Metabolische Wirkungen des ersten nicht-peptidischen Angiotensin II Rezeptor Typ 2 Agonisten

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

Sami Wardat

aus Berlin

Dezember 2011

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2008 bis September 2011 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Kintscher am Institut für Pharmakologie und Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité - Universitätsmedizin in Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kintscher

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Disputation am 04.04.2012

Für meine Familie

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Wardat S, Benz V, Paulis L, Iwai M, Horiuchi M, Dahlöf B, Hallberg A, Unger T, Kintscher U, Steckelings UM, Foryst-Ludwig A: Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation reduces adipose tissue-derived inflammation and improves obesity-related metabolic outcome in-vivo. *Diabetes 2011* (submitted)

Vorträge

Wardat S, Iwai M, Horiuchi M, Dahlöf B, Hallberg A, Unger T, Kintscher U, Steckelings UM, Foryst-Ludwig A: Angiotensin AT2R stimulation improves glucose tolerance and insulin sensitivity in obese mice. 21st European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Prevention of ESH, Mailand 2011 (*Journal of Hypertension Vol 29, e-Supplement A:e14, June 2011*)

Wardat S, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM, Foryst Ludwig A: TNFα and LPS - mediated inflammatory response in adipocytes and macrophages is attenuated by direct activation of angiotensin type 2 – receptors. (*Lifestyle and Risk Factors of Cardiovascular Diseases: Proceedings. ESH Satellite Symposium, Bratislava, Slovak Republic: Institute of Normal and Pathological Physiology, 2010; S27: ISBN 978-80-969544-6-9)*

Wardat S, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM, Foryst Ludwig A: TNFα-mediated inflammatory response in adipocytes is attenuated by the direct activation of angiotensin II AT2- receptors. Hypertonie 2009 der DHL, Lübeck (*Deutsche Medizinische Wochenzeitschrift 2009; 134:S247-S294*)

Poster

Wardat S, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM, Foryst Ludwig A: TNFα and LPS - mediated inflammatory response in adipocytes and macrophages is attenuated by direct activation of angiotensin type 2 – receptors. 45. Jahrestagung der DDG 2010, Stuttgart (*Diabetologie und Stoffwechsel 2010; 5:S1-S106*)

Wardat S, Kintscher U, Steckelings UM, Foryst Ludwig A: TNFα-mediated inflammatory response in adipocytes is attenuated by the direct activation of angiotensin II AT2- receptors. European Council for Cardiovascular Research, Nizza 2009 (*Hypertension 2009;54:1164-1187)*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Metabolisches Syndrom 1

1.1.1 Definition 1

1.1.2 Epidemiologie 3

1.2 Adipositas 3

1.3 Insulinresistenz und Diabetes 5

1.3.1 Insulinresistenz 5

1.3.2 Diabetes mellitus 6

1.3.3 Diagnose des Typ 2 Diabetes 6

1.3.4 Epidemiologie 7

1.3.5 Folgen 8

1.4 Pathophysiologie der Insulinresistenz 8

1.4.1 Lokale und systemische Insulinresistenz 8

1.4.2 Inflammation und Insulinresistenz 10

1.4.3 Das Fettgewebe als endokrines Organ 10

1.4.4 Adipozytokine 11

1.4.5 Inflammation im Fettgewebe 13

1.4.6 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz 15

1.5 Renin-Angiotensin-System 18

1.5.1 Grundlagen 18

1.5.2 Angiotensin AT1-Rezeptor 19

1.5.3 Angiotensin AT2-Rezeptor 20

1.5.4 Pharmakologische Intervention in das RAS 23

1.5.5 Pharmakologische Modelle am AT2-Rezeptor 23

1.5.6 Substanz C21 24

1.6 RAS, Insulinresistenz und Diabetes 25

1.6.1 ANG II vermittelte Insulinresistenz 25

1.6.2 Lokales RAS im Fettgewebe 26

1.6.3 Klinische Studien zur Blockade des RAS 27

1.6.4 Angiotensin AT1R-Blocker aktivieren PPARγ 28

1.6.5 Metabolische Effekte des AT2-Rezeptors 29

1.7 Hypothese und Zielsetzung 30

2 Material und Methoden 31

2.1 Material 31

2.1.1 Chemikalien und Substanzen 31

2.1.2 Kits 33

2.1.3 Laborgeräte 34

2.1.4 Medien und Zellkulturzusätze ... 36
2.1.5 Versuchstiere und Ziellinien ... 36
2.1.6 Verbrauchsmaterialien ... 37
2.1.7 Ausgewählte Zusatzmaterialien ... 38
2.1.8 Primer und Sonden ... 38
2.1.9 Nukleinsäuren und Enzyme ... 40
2.1.10 Molekulargewichtsmarker ... 40
2.1.11 Antikörper ... 40
2.1.12 Vektoren ... 41
2.1.13 Puffer und Lösungen ... 41
2.1.14 Software ... 43
2.2 Methoden ... 44
2.2.1 Modell des Tierversuchs ... 44
2.2.2 Blutdruckmessung ... 45
2.2.3 Metabolische Phänotypisierung ... 46
2.2.4 Bestimmung der Körperzusammensetzung ... 47
2.2.5 Metabolische Untersuchung im Stoffwechselkäfig ... 47
2.2.6 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme ... 48
2.2.7 Zellkultur ... 48
2.2.8 Molekularbiologische Methoden ... 51
2.2.9 Proteinbiochemische Methoden ... 55
2.2.10 Triglyzeridbestimmung ... 59
2.2.11 Histologische Untersuchungen ... 60
2.2.12 Statistische Berechnungen ... 61
3 Ergebnisse ... 62
3.1 AT2R-Stimulation in eukaryotischen Zellen ... 62
3.1.1 AT2R-Aktivierung in 3T3-L1 Adipozyten ... 62
3.1.2 AT2R-Aktivierung in THP-1 Makrophagen ... 67
3.1.3 Überprüfung der PPARγ Aktivität von C21 ... 69
3.2 AT2R-Stimulation im Adipositas-Modell der Maus ... 72
3.2.1 Körpergewichtsentwicklung ... 72
3.2.2 Blutdruckmessung ... 74
3.3 Metabolische Phänotypisierung ... 75
3.3.1 Glukose Toleranz Test (GTT) ... 76
3.3.2 Insulin Toleranz Test (ITT) ... 79
3.3.3 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig ... 82
3.4 Untersuchungen von Serum und Fettgewebe ... 85
3.4.1 Adipozytokine ... 85
3.4.2 Inkretine ... 90
3.4.3 Untersuchung der Zytokine IL-6, TNF-α und IL-10 ... 92

3.5 Triglyzeride 97
3.5.1 Serum 97
3.5.2 Leber 97
4 Diskussion 100
4.1 In-vitro 100
4.1.1 AT2R-Aktivierung führt zur Anti-Inflammation mit Modulation der Adipozytokin-Expression in 3T3-L1 Adipozyten 100
4.1.2 AT2R-Aktivierung führt zur Anti-Inflammation in THP-1 Makrophagen 103
4.1.3 Mechanismus der AT2R-vermittelten Anti-Inflammation 103
4.1.4 C21-Effekte sind PPARγ-unabhängig 106
4.2 In-vivo 107
4.2.1 AT2R wirkt modulatorisch auf den Blutdruck 107
4.2.2 AT2R-Aktivierung verbessert Glukose-Toleranz und Insulin-Sensitivität 109
4.2.3 AT2R reguliert das Köpergewicht 110
4.2.4 AT2R-Stimulation führt zu positiver Adipozytokin-Regulation 111
4.2.5 AT2R-Stimulation reguliert die Inkretine GLP-1 und GIP 113
4.2.6 AT2R-Aktivierung führt zu lokaler und systemischer Anti-Inflammation 114
4.2.7 AT2R-Stimulation reduziert Triglyzeride 116
4.2.8 C21 und Selektivität für den AT2R 117
4.2.9 Limitierung des Tiermodells und Übertragbarkeit auf den Menschen 118
4.3 Schlussfolgerung 120
4.4 Ausblick 121
5 Zusammenfassung 122
6 Summary 124
7 Literaturverzeichnis 126
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 139
9 Danksagung 141

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACE	Angiotensin-Conversions-Enzym
AGT	Angiotensinogen
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANG	Angiotensin
ANOVA	Analysis of variance
AP-1	Activation Protein 1
ARB	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Blocker
AT1R	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT2R	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
AUC	Area Under the Curve
BMI	Body Mass Index
C21	Compound 21
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
COX-2	Cyclooxigenase 2
CPT-1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
CRP	C-reaktives Protein
DIO	Diet-induced Obesity
DPP-4	Dipeptyl-Peptidase-4
ecSOD	extrazelluläre Superoxid-Dismutase
EET	Epoxyeicosatriensäure
EMA	European Medicines Agency
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FFS	Freie Fettsäuren
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phospat-Dehydrogenase
GIP	Glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP-1	Glucagon like peptide 1
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
GTT	Glukose Toleranz Test
h	Stunde
$HbA1_C$	Glykohämoglobin
HDL	High density lipoprotein

HFD	Hochfett-Diät
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
Hyd	Hydralazin
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IGT	Impaired glucose tolerance
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
IR	Insulinresistenz
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat Protein
ITT	Insulin Toleranz Test
IκB	Inhibitor of NF-κB
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LBD	Liganden Bindungsdomäne
LDL	Low density lipoprotein
LFD	Niedrigfett-Diät
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
MCP-1	Monozyten Chemotaktisches Protein 1
min.	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MS	Metabolisches Syndrom
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PGJ2	Prostaglandin J2
PI3K	Phosphatidylinisitol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B = AKT
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPARγ	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor gamma
qRT-PCR	Quantitative Real-time - Polymerase chain reaction
RAS	Renin-Angiotensin-System
RPM	Umdrehungen pro Minute

RQ	Respiratorischer Quotient
RXR	Retinolsäurerezeptor
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SHP-1	SH2 domain-containing Phosphatase 1
SNS	Sympathisches Nervensystem
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
TG	Triglyzeride
TGF-β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF-α	Tumornekrose Faktor alpha
UE	Untereinheit
Val	Valsartan
Veh	Vehikel
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Klinische Studien

ALLHAT	**A**ntihypertensive and **L**ipid-**L**owering Treatment to Prevent **H**eart **A**ttack **T**rial
CAPPP	**Ca**pto**p**ril **P**revention **P**roject
CHARM	**C**andesartan in **H**eart Failure-**A**ssessment of **R**eduction in **M**ortality and **M**orbidity
HOPE	**H**eart **O**utcomes **P**revention **E**valuation
LIFE	**L**osartan **I**ntervention **F**or **E**ndpoint Reduction in hypertension study
NAVIGATOR	**Na**teglinide and **V**alsartan in **I**mpaired **G**lucose **T**olerance **O**utcomes **R**esearch
ONTARGET	**On**going **T**elmisartan **A**lone and in combination with **R**amipril **G**lobal **E**ndpoint **T**rial
SOLVD	**S**tudies **O**f **L**eft **V**entricular **D**ysfunction
VALUE	**V**alsartan **A**ntihypertensive **L**ong-term **U**se **E**valuation

1 Einleitung

1.1 Metabolisches Syndrom

Der Lebensstil westlicher Industriestaaten ist gekennzeichnet durch einen hohen Anteil von Fehl- und Überernährung sowie Bewegungsmangel. Dieses Verhalten mündet meist in Folgeerkrankungen wie Fettleibigkeit (Adipositas), Bluthochdruck (Hypertonie), Störungen des Fettstoffwechsels (Dyslipidämien) und dem Auftreten einer Insulinresistenz (IR) mit anschließender Manifestation eines Diabetes Mellitus vom Typ 2 (T2DM). Das gleichzeitige Auftreten dieser Erkrankungen wird im Allgemeinen als metabolisches Syndrom (MS) zusammengefasst[1].

1.1.1 Definition

Bei der Definition des MS werden häufig die Klassifikationen der *World Health Organization* (WHO) oder der *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR) verwendet. Beide Organisationen verstehen unter dem MS die Summe aus dem Auftreten eines T2DM bzw. IR sowie von mindestens zwei weiteren Faktoren. Hierzu zählen neben Dyslipidämie (Triglyzeride ≥ 150 mg/dL, HDL < 35 mg/dL (WHO) bzw. Triglyzeride > 177 mg/dL, HDL < 40 mg/dL (EGIR)) auch der Faktor Hypertonie (≥ 140 zu 90 mmHg). Während bei der WHO-Definition der *Body Mass Index* (BMI) bzw. das Verhältnis von Taillen- zu Hüftumfang resp. das Auftreten einer Mikroalbuminurie als weitere Faktoren herangezogen werden, berücksichtigt die EGIR-Klassifikation lediglich den Taillenumfang und das Auftreten von Nüchternglukose ≥ 110 mg/dL als weiteren Faktor (Siehe Abb. 1.1).

Table I. Current definitions of the metabolic syndrome.

WHO 1999	EGIR 1999	ATPIII 2001	IDF 2005
Diabetes or impaired glucose tolerance or insulin resistance* Plus two or more of the following:	Insulin resistance† or hyperinsulinaemia (only non-diabetic subjects) Plus two or more of the following:	Three or more of the following:	Central obesity Waist circumference (ethnicity specific)‡ Plus any two of the following:
1. Obesity: BMI > 30 kg/m^2 or waist-hip ratio > 0.9 (M) > 0.85 (F)	1. Central obesity: waist circumference ⩾ 94 cm (M), ⩾ 80 cm (F)	1. Central obesity: waist circumference > 102 cm (M), > 88 cm (F)	1. Raised triglycerides ⩾ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) or specific treatment for this abnormality.
2. Dyslipidaemia: triglycerides ⩾ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) or HDL-C < 35 mg/dL (0.9 mmol/L) (M) < 39 mg/dL (1.0 mmol/L) (F)	2. Dyslipidaemia: triglycerides > 177 mg/dL (2.0 mmol/L) or HDL-C < 40 mg/dL (1.0 mmol/L)	2. Hypertriglyceridaemia: triglycerides ⩾ 150 mg/dL (1.7 mmol/L)	2. Reduced HDL-C < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) (M) < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) (F) or specific treatment for this abnormality
3. Hypertension: blood pressure ⩾ 140/90 mmHg or medication	3. Hypertension: blood pressure ⩾ 140/90 mmHg or medication	3. Low HDL-C: < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) (M), < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) (F)	3. Hypertension: blood pressure ⩾ 130/85 mmHg or medication.
4. Microalbuminuria: albumin excretion ⩾ 20 μg/min or albumin:creatinine ratio ⩾ 30 mg/g	4. Fasting plasma glucose ⩾ 110 mg/dL (6.1 mmol/L)	4. Hypertension: blood pressure ⩾ 130/85 mmHg or medication 5. Fasting plasma glucose ⩾ 110 mg/dL (6.1 mmol/L)	4. Fasting plasma glucose ⩾ 100 mg/dL (5.6 mmol/L) or previously diagnosed type 2 diabetes§

Abb. 1.1 Klassifizierungen des metabolischen Syndroms

Quelle: *Magliano DJ et al.* How to best define the metabolic syndrome[2]

Des Weiteren existieren zwei jüngere Klassifikationen des *Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults* (Adult Treatment Panel III (ATPIII)) und der *International Diabetes Federation* (IDF). Das ATPIII versteht hierbei unter dem MS das Auftreten von mindestens drei Faktoren aus abdomineller Adipositas, Dyslipidämie, Hypertonie und erhöhter Nüchternglukose mit ihren jeweiligen Grenzwerten. Die IDF betrachtet für ihre Klassifikation zentral die abdominelle Adipositas und definiert außerdem mindestens zwei weitere Faktoren aus Dyslipidämie, Bluthochdruck bzw. erhöhter Nüchternglukose als MS (siehe Abb. 1.1).

Die Definitionen der WHO und der EGIR rücken die IR bzw. einen manifesten T2DM ins Zentrum der Diagnose, während die jüngste Definition nach IDF auf die abdominelle Adipositas fokussiert. Das ATPIII klassifiziert hingegen das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren mit ihrer jeweiligen statistischen Vorhersagbarkeit für kardiovaskuläre Zwischenfälle. Nach welcher Klassifikation bei einem Patienten das MS diagnostiziert wird hängt dementsprechend von der verwendeten Definition des jeweiligen Klinikers ab.

