

## 4. Diskussion

### 4.1. 3T3-L1 Zellen

Da Adiponektin nur im Fettgewebe exprimiert wird [81], konnte der Einfluss des RAS auf dieses Adipozytokin *in-vitro* nur mit Hilfe einer Adipozytenzelllinie untersucht werden. Auch ein lokales RAS bzw. zumindest die Expression des AT1- und AT2R waren demzufolge eine Voraussetzung für das passende Zellsystem dieser Arbeit.

Die 3T3-L1 Zelllinie wird aus disaggregierten Swiss 3T3-Mausembryos gewonnen [137, 138] und stellt eines der meist verwendeten und zuverlässigsten Modelle zur Untersuchung der Adipozytenfunktionen incl. deren Konversion aus Präadipozyten dar [136]. In Kultur besitzen differenzierte 3T3-L1 Adipozyten die meisten Charakteristika von Fettzellen aus Tiergewebe [139]. Auch die Bildung und das Aussehen ihrer Fetttröpfchen ist gut mit denen in Gewebefettzellen vergleichbar [137]. Ein lokales RAS konnte für diese Zelllinie ebenfalls nachgewiesen werden. So weisen 3T3-L1 Zellen sowohl AGT [157] und Ang II [158], als auch den AT1- und den AT2R [159] auf.

Aus den oben genannten Gründen eignete sich dieses Zellmodell deswegen besonders gut für die vorliegende Arbeit und wurde dafür verwendet.

Zunächst wurde überprüft, ob sich die 3T3-L1 Zellen unter den gegebenen Laborbedingungen und dem verwendeten Differenzierungsmix (siehe 2.2.1.) in ausreichendem Maße differenzieren ließen und die beiden AT-Rezeptoren exprimierten.

Die unter 3.1. gezeigte, erfolgreiche Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten mit dem unter 2.2.1. beschriebenen Differenzierungsmix konnte die in der Literatur gemachten Angaben [160] bestätigen und war Grundvoraussetzung für das weitere Vorgehen.

**Adiponektinexpression in 3T3-L1 Zellen.** Natürlich war auch der Beweis der vorhandenen Adiponektinexpression eine zwingende Voraussetzung für die Arbeit mit diesem Zellsystem und ein wichtiger Beleg für das Funktionieren der in dieser Arbeit genutzten Methoden.

Dieser konnte unter 3.2. sowohl für die Adiponektin-mRNA-Expression mit der semiquantitativen RT-PCR und der quantitativen Realtime-PCR, als auch für die Adiponektin-Proteinexpression mit Hilfe des Western-Blots erbracht werden. Mit den entsprechenden Methoden konnte jeweils ein deutliches Adiponektin-Expressionssignal bei vollständig ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten (Tag 7) detektiert werden, während mit Präadipozyten (Tag 0) entsprechend keine Expression nachweisbar war.

Diese Ergebnisse stehen in vollem Einklang mit anderen Arbeiten, die ebenfalls das Vorhandensein von Adiponektin ausschließlich in differenzierten Adipozyten bzw. Fettgewebe zeigten. Schon der erste Report über das Adiponektin (ACRP30) 1995 von Scherer et al. [81] konnte in der Maus eindeutig die Adiponektin-mRNA- und -proteinexpression nur im Fettgewebe und in differenzierten 3T3-L1 Zellen nachweisen, während in anderen Gewebearten und in undifferenzierten 3T3-L1 Präadipozyten kein Adiponektin detektierbar war. Auch Hu et al. [82] bestätigten unabhängig davon dieselben Ergebnisse und konnten dies auch auf die Ratte erweitern. Hinweise für die ausschließliche Produktion von Adiponektin im menschlichen Fettgewebe finden sich bei Maeda et al. [83] und Nakano et al. [85].

Die in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse zur Adiponektinexpression stehen somit im Einklang mit der bisherigen Literatur und können als Positivkontrolle für die Richtigkeit und das Funktionieren der hier verwendeten Methoden einschließlich der entsprechenden Primer und Antikörper angesehen werden.

## 4.2. Adiponektin und das RAS

In 3T3-L1 Zellen und im Fettgewebe wird, wie unter 4.1. beschrieben, Adiponektin exprimiert. Ein lokales RAS konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Zum Einfluss von RAS-Komponenten bzw. der Modulation des Systems auf die Expression von Adiponektin ist allerdings bisher nur wenig bekannt.

Umso interessanter wurde deswegen die Analyse dieser Beziehung, da die insulinsensitivierende Wirkung des Adiponektins (siehe 1.5.4.) sowie der RAS-Blockade (siehe 1.4.5.) gut und umfangreich belegt ist.

**AT-Rezeptorexpression in 3T3-L1 Zellen.** Zunächst war das Vorhandensein des AT1- und des AT2R sowohl im präadipozytären als auch im adipozytären Zustand der 3T3-L1 Zellen (3.3.) Vorbedingung. Die bisher gemachten Erfahrungen bezüglich der AT-Rezeptorexpression in 3T3-L1 Zellen sind allerdings widersprüchlich. Den AT1R konnten auch Mallow et al. [159] im prä- und adipozytären Zustand nachweisen, während Jones et al. [123] dieses Ergebnis, allerdings mit einem indirekten Nachweis (Bindungsstudien des AT1-Antagonisten Losartan als Kompetitor), nicht erzielen konnten. Beim AT2R ist es umgekehrt. Hier fanden Mallow et al. [159] eine inverse Korrelation zwischen der AT2R-Expression und dem Grad der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen, während Jones et al. [123] mit den o.g. Bindungsstudien den AT2R auch in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten (Tag 7) nachweisen konnten. Allerdings waren Mallow et al. an Tag 7, also am gewählten Endpunkt der Differenzierung in dieser Arbeit, in der Lage, auch noch geringe Mengen AT2R finden, was

zumindest im Einklang mit der hier zum Ende der Differenzierung festgestellten geringeren Menge an AT2R steht.

Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen und der Ergebnisse dieser Arbeit kann also angenommen werden, dass beide AT-Rezeptoren sowohl in 3T3-L1 Präadipozyten, als auch in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten vorhanden sind.

**Adiponektin und Ang II.** Die unter 3.4. beschriebenen Versuchsreihen sind der erste Beweis dafür, dass Ang II die Adiponektin-Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten dosis- und zeitabhängig induzieren kann.

Dass das Ang II seine Wirkung in einem nur relativ engen Dosisbereich und dazu noch bei relativ niedrigen Dosen zeigte überrascht nicht, da die normalen Plasmaspiegel von Ang II *in-vivo* in einem ähnlichen, wenn auch etwas geringeren Bereich liegen (10 - 100 pM). Außerdem ist zu den Konzentrationen im Fettgewebe noch nichts bekannt. Deswegen könnte die in dieser Arbeit erst bei etwa 10 bis 100-fach größeren Konzentrationen einsetzende Wirksamkeit des Ang II daraus resultieren, dass auch *in vivo* das zirkulierende Ang II im Fettgewebe kumuliert und somit dort erst bei höheren Konzentrationen als im Plasma seine biologische Wirkung entfaltet.

Ein dosisabhängiger Effekt von Ang II konnte auch in anderen Studien registriert werden. So ermöglichte eine lokale Behandlung über osmotische Minipumpen mit 10 pM Ang II die physiologische und funktionelle Regeneration nach einer Ruptur des Ischias-Nervs in Ratten. Dieser AT2R-vermittelte Effekt war bei Konzentrationen von 1 nM Ang II deutlich geringer ausgeprägt und bei noch höheren Konzentrationen von 100 nM nicht mehr nachweisbar [161]. Die Unwirksamkeit höherer Ang II-Konzentrationen könnte damit auf ein dann vermehrtes Besetzen des AT1R hindeuten, der wie schon erwähnt, bei vielen Funktionen des Ang II gegenläufig zum AT2R wirkt.

