeneration im Rahmen der HFD erfolgte ohne Änderungen im Blutdruckprofil vergleichend zur SD-Gruppe, so dass wir in unserem Modell keinen Zusammenhang zwischen der strukturellen Wandlung der Gefäßwand nach HFD und hämodynamischen Veränderungen finden konnten. Es konnte in anderen Studien bereits gezeigt werden, dass eine vergleichbare Reduktion des Blutdrucks mit Hydralazin keinen effektiven Schutz gegenüber morphologischen Veränderungen in der Aortenwand bietet <sup>144</sup>. Weiterhin berichten Dai *et al.* <sup>159</sup> ebenfalls über günstige strukturelle Effekte des AT-1-Antagonisten Losartan auf das kardiovaskuläre System in einer Dosierung ohne Affektation des systolischen Blutdrucks.

Es ist davon auszugehen, dass die blutdrucksenkenden Eigenschaften des AT-1-Rezeptor-Antagonisten nach 12 Wochen in einem normotensiven Vergleichsmodell eine untergeordnete Rolle für die Wahrung struktureller Integrität in der Gefäßwand durch Telmisartan spielen.

Zur genaueren Untersuchung des strukturprotektiven Charakters von Telmisartan erfolgte nun eine Analyse der proteolytischen und inflammatorischen Aktivitäten.

#### 4.5.2 AT-1-Rezeptor-Blockade reduziert HFD-assoziierte proinflammatorische und proteolytische Aktivität in Media und PVAT

Die Aorten-Präparate der HFD-Gruppe und zusätzlicher Telmisartanbehandlung wiesen im Vergleich zur reinen HFD-Gruppe signifikant reduzierte TNF- $\alpha$ -Expressionsraten auf. Sowohl im PVAT als auch in der Media war die TNF- $\alpha$ -mRNA etwa auf das Niveau der SD-Gruppe reduziert. Auch CD 68-Expressionslevel waren in der Telmisartan-Gruppe in Media und PVAT signifikant reduziert. Media und PVAT bilden nach HFD ein inflammatorisches Milieu mit hoher Makrophagen- und TNF- $\alpha$ -Aktivität, welche durch Telmisartanapplikation effektiv abgemildert werden können.

Mit der proinflammatorischen Aktivität war auch die proteolytische Aktivität nach Telmisartanbehandlung signifikant reduziert. In deutlicher Analogie zu den Veränderungen der TNF- $\alpha$ -Expression fanden sich Reduktionen der MMP-2 und MMP-9-Expressionsmuster in der Media und im PVAT.

Arenas *et al.*<sup>153</sup> beschrieben für Endothelzellen eine Ang II vermittelte lokale TNF- $\alpha$ -Expression mit nachfolgender MMP-2-Aktivität. Wir konnten für das PVAT und die Media ebenfalls eine Assoziation von TNF- $\alpha$ -Expression und proteolytischer Aktivität durch MMP-2 und MMP-9 nachweisen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nach AT-1-Rezeptor-Blockade durch Telmisartan HFD-assoziierte Expressionslevel von TNF- $\alpha$  sowie MMP-2 und MMP-9 signifikant reduziert waren. Wir belegen somit ein inflammatorisch-proteolytisches System, dass im Rahmen der HFD aktiviert wird und durch Telmisartan reguliert werden kann.

Es bleibt zu berücksichtigen, dass kaum Daten bezüglich Dosierungen und Konzentrationen von Telmisartan im Fettgewebe vorliegen. So ist aufgrund der Lipophilie von Telmisartan, trotz unserer moderaten Dosierung eine Akkumulation im Fettgewebe möglich. Allerdings weisen die Ergebnisse der *real-time-RT-PCR* gleichmäßige, deutliche Reduktionen der unterschiedlichen Expressionen sowohl im PVAT als auch in der Media nach Telmisartan-Behandlung auf. Weiterhin handelt es sich bei den untersuchten Präparaten um Aorten aus *in-vivo* Diätexperimenten, die also als Simulation einer natürlicher Telmisartanverteilung gewertet werden können.

### **4.5.3 Telmisartan hemmt die proteolytische Aktivierung in Adipozyten nach TNF-alpha –Stimulation**

In der Zellkultur mit TNF- $\alpha$ -stimulierten 3T3-L1-Prädipozyten führte eine zusätzliche Behandlung mit dem AT-1-Antagonisten Telmisartan zu einer signifikanten Reduktion der MMP- und Cathepsin-Expression. Auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse per Western Blot bestätigt werden. Es ergibt sich somit eine Wirksamkeit des Telmisartans, die speziell Adipozyten betrifft und hier die Induktion proteolytischer Aktivität durch TNF- $\alpha$  neutralisiert. Große Bedeutung hinsichtlich einer parakrinen Interpretation adipozytärer Inflammation und Proteolyse sowie der vaskuloprotektiven Funktion des Telmisartans haben die Experimente mit den adipozytären Überständen: Die MMP-2 und MMP-9-Expressionen in VSMCs nach 48stündiger Inkubation mit Überständen TNF- $\alpha$ -aktivierter Adipozyten mit zusätzlicher Telmisartanbehandlung waren signifikant reduziert (etwa auf das Niveau der Kontroll-Gruppe ohne TNF- $\alpha$ -Aktivierung) gegenüber einer Inkubation mit Überständen TNF- $\alpha$ -aktivierter Adipozyten ohne Telmisartanbehandlung. Die nachweisliche Triggerung proteolytischer Aktivität in VSMCs durch Überstände TNF- $\alpha$ -aktivierter Adipozyten findet sich nicht durch Überstände Telmisartanbehandelter Adipozyten.