1.1.2 Epidemiologie

Durch Veränderungen innerhalb der westlichen Gesellschaft, insbesondere nach dem zweitem Weltkrieg, kam es in den letzten 60 Jahren durch Wohlstand und Nahrungsüberfluss - begleitet von abnehmender körperlicher Aktivität - zu einem rapiden weltweiten Anstieg des MS. So liegen in Europa und Deutschland, je nach Kriterien und Studie, die Prävalenzzahlen zwischen 20 bis 30%[3]. In den USA beträgt die Prävalenz sogar 34 bis 38%[4]. Es ist festzuhalten, dass die Prävalenz stark vom Lebensalter, Geschlecht sowie von ethnischen und sozialen Hintergründen abhängt[5]. Zahlreiche Studien haben die strenge Assoziation zwischen dem MS und dem Auftreten von Herzinfarkten, Schlaganfällen, Diabetes sowie allgemein erhöhter Gesamtmortalität beschrieben[1,3,6]. Beispielsweise ist beim MS das Auftreten eines T2DM bzw. kardiovaskulärer Ereignisse um das 2 bis 3-fache erhöht[5].
Im Folgenden sollen einzelne Komponenten des MS genauer besprochen werden.

1.2 Adipositas

Als einer von mehreren Faktoren des MS korreliert das Auftreten von Adipositas mit dessen Prävalenz und stellt somit ebenfalls eines der dominierenden Gesundheitsprobleme in den westlichen Industrieländern dar. Nach Definition der WHO liegt eine Adipositas ab einem BMI von 30 kg/m² vor, wobei drei Schweregrade unterschieden werden, zu deren Abgrenzung ebenfalls der BMI herangezogen wird. Ab einem BMI von ≥ 40 kg/m², dem Adipositas Grad III, spricht man von einer Adipositas permagna[7,8]. Die Ursachen der Adipositas liegen in einer positiven Energiebilanz gegenüber dem Verbrauch mit anschließend zunehmender Energiespeicherung in Form von Fettgewebe. Neben exogenen Faktoren wie Bewegung, Ernährungsverhalten und soziokulturellen „life-style“-Aspekten, tragen auch genetische Faktoren zur Ausprägung und Prädisposition der Adipositas bei[9]. Zusätzlich zum BMI bestimmt auch das Fettverteilungsmuster das Risiko für Adipositas-assoziierte kardiovaskuläre Erkrankungen[10]. Hierfür wird der Bauchumfang als Maß für die viszerale bzw. abdominelle Adipositas herangezogen. Ein Erhöhtes Risiko liegt bei Frauen ab 80 cm bzw. bei Männern ab 94 cm Bauchumfang vor[11].

In den letzten beiden Jahrzehnten zeigte sich ein explosionsartiger Anstieg der Prävalenz der Adipositas. Nach Angaben der WHO waren 1995 weltweit 200 Millionen Menschen adipös, fünf Jahre später waren es bereits 300 Millionen. Teilweise sind in den westlichen Industrieländern bereits bis zu zwei Drittel der Bevölkerung übergewichtig (Präadipositas; BMI von 25 bis 29,9 kg/m²) oder adipös[12]. Eine aktuelle Studie der *International Association for the Study of Obesity* (IASO) und der *International Obesity Taskforce* (IOTF) aus dem Jahr 2010 schätzt den Anteil adipöser Menschen auf bereits 475 Millionen weltweit[13].

In Deutschland konnte in den letzten 20 Jahren eine Zunahme der Adipositasprävalenz im Durchschnitt von etwa 42% beobachtet werden[14]. Nach aktuellen Schätzungen der IASO sind in Deutschland mittlerweile etwa 23% der Bevölkerung adipös. Im europäischen Vergleich liegt Deutschland damit im oberen Drittel. In den USA sind nach Schätzungen des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) bereits ca. 30% der Einwohner adipös. Die Abb. 1.2 zeigt die Inzidenz der adipösen Bevölkerung (BMI > 30 kg/m²) in den USA von 1990 bis 2009[15].

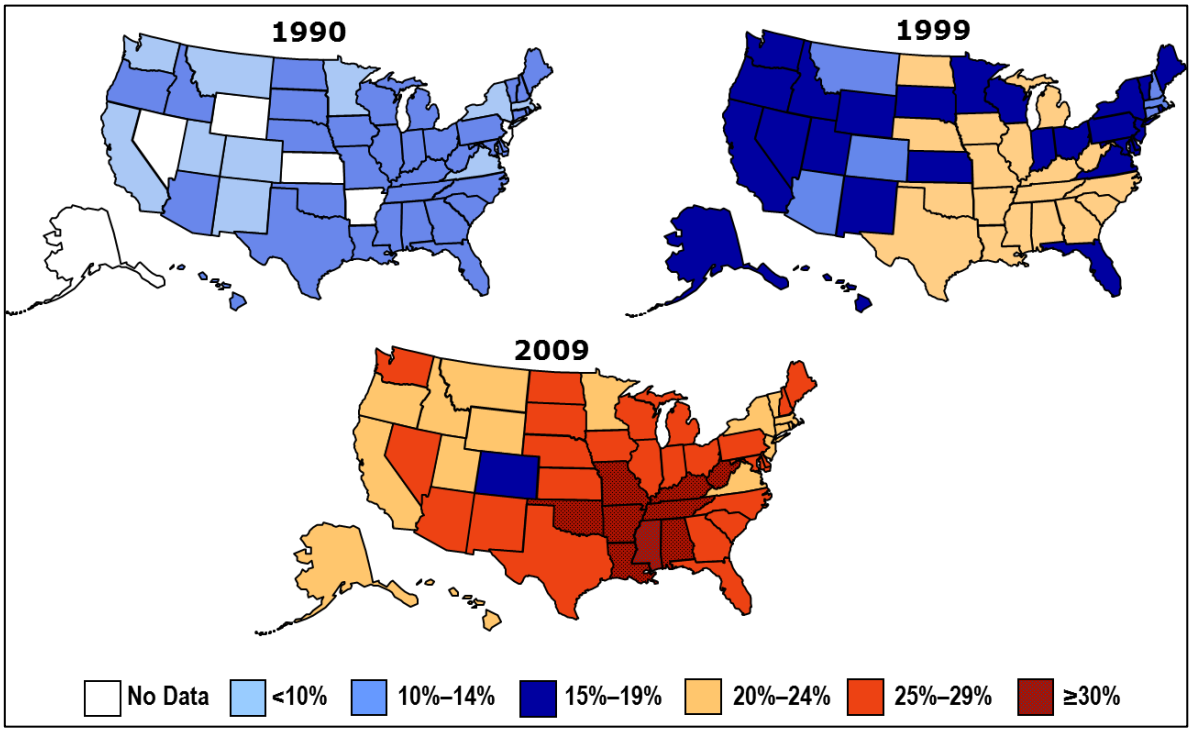

Abb. 1.2 Prozentualer Anteil der adipösen Bevölkerung (BMI > 30) der USA in den Jahren 1990, 1999 und 2009

Quelle: Behavioral Risk Factor Surveillance System, CDC[16]

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Adipositas und Übergewicht in strenger Korrelation mit dem Auftreten von T2DM, Schlaganfall, Hypertonie, Dyslipidämien und sogar einigen Krebsformen stehen, wobei die Mortalität wiederum stark vom ethnischen Hintergrund abhängt[17]. Die Therapiemöglichkeiten sind begrenzt und beschränken sich vor allem auf eine drastische Reduktion der Kalorienzufuhr mit nachhaltiger Ernährungsumstellung und gleichzeitiger Steigerung der körperlichen Aktivität. Möglich ist außerdem eine chirurgische Interventionen in Form von Magenballons- und bypässen[18].

Das einzige derzeitig in Deutschland zugelassene Arzneimittel zur Behandlung der Adipositas ab einem BMI 28 kg/m² ist Xenical®. Beim Wirkstoff Orlistat (120 mg) handelt es sich um einen unspezifischen Inhibitor gastrointestinaler Lipasen. Dadurch kann das inaktivierte Enzym nicht die in Form von Triglyzeriden vorliegenden Nahrungsfette in resorbierbare freie Fettsäuren und Monoglyzeride hydrolisieren. Seit 2009 steht auch 60 mg Orlistat rezeptfrei unter dem Namen Alli® in Europa zur Verfügung. Die Behandlung mit Orlistat ist relativ nebenwirkungsreich. Häufig treten neben unangenehmen Steatorrhoen und Flatulenzen auch Vitaminmangelerscheinungen aufgrund von Malabsorption auf[18,19].

1.3 Insulinresistenz und Diabetes

1.3.1 Insulinresistenz

Unter IR versteht man eine reduzierte, nicht adäquate Wirkung des Insulins an peripheren Zielorganen wie Muskel, Leber und Fettgewebe. Die Dosis-Wirkungs-Kurve des Insulins ist folglich nach rechts verschoben[20]. Die verminderte biologische Wirksamkeit des Insulins wird zunächst kompensatorisch durch Hyperplasie der pankreatischen β-Zellmasse und vermehrter Expression regulatorischer Enzyme der Insulinsynthese in der β-Zelle bei normalen Blutglukosespiegeln ausgeglichen. Es kommt zu einer erhöhten Insulinsynthese und folglich zur Hyperinsulinämie. Nach Ausfall der kompensatorischen Mechanismen folgt die unkompensierte Hyperglykämie mit gestörter Glukosetoleranz (IGT). Somit geht die IR meist der Entwicklung eines T2DM voraus[21,22].

1.3.2 Diabetes mellitus

Mit dem Begriff Diabetes mellitus „Honigsüßer Durchfluss“ wird eine Gruppe metabolischer Erkrankungen beschrieben, die alle phänotypisch mit einer Hyperglykämie einhergehen. Abhängig von der Ätiologie wird die Hyperglykämie durch eine stark herabgesetzte bzw. gestörte Insulinsekretion oder Insulinresistenz vermittelt, die mit verminderter Glukoseaufnahme bzw. gesteigerter oder gestörter Glukoseproduktion assoziiert ist. Diese metabolische Entgleisung führt zu weiteren sekundären pathophysiologischen Veränderungen an zahlreichen Organsystemen, Blutgefäßen und am Nervensystem, welche zur erhöhten Morbidität und Mortalität der Diabetespatienten beitragen.

Die beiden Hauptformen des Diabetes sind einerseits der absolute Insulinmangel (T1DM), andererseits der relative Insulinmangel (T2DM). Beim Typ 1 liegt als Hauptursache meist eine Autoimmunerkrankung vor, die zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden β-Zellen des Pankreas führt. Unter dem Typ 2 wird eine Gruppe von heterogenen Erkrankungen zusammengefasst, welche durch unterschiedlich ausgeprägte IR, gestörte Glukoseproduktion und -verwertung mit dem gemeinsamen Leitsymptom der Hyperglykämie sowie einem gestörten Lipidstoffwechsel gekennzeichnet sind[23,24]. Aufgrund des vollständigen Insulindefizits erfolgt die Behandlung des T1DM in erster Linie mit Insulin und dessen Analoga[25]. Die aktuellen Therapieleitlinien der *Deutschen Diabetes Gesellschaft* (DDG) zur Behandlung des T2DM sind in der Referenz[26] beschrieben.

1.3.3 Diagnose des Typ 2 Diabetes

Der Manifestation des T2DM geht eine Phase der Glukosestoffwechselstörung voraus, die als abnorme Nüchternglukose bzw. als IGT (Impaired glucose tolerance) klassifiziert wird. Einen ersten Hinweis auf einen T2DM liefern erhöhte Nüchternglukosespiegel. Pathologisch ist dieser in der Diagnostik ab einem Wert von ≥ 126 mg/dL. Ein anderes Diagnosemerkmal stellt der 2 h-Wert in einem oralen Glukose Toleranz Test (oGTT) nach der Gabe von 75 mg Glukose dar. Ist der oGTT-Wert nach 2 h oder die Gelegenheitsplasmaglukose ≥ 200 mg / dL bzw. die Nüchternglukose zwei Mal in Folge ≥ 126 mg/dL, so wird dies nach WHO Einstufung als T2DM klassifiziert[23]. Neu in den Praxisleitlinien der DDG wurde zur Diagnose der $HbA1_C$ von ≥ 6,5%, also der Anteil von nicht-enzymatisch glykiertem Hämoglobin, aufgenommen[27].

1.3.4 Epidemiologie

Als ein wichtiger Faktor des MS ist die Inzidenz des Diabetes Mellitus in den letzten 40 Jahren dramatisch angestiegen. Mehr als 90% entfallen hierbei auf den T2DM[28]. Waren es 1980 noch weltweit geschätzte 153 Millionen Menschen mit einem diagnostizierten Diabetes, so schätzt eine aktuelle Studie die Anzahl auf weltweit ca. 347 Millionen[29]. In den letzten 30 Jahren hat sich somit der Anteil der Diabetiker mehr als verdoppelt.

Durch Daten des nationalen Diabetesregisters der ehemaligen DDR und Krankenkassendaten der AOK konnte Ende der 80er Jahre eine Gesamtprävalenz des Diabetes von etwa 4 bis 5% in Deutschland ermittelt werden[30]. Im Jahre 2010 waren es nach Schätzungen der IDF bereits ungefähr 7,5 Millionen Diabetiker, entsprechend 8,9% der Bevölkerung[31]. Die Dunkelziffer von nicht diagnostiziertem Diabetes ist hierbei nicht berücksichtigt, sollte jedoch nicht unterschätzt werden[32]. Die Abb. 1.3 zeigt noch einmal grafisch die Inzidenz von Diabetes in den USA in den Jahren 1994 bis 2009.

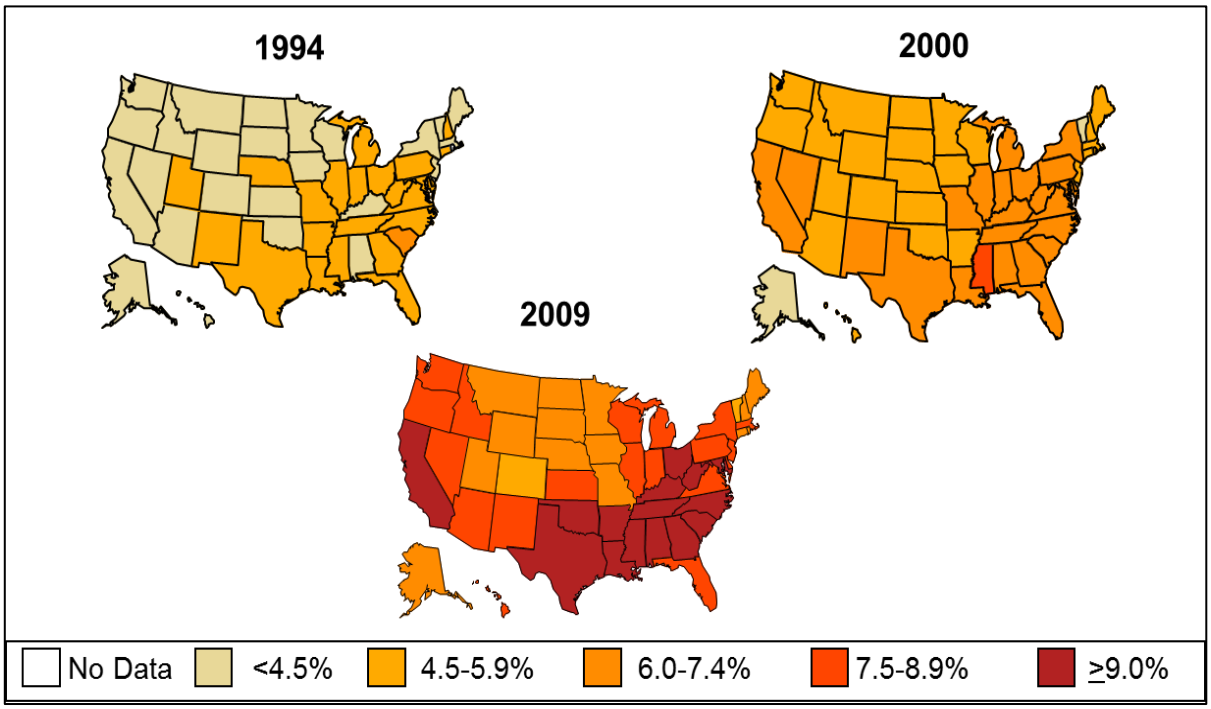

Abb. 1.3 Prozentualer Anteil der diabetischen Bevölkerung der USA in den Jahren 1994, 2000 und 2009

Quelle: Behavioral Risk Factor Surveillance System, CDC[33]

1.3.5 Folgen

Die chronischen Komplikationen von Diabetes betreffen zahlreiche Organsysteme und sind für erhöhte Morbidität und Mortalität verantwortlich. Es kommt vermehrt zu mikrovaskulären Komplikationen wie Retino-, Nephro- und Neuropathien. Makrovaskulär treten verhäuft die koronare Herzkrankheit (KHK) sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) in Erscheinung. Das Gesamtrisiko für kardiovaskuläre Begleiterkrankungen ist um das 1,5 bis 4,5-fache erhöht. Die Gesamtmortalität eines Diabetikers ist um das 1,5 bis 2,7-fache erhöht[34]. Die Lebenserwartung ist bei einer Diagnose im Alter zwischen 60 und 70 Jahren um ca. fünf Jahre reduziert. In einer US-Studie der *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) war die Lebenserwartung bei 55-64 jährigen Diabetikern sogar um acht Jahre reduziert[25]. Auch in der europäischen DECODE-Studie (*Diabetes-Epidemiology: Collobarative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe*) konnte eine Korrelation zwischen Diabetes und erhöhter Mortalität gezeigt werden[35]. Diabetes wird demnach als ein unabhängiger Mortalitätsfaktor angesehen, wenngleich er meist in Koexistenz zur abdominellen Adipositas, Bluthochdruck und Dyslipidämien auftritt[34].