Dadurch könnte der AT2R-vermittelte Effekt in der Studie verringert worden sein.

Der eben beschriebene Prozess könnte damit auch die in dieser Arbeit gefundene Dosisabhängigkeit des AT2R-vermittelten Effekts des Ang II auf die Adiponektin-Proteinexpression erklären.

Eine Induktion der Adiponektin-mRNA-Expression in 3T3-L1 Adipozyten konnte durch Ang II nicht erreicht werden, was auch von Fasshauer et al. [162] nicht berichtet wurde. Auch ein Einfluss von Ang II auf die kürzlich entdeckten Adiponektinrezeptoren [89] konnte von derselben Arbeitsgruppe nicht festgestellt werden [90], die allerdings jeweils sehr hohe Dosen des Ang II (10  $\mu$ M) verwendeten und die Adiponektin-Proteinexpression nicht analysierten.

Da für die vorliegende Analyse aber genau die Konzentrationen an Ang II eingesetzt wurden, die für die Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression verantwortlich war, fiel eine nicht richtig gewählte Ang II-Konzentration als Ursache für den nicht vorhandenen Einfluss auf die mRNA-Expression des Adiponektins aus und machte einen post-transkriptionellen Mechanismus wahrscheinlicher.

**Adiponektin und AT-Rezeptormodulation.** Um herauszufinden, über welchen Rezeptor die Ang II-induzierte Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression vermittelt sein könnte, wurden zunächst die AT1-Rezeptoren durch Präinkubation mit steigenden Konzentrationen des AT1-Antagonisten Irbesartan blockiert, welches in einer deutlichen und statistisch signifikanten Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression resultierte. Dies deutete auf eine Involvierung des AT2R in der Ang II-induzierten Steigerung der Adiponektinkonzentration hin. Da die AT1-Rezeptoren zumindest bei der gewählten Konzentration vollständig blockiert waren, dürfte das vorhandene Ang II nun ausschließlich an

die AT2-Rezeptoren gebunden haben, was die erwähnte Steigerung verursacht haben könnte.

Um die Rolle des AT2R in der Ang II-induzierten Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression weiter zu eruieren und zu verifizieren, wurden danach die AT2-Rezeptoren in den 3T3-L1 Adipozyten durch Präinkubierung mit dem selektiven AT2R-Antagonisten PD 123319 blockiert. Durch diese Maßnahme konnte die Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression durch Ang II vollständig inhibiert werden, was die schon oben in Erwägung gezogene mögliche Stimulierung über den AT2R eindrucksvoll bestätigt.

Als weiterer Nachweis dieser Hypothese diene die Stimulation des AT2R mit dem selektiven Agonisten CGP 42112A, der zu einer noch potenteren Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression, als der durch das Ang II verursachten, fähig war. Somit konnte unter 3.5. die AT2R-vermittelte Steigerung der Adiponektin-Proteinkonzentration durch Ang II überzeugend belegt werden.

Um dies in einen pathophysiologischen Kontext zu bringen, muss man zunächst bedenken, dass Adipositas oft mit einer Insulinresistenz einhergeht, die Zusammenhänge von übermäßiger Fettmasse und dem (prä-)diabetischen Zustand jedoch noch nicht vollständig klar sind. Da sich in letzter Zeit sowohl Hinweise auf das Vorhandensein von einem lokalen RAS im Fettgewebe [120, 163, 164], als auch Berichte über die insulinsensitivierende Wirkung des Adiponektins häufen [80, 94, 105], könnte lokal produziertes Ang II eine autokrine, parakrine und/ oder endokrine Rolle in der Pathophysiologie der Adipositas spielen. In diesem Falle wäre eine AT2R-vermittelte Steigerung der Konzentration des Adipozytokins Adiponektin ein möglicher Mechanismus, über den sich die mit dieser Stoffwechselstörung assoziierten insulinresistenten Zustände verbessern könnten. So wäre auch die durch AT1R-Blockade in den

unter 1.4. erwähnten Studien LIFE, CHARM und VALUE hervorgerufene Senkung der Inzidenz von neu aufgetretenem Diabetes Typ 2 durch vermehrt am AT2R angreifendes Ang II und der damit verbundenen Steigerung der Adiponektinkonzentration möglich (siehe Arbeitsmodell 1; Abbildung 4.1.).

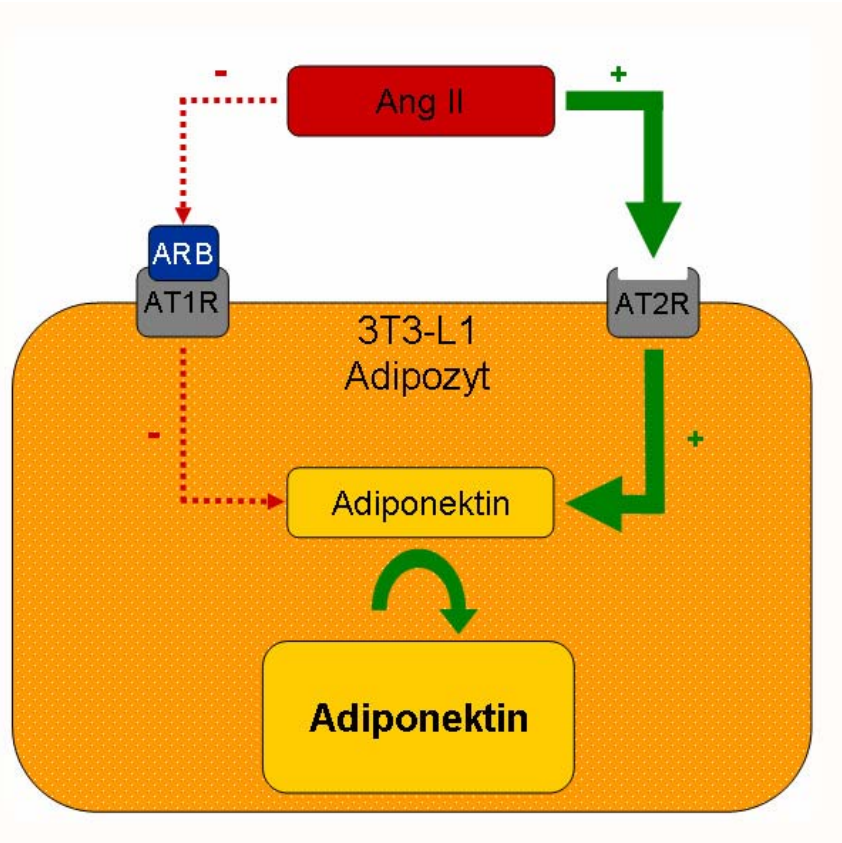


Abbildung 4.1.: Arbeitsmodell 1.

Ang II reguliert die Adiponektin-Proteinexpression über den AT1R herunter und noch stärker über den AT2R herauf. Die Blockade des AT1R durch einen AT1-Rezeptorenblocker (ARB) leitet das vorhandene Ang II ausschließlich auf den AT2R um, was in einer weiteren Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression resultiert, die daraufhin verstärkt insulinsensitivierende Effekte hervorruft.