Telmisartan bewirkt somit eine Neutralisation adipozytärer Proteolyse, die wir nach einer TNF- $\alpha$ -Stimulation nachweisen konnten. Diese Neutralisation erfolgt nicht nur über eine direkte Hemmung einer TNF- $\alpha$ -Expression, die wir im aortalen Gewebe dargestellt haben, sondern auch über eine Inhibierung TNF- $\alpha$ -abhängiger proteolytischer Aktivierung, wie sie in den Zellkulturexperimenten mit stimulierten Adipozyten nachvollzogen werden konnten: Überstände telmisartanbehandelter Adipozyten bewirkten trotz TNF- $\alpha$ -Aktivierung keine Induktion proteolytischer Aktivität in VSMCs. Folglich bewirkt Telmisartan eine Reduktion TNF- $\alpha$ -assoziiertes MMP- und Cathepsinaktivität im Fettgewebe und auch der MMP-2- und MMP-9-Induktion in VSMCs.

### **4.5.4 Potentielle Signalwege der Telmisartanwirkung**

Aktuelle Studien beschreiben zwei mögliche Wege insulinsensitivierender Wirkung von AT-1-Rezeptor-Antagonisten. Auf der einen Seite gibt es zahlreiche Hinweise auf eine

Wirksamkeit durch direkte Blockade des AT-1-Rezeptors<sup>160, 161</sup>, auf der anderen Seite gerät mehr und mehr PPAR $\gamma$  in das Interesse der Forschung<sup>112</sup>. PPAR $\gamma$  ist ein nukleäres Rezeptorprotein, das als Transkriptionsfaktor die Genexpression reguliert und so eine Schlüsselrolle in der Zelldifferenzierung in Adipozyten und Makrophagen spielt. Es moduliert die Adipogenese und den Glukosemetabolismus und ist entscheidend in die Entstehung metabolischer Erkrankungen involviert<sup>162, 163</sup>. Thiazolinderivate boten erstmals die Möglichkeit insulinsensitivierender Maßnahmen über PPAR $\gamma$ <sup>164</sup>. Tatsächlich sind für Thiazolinderivate im Fettgewebe hinsichtlich einer Neutralisierung TNF- $\alpha$ -abhängiger Veränderungen ähnliche Eigenschaften beschrieben, wie wir sie für Telmisartan nachweisen konnten<sup>165</sup>. Über den PPAR $\gamma$ -Weg entfaltet Pioglitazon neben den insulinsensitivierenden Eigenschaften eine antiinflammatorische und kardiovaskuloprotektive Wirkung<sup>166</sup>. Weiterhin weist Telmisartan strukturelle Ähnlichkeit mit Pioglitazon auf<sup>167</sup>. Um unsere Untersuchungen dieser Fragestellung anzunähern, führten wir Kontrollversuche mit dem Thiazolinderivat Pioglitazon durch.

In der Pioglitazon-Gruppe fanden sich in Adipozyten nach TNF- $\alpha$ -Stimulation ähnliche Ergebnisse wie in der Telmisartan-Gruppe. Auch hier waren sowohl die MMP-Aktivität als auch die Cathepsin-Aktivität deutlich reduziert. Es lässt sich feststellen, dass über PPAR $\gamma$ -Aktivierung eine Induktion proteolytischer Aktivität in 3T3-L1-Präadipozyten nach TNF- $\alpha$ -Stimulation effektiv verhindert werden kann. Ähnliche Ergebnisse waren durch eine Behandlung mit dem partiellen PPAR $\gamma$ -Agonisten Telmisartan zu erzielen. Somit ließe sich der PPAR $\gamma$ -Weg als mögliche Grundlage antiinflammatorischer und antiproteolytischer Wirksamkeit des Telmisartan im Fettgewebe mutmaßen. Allerdings konnte für Telmisartan eine im Vergleich zu Pioglitazon höhere Wirksamkeit sowohl in der Reduktion der MMP-Aktivität in Adipozyten als auch in der Abwendung einer HFD-assoziierten aortalen Dilatation nachweisen. Somit ist eine isolierte Wirkung des Telmisartan über den PPAR $\gamma$ -Weg auszuschließen.

