

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

*Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-aktivierende*  
Angiotensin Typ 1-Rezeptorblocker bei Adipositas und Insulinresistenz

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Markus Clemenz  
aus Lindau (Bodensee)

Gutachter:                   1. Prof. Dr. med. U. Kintscher  
                                      2. Prof. Dr. med. J. Spranger  
                                      3. Prof. Dr. med. J. Jordan

Datum der Promotion:      04.02.2011

*Für Nils und Margund*

# INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	5
1.1	Autoren und Titel .....	5
1.2	Abstract .....	5
1.3	Einleitung .....	7
1.4	Zielstellung.....	8
1.5	Methodik.....	9
1.6	Ergebnisse .....	11
1.6.1	<i>PPAR</i> $\gamma$ aktivierende ARB steigern die Adiponektinkonzentration .....	11
1.6.2	Identifikation von ARB als neue selektive <i>PPAR</i> $\gamma$ Modulatoren .....	13
1.6.3	Der ARB Telmisartan aktiviert <i>PPAR</i> $\alpha$ -Zielgene in der Leber .....	16
1.7	Diskussion.....	19
1.8	Literaturverzeichnis.....	24
2.	ANTEILSERKLÄRUNG.....	29
3.	PUBLIKATIONEN .....	30
3.1	Publikation 1 .....	30
3.2	Publikation 2 .....	45
3.3	Publikation 3 .....	58
4.	LEBENS LAUF.....	70
5.	PUBLIKATIONS LISTE.....	71
5.1	Originalartikel.....	71
5.2	Editorials, Reviews und andere Artikel.....	72
5.3	Lehrbücher .....	73
5.4	Abstracts .....	73
6.	ERKLÄRUNG.....	76
7.	DANKSAGUNG.....	77

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Autoren und Titel

**Publikation 1:** Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, **Clemenz M**, Krikov M, Thöne-Reineke C, Unger T, Kintscher U. *PPAR $\gamma$* -aktivierende Angiotensin Typ 1-Rezeptorblocker induzieren Adiponektin. *Hypertension*. 2005 Jul;46(1):137-43. (1)

**Publikation 2:** Schupp M\*, **Clemenz M\***, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. Molekulare Charakterisierung neuer selektiver *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* -Modulatoren mit angiotensinrezeptorblockierender Wirkung. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3442-52. (2)

\* geteilte Erstautorschaft

**Publikation 3:** **Clemenz M\***, Frost N\*, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Böhm C, Hartge M, Gust R, Staels B, Unger T, Kintscher U. Leberspezifische *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* -Zielgenregulation durch den Angiotensin Typ 1-Rezeptorblocker Telmisartan. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1405-13. (3) \* geteilte Erstautorschaft

## 1.2 Abstract

**HINTERGRUND** — Angiotensin Typ 1-Rezeptorblocker (ARB) haben in vielen klinischen Endpunktstudien die Inzidenz von Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) reduziert. Der ARB Telmisartan hat in mehreren klinischen Studien bei Patienten mit arterieller Hypertonie die Plasmatriglyzeride gesenkt. Die molekularen Mechanismen hierfür sind weitgehend unbekannt. *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)* sind nukleäre Hormonrezeptoren und regulieren als Lipidsensoren und Transkriptionsfaktoren den Insulin- und Glukosestoffwechsel und die Energiehomöostase. Sie dienen Medikamenten als molekulare Zielstrukturen zur Therapie metabolischer Störungen wie T2DM, Atherosklerose, Metabolisches Syndrom oder Adipositas.

**HYPOTHESE** — Bestimmte ARB wirken als selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulatoren (SPPARM) und/oder partielle *PPAR* $\alpha$ -Agonisten und sind dadurch an der Verbesserung der Insulinsensitivität und/oder des Lipidstoffwechsels beteiligt.

**METHODEN** — Die Regulation des insulinsensitivierenden Fettgewebshormons Adiponektin durch Angiotensin II und ARB wurde in 3T3-L1-Adipozyten und adipösen Zucker-Ratten untersucht. In vitro in 3T3-L1-Adipozyten, in humanen Adipozyten und in COS-7-Zellen sowie in vivo in diätinduzierten adipösen C57BL/6J-Mäusen wurde die selektive Modulation von *PPAR* $\gamma$  getestet. Die Aktivierung von *PPAR* $\alpha$  wurde in HepG2-, AML12-, COS-7-Zellen und in vivo in diätinduzierten adipösen C57BL/6J-Mäusen gemessen.

**ERGEBNISSE** — *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB steigern auf posttranskriptioneller Ebene die Expression von Adiponektin unabhängig von ihrer Blockade des *Angiotensin Typ 1-Rezeptors* (*AT*<sub>1</sub>). In vivo verhindert der *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB Irbesartan das Absinken des Adiponektinserumspiegels und verbessert bestimmte Insulinsensitivitätsparameter.

Irbesartan und Telmisartan, ebenfalls ein *PPAR* $\gamma$ -aktivierender ARB, werden als neue SPPARM charakterisiert. Die selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulation durch ARB führt zu *PPAR* $\gamma$ -Konformationsänderung, zu selektiver Kofaktorrekutierung, zu einem spezifischen Genexpressionsprofil und zu Insulinsensitivierung in vivo.

Telmisartan aktiviert *PPAR* $\alpha$ -Zielgene in Leberzellen und ist in vitro im mikromolaren Konzentrationsbereich ein partieller *PPAR* $\alpha$ -Ligand. Durch das pharmakokinetische Profil der Substanz mit hohen Wirkstoffmengen in der Leber wird auch in vivo *PPAR* $\alpha$  aktiviert, was mit vermehrter Zielgenexpression und reduzierten Triglyzeridspiegeln in der Leber und im Plasma einhergeht.

**ZUSAMMENFASSUNG** — Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass einige ARB möglicherweise durch *PPAR* $\gamma$ -vermittelte, posttranskriptionelle Mechanismen die Adiponektinkonzentration in Adipozyten erhöhen. Zwei ARB werden als neue SPPARM identifiziert. Selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulation führt, vergleichbar mit voller *PPAR* $\gamma$ -Aktivierung, zu metabolisch vorteilhaften Wirkungen, jedoch ohne die typischen unerwünschten Wirkungen voller *PPAR* $\gamma$ -Aktivierung aufzuweisen. Telmisartan wird als

partieller *PPAR $\alpha$* -Agonist identifiziert. Auf Grund des pharmakokinetischen Profils scheint diese Wirkung auf die Leber beschränkt zu sein.

**KLINISCHE PERSPEKTIVE** — Durch Kombination von Adiponektininduktion, *PPAR $\gamma$*  Modulation und partieller *PPAR $\alpha$* -Aktivierung zusätzlich zur *AT $_1$* -Blockade senken ARB auf mehreren Ebenen das kardiovaskuläre Risiko. Die Entwicklung von optimierten SPPARM-ARB könnte Patienten mit Diabetes, Hypertonie oder Metabolischem Syndrom eine neue Therapieoption bieten.

### 1.3 Einleitung

Antihypertensiva aus der Gruppe der Angiotensin Typ 1-Rezeptorblocker (ARB) blockieren die Wirkung von Angiotensin II (Ang II) am *Angiotensin Typ 1-Rezeptor* (*AT $_1$* ). Sie zeichnen sich insgesamt durch eine sehr gute Verträglichkeit aus und verfolgen das therapeutische Ziel durch Unterbrechung des kardiovaskulären Kontinuums die kardiovaskuläre Gesamtmorbidität und -mortalität zu senken. ARB haben außerdem in vielen klinischen Endpunktstudien eine ausgeprägte Reduktion des Neuauftretens von Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) bewiesen (4-8).

Bestimmte ARB sind in der Lage, den *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (*PPAR $\gamma$* ) zu aktivieren (9-10).

*PPARs* sind eine Unterfamilie der nukleären Hormonrezeptoren (NR, „nuclear receptors“) und bestehen aus drei Subtypen, *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\beta$*  (auch *PPAR $\delta$*  genannt) und *PPAR $\gamma$* . Als Lipidsensoren und Transkriptionsfaktoren agieren sie als „Masterregulatoren“ und bestimmen den Ernährungsstoffwechsel und die Energiehomöostase des Körpers. *PPARs* sind etablierte molekulare Targets von Medikamenten zur Therapie metabolischer Störungen wie T2DM, Atherosklerose, Metabolisches Syndrom, Adipositas und Fettstoffwechselstörungen.

*PPAR $\gamma$*  ist sehr stark im Fettgewebe exprimiert und kontrolliert als Haupteffektor der Adipogenese die Expression von Genen der Adipozytendifferenzierung und des Lipidstoffwechsels sowie die Freisetzung von Adiponektin aus dem Fettgewebe. Thiazolidinedione (TZD), auch Glitazone oder Insulinsensitizer genannt, sind eine Klasse synthetischer, hochaffiner voller *PPAR $\gamma$* -Agonisten, die für die Behandlung von

T2DM verwendet werden. Sie reduzieren Insulinresistenz in peripheren Geweben und in der Leber, und verbessern Glukosetoleranz und Lipidprofil. Die Verwendung von TZD ist begrenzt wegen Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Flüssigkeitsretention, Ödemen, Knochenfrakturen und ein potentiell erhöhtes Risiko für Herzinfarkt (11-13). Unter TZD auftretende Flüssigkeitsretention und Ödeme erhöhen bei disponierten Patienten potentiell das Risiko von Herzinsuffizienz (11, 13-21).