1.4 Pathophysiologie der Insulinresistenz

1.4.1 Lokale und systemische Insulinresistenz

Wie einleitend beschrieben, geht die Entwicklung der IR einer Manifestation des T2DM voraus. Zusätzlich wird die IR als zentraler pathogenetischer Faktor bei der Entstehung des MS diskutiert. Vermutlich resultiert die IR aus einer Kombination an genetischer Prädisposition und Adipositas, denn es besteht eine enge Assoziation zwischen dem Körperfettgehalt und der Insulinsensitivität[36]. Adipositas und körperliche Inaktivität korrelieren streng mit dem Auftreten der IR[20,37]. Die IR ist gekennzeichnet durch die reduzierte Fähigkeit des Insulins, die Glukoseaufnahme in den peripheren Organen wie Muskel und Fettgewebe zu stimulieren sowie die Glukoneogenese der Leber zu hemmen[38]. Die Abb. 1.4 zeigt, wie im Zuge der Ätiologie der Adipositas vermehrt Triglyzeride (TG) besonders im viszeralen und subkutanen Fettgewebe eingelagert werden. Die Folgen sind Hypertrophie und Wachstum der Adipozyten. Das Fettgewebe wird resistent gegenüber der Insulin-vermittelten Hemmung der Lipolyse[20]. Das Fettgewebe reagiert mit erhöhter Lipolyse und Freisetzung von freien Fettsäuren (FFS). Zirkulierende FFS führen zusätzlich zu Stress

im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zellen des Fettgewebes, der Leber und des Skelettmuskels. Beispielsweise führt die Belastung des ER in Adipozyten zu einer Verminderung der Expression des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT-4[39]. Darüber hinaus ist eine pro-inflammatorische Lymphozyten- und Makrophageninfiltration/ -aktivierung sowohl im Fettgewebe als auch im Muskel zu beobachten[40,41]. Durch die erhöhte Konzentration an FFS im Plasma besteht ein größeres Angebot an die Skelettmuskulatur. Die erhöhte Fettsäureaufnahme in den Muskel führt dort zur Fettakkumulation. Bedingt wird dieser Prozess durch das Missverhältnis aus erhöhter Fettsäureaufnahme und verminderter β-Oxidation, die zur TG-Produktion aus FFS führt. Ein erhöhter intramuskulärer Fettgehalt im Muskel fördert die weitere Makrophageninfliltration und -aktivierung[41] und steht in enger Korrelation mit der IR[42]. In der Leber führt die Einlagerung der TG zur nicht-alkoholischen Steatosis hepatis, einer Aktivierung von Kupffer-Sternzellen und einer damit verbundenen Inflammation und Zytokinproduktion[41].

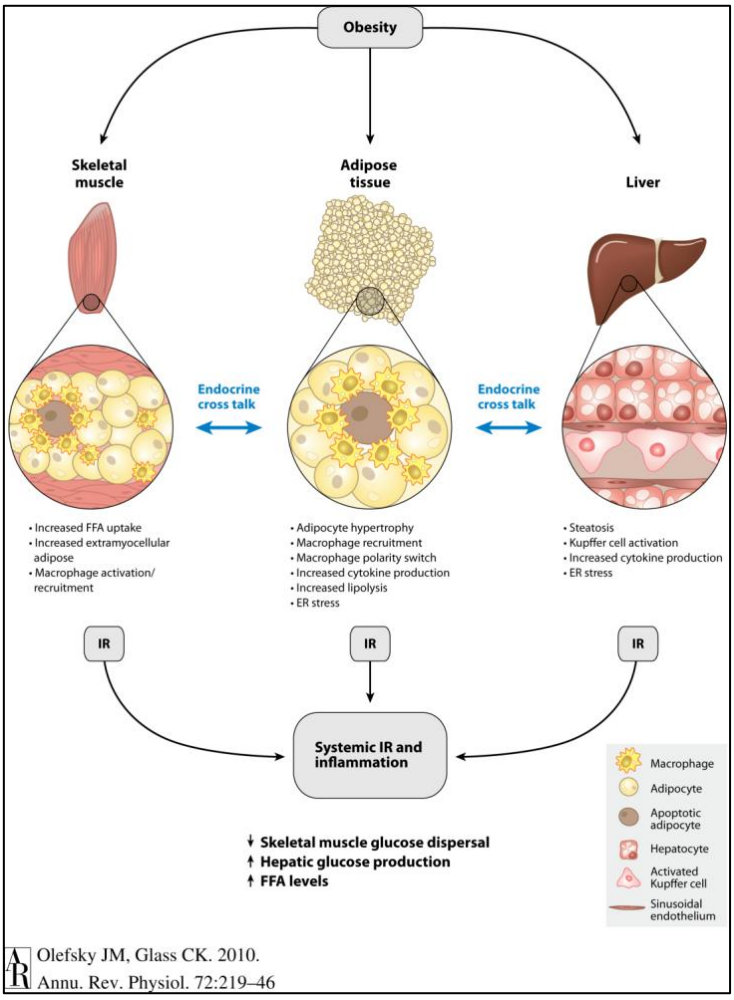

Abb. 1.4 Zusammenhang zwischen Adipositas und Insulinresistenz in Muskel, Fett und Leber

Quelle: *Olefsky JM et al.* Macrophages, inflammation, and insulin resistance[38]

Letzen Endes führen die Mechanismen zu einer zellautonomen lokalen Inflammation und IR in peripheren Organen mit der Folge einer global-systemischen Ausweitung.

1.4.2 Inflammation und Insulinresistenz

Zahlreiche klinische und epidemiologische Studien haben einen klaren Zusammenhang zwischen Inflammation und Entwicklung der IR hergestellt. So wurden beispielsweise eine Korrelation zwischen erhöhter Fettmasse und erhöhten Plasmaspiegeln des pro-inflammatorischen Markers C-reaktives Protein (CRP) gezeigt[43]. Auch konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass die Plasmaspiegel des CRP und seines Induktors IL-6 sowie anderer pro-inflammatorischer Zytokine eine Aussagekraft für die Entwicklung von IR und anschließender Manifestation eines T2DM in verschiedenen Populationen besitzen[44,45]. Die lokale Inflammation im Fettgewebe mit resultierender systemischer Inflammation wird hierbei als eine der Hauptursachen der systemischen IR angesehen. Das Fettgewebe wird somit nichtmehr nur als klassisches Organ zur Energiespeicherung angesehen, sondern nimmt sowohl lokal, über auto- und parakrine Effekte, als auch systemisch, über endokrine Wirkungen, Einfluss auf metabolische und inflammatorische Prozesse.

1.4.3 Das Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe produziert eine Vielzahl von Hormonen, bioaktiven Peptiden und Zytokinen. So werden beispielsweise Steroidhormone wie Glukokortikoide, Sexualhormone, Peptidhormone und deren Vorstufen wie z.B. Angiotensinogen (AGT) sezerniert. Aber auch Faktoren des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade wie Adipsin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-6 und das Monozyten-Chemotaktische-Protein 1 (MCP-1), anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-4 sowie Metabolite und Regulatoren des Lipidmetabolismus wie FFS, Lipoproteinlipase (LPL) und Apolipoprotein E werden vom Fettgewebe ausgeschüttet[46]. Während einige dieser Faktoren hauptsächlich auto- bzw. parakrin wirken, erreichen andere Peptide relativ hohe Plasmakonzentrationen. Dazu zählen Adipozytokine wie das Adiponektin, Leptin und Resistin, die somit Einfluss auf die peripheren Organe wie Muskel, Leber, Pankreas und Gehirn besitzen. Neben der Regulation von Appetit, Körpergewicht und Energieverbrauch regulieren die Adipozytokine auch die Insulinsensitivität[47].

1.4.4 Adipozytokine

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei Adipozytokine Adiponektin, Leptin und Resistin untersucht und werden daher im Folgenden detaillierter beschrieben.

1.4.4.1 Adiponektin

Adiponektin wird vorwiegend im Fettgewebe produziert. In geringen Mengen wird es auch vom Skelettmuskel, von kardialen Myozyten und Endothelzellen sezerniert. Adiponektin erreicht Plasmaspiegel zwischen 3 und 30 µg/mL[48–50]. Das Peptid besitzt ein Molekulargewicht von 30 kD, wobei sich durch Oligomerisierung Trimere (low molecular weight (LMW)) bilden, die sich weiter zu Hexameren zusammenlagern können (middle molecular weight (MMW)). Zudem findet man im Plasma eine hochmolekulare Polymerform (high molecular weight (HMW)), bestehend aus 12 bis 18 Monomeren[51]. Die biologische Relevanz der unterschiedlichen Formen wird im Diskussionsteil erörtert. Die Plasmaspiegel des Adiponektins sind bei Adipositas, IR sowie anderen kardiovaskulären Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen erniedrigt[52,53]. Es konnte gezeigt werden, dass die Adiponektin-Konzentration negativ mit der viszeralen Fettmasse korreliert[52] und dass Adiponektin-Spiegel bei Typ 2 Diabetikern verringert sind[50]. Gleichzeitig werden pro-inflammatorische CRP Spiegel negativ mit der Adiponektin-Konzentration korreliert[54]. Zudem reduzieren pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α und IL-6 die Expression von Adiponektin im Fettgewebe. So konnte für diese Zytokine in 3T3L-1 Adipozyten gezeigt werden, dass diese direkt die Transkription und Translation reduzieren, welches die verringerten Spiegel in adipösen und diabetischen Patienten erklären könnte[55,56].

Adiponektin vermittelt außerdem direkt anti-inflammatorische Effekte, wahrscheinlich über eine Hemmung der NF-κB-Aktivierung[57] und induziert gleichzeitig die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie dem IL-10 und dem IL-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1 RA)[58]. Darüber hinaus fördert Adiponektin den Polarisationswechsel von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen[59]. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Adiponektin selbst zu einer Verbesserung der Insulinsignalwirkung bzw. Insulinsensitivität führt[60,61]. Hierbei stellt Adiponektin ein klassisches Zielgen des Peroxisom-Proliferator-Aktivierten-Rezeptors-γ (PPARγ) dar.

Thiazolidindione oder Glitazone, welche zurzeit noch als Arzneimittel zur Behandlung des T2DM als „Insulin Sensitizer“ eingesetzt werden, fördern als PPARγ-Liganden die Adipozyten-Differenzierung und induzieren die Adiponektin-Produktion[62].

1.4.4.2 Leptin

Leptin wird hauptsächlich im Fettgewebe produziert und besitzt ein Molekulargewicht von 16 kD. Die Plasmaspiegel korrelieren daher mit der Menge des Fettgewebes und sind bei Adipositas beim Menschen und im Tiermodell entsprechend erhöht[63]. Im Gegensatz zum Adiponektin weist es pro-inflammatorische Eigenschaften auf und ist strukturell mit anderen pro-inflammatorischen Zytokinen der TNF-α Familie und dem IL-6 verwandt. Das Peptid induziert die Expression von TNF-α, IL-6, MCP-1 und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen[64] über die Aktivierung von JNKinase (JNK) und NF-κB Signalwegen[65,66]. Hierdurch kann die Insulinsensitivität durch Leptin negativ beeinflusst werden[67].

Im zentralen Nervensystem (ZNS) hemmt Leptin den Appetit. Entsprechend der erhöhten Fettmasse weisen adipöse Menschen sehr hohe Plasmaspiegel an Leptin auf, ohne dabei die zu erwartenden anorektischen Begleiteffekte zu besitzen[68] (siehe 4.2.4). Zwei unterschiedliche Mausmodelle zeigen den Effekt einer unzureichenden bzw. fehlenden zentralen Leptinwirkung: Die ob/ob Maus mit einer Mutation im Leptin-Gen (Leptindefizienz) sowie die db/db Maus mit einer Mutation des Leptin-Rezeptors (Leptinresistenz) entwickeln eine Adipositas aufgrund extremer Hyperphagie.

1.4.4.3 Resistin

Resistin besitzt ein Molekulargewicht von 12,5 kD und wird in Nagetieren exklusiv vom Fettgewebe produziert[69]. Beim Menschen wird eine größere Produktion vor allem in Makrophagen und Monozyten beschrieben[70]. Das Peptid wirkt pro-inflammatorisch und induziert die Expression von IL-1β, TNF-α und IL-6 über einen NF-κB abhängigen Signalweg[71]. Gleichzeitig wird die Resistin-Expression durch IL-6 und TNF-α erhöht[72]. Zusätzlich konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Resistin direkt zur IR führt[69]. Andere Studien stellen auch für den Menschen einen engen Zusammenhang zwischen erhöhten Resistin-Konzentrationen und der Entwicklung von T2DM her[73].

1.4.5 Inflammation im Fettgewebe

Die zentrale Rolle der lokalen Inflammation im Fettgewebe in der Pathophysiologie der IR wird im Folgenden erläutert (siehe Abb. 1.5). Das Fettgewebe besteht aus einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen wie den Adipozyten, Immunzellen (Makrophagen und Lymphozyten), Präadipozyten und Endothelzellen. Durch die erhöhte Adipozytenmasse bei der Adipositas verändern die Adipozyten des Fettgewebes durch Wachstum und Änderung ihrer Morphologie auch ihre parakrine Funktion. Steigende Spiegel an Zytokinen und FFS sowie die Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen führen neben einer Verschiebung der Adipozytokin-Expression zunächst zur Inflammation, anschließend wahrscheinlich zur IR und letztlich zum T2DM[74].

