

Regulation der Fettgewebsinflammation durch Liganden von Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Martin Maximilian Hartge

aus Hannover

Oktober 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kintscher

Disputation am 27.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	6
1.1	Adipositas	6
1.2	Diabetes Mellitus	7
1.3	Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz	8
1.4	Metabolische Auswirkungen der Insulinresistenz	9
1.5	Das metabolische Syndrom	10
1.6	Die Funktion des Fettgewebes	11
1.7	Inflammation	11
1.8	Nukleäre Hormonrezeptoren	13
1.9	Peroxisome Proliferator Activated Receptors	13
1.10	PPAR γ	14
1.11	PPAR γ -Liganden	15
1.12	Das Fettgewebe als Ziel der insulinsensitivierenden Effekte von Thiazolidindionen	17
1.13	PPAR γ -Regulation adipozytärer Gene und Verbesserung der Insulinsensitivität	17
1.14	Die Rolle von PPAR γ im inflammatorischen Prozess	18
1.15	PPAR γ -aktivierende Angiotensin Typ 1 Rezeptorblocker	19
1.16	Zielsetzung	19
2	<i>Material und Methoden</i>	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Laborgeräte	21
2.1.2	Chemikalien	21
2.1.3	Puffer und Lösungen	22
2.1.4	Antikörper Immunhistochemie	23
2.1.5	Materialien Tiermodell	23
2.1.6	Tiere	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Tierversuche	23
2.2.2	Metabolische Phänotypisierung	25
2.2.3	Bestimmung der Körperzusammensetzung	25
2.2.4	Immunhistochemie	25
2.2.5	Gewebehomogenisierung und RNA-Isolation	27
2.2.6	RNA- & DNA-Konzentrationsbestimmung	27
2.2.7	cDNA-Synthese	28

Inhaltsverzeichnis

2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion	29
2.2.9	Graphische Auswertung	31
2.2.10	Statistische Auswertung	31
3	<i>Ergebnisse</i>	32
3.1	Hochfett-induzierte Adipositas und Fettgewebsinflammation	32
3.1.1	Körpergewicht	32
3.1.2	Körperzusammensetzung	33
3.1.3	Metabolische Charakterisierung	34
3.1.3.1	Glukosetoleranz	34
3.1.3.2	Insulinsensitivität	35
3.1.4	Immunhistochemische Analyse der Fettgewebsinflammation	37
3.1.4.1	MAC-3	37
3.1.4.2	CD3	37
3.1.5	RNA-Expressionsanalyse im Fettgewebe	38
3.1.5.1	MCP-1	39
3.1.5.2	F4/80	39
3.1.5.3	SDF-1	40
3.1.5.4	CD3 γ	41
3.2	Pharmakologische PPAR γ -Aktivierung und Fettgewebsinflammation	41
3.2.1	Körpergewicht	41
3.2.2	Körperzusammensetzung	42
3.2.3	Metabolische Charakterisierung	43
3.2.3.1	Glukosetoleranz	44
3.2.3.2	Insulinsensitivität	45
3.2.4	RNA-Expressionsanalyse im Fettgewebe	46
3.2.4.1	MCP-1	47
3.2.4.2	F4/80	47
3.2.4.3	SDF-1	48
3.2.4.4	CD3 γ	49
4	<i>Diskussion</i>	51
4.1	Einfluss infiltrierender T-Lymphozyten	52
4.2	Einfluss von PPAR γ -Agonisten auf die inflammatorisch vermittelte IR	54

Inhaltsverzeichnis

4.3	Relevanz des Tiermodells	57
4.4	Nutzen/Risiko-Profil von Rosiglitazon & Telmisartan	57
4.5	Telmisartan und SPPARMs	58
5	<i>Zusammenfassung</i>	60
6	<i>Danksagung</i>	62
7	<i>Referenzen</i>	63

1. Einleitung

Die Versorgung von Zellen mit Energie stellt den Körper kontinuierlich vor eine komplexe Aufgabe, die durch die ständige Zufuhr von Substraten zur Energiegewinnung gewährleistet werden muss. Die hierfür fortwährend verwerteten Fette und Zuckermoleküle bedingen den Blutglukosespiegel, der im gesunden Organismus innerhalb physiologischer Grenzen von 4 bis 7 mM variiert¹. Um diese Balance sicherzustellen, bedarf es eines feinen Mechanismus, der durch intestinale Aufnahme der Substrate, die Speicherung und Metabolisierung im peripheren Gewebe sowie den hepatischen Glukosemetabolismus kontrolliert wird.

Insulin als primärer hormoneller Modulator der Glukosehomöostase wird bei erhöhtem Plasmaglukosespiegel von den Betazellen der pankreatischen Langerhansschen Inseln ausgeschüttet². Nach Bindung des sezernierten Hormons an den Insulinrezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die im Muskel und Fettgewebe primär zu einer verstärkten Glukoseaufnahme führt, während die hepatische Glukoneogenese gehemmt wird³. Weiteren Einfluss übt Insulin auf die Speicherung und den Metabolismus von Substraten in Leber, Muskel und Fett aus, indem es die Lipogenese, Glykogenolyse und Proteinsynthese in den genannten Geweben moduliert⁴.

1.1. Adipositas

In den letzten Jahrzehnten konnte ein grundlegender Wandel des Lebensstils beobachtet werden. Dieser ist besonders in industrialisierten Ländern durch verminderte körperliche Aktivität bei gleichzeitig hoher Kalorienaufnahme gekennzeichnet. Eine daraus resultierende Zunahme an Körperfettgewebe^{5;6} kann durch die Entwicklung des Körpergewichtes in den USA veranschaulicht werden⁷, wo sich innerhalb eines Jahrzehnts der Anteil adipöser Menschen nahezu verdoppelt hat. Ähnliche Daten sind für Europa^{8;9} und insbesondere bei der Entwicklung der Körpergewichte von Kindern bekannt¹⁰⁻¹². Laut der nationalen Verzehrsstudie II 2008 vom Max-Rubner Institut sind durchschnittlich 66,0 % der Männer und 50,6 % der Frauen übergewichtig bis adipös¹³. Zudem steigt mit zunehmendem Alter die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei beiden Geschlechtern deutlich an¹³.

Die weit reichenden, krankheitsbedingenden Auswirkungen dieser Entwicklung zeigten sich anhand mehrerer Studien. So führte in früheren Tiermodellen eine explizit höhere Fettmasse zu einer kürzeren Lebensdauer¹⁴, während durch die Reduktion der Kalorienaufnahme und einer damit verbundenen Gewichtsreduktion eine Verlängerung der Lebensdauer erreicht

Einleitung

werden konnte¹⁵. Auch kardiovaskuläre Ereignisse und Arteriosklerose sind mit Fettleibigkeit assoziiert¹⁶. Umgekehrt ist bereits eine Gewichtsreduktion um 3,2 kg mit einer Verbesserung von Blutdruck und des kardiovaskulären Risikos verbunden¹⁷. Zu den aus einem *Body Mass Index* (BMI) > 25 kg/m² resultierenden Folgen zählt auch eine erhöhte Gesamtmortalität¹⁸.

Eine negative Korrelation besteht zwischen Fettmasse und Insulinsensitivität. Insbesondere eine vermehrte Ansammlung von viszeralem Fettgewebe hat negative Auswirkungen auf den Insulin- und Glukosestoffwechsel bei adipösen Menschen, was sich in der Inzidenz für Diabetes mellitus und andere Erkrankungen widerspiegelt¹⁹.

1.2. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist der Sammelbegriff für eine heterogene Stoffwechselstörung, welche durch eine chronische Hyperglykämie gekennzeichnet ist²⁰.

Grundlegend wird eine gestörte Insulinsekretion von einer gestörten Insulinwirkung unterschieden, während beides auch zusammen auftreten kann. Ursächlich können eine Erkrankung des exokrinen Pankreas oder Endokrinopathien, genetische Defekte der Insulinwirkung oder der β -Zell-Funktion bestehen. Durch eine resultierende chronische Hyperglykämie treten Störungen verschiedener anderer Stoffwechselprozesse^{21;22} ebenso wie nachfolgende Organschäden^{23;24}, die so genannten Spätkomplikationen, auf.

Absoluter Insulinmangel liegt im Falle einer Zerstörung von Inselzellen vor, wodurch die Bauchspeicheldrüse nicht mehr in der Lage ist, Insulin zu sezernieren. Davon unterscheidet sich der relative Insulinmangel, bei dem unter anderem durch Verminderung oder Defekt der Insulinrezeptoren die nachgeschaltete, zelluläre Kaskade im Vordergrund steht.

Unter pathologischen und klinischen Aspekten wird demnach zwischen zwei Diabetes-Typen unterschieden, die sich als Typ-1-Diabetes durch die Insulinabhängigkeit bzw. als Typ-2-Diabetes durch ein relatives Insulindefizit auszeichnen. Letzterer wird auch nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM) genannt.

Pathologisch betrachtet sind bei beiden Typen genetische als auch exogene Faktoren beteiligt. Genetische Prädisposition, speziell die Expression der humanen Leukozyten Antigene DR3 und DR4, führt zu immunologischen Prozessen und damit zur Manifestation eines Typ-1-Diabetes^{25;26}. Im Rahmen einer T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktion kann es zusätzlich zu einer Inselzellentzündung zu einer selektiven Zerstörung der β -Zellen kommen. Daraus resultiert wiederum ein allmähliches Versiegen der Insulinproduktion und -sekretion.

Einleitung

Die Entstehung des Typ-2-Diabetes ist ein polygenetisches Geschehen, bei dem weitere Faktoren eine bedeutende Rolle spielen. Großen Einfluss hat das so genannte metabolische Syndrom, welches sich nach World Health Organisation (WHO)-Definition aus erhöhten Blutfettwerten, Bluthochdruck, erhöhtem Blutzucker und einem bauchbetonten Übergewicht zusammensetzt. Besonders Überernährung und Übergewicht sowie körperliche Inaktivität spielen als Realisationsfaktoren des Typ-2-Diabetes eine bedeutende Rolle.

Charakterisiert ist die manifeste Erkrankung des Typ-2-Diabetes durch eine Insulinresistenz der Zielzellen, bei der die biologische Antwort auf endogenes oder exogen zugeführtes Insulin vermindert ist, so dass das Insulin seine Wirkung an und in der Zielzelle nicht mehr vollständig entfalten kann. Dies betrifft die Insulin-Effekte sowohl auf den Glukose-, Lipid- als auch den Proteinstoffwechsel.

1.3. Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz

Auf molekularer Ebene liegt der Insulinresistenz eine gestörte Übertragung des Insulinsignals innerhalb der Zelle zugrunde. Normalerweise werden beim Andocken von Insulin an eine Zelle spezielle Transportproteine, die so genannten *glucose transporter* (GLUT), an der Zelloberfläche bereitgestellt, über welche die Zuckermoleküle eingeschleust werden. Bei der Insulinresistenz kann im speziellen der Transport von GLUT4 von intrazellulären Speichervesikeln zur Zytoplasmamembran gestört sein und nicht ausreichend Glukose zur Energieversorgung in die Zelle aufgenommen werden. Kompensatorisch wird die Produktion des Insulins in der Bauchspeicheldrüse erhöht, um die Glukoseverwertung aufrecht und den Blutzuckerspiegel im Normbereich zu halten. Diese unphysiologisch hohe Insulinproduktion kann jedoch, meist erst nach Jahren, nicht mehr gesteigert werden, womit das Stadium der gestörten Glukosetoleranz erreicht wird. Eine daraus resultierende, dauerhafte Hyperinsulinämie führt außerdem zu einer Verminderung der Rezeptorenzahl, was wiederum einen weiter erhöhten Insulinspiegel nach sich zieht. In dieser Phase ist die Insulinresistenz der Zellen bereits so weit fortgeschritten, dass der Organismus postprandiale Glukosespitzen nicht mehr kompensieren kann. Daraus resultieren ein anhaltend hoher Nüchtern-Blutzucker und ein manifester Diabetes mellitus. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich meist eine Insulin-Sekretionsstörung nachweisen, die durch von der Norm abweichende Sekretionsmuster gekennzeichnet ist und schließlich in einem Erschöpfen der Insulinproduktion münden kann. Eine weitere Ursache der Insulinresistenz kann die Bildung von Antikörpern sein, die gegen das Hormon gerichtet die biologische Wirksamkeit des Insulins hemmen. Auch eine erhöhte

Einleitung

enzymatische Insulinspaltung und eine herabgesetzte Bindung des Insulins an seine Rezeptoren können Resistenzursachen darstellen.

Zudem existieren Insulinresistenz-fördernde Proteine, zu denen der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Plasminogen Aktivator Inhibitor I (PAI-1) so wie Resistin zählen²⁷ und insbesondere von Adipozyten insulinresistenter Typ-2-Diabetiker vermehrt sezerniert werden^{28;29}. Sie interagieren mit dem Glukose- und Lipidstoffwechsel und verstärken ihrerseits die bereits bestehende Insulinresistenz. TNF- α inhibiert beispielsweise die intrazelluläre Phosphorylierung des Insulinrezeptors²⁸ und damit die nachfolgende Signalkaskade.

1.4. Metabolische Auswirkungen der Insulinresistenz

Der Einfluss der Insulinresistenz auf den Glukosestoffwechsel wird deutlich, wenn die Glukosebilanz betrachtet wird. Die Skelettmuskulatur ist insgesamt für rund 75% des peripheren Glukoseverbrauchs verantwortlich. Beim insulinresistenten Typ-2-Diabetiker ist die postprandiale Glukoseaufnahme allerdings durch die Skelettmuskulatur bedeutend eingeschränkt und die hepatische Glukoseproduktion wird durch die herabgesetzte Insulinwirkung nur unzureichend supprimiert, was im Nüchternzustand zu einem weiteren Anstieg der Blutzuckerwerte führt.

Ähnlich starke Korrelation besteht zwischen der Insulinresistenz und dem Lipidstoffwechsel. So sind die freien Fettsäuren ein entscheidender Faktor für die Pathophysiologie der Insulinresistenz. Durch Lipolyse können aus dem intraabdominalen Fettgewebe freie Fettsäuren kurzfristig in die Blutbahn freigesetzt werden. Wirkt Insulin diesem Prozess normalerweise entgegen, geht der hemmende Effekt auf die Enzyme *adipose triglyceride lipase* und *hormone-sensitive lipase* bei Insulinresistenz jedoch verloren^{30;31}, so dass vermehrt freie Fettsäuren in die Blutbahn gelangen. Aus diesem Grund gehört die Hypertriglyzeridämie zu den frühzeitig nachweisbaren Folgen der Insulinresistenz. Die Verschiebung der Lipidhomöostase führt letztlich zur typischen Fettstoffwechselstörung des Typ-2-Diabetikers, die durch erhöhte Triglyzeride und *low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterin sowie durch erniedrigtes, gefäßprotektives *high density lipoprotein* (HDL)-Cholesterin gekennzeichnet ist. An der Skelettmuskulatur bewirken erhöhte Spiegel freier Fettsäuren eine kompetitive Hemmung der Glukoseaufnahme und -verwertung. Darüber hinaus stimulieren sie die Glukoseneubildung in der Leber und hemmen die Insulinextraktion, wodurch es zu einem weiteren Anstieg des Blutzuckerspiegels kommt.

Einleitung

Hyperglykämie und Hyperlipidämie beeinflussen ihrerseits das Lipidprofil. So können Lipoproteine wie z.B. LDL-Cholesterin trotz normaler Plasmaspiegel ein erhöhtes atherogenes Potential aufweisen. Verantwortlich hierfür sind strukturelle Veränderungen wie Glykosylierung, Anreicherung mit Triglyzeriden und Oxidation des Proteinanteils. Es entstehen kleinere und dichtere Lipoproteinpartikel, von denen besonders die kleinen, dichten *small dense* LDL als gefäßaktiv mit hohem atherogenen Potential gelten³².

Das beschriebene Zusammenspiel des gestörten Glukose- und Lipidstoffwechsels in ihren jeweiligen Ausprägungen kann Bestandteil des Metabolischen Syndroms^{22;33;34} werden.

1.5. Das metabolische Syndrom

Die international anerkannte Definition der *International Diabetes Federation* setzt für das Vorhandensein des metabolischen Syndroms eine Adipositas bzw. vielmehr das Vorliegen viszeraler Adipositas voraus. Kommen noch zwei der folgenden Faktoren hinzu

- erhöhter TG Spiegel: ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L),
- reduziertes HDL Cholesterol: < 40 mg/dL (1.03 mmol/L*) bei Männern und < 50 mg/dL (1.29 mmol/L*) bei Frauen,
- erhöhter Blutdruck: systolisch ≥ 130 oder diastolisch ≥ 85 mm Hg, erhöhte Nüchtern-Plasma-Glukose ≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L),

liegt das so genannte Metabolische Syndrom vor³⁵.

Aus der Verflechtung der Insulinresistenz und des Adipositas-assoziierten Anstiegs freier Fettsäuren resultiert primär eine Dyslipidämie²², in deren Rahmen verstärkt hepatisch VLDL-Partikel sezerniert werden. Eine so entstehende Hypertriglyzeridämie bedingt unter anderem durch vermehrten Austausch von Cholesterinestern zwischen VLDL und HDL eine stärkere HDL-Clearance und die Senkung der HDL-Spiegel³⁶.

Eine arterielle Hypertonie als Bestandteil des Metabolischen Syndroms kann unter anderem durch Insulinresistenz bzw. Hyperinsulinämie hervorgerufen werden. Beginnend mit einer endothelialen Dysfunktion kann es in insulinresistenten Patienten zu einem manifesten Bluthochdruck, kardiovaskulären Komplikationen sowie verstärkter Na⁺- und Flüssigkeitsreabsorption kommen³⁷⁻³⁹. Die normalerweise vasodilatatorischen Eigenschaften des Insulins können bei adipösen und diabetischen Patienten reduziert sein²².

Einleitung

Grundsätzlich ist bei Patienten mit Metabolischem Syndrom die Inzidenz für Folgeerkrankungen und speziell für kardiovaskuläre Komplikationen stärker erhöht³⁹ als bei Vorliegen der einzelnen Komponenten⁴⁰.

Die aus der Verknüpfung der Insulinwirkung und der Adipositas resultierende Bedeutung des Fettgewebes wurde in den letzten Jahren offensichtlich und rückt in den Fokus der Forschung⁴¹.

1.6. Die Funktion des Fettgewebes

Lange Zeit galt das Fettgewebe als reiner Energiespeicher, der bei Bedarf Fettsäuren zur Energiegewinnung durch β -Oxidation freisetzen kann und dessen Umfang relativ zum Energiehaushalt schwankt⁴². Mit der Identifizierung des adipozytenspezifischen Proteins Leptin wurde die Bedeutung des Fettgewebes grundsätzlich neu interpretiert und mit der Charakterisierung weiterer so genannter Adipokine noch verstärkt⁴²⁻⁴⁵.

Erweitert wurde das Verständnis durch die Identifizierung diverser Rezeptoren, über die das Fettgewebe mit Mediatoren des Hormonsystems, wie z.B. Insulin, und dem zentralen Nervensystem kommuniziert⁴⁵.

Eine Dysregulation dieser Funktionen des Fettgewebes kann schwerwiegende Folgen auf den Glukosestoffwechsel haben, bis hin zur Initiierung eines Typ 2 Diabetes mellitus und eines metabolischen Syndroms. Dabei ist besonders viszeral auftretende Adipositas mit Hyperglykämie und Insulinresistenz assoziiert. Zudem wird das Fettgewebe heute als endokrines Organ angesehen, welches eine Vielzahl von Hormonen sezerniert und dadurch in die Pathogenese der Insulinresistenz und kardiovaskulärer Folgeerkrankungen eingreift.

1.7. Inflammation

Fettleibigkeit trägt zur Entstehung der Insulinresistenz und eines Typ 2 Diabetes mellitus bei. Ebenso wird seit einiger Zeit angenommen, dass eine ursächliche Beziehung zwischen der Insulinresistenz und einer chronischen subklinischen Inflammation besteht. So wurde im Tiermodell für das proinflammatorische Zytokin TNF α ein Einfluss auf die Insulinresistenz als Folge einer Fettleibigkeit nachgewiesen^{28;46;47}. TNF α wird verstärkt im weißen Fettgewebe von fettleibigen und insulinresistenten Nagern exprimiert, wobei interessanterweise TNF α -Ligand- bzw. p55TNF-Rezeptor-Knockout-Mäuse vor adipös induzierter Insulinresistenz geschützt sind⁴⁸⁻⁵¹. Als weiteres Chemokin führt das *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-

Einleitung

1) zu einer Verschlechterung der Insulinsensitivität⁵² und wurde wie auch TNF α in einer Reihe humaner Studien im Rahmen einer chronischen Inflammation mit der Insulinresistenz in Verbindung gebracht⁵³. Ebenso wurden weitere Inflammationsmarker wie das *C-reactive protein* (CRP) und Interleukin 6 (IL-6) verstärkt im Serum von adipösen Diabetes-Patienten gefunden⁵⁴. Ausgeschüttet werden die Zytokine MCP-1 und IL-6 unter anderem vom Fettgewebe⁵⁵⁻⁵⁷. Im beschriebenen inflammatorischen Milieu des Fettgewebes können zudem Makrophagen nachgewiesen werden, welche ebenfalls MCP-1 und IL-6 sezernieren und zur Insulinresistenz beitragen⁵⁸. Dieser Einfluss scheint durch Adipositas noch verstärkt zu werden^{58;59}. Xu et al. konnten weitere Inflammations- und Makrophagen-spezifische Gene wie ADAM8, MIP-1a, MAC-1, F4/80 und CD68 gefunden, die im weißen Fettgewebe von fettleibigen Mäusen stark hochreguliert waren⁶⁰. Diese Gene werden vorwiegend in der sogenannten Stroma Vaskulären Fraktion (SVF) des Fettgewebes gefunden, in der sich Makrophagen befinden, während die Adipozytenfraktion weniger starke Expression der genannten Gene zeigt. Der Nachweis sezernierten MIP-1 α s und MCP-1s, die beide so genannte chemotaktische Proteine sind, legt die Vermutung nahe, dass die Zunahme der Makrophagen im Fettgewebe durch deren Infiltration als Folge der Fettleibigkeit zustande kommt. Xu et al. zeigten zudem, dass mit der adipös-induzierte Makrophagenakkumulation im weißen Fettgewebe auch der Nüchtern-Insulinspiegel im Blut anstieg, was die Korrelation zwischen Hyperinsulinämie und Makrophagen-Infiltration unterstreicht⁶⁰.