*PPAR $\alpha$*  reguliert die Expression von Genen, die im Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel involviert sind, und wird in Geweben mit einer hohen Fettsäurekatabolismusrate exprimiert (22-23). Fibrate werden seit langer Zeit zur Therapie von Dyslipidämien eingesetzt, und führen über *PPAR $\alpha$* -Aktivierung zu einer Erhöhung des „high density lipoprotein cholesterol“ (HDL-C) und zu einer Senkung des Plasmatriglyzeridspiegels (24).

Adiponektin gehört zur Familie der Adipozytokine, wird ausschließlich von weißen Adipozyten synthetisiert und führt im Organismus zur Senkung des Glukosespiegels und zur Verbesserung von Insulinresistenz (25).

Für chemisch nicht mit TZD verwandte, selektive *PPAR $\gamma$* -Modulatoren (SPPARM) konnte Insulinsensitivierung ohne die typischen *PPAR $\gamma$* -Nebenwirkungen gezeigt werden (26-27).

Bei diabetischen und nichtdiabetischen Hypertonikern, die in klinischen Studien mit dem *PPAR $\gamma$* -aktivierenden ARB Telmisartan behandelt wurden, konnte zusätzlich zur Blutdrucksenkung in einigen Studien eine signifikante Senkung der Plasmatriglyzeride festgestellt werden (28-32). Diese Beobachtung ist weder durch Blutdrucksenkung noch durch *PPAR $\gamma$* -Aktivierung zu erklären. Der zugrundeliegende Mechanismus gilt als unbekannt.

#### **1.4 Zielstellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, neue molekulare Mechanismen für antidiabetische und triglyzeridsenkende Effekte von ARB zu identifizieren, die Teil des *PPAR*-Signalwegs sind oder mit diesem in Zusammenhang stehen könnten.

Zuerst wird die Wirkung von Ang II und ARB auf die Adiponektinexpression in 3T3-L1-Adipozyten und bei adipösen Zucker-Ratten studiert, sowie die Bedeutung von *PPAR $\gamma$*  für die Fähigkeit einiger ARB, die Adiponektinexpression zu beeinflussen.

Als nächstes soll die genaue molekulare Interaktion zwischen ARB und *PPAR $\gamma$*  bei *PPAR $\gamma$* -Aktivierung untersucht werden, sowie geklärt werden, ob es sich bei bestimmten ARB um selektive *PPAR $\gamma$* -Modulatoren handelt.

Schließlich wird der Frage nachgegangen, ob eine Regulation des *PPAR $\alpha$* -Signalweges durch Telmisartan vorliegt und mit den beschriebenen triglyzeridsenkenden Effekten der Substanz in Zusammenhang stehen könnte.

## 1.5 Methodik

In Publikation 1 wurde als initialer Schritt, um neue insulinsensitivierende Effekte von ARB zu identifizieren, die Regulation der Adiponektinexpression durch ARB und Ang II in murinen 3T3-L1-Adipozyten geprüft. 3T3-L1-Preadipozyten weisen fibroblastenartige Eigenschaften auf und werden in Versuchsschalen nach Erreichen von Konfluenz über fünf bis sieben Tage mit Insulin, Dexamethason und Isobutylmethylxanthin (IBMX) behandelt. Dadurch differenzieren die Preadipozyten zu reifen Adipozyten und zeigen Eigenschaften natürlicher Fettzellen. 3T3-L1-Adipozyten exprimieren sowohl *AT<sub>1</sub>* als auch *Angiotensin Typ 2-Rezeptoren (AT<sub>2</sub>)* (33). Das 3T3-L1-Adipozytenmodell ist ein Standardmodell und wird sehr häufig verwendet.

In einem monogenetischen Modell für adipositasinduzierte Insulinresistenz (adipöse leptinrezeptordefiziente *fa/fa* Zucker-Ratten) wurden Adiponektinserumspiegel, metabolische Parameter und der HOMA-IR-Index nach ARB-Behandlung bestimmt. Für die Bestimmung des Gesamtadiponektinproteins im Serum oder Zellkulturüberstand wurde ein „Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA) verwendet. Der HOMA-Index („HOmeostatic Model Assessment“) ist eine vor allem in klinischen Studien häufig verwendete Methode zur Quantifizierung von Insulinsensitivität (34-36). HOMA-IR ist der reziproke Wert der Insulinsensitivität und beschreibt die Insulinresistenz (IR). Mittels einer aus physiologischen Studien entwickelten mathematischen Gleichung, in die Nüchtern glukose und Insulinspiegel eingehen, wird die Insulinresistenz berechnet. In Publikation 1 wurde der HOMA-IR-Index wie folgt bestimmt: Nüchtern glukose [mmol/L] x Nüchtern insulin [ng/ml] / 22.5.

Als nächstes, auf Grundlage der Arbeiten die ARB als partielle *PPAR $\gamma$* -Agonisten identifizieren (9-10), wurde in Publikation 2 die Qualität und die Quantität der *PPAR $\gamma$* -Aktivierung durch ARB untersucht.

Die ersten Versuche hierfür, zum Nachweis einer direkten Interaktion von ARB und *PPAR $\gamma$* , waren Autoregulationsversuche. In 3T3-L1-Adipozyten und humanen Fettzellen wurde *PPAR $\gamma$* -Autoregulation (Protein- und mRNA-Expression) mit vollen Agonisten und ARB gemessen. Dabei führen *PPAR $\gamma$* -Agonisten typischerweise zu Herunterregulation von *PPAR $\gamma$*  (37-39).

Eine weitere Methode für den direkten Interaktionsnachweis sind „protease protection“-Untersuchungen. Hierbei führen distinkte Konformationsänderungen durch Anlagerung einer Substanz an das durch In vitro-Translation gewonnene *PPAR $\gamma$* -Protein zu unterschiedlichen Trypsinverdauungsmustern.

Ligandenbindung an nukleäre Rezeptoren führt üblicherweise zur Abdissoziation von Korepressoren und Rekrutierung von Koaktivatoren an den Rezeptorkomplex (40). Deshalb wurde mittels Glutathion S-Transferase (GST)-Pulldown-Untersuchung und „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET)-Untersuchung die Freigabe des Korepressors *nuclear receptor co-repressor 1 (NCOR1)* und die Bindung der Koaktivatoren *transcriptional intermediary factor 2 (TIF2)* und *vitamin D receptor-interacting protein 230 kD (DRIP205)* an *PPAR $\gamma$*  während Behandlung mit ARB oder TZD gemessen.

Als nächstes, um die Übersetzung selektiver Kofaktorrekutierung in Aktivierung unterschiedlicher Zielgenuntergruppen zu zeigen, sollte die Regulation von *PPAR $\gamma$* -Zielgenen genomweit zwischen ARB und TZD verglichen werden. Dazu wurden Agilent Microarray „whole genome“-Genexpressionsexperimente in 3T3-L1-Adipozyten durchgeführt.

Danach wurde der wichtigste und letzte Versuch für Publikation 2 durchgeführt: Um zu zeigen, dass die Aktivierung von *PPAR $\gamma$*  durch ARB in vivo eine Rolle spielt, und es zu Insulinsensitivierung, aber nicht zu Gewichtszunahme kommt, wurde in diätinduzierten adipösen C57BL/6J-Mäusen ein Versuch mit Telmisartan durchgeführt. Die Mäuse wurden 26 Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert, deren Gesamtkalorien sich zu 60% aus Fett zusammensetzen. Nach 16 Wochen Gewichtszunahme unter der Hochfettdiät wurden die Tiere in drei Gruppen randomisiert und für weitere zehn Wochen zusätzlich

zur Diät entweder mit Telmisartan, dem vollen *PPAR* $\gamma$ -Agonist Pioglitazon oder Vehikel behandelt. Danach wurden die Tiere metabolisch charakterisiert.

Für Publikation 3 dieser Arbeit wurde versucht, mögliche molekulare Ursachen für die in Studien mit Telmisartan beobachteten Triglyzeridspiegelreduktionen zu identifizieren. Um eine eventuell vorhandene Beteiligung von *PPAR* $\alpha$  zu zeigen, wurde als erstes die Expression von *PPAR* $\alpha$ -Zielgenen mittels quantitativer Realtime-PCR und Western Blot in vitro in mit Telmisartan behandelten HepG2- und AML12-Leberzellen bestimmt, sowie in vivo in Leber und Skelettmuskel von mit Telmisartan behandelten hochfettinduzierten adipösen C57BL/6J-Mäusen.

Unmittelbar darauf folgten Versuche mit *PPAR* $\alpha$ -siRNA und Telmisartan, mit denen Kausalität von Telmisartanbehandlung, *PPAR* $\alpha$ -Funktion und Zielgenregulation beschrieben wurde.

Danach wurde versucht, eine direkte Aktivierung von *PPAR* $\alpha$  durch Telmisartan nachzuweisen. Dazu wurde in einem Gal4-Gal5-Luziferasetest die Transaktivierung der Ligandenbindungsdomäne (LBD) von *PPAR* $\alpha$  in Anwesenheit verschiedener ARB und voller *PPAR* $\alpha$ -Agonisten gemessen.

Der wichtigste Versuch für Publikation 3 war wiederum der Tierversuch. Die funktionelle In vivo-Relevanz der *PPAR* $\alpha$ -Zielgenaktivierung wurde überprüft, indem in adipösen mit Telmisartan behandelten Mäusen Serum- und Lebertriglyzeride gemessen wurden.

Als letztes wurden in Tierlebern und in HepG2-Zellen optional noch zusätzliche Mechanismen der *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung durch Telmisartan verfolgt. Es wurde festgestellt, ob auf Expressionsebene eine durch Telmisartan induzierbare Autoregulation von *PPAR* $\alpha$  besteht.