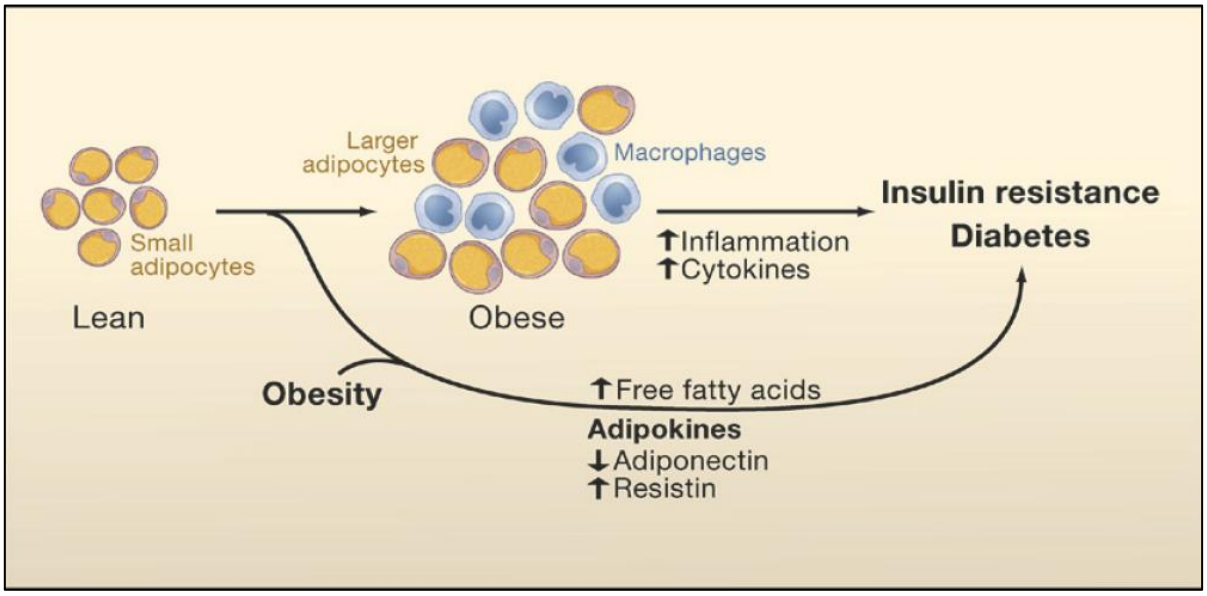

Abb. 1.5 Adipositas induzierte Inflammation und Insulinresistenz

Quelle: *Olefsky JM et al.* IKKepsilon: a bridge between obesity and inflammation[74]

Im normalgewichtigen, insulin-sensitiven Zustand (Abb. 1.6), produzieren sogenannte M2 polarisierte Fettgewebsmakrophagen anti-inflammatorische, gewebeprotektive Spiegel an IL-10 und Adipozyten sezernieren insulin-sensitivierendes Adiponektin. Durch nahrungsbedingte Gewichtszunahme (Diät-induzierte Adipositas (DIO) im Mausmodell) beginnen im Fettgewebe Präadipozyten eine vermehrte Ausschüttung von TNF-α. Dies stimuliert unter anderem Adipozyten zur vermehrten Produktion von MCP-1. Gleichzeitig wird das MCP-1 in Abhängigkeit des Zytokinmilieus ebenfalls von Endothelzellen produziert. Diese parallele Ausschüttung führt zur chemotaktischen Infiltration von

pro-inflammatorischen M1 Makrophagen sowie deren lokaler Aktivierung (Polarisationswechsel von M2 zu M1)[75]. M1 Makrophagen sezernieren ihrerseits selbst MCP-1 und potenzieren somit ihre eigene Infiltration. In diesem noch insulin-sensitiven Zustand können die M2 Fettgewebsmakrophagen teilweise das Fettgewebe vor pro-inflammatorischen Einflüssen schützen. Mit weiterer Zunahme an Körpergewicht beobachtet man eine Adipozytokinverschiebung mit erhöhten Spiegeln von Leptin, Resistin und stark verringerten Adiponektin-Spiegeln[76]. Somit wird das Adipozytokinmilieu in Richtung einer pro-inflammatorischen und insulin-desensitivierenden Seite verschoben. Die zunehmend infiltrierenden inflammatorischen Makrophagen bilden sogenannte Crown-like (Kronen-ähnliche) Strukturen[77] (CLS) mit einer ausgeprägten Produktion von TNF-α, IL-6, IL-1β und MCP-1. Die anti-inflammatorischen Effekte der M2 Makrophagen werden damit überwunden. Diese Zytokine führen dann höchstwahrscheinlich über eine Aktivierung von JNK und NF-κB Signalwegen zur IR[78–80].

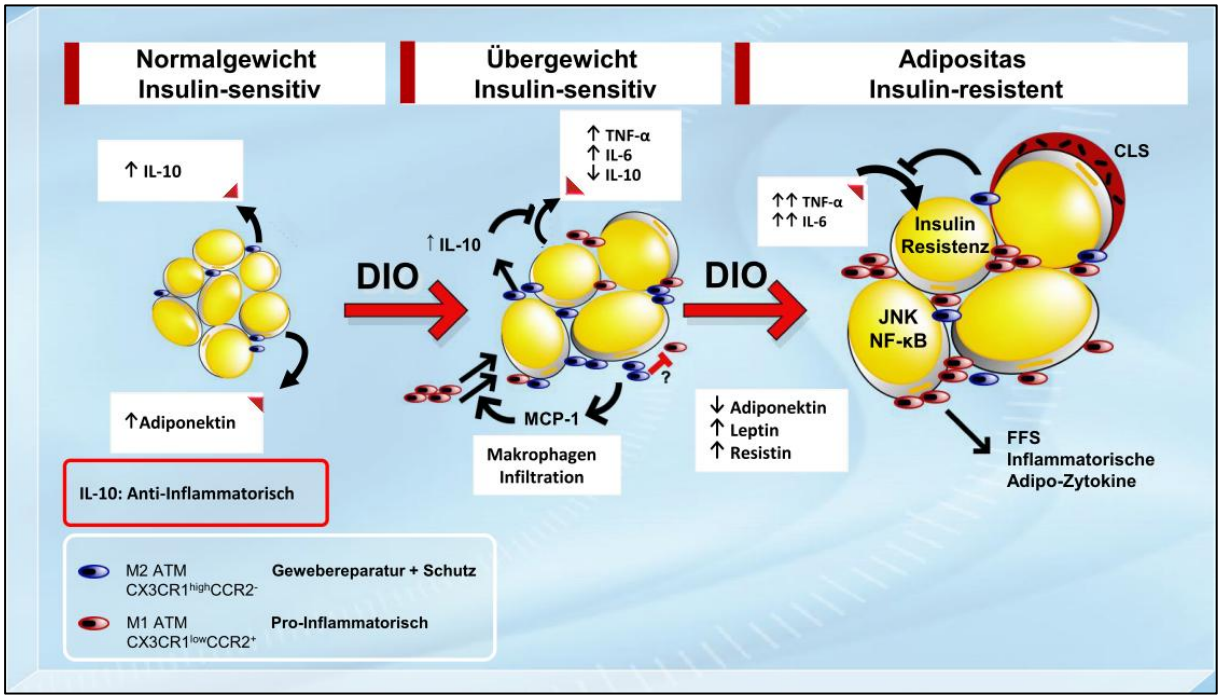

Abb. 1.6 Inflammation im Fettgewebe

Quelle: Angepasst nach *Lumeng CN et al.* Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization[76]

1.4.6 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz

Eine molekulare Schlüsselrolle in der Inflammation-induzierten IR wird der Aktivierung von JNK und NF-κB Signalwegen zugesprochen[79].

1.4.6.1 NF-κB

Der NF-κB ist von großer Bedeutung in der Regulation der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose. Ihm kommt als Transkriptionsfaktor eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung von Entzündungsprozessen zu. NF-κB ist ein Dimer bestehend aus einer p50 und einer p65 Untereinheit (UE). Im inaktiven Zustand liegt NF-κB als Komplex mit seinem Inhibitor IκB im Zytoplasma vor. Nach Stimulation der Zelle kommt es zur Aktivierung einer IκB-Kinase (IKK), die IκB phosphoryliert und dessen proteolytischen Abbau, durch Degradation mit anschließender Ubiquitinierung, induziert. Der so freigesetzte Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern und steigert nach Bindung an spezifische DNA-Bindungsstellen die Transkriptionsrate von pro-inflammatorischen Zielgenen wie TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, MCP-1, IL-8, sowie anderen Wachstumsfaktoren, Komplementfaktoren und der Cyclooxygenase 2 (COX-2)[81,82]. Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF-α führen über ihre entsprechenden Zytokinrezeptoren zu einer Induktion von IKK, zur Degradation vom IκB und konsekutiv zur Aktivierung der Transkription von NF-κB. Bakterielle Endotoxine wie Lipopolysacchride (LPS) sowie FFS führen über Toll-like Rezeptoren (TLR) ebenfalls zu einer Induktion von IKK und somit zur Aktivierung von NF-κB[82,83].

Zellkulturversuche mit humanen HEK-293 Zellen, in denen IKK überexprimiert wurde, zeigten eine abgeschwächte Insulin-Wirkung. Gleichzeitig konnte *in-vivo* an ob/ob Mäusen mit einem IKK-Knockout (KO) gezeigt werden, dass diese Mäuse keine IR entwickelten[79]. Somit stellt eine verminderte NF-κB Aktivierung, bedingt durch das Fehlen der IKK, einen protektiven Effekt vor der Entwicklung einer IR dar.

1.4.6.2 JNK

Die *c-Jun N-terminale Kinasen* (JNKs) sind Serin/Threonin Kinasen und gehören zur Gruppe der *Mitogen-aktivierten Protein Kinasen* (MAPK). Einer der wichtigsten Einflüsse des JNK-Signalweges ist der Transkriptionsfaktor AP-1 (*Activation protein 1*), dessen Transkriptionsaktivität durch die Phosphorylierung von c-Jun aktiviert wird[84]. Der Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert wichtige Entzündungsprozesse über pro-inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und führt zu zellulärem Stress[85]. Der Transkriptionsfaktor nimmt zudem Einfluss auf die Aktivität von NF-κB, denn es konnte ein „Crosstalk" zwischen dem AP-1 und dem NF-κB Signalweg gezeigt werden[86]. Eine der wichtigsten Aktivatoren des JNK-Signalweges sind die Zytokine TNF-α, IL-1 sowie LPS und FFS[84,87]. Somit führen klassische Aktivatoren der NF-κB-Kaskade auch gleichzeitig zur Aktivierung des JNK-Signalweges.

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Mäuse im adipösen Zustand eine erhöhte JNK-Aktivität aufwiesen. Mäuse mit einem JNK-KO zeigten zudem eine bessere Insulin-Rezeptor-Signalwirkung sowie ein geringeres Ausmaß an Adipositas im Gegensatz zu Wildtyp (WT)-Tieren[88]. Die Abwesenheit der JNKs führt somit über eine verminderte AP-1 bzw. NF-κB Aktivierung direkt zu einer höheren Insulinempfindlichkeit.

1.4.6.3 Einfluss von NF-κB und JNK auf die Insulin-Signaltransduktion

Der Insulinrezeptor gehört zur Gruppe der Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase Aktivität. In Anwesenheit von Insulin (Abb. 1.7) phosphoryliert der Insulin-Rezeptor das Insulin-Rezeptor-Substrat Protein (IRS) am Tyrosin und aktiviert somit die Signalkaskade. Die Signaltransduktion spaltet sich in zwei Signalwege auf:

1. Der *Phosphatidylinisitol-3-Kinase* (PI3K) / *Proteinkinase B* (PKB=AKT) Weg, welcher für die insulin-vermittelten metabolischen Effekte, wie Glukosehomöostase, Glykogenproduktion, Hemmung der Glukoneogenese der Leber sowie Hemmung der Lipolyse verantwortlich ist.
2. Der Ras/MAPK Signalweg, welcher das Zellwachstum, Zelldifferenzierung sowie Proteinsynthese reguliert und mit dem PI3K/AKT-Signalweg interagiert[89].

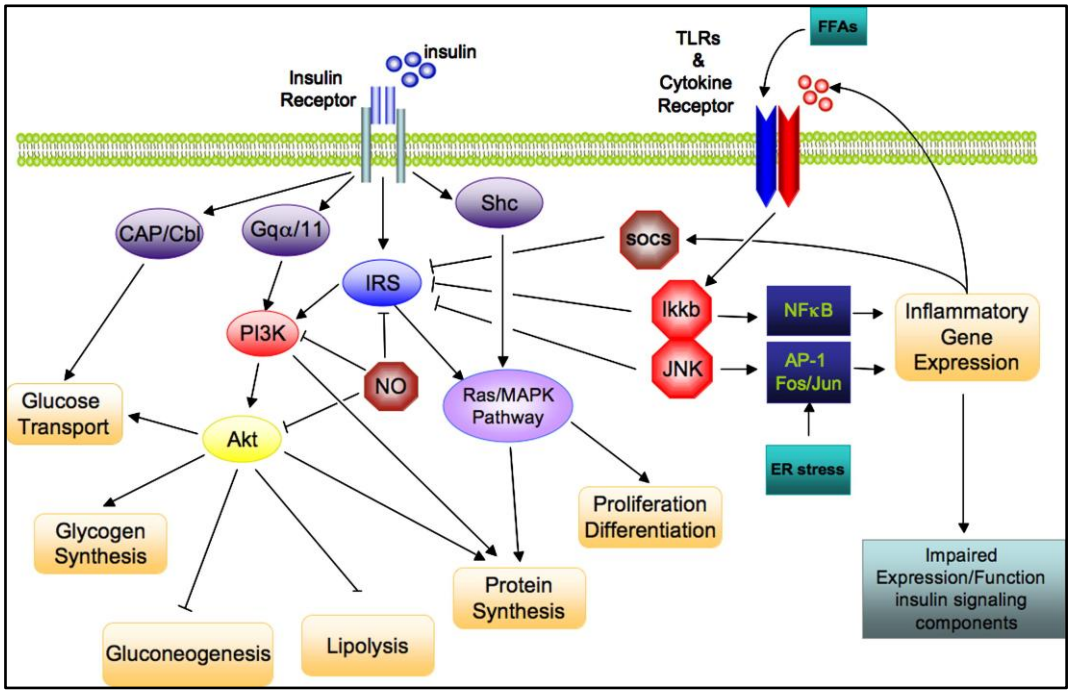

Abb. 1.7 Signaltransduktion der NF-κB und JNK vermittelten Insulinresistenz

Quelle: *de Luca C et al.* Inflammation and insulin resistance[90]

Wird das Serin des IRS alternativ phosphoryliert, ist die „Downstream-Signaltransduktion" gestört. So konnte gezeigt werden, dass die Serin-Kinasen IKK und JNK das IRS alternativ am Serin 307 phosphorylieren, somit die Insulin-Signaltransduktion stören und zur IR führen[90].

Zusammenfassend führt demnach die Zunahme an Körpergewicht bishin zur Adipositas zunächst zu lokalen Inflammationsprozessen im Muskel, in der Leber und im Fettgewebe. Dabei nimmt das Fettgewebe, als endokrines Organ, eine besondere Stellung in der systemischen Ausweitung der Inflammation ein. Die inflammatorischen Prozesse führen dann - primär NF-κB und JNK vermittelt - über die oben beschriebenen molekularen Mechanismen zur IR.

1.5 Renin-Angiotensin-System

1.5.1 Grundlagen

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) stellt eines der wichtigsten hormonellen Systeme zur Regulation der kardiovaskulären Homöostase und des Blutdrucks dar. Die Entdeckung des RAS geht auf das Jahr 1898 zurück, als Tigerstedt und Bergmann die Beobachtung machten, dass durch die Injektion eines Kaninchen-Nierenextraktes der Blutdruck gesteigert werden kann[91]. Aus dem in der Leber synthetisierten AGT wird durch die Protease Renin, die aus der Niere stammt, das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) abgespalten (Abb. 1.8). Aus Ang I wird durch das Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE), welches vorwiegend im Gefäßendothel vorhanden ist, das Oktapeptid Ang II abgespalten. Das Effektorpeptid Ang II bindet dann an spezifische Rezeptoren, wobei die Subtypen 1 und 2 zum heutigen Zeitpunkt am besten charakterisiert sind (AT1R und AT2R).