Einen weiteren Aspekt in der Verbindung der Adipositas mit der Insulinresistenz stellt die Infiltration von Lymphozyten ins Fettgewebe dar, die durch das chemotaktische Protein *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1 α) getriggert wird⁶¹. Die Akkumulation dieser in den inflammatorischen Prozess eingreifenden Zellen des Immunsystems konnte bei Mäusen mit Diät-induzierter Fettleibigkeit nachgewiesen werden⁶². Die Tiere wiesen zudem eine Insulinresistenz auf.

Welchen Einfluss die Inflammation auf die Fettleibigkeit bzw. die Insulinresistenz und damit auf die Inzidenz eines Typ 2 Diabetes mellitus hat, ist bisher nur in Ansätzen bekannt. Die Komplexität der Verknüpfung des Fettgewebes mit der Insulinwirkung sowie mit proinflammatorischen Zellen wird jedoch deutlicher, betrachtet man bestimmte Rezeptoren, die insbesondere von Adipozyten verstärkt exprimiert werden.

1.8. Nukleäre Hormonrezeptoren

Die Familie der nukleären Hormon Rezeptoren (NHR) ist eine der größten Transkriptionsfaktor-Familien. Die Mitglieder werden von kleinen, lipophilen Molekülen aktiviert, worunter auch Hormone und Vitamine fallen. Die NHRs weisen diverse funktionelle Domänen auf. Dazu zählt eine N-terminale A/B Domäne, welche zwischen den Mitgliedern der NHRs eher gering konserviert und wenig charakterisiert ist. Die A/B Domäne ist an der Ligand-unabhängigen Transaktivierung einiger Rezeptoren beteiligt und kann in anderen Fällen die DNA-Bindung regulieren. Die so genannte *DNA binding domain* (DBD) ist zentral lokalisiert, weist zwei hochkonservierte Zinkfinger motive auf und dirigiert den Rezeptor zu spezifischen DNA- Sequenzen, definiert als so genannte Response-Elemente. Der Rezeptor weist außerdem eine so genannte Hinge-Region auf, welche Proteinflexibilität für die simultane und obligatorische Dimerisierung mit dem Partner NHR und die DNA-Bindung erlaubt. Die Spezifität der DNA-Bindung ist durch die C-terminale Erweiterung der DBD vorbestimmt, die als *ligand binding domain* (LBD) bezeichnet wird. Die LBD enthält zudem eine ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne (*activation function 2* (AF2))⁶³. Bindet ein Ligand, erfährt die LBD des Rezeptors eine Konformationsänderung, aus der die Fähigkeit zur Rekrutierung von Molekülen resultiert, die als nukleäre Co-Aktivatoren bezeichnet werden. Zusammen mit den nukleären Co-Repressoren stellen sie eine Gruppe von Molekülen dar, die durch Bindung an den Rezeptor und/oder das Zielgen die Transkription zu unterdrücken respektive zu fördern vermögen. Die Bindung des Liganden bewirkt letztlich einen Wechsel von Co-Repressoren und Co-Aktivatoren, was als lokaler Austausch des so genannten Transkriptionskomplexes zusammengefasst wird. Dieser führt wiederum zu einer Repression oder Aktivierung der Transkription eines spezifischen Gens⁶⁴.

1.9. Peroxisome Proliferator Activated Receptors

Drei zur Gruppe der NHRs zählenden Rezeptoren sind die so genannten *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* (PPARs). Die Namensgebung beruht auf einer Reihe von Substanzen, die bei Nagetieren zu einer Peroxisomenproliferation führen, gleichfalls aber auch ein zu den Transkriptionsfaktoren bzw. PPARs gehörendes Protein aktivieren⁶⁵. Die drei bis heute bekannten Subtypen werden als PPAR α , PPAR γ und PPAR δ (β) bezeichnet. Die Anordnung der Proteindomänen der drei Subtypen ist identisch und weist eine Homologie von etwa 70 % der LBD und rund 85% der DBD für die verschiedenen PPAR-Subtypen auf⁶⁶.

Einleitung

Die beiden PPAR γ -Isoformen unterscheiden sich durch zusätzliche 30 N-terminale Aminosäuren des PPAR γ 2 Proteins^{67;68}. Während PPAR α durch die Stoffklasse der Fibrate aktiviert wird und im Rahmen der β -Oxidation von Fettsäuren aktiv ist⁶⁹, greift PPAR δ in die Proliferation und den Schutz des Endothels ein. Außerdem reduziert der Rezeptor bei Aktivierung die Fettbelastung des Körpers und verbessert das Serumlipid-Profil sowie die Insulinsensitivität⁷⁰⁻⁷⁴. PPAR γ entfaltet seine Funktion sowohl im Rahmen des Glukose- als auch des Fettstoffwechsels⁷⁵. Ebenso sind inflammatorische Regulation⁷⁶ sowie ein Einfluss auf Differenzierungsvorgänge bestimmter Organellen beschrieben worden^{77;78}. Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die PPAR γ Isoform, welche im Folgenden genauer besprochen werden soll.

1.10. PPAR γ

Nach dem zuvor beschriebenen Mechanismus induziert die Bindung eines synthetischen oder endogenen Liganden am PPAR γ eine Konformationsänderung, was zur Dimerisierung mit dem Retinolsäurerezeptor RXR führt⁷⁹. Dieser Vorgang geht mit einem lokalen Austausch der Transkriptionskomplexe einher⁸⁰⁻⁸². Der resultierende Proteinkomplex bindet an spezifische Sequenzen in Promoterregionen von Zielgenen, deren Expression in dieser Form durch Transaktivierung oder Transrepression reguliert werden. Diese Erkennungssequenzen ist charakterisiert durch den so genannten *Direct Repeat* (DR) AGGTCA, der auch als PPAR γ *Response Element* (PPRE) bezeichnet wird. Der in Abbildung 1.1 dargestellte ligandenaktivierte Mechanismus für PPAR γ kann jedoch auch durch eine Interaktion mit der AF-1 Domäne ligandenunabhängig geschehen⁶⁷.

Die beiden PPAR γ Subtypen unterscheiden sich sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrem Expressionsmuster. PPAR γ 1 wird hauptsächlich in der Leber, der Muskulatur sowie in Makrophagen und im Fettgewebe exprimiert^{79;83-85}. Die mit Abstand höchste Expression von PPAR γ 1 wird im weißen Fettgewebe gefunden. Hier findet sich auch die höchste PPAR γ 2 Expression. PPAR γ 2 konnte außerdem noch in monozytären Zellen identifiziert werden⁸⁶.

Die Bedeutung der PPAR γ -Expression im Fettgewebe wird durch seine Rolle beim Differenzierungsprozess deutlich. Dieser als Adipogenese bezeichnete Vorgang beschreibt die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten, ist morphologisch durch Lipidakkumulation gekennzeichnet und kann während des Lebens fortwährend stattfinden⁸⁷. Gegliedert in drei Phasen beginnt er mit der frühen Zellzyklusregulation, gefolgt von der klonalen Expansionsphase und der terminalen Differenzierung^{87;88}. PPAR γ fällt dabei als

Einleitung

regulierender Transkriptionsfaktor eine essentielle Schlüsselrolle zu⁸⁹. Die schwächere Expression von PPAR γ in anderen Organen als dem Fettgewebe führte anfangs zu nur geringer Untersuchung der Leber, des Muskels und anderen Geweben. Denn trotz dass die Muskulatur quantitativ wichtigster Ort für die insulininduzierte Glukoseverwertung ist, beträgt dort die Expression von PPAR γ lediglich 5-10% im Vergleich zum Fettgewebe⁹⁰. Die Entstehung von Insulinresistenz in muskelspezifischen PPAR γ *Knock-out* Mäusen^{91;92} unterstreicht die Bedeutung bereits geringer Expression von PPAR γ im Muskel für die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase.

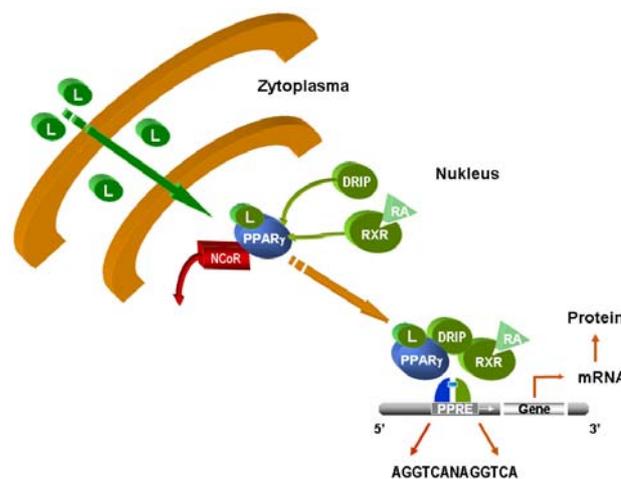


Abbildung 1.1: Ligandenaktivierte Induktion PPAR γ Ziel-Gene

1.11. PPAR γ -Liganden

Ein endogener Ligand mit hoher intrinsischer Aktivität für PPAR γ konnte noch nicht identifiziert werden. Endogene Liganden mit schwacher Aktivität sind Fettsäuren und Eicosanoide. Das Prostaglandinderivat 15-deoxy-D12,14--PGJ₂ (15d-PGJ₂) ist ein möglicher natürlicher Ligand, weist aber auch PPAR γ -unabhängige Effekte auf⁹³⁻⁹⁷. Es wird weiterhin angenommen, dass spezifische Genexpression durch entsprechende Konzentrationen von Fettsäuren über PPAR γ reguliert wird. Eine kürzlich veröffentlichte Studie lässt vermuten, dass transient während der Adipogenese induzierte PPAR γ -Liganden beteiligt sein könnten⁹⁸.

Die Liganden mit der bisher stärksten bekannten Affinität stellen die Thiazolidindione (TZDs) dar, die bereits im Bereich nanomolarer Konzentrationen binden. Ihre Entdeckung war durch die Verbesserung der Insulinsensitivität in Tier und Mensch^{99;100} von großer Bedeutung und stellt einen wichtigen Durchbruch in der Behandlung des NIDDM dar.

Einleitung

Die Substanzgruppe der Thiazolidindione (TZD) wurde bereits in den siebziger Jahren im Rahmen der Entwicklung neuer Cholesterin-senkender Substanzen identifiziert und chemisch definiert. Als Prototyp wurde Ende der siebziger Jahre Ciglitazon erstmals synthetisiert, auf das im Verlauf der Weiterentwicklung die Substanzen Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon folgten, welche als neue orale Antidiabetika zur Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus schließlich Marktreife erlangten. Troglitazon wurde im März 2000 aufgrund eines hohen Potentials für Lebertoxizität wieder vom Markt genommen. In Europa sind seit 2000 Rosiglitazon (Avandia[®]) und Pioglitazon (Actos[®]) verfügbar. Hinweise für eine Lebertoxizität im Sinne eines Gruppeneffektes bestehen bei den neuen Substanzen bisher nicht. Allerdings tritt bei allen TZDs eine Gewichtszunahme unter Therapie auf. Kürzlich veröffentlichte kardiovaskuläre Nebenwirkungen unter Rosiglitazon-Therapie wurden in mehreren Studien untersucht (DREAM, ADOPT und RECORD¹⁰¹⁻¹⁰³). In einer intensiv diskutierten Metaanalyse zeigte sich eine erhöhte Rate an Myokardinfarkten unter Rosiglitazontherapie¹⁰⁴. Diese Ergebnisse sollten dazu veranlassen, auch in Zukunft den kardiovaskulären Sicherheitsaspekt von Rosiglitazon detailliert zu betrachten und in therapeutische Entscheidungen einbezogen werden.

Es gibt Hinweise, dass die TZDs die Insulinwirkung via PPAR γ verbessern. Außerdem besteht eine starke Korrelation zwischen den TZD-Effekten auf die Plasmaglukosesenkung *in vivo* und der Bindung und Aktivierung von PPAR γ ¹⁰⁵. Interessanterweise verbessern auch neuere, nicht zur Klasse der TZDs gehörende PPAR γ -Liganden die Insulinwirkung *in vivo* und korrelieren mit der Bindung und Aktivierung von PPAR γ ¹⁰⁶. Auch RXR-Liganden können den PPAR γ /RXR-Komplex aktivieren. Sie vermögen die Insulinsensitivität in adipösen Mäusen wie auch in Kombination mit TZDs deren antidiabetische Aktivität zu steigern¹⁰⁷. Dies lässt vermuten, dass der PPAR γ /RXR-Komplex das molekulare Ziel für die Behandlung der Insulinresistenz darstellt.

Neben den Effekten durch die Aktivierung mittels TZDs müssen weitere Aspekte der PPAR γ -Wirkung auf die Insulinsensitivierung beachtet werden. So verändert ein Polymorphismus im menschlichen PPAR γ -Gen (Pro12Ala) marginal die PPAR γ -Aktivität und führt dadurch zu gesteigerter Insulinsensitivität¹⁰⁸ bzw. bei Individuen mit dominant negativen Allelen zu reduzierter Insulinsensitivität¹⁰⁹. Auch Mäuse mit mutationsbedingter, erhöhter PPAR γ -Aktivität zeigen Schutz vor Adipositas-assoziiertes Insulinresistenz¹¹⁰. Allerdings besitzen Mäuse mit nur einem PPAR γ -Allel eine größere Insulinsensitivität als der Wildtyp^{111;112}.

Einleitung

Folglich scheint der optimale Aktivitätsbereich für PPAR γ , in dem die förderlichen Effekte als insulinsensitivierender Transkriptionsfaktor beobachtet werden, sehr schmal zu sein¹¹³.

1.12. Das Fettgewebe als Ziel der insulinsensitivierenden Effekte von Thiazolidindionen

TZDs verbessern sowohl im Muskel als auch der Leber die Insulinsensitivität¹¹⁴. Die Rolle des Fettgewebes als endokrines Organ ebenso wie die starke Expression von PPAR γ in den Adipozyten gibt allerdings Grund zu der Annahme, dass das Fettgewebe Hauptort der TZD-Wirkung ist. In Einklang damit vermögen TZDs in Mäusen mit schwerer Lipodystrophie die Blutglukose nicht effektiv zu senken¹¹⁵. Interessanterweise führt ein muskelspezifischer PPAR γ -Knockout zu metabolischer Anomalität, obwohl PPAR γ nur sehr gering im Muskel exprimiert wird^{92;116}. Nichtsdestotrotz kehren die TZDs letztlich die Insulinresistenz in den beschriebenen muskelspezifischen PPAR γ -Knockout Mäusen um¹¹⁶. Obwohl weitere Gewebe eine Rolle spielen können, deuten die jüngsten Veröffentlichungen dennoch auf das Fett als Hauptgewebe für die TZD-Wirkung bezüglich der Insulinsensitivität hin, was untern anderem mit der Sekretion von adipozytären Faktoren begründet wird, die ihre Wirkung auf Muskel und Leber ausüben.

1.13. PPAR γ -Regulation adipozytärer Gene und Verbesserung der Insulinsensitivität

Die Ergebnisse der aktuellen Forschung zeigen, dass die TZDs die Insulinsensitivität im Fett durch Modulation diverser adipozytärer Gene und in der Folge durch die Regulation endokriner Produkte beeinflussen. Polypeptide wie TNF α und IL-6, die als inflammatorische Mediatoren an einer Insulinresistenz beteiligt sind, werden durch die TZD vermittelte PPAR γ -Aktivierung herunterreguliert¹¹⁷. Andererseits wird die Sekretion von Adipozytokinen wie Adiponektin und Leptin auf einem für die Insulinantwort ausgeglichenem und adäquatem Level gehalten¹¹⁸⁻¹²¹. Die genannten Adipozytokine sind die Hauptmediatoren der Glukosehomöostase und der Insulinsensitivität¹²². Ein weiterer Haupteffekt der TZDs ist die Reduktion von zirkulierenden freien Fettsäuren (FFA)^{107;123-125}. TZDs leisten dies zum Teil durch eine Hochregulation adipozytärer Gene, die in die Aufnahme freier Fettsäuren involviert sind, wie die Lipoprotein Lipase und das *fatty acid transport protein*^{126;127}. Ebenso sind Gene wie die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) und die Glycerol Kinase (GyK)¹²⁸⁻¹³⁰ beteiligt, welche die freien Fettsäuren im Adipozyten verwerten.

Einleitung

Am Menschen wird der beschriebene Einfluss der PPAR γ -Aktivierung durch TZDs in Form einer merklichen Verbesserung der Insulin- und Glukose-Parameter deutlich, da die Insulinsensitivität bei Typ 2 Diabetes-Patienten im gesamten Körper verbessert wird¹³¹⁻¹³⁴. Dabei scheint das Fett als Hauptexpressionsort von PPAR γ Mediator der Insulinsensitivierung zu sein¹³⁵. Durch die Aufrechterhaltung der intakten Funktion des weißen Fettgewebes schützt PPAR γ nach Aktivierung durch TZDs zudem die Leber vor zu starker Akkumulation von Lipiden und sichert dadurch die hepatische Insulinsensitivität.

Die Rolle der Skelettmuskulatur im Rahmen der Insulinresistenz ist noch nicht geklärt. Vorherige Studien haben gezeigt, dass lipodystrophe oder fettlose Tiere Insulinresistenz und Diabetes entwickeln, was vorwiegend ein Resultat von nicht ausgeglichener muskulärer Glukose disposal durch Lipidakkumulation und folgender Lipidtoxizität ist^{136;137}. Dies könnte auf eine fehlende Regulation durch adipozytäres PPAR γ zurückzuführen sein.

Somit spielt die PPAR γ -Aktivierung nicht nur eine der Rolle bei der Aufrechterhaltung der intakten Funktion des Fettgewebes. Vielmehr scheint PPAR γ protektiven Einfluss auf die Insulinsensitivität und damit auf den damit verknüpften Glukose- und Lipidstoffwechsel weiterer Gewebe zu haben.

1.14. Die Rolle von PPAR γ im inflammatorischen Prozess

PPAR γ ist im Fettgewebe stark exprimiert und reguliert nach seiner Aktivierung den adipozytären Phänotyp und Gene, die in den Fett- und Glukosestoffwechsel involviert sind. PPAR γ -Aktivierung wird zusätzlich mit positiven Effekten auf die Expression und Sekretion einer Reihe von Faktoren assoziiert, zu denen Resistin, IL-6, TNF α , PAI-1 und MCP-1 gehören¹¹⁷. In Makrophagen wird die zweitstärkste Expression von PPAR γ gefunden¹³⁸, dessen Aktivierung die Produktion von Inflammationsmediatoren unterdrückt wird¹³⁹. Auch scheint eine Aktivierung von PPAR γ positiven Einfluss auf die Funktion des Fettgewebes im Lipid- und Glukosestoffwechsel zu haben, die durch Makrophagen im Rahmen von Adipositas negativ beeinflusst sein kann¹⁴⁰. Zudem wird angenommen, dass PPAR γ den Prozess der Artherosklerose moduliert. Der Rezeptor wird bei atherosklerotischen Läsionen exprimiert und hat dort direkte antiinflammatorische Effekte in Zellen der vaskulären Wand wie dem Endothelium, vaskulären glatten Muskelzellen sowie Makrophagen^{141;142}.

Außerdem vermag der aktivierte Rezeptor die Dysfunktion der Adipozyten zu verbessern und scheint die Progression der Insulinresistenz zum Diabetes zu verhindern¹¹⁷.

Einleitung

Relativ wenig ist bisher über die Rolle von PPAR γ in Lymphozyten bekannt. Über die Expression des Rezeptors¹⁴³ scheinen die Lymphozyten in verschiedene Immunreaktionen einzugreifen^{144;145}. Ebenso wird über PPAR γ die Apoptose dieser immunologischen Zellen reguliert¹⁴⁶.

1.15. PPAR γ -aktivierende Angiotensin Typ 1 Rezeptorblocker

Angiotensin Typ 1 Rezeptorblocker (ARB) werden zur Behandlung von Bluthochdruck und kardiovaskulären Endorganschäden eingesetzt¹⁴⁷. Die Wirkung beruht auf der Blockade des AT₁-Rezeptors, wodurch die durch Angiotensin II vermittelte starke Vasokonstriktion verhindert wird^{147;148}.

Einige Mitglieder dieser Substanzklasse wurden als partielle PPAR γ -Agonisten identifiziert¹⁴⁹, die eine Insulinsensitivierung in insulinresistenten, adipösen Mäusen erreichen¹⁵⁰. Im Gegensatz zu den vollen Agonisten, den Glitazonen, ist keine begleitende Gewichtszunahme zu beobachten. Diese Selektivität der ARBs wird zurückgeführt auf eine spezifische Rekrutierung von nukleären Kofaktoren¹⁴⁹. Telmisartan wurde dabei als stärkster PPAR γ -Agonist identifiziert^{149;150}. Auf dieser Grundlage wurden in nachfolgenden klinischen Studien die metabolischen Effekte von Telmisartan eingehend untersucht¹⁵¹⁻¹⁵⁵ und zusätzlich zur Insulinsensitivierung ein positiver Einfluss auf die Serum-Lipidspiegel gefunden^{156;157}.

Neben ihrem Effekt auf das Renin Angiotensin System (RAS) entfalten die ARBs Wirkung auf metabolische Prozesse. Das Fettgewebe weist als parakrines System ein lokales RAS auf^{158;159}, welches in Hinblick auf einen Typ 2 Diabetes mellitus durch Medikation mit ARBs entsprechend positiv moduliert werden könnte⁴³. Gleichzeitig erhofft man sich neue Erkenntnisse über Behandlungsmöglichkeiten für Typ 2 Diabetes mellitus assoziierte Folgeerkrankungen¹⁶⁰⁻¹⁶⁴. Die zugrunde liegenden Mechanismen der PPAR γ -vermittelten Insulinsensitivierung durch ARBs sind generell bisher nur unzureichend charakterisiert.