## **1.6 Ergebnisse**

### **1.6.1 *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB steigern die Adiponektinkonzentration**

Publikation 1 konzentriert sich auf Untersuchungen zur Regulation von Adiponektin durch Ang II und ARB in 3T3-L1-Adipozyten. Im 3T3-L1-Zellmodell führte Ang II konsistent zu einer Erhöhung der Adiponektinproteinexpression, was durch einen AT<sub>2</sub>-Rezeptorblocker verhindert werden konnte (Publikation 1, Fig. 1A und 1B). Ein

selektiver  $AT_2$ -Agonist führte ebenfalls zu erhöhter Adiponektinproteinexpression (Publikation 1, Fig. 1C). Die zusätzliche Gabe von Irbesartan zu Ang II verstärkte die Expression von Adiponektin, jedoch nur in hohen Konzentrationen. Hingegen zeigten Irbesartankonzentrationen, die für eine Blockade von  $AT_1$  bereits ausreichend sind (0,1 und 1  $\mu$ M), keinen zusätzlichen Effekt (Publikation 1, Fig. 1D). Die zusätzliche Blockade von  $AT_2$  konnte den Effekt von Irbesartan nicht verhindern (Publikation 1, Fig. 2A). Irbesartan führte auch alleine zu einer Steigerung der Adiponektinproteinexpression (Publikation 1, Fig. 2B). Jedoch konnte ein  $PPAR\gamma$ -Antagonist die Irbesartanwirkung hinsichtlich der Adiponektinexpression blockieren (Publikation 1, Fig. 2C). Der  $PPAR\gamma$  aktivierende ARB Telmisartan konnte ebenfalls die Adiponektinproteinexpression steigern. Im Gegensatz dazu hatte Eprosartan, ein ARB ohne  $PPAR\gamma$ aktivierende Wirkung, keinen Effekt auf die Adiponektinexpression (Publikation 1, Fig. 2D).

Dies zeigt, dass einige ARB, die auch  $PPAR\gamma$ aktivieren können, das Adiponektinprotein unabhängig des adipozytären Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und unabhängig von ihrer  $AT_1$ -Blockade heraufregulieren. Eine Induktion der Adiponektinproteinexpression durch  $AT_2$ -Stimulation scheint hiervon unabhängig zu sein.

Da die Adiponektin-mRNA-Expression durch Irbesartan, Telmisartan und Pioglitazon nicht reguliert war (Publikation 1, Online Fig. I), wurden Versuche mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid durchgeführt. Irbesartan verlängerte die Adiponektinproteinhalbwertszeit deutlich, in etwa so stark wie mit 26S Proteasominhibitoren (Publikation 1, Fig. 3A und 3B). Die Proteasomaktivität selber wurde jedoch nicht durch Irbesartan beeinflusst (Publikation 1, Fig. 3C).

Für die Verlängerung der zellulären Adiponektinhalbwertszeit durch Irbesartan scheint also eine Regulation eines vorgeschalteten Systems verantwortlich zu sein, zum Beispiel der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg.

Um zu überprüfen, ob Irbesartan auch in vivo Adiponektin reguliert, wurden adipöse Zucker-Ratten 21 Tage mit Irbesartan oder isotonischer Salzlösung (Vehikel) oral behandelt. Irbesartan senkte den HOMA-IR-Index und den Nüchterninsulinspiegel (Publikation 1, Fig. 4A). Für das Tiermodell ist bekannt, dass mit zunehmenden Alter und Körpergewicht der Adiponektinserumspiegel der Tiere abfällt. Die Behandlung mit

Irbesartan verhinderte im Beobachtungszeitraum signifikant das Absinken des Adiponektinspiegels (Publikation 1, Fig. 4B).

In epididymalen Fettproben von adipösen Zucker-Ratten konnte die Proteininduktion von Adiponektin ex vivo durch Behandlung mit Irbesartan, nicht jedoch mit Eprosartan, reproduziert werden (Publikation 1, Fig. 4C). Auch die mRNA des *PPAR* $\gamma$ -Zielgens *adipocyte protein (aP2)* wurde verstärkt exprimiert (Publikation 1, Fig. 4D).

Die In vivo-Experimente zeigen, dass Irbesartan Parameter für Insulinsensitivität verbessert, den Adiponektinserumspiegel aufrecht erhält und das *PPAR* $\gamma$ -Zielgen *aP2* in Fettgewebe aktiviert.

Zusammengenommen identifiziert Publikation 1 Adiponektin als neues Target für *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB. Dies stellt einen neuen Mechanismus für insulinsensitivierende Wirkungen von ARB dar.

### **1.6.2 Identifikation von ARB als neue selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulatoren**

Im Zentrum von Publikation 2 steht die Charakterisierung der molekularen Interaktionen zwischen *PPAR* $\gamma$  und zwei *PPAR* $\gamma$ -aktivierenden ARB, Irbesartan und Telmisartan. ARB verhindern die Bindung von Ang II an *AT*<sub>1</sub> und finden eine breite Anwendung in der Behandlung von Bluthochdruck und in der Behandlung und Prävention von kardiovaskulären Folgeschäden. Obwohl diese ARB ausschließlich für die Bindung an *AT*<sub>1</sub> geplant und synthetisiert wurden, konnte gezeigt werden, dass sie die LBD von *PPAR* $\gamma$  im mikromolaren Konzentrationsbereich aktivieren (9-10).

Die ersten experimentellen Arbeiten für Publikation 2 waren Versuche zur Messung der Rezeptorautoregulation. Autoregulation ist die Fähigkeit bestimmter Hormonrezeptorliganden, die Protein- und/oder mRNA-Expression ihres eigenen Rezeptors zu regulieren. Dies wurde für *PPAR* $\gamma$ -Liganden bereits nachgewiesen (37-39). In humanen und murinen Adipozyten wurde mit dem vollen *PPAR* $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon, sowie mit Telmisartan und Irbesartan, nicht jedoch mit Eprosartan, eine verminderte Expression der *PPAR* $\gamma$ -mRNA gemessen (Publikation 2, Fig. 1A-D).

Diese Daten demonstrieren, dass *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB die Expression von *PPAR* $\gamma$  moderat herunterregulieren. Dies ist ein typisches Merkmal von *PPAR* $\gamma$ -Rezeptorliganden.

Ein weiterer Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen ARB und *PPAR* $\gamma$  ergab der Vergleich der Trypsinverdauungsmuster des *PPAR* $\gamma$ 2-Proteins. Dabei führt die direkte Interaktion von Ligand und Protein zu einer Konformationsänderung des Proteins und dadurch zu einer veränderten Angriffsfläche für die Protease. Daraus resultieren unterschiedliche Verdauungsmuster. Mit Rosiglitazon und Telmisartan ergaben sich verglichen mit Vehikel veränderte *PPAR* $\gamma$ 2-Trypsinverdauungsmuster. Mit Irbesartan ergaben sich keine Unterschiede, möglicherweise aufgrund mangelnder Empfindlichkeit der Methode (Publikation 2, Fig. 2A-C).

Die Ergebnisse der Proteaseverdauung weisen auf eine direkte Bindung von Telmisartan an *PPAR* $\gamma$ 2 hin, das den Rezeptor in eine andere Konformation als Rosiglitazon zwingt.

In Protein-Protein-Interaktionsuntersuchungen wurde festgestellt, dass *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB die Spezifität der *PPAR* $\gamma$ -LBD für Kofaktoren verändern. In GST-Pulldown-Untersuchungen ließ mit steigenden TZD-Konzentrationen die Bindung von *NCOR1* an die *PPAR* $\gamma$ -LBD nach, gleichzeitig wurden die Koaktivatoren *DRIP205* und *TIF2* an *PPAR* $\gamma$  gebunden (Publikation 2, Fig. 3A). Im Gegensatz dazu konnten ARB *NCOR1* nur geringfügig aus dem Komplex lösen, und die Bindung von *DRIP205* war deutlich weniger potent. *TIF2* wurde mit ARB nicht zum *PPAR* $\gamma$ -LBD-Komplex rekrutiert. Zur Bestätigung wurden mit den gleichen Peptiden FRET-Experimente durchgeführt (Publikation 2, Fig. 3B). Rosiglitazon führte zu starker *DRIP205*- und *TIF2*-Bindung an *PPAR* $\gamma$ , während *NCOR1* freigesetzt wurde. Ähnlich wie bei den GST-Pulldown-Experimenten, führte die Koinkubation mit ARB nur zu ungefähr 50% der maximalen mit TZD gemessenen Dissoziation von *NCOR1*. *DRIP205* wurde von beiden ARB rekrutiert. *TIF2* hingegen wurde nicht von Telmisartan rekrutiert, und nur gering von hochkonzentriertem Irbesartan.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB eine *PPAR*-Konformation erzeugen, unter der *NCOR1* komplexgebunden bleibt, und *DRIP205*, aber

nicht *TIF2*, rekrutiert werden. Damit können *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB als Agonisten mit selektiver Kofaktorrekutierung bezeichnet werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich differenzielle *TIF2*-Rekrutierung in funktionelle *PPAR* $\gamma$ -Aktivität umsetzt (Publikation 2, Fig. 4). Dazu wurden COS-7-Zellen transient mit *PPAR* $\gamma$ 2, einem *PPAR* $\gamma$ -abhängigen Luziferasereportervektor und ansteigenden Mengen von *TIF2* transfiziert, gefolgt von Stimulation mit den Liganden. Mit aufsteigenden *TIF2*-Mengen nahm die basale *PPAR* $\gamma$ -Aktivität zu und wurde mit Pioglitazon, aber mit Irbesartan nur bei höchster *TIF2*-Konzentration, verstärkt.