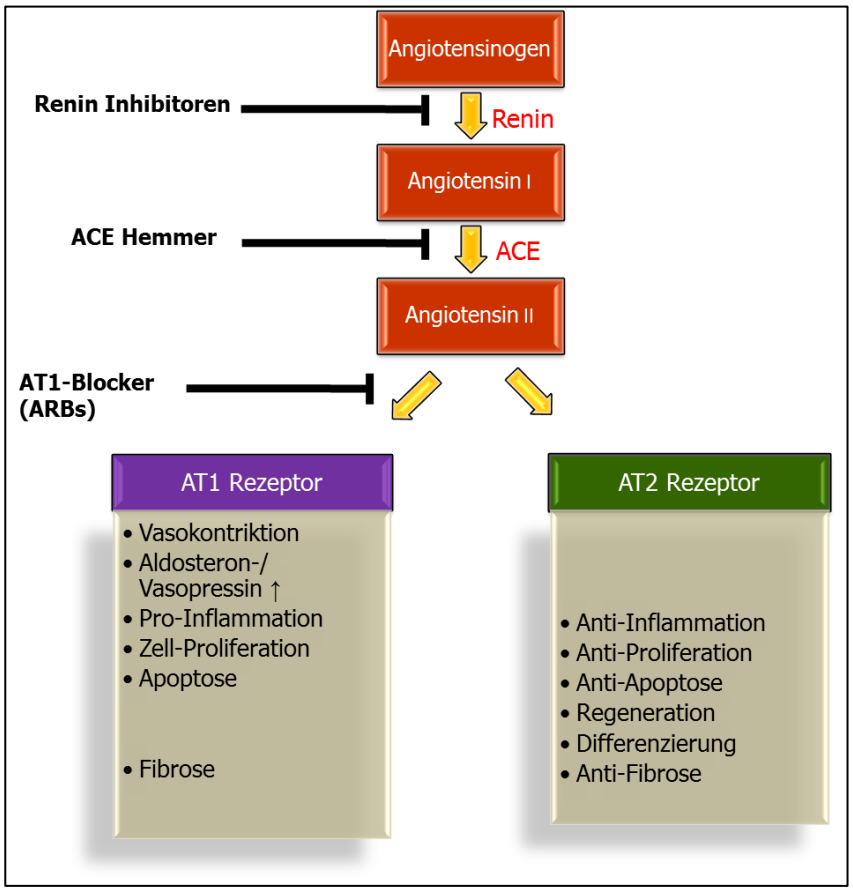

Abb. 1.8 Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

Darüber hinaus werden durch Angiotensinasen von Ang II weitere Aminosäuren abgespalten und es entstehen Ang III, Ang IV sowie Angiotensin 1-7, welch eine deutlich schwächere biologische Wirkung als das Ang II besitzen [92,93].

1.5.2 Angiotensin AT1-Rezeptor

Der AT1R wird nahezu in allen Organen und Geweben exprimiert, die an der Regulation des Blutdrucks und der Flüssigkeitshomöostase beteiligt sind. Dazu zählen Niere, Nebenniere, Leber, Gehirn und Hypophyse, Hoden, Lunge, Aorta, Herz und das Fettgewebe[94]. Die Stimulation des AT1R führt zur Vasokonstriktion, zur Aldosteronfreisetzung in der Zona glomerulosa der Nebenniere und einer damit verbundenen Natrium-Retention. Außerdem kommt es zur NF-κB und AP-1 Aktivierung und einer daraus resultierenden Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Apoptose. Ferner stimuliert die AT1R-Aktivierung die Proliferation glatter Gefäßmuskeln sowie die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Fibrose[95]. Der AT1R wird außerdem als wichtiger Faktor in der Pathophysiologie der linksventrikulären Herzhypertrophie, der Atherosklerose und der Entwicklung von diabetischen Endorganschäden wie Nephro- und Retinopathien angesehen. Eine überhöhte Aktivierung des Systems wird normalerweise durch negative Rückkopplung vermieden. Eine pathologische Überaktivierung des AT1R führt somit zu negativen kardiovaskulären Effekten und zur Hypertonie[94].

1.5.2.1 AT1-Rezeptor Signalwege

Der AT1R gehört in die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und besitzt sieben transmembranäre Domänen. Die Bindung von Ang II an den AT1R führt zur Freisetzung der α-UE des G-Proteins und im Anschluss zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über die G_q-Familie bzw. zu einer Hemmung der Adenylylcyclase über die G_i-Familie. Die Aktivierung der PLC induziert die Bildung der second Messenger Inisitol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 setzt Kalzium aus den intrazellulären Speichern frei. DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC) und fördert den Influx von extrazellulärem Kalzium über Kalziumkanäle (L-Typ) in die Zelle. Somit führen beide Mechanismen zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und folglich zur Vasokonstriktion [92,94].

Auch über den Einfluss auf MAPK wie ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*), über eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges (*Janus kinase - signal transducer and activator of transcription*) sowie der Expressionssteigerung des Wachstumsfaktors TGF-β übt der AT1R zusätzlich Einfluss auf Wachstum, Migration, Expression, Proliferation und Pro-Inflammation aus[96–98]. Bei Nagetieren konnten zwei Isoformen des AT1R, der $AT1_AR$ und $AT1_BR$, identifiziert werden, die sich in Bezug auf ihre Gewebeverteilung und Regulation unterscheiden[99].

1.5.3 Angiotensin AT2-Rezeptor

Den AT2R findet man in fetalen Geweben ubiquitär exprimiert. Postnatal nimmt das Verhältnis zur AT1R-Expression stark ab, wobei die größte Expressionsdichte im adulten Gehirn, der Nebenniere, den Ovarien und dem Uterus, dem Gefäßendothel und dem Myokard zu verzeichnen ist[94]. Bei der Herzinsuffizienz sowie bei inflammatorischen Prozessen wird eine erhöhte AT2R-Expression beschrieben[100,101]. Auch unter anderen pathophysiologischen Bedingungen und gewebsregenerativen Prozessen - dazu zählen die Neointimabildung nach Gefäßverletzung sowie der Prozess des „Remodellings“ nach Herzinfarkt - findet temporär eine erhöhte Expression des AT2R statt[93,102,103].

Der AT2R kann in vielen Fällen als Gegenspieler des AT1R angesehen werden (Siehe Abb. 1.8). Die Ang II-vermittelte Aktivierung des AT2R führt zu geweberegenerativen Effekten, zur Anti-Proliferation[104] und Anti-Fibrose[105]. Teilweise kann die Zellwachstumshemmung auch mit der Anregung von Apoptose einhergehen[93,106]. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe von *Kaschina et al.* zeigte hingegen anti-apoptotische Effekte durch AT2R-Aktivierung in einem Herzinfarktmodell an Ratten[107]. Die AT2R-Aktivierung führt zudem über eine Hemmung der NF-κB Aktivität, Reduktion der COX-2 Expression sowie Modulation von Phosphatasen zu anti-inflammatorischen Effekten. Zudem führt eine AT2R-Aktivierung höchstwahrscheinlich zur NO/cGMP vermittelten Natriurese und Vasodilatation[108,109]. So scheint der AT2R die Rolle eines Modulators auf den Blutdruck auszuüben. Zusammengenommen kann somit die AT2R-Aktivierung mit positiven kardiovaskulären Eigenschaften assoziiert werden.

1.5.3.1 AT2-Rezeptor Signalwege

Über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des AT2R ist weitaus weniger bekannt als über den AT1R. Die Sequenz des AT2R ist nur zu ca. 34% homolog zum AT1R. Der AT2R ist wie der AT1R ein 7-transmembranäres Glykoprotein, jedoch ist nicht abschließend geklärt, ob er ebenfalls an G-Proteine gekoppelt ist und wie im Detail die Signale transduziert werden. Teilweise fehlen klassische funktionelle Eigenschaften, welche die Rezeptorklasse normalerweise aufweist. Ungewöhnlich ist, dass einige Effekte ohne Aktivierung eines G-Proteins vermittelt werden. In einigen Fällen zeigt der AT2R hingegen die Funktionen eines klassischen G-Protein Rezeptors indem er an ein $Gi_{\alpha}2$ und $Gi_{\alpha}3$-Protein gekoppelt ist[110]. Es sind drei unterschiedliche AT2R-gekoppelte Signaltransduktions-Mechanismen umfassend charakterisiert worden:

1. die Aktivierung verschiedener Phosphatasen,
2. eine Aktivierung des NO/cGMP Systems und
3. die Stimulation der Phospholipase A2 und nachfolgender Freisetzung von Arachidonsäure.

Bislang konnten drei spezifische Phosphatasen identifiziert werden, die durch die Stimulation des AT2R aktiviert werden: die *mitogenaktivierte Proteinkinase-Phosphatase 1* (MKP-1), die *SH2 domain-containing Phosphatase 1* (SHP-1) und die *Protein Phosphatase 2A* (PP2A). Bei der MKP-1 handelt es sich um eine Tyrosin/Threonin-Phosphatase, SHP-1 ist eine Tyrosin-Phosphatase und PP2A fungiert als Serin/Threonin-Phosphatase[111]. Viele Wachstumsfaktoren, einschließlich des Ang II über den AT1R, wirken über Tyrosin-Kinasen und weiteren Phosphorylierungsschritten. Es ist anzunehmen, dass der AT2R durch die Aktivierung der verschieden Phosphatasen und damit verbundener Dephosphorylierung in verschiedenen Stufen der Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren zu einem negativen „Crosstalk“ mit dem AT1R führt. Dadurch könnten einige der oben beschriebenen gegenläufigen Effekte erklärt werden. Dies konnte beispielsweise für die MAPK ERK1 und ERK2 gezeigt werden[112–117].

Ein weiterer Signalweg wird über das NO/cGMP System beschrieben. Eine AT2R-vermittelte Erhöhung der NO-Freisetzung konnte sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* an verschieden Modellen gezeigt werden, wobei der NO-vermittelte cGMP Anstieg sehr wahrscheinlich

Bradykinin-abhängig ist[118]. Durch die Stimulation der Phospholipase A2 (PLA2) kommt es zur Freisetzung von Arachidonsäure[119], welche über die Modulation des Na^+/HCO_3^- - Symporter Systems (NBC) Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert haben könnte[120]. Ein weiterer Einfluss von Arachidonsäuremetaboliten auf die Aktvierung von MAPK wird zudem beschrieben[121].

1.5.3.2 AT2-Rezeptor vermittelte Anti-Inflammation

Anti-inflammatorische Eigenschaften konnten in Zellmodellen an glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden. So führte sowohl die AT1R-Blockade mit dem AT1R-Blocker (ARB) Valsartan und gleichzeitiger Stimulation mit Ang II als auch die direkte AT2R-Stimulation mit dem peptidischen AT2R-Agonisten CGP-42112A zu einer Reduktion der TNF-α induzierten MCP-1 Expression. Eine reduzierte NF-κB Aktivität konnte auf eine erhöhte IκB-Stabilität zurückgeführt werden. Durch die Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 und einer damit verbundenen Dephosphorylierung von IκB wird dessen Degradation verhindert. Folglich bleibt auch die Translokation des NF-κB Komplexes in den Zellkern und die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine aus (Siehe Kapitel NF-κB)[122]. Weiterhin konnte in Darmepithelzellen beobachtet werden, dass die LPS-induzierte Hochregulation der COX-2 sowohl durch direkte als auch indirekte AT2R-Stimulation reduziert werden konnte. Weitere Inflammationsprozesse durch die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen werden somit unterdrückt[123]. Die reduzierte COX-2 Expression könnte über die oben beschriebene Hemmung der NF-κB Aktivierung erklärt werden, denn das Enzym wird unter anderen über diesen Transkriptionsfaktor reguliert[124].

An glatten Gefäßmuskelzellen sowie R3T3 Fibroblasten konnte ein Einfluss auf die AT1R-vermittelte Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges gezeigt werden. So hemmt die Ang II stimulierte AT2R-Aktivierung die Tyrosin-Phosphorylierung von STATs (STAT 1, STAT 2, STAT 3) ohne dabei die JAK-Aktivität zu beeinflussen. Dieser Effekt rührt wahrscheinlich ebenfalls von der Aktivierung von SHP-1 her. Somit bleibt die Translokation der STAT-Dimere in den Nukleus und die damit verbundene Transkription pro-inflammatorischer Zytokine aus[125].

1.5.4 Pharmakologische Intervention in das RAS

Das RAS ist Zielsystem verschiedener Arzneimittel, die in erster Linie zur Behandlung der Hypertonie eingesetzt werden. Eine Hypertonie liegt nach den Leitlinien der *Deutschen Hochdruckliga* (DHL) ab einem Blutdruck ≥ 140 mmHg systolisch zu ≥ 90 mmHg diastolisch vor[126]. Mit dem Renin-Inhibitor Aliskiren ist ein neues Antihypertonikum geschaffen worden, das am Anfang der Ang II-Synthese angreift. Der jüngste Vertreter der Antihypertensiva ist seit September 2007 in der EU und der Schweiz unter dem Handelsnamen Rasilez® zur Behandlung der essentiellen Hypertonie zugelassen[19]. ACE-Hemmer (Captopril, Enalapril, etc.) greifen in der Mitte der Kaskade ein und verhindern, zumindest zum größten Teil, die Bildung des Effektorpeptides Ang II. Die zweitjüngste Generation der Antihypertensiva, die ARBs (Losartan, Valsartan, Telmisartan, etc.), verhindern spezifisch und selektiv die Bindung des Ang II an den AT1R. Alle klinisch zugelassenen Maßnahmen der RAS-Intervention zielen darauf ab, eine pathologische AT1R-Aktivierung abzuschwächen. Derzeit gibt es kein zugelassenes Arzneimittel das direkt mit dem AT2R interagiert.

1.5.5 Pharmakologische Modelle am AT2-Rezeptor

Die pharmakologischen Modelle der Grundlagenforschung zur Untersuchung des AT2R bestanden bis dato in der indirekten Aktivierung durch AT1R-Blockade und ANG II-Behandlung. Weitere Ansatzpunkte lieferten das Fehlen des AT2R-Signals durch die pharmakologische Blockade des Rezeptors mit der Substanz PD123319 oder durch den genetischen KO des Rezeptors. Die direkte Aktivierung des Rezeptors gelang mit dem AT2R-Agonisten CGP-42112A. Nachteile der Modelle lagen zum einen in der Vergleichbarkeit zwischen direkter und indirekter Stimulation. Zum anderen bietet der Vergleich zwischen pharmakologischer Stimulation und mit dem Fehlen des AT2R-Signals in der KO-Maus ebenfalls nur eine limitierte Aussagekraft. Die Substanz CGP-42112A ist zudem stark umstritten, da diese aufgrund der peptidischen Struktur relativ instabil ist und sich zugleich teilweise antagonistisch am AT2R verhalten kann[104]. Gleichzeitig scheint die Substanz PD123319 ebenfalls für *in-vivo* Studien ungeeignet zu sein, da die Substanz teilweise nicht zu den erwarteten AT2R-blockierenden Effekten führt[127]. Seit 2004 besteht die Möglichkeit den AT2R selektiv mit der Substanz C21 zu stimulieren.

1.5.6 Substanz C21

Bei der Substanz C21 handelt es sich um den ersten nicht-peptischen und damit oral applizierbaren, selektiven AT2R-Agonisten. Die Selektivität der Substanz wird mit einer Dissoziationskonstanten (Ki) von 0,4 nM für den AT2R bzw. >10 µM für den AT1R beschrieben. Das N-Butyloxycarbonyl-3-(4-Imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-Isobutylthiophen-2-Sulfonamid (siehe Abb. 1.9) weist ein Molekulargewicht von 475,63 g/mol auf. Nach oraler Gabe bei Ratten besitzt die Substanz eine orale Bioverfügbarkeit von 20 bis 30% mit einer Halbwertszeit von t½ ≈ 4 h[128].