Das Konzept der indirekten AT2R-Stimulation aufgrund von, durch AT1R-Blockade umgeleitetem, Ang II wurde auch schon mehrfach in anderen Arbeiten herausgearbeitet [165-167] und könnte in dieser Arbeit ein weiteres Beispiel finden.

Die mögliche insulinsensitivierende Wirkung der AT1R-Blockade könnte im Zusammenhang mit Ang II auch weitere Ursachen haben. In glatten Muskelzellen der Aorta scheint Ang II einen wichtigen Prozess der Insulin-Signaltransduktion, nämlich die insulinabhängige Aktivierung der PI3-Kinase, zu inhibieren und somit die Fähigkeit der Zelle einzuschränken, Glucose aufgrund eines Insulinstimulus aufzunehmen [168]. Außerdem gibt es mehrere Hinweise auf eine Hyperglykämie erzeugende Wirkung des Ang II durch Steigerung der Gluconeogenese [169, 170] und der Glykogenolyse in der Leber [171, 172].

Somit könnten mehrere, durch AT1R-Blockade aufgehobene oder durch Ang II-Umleitung auf den AT2R erzeugte, Effekte des Ang II einen positiven Effekt auf den Glucosemetabolismus ausüben und damit zu einer verbesserten Insulinsensitivität beitragen, wobei die hier vorgestellte Erhöhung der Adiponektin-Proteinexpression eine wichtige Möglichkeit repräsentiert.

### 4.3. Adiponektin und PPAR $\gamma$

Die nachfolgenden, unter 3.5. dargestellten, Experimente lieferten überraschende Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass Irbesartan in der Lage war, auch ohne Anwesenheit von Ang II die Adiponektin-Proteinexpression im selben Maß zu steigern wie im Beisein des Vasokonstriktors. Auch eine AT2R-Blockade vermochte die durch Irbesartan verursachte Steigerung der Adiponektinkonzentration nicht zu verringern.



Daraus musste geschlossen werden, dass im Falle des Irbesartans die unter 4.2. diskutierten Effekte der AT2R-vermittelten Steigerung der Adiponektinkonzentration durch umgeleitetes Ang II für diesen AT1-Antagonisten nur von untergeordneter Bedeutung sind und nach einem deutlich stärkeren und direkteren Effekt gesucht werden muss.

Einen wichtigen Anstoß in die richtige Richtung gab dabei die kürzlich von uns entdeckte Eigenschaft bestimmter AT1-Antagonisten, den insulin-sensitivierenden nukleären Hormonrezeptor PPAR $\gamma$  zu aktivieren [140], welches komplett unabhängig von der AT1R-blockierenden Eigenschaft geschah. So zeigten die AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan und nicht Losartan oder Eprosartan in den gleichen wie in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen und in dem gleichen Zellmodell eine Induktion der transkriptionellen Aktivität des PPAR $\gamma$ . Dies konnte auch in AT1R-defizienten PC12W Zellen bestätigt werden, was eine Involvierung des AT1R bei diesem Effekt ausschloss.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Benson et al. [173]. Diese Gruppe konnte unter anderem zeigen, dass in 3T3-L1 Präadipozyten die PPAR $\gamma$ -Zielgene aP2 und CD36 durch Irbesartan- und Telmisartanbehandlung induziert werden.

Dass Adiponektin ebenfalls als PPAR $\gamma$ -Zielgen fungiert und durch Agonisten an diesem Rezeptor, zum Beispiel durch die Thiazolidindione, induziert werden kann, legen mehrere Arbeiten aus den letzten Jahren an verschiedenen Spezies und Zellmodellen dar [96, 97, 141, 174].

Wegen dieser Zusammenhänge lag die Frage nach der PPAR $\gamma$ -vermittelten Steigerung der Adiponektinexpression durch Irbesartan auf der Hand und wurde in den folgenden Versuchsreihen (3.6. und 3.7.) beantwortet.

**Adiponektin und PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten.** Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten zunächst mit Irbesartan und dem PPAR $\gamma$ -aktivierenden Thiazolidindion Pioglitazon mit oder ohne Präinkubation des PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW 9662 behandelt. Die Adiponektin-Proteinexpression konnte hierbei wieder mit Irbesartan und Pioglitazon erwartungsgemäß gesteigert werden. Diese Steigerung wurde jedoch durch die oben erwähnte Vorbehandlung mit GW 9662 deutlich und statistisch signifikant unterbunden. Somit lieferte dieses Experiment einen eindrucksvollen Beweis für ein weiteres PPAR $\gamma$ -Zielgen, welches durch Irbesartan induziert werden kann und zeigt gleichzeitig einen möglichen Mechanismus für die Irbesartan-vermittelte Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression auf.

Zur weiteren Festigung des Konzepts der PPAR $\gamma$ -vermittelten Induktion der Adiponektinkonzentration durch bestimmte AT1-Antagonisten musste daraufhin überprüft werden, ob die von uns aufgestellte Einteilung der AT1-Antagonisten in PPAR $\gamma$ -aktivierend und -nicht-aktivierend [140] auch auf das Zielgen Adiponektin übertragbar war. Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten mit den PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan, mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon als Positivkontrolle und dem nicht-PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Eprosartan als Negativkontrolle behandelt. Entsprechend den Erwartungen konnte sowohl der PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon als auch die PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan die Adiponektin-Proteinexpression potent und statistisch signifikant steigern, wozu der nicht-PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonist Eprosartan nicht in der Lage war. Dies lieferte einen weiteren Beweis dafür, dass die Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression durch bestimmte AT1-Antagonisten vor allem PPAR $\gamma$ -vermittelt und kaum auf die Blockade des AT1R zurückzuführen ist.

Durch seine Liganden aktiviert, funktioniert PPAR $\gamma$  als transkriptionelle Schaltstelle für seine Zielgene, die korrespondierende Bindeelemente in deren Promotorregionen enthalten und *PPAR-response-elements* (PPRE) genannt werden [175]. Um herauszufinden, ob auch Adiponektin auf transkriptioneller Ebene durch PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten aktiviert wird, wurden die 3T3-L1 Adipozyten sowohl mit Irbesartan für verschieden lange Zeitintervalle behandelt, als auch mit den PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan sowie mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon für die Zeitdauer inkubiert (24h), die auch für andere PPAR $\gamma$ -Zielgene eine Induktion ergab [140].

Die Messung der Adiponektin-mRNA-Expression mittels Realtime-PCR ergab jedoch überraschenderweise, dass weder die PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Irbesartan und Telmisartan noch der PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon die Adiponektin-mRNA-Expression zu steigern vermochten.

Die bisher gemachten Studien zur transkriptionellen Regelung von Adiponektin durch PPAR $\gamma$ -Liganden lieferten uneindeutigere Ergebnisse. So konnten Combs und seine Kollegen keinen Einfluss eines Thiazolidindions als PPAR $\gamma$ -Agonisten auf die Adiponektin-mRNA-Expression in 3T3-L1 Adipozyten feststellen [141], während Maeda et al. im gleichen Zellmodell eine Induktion durch verschiedene Glitazone observierten [96].

Außerdem ist das Vorhandensein eines funktionellen PPRE im Adiponektinpromotor ebenfalls umstritten. Ein vermeintliches PPRE, welches von der Präsenz des Kompetenzfaktors *Liver Receptor Homolog-1* abhängt, wurde im humanen Adiponektinpromotor identifiziert [176], während ein *klassisches* PPRE bisher weder im humanen, noch im murinen Promotor entdeckt werden konnte [177, 178].