Diese Daten zeigen die funktionelle Relevanz der selektiven Kofaktorrekutierung durch ARB.

In Genexpressionsanalysen mit Microarrays erzeugt die Behandlung von 3T3-L1-Adipozyten mit Pioglitazon, Irbesartan oder Telmisartan ein unterschiedliches Expressionsmuster von *PPAR* $\gamma$ -Zielgenen (Publikation 2, Fig. 5). Die meisten Gene mit „peroxisome proliferator response element“ (PPRE) in ihrem Promoter wurden von ARB und TZD ähnlich reguliert, wenn auch teilweise in unterschiedlichen Größenordnungen. Jedoch gab es auch eine Vielzahl funktionell relevanter *PPAR* $\gamma$ -Zielgene in Adipozyten, die differenziell reguliert wurden.

Differenzielle Zielgenregulation als Folge selektiver Kofaktorrekutierung ist das Hauptmerkmal von selektiven Liganden für nukleäre Rezeptoren. Die hier erhobenen Daten weisen darauf hin, dass es sich bei den untersuchten ARB um selektive *PPAR* $\gamma$ -Liganden handelt.

Die spezifische Aktivierung von *PPAR* $\gamma$ -Zielgenen führt in Adipozyten zu gesteigerter Glukoseaufnahme. In Publikation 2 wird gezeigt, dass neben Pioglitazon auch Telmisartan und Irbesartan, nicht jedoch Eprosartan, die Glukoseaufnahme erhöhen (Publikation 2, Fig. 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulation mit ARB die metabolischen Funktionen des Rezeptors erhält.

Um die Wirksamkeit der selektiven *PPAR* $\gamma$ -Liganden in vivo zu demonstrieren, wurde Telmisartan, Pioglitazon und eine Lösungsmittelkontrolle (0,5% Tween 80 in H<sub>2</sub>O)

adipösen C57BL/6J-Wildtypmäusen zehn Wochen lang oral per Schlundsonde verabreicht. Die mit Telmisartan behandelten Tiere nahmen signifikant weniger an Gewicht zu als die beiden anderen Gruppen (Publikation 2, Fig. 7A). Die Nahrungsaufnahme der Telmisartan- und Pioglitazontiere unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Publikation 2, Fig. 7B). Glukosetoleranz und Insulinsensitivität verbesserten sich signifikant gegenüber den Kontrolltieren (Publikation 2, Fig. 7C und 7D). Der Gewichtsunterschied der Tiere war durch unterschiedlichen Körperfettgehalt gekennzeichnet (Publikation 2, Fig. 7E).

Zusammengenommen verbesserte Telmisartan in diesen In vivo-Experimenten die Insulinsensitivität, ohne dass es zu einer Gewichtszunahme kam. Das lässt vermuten, dass es sich bei Telmisartan um einen selektiven *PPAR* $\gamma$ -Modulator handelt.

Zusammenfassend werden die *PPAR* $\gamma$ -aktivierenden ARB Irbesartan und Telmisartan in Publikation 2 als neue SPPARM charakterisiert. Wie volle *PPAR* $\gamma$ -Agonisten haben ARB als selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulatoren metabolisch vorteilhafte Wirkungen. Jedoch, im Gegensatz zu vollen *PPAR* $\gamma$ -Agonisten, führt die Behandlung mit SPPARM nicht zu Gewichtszunahme.

### 1.6.3 Der ARB Telmisartan aktiviert *PPAR* $\alpha$ -Zielgene in der Leber

Von den ARB hat Telmisartan die höchste Potenz als *PPAR* $\gamma$ -Modulator (9-10). In klinischen Studien wurden die metabolischen Wirkungen von Telmisartan mit denen nicht-*PPAR* $\gamma$ -aktivierender ARB verglichen (28, 31, 41-43). In mehreren Studien konnten bei mit Telmisartan behandelten Patienten verbesserte Serumlipidspiegel und insbesondere reduzierte Triglyzeridspiegel festgestellt werden (28-30).

*PPAR* $\alpha$  ist stark exprimiert in Geweben, in denen viel Fettsäuren umgesetzt werden, wie zum Beispiel in Leber und Skelettmuskulatur (23). Dort reguliert *PPAR* $\alpha$  Schlüsselgene für die Fettsäureaufnahme, die mitochondriale Fettsäureoxidation und den Triglyzeridabbau (23-24). *PPAR* $\alpha$  ist das molekulare Ziel von lipidsenkenden Fibraten wie Gemfibrozil, Bezafibrat, Clofibrat und Fenofibrat, die zur Behandlung von Dyslipidämien und kardiovaskulären Krankheiten eingesetzt werden (22-23).

Die ersten Experimente von Publikation 3 dienten der Identifikation zugrundeliegender Mechanismen für die triglyzeridsenkenden Effekte bei Einwirkung von Telmisartan. Es wurde zunächst geprüft, ob Telmisartan klassische *PPAR $\alpha$* -Zielgene aktivieren kann. In HepG2-Zellen wurde eine gesteigerte Expression des Gens *carnitine palmitoyltransferase 1A liver (CPT1A)* mit Telmisartan festgestellt (Publikation 3, Fig. 1A und 1B). Unter *PPAR $\alpha$* -Reduktion mittels siRNA konnte bereits ohne Behandlung eine signifikant geringere *CPT1A*-Expression gemessen werden. Nach Telmisartanbehandlung war die *CPT1A*-Aktivierung zu 30,4% reduziert und die *CPT1A*-Aktivität war zu 59% reduziert (Publikation 3, Fig. 1C). Um zu testen, ob die *PPAR $\alpha$* -Zielgenaktivierung durch Telmisarten spezifisch für das *CPT1A*-Gen und für die humane Spezies ist, oder eher universaler Natur ist, wurde die transkriptionelle Aktivität des *acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1)*-Gens in der murinen Leberzelllinie AML12 gemessen. *ACSL1* ist ein klassisches *PPAR $\alpha$* -Zielgen und wurde hier durch Telmisartan ebenfalls aktiviert (Publikation 3, Fig. 1D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Telmisartan die *PPAR $\alpha$* -Zielgene *CPT1A* in HepG2-Zellen und *ACSL1* in AML12-Zellen aktiviert.

Als nächstes war die Frage zu klären, ob Telmisartan *PPAR $\alpha$*  direkt als Agonist aktiviert. Dazu wurde ein Fusionsprotein mit *PPAR $\alpha$* -LBD und Gal4-Domäne verwendet. Dieses Fusionsprotein ist nach Aktivierung der LBD in der Lage, ein Gal4-abhängiges Luziferase-Reporterkonstrukt zu aktivieren. Telmisartanbehandlung führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung der *PPAR $\alpha$* -LBD mit einem Maximum entsprechend 22,5% der Maximalaktivierung des vollen Agonisten Wy-14643 (Publikation 3, Fig. 2). Mit Irbesartan und Losartan wurde keine Aktivierung registriert.

Somit wurde Telmisartan als partieller *PPAR $\alpha$* -Agonist in vitro identifiziert, jedoch findet die Aktivierung des Rezeptors erst bei höheren Substanzkonzentrationen statt.

Aus einer Studie mit Ratten ist bekannt, dass Telmisartan sich in der Leber bis um das 40- bis 50-fache, verglichen mit Plasma, und bis um das 600-fache, verglichen mit Muskelgewebe, anreichert (44). Es könnte also sein, dass für eine *PPAR $\alpha$* -Aktivierung in vivo ausreichend hohe Konzentrationen von Telmisartan in der Leber vorhanden sind. Um dies zu untersuchen, wurden adipöse C57BL/6J-Hochfett-diät-Mäuse für zehn Wochen mit Telmisartan behandelt. Verglichen mit den Kontrolltieren konnten in den

Lebern der mit Telmisartan behandelten Tiere erhöhte *ACSL*-Protein- und -mRNA-Spiegel sowie erhöhte *CPT1A*-mRNA-Spiegel gemessen werden (Publikation 3, Fig. 3A und 3B). Dies schien a) organ-, b) *PPAR*-Subtyp-, und c) Ligand-spezifisch zu sein. So war im Skelettmuskel der mit Telmisartan behandelten Tiere keine *PPAR* $\alpha$ -Zielgenaktivierung messbar (a) (Publikation 3, Fig. 3C). In der Leber der Telmisartantiere kam es weder zur Induktion des *PPAR* $\gamma$ -Zielgens *fatty acid translocase* (*CD36*) noch zur Induktion von *PPAR* $\gamma$ 2 (b) (Publikation 3, Fig. 3D). Und in der Leber von zehn Wochen mit Pioglitazon behandelten adipösen Tieren bestand keine *PPAR* $\alpha$ -Zielgenaktivierung (*CPT1A*) (c) (Publikation 3, Fig. 3E).

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass Telmisartan in der Leber adipöser Mäuse spezifisch *PPAR* $\alpha$ -Zielgene des Fettsäureabbaus aktiviert.

Mit den erhöhten *CPT1A*- und *ACSL1*-mRNA-Spiegeln in der Leber der mit Temisartan behandelten Mäuse übereinstimmend wurden in Leber und Serum dieser Tiere reduzierte Triglyzeride gemessen (Publikation 3, Fig. 4A-C).

Dies zeigt, dass sich die hepatische *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung durch Telmisartan in reduzierten lokalen und systemischen Triglyzeridkonzentrationen auswirkt.