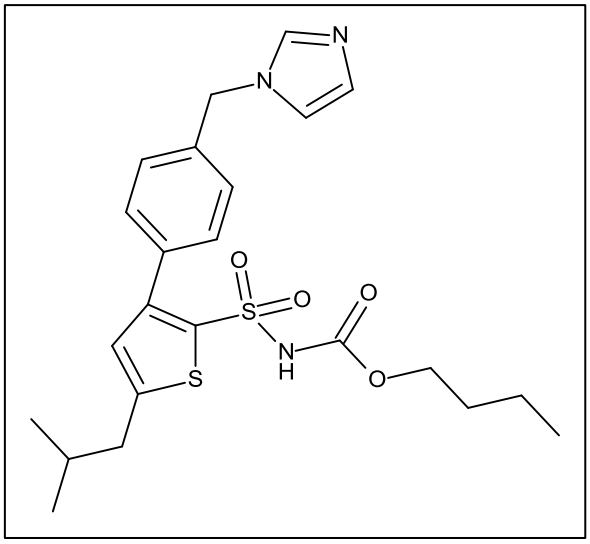

Abb. 1.9 Struktur des ersten nicht-peptidischen AT2R Agonisten C21[128]

1.5.6.1 Studien mit C21

Eine *in-vivo* Studie an *spontaneuosly hypertensive stroke-prone rats* (SHRSPs), die eine Hochsalzdiät erhielten, beschreibt, dass die Behandlung der Ratten mit C21 in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) pro Tag nach etwa acht Wochen zu einer reduzierten Hirnschädigung und einer deutlichen Verzögerung der stark erhöhten renalen Proteinurie führte, ohne dabei den Blutdruck zu beeinflussen. Diese positive Regulation konnte auf anti-fibrotische und anti-inflammatorische Effekte zurückgeführt werden. Ein Hinweis auf die Spezifität der Effekte konnte mit dem AT2R-Blocker PD123319 erbracht werden, indem die protektiven Effekte auf Gehirn und Niere unter Parallelbehandlung mit C21 ausblieben[129]. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe von *Kaschina et al.* konnte in einem Herzinfarktmodell an normotensiven Wistar-Ratten zeigen, dass die Behandlung 24 h post-Infarkt mit C21

0,03 mg/kg KG pro Tag über sieben Tage signifikant die Infarktgröße verkleinerte, die Expression des Apoptose Markers Caspase-3 in der Peri-Infarktzone reduzierte und die kardiale Expression der induzierten pro-inflammatorischen Zytokine MCP-1, IL-6, IL-1β und IL-2 reduzierte. Diese Effekte konnten ebenfalls mit dem AT2R-Blocker PD123319 aufgehoben werden. Hierbei hatte C21 keinen Einfluss auf den Blutdruck[107]. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten zudem zeigen, dass die spezifische Aktivierung des AT2R mit C21 *in-vitro* an humanen und murinen dermalen Fibroblasten zu einer Reduktion der TNF-α induzierten IL-6 Expression führte. *In-vivo* konnte an Mäusen durch die Stimulation mit C21 (1 mg/kg KG s.c. pro Tag) eine Bleomycin induzierte subkutane Inflammation gesenkt werden. Hier kam es zur signifikanten Reduktion der Inflammationsmarker MCP-1, IL-6 und TNF-α[130].

Die durchgeführten Studien zeigten also in verschiedenen Modellen und Organen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, dass die C21-vermittelte AT2R-Aktivierung zu geweberegenerativen und vor allem anti-inflammatorischen Effekten führt.

1.6 RAS, Insulinresistenz und Diabetes

In den letzten Jahren wurde das RAS auch als wichtiger Regulator des Glukosemetabolismus identifiziert. Es stellt damit neben seiner Funktion als Blutdruckregulator eine Schnittstelle in der Pathophysiologie des MS, Adipositas und Diabetes dar. Etwa 50% der Hypertoniker weisen eine Hyperinsulinämie auf[131] und umgekehrt sind bis zu 80% der Typ 2 Diabetiker Hypertoniker[132].

1.6.1 ANG II vermittelte Insulinresistenz

Zahlreiche Beobachtungen haben gezeigt, dass bei Patienten mit MS bzw. Adipositas eine Überaktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS) vorliegt. Diese korreliert mit dem Auftreten der IR[133]. Zu den Mechanismen der symphatischen Überaktivierung zählt die Hyperinsulinämie, die über die hypothalamische Achse zu einer Aktivierung des SNS führt[134] und über einen MAPK-Signalweg die ANG II Produktion stimuliert[135]. Die Aktivierung des SNS führt zur Freisetzung von Katecholaminen, die wiederum β1-Rezeptor-vermittelt zu einer Steigerung der Renin-Aktivität und -Freisetzung führen[136]. Ebenfalls konnte in humanen

Adipozyten gezeigt werden, dass eine Katecholamin-induzierte cAMP Erhöhung zu einer Expressionssteigerung von AGT führt[137]. Die mit der Adipositas und Fettmasse verknüpften erhöhten peripheren Leptin-Spiegel führen ebenfalls zu einer Aktivierung des SNS, konsekutiv zur Aktivierung des RAS und damit zu einer Erhöhung des Blutdrucks[138]. Demzufolge findet man bei adipösen Patienten erhöhte Plasmaspiegel der Komponenten des RAS wie AGT, Renin, ACE, Aldosteron und ANG II vor[139]. ANG II führt selbst auch zu einer Aktivierung des SNS und schließt damit den Circulus vitiosus[140].

Dem Effektorpeptid ANG II wird auch ein Einfluss auf den Glukosemetabolismus und die Insulinempfindlichkeit zugewiesen. Die systemische Vasokonstriktion führt zu einem verringerten peripheren Blutfluss im Skelettmuskel, der einen wesentlichen Faktor für die Glukose-Aufnahme darstellt[141]. Darüber hinaus führt ANG II über die Aktivierung von NF-κB in verschiedenen Endorganen zur Inflammation[142]. Daraus folgt eine Reduktion der Adiponektin-Expression und eine zusätzliche Absenkung der Insulinempfindlichkeit. Weitere hypothetische Mechanismen der ANG II-vermittelten Störung des Glukosemetabolismus werden in der Reduktion der GLUT-4 Expression und einer erhöhten ektopischen Fetteinlagerung gesehen[142,143].

1.6.2 Lokales RAS im Fettgewebe

Neben der klassischen endokrinen Achse des RAS existiert auch ein lokales RAS. Es werden alle wichtigen Komponenten zur ANG II Produktion im Herz, den Gefäßwänden, den Nieren, den Nebennieren sowie dem Gehirn synthetisiert. Somit kommen dem RAS neben seiner endokrinen Rolle auch lokale, gewebsspezifische auto- und parakrine Funktionen zu[144]. Auch das Vorhandensein eines lokalen RAS im Fettgewebe wird beschrieben. Dem RAS im Fettgewebe wird eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie von Adipositas-assoziierten Krankheiten wie IR und Hypertonie zugewiesen.

Das Fettgewebe exprimiert ebenfalls alle wichtigen Komponenten des RAS (AGT, ACE, Renin, AT1R, AT2R)[145]. Als endokrines Organ nimmt das Fettgewebe auch direkt systemischen Einfluss durch Produktion der RAS Komponenten. Entsprechend der Zunahme der viszeralen Fettmasse steigt im Fettgewebe die Produktion von AGT und ANG II an. Diese steigen im Plasma an und führen konsekutiv zur Aktivierung des SNS, RAS und Erhöhung

des Blutdrucks[140]. Durch Gewichtsverlust nimmt bei den Patienten sowohl die systemische als auch lokale RAS-Aktivität im Fettgewebe wieder ab[146].

Die Funktion von ANG II in der Differenzierung von Adipozyten und deren Proliferation ist noch nicht vollständig geklärt und wird zum Teil kontrovers diskutiert. Es gibt Beobachtungen, die zeigen, dass ANG II die Adipozytendifferenzierung hemmt und somit die Neubildung kleiner, insulinsensitiver Adipozyten unterbindet. Damit hätte ANG II einen direkten negativen Einfluss auf die Insulinempfindlichkeit[140]. Demgegenüber werden auch fördernde Effekte von ANG II auf die Differenzierung von Adipozyten beschrieben, verbunden mit der Induktion von Enzymen der Lipogenese wie *Glycerol-3-Phosphatase Dehydrogenase* (GPDH) und *Fettsäure Synthase* (FAS), welche ihrerseits die Einlagerung von TG in Adipozyten und damit die Hypertrophie fördern[143]. Das lokale RAS im Fettgewebe hat somit einen entscheidenen Einfluss sowohl auf lokale als auch auf systemische metabolische Prozesse

1.6.3 Klinische Studien zur Blockade des RAS

Mehrere klinische Studien beschreiben, dass die Blockade des RAS mit positiven metabolischen Effekten einhergeht. Die Behandlung von Hochrisikopatienten mit ACE-Hemmern bzw. ARBs führte hierbei neben einer Verbesserung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität auch zu einer Verbesserung der Insulinempfindlichkeit und des metabolischen Profils. Ebenfalls konnte eine Reduktion der Diabetes-Inzidenz bei Hypertonikern sowie eine Reduktion von Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen und Endorganschäden bei Typ 2 Diabetikern identifiziert werden. Dies konnte sowohl in Studien mit ACE-Hemmern (CAPPP-, HOPE-, ALLHAT- und SOLVD-Studie) als auch in Studien mit ARBs gezeigt werden (LIFE-, CHARM- und VALUE-Studie). Eine Metaanalyse ergab, dass die Neudiagnose von T2DM mit beiden RAS-Blockern im Schnitt um 25% gesenkt werden konnte[147]. Dies konnte in einer Netzwerk-Metaanalyse, in der 22 klinische Studien mit insgesamt 143.153 Hypertonie- und Hochrisiko-Patienten berücksichtigt wurden, von *Elliott et al.* bestätig werden. Die Analyse ergab, dass die Diabetes-Inzidenz von Patienten, die mit ARBs bzw. ACE-Hemmern behandelt wurden, im Vergleich zu anderen Antihypertensiva signifikant am geringsten war[148].

In der kürzlich abgeschlossenen NAVIGATOR-Studie konnte durch eine chronische Behandlung mit dem ARB Valsartan die Diabetes-Inzidenz bei Patienten mit IGT signifikant um 14% gesenkt werden[149]. In der ONTARGET Studie wurde Telmisartan direkt mit dem ACE-Hemmer Ramipril verglichen und beinhaltete als sekundären Endpunkt die Neudiagnose von T2DM bei Risikopatienten. Dieser Endpunkt wurde durch beide Arzneimittel gleichermaßen signifikant erreicht. Die Kombination beider Arzneimittel brachte zudem bei keinem Endpunkt Vorteile gegenüber der jeweiligen Monotherapie[150,151].

1.6.4 Angiotensin AT1R-Blocker aktivieren PPARγ

Für einige AT1R-Blocker (Telmisartan > Losartan bzw. für seinen Metaboliten EXP 3179) wurde beschrieben, dass diese in der Lage sind, partiell den PPARγ-Rezeptor zu aktivieren. Der Transkriptionsfaktor PPARγ spielt eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit endokrinen und metabolischen Funktionen des Fettgewebes. Dieser Effekt könnte zusätzlich die anti-inflammatorischen Eigenschaften dieser Substanzen und deren positiven Einfluss auf den Glukosemetabolismus erklären. Auch vergleichende Studien innerhalb der AT1R-Blocker haben gezeigt, dass Telmisartan, als partieller PPARγ-Ligand, stärkere positive Effekte auf das Lipid-Profil und den Glukosemetabolismus aufweist als andere ARBs. So ist Telmisartan derzeit der einzige Vertreter der ARBs der in den USA und Europa (FDA und EMA) für die Behandlung der Hypertonie bei Patienten mit T2DM zugelassen ist[152].

Der Wirkungsmechanismus am PPARγ wird im Folgenden beschrieben. Durch Bindung eines endogenen (diskutiert werden mehrfach ungesättigte FS und PGJ2[153]) oder synthetischen Liganden an PPARγ kommt es zur Heterodimesierung des Rezeptors mit dem Retinolsäurerezeptor (RXR) und gleichzeitiger Dissoziation von Korepressoren bzw. Assoziation von Koaktivatoren und folgender Translokation in den Nukleus mit anschließender Transkription[154]. PPARγ fördert als „Masterregulator“ die Adipozytendifferenzierung. Durch Aktivierung von PPARγ und Reifung der Adipozyten kommt es zu erhöhter Expression von Transportproteinen wie dem *adipocyte Protein 2* (aP 2) und Lipoproteinrezeptoren (CD36) sowie der LPL. Dadurch wird die Fähigkeit gesteigert, vermehrt TG im Fettgewebe zu speichern. Die Folge sind eine Verminderung von FFS bzw. TG mit einer Verbesserung der Insulinsensitivität. Des Weiteren führt eine PPARγ-

Aktivierung zu anti-inflammatorischen Effekten. In der Leber führt PPARγ zur Reduktion der Glukoseproduktion und im Skelettmuskel zu einer erhöhten Glukoseaufnahme[154,155].

Antidiabetische Effekte der AT1R-Blocker konnten zudem auch in diversen Tierversuchen sowohl durch unsere Arbeitsgruppe als auch durch andere Gruppen beobachtet werden[156–158]. Die metabolischen Verbesserungen der RAS-Blocker scheinen blutdruckunabhängig zu sein. So konnte eine Subanalyse der CAPPP-Studie zeigen, dass die Behandlung mit einem ACE-Hemmer bzw. mit einem Diuretikum/β-Blocker zwar zu einer adäquaten Senkung des Blutdrucks führte, eine Risikoreduktion in der Entwicklung von neu diagnostiziertem T2DM aber nur in der ACE-Hemmer-Gruppe zu verzeichnen war[159]. So scheinen β-Blocker bzw. Thiazid-Diuretika sogar ein pro-diabetogenes Potential aufzuweisen[160]. Auch andere Tierversuche beschreiben, dass schon eine geringe Dosis an ARB zu positiven metabolischen Effekten führt, ohne dabei den Blutdruck zu senken[157].

Die klinischen Studien und Experimente konnten eindeutig die positiven metabolischen Effekte der ARBs belegen. Neben der partiellen PPARγ-Aktivierung durch einige ARBs könnte für den AT2R ein eigener antidiabetischer Effekt in Betracht gezogen werden, da durch die AT1R-Blockade das ANG II vermehrt am AT2R binden und diesen aktivieren kann[161]. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Effekte und die metabolische Relevanz des AT2R sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.6.5 Metabolische Effekte des AT2-Rezeptors

Tierversuche an transgenen Mäusen beschreiben einen positiven Einfluss des AT2R auf den Glukosemetabolismus. So führte beispielsweise die Abwesenheit des AT2R in Mäusen zu einer Reduktion der Insulinempfindlichkeit und Glukosetoleranz[157]. Dem gegenüber wurde auch beobachtet, dass bei AT2R-KO Mäusen, die mit einer Hochfett-Diät (HFD) gefüttert wurden, eine erhöhte Fettzelldifferenzierung, eine reduzierte Adipozytengröße und -masse sowie eine verbesserte Insulinempfindlichkeit bzw. Glukosetoleranz vorlag. Dies würde dem AT2R negative metabolischen Effekte zuweisen[162,163]. Wenngleich alle Untersuchungen, einschließlich denen an transgenen Mäusen, dem AT2R eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion und Regulierung der Insulinsensitivität und Glukosetoleranz zuordnen, sind die Daten kontrovers und die AT2R-vermittelten metabolischen Funktionen

im systemischen und lokalen RAS scheinen unklar zu sein. Der Einsatz des selektiven AT2R-Agonisten C21 *in-vitro* und *in-vivo* könnte zu neuen Erkenntnissen der Funktion des AT2R auf metabolischer Ebene führen.

1.7 Hypothese und Zielsetzung

Die oben aufgeführten Daten zur Prävalenz, Inzidenz und den Folgeerkrankungen des MS, der Adipositas und assoziierter IR sowie T2DM weisen der Erforschung, der Prävention und der Therapie dieser Krankheiten eine enorme Bedeutung zu. Die vorliegende Arbeit soll der Aufklärung neuer pathophysiologischer und pharmakologischer Mechanismen von AT2R-Agonisten bei der Entstehung und Behandlung der Adipositas-induzierten Inflammation im Fettgewebe und damit verbundener IR und IGT dienen.

Aufgrund der vielversprechenden Datenlage des AT2R und der Substanz C21 bezüglich der gewebeprotektiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften könnte die pharmakologische Intervention an diesem Rezeptor der Ätiologie der Fettgewebs-Inflammation und Pathophysiologie der IR entgegenwirken. Durch die genaue Charakterisierung inflammatorischer Prozesse in der Entstehung der Adipositas-induzierten IR und deren Inhibierung durch AT2R-Aktivierung könnten somit neue therapeutische Konzepte für die Prävention entstehen. Die vorliegende Arbeit dient außerdem dem spezifischen Wirksamkeitsnachweis der Substanz C21 durch den Einsatz von AT2R-KO Mäusen sowie der Eingrenzung möglicher Indikationen für eine Therapie am Menschen - beides mit dem Ziel der zukünftigen Arzneimittelentwicklung.