1.16. Zielsetzung

Die Verbreitung der Fettleibigkeit nimmt weltweit zu und damit verbunden auch die Anfälligkeit für Insulinresistenz bis hin zum manifesten Diabetes mellitus. Die Regulation der Differenzierung und des Metabolismus von Adipozyten durch PPAR γ scheint von großer Bedeutung zu sein. PPAR γ als möglicher Angriffspunkt in der Therapie der Adipositas-assoziierten Insulinresistenz gewinnt damit zunehmend an Interesse. Besseres Verständnis der

Einleitung

biologischen Rolle der Regulierung der PPAR γ -Aktivität und der biologischen Signalwege, über die PPAR γ Adipozyten und andere Gewebe reguliert, könnte ein Weg sein, um neue Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Da Adipositas chronisch durch subklinische Inflammation begleitet wird, welche zudem mit der Entstehung einer Insulinresistenz und einen Diabetes mellitus assoziiert wird, gewinnt die Aufklärung der zugrunde liegenden Prozesse an Bedeutung. Hier scheinen lokale Entzündungsprozesse im Fettgewebe im Mittelpunkt der Pathogenese zu stehen. Die Bedeutung von Makrophagen bei diesen Prozessen wurde kürzlich beschrieben, dahingegen ist die Funktion von Fettgewebs-Lymphozyten noch ungeklärt. PPAR γ stellt hier eine wesentliche Schnittstelle zwischen Fettgewebe-Makrophagen-und Lymphozyten dar.

Ein gute Möglichkeit, die Pathogenese dieser verknüpften Erkrankungen zu beschreiben, stellt das Tiermodell, speziell das bereits etablierte Adipositasmodell mit männlichen C57BL/6J Mäusen dar⁶⁰. Denn die Komplexität und Verknüpfung der entstehenden der Inflammation, Fettleibigkeit und Adipositas kann nicht mehr mit einfachen Zellmodellen beschrieben werden.

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass durch gezielte pharmakologische PPAR γ -Regulierung der Entstehung einer chronischen Inflammation in einem die Adipositas imitierenden, induzierten Hochfettmodell entgegengewirkt werden kann. Unklar ist auch, welche der genannten Dysfunktionen zeitlich zuerst auftritt und damit die anderen zu fördern vermag.

Die Ziele dieser Arbeit werden damit wie folgt formuliert:

1. Nachweis einer Beteiligung inflammatorischer Zellen insbesondere von Makrophagen/ Lymphozyten an Entstehungsprozessen der IR durch Fettleibigkeit.
2. Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Entstehung von IR und der Bedeutung inflammatorischer Zellen.
3. Aufklärung der Fähigkeit von TZDs und PPAR γ -aktivierenden ARBs, einer Inflammation und Insulinresistenz im induzierten Adipositasmodell entgegenzuwirken.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Laborgeräte

ABI Prism [®] 7000, Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich, Hanau
pH-Meter pH211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Eppendorf Zentrifuge P 2810	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Leica DM LB2	Leica Camera AG, Solms
Beckmann Spektralphotometer DU [®] 530	Beckmann, München
MyCycler, iCycler	BioRad GmbH, München
Mx 3000 P	Stratagene, Amsterdam Zuidoost
Brutschrank HERA cell 150	Heraeus Instruments, Hanau
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Zellkulturartikel BD	Falcon, Heidelberg
NMR-Gerät Minispec MQ10	Bruker, Karlsruhe
Glucometer	Bayer, Leverkusen
Microm HM 325	Microm, Walldorf
Shandon Citadel 1000	Thermo Electronic Corp., Piräus, Griechenland
Einbettstation Microm EC 350-1 und -2	Microm, Walldorf

2.1.2. Chemikalien

Zitronensäure	Sigma, Taufkirchen
KCl	Roth GmbH, Karlsruhe
Tris HCl	Roth GmbH, Karlsruhe
Mg ²⁺	Roth GmbH, Karlsruhe
dNTP	Sigma, Taufkirchen
SYBR Green I	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Sigma, Taufkirchen
Tween20	Roth GmbH, Karlsruhe

Material und Methoden

ROX	Sigma, Taufkirchen
Ethanol 100%	J.T Baker, Deventer, NL
Xylol	J.T Baker, Deventer, NL
Paraffin I	Microm, Walldorf
Paraffin II	Microm, Walldorf
Isopropanol	J.T Baker, Deventer, NL
Chloroform	J.T Baker, Deventer, NL
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt
TRIZOL [®] Reagent	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3. Puffer und Lösungen

Zitronensäurepuffer

pH 6

Zitronensäure · H ₂ O	2,1 g
Aqua dest.	Ad 1000 ml

SYBR[®] Green I	Finale Konzentration	Für 10 ml
House Mix		
H ₂ O, Ultra Pure		8,50 ml
KCl, 2.5 M	50 mM	400 µl
Tris-HCl, 1M	10 mM	200 µl
Mg ²⁺ -solution, 1M	6.5 mM	130 µl
dATP, 100 mM	0.2 mM	40 µl
dCTP, 100 mM	0.2 mM	40 µl
dGTP, 100 mM	0.2 mM	40 µl
dTTP, 100 mM	0.2 mM	40 µl
SYBR [®] Green I	0.01 % (v/v)	2 µl
DMSO	2 % (v/v)	400 µl
Tween20	0.005 % (v/v)	1 µl
ROX-Solution	1 % (v/v)	200 µl

Material und Methoden

2.1.4. Antikörper Immunhistochemie

Rat Anti Human/ Mouse CD3	AbD Serotec, Düsseldorf
Rat Anti Mouse MCP-1	R&D Systems, Wiesbaden
Rat Anti Mouse F4/80	AbD Serotec, Düsseldorf
Polyclonal Rabbit Anti-Rat	Dako GmbH, Hamburg
Rat Anti Mouse Mac-3	BD Biosciences, Heidelberg
Immunoglobuline/HRP	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.5. Materialien Tiermodell

Insulin Novolin	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz
Glukose	Merck, Darmstadt
Niedrig Fett Diät	Altromin GmbH, Lage
Hoch Fett Diät	Research Diets, New Brunswick, NJ, USA

2.1.6. Tiere

männliche C57BL/6J Mäuse	Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln
--------------------------	----------------------------------

2.2. Methoden

2.2.1. Tierversuche

Es wurden männliche C57BL/6J Mäuse (Alter 4-6 Wochen, n=180 Tiere) für den Versuch verwendet. Zur Grundcharakterisierung wurde eine randomisierte Subgruppe (n=10) zunächst metabolisch charakterisiert. Der metabolischen Phänotypisierung, welche die Analysen der Gewichte, eine NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Messung zur Bestimmung der Körperanteile an Muskel, Fett und freiem Wasser sowie eine Punktion retrobulbärer Gefäße zur Blutentnahme umfasste, folgten ein Insulin- sowie ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ITT & ipGTT). Anschließend wurde diese erste Subgruppe zur Organentnahme zwecks basaler Genexpressionanalyse getötet. Ein Teil der Organproben wurden zur histologischen Analyse der Zellmorphologie herangezogen. Im Fettgewebe wurde

Material und Methoden

das Ausmaß der Fettgewebsinflammation einschließlich Zytokinexpression und Lymphozyten- sowie Makrophagen-Akkumulation analysiert.

Die Tiere der übrigen Subgruppen wurden für die Zeit des Tiermodells mit einer fettreichen Diät (60% des Energiegehaltes aus Fetten, Altromin, Lage, n=90 Tier) paarweise gefüttert. Nach 5 und 10 Wochen wurden sequentiell die Hochfett-diätgruppen (Unbehandelt (Vehikel), Rosiglitazon 10mg/kg/d, Telmisartan 3mg/kg/d, randomisiert n=10 Tiere/Gruppe) metabolisch phänotypisiert und anschließend die Organe entnommen.

Eine Normaldiätgruppe von n=10 Tieren erhielt Niedrigfettfutter (10% des Energiegehaltes aus Fetten, Altromin, Lage, n=10 Tiere) und wurde als Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer mitgeführt, wobei Körpergewicht und Nahrungsaufnahme dokumentiert wurden. Nach 10 Wochen wurde diese Gruppe ebenfalls metabolisch charakterisiert und anschließend zur Organentnahme getötet.

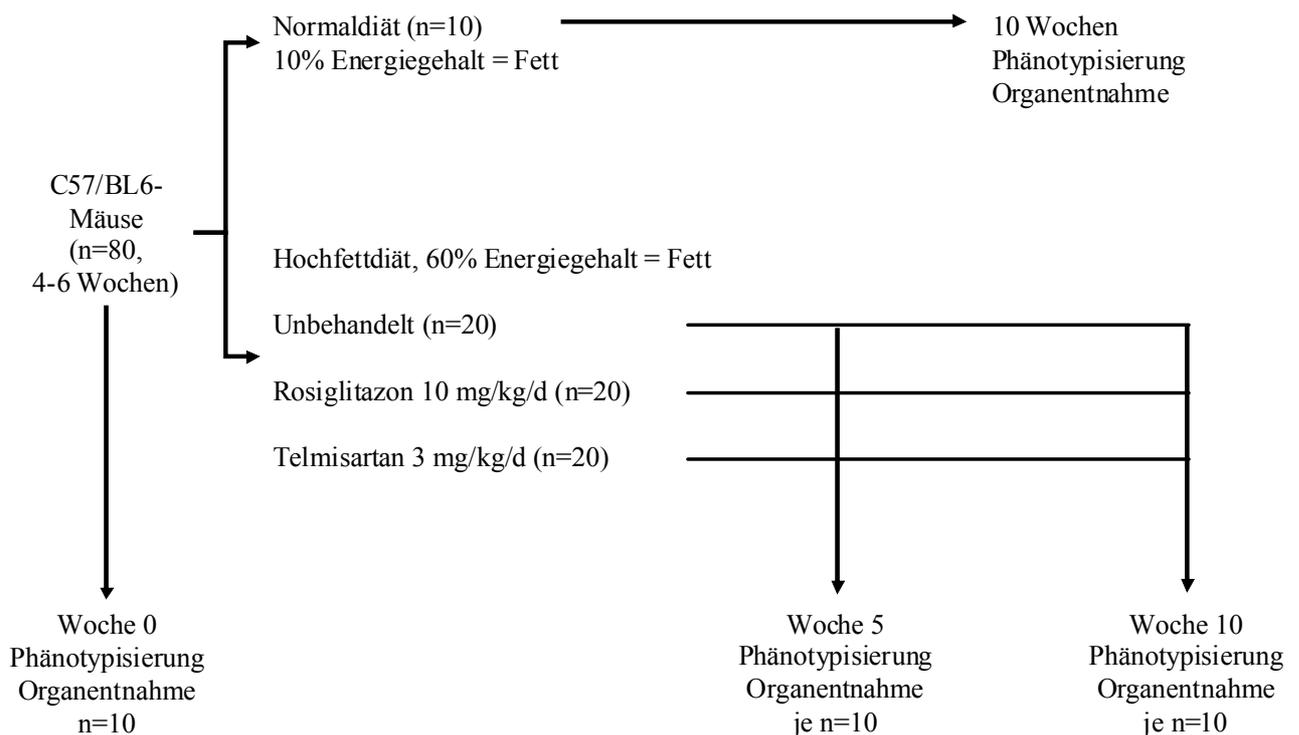


Abb. 2.1: Aufbau des Tiermodells

Um statistisch gesicherte Aussagen bezüglich der Parameter der Insulinsensitivität und der Fettgewebsentzündung treffen zu können, waren in diesem diät-induzierten, adipösen Mausmodell eine Tierzahl von mindestens 10 pro Versuchgruppe/Behandlungsgruppe

Material und Methoden

notwendig^{165;166}. Die einzelnen Gruppen und der Versuchsaufbau sind aus Abbildung 1 ersichtlich. Die Dosierungen von Rosiglitazon und Telmisartan sind der Literatur entnommen^{167;168}. Die Substanzen wurden oral über Schlundsonde im 24 h-Rhythmus verabreicht.

2.2.2. Metabolische Phänotypisierung

Anschließend an eine nächtliche Fastenperiode wurden mittels NMR-Messung die Körperanteile Muskel, Fett und freies Wasser bestimmt.

Zur metabolischen Charakterisierung wurde ein Glukosetoleranztest durchgeführt, wozu den Tieren nach nächtlicher Nüchternphase und initialer Blutentnahme (Zeitpunkt 0) 1 g/kg Glukose intraperitoneal verabreicht wurde. Jeweils nach 15, 30, 60, 90 und 120 min wurde über Punction der Schwanzvene Blut zur Blutglukosebestimmung entnommen. Hierfür musste das Tier nicht narkotisiert werden. In der jeweils darauffolgenden Woche wurde der Insulintoleranztest zur direkten Bestimmung der Insulinsensitivität durchgeführt. Hierfür wurde 0,25 U/kg Insulin intraperitoneal appliziert und nach 0, 15, 30, 60 und 120 min Blut aus dem Schwanz zur Glukosebestimmung gewonnen. Abschließend wurden die Tiere zur Organentnahme getötet.

2.2.3. Bestimmung der Körperzusammensetzung

Zur Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde mittels *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Messung der Anteil an Muskel und Fett in den Mäusen bestimmt. Hierzu wurden die Tiere einzeln im NMR-Gerät Bruker's Minispec MQ10 arretiert und die Körperzusammensetzung während der 30sekündigen Messung bestimmt.

2.2.4. Immunhistochemie

Nach Entnahme von Fettgewebsproben wurden diese anschließend in 10%ige Formalinlösung überführt und 24 h bei RT inkubiert. Es folgt die Dehydrierung der Proben nach folgendem Zeit-Lösungsmittel-Profil:

Material und Methoden

Lösungsmittel	Zeit in Stunden [h]
70% Ethanol	1
96% Ethanol	2
3·100% Ethanol	2
Aceton	0,5
Paraffin I	2
Paraffin II	2

Das so paraffinisierte Fettgewebe wurde nach Aushärtung in Einbettkassetten als 3 µm dünne Schnitte auf Superforst-Plus-Objektträger über 12 h im Brutschrank bei 60°C fixiert. Es folgte die immunhistologische Aufarbeitung beginnend mit der Entparaffinisierung nach folgendem Zeit-Lösungsmittel-Profil:

Lösungsmittel	Zeit in Minuten [min]
2· Xylol	10
100% Ethanol	5
96% Ethanol	3
70% Ethanol	1
50% Ethanol	1

Zur Antigenfreilegung wurden die Schnitte im Citratpuffer bei pH 6 10 min im Dampftopf erhitzt, danach für 10 min in PBS abgekühlt. Es folgte die Blockierung mit Peroxidase Blockierungsreagenz für 8 min, danach mit Avidin und Biotin Blockierungsreagenz für je 15 min. Die Schnitte wurden zwischen den einzelnen Schritten jeweils 3x2 min in PBS gewaschen. Schließlich folgte die Inkubation mit Primärantikörpern für 90 min bei RT bzw. 12 h bei 4°C. Nach einem weiteren Waschschrift von 3x2 min wurde der Sekundärantikörper mit dem primären über 30 min bei RT gekoppelt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Horseradish Peroxidase (HRP)-gelabelte Zweitantikörper mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Chromogen-Reagenz entwickelt. Der Peroxidase wird bei dieser Farbreaktion Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten, gefolgt von der Gegenfärbung für 15 sec mit Hämalaun und Konservierung durch Aquatex unter Deckglas konserviert. Anschließend wurden die Färbungen unter dem Lichtmikroskop qualitativ ausgewertet.

2.2.5. Gewebekomogenisierung und RNA-Isolation

Die Homogenisierung der Gewebe erfolgte mittels 0,5 ml PeqLab[®]-Lösung pro Probe, die jeweils 2 min mit einem Homogenisator zerkleinert wurde. Einer Inkubationszeit von 5 min bei RT folgte die Zugabe von 100 µl Chloroform. Der Ansatz wurde 15 s geschwenkt und weitere 10 min inkubiert. Der Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C über 5 min schloss sich die Überführung der oberen Phase in 250 µl Isopropanol an. Nach 15 sekündigem Schwenken wurde für weitere 10 min inkubiert, danach 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Isopropanolphase abgenommen, das Pellet zweimal mit Ethanol 75% gewaschen und nach fünfminütigem Trocknen bei 37°C in RNase-freiem Wasser gelöst.

2.2.6. RNA- & DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde durch Messung der Optischen Dichte (*optical density* = OD) bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge in einem UV-Spektrophotometer bestimmt. Die Absorption bei 260 nm entsprach der Gesamtmenge der Nukleinsäuren (RNA, DNA) in der Probe. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, was dem Absorptionsmaximum der Proteine entsprach. Durch Bestimmung des Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ließ sich die Reinheit der Proben ermitteln. Eine reine RNA-Lösung sollte einen Wert von >1,8 aufweisen.

Vor der Messung wurde die Probe verdünnt, woraus sich der Verdünnungsfaktor (VF) ergab, welcher in die Konzentrationsberechnung Eingang fand. Diese erfolgte mit der nachstehenden Formel:

$$c = A_{260} \cdot 40 \cdot VF \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

A₂₆₀ Absorption bei 260 nm

40 RNA-spezifischer Faktor, eine Lösung, die 40 µg/ml doppelsträngige RNA enthält, besitzt bei Verwendung einer 1 cm dicken Quarzküvette eine OD von 1

50 DNA-spezifischer Faktor, eine Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige RNA enthält, besitzt bei Verwendung einer 1 cm dicken Quarzküvette eine OD von 1

VF Verdünnungsfaktor

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung.

2.2.7. cDNA-Synthese

Um die Expression spezifischer RNA quantifizieren zu können, bedarf es der Umschreibung in DNA. Das Prinzip dieser Umwandlung ist die reverse Transkription (RT). Die durch diesen Prozess entstehende DNA wird als cDNA bezeichnet, da sie komplementär zur RNA-Sequenz ist.

Für eine nachfolgende *real-time* PCR wurden einheitliche Mengen cDNA je Probe verwendet, so dass sich ein typischer RT-Ansatz wie folgt zusammensetzte:

	Eingesetzte Menge
RNA	1 µg
Random-Hexamer-Primer (500ng/ µl)	1 µl
Ultra-Pure-Water	ad 10 µl
M-MLV-Puffer	5 µl 5fach
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
-Inhibitor (40 U/µl)	0,75 µl
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
Ultra-Pure-Water	ad 25 µl

Die RT verläuft nach folgendem Temperaturprotokoll:

	Thermal-Zeit-Profil
Inkubation von RNA und Random-Hexamer-Primer	5 min bei 70°C
Reverse Transkription	60 min bei 37°C
Kühlung bis zur Probenentnahme	4°C

Nach erfolgter RT wird der Ansatz auf 10 ng/µl revers-transkribierte RNA verdünnt.

2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion

Real-time-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf einem Zyklus, welcher sich in drei Schritte unterteilt. Der initialen Denaturierung zur Trennung der DNA-Stränge folgt der Annealingschritt zur Hybridisierung der Primer an die *single-stranded* DNA (ssDNA). Im dritten Schritt, der Elongation, werden die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert, so dass die DNA im Anschluss wieder doppelsträngig vorliegt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus kommt es schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Menge.

Zur Quantifizierung wurde die TaqMan[®]- und SYBR[®] Green I-Systeme eingesetzt. Dabei werden in die vermehrte DNA-Menge ssDNA-Fragmenten, an die ein Fluorochrom gekoppelt ist, eingebaut und so eine Quantifizierung möglich.

Die für die *real-time* RT-PCR verwendete Sonden- und Primersequenzen sind im Folgenden aufgelistet. Assays on demand (AoD) sind vorgefertigte Primer-Sonden-Gemische, deren Sequenzen durch die herstellende Firma nicht preisgegeben werden.

Primer bzw. Sonde	Sequenz	Assay ID
18 S forward	ACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG	
18 S reverse	TTAATGAGCCATTCGCAGTTTC	
MPC-1	AoD	Mm00441242_m1
F4/80	AoD	Mm00802529_m1
SDF-1 α	AoD	Mm00445552_m1
CD3 γ	AoD	Mm00438095_m1

Das Temperaturprofil ist für alle durchgeführten PCRs resp. *Assays On Demand* der Firma Applied Biosystems identisch. An zwei Vorinkubationsschritte von 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C, die unter anderem der Aktivierung der Taq-Polymerase dienen, schließen sich 40 Zyklen mit 15 sekundigen Denaturierungsschritten bei 95°C und einminütigen Inkubationsphasen bei 60°C für *Annealing* und *Elongation* an.

Das optimierte Thermalprofil auf Grundlage der SYBR[®] Green I-Detektion startet mit 5 min bei 95°C. Es schließen sich 40 und mehr Zyklen an, bestehend aus jeweils 15 sekundigen Denaturierungsschritten bei 95°C sowie 30 sekundigen Inkubationsphasen bei 60°C und 72°C für *Annealing* und *Elongation* an. Jeder Zyklus wird durch die Fluoreszenzmessung abgeschlossen. Den Schluss bildet ein Temperaturgradient beginnend bei 50 °C bis 95°C, mit

Hilfe dessen eine Dissoziationskurve aufgenommen wird, die der Überprüfung der Amplifikation dient.

Prinzip der Quantifizierung

Bei der Quantifizierung der isolierten RNA mittels *real-time* PCR wird die Kinetik der PCR-Reaktion genutzt. Dabei wird das nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenzsignal gegen die Zykluszahl aufgetragen. Anhand dieser Darstellung wird zunächst die Hintergrundaktivität bestimmt und ein Schwellenwert (*Threshold*) festgelegt. Dies geschieht durch Ausnutzung der Kinetik der PCR-Reaktion, da in den frühen PCR-Zyklen eine weitgehende exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente stattfindet. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenzsignale einer Probe so stark sind, dass sie diese Schwelle erreichen, wird als CT-Wert (*Cycle of Threshold*) bezeichnet und bietet die Grundlage der weiteren Quantifizierung. Die Wahl des Schwellenwerts sollte dabei so erfolgen, dass die CT-Werte jeweils im Bereich der exponentiellen Zunahme des PCR-Produktes liegen.