Schließlich dienten die letzten Versuche für Publikation 3 der Charakterisierung weiterer Mechanismen der *PPAR* $\alpha$ -Zielgenaktivierung durch Telmisartan. In den Lebern der Telmisartanmäuse wurde eine Heraufregulation von *PPAR* $\alpha$ -Protein und -mRNA gemessen, und dies konnte in HepG2-Zellen mit Telmisartan, jedoch nicht mit Eprosartan, verifiziert werden (Publikation 3, Fig. 5).

Diese Daten zeigen, dass Telmisartan die *PPAR* $\alpha$ -Expression zusätzlich zur LBD-Aktivierung steigert, was ebenfalls zu vermehrter Zielgenaktivität beitragen dürfte.

Zusammengenommen identifiziert Publikation 3 den ARB und SPPARM Telmisartan als partiellen *PPAR* $\alpha$ -Agonist. Durch das pharmakokinetische Profil der Substanz mit hohen Wirkstoffkonzentrationen in der Leber scheint sich die *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung auf die Leber zu beschränken. Dies schützt den restlichen Körper vor potenziellen Gefahren einer systemischen *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung.

## 1.7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit identifiziert neue molekulare Mechanismen für antidiabetische und triglyzeridsenkende Effekte von ARB. Adiponektininduktion, selektive *PPAR* $\gamma$  Modulation und partielle *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung sind an der Verbesserung der Insulinsensitivität und des Lipidstoffwechsels beteiligt.

*PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB steigern auf posttranskriptioneller Ebene die Expression von Adiponektin unabhängig von ihrer *AT* $_1$ -Blockade. *AT* $_2$ -Aktivierung führt ebenfalls zu Adiponektinheraufregulation. Der *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB Irbesartan verbessert bestimmte Insulinsensitivitätsparameter in adipösen Zucker-Ratten, gleichzeitig wird die in diesem Tiermodell bekannte Reduktion des Adiponektinserumspiegels verhindert.

Irbesartan und Telmisartan, ebenfalls ein *PPAR* $\gamma$ -aktivierender ARB, werden als neue SPPARM charakterisiert. Selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulation führt zu dreidimensionaler Konformationsänderung von *PPAR* $\gamma$ . Dies setzt selektive Kofaktorrekutierung voraus und führt zu einem spezifischen Genexpressionsprofil, das nur zu gemäßigter Adipogenese führt. Wie volle *PPAR* $\gamma$ -Agonisten haben ARB als selektive *PPAR* $\gamma$ -Modulatoren insulinsensitivierende Eigenschaften. Jedoch, im Gegensatz zu vollen *PPAR* $\gamma$ -Agonisten, führt die Behandlung mit SPPARM nicht zu Gewichtszunahme.

Zusätzlich aktiviert Telmisartan *PPAR* $\alpha$  und *PPAR* $\alpha$ -Zielgene in Zellen, und ist in vitro ein partieller *PPAR* $\alpha$ -Ligand. Durch das pharmakokinetische Profil der Substanz mit hohen hepatischen Wirkstoffmengen wird auch in vivo, in adipösen Mäusen in der Leber *PPAR* $\alpha$  aktiviert. Dies führt zu vermehrter Zielgenexpression und zu reduzierten Triglyzeridspiegeln in Leber und Plasma.

Seit 2004 ist bekannt, dass einige ARB, darunter Telmisartan und Irbesartan, den insulinsensitivierenden nukleären Hormonrezeptor *PPAR* $\gamma$  aktivieren können, und dies unabhängig von ihren Eigenschaften als *AT* $_1$ -Rezeptorblocker (9-10). *PPAR* $\gamma$ -Aktivierung führt zu vermehrter Adiponektinexpression in Adipozyten, steigert die Adiponektinplasmaspiegel bei Tieren und Menschen und verbessert dadurch die Gesamtkörperinsulinsensitivität (25, 45).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass mit pharmakologischer Hemmung von *PPAR* $\gamma$  die Heraufregulation von Adiponektin durch Irbesartan vollständig verhindert werden kann. Zusätzlich konnte Adiponektin nur durch *PPAR* $\gamma$ -aktivierende ARB heraufreguliert

werden. Scheinbar ist *PPAR $\gamma$*  von außerordentlicher Bedeutung für die Fähigkeit einiger ARB, Adiponektin zu steigern. *PPAR $\gamma$*  funktioniert als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor für Gene, die ein PPRE in ihrer Promoterregion enthalten. Überraschenderweise konnte in Publikation 1 keiner der ARB, und auch Pioglitazon nicht, Adiponektin auf mRNA-Ebene induzieren. Die hier vorliegenden Daten lassen also einen *PPAR $\gamma$* -abhängigen Mechanismus vermuten, der zu einer posttranskriptionellen Stabilisierung von Adiponektin im Zytoplasma führt. Tatsächlich ist der genaue Mechanismus der *PPAR $\gamma$* -vermittelten Adiponektinregulation in Adipozyten nicht vollständig geklärt. Dazu gibt es kontroverse Berichte: Combs et al. berichteten über keine verstärkte Adiponektin-mRNA-Expression in 3T3-L1-Adipozyten mit einem TZD-*PPAR $\gamma$* -Agonisten, während Maeda et al. eine mRNA-Regulation im gleichen Zelltyp, jedoch mit unterschiedlichem Differenzierungsprotokoll nachwiesen (45-46). Hinzu kommt, dass ein klassisches PPRE im humanen und murinen Adiponektinpromoter nicht identifiziert wurde (47-48). Im humanen Adiponektinpromoter findet sich lediglich ein putatives PPRE, das von einem weiteren Faktor, dem *liver receptor homolog-1 (nuclear receptor NR5A2)*, abhängig ist (49). Die genaue molekulare Entschlüsselung, wie und unter welchen Bedingungen das „PPRE“ im Adiponektinpromoter funktioniert, ist bislang nicht gelungen.

Größtenteils scheinen *PPAR $\gamma$* -vermittelte Wirkungen im metabolisch gefährdeten Patienten erwünscht zu sein, wie beispielsweise der Anstieg des insulinsensitivierenden Adipozytokins Adiponektin. Jedoch wurden bei Behandlung mit vollen *PPAR $\gamma$* -TZD-Agonisten unerwünschte Wirkungen wie Gewichtszunahme, Flüssigkeitsretention, ein erhöhtes Frakturrisiko und möglicherweise ein erhöhtes Myokardinfarktrisiko festgestellt. Eine aktuell diskutierte Frage ist, mit wieviel Quantität und mit welcher Qualität *PPAR $\gamma$*  zu stimulieren sei um keine Nebenwirkungen hervorzurufen. Berger et al. haben Molekülstrukturen publiziert, die chemisch nicht mit TZD verwandt sind, jedoch trotzdem *PPAR $\gamma$*  selektiv modulieren können, und im diätetischen Adipositasmausmodell zu Insulinsensitivierung ohne Gewichtszunahme führen (26-27). Durch spezifische Interaktionen zwischen Ligand, Rezeptor und Kofaktoren kommt es mit einem SPPARM zielgenau vermittelt lediglich zur Ausprägung eines Teils der typischen *PPAR $\gamma$* -Funktionen, und/oder es findet eine Auswahl des Spektrums der Zelltypen oder Organe statt, in denen diese Liganden eine Wirkung entfalten.

In Publikation 2 wurden die ARB Telmisartan und Irbesartan zum ersten Mal als SPPARM identifiziert und charakterisiert. Erstens führt Telmisartan zu einer Konformationsänderung von *PPAR $\gamma$* , wie im Proteaseverdauungsexperiment gezeigt werden konnte. Und zweitens bewirken Telmisartan und Irbesartan ein selektives Interaktionsmuster zwischen Kofaktoren und *PPAR $\gamma$* . Dies führt zu einem selektiven Expressionsprofil der *PPAR $\gamma$* -Zielgene der einzelnen Substanzen. Der *Prostazyklinrezeptor* beispielsweise ist ein proadipogener Faktor (50-51), und es wurde gezeigt, dass Pioglitazon den Rezeptor heraufreguliert, aber nicht die ARB. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Lipidspeicherung im Adipozyten ist die *Glycerolkinase*, die von TZD sehr stark stimuliert wird (52), jedoch, wie in Publikation 2 gezeigt, von ARB viel schwächer stimuliert wird als von Pioglitazon. Die Ergebnisse der Genexpressionsexperimente haben das Prinzip der selektiven *PPAR $\gamma$* -Zielgenregulation durch ARB auf „whole genome“-Ebene bestätigt. *PPAR $\gamma$* -aktivierende ARB stimulieren proadipogene Gene der Fettzellendifferenzierung deutlich schwächer als Pioglitazon. Das kann ein Grund für *PPAR $\gamma$* -vermittelte Insulinsensitivierung ohne Gewichtszunahme bei Patienten sein.

Die Fähigkeit von *PPAR $\gamma$* -Liganden, eine bestimmte Dynamik und Interaktion zwischen Rezeptoren und Kofaktoren auszulösen, ist für spezifische metabolische Effekte in vitro und in vivo unabdingbar (26, 52-53). In Publikation 2 wird gezeigt, dass unter ARB-Behandlung, im Gegensatz zu TZD-Behandlung, der Korepressor *NCOR1* seltener von *PPAR $\gamma$*  abdissoziiert, und der Koaktivator *TIF2* schwächer rekrutiert wird. Übereinstimmend damit ist aus der Literatur bekannt, dass *NCOR1* in der Lage ist, die Fettzellendifferenzierung zu beeinträchtigen (54). *TIF2*-Knockoutmäuse zeigen im weißen Fettgewebe weniger *PPAR $\gamma$* -Aktivität und weniger Fettbildung (55). Die eingeschränkte Fähigkeit der ARB-*PPAR $\gamma$* -Liganden *TIF2* zu binden und *NCOR1* freizusetzen, könnte eine molekulare Erklärung für die deutlich abgeschwächte Induktion proadipogener, *PPAR $\gamma$* -kontrollierter Faktoren sein.