Die Zielstellung der Arbeit ist:

1. durch den Einsatz der Substanz C21 *in-vitro* an verschiedenen Zellmodellen anti-inflammatorische und metabolische Prozesse zu charakterisieren und

2. den therapeutischen Nutzen einer direkten AT2R-Stimulation mit der Substanz C21 im Rahmen der Adipositas-induzierten IR im Diät-induzierten Adipositas (DIO)-Modell der Maus zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Substanzen

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Acrylamid-Bis (30%)	Serva (Heidelberg, D)
Agarose	Biozym (Oldendorf, D)
Ammoniumperoxodisulfat	Merck (Darmstadt, D)
β-Marcaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Bovines Serum Albumin (BSA) Standard	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
Compound 21	Vicore Pharma (Göteborg, SWE)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Eosin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Essigsäure Ethanol (96%)	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol absolut (<99,9 %)	J.T Baker (Deventer, NL)
Ethidiumbromid Lösung (1%)	J.T Baker (Deventer, NL)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe, D)
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylester)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Formaldehydlösung	Merck (Darmstadt, D)
Glukoselösung Glucosteril (20%)	Fresenius (Bad Homburg, D)
Glycin	Serva (Heidelberg, D)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)

Hydralazin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Insulin 10 mg/mL	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Insulin Insuman® Rapid 40 I.E. / mL	Sanofi-Aventis (Berlin, D)
Isofluran Forene®	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)
Lipofectamin® 2000	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D)
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Methanol	Merck (Darmstadt, D)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumpyrophosphat ($Na_4P_2O_7$)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Neo-Clear (Xylol Ersatz)	Merck (Darmstadt, D)
Öl-Rot-O Farbstoff	Serva (Heidelberg, D)
Orange G	Merck (Darmstadt, D)
PD123319	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Pioglitazon	Takeda Pharma (Osaka, Japan)
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Proteaseinhibitor Complete-Mini®	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Real-Time Sybrgreen® Mastermix	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Real-Time Taqman® Mastermix	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (Rockford, USA)

Roti® Blue kolloidale Comassie-Färbung	Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure (25%)	Roth (Karlsruhe, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
TNF-α, rekombinant Maus	Biomol GmbH (Hamburg, D)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, D)
Triton X-100 (1%)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ultrapure Wasser	Biochrom AG (Berlin, D)
Valsartan	Novartis Pharma AG (Basel, SUI)

2.1.2 Kits

BCA Protein Assay	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega (Mannheim, D)
ECLTM Western Blotting Detection Reagents	Amersham (Buckinghamshire, UK)
Mouse / Rat Adiponectin ELISA kit	B-Bridge (Sunnyvale, USA)
Bio-Plex Mouse Adiponectin Kit	Bio-Rad (München, D)
Bio-Plex Mouse x-Plex Kit	Bio-Rad (München, D)
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel (Düren, D)
Quantikine® human IL-6 ELISA kit	R&D Systems (Wiesbaden, D)
RNeasy® lipid tissue mini kit	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy® mini kit	Qiagen (Hilden, D)
Triglycerides FS Assay	Diasys Diagnostics (Holzheim, D)

2.1.3 Laborgeräte

Analysewaage Alt 220-5DAM	Kern (Balingen, D)
Bio-Plex Pro Wash Station	Bio-Rad (München, D)
Bio-Plex 200 System	Bio-Rad (München, D)
Blutzuckermessgerät Precision Xceed	Abbott (Wiesbaden, D)
Butdruckmessgerät Power Lab 4/20 mit Maus Manschette MLT125/M	ADInstruments (Spechbach, D)
CO_2-Inkubator HeraCell 150	Heraeus (Hanau, D)
DNA Gel-Kammern	Armin Baack Labortechnik (Schwerin, D)
Elektronische Pipettierhilfe Rota-Filler 3000	Heathrow Scientific (Northgate, UK)
Elektrophorese Spannungsversorgung: Power Pac 300	Bio-Rad (München, D)
Geldokumentationsanlage	Syngene (Frederick, USA)
Grobwaage BL-1500S	Sartorius (Göttingen, D)
Homogenisator Polytron PT 2100	Kern (Balingen, D)
Laminar-Flow-Arbeitsbank: LaminAir 1.2.	Bio-Rad (München, D)

Messzylinder, Bechergläser, Glasflaschen und weiteres Zubehör der Firmen:

Schott (Mainz, D), Brand (Wertheim, D), VWR (Darmstadt, D)

Mikroliter-Pipetten diverse Volumina:

Multipipette®, Reference®, Research®	Eppendorf (Hamburg, D)
Proline® elektronische Pipetten	Biophit (Helsinki, Finnland)
Rainin®	Mettler (Toledo, Giessen, D)
Mikroskop BZ-9000	KEYENCE (Neu-Isenburg, D)
Mikroskop CK40	Olympus (Hamburg, D)
NMR Gerät: Echo MRI Maus	Echo Medical Systems (Houston, USA)
Nano-Drop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)

Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, D)
pH-Meter PH-211	Hanna Instruments (Kehl, D)
Real-Time Device Strategene® MX3000P	Agilent Technologies (Waldbronn, D)
Schwingschüttler KS 260 basic	IKA (Staufen, D)
Sirius Luminometer	Berthold Detection Systems (Pforzheim,D)
Spektrophotometer Benchmark Plus	Bio-Rad (München, D)
Stoffwechselkäfige TSE LabMaster	TSE Systems (Bad Homburg, D)
Thermomixer Thermostat Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Tierkäfige Typ 2 IVC	Ehret Labor- und Pharmatechnik (Schönwalde, D)
Tierwaage PK2000	Mettler-Toledo (Giessen, D)
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International (Darmstadt, D)
Vortex-2-Genie	Scientific Industries (Bohemia NY, USA)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, D)
Western-Blot Zubehör	Bio-Rad (München, D)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Mikro22R	Hettich (Tuttlingen, D)

2.1.4 Medien und Zellkulturzusätze

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D)
Opti-MEM®	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D)
Lipofectamin® 2000	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D)
Penicillin / Streptomycin 10.000 U/mL / 10.000 µg/mL	Biochrom AG (Berlin, D)
Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7,4	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D)
RPMI-1640	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D)
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories (Pasching, AT)

2.1.5 Versuchstiere und Ziellinien

Mus Musculus Zelllinie:	
3T3-L1 (*Mouse embryonic fibroblast*)	ATCC-LGC (Wesel, D)
Homo Sapiens Zelllinien:	
HEK-293 (*Human embryonic kidney*)	ATCC-LGC (Wesel, D)
THP-1 (*Human acute monocytic leukemia*)	ATCC-LGC (Wesel, D)
Versuchstiere:	
C57Bl-6 Mäuse	Janvier (Le Genest-Saint-Isle, FRA)
AT2R-Knockout (KO) Mäuse	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) - Charité (Berlin, D)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Blutzuckerteststreifen Precision Xtra Plus	Abbott (Wiesbaden, D)
Descosept®	Dr. Schumacher (Malsfeld, D)
Kanülen diverse Größen MicrolanceTM	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Mess-Pipetten	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Parafilm	American National Can (Mensaha, USA)
Pipettenspitzen für diverse Volumina	VWR International (Darmstadt, D)
RNAseZAP®	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)

Schraubflaschen für verschiedene Volumina:

Falcon®	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Spritzen Omnifix®-F	Braun (Melsungen, D)

Tubes für verschiedene Volumina:

Sarstedt (Newton, USA) und Eppendorf (Hamburg, D)

Zellkulturflaschen in diversen Größen und x-Well Platten:

Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Sarstedt (Newton, USA)

Zellscharber	Sarstedt (Newton, USA)

2.1.7 Ausgewählte Zusatzmaterialien

Membranen für Western Blotting:

Highbond-P Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Amersham (Buckinghamshire, UK)

Fotomaterial:

High Performance Chemiluminescence Film	Amersham (Buckinghamshire, UK)

Fotochemikalien:

Tierfutter:

Niedrigfett Diät Futter (LFD) für Kontrolldiät 10% kcal aus Fett (3450 kcal/kg)	Altromin Spezialfutter (Lage, D)
Hochfett Diät Futter (HFD) 60% kcal aus Fett (4974 kcal/kg)	Altromin Spezialfutter (Lage, D)

Operationszubehör:

Scheren, Skalpelle, Pinzetten	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Histologie:

Paraffin Typ 6 und 9	Richard-Allan Scientific (Kalamazoo, USA)
Entwickler, Unterbrecher, Fixierer	AGFA (Leverkusen, D)

2.1.8 Primer und Sonden

Primer

Alle Primer wurden mit der Software Primer-3 entworfen. Forward und Reverse Primer wurden jeweils gegen das gesamte Genom des jeweiligen Organismus geblastet (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) und somit auf Spezifität und auf die Amplifikation unerwünschter Fragmente hin überprüft. Zusätzlich wurde die Größe des jeweiligen PCR-Produktes mittels DNA Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Alle Primer wurden von den Firmen Tib-MolBiol (Berlin, D) bzw. SMB - Dr. Meixner (Berlin, D) synthetisiert.

Gen	Forward 5´-3´	Reverse 5´-3´
Resistin Mm	ACTCCCTGTTTCCAAATG	GCTCAAGACTGCTGTGCC
Leptin Mm	TTCACACACGCAGTCGGTAT	TGGAGGAGGTCTCGGAGATT
Adiponektin Mm	TCCGGGACTCTACTACTTCTCTTACCAC	GTCCCCATCCCCATACACCTG
Arginase-1 Mm	TGGCTTGCGAGACGTAGAC	GCTCAGGTGAATCGGCCTTTT
F 4/80 Mm	TGACAACCAGACGGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
IL-10 Mm	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
IL-6 Mm	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
MCP-1 Mm	GCTTCTTTGGGACACCTGCT	TCTCTCTTCCTCCACCACCA
TNF-α Mm	TAGCCAGGAGGGAGAACAGA	GAACTGGCAGAAGAGGCACT
36B4 Mm	GCTCCAAGCAGATGCAGCA	CCGGATGTGAGGCAGCAG
18s Mm + H	CCTGAGAAACGGCTACCACAT	TTCCAATTACAGGGCCTCGA
IL-10 H	GATCCAGTTTTACCTGGAGGA	CCTGAGGGTCTTCAGGTTCTC
MCP-1 H	CCCCAGTCACCTGCTGTTAT	AGATCTCCTTGGCCACAA
TNF-α H	AAGAATTCAAACTGGGGCCT	GAGGAAGGCCTAAGGTCCAC
AT2R Mm	GATGGAGGGAGCTCGGAACT	AATTTGGAGTTGCTGCAGTTCAA
AT2R H	AACATTACCAGCGGTCTTCAC	GGAATTGCATCTAAATGCTTATC TGATGGT

Tab. 2.1 Verzeichnis der verwendeten Primer Mm=Maus, H=Human

Assay on Demand Sonden

In bestimmten Ausnahmefällen wurden vorgefertigte Primer-Sonden-Gemische der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, D) verwendet.

Gen	Assay ID
CD3γ Mm	Mm00438095_m1
SDF1-α Mm	Mm00445552_m1
IL-6 Mm	Mm00446190_m1

Tab. 2.2 Verzeichnis AOD Sondengemische Mm=Maus

2.1.9 Nukleinsäuren und Enzyme

Für die cDNA Synthese wurden folgende Nukleinsäuren und Enzyme verwendet:

dNTPs	Promega (Mannheim, D)
M-MLV Reverse Transkriptase (RT)	Promega (Mannheim, D)
RNAsin	Promega (Mannheim, D)
Random Primer	Promega (Mannheim, D)
MLV – Puffer (5x)	Promega (Mannheim, D)

2.1.10 Molekulargewichtsmarker

GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth, D)

2.1.11 Antikörper

Anti-Maus Adiponectin (Maus monoclonal)	Millipore (Billerica, USA)
Anti-Maus-GAPDH (Kaninchen, polyklonal)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Mouse Ig HRP (Kaninchen, polyklonal)	Dako (Glostrup, DK)

2.1.12 Vektoren

pGal4-hPPARγDEF	Bart Staels (Institut Pasteur, Lille, FRA)
pGal5-TK-pGL3	Bart Staels (Institut Pasteur, Lille, FRA)
pRL-CMV	Promega (Mannheim, D)

2.1.13 Puffer und Lösungen

Die hier aufgeführten Puffer und Lösungen wurden hauptsächlich für die Western Blot Methode verwendet (siehe 2.2.9.2). Die Zusammensetzungen orientieren sich hierbei an Erfahrungswerten und Etablierungen des Institutes für Pharmakologie der Charité (Berlin, D).

Protein-Lysis-Puffer (RIPA):

20	mM	Tris
150	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	mM	EGTA
2,5	mM	1 % Triton X-100
2,5	mM	$Na_4P_2O_7$
1	mM	Na_3VO_4

1 Tablette Proteaseinhibitoren Complete-mini® in 50 mL Stammlösung

4x Proben Puffer (Stammlösung):

303	mg Tris
800	mg SDS
4	mL Glycerol
2	mL β-Marcaptoethanol
50	µL Bromphenolblau

ad 10 mL H2O ; pH 6,8

10x Elektrophorese Puffer (Stammlösung):

30,3 g Tris

144 g Glycin

100 mL 10 % SDS Lösung

ad 1000 mL H_2O; pH 8,3

Towbin Puffer:

5,82 g Tris

2,93 g Glycin

200 mL Methanol

3,75 mL 10 % SDS Lösung

ad 1000 mL H2O; pH 9,0

10x TBS Puffer:

24,2 g Tris

80 g NaCl

ad 1000 mL H_20; pH 7,6

10x TBS-T Puffer:

100 mL TBS 10x Puffer

1000 µL Tween® 20

ad 1000 H_2O

Trenn– und Sammelgel Puffer:

[Tris 1,5 / 0,5 M; 10% SDS Lösung; 30% Acylamid-Bis; 10% APS; TEMED]

2.1.14 Software

Bio-Plex Manager 6.0	Bio-Rad (München, D)
Graph Pad Prism® 5	GraphPad Software (La Jolla CA, USA)
LabChart 5.4.1	ADInstruments (Spechbach, D)
Labmaster Software	TSE Systems (Bad Homburg, D)
MasterPlex 2000	Bio-Rad (München, D)
MXPro 4.10	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Office® 2010	Microsoft (Redmond, USA)
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, UK)
Zotero 2.1.10	Center for History and New Media (Fairfax, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Modell des Tierversuchs

Männliche C57Bl-6 (n=60) und AT2R-KO Mäuse[164] (n=30) wurden im Alter von 4-6 Wochen in individuell klimatisierbare (IVC) Tierkäfige vom Typ 2 untergebracht. Die Haltung der Mäuse erfolgte bei einer Lufttemperatur von ca. 25ºC bei einer relativen Luftfeuchte von 50-60% und einem Hell-Dunkel Zyklus von jeweils 12 h (Lichtphase von 6-18 Uhr). Die Tiere wurden für 14 Wochen entweder mit einer Kontrolldiät (LFD, 10% kcal aus Fett) oder Hochfettdiät (HFD, 60% kcal aus Fett) *ad libitum* gefüttert[158]. Das Körpergewicht der Mäuse wurde für den gesamten Versuch zwei Mal in der Woche mit der *Tierwaage PK2000* erfasst und dokumentiert. Ab Beginn der 11. Fütterungswoche wurden die Tiere nach Körpergewicht randomisiert und jeden Tag jeweils mit n=10 pro Gruppe und Genotyp mit Vehikel, C21 (0,3 mg/kg KG), Valsartan (3 mg/kg KG), C21/Valsartan (0,3/3 mg/kg KG) i.p. bzw. mit Hydralazin (250 mg/L) über das Trinkwasser über vier Wochen behandelt (siehe Abb. 2.1).