Zusammengefasst belegen diese Studien, dass der transkriptionelle Mechanismus der PPAR $\gamma$ -induzierten Modulation der Adiponektinexpression noch immer unklar ist. Die hier gezeigten Daten deuten eher auf einen zusätzlichen post-transkriptionellen Mechanismus der Adiponektinregulation hin, welcher eventuell eine PPAR $\gamma$ -abhängige Stabilisierung der zellulären Adiponektin-Proteinkonzentration beinhaltet. Diese Zusammenhänge sind auch im untenstehenden 2. Arbeitsmodell dargestellt (Abbildung 4.2.).

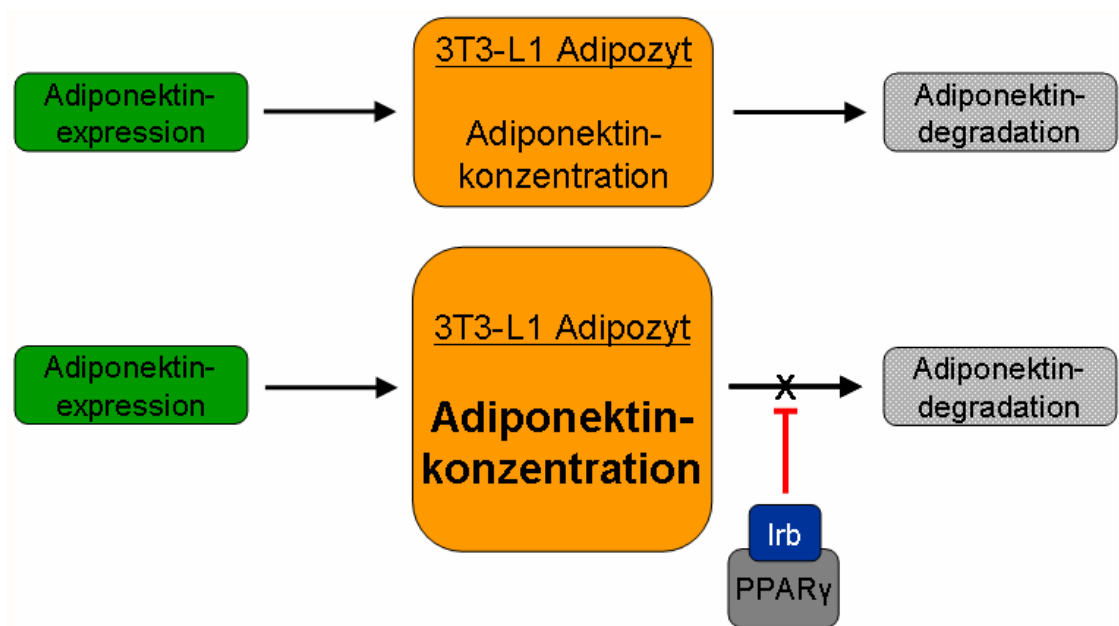


Abbildung 4.2.: Arbeitsmodell 2.

Regulation der Adiponektinexpression durch PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten. Irbesartan aktiviert unabhängig von dessen Blockade des AT1-Rezeptors auch PPAR $\gamma$ , was im Falle des Adiponektins über eine eventuelle Inhibierung des Proteinabbaus in einer Erhöhung von dessen Proteinexpression resultiert.

#### 4.4. Adiponektin-Abbau

Die in der Zelle befindlichen Proteine unterliegen einem stetigen Umsatz. So wird ein Protein ständig in unterschiedlichem Ausmaß neu produziert und gleichzeitig werden nicht mehr benötigte Moleküle degradiert. Somit würde bei einer Blockade der Proteinneusynthese der zelluläre Proteingehalt kontinuierlich abnehmen und bei Inhibition des Proteinabbaus demzufolge zunehmen.

Um diese Vorgänge in dem hier verwendeten Zellmodell zu veranschaulichen und nach einer möglichen Interferenz des Irbesartans mit dem Adiponektin-Proteinabbau zu suchen, wurde in den 3T3-L1 Adipozyten mit Hilfe des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid die Proteinneusynthese ausgeschaltet (3.8.). Die Abnahme der Adiponektin-Proteinkonzentration konnte so klar gezeigt werden.

**Adiponektinabbau und Irbesartan.** Die unter 3.8. dargestellte, 4-stündige Inkubation der 3T3-L1 Adipozyten mit Cycloheximid bewirkte eine schnelle Abnahme des Adiponektin-Proteingehalts der Zelle. Dieser konnte jedoch interessanterweise durch Präinkubation (24 h) mit Irbesartan vollständig und statistisch signifikant aufgehoben werden.

Damit konnte zum ersten Mal der Einfluss des AT1-Antagonisten Irbesartan auf die Adiponektindepletion der Zelle nachgewiesen werden. Somit wurden auch erste Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der Irbesartan-induzierten Steigerung - oder besser gesagt - Aufrechterhaltung der Adiponektin-Proteinexpression generiert.

Das unten dargestellte Arbeitsmodell veranschaulicht schematisch diesen möglichen Vorgang. Während unter Normalbedingungen ständig neues Adiponektin produziert und gleichzeitig auch abgebaut wird, ist bei Präsenz

von Cycloheximid die Neuproduktion des Proteins blockiert. Da der Abbau trotzdem ungestört weitergeht, nimmt die Konzentration des Proteins immer mehr ab. Dies kann gestoppt werden, indem man zusätzlich auch den Abbauweg des Adipozytokins durch Irbesartan inhibiert und somit die Proteinkonzentration aufrechterhält.

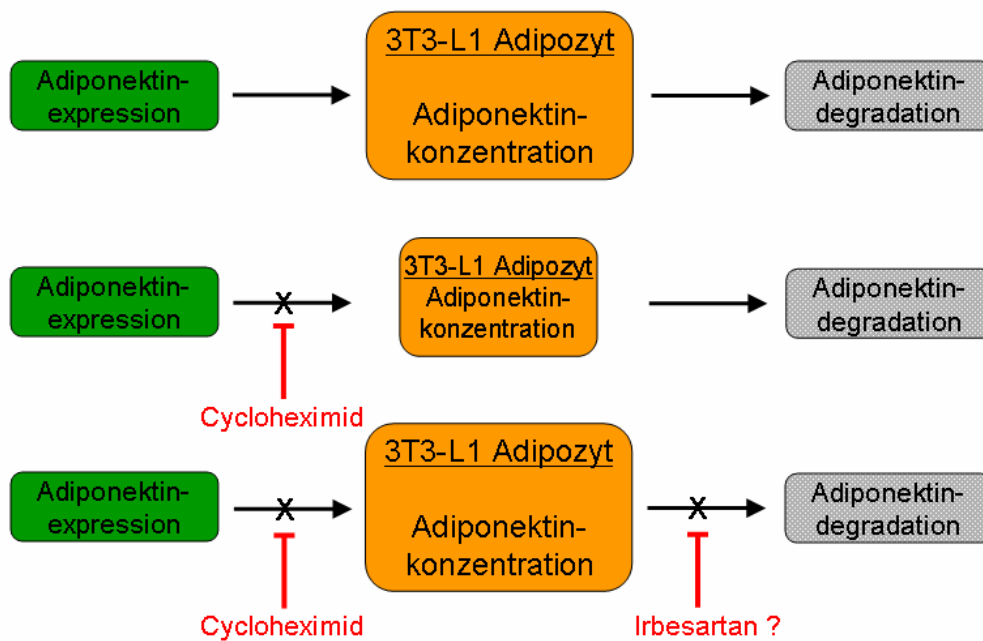


Abbildung 4.3.: Arbeitsmodell 3.