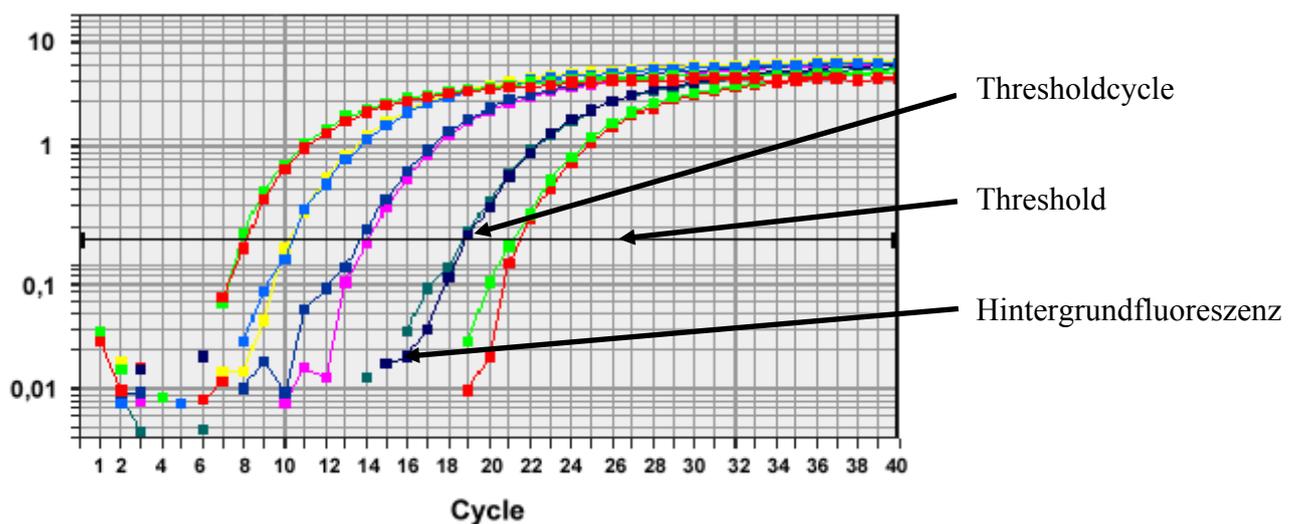


Abb. 2.2: Halblogarithmische Darstellung einer *real-time* Quantifizierung

Die TaqMan[®]- als auch die SYBR[®] Green I-PCR liefert in der oben beschriebenen Durchführung die CT-Werte zu den einzelnen Proben. Anhand dieser Werte ist es möglich, relative Aussagen über die Transkripte der gemessenen Gene zu treffen.

2.2.9. Graphische Auswertung

Die graphische Auswertung der metabolischen Daten erfolgte durch das Programm ImageJ Version 1.38.

2.2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Version 14.0. Die Daten wurden je nach Einflussvariablen mit Hilfe von t-Test bzw. ANOVA (post-hoc Bonferoni) auf Signifikanz überprüft. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant definiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM präsentiert.

3. Ergebnisse

3.1. Hochfett-induzierte Adipositas und Fettgewebsinflammation

3.1.1. Körpergewicht

Wie aus Abbildung 3.1 zu ersehen ist, erreichte das Körpergewicht der HFD-Tiere nach vier Wochen auf Hochfettdiät einen signifikanten Unterschied zur LFD-Gruppe. Die Signifikanz dieser Differenz wurde über den restlichen Zeitraum beibehalten und die HFD-Tiere erreichten bei Abschluss der Untersuchung nach 10 Wochen ein Körpergewicht von durchschnittlich $30,4 \pm 2,2$ g, die LFD-Gruppe $26,4 \pm 0,7$ g ($p < 0,05$).

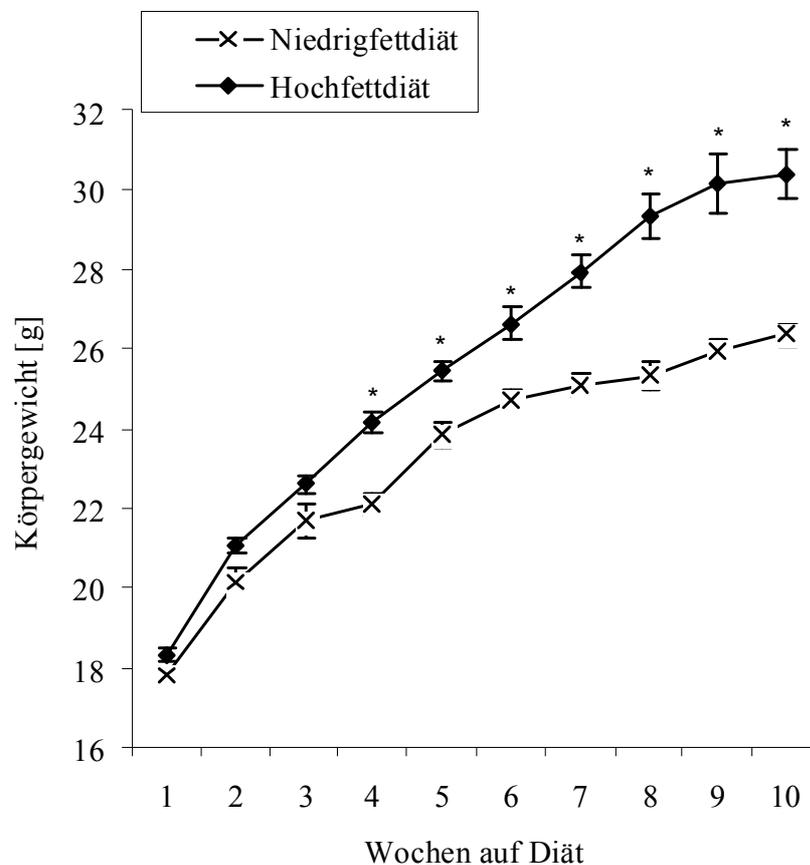


Abb. 3.1.1.: Körpergewichtsentwicklung \pm SEM auf Normal- und Hochfettdiät. (* $p < 0,05$ HFD-Gruppe)

Man kann also schlussfolgern, dass durch die verfütterte Hochfettdiät die Zunahme des Körpergewichtes gegenüber der Normaldiät beschleunigt wurde.

3.1.2. Körperzusammensetzung

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung erfolgte, um den Einfluss der Hochfettdiät auf die Anteile von Fett bzw. Muskelmasse zu untersuchen.

Die Verteilung in den Kontrolltieren blieb über den beobachteten Zeitraum konstant bei 23,5% \pm 3,3 Fettanteil bzw. 76,5% \pm 5,6 Muskelanteil. Die Vermessung der Hochfettgruppe ergab eine ab Woche 5 signifikante Zunahme der Fettmasse (Abb. 3.1.2), die bis Woche 10 auf 32,1% \pm 5 zunahm ($p < 0,05$). Die Muskelmasse nahm entsprechend auf 67,9% \pm 5,0 ab, erreicht jedoch zu keinem Zeitpunkt Signifikanz.

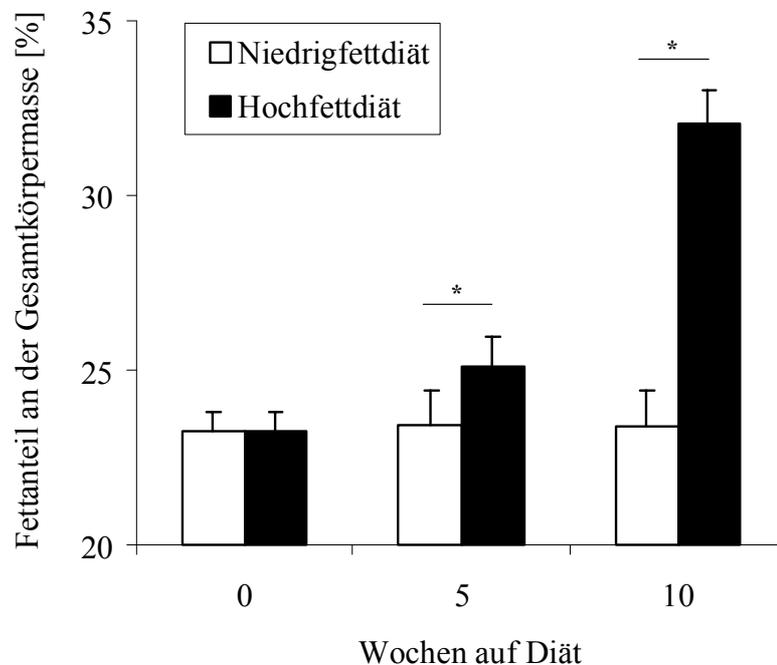


Abb. 3.1.2: Entwicklung des Fettmassenanteils \pm SEM auf Normal- und Hochfettdiät (* $p < 0,05$).

Die Messdaten der Körperzusammensetzung zeigen also, dass durch die Hochfettdiät die anteilige Zunahme des Fettgewebes gegenüber der Normaldiät signifikant verstärkt wurde.

3.1.3. Metabolische Charakterisierung

3.1.3.1. Glukosetoleranz

Die Bestimmung der Glukosespiegel nach Glukosegabe wurde durchgeführt, um den Einfluss der Hochfett diät auf die Glukoseintoleranz (GIT) zu untersuchen.

Mittels ipGTT wurde die Veränderung der GIT gegenüber den Normaldiät-Tieren ermittelt, für die der ipGTT keine Veränderung in der GIT über den beobachteten Zeitraum ergab. Die unbehandelte HFD-Gruppe wurde bereits nach Woche 5 glukoseintolerant. Dieser Anstieg wurde durch die Berechnung der AUC aus den gemessenen ipGTT-Kurven deutlich, was sich durch einen signifikanten Anstieg des relativen Wertes auf $162\% \pm 13$ ($p < 0,01$ vs. Woche 0) zeigte (Abb. 3.1.3.1.2). Nach 10 Wochen stieg die relative GIT auf $174\% \pm 6$ ($p < 0,01$ vs. Woche 0) an.

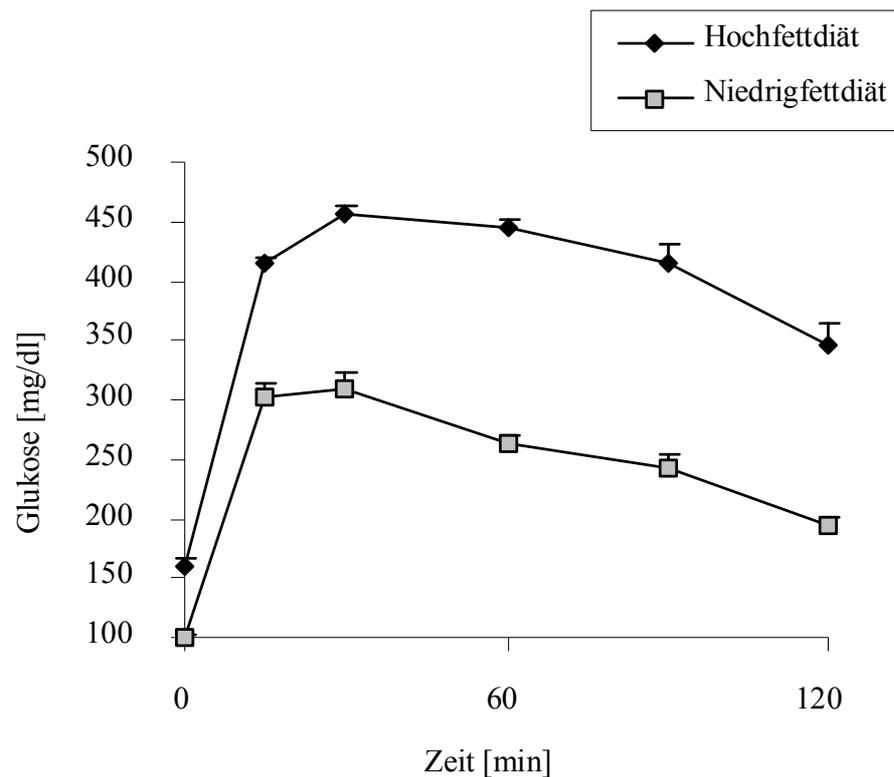


Abb. 3.1.3.1.1: Entwicklung der Glukoseintoleranz nach 5 Wochen auf HFD.

Ergebnisse

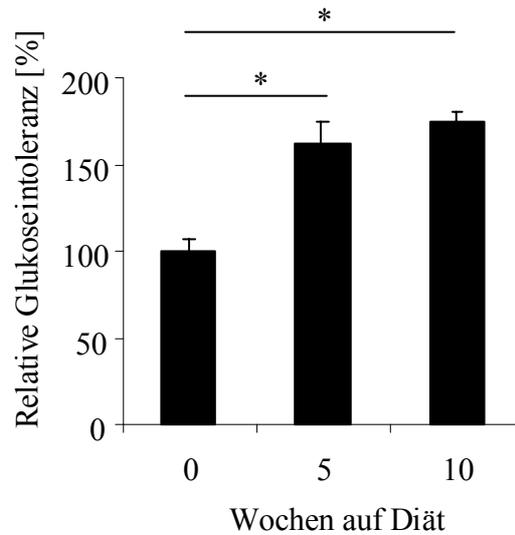


Abb. 3.1.3.1.2: Entwicklung der Glukoseintoleranz zwischen 0 und 10 Wochen auf HFD.

Die Daten dieses Abschnitts zeigen, dass durch die HFD bereits nach 5 Wochen eine Glukoseintoleranz induziert wurde.

3.1.3.2. Insulinsensitivität

Die Bestimmung der Glukosespiegel nach Insulingabe erfolgte, um den Einfluss der Hochfettdiät auf die Insulinsensitivität zu untersuchen.

Die relative Insulinsensitivität der Normaldiät-Tiere blieb über den gesamten Zeitraum auf nahezu unverändertem Niveau.

Für die HFD-Gruppe wurde eine signifikante Abnahme der Sensitivität gegenüber den LFD-Tieren bereits nach Woche 5 auf $85\% \pm 10$ ($p < 0,05$) beobachtet, die bis Woche 10 bis auf $70\% \pm 7$ absank ($p < 0,01$).

Ergebnisse

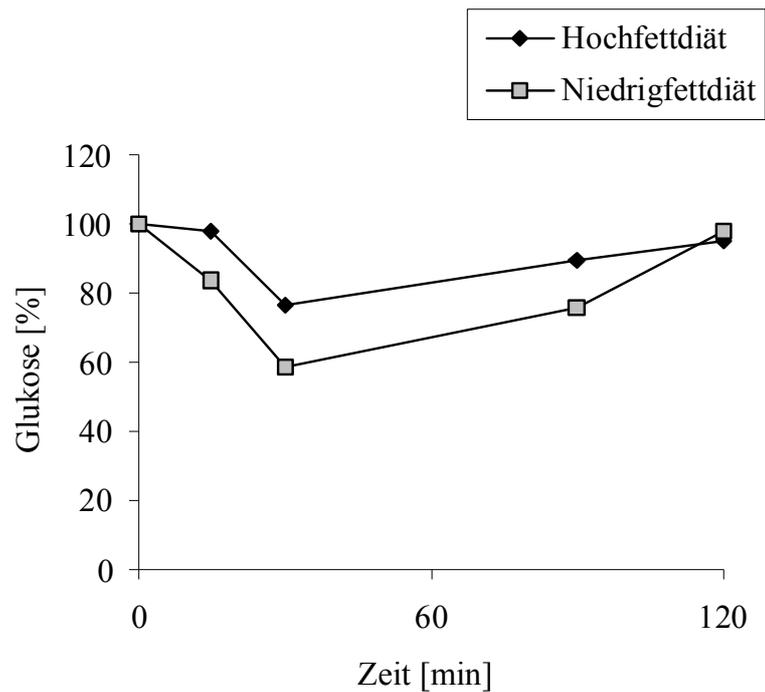


Abb. 3.1.3.2.1: Entwicklung der Insulinresistenz nach 5 Wochen auf HFD.

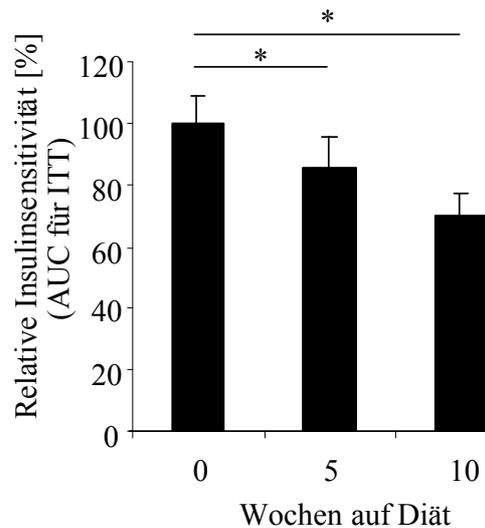


Abb. 3.1.3.2.2: Entwicklung der Insulinresistenz zwischen 0 und 10 Wochen auf HFD.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass durch die HFD bereits nach 5 Wochen die Insulintoleranz signifikant gesenkt wurde.

3.1.4. Immunhistochemische Analyse der Fettgewebsinflammation

Mit immunhistologischen Färbungen wurden qualitativ die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und die Infiltration inflammatorischer Zellen im Fettgewebe in Korrelation zur Hochfettdiät untersucht.

3.1.3.3. MAC-3

Bei der immunhistologischen Detektion von MAC-3 konnte erst in Woche 10 eine Ansiedlung von Makrophagen gefunden werden, während von Woche null bis fünf keine Infiltration zu beobachten war.

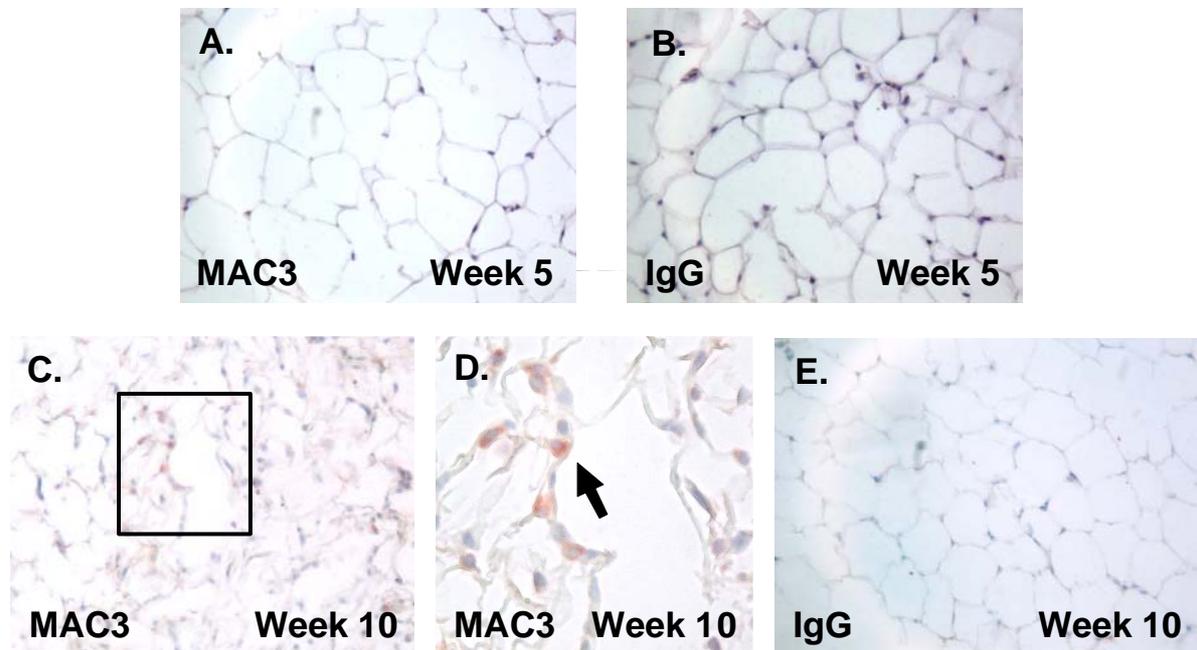


Abb. 3.1.3.3: Immunhistochemische Färbung mit MAC-3-Antikörper. Die detektierten Antigene zeigen rote Färbung im epididymales Fett in Woche 10 auf HFD (C; D: hohe Auflösung). B und E sind Negativkontrollen.

3.1.3.4. CD3

Bei der immunhistologischen Detektion von CD3 im Fettgewebe konnte in Woche 0 keine Ansiedlung von T-Lymphozyten gefunden werden, während ab Woche fünf auf HFD Infiltration zu beobachten war. Die Einwanderung der T-Lymphozyten stieg bis Woche 10 an.

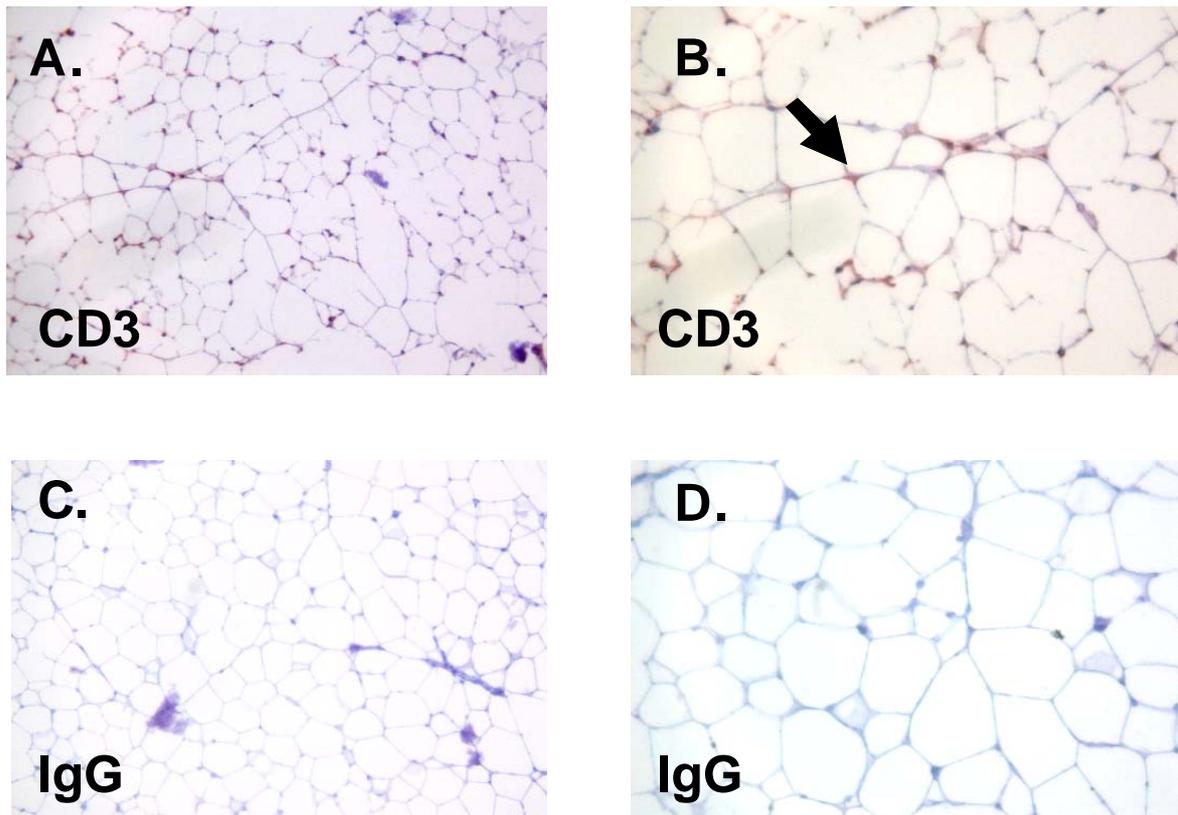


Abb. 3.1.3.4: Immunhistochemische Färbung mit CD3-Antikörper. Die detektierten Antigene zeigen rote Färbung im epididymales Fett in Woche 5 auf HFD (A; B: hohe Auflösung). C und D sind Negativkontrollen.