Eine Besonderheit von Telmisartan ist, dass in mehreren Studien bei mit Telmisartan behandelten Patienten verbesserte Serumlipidspiegel und insbesondere reduzierte Triglyzeridspiegel festgestellt wurden (28-30). Andere ARB, wie zum Beispiel Eprosartan, senken den Serumtriglyzeridspiegel nicht (28). Das kann nicht ohne weiteres über *AT $_1$* -Blockade oder *PPAR $\gamma$* -Aktivierung erklärt werden. Es ist eher von

vollen *PPAR* $\alpha$ -Agonisten wie den Fibraten bekannt, dass diese teilweise über hepatische *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung und in der Folge vermehrte hepatische Fettsäureoxidation den Triglyzeridspiegel senken (56). Hinzu kommt, dass der „selektive“ *PPAR* $\gamma$ -Agonist Pioglitazon möglicherweise auch *PPAR* $\alpha$  partiell aktiviert (57-58). Tatsächlich führt die Behandlung von Patienten mit Pioglitazon, aber nicht mit Rosiglitazon, zu Serumtriglyzeridreduktion (59-60). Schlüssigerweise wird in Publikation 3 die Charakterisierung Telmisartans als *PPAR* $\alpha$ -Agonist in vitro beschrieben. In vivo im Hochfettdiätmausmodell wurden nach Behandlung mit Telmisartan Aktivierung von *PPAR* $\alpha$ -Zielgenen der Fettsäureoxidation in der Leber sowie reduzierte Serum- und Lebertriglyzeride beobachtet. Dies ist in Übereinstimmung mit einer kürzlich publizierten Studie, in der die Behandlung adipöser Zucker-Ratten mit Telmisartan zu einer Tendenz in Richtung Normalisierung der Plasmalipide (Gesamtcholesterin und Triglyzeride) führte (61).

Da *PPAR* $\gamma$ -Aktivierung in der Leber eine wichtige Bedeutung für den Lipid- und Glukosestoffwechsel bei Mäusen zukommt (62-64), wurden für Publikation 3 *PPAR* $\gamma$ -Zielgene in Lebergewebe der mit Telmisartan behandelten Mäuse mittels PCR gemessen. Weder *CD36* noch *PPAR* $\gamma$ 2 waren in ihrer Expression verändert, wohl aber wurde das *PPAR* $\alpha$ -Zielgen *CPT1A* durch Telmisartan stark induziert. In der Leber scheint Telmisartan also primär als *PPAR* $\alpha$ -Agonist zu wirken, und die *PPAR* $\gamma$ -Wirkung scheint dort weniger an Bedeutung zu erlangen.

Die pharmakokinetische Eigenheit von Telmisartan, sich in der Leber bis auf das 40- bis 50-fache der Serumkonzentration anzureichern (44), beispielsweise durch Bindung an die reichlich vorhandene *Glutathion S-Transferase A1* (65), ist wahrscheinlich für die Leberspezifität der *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung verantwortlich. Die hohen Konzentrationen in der Leber könnten tatsächlich für die zunächst in vitro beschriebene *PPAR* $\alpha$ -Aktivierung ausreichen. Damit übereinstimmend ist auch die im Muskelgewebe fehlende *PPAR* $\alpha$ -Zielgeninduktion durch Telmisartan.

Unabhängig davon wurden zwei weitere Phänomene von *PPAR* $\alpha$ -Agonisten verfolgt, die zwar bekannt, deren molekulare Mechanismen jedoch nicht erforscht sind. Zum einen ist publiziert, dass *PPAR* $\alpha$ -Agonisten den eigenen Rezeptor auf Proteinebene stabilisieren können (66), zum anderen wurde mit Fibraten eine Heraufregulation der *PPAR* $\alpha$ -mRNA in humanen Hepatozyten und bei Nagern beschrieben (67-69). Folgerichtig wird in Publikation 3 die Heraufregulation von *PPAR* $\alpha$ -Protein- und -mRNA-

Konzentration durch Telmisartan in vitro und in vivo nachgewiesen. Die genauen molekularen Mechanismen für diese Regulation sind noch aufzuklären. Jedoch sind zwei Mechanismen, über die Telmisartan in den *PPAR* $\alpha$ -Signalweg der Leber eingreift, klar gezeigt: Aktivierung der LBD und Heraufregulation des Rezeptors.

Zusammenfassend betrachtet werden in den Publikationen 1-3 neue molekulare Mechanismen antidiabetischer Wirkungen von ARB beschrieben. Darunter fällt die Zunahme des insulinsensitivierenden Fettgewebshormons Adiponektin, sei es durch Blockade des *AT*<sub>1</sub>-Rezeptors, *PPAR* $\gamma$  oder *AT*<sub>2</sub>-vermittelt. Die Aufklärung und Identifizierung der Interaktion von ARB und *PPAR* $\gamma$  als selektive Modulation von *PPAR* $\gamma$  verleiht einer Subgruppe der ARB eine völlig neue Bedeutung als multimodal wirkende Pharmaka. Für triglyzeridsenkende Einflüsse Telmisartans wird die Aktivierung von *PPAR* $\alpha$  als ein mitverantwortlicher Mechanismus identifiziert.

ARB, die über die Blutdrucksenkung hinaus mit zusätzlichen, vorteilhaften Eigenschaften wie Insulinsensitivierung und Triglyzeridreduktion ausgestattet sind, haben für metabolisch gefährdete oder bereits erkrankte Patienten eine hohe Bedeutung. Sie bieten gegenüber einer Standardhochdrucktherapie den wichtigen Mehrwert der Stoffwechselprotektion. Überdies wird die weitere Charakterisierung und Erforschung dieser Substanzen neue Perspektiven für die Entwicklung zukünftiger, verbesserter SPPARM-ARB eröffnen.

## 1.8 Literaturverzeichnis

1. Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, Clemenz M, Krikov M, et al. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension*. 2005;46(1):137-43.
2. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, et al. Molecular Characterization of New Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} Modulators With Angiotensin Receptor Blocking Activity. *Diabetes*. 2005;54(12):3442-52.
3. Clemenz M, Frost N, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Bohm C, et al. Liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene regulation by the angiotensin type 1 receptor blocker telmisartan. *Diabetes*. 2008;57(5):1405-13.
4. Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH, Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(5):821-6.
5. Elliott WJ, Meyer PM. Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis. *Lancet*. 2007;369(9557):201-7.
6. Gillespie EL, White CM, Kardas M, Lindberg M, Coleman CI. The Impact of ACE Inhibitors or Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers on the Development of New-Onset Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2261-6.
7. Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs*. 2004;64(22):2537-65.
8. Bloch MJ, Basile JN. In angiotensin-converting enzyme inhibitor-intolerant individuals, the angiotensin receptor blocker telmisartan does not reduce the incidence of major cardiovascular events in high-risk patients: lessons learned from the Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE-Intolerant Subjects With Cardiovascular Disease (TRANSCEND). *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2008;10(11):876-80.
9. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension*. 2004;43(5):993-1002.
10. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation*. 2004;109(17):2054-7.
11. Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2004;27(1):256-63.
12. Dormuth CR, Carney G, Carleton B, Bassett K, Wright JM. Thiazolidinediones and fractures in men and women. *Arch Intern Med*. 2009;169(15):1395-402.
13. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007;356(24):2457-71.
14. Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med*. 2005;11(8):861-6.
15. Staels B. Fluid retention mediated by renal PPARgamma. *Cell Metab*. 2005;2(2):77-8.

16. Rajagopalan R, Rosenson RS, Fernandes AW, Khan M, Murray FT. Association between congestive heart failure and hospitalization in patients with type 2 diabetes mellitus receiving treatment with insulin or pioglitazone: a retrospective data analysis. *Clin Ther.* 2004;26(9):1400-10.
17. Belcher G, Lambert C, Goh KL, Edwards G, Valbuena M. Cardiovascular effects of treatment of type 2 diabetes with pioglitazone, metformin and gliclazide. *Int J Clin Pract.* 2004;58(9):833-7.
18. Delea TE, Edelsberg JS, Hagiwara M, Oster G, Phillips LS. Use of thiazolidinediones and risk of heart failure in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. *Diabetes Care.* 2003;26(11):2983-9.
19. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, et al. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;368(9541):1096-105.
20. Psaty BM, Furberg CD. The record on rosiglitazone and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2007;357(1):67-9.
21. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med.* 2006;355(23):2427-43.
22. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4312-7. PMID: 20719.
23. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes.* 2005;54(8):2460-70.
24. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation.* 1998;98(19):2088-93.
25. Fasshauer M, Paschke R, Stumvoll M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie.* 2004;86(11):779-84.
26. Berger JP, Petro AE, Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [ $\gamma$ ] selective modulator. *Mol Endocrinol.* 2003;17(4):662-76.
27. Chang CH, McNamara LA, Wu MS, Muise ES, Tan Y, Wood HB, et al. A novel selective peroxisome proliferator-activator receptor- $\gamma$  modulator-SPPAR $\gamma$ M5 improves insulin sensitivity with diminished adverse cardiovascular effects. *Eur J Pharmacol.* 2008;584(1):192-201.
28. Derosa G, Ragonesi PD, Mugellini A, Ciccarelli L, Fogari R. Effects of telmisartan compared with eprosartan on blood pressure control, glucose metabolism and lipid profile in hypertensive, type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled 12-month study. *Hypertens Res.* 2004;27(7):457-64.
29. Inoue T, Morooka T, Moroe K, Ikeda H, Node K. Effect of telmisartan on cholesterol levels in patients with hypertension - Saga Telmisartan Aggressive Research (STAR). *Horm Metab Res.* 2007;39(5):372-6.
30. Mori Y, Itoh Y, Tajima N. Telmisartan improves lipid metabolism and adiponectin production but does not affect glycemic control in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Adv Ther.* 2007;24(1):146-53.
31. Miura Y, Yamamoto N, Tsunekawa S, Taguchi S, Eguchi Y, Ozaki N, et al. Replacement of valsartan and candesartan by telmisartan in hypertensive