Einfluss der Proteinneusynthese und der Proteindegradation auf den Adiponektin Gehalt in 3T3-L1 Adipozyten. Während unter Normalbedingungen ständig neues Adiponektin produziert und gleichzeitig auch abgebaut wird, ist bei Präsenz von Cycloheximid die Neuproduktion des Proteins blockiert. Da der Abbau trotzdem ungestört weitergeht, nimmt die Konzentration des Proteins immer mehr ab. Dies kann gestoppt werden, indem man zusätzlich auch den Abbauweg des Adipozytokins durch Irbesartan inhibiert und somit die Proteinkonzentration aufrechterhält.

**Adiponektinabbau und das Ubiquitin-Proteasom-System.** Der Proteinabbau in eukaryotischen Zellen findet hauptsächlich über 2 Systeme, den lysosomalen Abbau und den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System, statt.

Zuerst wurde der Abbau über das Lysosom entdeckt, zusammengesetzt aus einer Membran-umschlossenen Vakuole, welche verschiedene Aminosäureproteasen (Kathepsine) und andere Hydrolasen enthält [179]. Es wurde lange Zeit angenommen, dass das Lysosom der einzige Ort für den Proteinabbau ist, doch Studien mit Inhibitoren der lysosomalen Azidifikation und mit lysosomalen Proteasen enthüllten, dass dieses System, welches hauptsächlich membranständige und extrazellulär aufgenommene Proteine degradiert, im Abbau zytosolischer Proteine nur eine untergeordnete Rolle spielt [179].

Die überwiegende Mehrheit der Proteine wird über das Ubiquitin-Proteasom-System hydrolysiert, welches dafür Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. In diesem Mechanismus, der sowohl im Zellkern als auch im Zytosol stattfindet, werden die meisten Substrate zunächst für den Abbau durch kovalente Bindung an mehrere Moleküle Ubiquitin markiert [180, 181]. Der Konjugation an die Ubiquitinmoleküle folgt eine schnelle Degradation durch das 26 S Proteasom, einem 2000 kDa großem, ATP-abhängigen, proteolytischen Komplex. Diese große Struktur besteht aus dem zentralen 20 S (700 kDa) Proteasom, indem die Proteine degradiert werden, und aus 2 flankierenden 19 S Komplexen, die die Substratspezifität und deren Regulierung sicherstellen [182].

Kürzlich konnten auch verschiedene Arten von Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems identifiziert werden. Die am häufigsten verwendeten sind die Peptidaldehyde, wie zum Beispiel das MG 132 (Cbz-Leu-Leu-Leucinal), die vor allem als Substratanaloga fungieren [143, 183]. Wenn solche Inhibitoren eine Senkung der Konzentration eines bestimmten Proteins aufhalten bzw. die

Konzentration noch steigern können, dann deutet dies sehr stark auf eine proteasomvermittelte Degradation dieses Proteins hin.

Zum Abbau des Adiponektins ist bisher so gut wie nichts bekannt. Deshalb empfahl es sich herauszufinden, ob der Abbau dieses Adipozytokins über das oben erwähnte Ubiquitin-Proteasom-System erfolgt und ob Irbesartan dieses zu inhibieren vermag.

Dazu wurde zunächst untersucht, ob mit spezifischen Inhibitoren dieses Abbau-mechanismus die gleiche Steigerung bzw. Aufrechterhaltung der Adiponektin-Proteinkonzentration zu erzielen ist, wie mit dem AT1-Antagonisten. Die unter 3.9. erläuterten Versuchsreihen mit verschiedenen, spezifischen Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems bestätigten die Vermutung, dass das Ubiquitin-Proteasom-System beim Abbau des Adiponektins beteiligt ist, weil die Peptid-aldehyd-Proteasominhibitoren MG 132 und MG 262 eine ähnliche Steigerung/Aufrechterhaltung der Adiponektin-Proteinexpression erzielten, wie es auch beim Irbesartan beobachtet wurde.

Da die Peptid-Aldehyd-Inhibitoren auch verschiedene lysosomale Cystein-proteasen und Kalpaine inhibieren können [184], musste dieser Effekt noch mit einem anderen, spezifischeren Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems bestätigt werden, um einen Einfluss des lysosomalen Proteinabbaus auszuschließen.

Dafür wurde Lactacystin bzw. der aktive Metabolit *clasto*-Lactacystin- $\beta$ -Lakton, ein Stoffwechselprodukt von *Streptomyces lactacystinaeus*, verwendet. Dieser natürlich generierte und hochselektive Proteasominhibitor greift am zentralen 20S Proteasompartikel an, indem er irreversibel an die OH-Gruppen der aminoterminalen Threoninreste in den  $\beta$ -Untereinheiten bindet [147].



Der oben erwähnte Versuch mit den Peptid-Aldehyd-Inhibitoren wurde daraufhin mit Lactacystin wiederholt. Auch hier führte die Inkubation mit Lactacystin zu einer, der Behandlung mit Irbesartan vergleichbaren, deutlichen und statistisch signifikanten Steigerung/ Aufrechterhaltung der Adiponektin-Proteinexpression gegenüber der Kontrolle. Somit konnte die Involvierung anderer Proteindegradationswege ausgeschlossen werden und deswegen stellen diese Analysen einen noch eindeutigeren Beweis für die Degradation des Adiponektins über das Ubiquitin-Proteasom-System dar.

Aufgrund dieser Experimente (siehe 3.9.) lässt sich also schlussfolgern, dass Adiponektin über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Es ist wahrscheinlich, dass der AT1-Antagonist und PPAR $\gamma$ -Aktivator Irbesartan dieses System inhibiert und damit die Adiponektin-Proteinexpression durch Blockade der Degradation dieses Adipozytokins erhöhen kann.

Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Arbeiten die demonstrieren konnten, dass PPAR $\gamma$ -Liganden die Proteasom-Aktivität in hepatozellulären Karzinomzellen inhibieren [185].

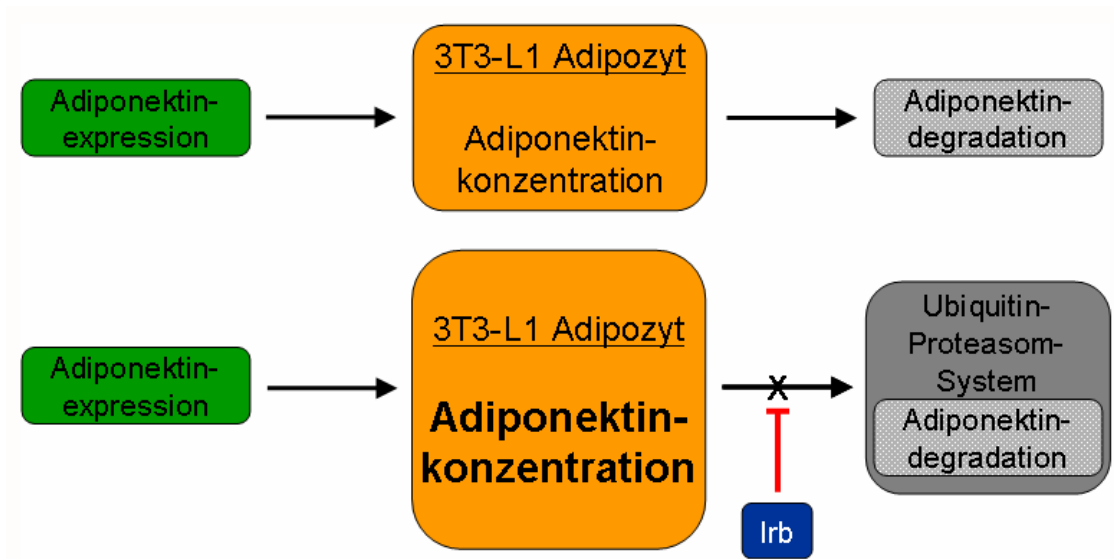


Abbildung 4.4.: Arbeitsmodell 4.