3.1.5. RNA-Expressionsanalyse im Fettgewebe

Um den Einfluss der Diät und Gewichtszunahme auf den Status der Inflammation im Fettgewebe in Korrelation zur Hochfettdiät zu untersuchen, wurden die Inflammations-Marker MCP-1, F4/80, CD3 sowie das Chemoattractant SDF-1 α quantifiziert. Dazu wurden den nach 0, 5 und 10 Wochen getöteten Tieren Fettgewebeproben entnommen und zur Quantifizierung mittels *real time* PCR aufbereitet. Zur einheitlichen Auswertung des Expressionsmusters wurde der Mittelwert der Nullkontrollwerte gleich 1 gesetzt und die Mittelwerte der HFD-Gruppe als ein relatives Vielfaches dieses Ausgangswertes dargestellt.

3.1.5.1. MCP-1

Ergebnisse

Das Chemokin MCP-1 erreichte in der HFD-Gruppe ein Minimum der relativen Expression von $0,32 \pm 0,1$ in Woche 5, gefolgt von einem Anstieg auf das 4,4fache $\pm 0,2$ des Ausgangswertes in Woche 10. Damit stieg die Expression im beobachteten Zeitraum signifikant an ($p < 0,01$).

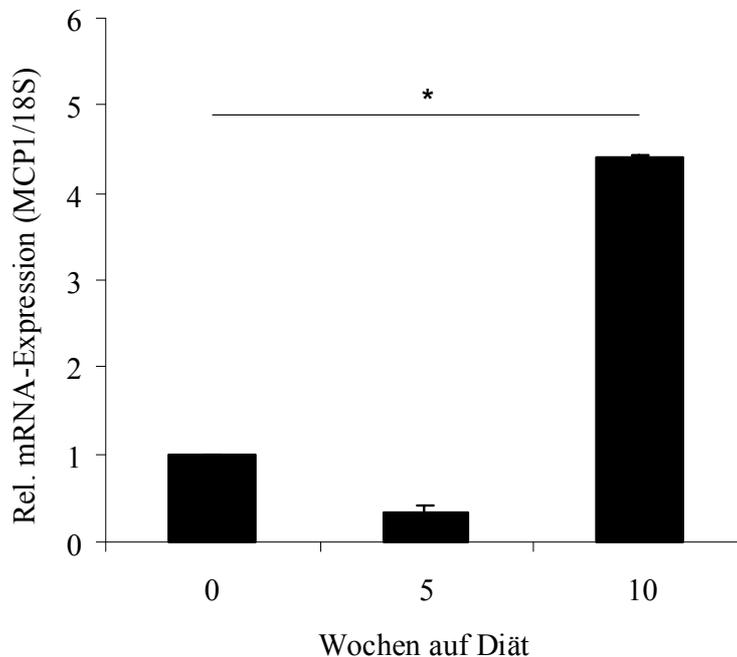


Abb. 3.1.5.1: Relative MCP-1-mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe auf HFD zwischen Woche 0 und 10 (* $p < 0,05$).

Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression eines wesentlichen Chemokins der Makrophagen-Infiltration unter Hochfettdiät ab Woche 10 signifikant anstieg.

3.1.5.2. F4/80

Für die relative Expression des Makrophagenmarkers F4/80 wurde bei den HFD-Tieren ein Absinken bis Woche 5 auf $0,4 \pm 0,1$ beobachtet, dem ein Anstieg der Expression auf das signifikant 5,2fache $\pm 0,2$ ($p < 0,05$) folgte.

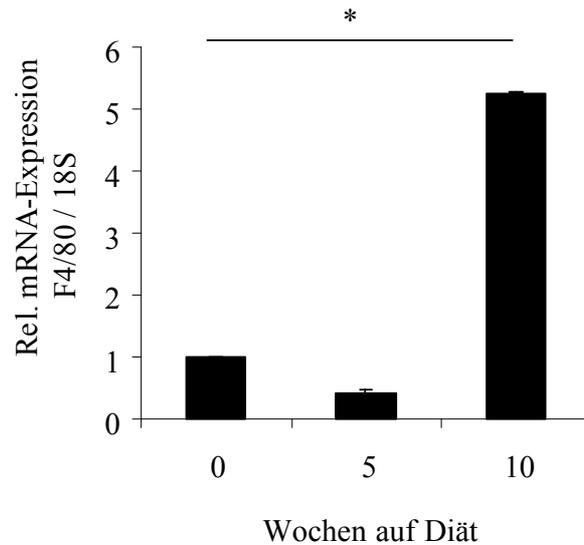


Abb. 3.1.5.2: F4/80-mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe auf HFD zwischen Woche 0 und 10 (* $p < 0,05$).

3.1.5.3. SDF-1 α

Das T-Zell spezifische Chemoattractant SDF-1 α wurde quantifiziert, um ein zusätzlichen Parameter der Lymphozytenmigration in einem frühen Stadium analysieren.

Für die relative Expression von SDF1- α wurde bei den HFD-Tieren ein Anstieg bis Woche 5 auf das 2,6fache $\pm 0,1$ beobachtet, dem eine nach 10 Wochen signifikante Expression auf das 3,2fache $\pm 0,1$ ($p < 0,05$) folgte.

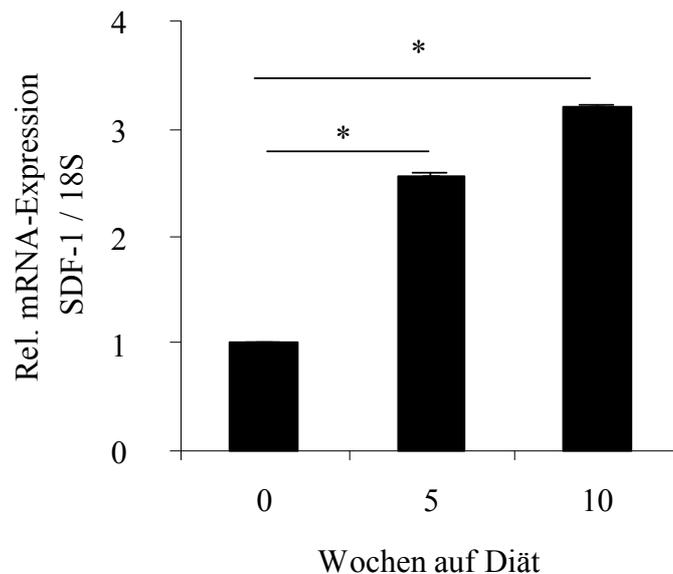


Abb. 3.1.5.3: SDF1- α -mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe auf HFD zwischen Woche 0 und 10 (* $p < 0,05$).

3.1.5.4. CD3 γ

Zur Quantifizierung der immunhistochemisch detektierten Fettgewebs-Lymphozyten, wurde im epididymalen Fettgewebe die mRNA Expression von CD3 γ vermessen.

In der HFD-Gruppe wurde eine Zunahme der Expression des Lymphozytenmarkers CD3 γ auf das 4,3fache \pm 1,3 in Woche 5 gemessen, der in Woche 10 ein weiterer Anstieg auf das 6,8fache \pm 1,2 folgte. Nach 10 Wochen war die Expression signifikant erhöht ($p < 0,05$).

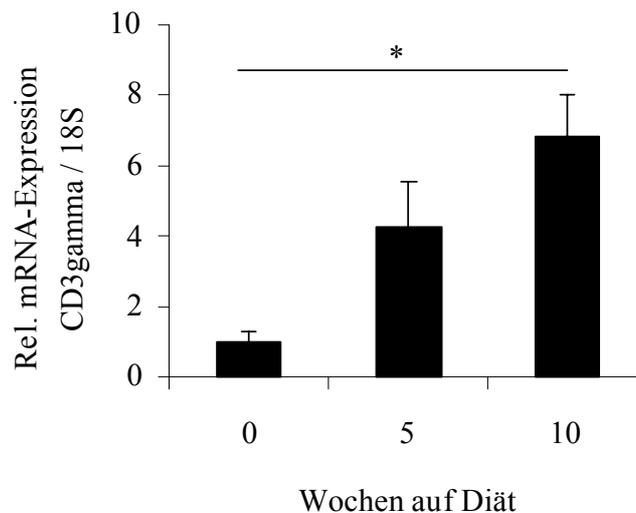


Abb. 3.1.5.4: CD3 γ -mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe auf HFD zwischen Woche 0 und 10 (* $p < 0,05$).

3.2. Pharmakologische PPAR γ -Aktivierung und Fettgewebsinflammation

3.2.1. Körpergewicht

Nach 10 Wochen auf Hochfettdiät wog ein Tier der Rosiglitazon-Gruppe durchschnittlich 27,2 \pm 1,2 g. Der relative Gewichtsunterschied zwischen der mit Rosiglitazon behandelten und der HFD Gruppe betrug nach 5 Wochen 2,1 \pm 0,8 %, war ab Woche 6 signifikant unterschiedlich und nahm bis Woche 10 auf 10,5 \pm 1,1 % zu ($p < 0,05$, in Abbildung 3.2.1 nicht dargestellt). Der Gewichtsunterschied zwischen der mit Telmisartan behandelten und der HFD Gruppe war bereits ab Woche 3 signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$) und vergrößerte sich von Woche 5 mit 8,8 \pm 1,1 % auf 19,5 \pm 1,0 % in Woche 10.

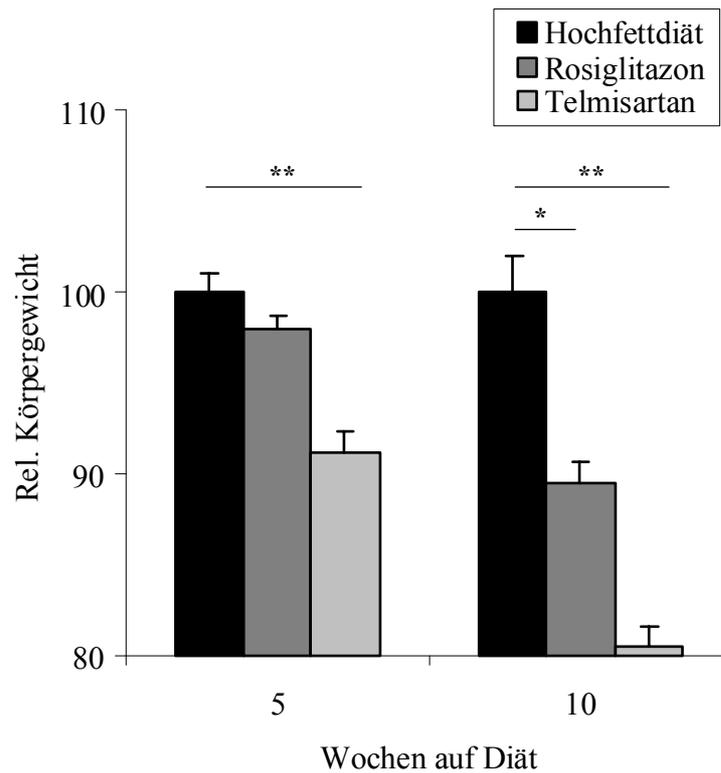


Abb. 3.2.1.: Körpergewichtsentwicklung \pm SEM auf HFD sowie auf HFD plus Rosiglitazon- bzw. Telmisartan-Behandlung (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass durch die zusätzlich zur HFD verabreichte Medikation von Rosiglitazon bzw. Telmisartan in einer geringeren Gewichtszunahme der Tiere resultierte.

3.2.2. Körperzusammensetzung

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung erfolgte, um den Einfluss der Hochfett-diät plus Medikationen auf die Anteile von Fett zu untersuchen.

Im Gegensatz zur HFD-Gruppe wurde bei der mit Rosiglitazon behandelten HFD-Gruppe nach 10 Wochen ein geringerer Anstieg des Fettanteils gefunden (Abb. 3.2.2). Hier nahm der zur HFD-Gruppe relative Fettanteil (bezogen auf die Gesamtkörpermasse) nach 5 Wochen um 4,4 % \pm 0,7 zu, lag nach 10 Wochen jedoch um 8,0% \pm 1,3 niedriger ($p < 0,05$). Diese Unterschiede sind wahrscheinlich durch das Pair-Feeding Protokoll erklärbar und weisen daraufhin, dass die sonst zu beobachtende Gewichtszunahme unter Glitazontherapie wesentlich auch durch Unterschiede in der Futteraufnahme (Hyperphagie) bedingt ist.

Ergebnisse

Die Fettmasse der mit Telmisartan behandelten Tiere überschritt zu keinem Zeitpunkt die der unbehandelten HFD-Gruppe und lag nach 5 Wochen um $5,8\% \pm 0,8$, nach 10 Wochen $22,3\% \pm 1,1$ ($p < 0,05$) unter dem Fettmassenanteil der HFD-Gruppe.

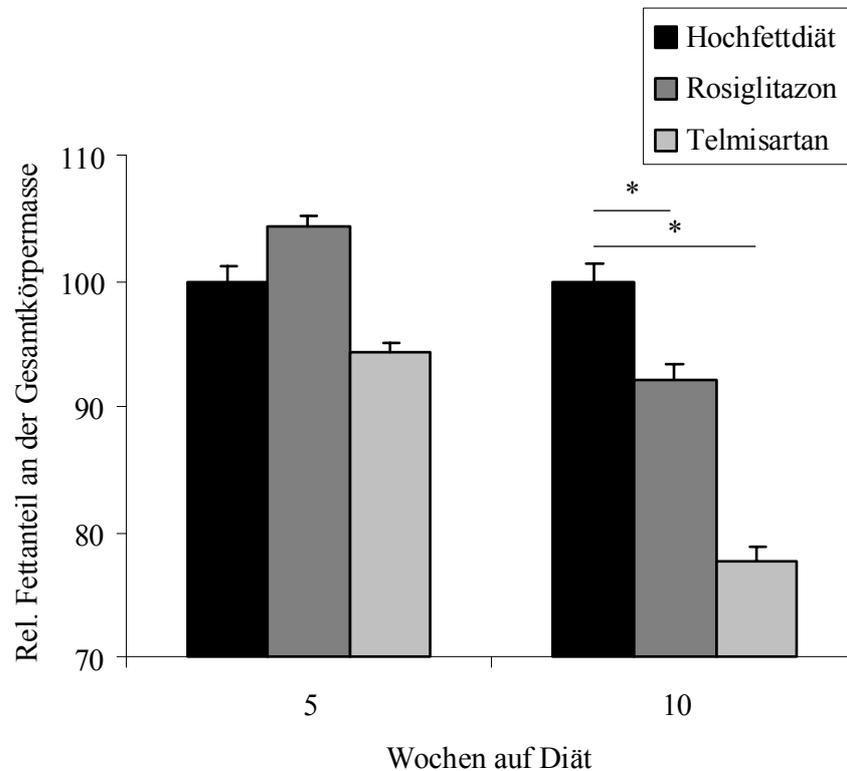


Abb. 3.2.2: Entwicklung des Fettmassenanteils \pm SEM relativ zur HFD-Gruppe. Relativer Fettanteil nach 5 bzw. 10 Wochen auf HFD sowie auf HFD plus Rosiglitazon- bzw. Telmisartan-Medikation (* $p < 0,05$).

Man kann also schlussfolgern, dass sowohl die Rosiglitazon- als auch die Telmisartan-Medikation in einem signifikant verringerten Zuwachs des Fettgewebsanteil gegenüber der HFD nach 10 Wochen resultierte.

3.2.3. Metabolische Charakterisierung

Die Bestimmung der Glukosespiegel nach Glukose- bzw. Insulingabe diente der Untersuchung, welchen Einfluss die Hochfett-diät plus Medikationen auf den Glukosemetabolismus hat.

3.2.3.1. Glukosetoleranz

Mittels ipGTT wurde die Veränderung der GIT der HFD-Gruppen untersucht. Die unbehandelte HFD-Gruppe wurde bereits nach Woche 5 signifikant glukoseintolerant ($p < 0,01$ vs. Woche 0). Dieser Zustand wurde nach 10 Wochen beibehalten ($p < 0,01$ vs. Woche 0).

Verglichen damit (HFD = 100 %) konnte die Rosiglitazon-Medikation die beschriebene GIT nach 5 Wochen um etwa 15% $\pm 1,4$ ($p < 0,01$) und nach 10 Wochen um 17% $\pm 1,7$ ($p < 0,01$) verbessern (Abb. 3.2.3.1).

Im Vergleich zur unbehandelten HFD konnte die Telmisartan-Medikation nach 5 Wochen die GIT signifikant verbessern 16% $\pm 2,3$ ($p < 0,01$). Nach 10 Wochen war die GIT durch Telmisartan-Behandlung ebenfalls signifikant, jedoch weniger stark verbessert (6% $\pm 1,7$, $p < 0,05$).

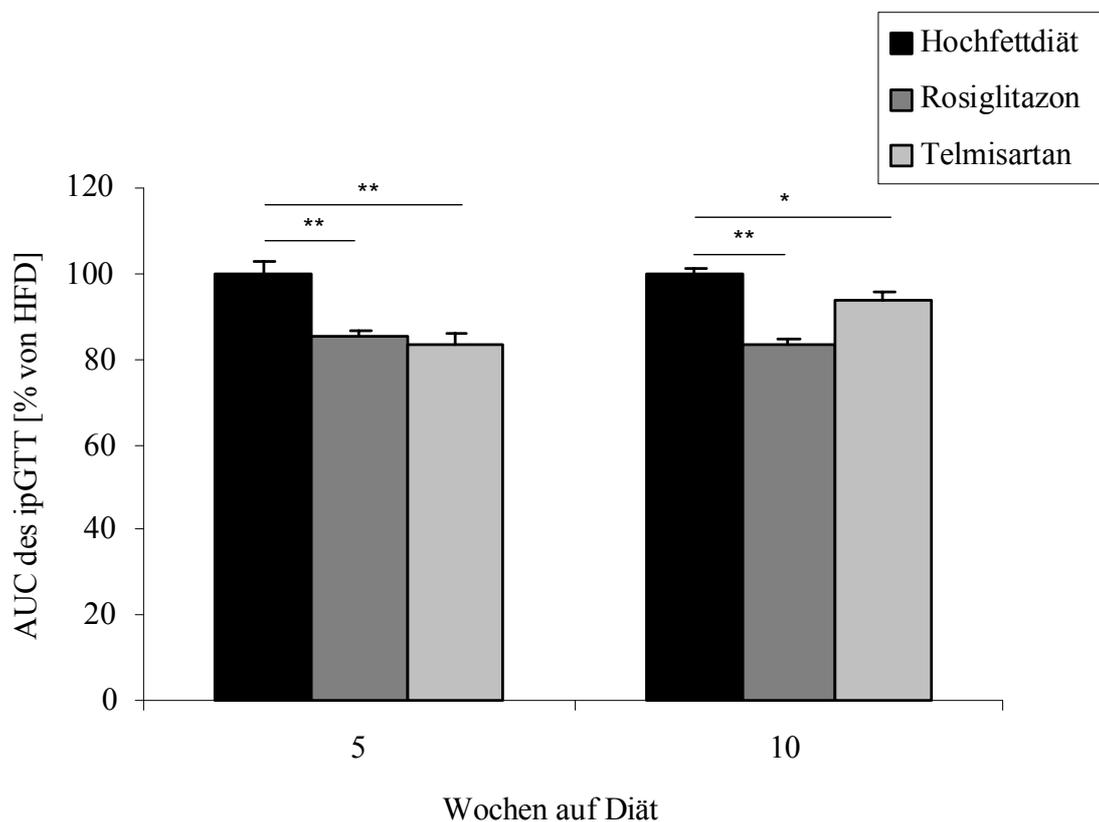


Abb. 3.2.3.1: Entwicklung der Glukoseintoleranz relativ zur HFD-Gruppe nach 5 bzw. 10 Wochen auf HFD sowie auf HFD plus Rosiglitazon bzw. Telmisartan-Medikation (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs. HFD). Intraperitoneale Gabe von 1g Glukose pro kg Körpergewicht.

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass durch die HFD bereits nach 5 Wochen eine Glukoseintoleranz induziert wurde. Diese konnte durch die Medikation mit Rosiglitazon bzw. Telmisartan zum Teil signifikant abgeschwächt werden.

3.2.3.2. Insulinsensitivität

Die Bestimmung der Glukosespiegel nach Insulingabe erfolgte, um den Einfluss der Hochfettdiät plus Medikationen auf die Insulinsensitivität zu untersuchen.

Für die HFD-Gruppe wurde eine signifikante Abnahme der Sensitivität gegenüber den LFD-Tieren bereits nach Woche 5 auf $85\% \pm 10$ ($p < 0,05$) beobachtet, die bis Woche 10 bis auf $70\% \pm 7$ absank ($p < 0,01$).

Relativ dazu (HFD = 100 %) konnte durch Medikation mit Rosiglitazon die GIT nach 5 Wochen um $15\% \pm 2,7$ (* $p < 0,05$), nach 10 Wochen um $55\% \pm 4,5$ verbessern (** $p < 0,01$). Absolut wurde keine signifikante Abnahme der Insulinsensitivität über den beobachteten Zeitraum beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe verbesserte die Telmisartan-Medikation die GIT nach 5 Wochen um $15\% \pm 6,8$. Nach 10 Wochen wurde eine Verbesserung von $58\% \pm 3,5$ erreicht (** $p < 0,01$).