Dennoch lässt sich für uns nicht abschließend klären, über welche Wege Telmisartan seine komplexe Wirkung in aortaler Media und im Fettgewebe entfaltet. Es scheint ein Zusammenspiel beider Signalebenen über PPAR $\gamma$  und auch AT-1 notwendig zu sein. Inwieweit sich beide Wege ergänzen und welche therapeutischen Konsequenzen sich möglicherweise ergeben, bleibt weiter Gegenstand intensiver Forschung.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit gelang erstmals der Nachweis einer direkten Verbindung zwischen diätinduzierter Adipositas und aortalen Strukturveränderungen im Sinne eines *outward Remodeling*. Ursächlich für diesen Prozess ist ein struktureller Integritätsverlust in der Aortenwand nach HFD. Darüberhinaus erbringt diese Arbeit eine Verknüpfung dysregulierter Funktion des PVAT und vaskulären Strukturverlustes der Media im Rahmen der Adipositas. Wobei das PVAT als Quelle pathologischer proteolytischer und proinflammatorischer Aktivität mit parakriner Beeinflussung der benachbarten Aortenwand ausgemacht werden konnte. Weiterhin konnte Telmisartan als AT-1-Rezeptor-Blocker mit protektiven Eigenschaften identifiziert werden, der sowohl in der Gefäßwand als auch im PVAT TNF- $\alpha$ -induzierte proteolytische und inflammatorische Aktivität wirkungsvoll inhibiert.

Die Grundlage dieser Erkenntnisse bilden folgende Resultate:

1. Als strukturmorphologisches Korrelat der HFD in der Aortenwand fand sich ein pathologisches *outward Remodeling*: Dilatation der Aorta, Strukturverlust durch Fragmentation des elastischen Netzwerks, zystische Degeneration durch Einlagerung von Lipiddepots und ein proinflammatorischer Status in der Gefäßwand mit hoher Zytokin-Aktivität im Sinne einer Aortitis.
2. Grundlage dieser Veränderungen war eine erhöhte proteolytische und inflammatorische Aktivität in der aortalen Media. Hieraus ergab sich eine Degradation der wesentlichen extrazellulären Strukturproteine Elastin und Kollagen.
3. Adipositas-assoziierte Proteolyse und Inflammation konnten sowohl in der Media als auch im PVAT lokalisiert werden. Das perivaskuläre Fett wurde als Quelle von MMPs, Cathepsinen und Zytokinen indentifiziert.
4. Die zentrale Rolle von TNF- $\alpha$  in der Induktion und Vermittlung pathologischer Effekte dysregulierten Fettgewebes konnte nachgewiesen werden: Die Stimulation von Adipozyten mit TNF- $\alpha$  führte zu einer proteolytischen Aktivierung dieser Zellen.
5. Darüberhinaus ließ sich mit dem Überstand TNF- $\alpha$ -aktivierter Adipozyten eine Induktion der MMP-Expression in VSMCs erreichen. Somit ließ sich nach HFD eine vom PVAT ausgehende Induktion von Proteolyse und Inflammation in der gesamten Aortenwand nachweisen. Dysregulierte Aktivität im perivaskulären Fett

nach HFD bewirkte parakrin eine Aktivierung des proteolytischen Systems in der benachbarten Gefäßwand.

- Zudem konnte gezeigt werden, dass der AT-1-Antagonist Telmisartan die TNF- $\alpha$ -Aktivität nach HFD sowohl in PVAT als auch aortaler Media verringerte. Konsekutive antiproteolytische und antiinflammatorische Eigenschaften des Telmisartan verhinderten das mit HFD assoziierte *outward Remodeling* der Aortenwand.

Abbildung 5-1 illustriert schematisch die aufgezeigten Interaktionen von PVAT und Media im Rahmen einer HFD, sowie den Einfluss von Telmisartan.