Einfluss von Irbesartan auf den Abbau von Adiponektin in 3T3-L1 Adipozyten. Adiponektin wird über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Während unter Normalbedingungen ständig neues Adiponektin produziert und gleichzeitig auch abgebaut wird, ist bei Präsenz von Irbesartan die Degradation des Proteins blockiert. Da die Neusynthese trotzdem ungestört weitergeht, nimmt deswegen die Konzentration des Proteins immer mehr zu.

Unter 3.9. wurde herausgearbeitet, dass das zelluläre Adiponektin über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Der Abbau eines Proteins in diesem System umfasst jedoch viele, unterschiedlich lokalisierte und terminierte, Einzelschritte [148]. Das Proteinsubstrat wird zuerst an mehrere Moleküle Ubiquitin konjugiert, was in einer Reaktion geschieht, die dazu das Ubiquitin-aktivierende-Enzym, das Ubiquitin-Transport-Protein und die Protein-Ligase benötigt. Das ubiquitinierte Substrat wird daraufhin schnell im 26 S Proteasom zu kleineren Peptiden hydrolysiert und die Ubiquitinmoleküle durch bestimmte Enzyme abgespalten und wiederverwendet. Die kleineren Peptide werden dann überwiegend durch Exopeptidasen weiter zu Aminosäuren

abgebaut, welche der Proteinneusynthese dann wieder zur Verfügung stehen [184].

Um einen eventuellen Anhaltspunkt zu bekommen, an welcher Stelle des Degradationszyklusses Irbesartan interferieren könnte, wurde zusätzlich noch der Einfluss des AT1-Antagonisten auf die Aktivität des Proteasompartikels analysiert. Da sowohl die Peptid-Aldehyd-Inhibitoren als auch Lactacystin an die aktiven Zentren mehrerer, direkt im zentralen Proteasompartikel lokalisierter, Peptidasen binden [145, 147], drängte sich eine Analyse der Beeinflussung der Aktivität dieses zentralen Ortes des Ubiquitin-Proteasom-Systems durch das Irbesartan auf.

Der Aktivitätsassay (siehe 2.2.4.) ergab, dass Irbesartan keinen Einfluss auf das Proteasom hatte. Da die Methode mittels der potenten Inhibierung der Aktivität durch das MG132 verifiziert werden konnte, muss man daraus ableiten, dass Irbesartan durch Interferenz an einer anderen Stelle der Degradationskaskade das Ubiquitin-Proteasom-System zu inhibieren vermag.

Somit eröffnen sich vielfältige Möglichkeiten, an denen der PPAR $\gamma$ -Agonist mit dem System interagieren könnte, welche aufgrund des inhaltlichen Fokus dieser Arbeit nicht weiter analysiert wurden.

So könnte die Ubiquitinylierung betroffen sein, da es zum Beispiel Berichte über eine Ang II-induzierte Steigerung des Abbaus von Rezeptorproteinen in Leberepithelzellen der Ratte via verstärkter Ubiquitinylierung gibt [186]. Außerdem könnte Irbesartan die Aktivität eines zur Degradation erforderlichen Enzyms verringern oder mit weiteren, noch unentdeckten Bestandteilen des Systems interagieren. Auch die Ausschleusung der degradierten Peptide aus dem Proteasom könnte betroffen und so durch negative Feedbackmechanismen die weitere Degradierung inhibiert sein.

Auf jeden Fall sind noch weitere und detailliertere Arbeiten erforderlich, um endgültig zu klären, an welcher Stelle der Degradationskaskade Irbesartan mit dem Ubiquitin-Proteasom-System interagiert.

#### 4.5. Das Adipositas-induzierte Rattenmodell der Insulinresistenz

Die homozygot Leptinrezeptor-defiziente (*fa/ fa*) Zucker Fatty (ZF)-Ratte [149, 150] ist ein weit verbreitetes Modell der Adipositas-induzierten Insulinresistenz [151], nicht zuletzt deshalb, weil sie auch viele andere kardiovaskuläre Risikofaktoren, die das metabolische Syndrom kennzeichnen, wie zum Beispiel Adipositas und Dyslipidämie, in sich vereint [187].

Die ZF-Ratte wird aufgrund der vorhandenen Mutation des Leptinrezeptors auch unter normaler Diät schnell adipös und weist u.a. eine massive Verschlechterung der Glucosetoleranz inklusive Hyperinsulinämie auf [188].

Auf Grund der oben genannten Vorteile wurde dieses Tiermodell in der vorliegenden Arbeit verwendet, um den Einfluss einer Irbesartanbehandlung auf die Insulinresistenz und die Adiponektinexpression *in vivo* zu studieren.

**Adiponektinspiegel und Parameter der Insulinsensitivität in diesem Modell.** In dieser Arbeit wurden 14 8-9 Wochen alte *fa/fa* ZF-Ratten für 21 Tage oral mit entweder 50 mg/ kg KG Irbesartan oder Vehikel (gleiche Lösung ohne Irbesartan) behandelt und deren Adiponektinspiegel sowie metabolischen Parameter vor und nach der Behandlung bestimmt (siehe 2.2.5.).

Während der 3-wöchigen Behandlungsdauer erhöhte sich das Körpergewicht in der Vehikelgruppe deutlich und statistisch signifikant um etwa 25 %. Die Nüchtern-Insulin- und Glucosespiegel veränderten sich in dieser Periode nicht wesentlich und blieben auf etwa gleich hohem Niveau. Der durchschnittliche HOMA-Index betrug schon vor der Behandlungszeit etwa 3,6 und änderte sich während der Behandlung entsprechend der Nüchtern-Insulin- und -Glucosespiegel nicht wesentlich. Dieser hohe Wert markierte damit die ausgeprägte Insulinresistenz der Tiere (siehe 3.10., Tabelle 3.2.).

Als durchschnittlicher Adiponektin-Plasmaspiegel wurde zu Beginn ein Wert von 6,56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ermittelt, der im Vergleich zu den bekannten Werten der als Kontrolltiere zu den ZF-Ratten fungierenden *Zucker Lean* (ZL)-Ratten deutlich erniedrigt war (13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; [189]). Somit bestätigen die bei diesen Tieren erniedrigten Adiponektin-Plasmaspiegel einmal mehr die unter 1.5. besprochene, negative Korrelation mit der Insulinsensitivität. Nach der Vehikelbehandlung verringerten sich die Adiponektinkonzentrationen in der Kontrollgruppe aufgrund der vermehrten Adipositas erwartungsgemäß.

Es konnte hier also gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit analysierten Tiere eine ausgeprägte, Adipositas-induzierte Insulinresistenz aufwiesen und somit für die Untersuchung des Einflusses einer Irbesartanbehandlung auf die o.g. Parameter geeignet waren. Ähnliche Werte bezüglich der Parameter der Insulinresistenz in diesem Tiermodell und dem verwendeten Alter konnten auch bei anderen Arbeiten erreicht werden [76] und dienten als weitere Referenz für diesen Versuch.