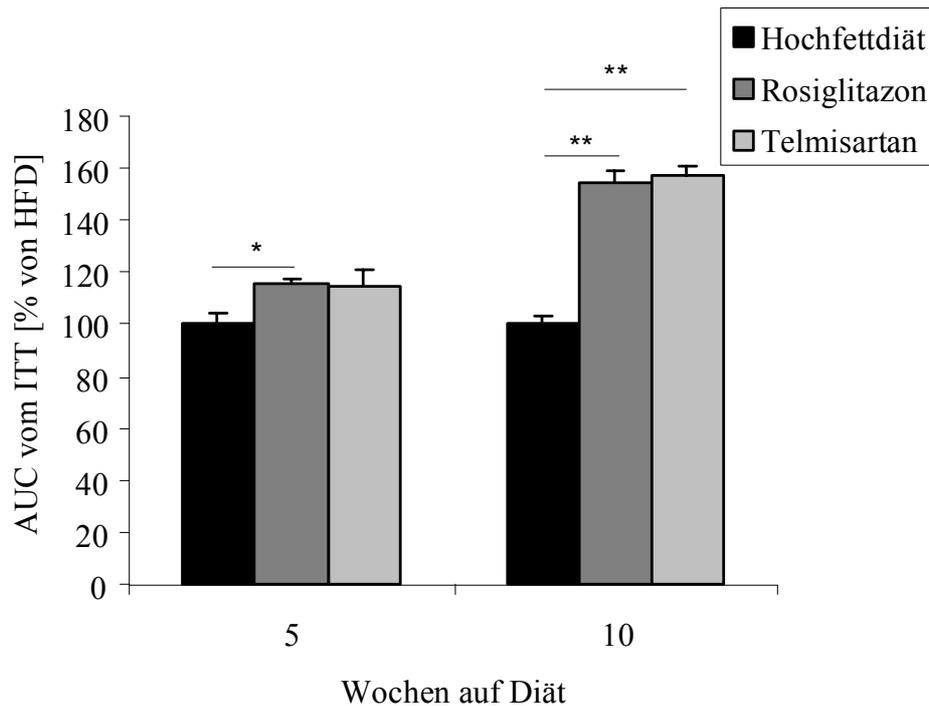


Abb. 3.2.3.2: Entwicklung der Insulinsensitivität relativ zur HFD-Gruppe nach 5 bzw. 10 Wochen auf HFD sowie HFD plus Rosiglitazon bzw. Telmisartan-Medikation (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs. Woche 0). Gabe von 0,25 U Insulin pro kg Körpergewicht.

Insofern kann man also schlussfolgern, dass die durch HFD bereits nach 5 Wochen signifikant verringerte Insulintoleranz durch die Medikation mit Rosiglitazon bzw. Telmisartan sowohl nach 5 als auch nach 10 Wochen zum Teil signifikant verbessert werden konnte.

3.2.4. RNA-Expressionsanalyse im Fettgewebe

Um den Einfluss der Medikation auf den Status der Inflammation im Fettgewebe in Korrelation zur Hochfettdiät zu untersuchen, wurden die Inflammations-Marker MCP-1, F4/80, CD3 sowie das Chemoattractant SDF-1 α quantifiziert. Dazu wurden den nach 0, 5 und 10 Wochen getöteten Tieren Fettgewebeproben entnommen und zur Quantifizierung mittels *real time* PCR aufbereitet. Zur einheitlichen Auswertung des Expressionsmusters wurde der Mittelwert der HFD-Gruppe gleich 1 gesetzt und die Mittelwerte der anderen Gruppen als ein relatives Vielfaches dieses Vergleichswertes dargestellt.

3.2.4.1. MCP-1

Der Makrophagenmarker MCP-1 erreichte in der unbehandelten HFD-Gruppe einen Anstieg auf das 4,4 fache $\pm 0,2$ in Woche 10. Damit stieg die Expression im beobachteten Zeitraum signifikant an ($p < 0,01$).

Die Expression von MCP-1 sank in der Rosiglitazon-Gruppe nach 10 Wochen auf das 0,4fache $\pm 0,2$ der HFD-Gruppe ab. Nach 10 Wochen war der Anstieg von MCP-1 signifikant gegenüber der HFD-Gruppe ($p < 0,01$).

In der Telmisartan-Gruppe sank die Expression von MCP-1 nach 10 Wochen auf das 0,01 fache $\pm 0,003$ ($p < 0,01$ vs. HFD-Gruppe) ab.

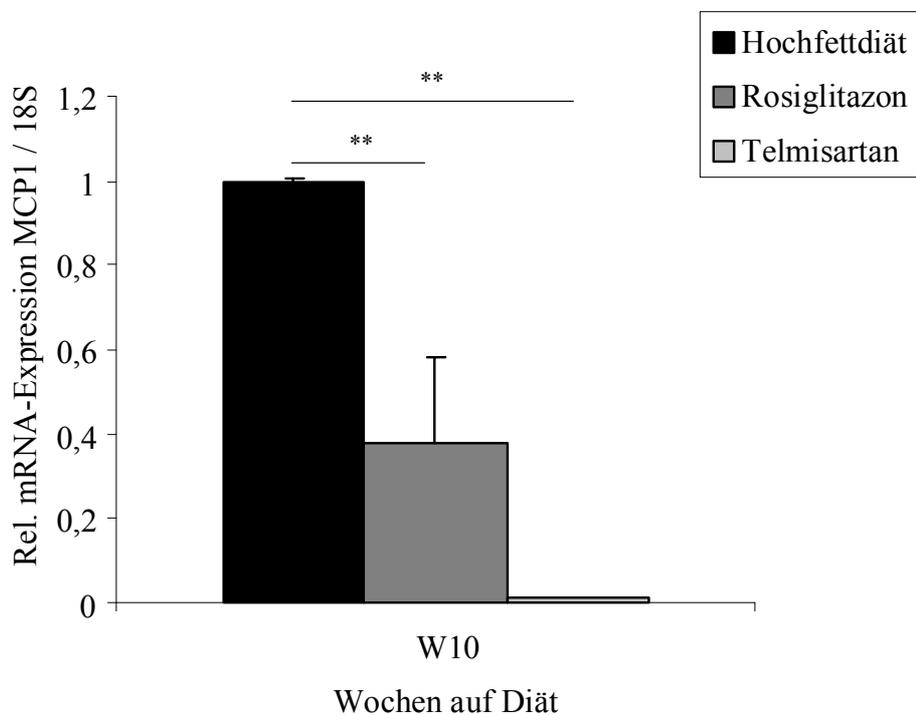


Abb. 3.2.4.1: MCP-1-mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe nach 10 Wochen auf HFD sowie auf HFD plus Rosiglitazon bzw. Telmisartan-Medikation (** $p < 0,01$).

3.2.4.2. F4/80

Für die relative Expression des Makrophagenmarkers F4/80 wurde bei den unbehandelten HFD-Tieren ein Anstieg der Expression auf das signifikant 5,2 fache $\pm 0,2$ ($p < 0,05$) gemessen. In der Rosiglitazon-Gruppe nahm relativ zur HFD-Gruppe die Expression von F4/80 nach 10 Wochen auf das 0,15 fache $\pm 0,04$ ab. Der Expressionsunterschied war statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Ergebnisse

Die Expression von F4/80 fiel in der Telmisartan-Gruppe relativ zur HFD-Gruppe nach 10 Wochen auf 0,02fache \pm 0,01 ab ($p < 0,01$).

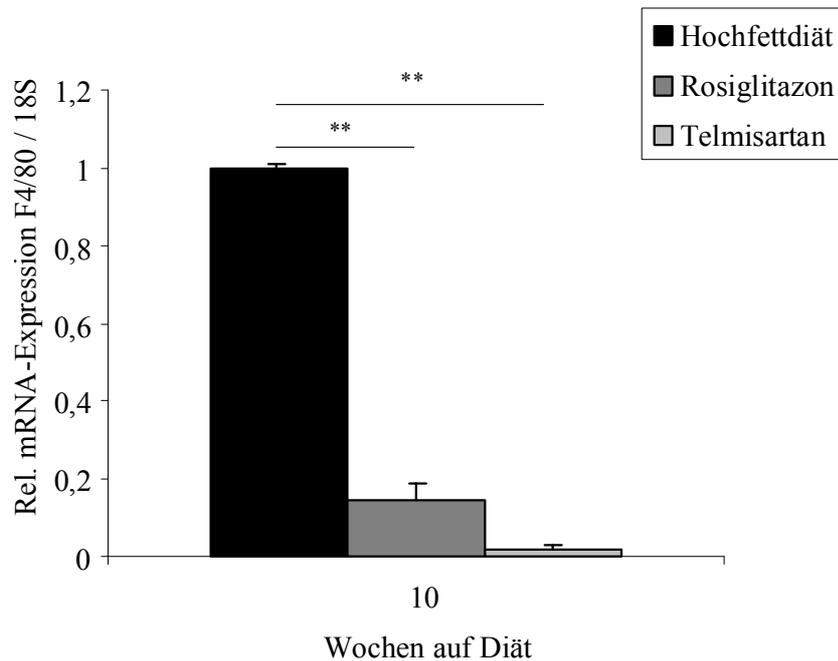


Abb. 3.2.4.2: F4/80-mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe nach 10 Wochen auf HFD sowie auf HFD plus Rosiglitazon- bzw. Telmisartan-Medikation (** $p < 0,01$).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen-Infiltration auf Hochfettdiät in Woche 10 durch Medikation mit Rosiglitazon deutlich gesenkt bzw. durch Telmisartan gänzlich unterdrückt werden konnte.

3.2.4.3. SDF-1 α

Das Chemoattractant SDF-1 α wurde quantifiziert, um die Infiltration der Lymphozyten in einem frühen Stadium zu analysieren.

Für die relative Expression von SDF1- α wurde bei den unbehandelten HFD-Tieren ein Anstieg bis Woche 5 auf das 2,6fache \pm 0,1 beobachtet, dem eine nach 10 Wochen signifikante Expression auf das 3,2fache \pm 0,1 ($p < 0,05$) folgte.

Die Expression von SDF1- α sank relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe in den Rosiglitazon-Tieren nach 5 Wochen auf das 0,28fache \pm 0,16 ab und erreichte nach 10 Wochen das 0,29fache \pm 0,2. Zu beiden Zeitpunkten war die Ausprägung von SDF1- α gegenüber den unbehandelten HFD-Tieren signifikant erniedrigt ($p < 0,01$).

Ergebnisse

In der Telmisartan-Gruppe sank die Expression von SDF1- α sank relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe nach 5 Wochen auf das 0,16fache $\pm 0,05$ und nahm nach 10 Wochen auf das 0,09fache $\pm 0,4$ ab. Zu beiden Zeitpunkten war die Expression von SDF1- α gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigt ($p < 0,01$).

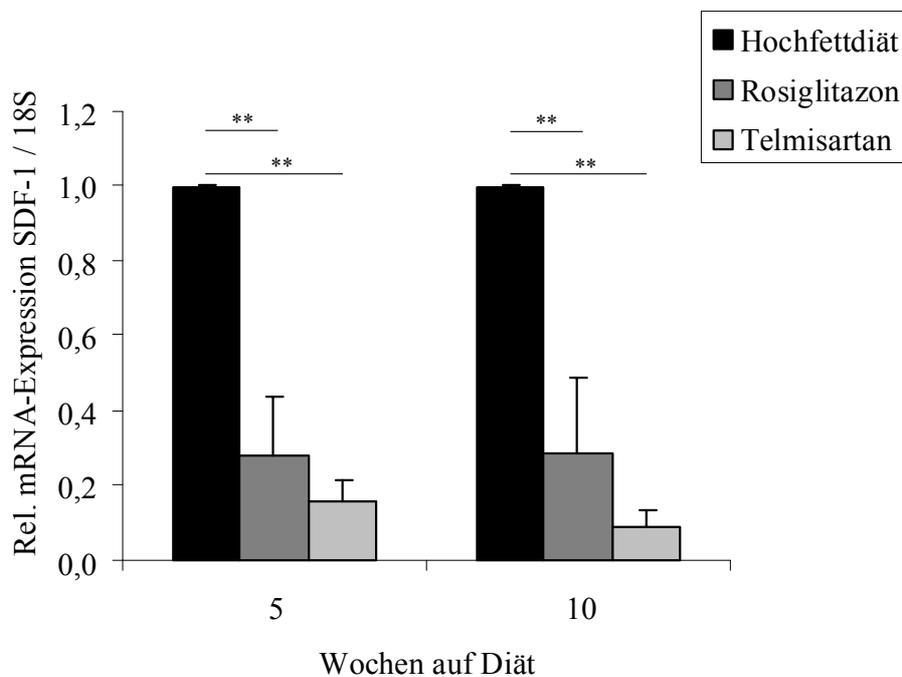


Abb. 3.2.4.3: SDF1- α -mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe nach 5 bzw. 10 Wochen auf HFD sowie HFD plus Rosiglitazon- bzw. Telmisartan-Medikation (** $p < 0,01$).

3.2.4.4. CD3 γ

Zur Quantifizierung der immunhistochemisch detektierten Fettgewebs-Lymphozyten, wurde im Folgenden die mRNA Expression im epididymalen Fettgewebe vermessen.

In der unbehandelten HFD-Gruppe wurde eine Zunahme der Expression des Lymphozytenmarkers CD3 γ auf das 4,3fache $\pm 1,3$ in Woche 5 gemessen, der in Woche 10 ein weiterer Anstieg auf das 6,8fache $\pm 1,2$ folgte. Nach 10 Wochen war die Expression signifikant erhöht ($p < 0,05$).

In der Rosiglitazon-Gruppe sank die Expression von CD3 γ relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe nach 5 Wochen auf das 0,22fache $\pm 0,22$ und nahm nach 10 Wochen auf das 0,27fache $\pm 0,16$ ab. Der Expressionsunterschiede war nach 10 Wochen signifikant ($p < 0,05$).

Ergebnisse

Die Expression von CD3 γ nahm in der Telmisartan-Gruppe relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe nach 5 Wochen auf das 0,08fache \pm 0,04 ab und erreichte nach 10 Wochen ein Minimum von 0,01fach \pm 0,01. Der Unterschied war nach 5 und 10 Wochen signifikant ($p < 0,05$).

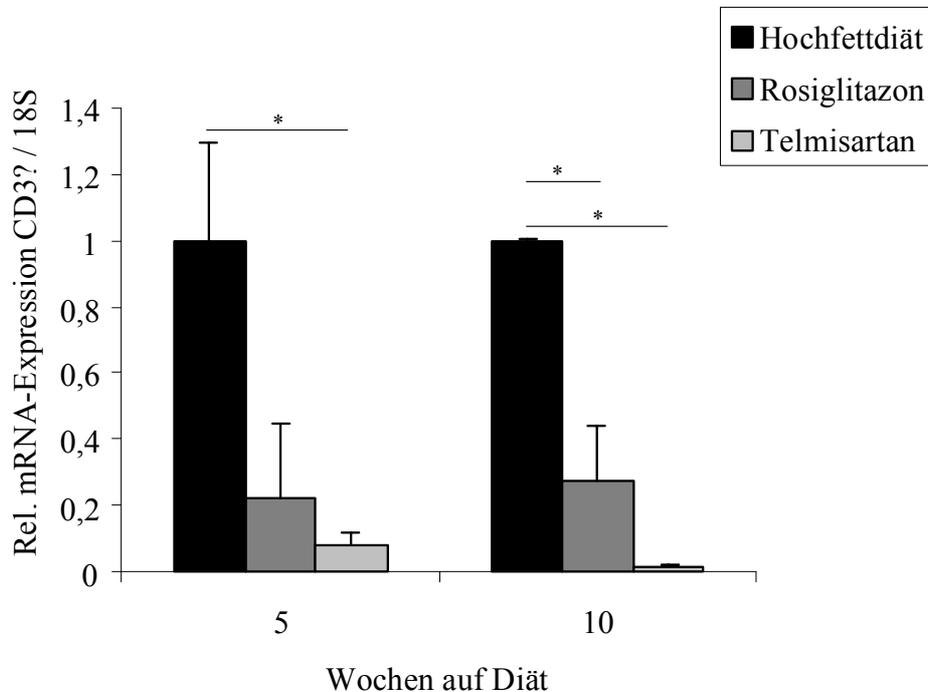


Abb. 3.2.4.4: CD3 γ -mRNA-Expression im epididymalen Fettgewebe relativ zur unbehandelten HFD-Gruppe nach 5 bzw. 10 Wochen auf HFD sowie HFD plus Rosiglitazon- bzw. Telmisartan-Medikation (* $p < 0,05$).

Man kann also schlussfolgern, dass sowohl Rosiglitazon als auch Telmisartan die Lymphozytenmenge und deren chemotaktisches Zytokin in frühen Stadien der diät-induzierten Insulinresistenz zu senken scheinen.

4. Diskussion

In den vergangenen 10 bis 20 Jahren ist insbesondere in den industrialisierten Ländern eine deutliche Zunahme der Adipositas-Prävalenz zu verzeichnen⁷⁻⁹. Die damit assoziierte Insulinresistenz (IR) kann zur Manifestation eines Typ 2 Diabetes Mellitus führen, der wiederum mit der Adipositas korreliert ist. Da sowohl im Fettgewebe adipöser Patienten als auch im Status eines manifesten Typ 2 Diabetes mellitus Zeichen einer subklinischen, chronischen Inflammation nachgewiesen werden können, ist die Untersuchung der Pathogenese beider Krankheiten erstrebenswert, um Möglichkeiten der medikamentösen Einflussnahme zu charakterisieren.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der pro-inflammatorischen Makrophagen und T-Lymphozyten auf die frühe Entwicklung von Insulinresistenz im Hochfett-diät-induzierten Adipositasmodell zu untersuchen. Zudem sollte der Einfluss von Rosiglitazon und Telmisartan auf die Inflammation und Entwicklung der Insulinresistenz als mögliche pharmakologische Intervention geprüft werden.

Frühere Arbeiten richteten den Blick bisher hauptsächlich auf die Rolle der Makrophagen in der Entwicklung der Inflammation des Fettgewebes und die damit verbundene Entstehung der IR. Mittlerweile ist bekannt, dass bei normaler Funktion der Adipozyten konstant eine geringe Anzahl an Makrophagen rekrutiert werden^{58;169}, die jedoch keinen proinflammatorischen Einfluss ausüben. Sie werden auch als residente M2-Klasse definiert. Wird jedoch durch Hochfett-diät eine positive Energiebilanz mit folgender Adipositas induziert, kommt es zur Einwanderung weiterer so genannter M1-Makrophagen, die durch ein zu den bereits vorhandenen Makrophagen verändertes Genexpressionsmuster gekennzeichnet sind⁵⁸. In der vorliegenden Arbeit zeigten sowohl die immunhistochemischen Färbungen als auch die quantitative RT-PCR Analyse nach fünf Wochen HFD nur eine geringe Anzahl detektierbarer Makrophagen. Es handelte sich dabei wahrscheinlich um Makrophagen der Klasse M2, da die gemessene Expression von MCP-1 erst nach zehn Wochen signifikant anstieg. MCP-1 ist als Ligand des so genannten *C-C chemokine receptor 2* (CCR2) für die Rekrutierung weiterer inflammatorisch agierender Makrophagen im Fettgewebe notwendig^{170;171}, wird im inflammatorischen Milieu von Adipozyten sowie von M1-Makrophagen sezerniert und wurde bisher als einer der Hauptmediatoren der Inflammation angesehen. Der nach zehn Wochen HFD zu beobachtende Anstieg detektierbarer Makrophagen ist somit wahrscheinlich auf die Infiltration von Makrophagen der M1-Klasse zurückzuführen, welche verstärkt Gene exprimieren, die der zellulären Adhäsion und Migration dienen¹⁶⁹. Für die zu diesem

Komplex zählenden Gene CCR2, Interleukin 6 (IL-6) und *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass sie zur Inflammation im Fettgewebe beitragen^{60;171;172}. Letztlich aktiviert der direkte Zellkontakt zum Adipozyten den Makrophagen und führt zur Beeinflussung der Insulinsensitivität der Fettzellen¹⁴⁰. Diese Verbindung zur Insulinwirkung konnte anhand von CCR2-*Knockout*-Mäusen demonstriert werden, die durch das Fehlen des MCP-1-Rezeptors neben geringerer Makrophagen-Infiltration auch eine Expressionsreduktion inflammatorischer Gene aufwiesen. Interessanterweise waren diese Tiere teilweise vor der Entwicklung einer HFD-induzierten Insulinresistenz geschützt¹⁷¹. In diesem Zusammenhang wird eine wichtige Rolle für Makrophagen postuliert. Der allerdings nicht vollständige Schutz vor einer HFD-induzierten Insulinresistenz legt die Beteiligung weiterer inflammatorischer Zellen nahe.

Die Rolle der Makrophagen während der HFD-induzierten Adipositas wurde ebenfalls von Xu et al. im gleichen Mausmodell beschrieben⁶⁰. Die Autoren argumentieren, dass das Auftreten der Hyperinsulinämie in den Diät-induzierten Adipositas-Mäusen die Initiierung der Insulinresistenz darstellt und dass dieses Stadium eng mit der Hochregulierung chemotaktischer Marker der Makrophagen-Infiltration im Fettgewebe verknüpft ist. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass C57BL/6J-Mäuse bereits nach fünf Wochen HFD insulinresistent sind. Dieses metabolische Charakteristikum ist deutlich früher zu beobachten als der Anstieg des Serum-Insulins, den Xu et al. nach elf Wochen HFD beschrieben. Unsere Daten sind konform mit kürzlich veröffentlichten Ergebnissen, die im gleichen Mausmodell eine frühe Initiierung der IR durch HFD bestätigen¹⁷³. Die bereits zuvor beschriebene⁶⁰, späte Regulierung der Makrophagenmarker im Fettgewebe ist übereinstimmend mit unseren Ergebnissen. Zusammenfassend wird eine deutliche Diskrepanz zwischen der Makrophageninfiltration und der Initiierung der IR im Fettgewebe der Mäuse deutlich, was darauf hindeutet, dass Makrophagen möglicherweise nicht in die frühe Pathogenese der Adipositas-induzierten IR involviert sind.