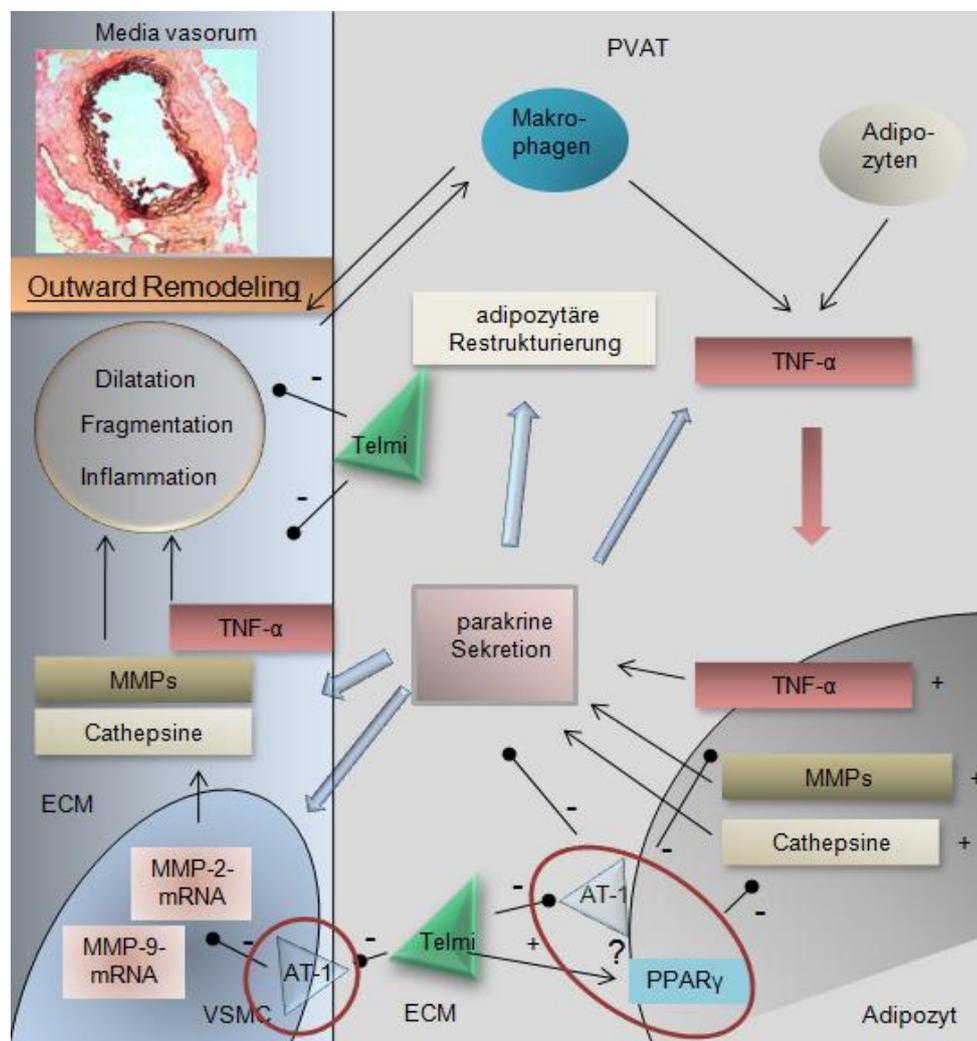


Abbildung 5-1: **Schematische Darstellung der Effekte einer HFD und Telmisartanbehandlung.**

AT-1 – AT-1-Angiotensin-Typ 1-Rezeptor, ECM – extrazelluläre Matrix, PPAR $\gamma$  – Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor gamma, PVAT – perivaskuläres Fettgewebe, Telmi – Telmisartan, VSCM – glatte Gefäßmuskelzelle.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1: Aufbau der Arterienwand. ....	2
Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau der unterschiedlichen MMPs. ....	7
Abbildung 1-3: Renin-Angiotensinsystem. ....	17
Abbildung 1-4: Telmisartan. ....	19
Abbildung 2-1: Protokoll der 3T3-L1-Zellkultur. ....	30
Abbildung 2-2: Protokoll der 3T3-L1-Zellkultur mit VSMC-Stimulation. ....	31
Abbildung 2-3: Setup der PCR. ....	37
Abbildung 3-1: Effekte der HFD auf Körpergewicht und gonadales Fettgewebe. ....	42
Abbildung 3-2: Entwicklung von Glukosetoleranz und Insulinsensitivität. ....	43
Abbildung 3-3: Aortale Dilatation nach HFD. ....	44
Abbildung 3-4: Lumen und Media-Dimensionen der Aorta nach HFD. ....	44
Abbildung 3-5: Histologische Auswirkungen der HFD in der Aortenwand. ....	45
Abbildung 3-6: Fragmentationsindex. ....	46
Abbildung 3-7: Zystische Mediadegeneration. ....	47
Abbildung 3-8: Elastin-Fraktion. ....	47
Abbildung 3-9: Histologische Darstellung des HFD-Einfluss: PVAT. ....	48
Abbildung 3-10: Effekt der HFD auf die aortale MMP-2 und MMP-9-Expression. ....	50
Abbildung 3-11: MMP-2-Immunohistochemie. ....	51
Abbildung 3-12: Effekt der HFD auf die aortale MMP-3 und MMP-12-Expression. ....	52
Abbildung 3-13: Effekt der HFD auf die aortale TIMP-Expression. ....	53
Abbildung 3-14: TIMP-1-Immunohistochemie. ....	53
Abbildung 3-15: Effekt der HFD auf aortale Cathepsin B- und -D-Expression. ....	54
Abbildung 3-16: Cathepsin B-Immunohistochemie. ....	55
Abbildung 3-17: Cathepsin D-Immunohistochemie. ....	55
Abbildung 3-18: Effekt der HFD auf TNF- $\alpha$ - und Interleukin-1 $\beta$ -Expression. ....	57
Abbildung 3-19: TNF- $\alpha$ -Immunohistochemie. ....	57
Abbildung 3-20: Immunohistochemischer Nachweis proteolytischer und proinflammatorischer Aktivitäten nach HFD im PVAT. ....	58
Abbildung 3-21: Analyse der adipozytären Cathepsin B- und D-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation. ....	60