- patients with type 2 diabetes: metabolic and antiatherogenic consequences. *Diabetes Care*. 2005;28(3):757-8.
32. Aoki A, Ogawa T, Sumino H, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, et al. Long-term effects of telmisartan on blood pressure, the renin-angiotensin-aldosterone system, and lipids in hypertensive patients. *Heart Vessels*. 2010;25(3):195-202.
  33. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(6):807-25.
  34. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
  35. Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TD, Peto J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism*. 1979;28(11):1086-96.
  36. Pickavance LC, Brand CL, Wassermann K, Wilding JP. The dual PPARalpha/gamma agonist, ragaglitazar, improves insulin sensitivity and metabolic profile equally with pioglitazone in diabetic and dietary obese ZDF rats. *Br J Pharmacol*. 2005;144(3):308-16. PMID: 1576007.
  37. Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol*. 1999;13(9):1522-34.
  38. Bellingham DL, Sar M, Cidlowski JA. Ligand-dependent down-regulation of stably transfected human glucocorticoid receptors is associated with the loss of functional glucocorticoid responsiveness. *Mol Endocrinol*. 1992;6(12):2090-102.
  39. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18527-33.
  40. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-43.
  41. Benndorf RA, Rudolph T, Appel D, Schwedhelm E, Maas R, Schulze F, et al. Telmisartan improves insulin sensitivity in nondiabetic patients with essential hypertension. *Metabolism*. 2006;55(9):1159-64.
  42. Shimabukuro M, Tanaka H, Shimabukuro T. Effects of telmisartan on fat distribution in individuals with the metabolic syndrome. *J Hypertens*. 2007;25(4):841-8.
  43. Vitale C, Mercurio G, Castiglioni C, Cornoldi A, Tulli A, Fini M, et al. Metabolic effect of telmisartan and losartan in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2005;4:6.
  44. Shimasaki M, Yamashita K, Imanishi R, Yokoyama K, Kuritani M, Oiwa Y, et al. Pharmacokinetics of <sup>14</sup>C-Telmisartan (1): Absorption, Distribution and Protein Binding of <sup>14</sup>C-Telmisartan after a Single Oral Administration to Rats. *Xenobio Metabol and Dispos*. 1999;14(6):425-32.
  45. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology*. 2002;143(3):998-1007.

46. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50(9):2094-9.
47. Das K, Lin Y, Widen E, Zhang Y, Scherer PE. Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(4):1120-9.
48. Schaffler A, Orso E, Palitzsch KD, Buchler C, Drobnik W, Furst A, et al. The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260(2):416-25.
49. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003;52(7):1655-63.
50. Aubert J, Saint-Marc P, Belmonte N, Dani C, Negrel R, Ailhaud G. Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;160(1-2):149-56.
51. Vassaux G, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R. Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent. *J Biol Chem*. 1992;267(16):11092-7.
52. Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev*. 2005;19(4):453-61.
53. Wang M, Tafuri S. Modulation of PPARgamma activity with pharmaceutical agents: treatment of insulin resistance and atherosclerosis. *J Cell Biochem*. 2003;89(1):38-47.
54. Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RN. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13600-5.
55. Picard F, Gehin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*. 2002;111(7):931-41.
56. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*. 2006;116(3):571-80.
57. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka H, Momose Y, Sugiyama Y, et al. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278(3):704-11.
58. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351(11):1106-18.
59. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, et al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2005;28(7):1547-54.
60. Orasanu G, Ziouzenkova O, Devchand PR, Nehra V, Hamdy O, Horton ES, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(10):869-81.

61. Ohmura T, Tsunenari I, Seidler R, Chachin M, Hayashi T, Konomi A, et al. Renoprotective effects of telmisartan on renal injury in obese Zucker rats. *Acta Diabetol.* 2007.
62. Zhang YL, Hernandez-Ono A, Siri P, Weisberg S, Conlon D, Graham MJ, et al. Aberrant hepatic expression of PPARgamma2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. *J Biol Chem.* 2006;281(49):37603-15.
63. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34268-76.
64. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest.* 2003;111(5):737-47.
65. Entzeroth M, Ebner T, Schmid J, Hadamovsky S. Distribution of Telmisartan in Rat Liver and Binding to Cytosol and Cytosolic Proteins. *J Hum Hypertens.* 1999;13(Suppl 3):S12 Abstr P.43.
66. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha ) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37254-9.
67. Gebel T, Arand M, Oesch F. Induction of the peroxisome proliferator activated receptor by fenofibrate in rat liver. *FEBS Lett.* 1992;309(1):37-40.
68. Pineda Torra I, Jamshidi Y, Flavell DM, Fruchart JC, Staels B. Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Mol Endocrinol.* 2002;16(5):1013-28.
69. Soria A, Gonzalez Mdel C, Vidal H, Herrera E, Bocos C. Triglyceridemia and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression are not connected in fenofibrate-treated pregnant rats. *Mol Cell Biochem.* 2005;273(1-2):97-107.

## 2. ANTEILSERKLÄRUNG

Der Promovend hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

**Publikation 1:** Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, **Clemenz M**, Krikov M, Thöne-Reineke C, Unger T, Kintscher U. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension*. 2005 Jul;46(1):137-43.

Impact Faktor 2005: 6,331. Gesamtanteil des Promovenden: 20%.

Beitrag im Einzelnen: Mithilfe bei der Durchführung des tierexperimentellen Teils; Durchführung von quantitativen Realtime-PCR-Untersuchungen; Durchführung von Western Blot-Untersuchungen.

**Publikation 2:** 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 Dec;54(12):3442-52. \* geteilte Erstautorschaft

Impact Faktor 2005: 8,028. Gesamtanteil des Promovenden: 50%.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung des tierexperimentellen Teils; Durchführung der „whole genome“-Microarray-Genexpressionsexperimente; Durchführung von quantitativen Realtime-PCR-Untersuchungen; Durchführung von Glukoseaufnahme-Experimenten; teilweise Anfertigung des Manuskripts.

**Publikation 3:** **Clemenz M\***, Frost N\*, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Böhm C, Hartge M, Gust R, Staels B, Unger T, Kintscher U. Liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene regulation by the angiotensin type 1 receptor blocker telmisartan. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1405-13. \* geteilte Erstautorschaft

Impact Faktor 2008: 8.398. Gesamtanteil des Promovenden: 60%.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung des tierexperimentellen Teils; Durchführung von quantitativen Realtime-PCR-Untersuchungen; Durchführung der Transfektionen und der siRNA-Experimente; teilweise konzeptionelle Planung des Projektes und Anfertigung des Manuskripts.

### 3. PUBLIKATIONEN

#### 3.1 Publikation 1

Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, **Clemenz M**, Krikov M, Thöne-Reineke C, Unger T, Kintscher U.

PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin.

*Hypertension. 2005 Jul;46(1):137-43.*

### 3.2 Publikation 2

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 Dec;54(12):3442-52. \* geteilte Erstautorschaft*

### 3.3 Publikation 3

**Clemenz M\***, Frost N\*, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Böhm C, Hartge M, Gust R, Staels B, Unger T, Kintscher U.

Liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene regulation by the angiotensin type 1 receptor blocker telmisartan.

*Diabetes. 2008 May;57(5):1405-13. \* geteilte Erstautorschaft*

## 4. LEBENSLAUF

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

## 5. PUBLIKATIONSLISTE

### 5.1 Originalartikel

- Foryst-Ludwig A, Hartge M, **Clemenz M**, Sprang C, Heß K, Marx N, Unger T, Kintscher U. PPARgamma activation attenuates T-lymphocyte-dependent inflammation of adipose tissue and development of insulin resistance in obese mice. *Submitted to Cardiovasc Diabetol.* 2010.
- Mai K, Andres J, Biedasek K, Weicht J, Bobbert T, Sabath M, Meinus S, Reinecke F, Möhlig M, Weickert MO, **Clemenz M**, Pfeiffer AF, Kintscher U, Spuler S, Spranger J. Free fatty acids link metabolism and regulation of the insulin-sensitizing Fibroblast Growth Factor-21. *Diabetes.* 2009 Apr 28.
- 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 Mar;4(3):445-56.
- Foryst-Ludwig A, **Clemenz M**, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, Krikov M, Bhanot S, Barros R, Morani A, Gustafsson JA, Unger T, Kintscher U. Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet.* 2008 Jun 27;4(6):e1000108.
- Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, **Clemenz M**, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher 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 Jul;28(7):1304-10.
- **Clemenz M**, Frost N, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Böhm C, Hartge M, Gust R, Staels B, Unger T, Kintscher U. Liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene regulation by the angiotensin type 1 receptor blocker telmisartan. *Diabetes.* 2008 May;57(5):1405-13. *M.C. and N.F. contributed equally.*

- Walcher D, Hess K, Heinz P, Petscher K, Vasic D, Kintscher U, **Clemenz M**, Hartge M, Raps K, Hombach V, Marx N. Telmisartan inhibits CD4-positive lymphocyte migration independent of the angiotensin type 1 receptor via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Hypertension*. 2008 Feb;51(2):259-66.
- Kappert K, Meyborg H, **Clemenz M**, Graf K, Fleck E, Kintscher U, Stawowy P. Insulin facilitates monocyte migration: a possible link to tissue inflammation in insulin-resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jan 18;365(3):503-8.
- 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 Dec;54(12):3442-52. *M.S. and M.C. contributed equally.*
- Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, **Clemenz M**, Krikov M, Thöne-Reineke C, Unger T, Kintscher U. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension*. 2005 Jul;46(1):137-43.