4.1. Einfluss infiltrierender T-Lymphozyten

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene frühe Anwesenheit von T-Lymphozyten im viszeralen Fett zum Zeitpunkt der manifesten IR (siehe Abb. 3.1.3.4) postuliert, dass diese Zellen an der Initiierung der IR im Fettgewebe beteiligt sein könnten. Diese Konstellation könnte der inflammatorischen Antwort der Gefäßwand während der Atherogenese entsprechen, in deren Verlauf die frühzeitige Lymphozyten-Rekrutierung und Aktivierung einen entscheidenden Schritt zur Läsionsentwicklung darstellt. Frühere Studien haben bereits

Diskussion

die Anwesenheit von CD3⁺ T-Lymphozyten in humanem Fettgewebe sowie eine hohe Anzahl von T-Zellen im viszeralen Fett diät-induzierter, insulinresistenter Mäuse nachgewiesen⁶². In der vorliegenden Arbeit zeigten sowohl immunhistochemische Färbungen als auch quantitative RT-PCR Analysen bereits nach fünf Wochen HFD die Anwesenheit von CD3⁺ Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe (siehe Abb. 3.1.3.4), was darauf schließen lässt, dass T-Lymphozyten früh während der Krankheitsentstehung in das Fettgeweben einwandern. Die Rekrutierung von T-Zellen an Orte der Inflammation wird normalerweise durch Chemokine vermittelt, die durch Endothel- oder Stromazellen sowie Makrophagen freigesetzt werden. In Präadipozyten und Adipozyten wurde in mehreren Studien eine Regulation der Expression von T-Zell-spezifischen Chemokinen wie *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES), MCP-1 oder *interferon-gamma-inducible protein 10* (IP-10) beobachtet^{62;174;175}. Interessanterweise scheint RANTES, ein chemotaktisches Zytokin für T-Zellen¹⁷⁶, während der Adipozytendifferenzierung hochreguliert zu werden, während die Expression anderer Chemokine wie MCP-1 im Verlaufe der Zeit verringert wird. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von *Stromal-derived factor-1* (SDF-1), das ebenfalls die Rekrutierung von Lymphozyten induziert, detektiert werden. Die Expression von SDF-1 im Fettgewebe war bereits parallel zur Rekrutierung von CD3⁺ T-Lymphozyten nach fünf Wochen signifikant erhöht. Bei der Fettgewebsinflammation werden möglicherweise die T-Lymphozyten durch die Freisetzung präadipozytärer Chemokine wie SDF-1 rekrutiert. Somit wäre der durch die Hochfettdiät beeinflusste Präadipozyt der wesentliche zelluläre Stimulator der T-Zellrekrutierung ins Fettgewebe.

Die Bedeutung des T-Lymphozyten im Fettgewebe hingegen ist bisher nur unvollständig untersucht. Jüngste Ergebnisse lassen auf eine Inhibierung der Differenzierung vom Prä- zum Adipozyten durch aktivierte T-Zellen schließen⁶². Ein solcher Mechanismus könnte zu ektopischer Triglycerid-Disposition in der Leber und im Skelettmuskel beitragen und dadurch die IR in diesen Organen vorantreiben. Die vorliegende wie auch die Arbeit von Wu et al. konnte die Interaktion zwischen Präadipozyten und T-Lymphozyten als wichtige zelluläre Schnittstelle während der Entwicklung von Adipositas-induzierter IR identifizieren. Die Anwesenheit der fettgewebsständigen T-Lymphozyten könnte die Anzahl der Präadipozyten erhöhen, die wiederum die Rekrutierung weiterer T-Lymphozyten mittels der Induktion von SDF-1 Produktion verstärken.

Neben der direkten Regulation der Adipozytenfunktion können T-Lymphozyten auch die Funktion von Fettgewebsmakrophagen beeinflussen. Im Falle von TH1-Lymphozyten kommt es im Laufe der Entzündung zur Produktion und Sekretion von IFN γ . Das Cytokin IFN γ

induziert im Makrophagen dann eine pro-inflammatorische M1-Antwort, so dass die Anwesenheit der T-Lymphozyten im Fettgewebe nicht nur die quantitativen Unterschiede der Makrophagen zu beeinflussen vermag, sondern vielmehr auch funktionelle Unterschiede induziert¹⁷⁷. Um die pathophysiologischen Interaktionen zwischen den fettgewebsständigen T-Lymphozyten und Makrophagen zu charakterisieren, bedarf es weiterer Studien.

Diesbezüglich werden derzeit in Ulm in der Arbeitsgruppe von Prof. Nikolaus Marx (in Kooperation mit Berlin) weiterführende Tierexperimente durchgeführt. Es werden unterschiedliche Knock-out Tiere mit einer Hochfettdiät behandelt und metabolisch phänotypisiert. Hierfür wurden im Einzelnen folgende Stämme gewählt: Die B6.129S7-Rag^{tm1Mom}/J Maus, die weder reife T- (CD8- und CD4-negativ) noch B-Lymphozyten produziert. Desweiteren die B6.129P2-Terb^{tm1Mom}/J Maus, welche eine Depletion für CD4- und CD8-positve Lymphozyten aufweist. Als drittes Modell wird ferner die B6.129-H2dIAb1-Ea/J Maus gewählt, der ausschließlich die CD4-positiven Lymphozyten fehlen. Durch diese Arbeiten wird die pathogenetische Funktion der unterschiedlichen T-Zellpopulation bei der diät-induzierten Insulinresistenz weiter aufgeklärt.

Zusammengefasst konnte durch die vorliegende Studie die frühe Infiltration von Lymphozyten ins Fettgewebe während der Entwicklung der IR im Mausmodell mit HFD-induzierter Adipositas demonstriert werden. Die Assoziation von früher T-Lymphozyten-Einwanderung ins Fettgewebe und die parallele Initiierung von IR in Diät-induzierter Adipositas lässt auf eine wichtige pathophysiologische Rolle dieses Zelltyps bei der Ausbildung HFD-vermittelter IR schließen. Ein Einfluss der T-Lymphozyten auf die Rekrutierung und die Funktion von Makrophagen scheint eine weitere Einflussgröße auf die inflammatorisch vermittelte IR zu sein.

4.2. Einfluss von PPAR γ -Agonisten auf die inflammatorisch vermittelte IR

Neben der essentiellen Funktion in der Adipozyten-Differenzierung^{89;98;178} erfüllt PPAR γ weitere wichtige Rollen unter anderem bei Entzündungsprozessen. Aktiviert durch Liganden vermittelt PPAR γ im Fettgewebe stark anti-inflammatorische Wirkungen. Hierbei standen zunächst die Wirkungen von PPAR γ auf Adipozyten im Vordergrund. Der Rezeptor vermag die Expression inflammatorischer Gene durch seinen Einfluss auf die Adipozyten-Morphologie verändern, was durch verminderte Sekretion inflammatorischer Marker durch kleinere Adipozyten im Gegensatz zu großen Fettzellen deutlich wird¹⁷⁹. In anderen Studien konnte durch die Behandlung von adipösen Ratten mit Troglitazon die Größe der Adipozyten

Diskussion

drastisch verringert werden, was mit einer Reduktion des Expressionspiegel inflammatorischer Marker wie TNF α einherging¹⁸⁰.

Zusätzlich zu den Effekten auf Adipozyten werden immer mehr direkte Wirkungen von PPAR γ auf inflammatorische Zellen im Fettgewebe beschrieben.

Nach seiner Aktivierung vermag der Rezeptor die Makrophagen-Infiltration zu inhibieren und dadurch die Expression inflammatorischer Gene zu reduzieren, sowie die Expression von Makrophagenmarkern wie F4/80 zu senken⁶⁰. Insbesondere zählt dazu die Senkung der MCP 1- sowie TNF α -Expression, die mit IR assoziiert sind^{170;181;182}. Die Sekretion inflammatorischer Adipokine stammt hauptsächlich aus der so genannten Stroma-Vaskular-Fraktion des Fettgewebes^{60;172}. Makrophagen stellen einen wesentlichen Bestandteil dieser Fraktion im Fettgewebe dar. Die anti-inflammatorische Rolle von PPAR γ im Makrophagen, lässt somit vermuten, dass die beobachtete Reduktion der Fettgewebsentzündung durch PPAR γ Aktivatoren wesentlich auch über die Effekte auf fettgewebsständige Makrophagen vermittelt wird. Es ist bekannt, dass PPAR γ durch Eingreifen in den NF κ B-Signalweg die Entzündung in aktivierten Makrophagen reduziert¹³⁸.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die mit Rosiglitazon behandelten HFD-Tiere nach fünf Wochen keinen Anstieg der SDF-1 α - bzw. CD3-Expression. Es kann daher davon ausgegangen werden kann, dass der PPAR γ -Agonist die Ausschüttung von SDF-1 α und die damit verbundene Rekrutierung von T-Lymphozyten in der Entstehung der Adipositas stark zu reduzieren oder sogar zu verhindern vermag. Auch eine Inhibierung der T-Lymphozyten-Aktivierung ist denkbar, was in einer verringerten Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine der T-Lymphozyten resultieren würde. Der Einfluss auf die Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine der T-Lymphozyten umfasst unter anderem die Inhibierung der Ausschüttung von IL-2, IL-4, IFN γ sowie TNF α durch die PPAR γ -Aktivatoren Rosi-, Pio- und Ciglitazon¹⁸³⁻¹⁸⁶. Die bei der Vehikel-Gruppe auf HFD beobachtete Infiltration von Makrophagen nach zehn Wochen war im Fettgewebe der Rosiglitazon-Tiere stark reduziert. Die vermessenen Makrophagenmarker waren nicht erhöht (F4/80), bzw. erreichten keinen signifikant erhöhten Spiegel an MCP-1. In bisherigen Arbeiten konnten Effekte von PPAR γ -Liganden (Rosiglitazon und Pioglitazon) auf CD4-positive T-Lymphozyten nachgewiesen werden¹⁸⁷. PPAR γ -Aktivierung führt in diesen Zellen z.B. zur deutlichen Senkung von IFN γ , was wie o.g. zur Makrophagenaktivierung beiträgt. Man könnte daher schlussfolgern, dass PPAR γ -Aktivierung über die Beeinflussung von CD⁴⁺ T-Lymphozyten zur Reduktion inflammatorischer Prozesse in Fettgewebemakrophagen führt und dies zur Verbesserung der Insulinsensitivität durch diese Substanzen beiträgt.

Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt des Weiteren, dass Telmisartan das Vorhandensein von CD3⁺ T-Lymphozyten ins Fettgewebe der HFD-Tiere stark verringert. Dies könnte unter anderem durch die Inhibierung der Expression von SDF-1 α erklärt werden, da dieser Marker durch die Hochfettdiät nach fünf und zehn Wochen in der mit Telmisartan behandelten Gruppe nicht hochreguliert ist.

Da die beschriebenen Effekte sowohl durch die Behandlung mit Rosiglitazon als auch mit Telmisartan zu beobachtet waren und beide Substanzen eine Aktivierung von PPAR γ bewirken, liegt es nahe, dass die beobachtete Wirkung auf die T-Lymphozyten-Rekrutierung über Liganden-PPAR γ Bindung vermittelt wird. Die bereits genannten Arbeiten von Marx N. und Kollegen unterstützen diese Annahme. Gleichfalls konnte eine Reduktion von MCP-1 als *Chemoattractant* für Makrophagen sowie deren Marker F4/80 gemessen werden. Auch dieser Effekt ist einerseits auf die verminderte T-Lymphozyten-Infiltration und die damit verringerte Schaffung des oben beschriebenen inflammatorischen Milieus zurückzuführen. Andererseits kann eine PPAR γ -Aktivierung durch Rosiglitazon oder Telmisartan direkt in den Adipozyten und residenten Makrophagen eine verminderte MCP-1-Ausschüttung bedingen und die damit verbundene Rekrutierung pro-inflammatorischer Makrophagen.

Telmisartan ist ein potenter Antagonist am Angiotensin Typ1 Rezeptor und führt über diese Effekte zur Blutdrucksenkung und kardiovaskulärer Protektion. Bei dem bekannten bimodalen Wirkmechanismus von Telmisartan mit AT1-Blockade und selektiver PPAR γ Modulation, stellt sich die Frage, wie bedeutsam ist die AT1-Blockade für die beobachteten Effekte von Telmisartan in der vorliegenden Studie. Walcher und Kollegen konnte zeigen, dass Telmisartan unter bereits bestehender AT1-Blockade mittels Eprosartan eine Blockade der T-Zellaktivierung induzieren kann¹⁸⁸. Dieser inhibitorische Effekt wird jedoch durch den Einsatz von siRNA gegen PPAR γ aufgehoben. Diese Arbeiten weisen daraufhin, dass die AT1-Blockade für Telmisartan-vermittelte Effekte in T-Lymphozyten nur eine untergeordnete Rolle spielt und im Vordergrund der Wirkungen die PPAR γ -Aktivierung steht.

Konsistent zu bereits veröffentlichten Arbeiten verbesserte die Behandlung der HFD-Tiere mit dem Glitazon oder Telmisartan sowohl die Insulinsensitivität, als auch die Glukosetoleranz in dem vorliegenden Model¹⁵⁰. Die zeitliche Abfolge der metabolischen Wirkungen der Substanzen und der Blockade der T-Zellinfiltration impliziert, dass die Inhibierung der Lymphozyteninfiltration durch Glitazone oder Telmisartan zu einer Substanz-vermittelten Insulinsensitivierung beiträgt. Zukünftige Studien in T-Zell-defizienten Tiermodellen unter Behandlung mit PPAR γ Aktivatoren werden dies bestätigen müssen.

4.3. Relevanz des Tiermodells

Es ist wichtig zu betonen, dass die beschriebenen Beobachtungen im Mausmodell Diät-induzierter Fettleibigkeit gemacht wurden und dass die gefundenen Ergebnisse unter Umständen nicht in gleicher Form im Menschen gefunden werden können. Nager- und humane Makrophagen differieren in ihrem Aktivierungs- und Funktionsprofil^{189;190}. Allerdings zeigen wiederum Fettgewebsmakrophagen aus Menschen und Mäusen ähnliche Expressionsmuster für viele inflammatorische Marker^{60;172;191}. Ähnlich differenzierte Expressions- und Funktionsprofile sind für murine und humane T-Lymphozyten denkbar. Unsere Kooperationspartner konnten bestätigen, dass die Ergebnisse im Tiermodell auch im humanen Fettgewebe beobachtet werden können, und dass Telmisartan dort vergleichbare Wirkungen vermittelt. Aus diesem Grund ist die Maus ein wichtiges Modell, um die Biologie von Fettgewebsmakrophagen bzw. Lymphozyten zu erforschen und neue Hypothesen zu erheben, welche dann im Menschen bestärkt werden können.

4.4. Nutzen/Risiko-Profil von Rosiglitazon & Telmisartan

TZDs als volle Agonisten verbessern die Insulinsensitivität, die Glukosetoleranz und das Lipidprofil in Patienten mit Typ-2-Diabetes. Andererseits umfassen die für die Thiazolidindionderivate beschriebenen unerwünschten Nebenwirkungen neben Flüssigkeitsretention, Kopfschmerzen und einer Zunahme von Infektionen der oberen Luftwege besonders eine Gewichtszunahme¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Die induzierte Zunahme an Fettgewebe ist die möglicherweise unvermeidbare Folge des starken Aktivierungsgrades von PPAR γ durch TZDs und kommt vorwiegend in subkutanen Fettdepots vor. Noch unklar bleiben bisher jedoch die langfristigen Auswirkungen dieser Gewichtszunahme (bspw. 6 kg in ~34 Wochen (PROactive Studie) unter Pioglitazon-Therapie¹⁹⁵) auf die ohnehin meist übergewichtigen/adipösen Patienten mit Typ-2-Diabetes. Die Gewichtszunahme ist am ehesten auf die verbesserte Insulinwirkung zurückzuführen. Dementsprechend wurde in der PROACTIVE Studie trotz Gewichtszunahme eine Abnahme der kardiovaskulären Ereignisse verzeichnet. Die Gewichtszunahme unter Glitazonen lässt sich also nicht in ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko übersetzen. Sie muss jedoch im Therapieverlauf beobachtet werden, da eine zunehmende Glitazon-vermittelte Flüssigkeitsretention ebenfalls dazu beitragen kann. Die kürzlich veröffentlichte Metaanalyse von Nissen et al. untersuchte das Herzinfarkttrisiko und das Risiko für tödliche kardiovaskuläre Erkrankungen unter Rosiglitazon-Therapie. Die in die Analyse

eingeschlossenen 42 Studien mit mehr als 28.000 Patienten (Rosiglitazon-Gruppe: n=15.560; Kontroll-Gruppe: n=12.283; Mindeststudiendauer 24 Wochen) ergaben zusammengenommen ein signifikant um 43 % erhöhtes Risiko für Herzinfarkt unter Rosiglitazon-Therapie und ein nicht signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskulären Tod, bei insgesamt niedrigen Ereignisraten: 86 Myokardinfarkte bei 15.560 Patienten in der Rosiglitazon-Gruppe und 72 Infarkte bei 12283 Kontrollpatienten. Bei der Interpretation der Metaanalyse müssen allerdings die Limitationen der Publikation berücksichtigt werden wie die zumeist sehr kurze Studiendauer und die Tatsache, dass keine der eingeschlossenen Studien darauf ausgelegt waren, kardiovaskuläre Endpunkte zu untersuchen. Außerdem lag die Ergebnisrate für das Auftreten von Myokardinfarkten in beiden Gruppen unter 0,6 % und ist somit als niedrig einzustufen. In den großen prospektiv und randomisiert angelegten Studien DREAM und ADOPT, die in die Metaanalyse eingeschlossen wurden, waren die Unterschiede in den Ereignisraten für Myokardinfarkt und kardiovaskulären Tod statistisch nicht zwischen den Gruppen signifikant und stehen somit im Gegensatz zur Metaanalyse^{196;197}. Auch eine im Juni 2007 veröffentlichte Interimsanalyse der RECORD-Studie, in der 4447 Patienten randomisiert mit Rosiglitazon vs. Sulfonylharnstoff plus Metformin behandelt wurden, zeigte kein statistisch erhöhtes Risiko für Herzinfarkt oder kardiovaskulären Tod unter Rosiglitazon-Therapie¹⁰³. Zusammenfassend sollten die Ergebnisse der Studien jedoch dazu veranlassen, auch in Zukunft den kardiovaskulären Sicherheitsaspekt von TZDs detailliert zu betrachten.

4.5. Telmisartan und SPPARMs

Fortschritte im Verständnis der Pharmakologie von PPAR γ könnten durch die Entdeckung der Sartane als Liganden des nukleären Rezeptors erzielt werden¹⁴⁹. Diese Substanzgruppe weist an Nebenwirkungen selten Reizhusten und Angioödeme auf, ansonsten sind die Nebenwirkungen von Sartane vergleichbar mit Placebo. Trotz PPAR γ -Aktivierung zählt Gewichtszunahme interessanterweise bei den ARBs nicht zu den Nebenwirkungen wie bei den Glitazonen. Diese auch im vorliegenden Tiermodell beobachtete Limitierung der Körpergewichtszunahme der HFD-Tiere wurde bereits in mehreren Studien beschrieben¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Wir konnten Telmisartan als sog. selektiven PPAR γ Modulator charakterisieren. Diese Substanzen unterscheiden sich von vollen PPAR γ Agonisten, da sie nur einen Teil der durch die vollen Agonisten wie die TZDs hervorgerufenen Effekte aktivieren und Zelltyp-spezifisch agieren^{149;150;201}. Wie im Falle von Telmisartan und Irbesartan wird die PPAR γ -Cofaktor-Bindung selektiv reguliert und dadurch die Genexpression spezifisch induziert. Wie volle

Diskussion

Agonisten greifen auch die SPPARMs in den Lipid-Metabolismus der Adipozyten und induzieren dort ein weitaus weniger adipogenes Genprogramm als Glitazone. Ein positiver Effekt der selektiven PPAR γ -Aktivierung wurde in der vorliegenden wie auch anderen Arbeiten durch den positiven Einfluss auf das Körpergewicht und metabolische Parameter wie die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität deutlich^{150;151;153;201}. Trotz einer eher moderaten PPAR γ -Aktivierung durch die SPPARMs zeigen diese Substanzen eine potente antidiabetische Wirkung im Tiermodell²⁰¹⁻²⁰⁴. Allerdings existieren bisher für keinen der erwähnten Modulatoren Daten zur Wirkung auf die metabolischen Parameter in Patienten mit Typ-2-Diabetes. Der ideale therapeutische Ansatz wäre die Verbesserung der Insulinsensitivität, ohne eine Gewichtszunahme der Patienten zu induzieren.

Neben dem potentiellen Gebrauch bestimmter AT1-Antagonisten zur Prävention und Behandlung des Typ-2-Diabetes und des metabolischen Syndroms hat die Entdeckung der PPAR γ -aktivierenden Eigenschaften dieser Substanzen eine Reihe von Implikationen für die Entwicklung einer neuen Generation von Substanzen. Krankheiten, die eine dysregulierte Aktivität des RAS und von PPAR γ einschließen, wären für eine Anwendung dieser Substanzen prädestiniert. Die für die AT1-Rezeptorblockade beschriebene Inhibierung der renalen Na⁺-Retention könnte als Grundlage für die Entwicklung neuer PPAR γ -Modulatoren ohne Nebenwirkungen wie Flüssigkeitsretention, periphere Ödeme, und Herzinsuffizienz wie beim Einsatz von TZDs dienen. Aufbauend auf den Leitstrukturen der derzeit erhältlichen AT1-Antagonisten könnten folglich neue Substanzen mit potenten PPAR γ -modulierenden Eigenschaften entwickelt werden.

5. Zusammenfassung

In der Entstehung der HFD-induzierten IR-Entwicklung und des daran anknüpfenden Typ-2-Diabetes spielen inflammatorische Vorgänge eine bedeutende Rolle. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass im zeitlichen Verlauf der IR-Pathogenese zuerst T-Lymphozyten das Fettgewebe infiltrieren um dann die nachfolgende Makrophagen-Rekrutierung zu vermitteln. Bereits zum Zeitpunkt der T-Lymphozyten-Präsenz besteht eine signifikant verschlechterte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität, was auf einen Einfluss der T-Lymphozyten nahe legt.

Durch die Medikation mit den PPAR γ -aktivierenden Substanzen Rosiglitazon und Telmisartan konnten die beobachteten Effekte auf das inflammatorische Milieu und die Insulin- bzw. Glukosehomöostase verbessert werden. Die anti-inflammatorischen sowie insulinsensitivierenden Effekte der PPAR γ -Aktivierung im Fettgewebe scheinen wesentlich auch über die Effekte auf T-Lymphozyten und Makrophagen vermittelt zu sein. Zusätzlich spielt die Regulation der Adipozytenfunktion eine zentrale Rolle bei der pharmakologischen Aktivierung von PPAR γ im Fettgewebe.

Insgesamt konnte somit PPAR γ als Bindeglied zwischen Fettgewebsinflammation, Adipozyten und Insulinresistenz charakterisiert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die herausragende Bedeutung dieses Rezeptors als pharmakologisches Zielmolekül für zukünftige Therapie kardio-metabolischer Erkrankungen.