Abbildung 3-22: Analyse der adipozytären Cathepsin B- und D-Protein- expressionslevel nach TNF- $\alpha$ -Stimulation sowie Telmisartan- und Pioglitazonwirkungen. ....	60
Abbildung 3-23: Analyse der adipozytären MMP-2- und MMP-9-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation. ....	61
Abbildung 3-24: Analyse der adipozytären MMP-3-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation. ....	61
Abbildung 3-25: Analyse der adipozytären MMP-2- und MMP-3-Proteinexpressions- level nach TNF- $\alpha$ -Stimulation sowie Telmisartan- und Pioglitazonwirkungen. ....	62
Abbildung 3-26: Analyse der MMP-2-mRNA-Expression in VSMCs nach Inkubation mit adipozytären Überständen nach 24 und 48 Stunden. .	64
Abbildung 3-27: Analyse der MMP-9-mRNA-Expression in VSMCs nach Inkubation mit adipozytären Überständen nach 24 und 48 Stunden. .	64
Abbildung 3-28: Sonographische Analyse des aortalen Diameters nach HFD. ....	66
Abbildung 3-29: Longitudinaler Durchmesser der Aorta. ....	66
Abbildung 3-30: Sonographische Analyse des aortalen Diameters nach HFD und Telmisartanbehandlung. ....	67
Abbildung 3-31: Longitudinaler Durchmesser der Aorta nach HFD und Behandlung. ...	67
Abbildung 3-32: Systolischer und diastolischer sowie mittlerer Blutdruck. ....	68
Abbildung 3-33: Histologischer Vergleich von SD, HFD und HFD mit Telmisartan. ....	69
Abbildung 3-34: Lumen- und Media-Dimension der Aorta abdominalis nach HFD sowie zusätzlicher Telmisartanbehandlung. ....	69
Abbildung 3-35: Analyse der Telmisartanwirkung auf den Fragmentationsindex. ....	70
Abbildung 3-36: Analyse der Telmisartanwirkung auf zystische Einlagerungen nach HFD. ....	71
Abbildung 3-37: Analyse der Telmisartanwirkung auf die Elastin-Fraktion. ....	71
Abbildung 3-38: Analyse der SMA- und DEPP-mRNA-Expression in Media und PVAT. ....	72
Abbildung 3-39: Analyse der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression in Media und PVAT. ....	73
Abbildung 3-40: Analyse der CD68-mRNA-Expression in Media und PVAT. ....	74
Abbildung 3-41: Analyse der MMP-2- und MMP-9-mRNA-Expression in Media und PVAT. ....	74
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der parakrinen Effekte des PVAT	

---

hinsichtlich der vaskulären Veränderungen nach HFD.....	87
Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Effekte einer HFD und Telmisartanbehandlung.....	94
Tabelle 2-1: Verzeichnis der verwendeten Primersequenzen .....	23
Tabelle 2-2: verwendete Primärantikörper.....	24
Tabelle 2-3: verwendete Sekundärantikörper .....	24
Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele .....	33
Tabelle 2-5: PCR-Reaktionsansatz .....	36
Tabelle 2-6: Reaktionsansatz zur reversen Transkription.....	38
Tabelle 3-1: Bewertungsmaßstab für die Erhebung der semiquantitativen Scores. ....	46

## 7 Literaturverzeichnis

1. Geneser F, Schwerdtfeger W. *Histologie*. Köln: Deutscher Ärzteverlag; 1995.
2. Gutterman DD. Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol*. 1999;277:H1265-1272.
3. Risau W. Differentiation of endothelium. *Faseb J*. 1995;9:926-933.
4. Gonzalez MC, Arribas SM, Molero F, Fernandez-Alfonso MS. Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2876-2881.
5. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:134-145.
6. Brooke BS, Bayes-Genis A, Li DY. New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:176-181.
7. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 1994;330:1431-1438.
8. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2000;102:1186-1191.
9. Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R, Pratt RE. New perspectives in hypertension research. Potentials of vascular biology. *Hypertension*. 1994;23:1132-1140.
10. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2007.
11. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365:1577-1589.
12. Thompson RW, Curci JA, Ennis TL, Mao D, Pagano MB, Pham CT. Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms: insights from the elastase-induced model in mice with different genetic backgrounds. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1085:59-73.
13. Wang DH, Makaroun M, Webster MW, Vorp DA. Mechanical properties and microstructure of intraluminal thrombus from abdominal aortic aneurysm. *J Biomech Eng*. 2001;123:536-539.
14. McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:461-469.
15. Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, Taylor GW, Powell JT. Inhibition of prostaglandin E2 synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 1999;100:48-54.
16. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002;110:625-632.
17. Keen RR, Nolan KD, Cipollone M, Scott E, Shively VP, Yao JS, Pearce WH. Interleukin-1 beta induces differential gene expression in aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 1994;20:774-784; discussion 784-776.
18. Norman P, Le M, Pearce C, Jamrozik K. Infrarenal aortic diameter predicts all-cause mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1278-1282.

19. Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery*. 1997;122:264-271; discussion 271-262.
20. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett*. 1990;268:386-393.
21. Labat-Robert J, Robert L. Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static-rheological role to a dynamic-signaling function. *Pathol Biol (Paris)*. 2005;53:369-371.
22. Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*. 2007;11:176-205.
23. Wall SJ, Jiang Y, Muschel RJ, DeClerck YA. Meeting report: Proteases, extracellular matrix, and cancer: an AACR Special Conference in Cancer Research. *Cancer Res*. 2003;63:4750-4755.
24. Ferrans VJ. New insights into the world of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2002;105:405-407.
25. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:346-359.
26. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*. 1995;309 ( Pt 1):299-306.
27. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol*. 2003;4:216.
28. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007.
29. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*. 1990;29:10261-10270.
30. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275:26411-26415.
31. Janssens S, Lijnen HR. What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? *Cardiovasc Res*. 2006;69:585-594.
32. Chew DK, Conte MS, Khalil RA. Matrix metalloproteinase-specific inhibition of Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of vascular contraction. *J Vasc Surg*. 2004;40:1001-1010.
33. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1145-1151.
34. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:501-507.
35. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases in venous tissue remodeling and varicose vein formation. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008;6:158-172.
36. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005;9:267-285.
37. Lijnen HR, Maquoi E, Holvoet P, Mertens A, Lupu F, Morange P, Alessi MC, Juhan-Vague I. Adipose tissue expression of gelatinases in mouse models of obesity. *Thromb Haemost*. 2001;85:1111-1116.

38. Demeulemeester D, Collen D, Lijnen HR. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on adipose tissue development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329:105-110.
39. Chavey C, Mari B, Monthouel MN, Bonnafous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-Deckert S. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2003;278:11888-11896.
40. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai P, Jr., Razak F, Sharma AM, Anand SS. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet.* 2005;366:1640-1649.
41. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:639-646.
42. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115:3719-3727.
43. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. 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;109:433-438.
44. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs.* 1997;15:61-75.
45. Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;878:73-91.
46. Unoki H, Bujo H, Jiang M, Kawamura T, Murakami K, Saito Y. Macrophages regulate tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in adipocytes through the secretion of matrix metalloproteinase-3. *Int J Obes (Lond).* 2008;32:902-911.
47. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J.* 1992;282 ( Pt 1):273-278.
48. Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol.* 1986;251:E576-583.
49. Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie.* 2007.
50. Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *Faseb J.* 2007;21:3029-3041.
51. Resende MM, Mill JG. Alternate angiotensin II-forming pathways and their importance in physiological or physiopathological conditions. *Arq Bras Cardiol.* 2002;78:425-438.
52. Xiao Y, Junfeng H, Tianhong L, Lu W, Shulin C, Yu Z, Xiaohua L, Weixia J, Sheng Z, Yanyun G, Guo L, Min L. Cathepsin K in adipocyte differentiation and its potential role in the pathogenesis of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4520-4527.
53. Demoz M, Castino R, Follo C, Hasilik A, Sloane BF, Isidoro C. High yield synthesis and characterization of phosphorylated recombinant human procathepsin D expressed in mammalian cells. *Protein Expr Purif.* 2006;45:157-167.

54. Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278:31401-31411.
55. Briozzo P, Badet J, Capony F, Pieri I, Montcourrier P, Barritault D, Rochefort H. MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D. *Exp Cell Res.* 1991;194:252-259.
56. Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Embo J.* 2001;20:4629-4633.
57. Kolkhorst V, Sturzebecher J, Wiederanders B. Inhibition of tumour cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998;124:598-606.
58. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:772-783.
59. Guzik TJ, Mangalat D, Korbout R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol.* 2006;57:505-528.
60. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27:875-888.
61. Goossens GH, Blaak EE, van Baak MA. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev.* 2003;4:43-55.
62. Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:275-283.
63. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose Tissue and Atherosclerosis. Exploring the Connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007.
64. Thalmann S, Meier CA. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res.* 2007;75:690-701.
65. Douketis JD, Sharma AM. Obesity and cardiovascular disease: pathogenic mechanisms and potential benefits of weight reduction. *Semin Vasc Med.* 2005;5:25-33.
66. Lohn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *Faseb J.* 2002;16:1057-1063.
67. Singer G, Granger DN. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation.* 2007;14:375-387.
68. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med.* 2001;345:790-797.
69. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2583-2589.
70. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18:313-325.
71. Daskalopoulou SS, Athyros VG, Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Mikhailidis DP. Definitions of metabolic syndrome: Where are we now? *Curr Vasc Pharmacol.* 2006;4:185-197.

72. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med.* 2006;355:763-778.
73. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:327-332.
74. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004;145:2273-2282.
75. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr Atheroscler Rep.* 2004;6:424-431.
76. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796-1808.
77. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96:939-949.
78. Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Penicaud L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J.* 1999;13:305-312.
79. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:e13-18.
80. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539-553.
81. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007;48:751-762.
82. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2007.
83. Ryden M, Arner P. Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue - from signalling mechanisms to clinical implications. *J Intern Med.* 2007;262:431-438.
84. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72:3666-3670.
85. Sugano M, Tsuchida K, Hata T, Makino N. In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats. *Faseb J.* 2004;18:911-913.
86. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature.* 1997;389:610-614.
87. Fernandez-Alfonso MS. Regulation of vascular tone: the fat connection. *Hypertension.* 2004;44:255-256.
88. Chatelain RE, Dardik BN. Increased DNA replication in the arterial adventitia after aortic ligation. *Hypertension.* 1988;11:1130-134.
89. Maiellaro K, Taylor WR. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2007;75:640-648.