## 5.2 Editorials, Reviews und andere Artikel

- Angiotensin Type 1 Receptor Blockers (Sartans): A Review of the Evidence for Beneficial Effects on Insulin Sensitivity and Progression of Type 2 Diabetes. **Clemenz M**, Goebel M, Unger T. *American Journal Cardiovascular Drugs*. 2010. *In preparation.*
- Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) modulation on weight loss. **Clemenz M**. *Agro FOOD INDUSTRY Hi-tech*. 2010. *In preparation.*
- Angiotensin Receptor Blockers (ARBs) with PPARgamma-Modulating Properties: A new Treatment Principle for Patients with the Metabolic Syndrome. Unger T, **Clemenz M**. *Hipertensión (Madr.)*. 2007;24 Supl 1:1.
- Die Rolle von Vaspin bei Diabetes und Myokardveränderungen: Neues geschlechtsspezifisch reguliertes Adipozytokin in epikardialem Fettgewebe. **Clemenz M**. *MedReview*. 2007 Jun;8(4):12-3.
- The metabolic syndrome: cluster with a self-fulfilling loop? **Clemenz M**, Kintscher U, Unger T. *J Hypertens*. 2006 Feb;24(2):257-8.

- Effective treatment of hypertension by AT(1) receptor antagonism: the past and future of telmisartan. Goebel M, **Clemenz M**, Unger T. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006 Sep;4(5):615-29.
- A New Dawn for Treatment of Hypertensive Patients with Insulin Resistance: Positioning of a Drug with Selective PPARgamma-Modulation. Unger T, **Clemenz M**. *Ther Res.* 2006, Vol. 27; No. 6; pages 948-961.

### 5.3 Lehrbücher

- Regulationsmechanismen des Renin-Angiotensin-Systems im kardiovaskulären System. **Clemenz M**, Steckelings UM, Unger T. In: *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Reihe: Molekulare Medizin. Ganten, Detlev; Ruckpaul, Klaus; Köhrle, Josef (Eds.).* 2006:377-407.

### 5.4 Abstracts

- Histone deacetylase 6 – HDAC6 – a new regulator of glucocorticoid receptor-mediated metabolic processes. Winkler R, **Clemenz M**, Bloch M, Foryst-Ludwig A, Böhm C, Sprang C, Matthias G, Truee O, Matthias P, Kintscher U. *Diabetologie & Stoffwechsel* 2010; 5: S95.
- Depletion of Serine Protease Inhibitors in Epicardiac Adipose Tissue Is Associated With Myocardial Hypertrophy in a Mouse Model of Diet Induced Obesity. **Clemenz M**, Böhm C, Foryst-Ludwig A, Hartge M, Unger T, Kintscher U. *J Hypertens.* 26 Suppl 1:S48, June 2008.
- Regulation of Adipocytokine Expression in Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice by the PPAR $\gamma$ -Activating Angiotensin-Receptor-Blocker Telmisartan. **Clemenz M**, Foryst-Ludwig A, Hartge M, Unger T, Kintscher U. *Clin Res Cardiol* 96: Suppl 1 (2007).
- Vaspin – A New Gender Specific Regulated Adipocytokine in Epicardial Adipose Tissue. **Clemenz M**, Foryst-Ludwig A, Hartge M, Unger T, Kintscher U. *Clin Res Cardiol* 96: Suppl 1 (2007).

- Gender Specific Expression Regulation of Adipocytokines in Epicardial Adipose Tissue. **Clemenz M**, Foryst-Ludwig A, Hartge M, Unger T, Kintscher U. *Dtsch Med Wochenschr.* 2006 Nov;131(46 Suppl 6):S150.
- The PPAR $\gamma$ -Activating Angiotensin-Receptor-Blocker Telmisartan Increases Serum Adiponectin in Diet Induced Obese Mice. **Clemenz M**, Foryst-Ludwig A, Hartge M, Unger T, Kintscher U. *Hypertension* 2006;48;756-785.
- Regulation of Parameters of the Metabolic Syndrome in ER $\beta$   $\neg$  Mice. Foryst-Ludwig A, **Clemenz M**, Hartge M, Sprang Ch, Gustafsson JA, Unger Th, Kintscher U. *Hypertension* 2006;48;756-785.
- Characterization of Angiotensin Receptor Blockers with Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Modulating Activity. **Clemenz M**, Schupp M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. *Clin Res Cardiol.* 2006 Apr;95 Suppl 5:111.
- The PPAR $\gamma$ -Activating Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Telmisartan Improves Insulin Sensitivity and Prevents Weight Gain in Diet Induced Obese Mice. **Clemenz M**, Schupp M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005 Nov;130.
- The Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Telmisartan Induces Genes of the  $\beta$  Hepatic Fatty Acid Oxidation Pathway. **Clemenz M**, Frost N, Schupp M, Unger T, Staels B, Kintscher U. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005 Nov;130.
- The AT $_1$ -Receptor Blocker Telmisartan is a Partial PPAR $\alpha$  Agonist. **Clemenz M**, Frost N, Schupp M, Unger T, Staels B, Kintscher U. *Hypertension.* 2005 Oct;46(4): 889.
- Molecular Interactions Between Estrogen Receptor  $\beta$  and PPAR $\gamma$ . Foryst-Ludwig A, **Clemenz M**, Unger T, Kintscher U. *Hypertension.* 2005 Oct;46(4): 895.
- PPAR $\gamma$  Activating Angiotensin Receptor Blockers Exhibit Differential Cofactor Recruitment and Induce Altered Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. Schupp M, Gineste R, **Clemenz M**, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. *J Hypertens Suppl.* 2005 Jun;23(2):S204.

- The PPAR $\gamma$ -Activating ARB Irbesartan Stimulates Expression of the Insulin-Signaling Protein CAP and Enhances Insulin-Induced Glucose-Uptake. **Clemenz M**, Frank J, Schupp M, Goebel M, Unger T, Kintscher U. *Circulation*. 2004 Oct 26;110(17):III-834.
- Depletion of Adiponectin in Pericardial-Fat Tissue: A Potential Role for Cardiac MMP-Regulation. Clasen R, Sprang C, Schupp M, **Clemenz M**, Krikov M, Thoene-Reineke C, Unger T, Kintscher U. *Circulation*. 2004 Oct 26;110(17):III-821.

## 6. ERKLÄRUNG

Ich, Markus Clemenz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „*Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)*-aktivierende Angiotensin Typ 1-Rezeptorblocker bei Adipositas und Insulinresistenz“ 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

## 7. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Kintscher danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für allzeit herausragende Unterstützung, wissenschaftliche Diskussionen und pharmakologische Ausbildung. Dem Direktor des Instituts für Pharmakologie und des Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité, Prof. Dr. Thomas Unger, danke ich für stets hervorragende Förderung, akademischen Diskurs, und interdisziplinäre Ausbildung. Der Direktorin des Instituts für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM) der Charité und Sprecherin des GK 754, Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek, danke ich für ausgezeichnete wissenschaftliche Interaktion und Betreuung im Graduiertenkolleg. Dr. Anna Foryst-Ludwig danke ich für fortwährend teilnahmevolle und vortreffliche Kollegialität, Teamwork und molekularbiologische Ausbildung. Dr. Kai Kappert danke ich für aufrichtige Hilfsbereitschaft bei experimentellen, strategischen und organisatorischen Fragestellungen. Meinen molekular- und grundlagenwissenschaftlichen Lehrern, Dr. Michael Schupp, Dr. Ronald Clasen und Dr. Henning Witt danke ich für ihre hochgeschätzte Bereitschaft, viel Zeit zu opfern, um mir Wissen, Handwerk und wissenschaftliche Kultur zu vermitteln. Meinem langjährigen Kollegen Dr. Matthias Goebel danke ich für stets motivierendes Zusammenwirken und zahllose freudige Momente. Dr. Martin Hartge und Christiane Sprang danke ich für herzliche und angenehme Zusammenarbeit sowie beständigen Teamgeist höchster Güte. Dr. Nikolaj Frost, Dirk-Jan Enklaar, Dany Balke, Anna Schneider, Christian Böhm und Robin Winkler danke ich für konstant exzellente Teamarbeit, Interesse an der Wissenschaft, Ehrgeiz und beste Erinnerungen an die gemeinsame Zeit. Mandy Bloch, Ilse Nirmala-Bähr, Stephan Hohmann, Sami Wardat, Verena Benz sowie den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Kintscher, Unger, Regitz-Zagrosek, Ruiz Noppinger, Theuring und des CCRs danke ich für unersetzliche Unterstützung und Kollaboration. Bei meinen Eltern Nils und Margund Clemenz, meinem Bruder Thies und Miriam Clemenz, meiner Tante Petra Kurz, allen Verwandten und Familienmitgliedern, Marko T. Hinz, Dr. Stefan Wudel, Thorben Kotzbacher, Elisa Martínez Buchaca sowie allen Freunden und Bekannten bedanke ich mich für wertvolle Hilfe, Zuneigung, Motivation und Rückhalt. Eure Freundschaft und Liebe macht mich glücklich und hat großen Anteil an dieser Arbeit.