Summary

Inflammatory processes play a significant role during the origin of HFD-induced IR-development and the following type 2 diabetes. In the present work it could be demonstrated for the first time that during the IR pathology primarily T-lymphocytes infiltrate the adipose tissue to mediate the subsequent macrophage recruitment. Already at the time point of the T-lymphocyte presence exists significantly declined glucose tolerance and insulin sensitivity which suggests an influence of the T-lymphocytes. By medication of the PPAR γ activating agents Rosiglitazone and Telmisartan the observed effects on the inflammatory milieu and the insulin respective glucose homoeostasis could be improved. The anti inflammatory and insulin sensitisation effect of the PPAR γ activation inside the adipose tissue seem to be mediated also importantly by effects on T-lymphocytes and macrophages. Furthermore, the regulation of the adipocyte function plays a central role in the pharmacological activation of PPAR γ in the adipose tissue.

Summarising, PPAR γ could be characterised as a connection between adipose tissue inflammation, adipocytes and insulin resistance. These results support the major impact of this receptor as pharmacological target molecule for future therapy of cardio-metabolic diseases.

Danksagung

6. Danksagung

Einen Dank möchte hiermit an all jene richten, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Einen besonderen Dank möchte ich für die wissenschaftliche wie auch intensive Betreuung bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit an Herrn Prof. Dr. Ulrich Kintscher richten. Ich danke ihm für die Vergabe des Themas, sein beständiges Interesse an der Arbeit und seine Anregungen bei kleinen und großen Problemen. Nicht zu vergessen ist natürlich seine mir entgegengebrachte Geduld in unserer Zusammenarbeit.

Ebenfalls möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ronald Gust als meinen Betreuer im Fachbereich Pharmazie bedanken, sowohl für seine Unterstützung und viele wertvolle Hinweise, das Korrekturlesen und nicht zuletzt für sehr interessante Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Unger möchte ich herzlich für die Aufnahme am Institut sowie für die vielfältigen Möglichkeiten während meiner Tätigkeit in CCR danken.

Herrn Prof. Dr. Niko Marx danke ich für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt außerdem Frau Christiane Sprang, die mit wertvollen Tipps sowie Humor manchen Laboralltag aufzuhellen vermochte und mit mir die aufreibenden Monate im Tierstall verbracht hat.

Ebenso danke ich vielmals Frau Dr. Anna Foryst-Ludwig und Herrn Markus Clemenz, mit denen die vielzähligen Tierversuche nicht möglich gewesen wären und die mich mit Rat, Tat und Zeit sehr unterstützt haben.

Ich möchte ebenfalls Herr Maxim Krikov danken, der mich die Filigranität verschiedenster Operation lehrte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Freundin Franziska Rompe für ihre uneingeschränkte Unterstützung über all die Jahre bedanken.

7. Referenzen

Reference List

1. Clemens A, Riemann JF, Siegel EG. [Optimized diabetes therapy in type 2 diabetics]. *Med.Klin.(Munich)* 2003;98:484-92.
2. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001;104:517-29.
3. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799-806.
4. Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 1990;13:228-43.
5. Peacock WL, Speakman JR. Effect of high-fat diet on body mass and energy balance in the bank vole. *Physiol Behav.* 2001;74:65-70.
6. Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J.Nutr.* 2004;134:2090S-105S.
7. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 2001;286:1195-200.
8. Seidell JC. Obesity in Europe: scaling an epidemic. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 1995;19 Suppl 3:S1-S4.
9. James PT, Rigby N, Leach R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil.* 2004;11:3-8.

Referenzen

10. Williams CL, Gulli MT, Deckelbaum RJ. Prevention and treatment of childhood obesity. *Curr.Atheroscler.Rep.* 2001;3:486-97.
11. Deckelbaum RJ, Williams CL. Childhood obesity: the health issue. *Obes.Res.* 2001;9 Suppl 4:239S-43S.
12. Sorof J, Daniels S. Obesity hypertension in children: a problem of epidemic proportions. *Hypertension* 2002;40:441-47.
13. Nationale Verzehrstudie II Ergebnisbericht 2008. 2008.
Ref Type: Generic
14. Smith BA, Edwards MS, Ballachey BE, Cramer DA, Sutherland TM. Body weight and longevity in genetically obese and non-obese mice fed fat-modified diets. *Growth Dev.Aging* 1991;55:81-89.
15. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes Dev.* 2003;17:313-21.
16. Coban E, Yilmaz A, Sari R. The effect of weight loss on the mean platelet volume in obese patients. *Platelets.* 2007;18:212-16.
17. Powell LH, Calvin JE, III, Calvin JE, Jr. Effective obesity treatments. *Am.Psychol.* 2007;62:234-46.
18. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635-43.
19. Keller U. From obesity to diabetes. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 2006;76:172-77.
20. Leitlinien Diabetes mellitus. 2007. Deutsche Diabetes Gesellschaft.
Ref Type: Generic

Referenzen

21. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991;14:1132-43.
22. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu.Rev.Med.* 2005;56:45-62.
23. Strippoli GF, Di Paolo S, Cincione R, Di Palma AM, Teutonico A, Grandaliano G *et al.* Clinical and therapeutic aspects of diabetic nephropathy. *J.Nephrol.* 2003;16:487-99.
24. Adler A. Obesity and target organ damage: diabetes. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 2002;26 Suppl 4:S11-S14.
25. Boitard C, Debray-Sachs M, Bach JF. Autoimmune disorders in diabetes. *Adv.Nephrol.Necker Hosp.* 1986;15:281-305.
26. Sheehy MJ. T cell defined HLA epitopes and T cell receptor polymorphism in insulin dependent diabetes mellitus. *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab* 1991;5:341-55.
27. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-12.
28. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:4854-58.
29. Juhan-Vague I, Alessi MC. Plasminogen activator inhibitor 1 and atherothrombosis. *Thromb.Haemost.* 1993;70:138-43.

Referenzen

30. Berndt J, Kralisch S, Kloting N, Ruschke K, Kern M, Fasshauer M *et al.* Adipose Triglyceride Lipase Gene Expression in Human Visceral Obesity. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 2007.
31. Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2007;293:G1-G4.
32. Rajman I, Eacho PI, Chowienczyk PJ, Ritter JM. LDL particle size: an important drug target? *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1999;48:125-33.
33. Reaven GM. Syndrome X. *Blood Press Suppl* 1992;4:13-16.
34. Reaven GM. Syndrome X: 6 years later. *J.Intern.Med.Suppl* 1994;736:13-22.
35. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. 2008. *International Diabetes Federation* .
Ref Type: Generic
36. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J.Clin.Invest* 2000;106:453-58.
37. Antic V, Dulloo A, Montani JP. Multiple mechanisms involved in obesity-induced hypertension. *Heart Lung Circ.* 2003;12:84-93.
38. Hartge MM, Kintscher U, Unger T. Endothelial dysfunction and its role in diabetic vascular disease. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 2006;35:551-ix.
39. Haffner S, Taegtmeier H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation* 2003;108:1541-45.

Referenzen

40. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 2003;52:1210-14.
41. Engeli S, Sharma AM. Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm.Metab Res.* 2000;32:485-99.
42. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc.Nutr.Soc.* 2001;60:329-39.
43. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;35:1270-77.
44. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
45. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2004;89:2548-56.
46. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
47. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43:1271-78.
48. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997;389:610-14.

Referenzen

49. Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 1998;139:4832-38.
50. Ventre J, Doebber T, Wu M, MacNaul K, Stevens K, Pasparakis M *et al.* Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 1997;46:1526-31.
51. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol.Metab* 2000;11:212-17.
52. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:7265-70.
53. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998;41:1241-48.
54. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997;40:1286-92.
55. Sell H, Eckel J. Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance. *Curr.Opin.Lipidol.* 2007;18:258-62.
56. Canello R, Tounian A, Poitou C, Clement K. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab* 2004;30:215-27.
57. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006;1084:89-117.

Referenzen

58. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:16-23.
59. Williams MD, Nadler JL. Inflammatory mechanisms of diabetic complications. *Curr.Diab.Rep.* 2007;7:242-48.
60. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J.Clin.Invest* 2003;112:1821-30.
61. Cherla RP, Ganju RK. Stromal cell-derived factor 1 alpha-induced chemotaxis in T cells is mediated by nitric oxide signaling pathways. *J.Immunol.* 2001;166:3067-74.
62. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL *et al.* T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 2007;115:1029-38.
63. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 2003;144:2201-07.
64. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000;14:121-41.
65. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999;354:141-48.
66. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol.Sci.* 2004;25:331-36.

Referenzen

67. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J.Biol.Chem.* 1997;272:20230-35.
68. Saladin R, Fajas L, Dana S, Halvorsen YD, Auwerx J, Briggs M. Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ.* 1999;10:43-48.
69. van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, Wasan KM. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharm.Res.* 2004;21:1531-38.
70. Furnsinn C, Willson TM, Brunmair B. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta, a regulator of oxidative capacity, fuel switching and cholesterol transport. *Diabetologia* 2007;50:8-17.
71. Brunelli L, Cieslik KA, Alcorn JL, Vatta M, Baldini A. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta upregulates 14-3-3 epsilon in human endothelial cells via CCAAT/enhancer binding protein-beta. *Circ.Res.* 2007;100:e59-e71.
72. Liou JY, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N, Wu KK. Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006;26:1481-87.
73. Bedu E, Wahli W, Desvergne B. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta as a therapeutic target for metabolic diseases. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 2005;9:861-73.

Referenzen

74. Reilly SM, Lee CH. PPARdelta as a therapeutic target in metabolic disease. *FEBS Lett.* 2008;582:26-31.
75. Rosenson RS. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am.J.Cardiol.* 2007;99:96B-104B.
76. Libby P, Plutzky J. Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Am.J.Cardiol.* 2007;99:27B-40B.
77. Szatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006;1088:207-18.
78. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y. The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol.Cell Endocrinol.* 2006;249:10-15.
79. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ *et al.* Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:7355-59.
80. Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol.Life Sci.* 1999;55:932-43.
81. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado DO *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004;429:771-76.

Referenzen

82. Spiegelman BM, Heinrich R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* 2004;119:157-67.
83. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R *et al.* The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J.Biol.Chem.* 1997;272:18779-89.
84. Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJ, Jenkins NA *et al.* Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur.J.Biochem.* 1995;233:219-26.
85. Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L *et al.* Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000;101:1311-18.
86. Kappert K, Meyborg H, Clemenz M, Graf K, Fleck E, Kintscher U *et al.* Insulin facilitates monocyte migration: a possible link to tissue inflammation in insulin-resistance. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2008;365:503-08.
87. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE, Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin.Cell Dev.Biol.* 1999;10:3-10.
88. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998;78:783-809.
89. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79:1147-56.

Referenzen

90. Loviscach M, Rehman N, Carter L, Mudaliar S, Mohadeen P, Ciaraldi TP *et al.* Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia* 2000;43:304-11.
91. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC *et al.* Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J.Clin.Invest* 2003;112:608-18.
92. Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P *et al.* Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat.Med.* 2003;9:1491-97.
93. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.
94. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813-19.
95. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH *et al.* 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:4844-49.
96. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M *et al.* Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* 2000;403:103-08.
97. Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J.Clin.Invest* 2003;112:945-55.

Referenzen

98. Tzamei I, Fang H, Ollero M, Shi H, Hamm JK, Kievit P *et al.* Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J.Biol.Chem.* 2004;279:36093-102.
99. Henry RR. Thiazolidinediones. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 1997;26:553-73.
100. Olefsky JM, Saltiel AR. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol.Metab* 2000;11:362-68.
101. 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;368:1096-105.
102. 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;355:2427-43.
103. Home PD, Jones NP, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M *et al.* Rosiglitazone RECORD study: glucose control outcomes at 18 months. *Diabet.Med.* 2007;24:626-34.
104. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N.Engl.J.Med.* 2007;356:2457-71.
105. Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR *et al.* The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J.Med.Chem.* 1996;39:665-68.

Referenzen

106. Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G *et al.* Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J.Biol.Chem.* 1999;274:6718-25.
107. Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L *et al.* Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 1997;386:407-10.
108. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J *et al.* The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat.Genet.* 2000;26:76-80.
109. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA *et al.* Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999;402:880-83.
110. Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI *et al.* Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev.Cell* 2003;5:657-63.
111. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K *et al.* PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol.Cell* 1999;4:597-609.
112. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J.Clin.Invest* 2000;105:287-92.
113. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K *et al.* The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor

Referenzen

- gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J.Biol.Chem.* 2001;276:41245-54.
114. Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V *et al.* Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* 1998;338:867-72.
115. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E *et al.* Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J.Clin.Invest* 2000;106:1221-28.
116. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC *et al.* Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J.Clin.Invest* 2003;112:608-18.
117. Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2007;92:386-95.
118. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762-69.
119. Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr.Opin.Lipidol.* 2002;13:51-59.
120. Hsueh WA, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *Am.J.Cardiol.* 2003;92:3J-9J.

Referenzen

121. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H *et al.*
Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat.Med.*
2002;8:731-37.
122. Stepan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends
Endocrinol.Metab* 2002;13:18-23.
123. Kumar S, Boulton AJ, Beck-Nielsen H, Berthezene F, Muggeo M, Persson B *et al.*
Troglitazone, an insulin action enhancer, improves metabolic control in NIDDM
patients. Troglitazone Study Group. *Diabetologia* 1996;39:701-09.
124. Chaiken RL, Eckert-Norton M, Pasmantier R, Boden G, Ryan I, Gelfand RA *et al.*
Metabolic effects of darglitazone, an insulin sensitizer, in NIDDM subjects.
Diabetologia 1995;38:1307-12.
125. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their
role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction.
Eur.J.Clin.Invest 2002;32 Suppl 3:14-23.
126. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome
proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene.
J.Biol.Chem. 1999;274:3970-77.
127. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S *et
al.* PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific
transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.*
1996;15:5336-48.

Referenzen

128. Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C, Antoine B. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J.Biol.Chem.* 2003;278:18785-90.
129. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol.Cell Biol.* 1995;15:351-57.
130. Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat.Med.* 2002;8:1122-28.
131. Frias JP, Yu JG, Kruszynska YT, Olefsky JM. Metabolic effects of troglitazone therapy in type 2 diabetic, obese, and lean normal subjects. *Diabetes Care* 2000;23:64-69.
132. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E *et al.* Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* 2001;24:710-19.
133. Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N.Engl.J.Med.* 1994;331:1188-93.
134. Raskin P, Rappaport EB, Cole ST, Yan Y, Patwardhan R, Freed MI. Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 2000;43:278-84.
135. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues.

Referenzen

- Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids.
J.Clin.Invest 1997;99:2416-22.
136. Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B *et al.* Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 1998;12:3168-81.
137. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C *et al.* Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 1999;48:1600-06.
138. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.
139. Stienstra R, Duval C, Ller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR.Res.* 2006;2007:95974.
140. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2007;292:E166-E174.
141. Reiss AB, Vagell ME. PPARgamma activity in the vessel wall: anti-atherogenic properties. *Curr.Med.Chem.* 2006;13:3227-38.
142. Zadelaar AS, Boesten LS, Jukema JW, van Vlijmen BJ, Kooistra T, Emeis JJ *et al.* Dual PPARalpha/gamma agonist tesaglitazar reduces atherosclerosis in insulin-resistant and hypercholesterolemic ApoE*3Leiden mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006;26:2560-66.

Referenzen

143. Dunn SE, Ousman SS, Sobel RA, Zuniga L, Baranzini SE, Youssef S *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J.Exp.Med.* 2007;204:321-30.
144. Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4+ T cell-mediated protection against colitis. *J.Immunol.* 2007;178:2940-49.
145. Klotz L, Dani I, Edenhofer F, Nolden L, Evert B, Paul B *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma control of dendritic cell function contributes to development of CD4+ T cell anergy. *J.Immunol.* 2007;178:2122-31.
146. Soller M, Tautenhahn A, Brune B, Zacharowski K, John S, Link H *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to T lymphocyte apoptosis during sepsis. *J.Leukoc.Biol.* 2006;79:235-43.
147. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol.Rev.* 2000;52:415-72.
148. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 2003;12:70-88.
149. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 2004;109:2054-57.
150. 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;54:3442-52.

Referenzen

151. 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;27:457-64.
152. 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.
153. 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;28:757-58.
154. Shimabukuro M, Tanaka H, Shimabukuro T. Effects of telmisartan on fat distribution in individuals with the metabolic syndrome. *J.Hypertens.* 2007;25:841-48.
155. 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;55:1159-64.
156. 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;39:372-76.
157. 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;24:146-53.

Referenzen

158. Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM *et al.* Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* 2001;15:2727-29.
159. Lee MA, Bohm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation* 1993;87:IV7-13.
160. Lewis EJ. The role of angiotensin II receptor blockers in preventing the progression of renal disease in patients with type 2 diabetes. *Am.J.Hypertens.* 2002;15:123S-8S.
161. Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J *et al.* Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:1952-61.
162. Devereux RB, Dahlof B, Kjeldsen SE, Julius S, Aurup P, Beevers G *et al.* Effects of losartan or atenolol in hypertensive patients without clinically evident vascular disease: a substudy of the LIFE randomized trial. *Ann.Intern.Med.* 2003;139:169-77.
163. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL *et al.* Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 2003;362:759-66.
164. Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs* 2004;64:2537-65.
165. Hildebrandt AL, Kelly-Sullivan DM, Black SC. Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur.J.Pharmacol.* 2003;462:125-32.

Referenzen

166. Hancock AA, Bennani YL, Bush EN, Esbenshade TA, Faghieh R, Fox GB *et al.* Antiobesity effects of A-331440, a novel non-imidazole histamine H3 receptor antagonist. *Eur.J.Pharmacol.* 2004;487:183-97.
167. Umrani DN, Banday AA, Hussain T, Lokhandwala MF. Rosiglitazone treatment restores renal dopamine receptor function in obese Zucker rats. *Hypertension* 2002;40:880-85.
168. 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;43:993-1002.
169. Xu H, Manivannan A, Dawson R, Crane IJ, Mack M, Sharp P *et al.* Differentiation to the CCR2+ inflammatory phenotype in vivo is a constitutive, time-limited property of blood monocytes and is independent of local inflammatory mediators. *J.Immunol.* 2005;175:6915-23.
170. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J.Clin.Invest* 2006;116:1494-505.
171. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J.Clin.Invest* 2006;116:115-24.
172. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest* 2003;112:1796-808.

Referenzen

173. Park SY, Cho YR, Kim HJ, Higashimori T, Danton C, Lee MK *et al.* Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes* 2005;54:3530-40.
174. Herder C, Hauner H, Kempf K, Kolb H, Skurk T. Constitutive and regulated expression and secretion of interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) in human adipocytes. *Int.J.Obes.(Lond)* 2007;31:403-10.
175. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2007;92:1023-33.
176. Maghazachi AA, Al Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur.J.Immunol.* 1996;26:315-19.
177. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J.Clin.Invest* 2007;117:175-84.
178. Auwerx J, Cock TA, Knouff C. PPAR-gamma: a thrifty transcription factor. *Nucl.Recept.Signal.* 2003;1:e006.
179. Jernas M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG *et al.* Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J.* 2006;20:1540-42.
180. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K *et al.* Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J.Clin.Invest* 1998;101:1354-61.

Referenzen

181. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J.Biol.Chem.* 2006;281:26602-14.
182. Peraldi P, Spiegelman BM. Studies of the mechanism of inhibition of insulin signaling by tumor necrosis factor-alpha. *J.Endocrinol.* 1997;155:219-20.
183. Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L *et al.* Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J.Biol.Chem.* 2000;275:4541-44.
184. Chung SW, Kang BY, Kim TS. Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. *Mol.Pharmacol.* 2003;64:1169-79.
185. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V *et al.* PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ.Res.* 2002;90:703-10.
186. Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J.Immunol.* 2000;164:6503-08.
187. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V *et al.* PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for

Referenzen

- atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ.Res.* 2002;90:703-10.
188. Walcher D, Hess K, Heinz P, Petscher K, Vasic D, Kintscher U *et al.* Telmisartan inhibits CD4-positive lymphocyte migration independent of the angiotensin type 1 receptor via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Hypertension* 2008;51:259-66.
189. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25:677-86.
190. Schneemann M, Schoedon G. Species differences in macrophage NO production are important. *Nat.Immunol.* 2002;3:102.
191. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C *et al.* Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005;54:2277-86.
192. Barnett A, Allsworth J, Jameson K, Mann R. A review of the effects of antihyperglycaemic agents on body weight: the potential of incretin targeted therapies. *Curr.Med.Res.Opin.* 2007;23:1493-507.
193. Yeap BB. Type 2 diabetes mellitus - Guidelines for initiating insulin therapy. *Aust.Fam.Physician* 2007;36:549-53.
194. Goldberg RB. The new clinical trials with thiazolidinediones - DREAM, ADOPT, and CHICAGO: promises fulfilled? *Curr.Opin.Lipidol.* 2007;18:435-42.

Referenzen

195. Charbonnel B, Dormandy J, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Skene A. The prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events (PROactive): can pioglitazone reduce cardiovascular events in diabetes? Study design and baseline characteristics of 5238 patients. *Diabetes Care* 2004;27:1647-53.
196. Herder C, Martin S, Kempf K, Rose B, Kolb H. The DREAM trial. *Lancet* 2006;368:2049-1.
197. Viberti G, Lachin J, Holman R, Zinman B, Haffner S, Kravitz B *et al.* A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT): baseline characteristics of Type 2 diabetic patients in North America and Europe. *Diabet.Med.* 2006;23:1289-94.
198. Sugimoto K, Qi NR, Kazdova L, Pravenec M, Ogihara T, Kurtz TW. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension* 2006;47:1003-09.
199. Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension* 2006;48:51-57.
200. Yamagishi S, Takenaka K, Inoue H. Role of insulin-sensitizing property of telmisartan, a commercially available angiotensin II type 1 receptor blocker in preventing the development of atrial fibrillation. *Med.Hypotheses* 2006;66:118-20.
201. 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 [γ] selective modulator. *Mol.Endocrinol.* 2003;17:662-76.

Referenzen

202. Reginato MJ, Bailey ST, Krakow SL, Minami C, Ishii S, Tanaka H *et al.* A potent antidiabetic thiazolidinedione with unique peroxisome proliferator-activated receptor gamma-activating properties. *J.Biol.Chem.* 1998;273:32679-84.
203. Henke BR, Blanchard SG, Brackeen MF, Brown KK, Cobb JE, Collins JL *et al.* N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J.Med.Chem.* 1998;41:5020-36.
204. Rocchi S, Picard F, Vamecq J, Gelman L, Potier N, Zeyer D *et al.* A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol.Cell* 2001;8:737-47.