90. Haurani MJ, Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovasc Res.* 2007;75:679-689.
91. Nelson EB, Pool JL, Taylor AA. Pharmacology of angiotensin converting enzyme inhibitors. A review. *Am J Med.* 1986;81:13-18.
92. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52:415-472.
93. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86:747-803.
94. Danser AH. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:759-768.
95. Hermann K, McDonald W, Unger T, Lang RE, Ganten D. Angiotensin biosynthesis and concentrations in brain of normotensive and hypertensive rats. *J Physiol (Paris).* 1984;79:471-480.
96. Kim S, Soltani-Bejnood M, Quignard-Boulangé A, Massiera F, Teboul M, Ailhaud G, Kim JH, Moustaid-Moussa N, Voy BH. The adipose Renin-Angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal Renin-Angiotensin system. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006:27012.
97. Engeli S. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the metabolic syndrome. *Contrib Nephrol.* 2006;151:122-134.
98. Aubert J, Safonova I, Negrel R, Ailhaud G. Insulin down-regulates angiotensinogen gene expression and angiotensinogen secretion in cultured adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250:77-82.
99. Galvez-Prieto B, Dubrovskaja G, Cano MV, Delgado M, Arangué I, González MC, Ruiz-Gayo M, Gollasch M, Fernández-Alfonso MS. A reduction in the amount and anti-contractile effect of periaortic mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2008;31:1415-1423.
100. Saye JA, Cassis LA, Sturgill TW, Lynch KR, Peach MJ. Angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol.* 1989;256:C448-451.
101. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1623-1629.
102. Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J Vasc Res.* 2005;42:415-423.
103. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 2003;12:70-88.
104. Schiffrin EL, Touyz RM. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:911-913.
105. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342:145-153.
106. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H. Cardiovascular morbidity and mortality in the

- Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002;359:995-1003.
107. Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med*. 2008;358:1547-1559.
  108. Shiuchi T, Cui TX, Wu L, Nakagami H, Takeda-Matsubara Y, Iwai M, Horiuchi M. ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension*. 2002;40:329-334.
  109. Leiter LA, Lewanczuk RZ. Of the renin-angiotensin system and reactive oxygen species Type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. *Am J Hypertens*. 2005;18:121-128.
  110. 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;110:245-252.
  111. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation*. 2004;109:2054-2057.
  112. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes*. 2005;54:3442-3452.
  113. Goebel M, Clemenz M, Staels B, Unger T, Kintscher U, Gust R. Characterization of new PPARgamma agonists: analysis of telmisartan's structural components. *ChemMedChem*. 2009;4:445-456.
  114. Golledge J, Clancy P, Jamrozik K, Norman PE. Obesity, adipokines, and abdominal aortic aneurysm: Health in Men study. *Circulation*. 2007;116:2275-2279.
  115. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, Tome D, Jais JP, Junien C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:1996-2005.
  116. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:798-808.
  117. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of Telmisartan as a Unique Angiotensin II Receptor Antagonist With Selective PPAR{gamma}-Modulating Activity. *Hypertension*. 2004;43:993-1002.
  118. Schlatmann TJ, Becker AE. Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aortic aneurysm. *Am J Cardiol*. 1977;39:13-20.
  119. Schlatmann TJ, Becker AE. Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta. Comparative histopathologic study of significance of medial changes. *Am J Cardiol*. 1977;39:21-26.
  120. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem*. 1993;53:288-295.
  121. Dasu MR, Barrow RE, Spies M, Herndon DN. Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts. *Burns*. 2003;29:527-531.
  122. Wassink AM, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Visseren FL. Metabolic syndrome and the risk of new vascular events and all-cause mortality in patients with coronary artery disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J*. 2008;29:213-223.

123. Gorter PM, Visseren FL, Moll FL, van der Graaf Y. Intra-abdominal fat and metabolic syndrome are associated with larger infrarenal aortic diameters in patients with clinically evident arterial disease. *J Vasc Surg.* 2008;48:114-120.
124. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005;112:2735-2752.
125. Gollasch M, Dubrovskaja G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:647-653.
126. Dubrovskaja G, Verloren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1107-1113.
127. Gao YJ, Lu C, Su LY, Sharma AM, Lee RM. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol.* 2007;151:323-331.
128. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism.* 1995;44:645-651.
129. Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, Widmer CC, Kretz M, Hofmann-Lehmann R, Minotti R, Barton M. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res.* 2007;73:368-375.
130. Woods SC, D'Alessio DA, Tso P, Rushing PA, Clegg DJ, Benoit SC, Gotoh K, Liu M, Seeley RJ. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. *Physiol Behav.* 2004;83:573-578.
131. Williams TD, Chambers JB, Roberts LM, Henderson RP, Overton JM. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:769-778.
132. Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Aorta wall quantitative alterations due to different long-term high-fat diet in rats. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:1391-1397.
133. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000;130:3122S-3126S.
134. Mallow H, Trindl A, Loffler G. Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res.* 2000;32:500-503.
135. Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem.* 1999;274:6770-6775.
136. Lin J, Page KA, Della-Fera MA, Baile CA. Evaluation of adipocyte apoptosis by laser scanning cytometry. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004;28:1535-1540.
137. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
138. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259:87-91.
139. Jovinge S, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Nilsson J. Tumor necrosis factor-alpha activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:490-497.