**Einfluss einer Irbesartanbehandlung auf die Adiponektinspiegel sowie Parameter der Insulinsensitivität in diesem Modell.** Die Gruppe der Irbesartan-behandelten Tiere unterschied sich vor dem Versuchsbeginn nicht von der

Kontrollgruppe. So waren die Körpergewichte, die Nüchtern-Insulin- und Nüchtern-Glucosespiegel, der daraus resultierende HOMA-Index sowie die Adiponektin-Plasmaspiegel in beiden Gruppen vergleichbar.

Nach der 21-tägigen Behandlung mit entweder 50 mg/ kg KG Irbesartan oder Vehikel (gleiche Lösung ohne Irbesartan), konnten folgende Veränderungen festgestellt werden:

Zum einen war Irbesartan in der Lage, den mittleren arteriellen Blutdruck statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe zu senken ( $70 \pm 2$  mmHg vs.  $87 \pm 2,5$  mmHg), während der Wirkstoff keinen Einfluss auf das Körpergewicht hatte. Zwar änderte sich auch der Nüchtern-Glucosespiegel nicht signifikant unter Irbesartanbehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren, doch dafür gab es eine deutliche und statistisch signifikante Erniedrigung der Nüchtern-Insulinspiegel ( $13,7 \pm 1,2$  ng/ ml vs.  $8,8 \pm 0,8$  ng/ ml) und damit auch des HOMA-Indexes ( $2,4 \pm 0,2$  vs.  $3,9 \pm 0,9$  mmol/ l x ng/ ml,  $p < 0,05$ ) zu verzeichnen. Somit wurde unter Irbesartantherapie eine Verbesserung der Insulinsensitivität in den adipösen *fa/fa* ZF-Ratten erreicht, was auch in ähnlichem Zusammenhang in anderen Arbeiten berichtet wurde. Zum Beispiel verbesserte eine Olmesartanbehandlung die Insulinsensitivität im gleichen Tiermodell [78].

Interessanterweise gibt es auch zunehmend Daten aus verschiedenen, genetisch- oder diätinduzierten Modellen der Insulinresistenz, die über eine Verbesserung der Insulinsensitivität speziell durch PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten berichten. So konnten Henriksen et al. mit der gleichen wie in dieser Arbeit verwendeten Dosis Irbesartan Parameter der Insulinsensitivität in der ZF-Ratte verbessern [76]. Dieselbe Gruppe berichtet im Umkehrschluss auch, dass in einem früher gemachten Experiment am gleichen Tiermodell (ZF-Ratte) keine Verbesserung der Insulinaktivität nach Infusion mit dem nicht-

PPAR $\gamma$ -aktivierenden Eprosartan im Gegensatz zum ACE-Hemmer Captopril erzielt werden konnte. Auch Benson et al. stellten einen PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten (Telmisartan) als insulinsensitivierend gegenüber dem schwach PPAR $\gamma$ -aktivierenden Losartan in einem diätinduzierten Rattenmodell heraus [173].

Zum Nachweis, dass die *in-vitro* identifizierte Induktion von Adiponektin durch Irbesartan auch *in-vivo* mit einer Verbesserung der Insulinsensitivität assoziiert ist, wurden die Adiponektin-Serumspiegel in den ZF-Ratten untersucht.

Zwar waren diese am Ende der Irbesartanbehandlung nicht höher als vor der Behandlung, sie konnten aber durch Irbesartan aufrechterhalten werden. Damit war der in der Kontrollgruppe während der Behandlungsperiode beobachtete Abfall der Adiponektinspiegel signifikant stärker als der in der Irbesartan-gruppe.

Diese Stabilisierung der Adiponektinkonzentration durch Irbesartan während der Gewichtszunahme, könnte somit einen Mechanismus der Insulinsensitivierung durch den PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten Irbesartan darstellen.

Allerdings gibt es ebenso klinische Studien, in denen auch andere AT1-Antagonisten (Losartan, Candesartan und Valsartan) die Inzidenz von neu auftretendem Diabetes Typ 2 senken [73, 74, 190] und die Insulinsensitivität in hypertensiven Patienten steigern [191] konnten. Außerdem konnte Candesartan sogar die Adiponektinspiegel in hypertensiven Patienten erhöhen [191]. Da die klinischen Daten über insulinsensitivierende Eigenschaften von AT1-Antagonisten bisher nur von nicht bis wenig PPAR $\gamma$ -aktivierenden Vertretern stammen, muss man folgende, weitere Überlegungen anstellen, um diese Studien mit den hier gemachten Erfahrungen zu verbinden.

Zum einen muss man bedenken, dass die meisten der oben genannten AT1-Antagonisten den PPAR $\gamma$  zumindest bei hohen Konzentrationen schwach aktivieren [140, 173]. Die dafür nötigen Konzentrationen könnten auch bei normalen Dosierungen über eine Akkumulation im Fettgewebe erreicht werden. Denn Daten zu den Konzentrationen der AT1-Antagonisten im Fettgewebe sind noch nicht bekannt. Zum anderen sind auch weitere Mechanismen der Insulinsensitivierung durch AT1-Antagonisten bekannt, zum Beispiel eine verbesserte Wirkung der Insulinsignalkaskade [192]. Außerdem sind große, klinische Studien mit PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten noch nicht vollzogen worden und somit dringend angezeigt, um eine Überlegenheit gegenüber den anderen Vertretern dieser Substanzklasse im Hinblick auf die Verbesserung der Insulinsensitivität zu beweisen.

**Irbesartanbehandlung von Ratten-Fettgewebe *ex-vivo*.** In dem unter 3.10. gemachten Tierversuch wurde gezeigt, dass eine Irbesartanbehandlung in adipösen und insulinresistenten *fa/ fa* ZF-Ratten mit einer Insulinsensitivierung verbunden ist, die mit einer Stabilisierung der systemisch zirkulierenden Adiponektinspiegel einhergeht. Ob dieser Prozess, ähnlich wie bei den Ergebnissen in 3T3-L1 Adipozyten, durch eine direkte Wirkung im Fettgewebe geschieht und dieser auch PPAR $\gamma$ -vermittelt ist, konnte aber mit den bisher gemachten Ergebnissen nicht geklärt werden.

Das konnte jedoch mit der *ex-vivo* Behandlung des Fettgewebes dieser Tiere ermittelt werden. Dazu wurde viszerales Fettgewebe (epididymal) aus unbehandelten Kontrolltieren entnommen und nach bestimmten Isolierschritten sofort für 24 h mit 10  $\mu$ M Irbesartan als PPAR $\gamma$ -aktivierenden und mit 10  $\mu$ M Eprosartan als nicht PPAR $\gamma$ -aktivierenden Vertreter der AT1-Antagonisten unter Serumentzug inkubiert. Es zeigte sich mit dem PPAR $\gamma$ -aktivierenden Irbesartan eine noch deutlichere Steigerung der Adiponektin-Proteinexpression als in 3T3-



L1 Adipozyten, während diese mit dem, nicht den PPAR $\gamma$  beeinflussenden, Eprosartan nicht zu verzeichnen war.

Um zu verifizieren, dass dieser Effekt ähnlich wie in den *in-vitro* gemachten Erfahrungen auch PPAR $\gamma$ -vermittelt ist, wurde des Weiteren in den gleichen Proben die Expression eines typischen PPAR $\gamma$ -Zielgens, nämlich die des aP2, untersucht. Das aP2 wurde ausgewählt, da wir kürzlich eine, nur durch PPAR $\gamma$ -aktivierende AT1-Antagonisten hervorgerufene, Induktion auch dieses PPAR $\gamma$ -Zielgens nachweisen konnten [140]. Dieser Versuch wies erwartungsgemäß nach, dass Irbesartan auch in diesem *ex-vivo* Modell in der Lage ist, die aP2-mRNA-Expression statistisch signifikant zu induzieren, während Eprosartan keinen Einfluss auf das Zielgen hatte.