140. Lutgens E, de Muinck ED, Heeneman S, Daemen MJ. Compensatory enlargement and stenosis develop in apoE(-/-) and apoE\*3-Leiden transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1359-1365.
141. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, Teepen H, van der Wal AC, Borst C. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000;150:245-253.
142. Bouloumie A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes.* 2001;50:2080-2086.
143. Tsukuba T, Okamoto K, Yasuda Y, Morikawa W, Nakanishi H, Yamamoto K. New functional aspects of cathepsin D and cathepsin E. *Mol Cells.* 2000;10:601-611.
144. Kaschina E, Schrader F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Grzesiak A, Krikov M, Unger T. Telmisartan prevents aneurysm progression in the rat by inhibiting proteolysis, apoptosis and inflammation. *J Hypertens.* 2008;26:2361-2373.
145. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409-2415.
146. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1304-1310.
147. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2062-2068.
148. Ozaki CK, Jiang Z, Berceci SA. TNF- $\alpha$  and shear stress-induced large artery adaptations. *J Surg Res.* 2007;141:299-305.
149. Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg.* 2002;35:254-261.
150. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache JC, Velebit V, Dayer JM, Meda P, Chizzolini C, Meier CA. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2594-2599.
151. Yudkin JS, Eringa E, Stehouwer CD. "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet.* 2005;365:1817-1820.
152. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper EA, Johnson AG, Martin J, Goldstein BJ, Shi Y. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation.* 2003;108:2460-2466.
153. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C779-784.

154. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C82-97.
155. Henriksen EJ. Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R974-980.
156. Kaschina E, Scholz H, Steckelings UM, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Artuc M, Schmidt S, Unger T. Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components. *Atherosclerosis.* 2009.
157. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens.* 2000;13:31S-38S.
158. Kang PM, Landau AJ, Eberhardt RT, Frishman WH. Angiotensin II receptor antagonists: a new approach to blockade of the renin-angiotensin system. *Am Heart J.* 1994;127:1388-1401.
159. Dai Q, Xu M, Yao M, Sun B. Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2007;152:1042-1048.
160. Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest.* 1997;100:2158-2169.
161. Bonnet F, Patel S, Laville M, Balkau B, Favuzzi A, Monti LD, Lalic N, Walker M. Influence of the ACE gene insertion/deletion polymorphism on insulin sensitivity and impaired glucose tolerance in healthy subjects. *Diabetes Care.* 2008;31:789-794.
162. Klier SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:7355-7359.
163. Picard F, Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:167-197.
164. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes.* 2005;54:2460-2470.
165. Szalkowski D, White-Carrington S, Berger J, Zhang B. Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells. *Endocrinology.* 1995;136:1474-1481.
166. Rocchi S, Picard F, Vamecq J, Gelman L, Potier N, Zeyer D, Dubuquoy L, Bac P, Champy MF, Plunket KD, Leesnitzer LM, Blanchard SG, Desreumaux P, Moras D, Renaud JP, Auwerx J. A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol Cell.* 2001;8:737-747.
167. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension.* 2004;43:993-1002.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Unger für die Überlassung des Themas und das Vertrauen in meine Arbeit, wodurch mir ein ausgesprochen lehrreicher und spannender Einblick in die Wissenschaft ermöglicht wurde.

Großer Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. Elena Kaschina, die durch ihre fachliche Anleitung sowie geduldige und fürsorgliche Unterstützung motivierend meine wissenschaftliche Arbeit begleitet hat.

Ich danke Dr. Anna Foryst-Ludwig, Dr. Kai Kappert, Markus Clemenz und Prof. Dr. Ulrich Kintscher sowie Alexandra Grzesiak, Manuela Sommerfeld und Rudi Kemnitz für Rat und Tat bei der Planung und Durchführung der Experimente.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des gesamten CCR, die eine angenehme Atmosphäre für die Arbeit und auch darüberhinaus geschaffen haben.

Katharina danke ich herzlich für ihre unermüdliche Unterstützung und ihr Auge für Formatierungsästhetik.

Im Besonderen möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, deren bedingungslose Unterstützung diese Arbeit und auch meine gesamte Ausbildung erst ermöglicht haben.

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Friedrich Krüger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Aortales Remodeling bei Diät-induzierter Adipositas und mögliche pharmakologische Interventionen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

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