Die eben beschriebenen Experimente lieferten somit einen weiteren Beleg für die PPAR $\gamma$ -vermittelte Induktion der Adiponektin-Proteinexpression und dies erstmals auch direkt am *ex-vivo* behandelten Fettgewebe. Das die Steigerung der Adiponektinexpression im Fettgewebe noch stärker als in den 3T3-L1 Adipozyten ausgeprägt war, könnte auf einen zusätzlichen Effekt des Irbesartans auf die Fettzelldifferenzierung der Präadipozyten in diesem Gewebe hinweisen. So konnten wir bereits zeigen, dass Irbesartan die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten verstärkt, was auch nur bei PPAR $\gamma$ -aktivierenden AT1-Antagonisten der Fall war [140]. Dieser Effekt war in den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten nicht präsent, da die Versuche ausschließlich an schon differenzierten 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt wurden. In diesem Versuch könnten allerdings noch im Fettgewebe befindliche Präadipozyten vorhanden gewesen sein. Irbesartan dürfte diese Präadipozyten vermehrt zu Adipozyten differenziert haben, so dass dies zu einer zusätzlichen Expression von neuem Adiponektin geführt haben könnte.

## 4.6. Unterschiede verschiedener Fettgewebe

Die seit einiger Zeit stattfindende, differenzierende Sichtweise zwischen den einzelnen Fettdepots und erste Erkenntnisse unterschiedlicher Wirkungen bezüglich der Insulinresistenz und der Adipositas wurden unter 3.11. schon kurz erläutert. Es gehört immer mehr zum Konsens, dass Adipositas in den Fettgeweben der Bauchregion, welches durch ein erhöhtes *Waist-to-hip ratio* (WTH = Taille im Verhältnis zur Hüfte) festgestellt wird, ein wichtiger Indikator einer erhöhten Morbidität und Mortalität infolge von koronarer Herzkrankheit, Diabetes und einigen Krebsarten ist [193-196]. Menschen, die die gleiche Masse an Fett jedoch vermehrt in der unteren Körperhälfte (subkutanes Fett im Gesäß, Schenkel, etc.) haben, besitzen hingegen ein deutlich niedrigeres Risiko für diese Erkrankungen.

Zu den Fettgeweben der oberen Körperregion gehören abdominelles, subkutanes und viszerales Fett, welches in der Bauchhöhle die inneren Organe umgibt. Zu einzelnen Fettdepots und ihren umgebenen Organen konnten bereits physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge erstellt werden. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass perivaskuläres adventitielles Fettgewebe einen durch Hormonsekretion relaxierenden Effekt auf die umgebenen Gefäße hat [197]. Außerdem wurde entdeckt, dass viszerale und subkutane Fettdepots unterschiedliche Mengen von wichtigen Zytokinen wie z.B. Interleukin (IL) 6 [198] und IL 8 [199] oder von dem Inhibitor des Plasminogen-Aktivator-Enzyms (PAI)-1 [200] sezernieren.

Da Adiponektin ein weiteres wichtiges, einige der oben genannten Krankheiten beeinflussendes Hormon ist, im Fettgewebe vorkommt und bisher weder viel über die Adiponektinexpression in den einzelnen Fettgeweben, noch über Effekte auf die jeweiligen umgebenen Organe bekannt ist, war eine fettgewebsspezifische Untersuchung der Adiponektinexpression in dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell von großem Interesse.

**Adiponektin und dessen fettgewebsspezifische Verteilung.** Daraufhin wurde aus den Kontrolltieren der adipösen *fa/ fa* ZF-Ratten das epididymale und perikardiale Fett als Vertreter der viszeralen Fettdepots und das subkutane Fett aus dem Nackenbereich isoliert und daraus die Adiponektinexpression bestimmt.

Es zeigte sich, dass kein Unterschied in der Adiponektinexpression im epididymalen Fettgewebe als Vertreter des viszeralen Fettdepots, im Vergleich zu der im subkutanen Fettgewebe gefunden werden konnte. Die bisher dazu veröffentlichten Daten sind uneinheitlich. So konnten entweder keine Unterschiede [201] oder niedrigere Adiponektin-mRNA-Expressionen in einem viszeralen Fettdepot im Vergleich zu denen im subkutanen [202] festgestellt werden. Kürzlich konnte ebenso erwartungsgemäß gezeigt werden, dass die Adiponektinexpression in schlanken im Vergleich zu adipösen *fa/fa Zucker Diabetic Fatty* (ZDF)-Ratten signifikant erhöht war [189]. Jedoch war interessanterweise die Adiponektinexpression in den schlanken Ratten im viszeralen Fettgewebe höher als die im subkutanen, während dies bei den ZDF-Ratten umgekehrt der Fall war. Da die hier verwendeten ZF-Ratten eine weniger ausgeprägte Insulinresistenz wie die der ZDF-Ratten aufwiesen, also diesbezüglich eine Mittelstellung zwischen den schlanken und den ZDF-Ratten einnahmen, könnte man somit vermuten, dass die beiden Expressionen einen Mittelwert der beiden Extrema darstellten, sich deswegen also nicht unterschieden.

Trotzdem müssten bezüglich der Adiponektinexpression in den verschiedenen Fettgeweben noch weitergehende Studien unternommen werden, die diese Frage eindeutiger klären können.

**Adiponektin im perikardialen Fett und Myokardium.** Noch interessanter an der Analyse der fettgewebsspezifischen Verteilung der Adiponektinexpression war

jedoch die Tatsache, dass sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression des Adiponektins im perikardialen Fett erheblich niedriger war als in den anderen Fettdepots. Dies machte zusätzlich noch eine Untersuchung des vom perikardialen Fettgewebe umgebenen Myokardiums auf dort eventuell vorhandenes Adiponektin interessant.

In der Tat konnte sowohl durch immunohistochemische Färbungen, als auch im Western-Blot das Vorhandensein von Adiponektin im Myokard nachgewiesen werden. Die Adiponektin-Proteinexpression im perikardialen Fettgewebe korrelierte dabei streng mit der im entsprechenden Myokardium.

Dies könnte darauf hindeuten, dass das im perikardialen Fettgewebe produzierte Adiponektin in das Myokardium gelangt und dort als Adipozytokin verschiedene Effekte auslöst. Die vorliegenden Ergebnisse machen daher in der Zukunft die Suche nach Funktionen des Adiponektins im Myokard sowie nach dem Mechanismus, wie es vom umgebenen Fettgewebe dorthin gelangt, absolut erforderlich.

Interessante Ergebnisse dahingehend lieferten bereits Zhou et al. in adipösen ZDF-Ratten, die ebenfalls viel perikardiales Fett aufwiesen. Sie konnten zeigen, dass deren Herzen insuffizient waren, was sich in einer verminderten Kontraktilität und in einer Dilatation sowie erhöhtem Gewicht des linken Ventrikels ausdrückte [203]. Shibata et al. konnten wiederum demonstrieren, dass Adiponektin-defiziente Mäuse in einem hypertonen Zustand eine kardiale Hypertrophie entwickelten, die sich mit nachträglicher adenoviraler Adiponektin-Gensupplementierung verbesserte [204].

Es bleibt jedoch in zukünftigen Studien zu klären, ob das myokardiale Adiponektin auch in den ZF-Ratten in die Pathogenese einer Kardiomyopathie eingreift.