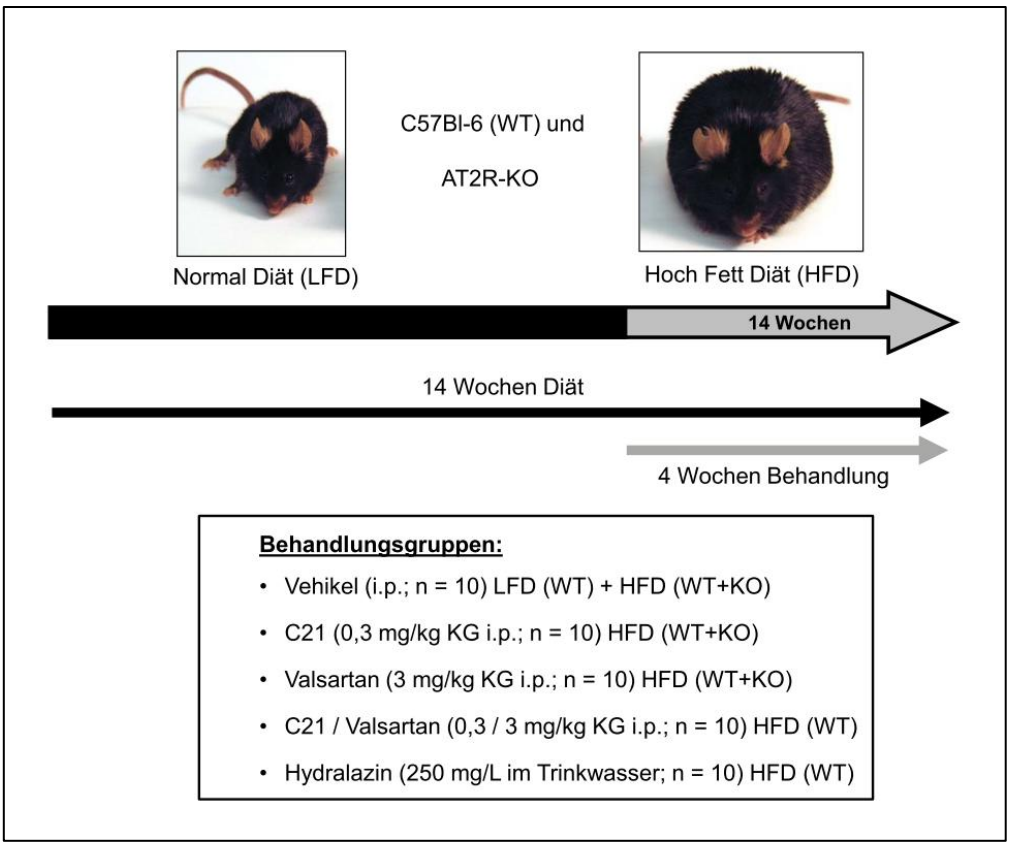

Abb. 2.1 Behandlungsschema des Tierversuchs

Für die HFD-Gruppen Vehikel, C21 und Valsartan wurden zusätzlich neben den Wildtyp (WT) Mäusen auch AT2R-KO Mäuse behandelt. Insgesamt n=90 Tiere

Im Anschluss an die vierwöchige Behandlung erfolgten metabolische Untersuchungen wie Bestimmung der Glukosetoleranz, der Insulintoleranz, des Blutdrucks und der Körperzusammensetzung. Für die indirekte Kalorimetrie und Aktivitätserfassung wurden die Tiere für 24 h in Stoffwechselkäfige eingesetzt. Alle Untersuchungen fanden in den Wochen fünf bis sechs nach Behandlungsbeginn statt, in denen die Tiere weiterhin, wie oben beschrieben, jeden Tag behandelt und gefüttert wurden.

2.2.2 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte in der 5. Woche nach Beginn der Behandlung. Mit Hilfe des Bludruckmessgerätes *Power Lab 4/20* und der Maus Manschette *MLT125/M* (Druckmanschette mit Pulsaufnehmer) wurde am wachen Tier der systolische Blutdruck nicht-invasiv bestimmt. Diese Methode wird auch als „Tail-Cuff-Methode“ bezeichnet. Hierbei wurden die Versuchstiere in spezielle Plexiglasröhrchen (Restrainer) verbracht. Der Schwanz wurde zur Hyperämisierung der Arterie mit einer wärmenden Rotlichtlampe bestrahlt und auf eine Temperatur von ca. 38ºC konstant gehalten. Anschließend wurde die Druckmanschette am Schwanz angebracht. An einem Computer wurde das elektrische Signal des Pulsaufnehmers optisch in Pulswellensignale übersetzt. Erhält man nun konstante Pulswellensignale wird durch einen mit dem Steuerteil verbundenen Schlauch schrittweise die Manschette aufgeblasen (ca. 5 mmHg/s). Durch den Druckanstieg wurde eine arterielle Okklusion erreicht. Ist die Arterie vollständig verschlossen, erkennt der Pulssensor keine Pulsation mehr. Anschließend wurde der Druck in der Manschette wieder abgelassen. Der Druck, an dem erstmals wieder Pulssignale erscheinen, entspricht also dem systolischen Blutdruck und konnte nun optisch abgelesen werden. Es wurden bis zu fünf Messungen pro Tier durchgeführt. Die Messungen erfolgten an Vormittagen in der inaktiven Phase der Mäuse.

2.2.3 Metabolische Phänotypisierung

2.2.3.1 Glukose Toleranz Test (GTT)

Die Bestimmung der Glukosetoleranz wurde nach Abschluss der vierwöchigen Behandlungen durchgeführt. Für den GTT wurden die Tiere über Nacht nüchtern gesetzt. Nach initialer Isofluran Betäubung wurde den Tieren mittels retrobulbärer Punktion des Venenplexus Blut abgenommen. Es wurde mit dem Blutzuckermessgerät *Precision Xceed* die Blutglukose bestimmt (Zeitpunkt 0). Anschließend wurde den Tieren intraperitoneal (i.p.) 1 g/kg KG Glukose-Lösung injiziert. Nach Punktion der Schwanzvene erfolgte jeweils eine Quantifizierung der Blutglukose nach 15, 30, 60, 90 und 120 min.

Die *Area Under the Curve* (AUC) wurde mit der allgemeinen Trapezmethode berechnet. Hierzu wurden die Blutglukosekonzentrationen (BG) zweier aufeinander folgenden Zeitpunkte addiert, dann durch zwei dividiert und mit dem Zeitabstand der beiden Werte multipliziert. Anschließend wurde aus diesen Werten die Summe gebildet.

Beispiel:

Zeitpunkt:	0	15	30	60	90	120
BG:	A	B	C	D	E	F

=((A+B)/2*15)+((B+C)/2*15)+((C+D)/2*30)+((D+E))/2*30)+((E+F)/2*30)

2.2.3.2 Insulin Toleranz Test (ITT)

Der ITT erfolgte ca. eine Woche nach dem GTT. Die Tiere wurden ebenfalls über Nacht nüchtern gesetzt. Bei diesem Test erfolgte keine initiale Blutabnahme, so dass die Tiere gleich für die Bestimmung des Ausgangs-Glukose Wertes (Zeitpunkt 0) an der Schwanzvene punktiert wurden. Anschließend wurde den Tieren Insulin (Insuman® Rapid) 0,25 I.E./kg KG i.p. verabreicht und die Blutglukose nach 15, 30, 60, 90, 120 und 150 min. bestimmt. Für die Berechnung der AUC wurde die unter 2.2.3.1 erwähnte Formel angewendet.

2.2.4 Bestimmung der Körperzusammensetzung

Die Bestimmung an Körperfett und fettfreier Masse erfolgte mittels *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Messung mit dem *Echo MRI Maus* Gerät. Hierfür wurden die Mäuse einzeln in ein Plexiglasrohr verbracht und arretiert. Anschließend erfolgte die Messung innerhalb von 30 Sekunden.

2.2.5 Metabolische Untersuchung im Stoffwechselkäfig

Nach Abschluss der vierwöchigen Behandlung wurden die Tiere metabolisch im Stoffwechselkäfig System *Labmaster* (TSE Systems) untersucht. Hierfür wurden jeweils vier Tiere einzeln für 24 h in die Labmaster-Käfige gesetzt. Die Tiere bekamen *ad libitum* das entsprechende Futter und Wasser. Der Verbrauch über die 24 h wurde automatisch über elektronische Waagen gemessen. Die lokomotorische Aktivität wurde über Lichtschranken registriert. Die Stoffwechselkäfig-Untersuchungen wurden in der vierten bis sechsten Woche nach Behandlungsbeginn durchgeführt.

2.2.5.1 Indirekte Kalorimetrie

Während der 24-stündigen Untersuchung im Stoffwechselkäfig wurden auch der CO_2-Ausstoß und der O_2-Verbrauch der Tiere über entsprechende Sensoren gemessen. Das Verhältnis aus produzierter CO_2-Menge und verbrauchter O_2-Menge gibt darüber Aufschluss, welche Makronährstoffe primär als Energiequelle oxidiert werden[165]. Dieses Verhältnis wird auch als respiratorischer Quotient (RQ) ausgedrückt ($RQ=VCO_2/VO_2$). Aufgrund stöchiometrischer Verhältnisse von CO_2 und H_2O der entstehenden Produkte kann man bei entsprechendem O_2-Verbrauch indirekt auf die Ausgangssubstrate schließen. Bei reiner Kohlenhydratverbrennung beträgt der RQ = 1,0 - bei Proteinen 0,8 und bei reiner Fettverbrennung 0,7. Mithilfe der CO_2- und O_2-Menge lässt sich auch der gewichtsspezifische Gesamtenergieumsatz *(=Energy expenditure, EE*) durch die Formel nach *Frenz*[166] berechnen:

$$EE = (16{,}17 * VO_2\ [l/d]) + (5{,}03 * VCO_2\ [l/d]) – (N\ [g/d] * 5{,}98)$$

VO_2 und VCO_2 wuden alle 15 min. gemessen und die Stickstoffmenge (N) wurde standardmäßig als 0,1 angenommen.

2.2.6 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Etwa sechs Wochen nach Behandlungsbeginn und nach Abschluss aller Lebenduntersuchungen erfolgte eine finale retrobulbäre Blutentnahme unter Isofluranananästhesie zur Erfassung von Biomarkern und TG aus dem Blutserum. Die Tiere wurden getötet und es wurden die Organe entnommen. Nach Wägung wurden die Organe für die histologischen Untersuchungen umgehend in Formalinlösung eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet (siehe 2.2.11.1). Für die RNA- und Proteinbestimmung wurden die Organe in flüssigem Stickstoff gesammelt und anschließend bei -80ºC eingefroren.

2.2.7 Zellkultur

2.2.7.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) erworben und anhand der jeweiligen Empfehlung des Herstellers hin kultiviert und passagiert.

3T3-L1 Zellen

Kultivierung

Die 3T3-L1 Präadipozyten wurden standardmäßig bei 37ºC und 5% CO_2 Atmosphäre in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 1 % Penicillin / Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert. Qualität und Grad der Konfluenz der Zellen wurden visuell mit dem *Olympus CK 40* Mikroskop überprüft.

Passagierung

Die Zellen wurden jeden zweiten Tag mit frischem Medium versorgt**.** Für die Stammerhaltung, Selektion und Vermehrung wurden die Zellen bis zu einer maximalen Konfluenz von ca. 60% kultiviert und anschließend passagiert. Für die Passagierung wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA abgelöst und etwa im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Differenzierung

Für die Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten zu adulten Adipozyten wurden die Zellen in 6-Well Platten ausgesät und anschließend bis zur 100%igen Konfluenz wachsen gelassen. Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nach einem modifizierten Protokoll mit einem Induktionsmix aus 500 µM IBMX, 4 µM Dexamethason und 4 µg/mL Insulin im Kulturmedium über drei Tage behandelt. Anschließend wurde der Induktionsmix durch Kulturmedium mit 4 µg/mL ausgetauscht und über weitere drei Tage inkubiert[167]. Der Grad der Differenzierung wurde mit dem Mikroskop überprüft. Es wurden nur Adipozyten mit einem Differenzierungsgrad von mindestens 90% verwendet. Eine anschließende pharmakologische Behandlung fand dann nach 24-stündigem Serumentzug (DMEM + 0,5% FBS + 1% Pen/Strep) statt.

THP-1 Zellen

Kultivierung

Die THP-1 Monozyten wurden bei 37ºC und 5% CO_2 in RPMI-1640 unter Zusatz von 10% FBS und 1% Pen/Strep kultiviert.

Passagierung

Die Zellen wurden jeden zweiten Tag mit frischem Medium versorgt**.** Für die Passagierung wurden die Zellen bis zu einer maximalen Dichte von etwa 70% in Suspension kultiviert. Eine geringere Dichte der Suspensionszellen wurde durch einfache Zugabe von frischem Medium in die Zellkulturflasche erreicht. Bei Erreichen eines bestimmten Volumens wurden die Zellen auf neue Flaschen verteilt.

Differenzierung

Zur Differenzierung der THP-1 Monozyten zu Makrophagen wurden die Zellen abzentrifugiert und mit neuem Medium versorgt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit $5x10^5$ Zellen/mL Medium in 6-Well Platten (2 mL pro Well) ausgesät. Daraufhin wurden die Zellen nach einem modifizierten Protokoll mit 100 ng PMA/mL Medium behandelt und so über vier Tage zu Makrophagen differenziert[168]. Eine anschließende pharmakologische Behandlung fand nach 24-stündigem Serumentzug (RPMI + 0,5% FBS + 1% Pen/Strep) statt.

HEK-293 Zellen

Kultivierung

Die HEK-293 Zellen wurden standardmäßig bei 37ºC und 5% CO_2 Atmosphäre in DMEM unter Zusatz von 10% FBS und 1% Pen/Strep kultiviert.

Passagierung

Die Zellen wurden jeden zweiten Tag mit frischem Medium versorgt**.** Zur Passagierung wurden die Zellen bis zu einer maximalen Konfluenz etwa 60% kultiviert, trypsinisiert und im Verhältnis von etwa 1:10 in frischem Medium auf neue Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.7.2 Öl-Rot O Färbung

3T3-L1 Präadipozyten wurden über drei Tage mit Dexamethason, Insulin und den Testsubstanzen behandelt. Weitere sechs Tage der Behandlung mit den Testsubstanzen folgten, wobei nur in den ersten dieser drei Tage noch Insulin zugefügt wurde. Lipophile Substanzen, wie Pioglitazon, bedurften einer Lösungsvermittlung durch DMSO. Nach insgesamt neun Tagen der Differenzierung wurden die Zellen zur Färbung intrazellulärer Lipideinlagerungen mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit einer Öl-Rot O Lösung (0,5% in 60% Isopropanol) unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal kurz mit 60% Isopropanol gewaschen und die gefärbte Platte eingescannt. Zur Quantifizierung des Öl-Rot O Farbstoffs wurde dieser in 80% Isopropanol gelöst und anschließend die Absorption bei 515 nm gemessen[169].

2.2.7.3 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion von HEK-293 Zellen wurde das Lipofectamin® 2000 nach den Angaben des Herstellers angewendet. Im ersten Ansatz wurden der PPARγ-LBD Expressionsionsvektor pGal4-hPPARγ-DEF (100 ng), der Firefly-Luziferase-Reportervektor pGal5-TK-pGL3 (400 ng) und der Renilla-Luziferase-Kontrollvektor pRL-CMV (5ng) in Opti-MEM verdünnt. In einem zweiten Ansatz wurde Lipofectamin (1 µL / 2 µg DNA) ebenfalls in Opti-MEM verdünnt und für 5 min. inkubiert. Nach Vereinigung der Ansätze und weiteren 15 min. Inkubation wurde das Transfektionsreagenz vorsichtig auf die Zellen

gegeben[170,171]. Nach einer Transfektionszeit von 4 h wurde das Medium durch DEMEM (0,5% FBS, 1% Pen/Strep) ersetzt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über 24 h entsprechend stimuliert.

2.2.7.4 Luziferase Reporterassay für die PPARγ LBD Aktivierung

Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* nach den Angaben des Herstellers verwendet. Nach 24-stündiger Stimulation der transfizierten HEK-293 Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und im passiven Lysepuffer aufgenommen. Nach kurzem Schockgefrieren der Zellen bei -80ºC und Herstellung der beiden Substratlösungen LAR II und Stop&Glo für die Firefly-Luziferase bzw. Renillia-Luziferase Aktivität, wurden die Proben am Luminometer vermessen. Anschließend wurde aus dem Quotienten aus Renilla- und Firefly-Aktivität die relative Luziferase-Aktivität (RLA) errechnet.

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1 RNA Isolation

Für die RNA Isolation aus Zellen wurde das *NucleoSpin® RNA II Kit* (Machery-Nagel) verwendet. Für die Isolation aus tierischem Gewebe wurden das *RNeasy® mini Kit* bzw. für das Fettgewebe das *RNeasy® lipid tissue mini kit* (beide Qiagen) verwendet. Alle Schritte wurden streng anhand der vom Hersteller angegebenen Anleitungen durchgeführt. Das Grundprinzip aller Kits beruht auf der spezifischen Bindung der präzipitierten RNA an entsprechend geladene Polymere (siliziumbasiert), der Aufreinigung durch Wasch-Schritte, dem zusätzlichem DNA Verdau durch eine DNAse, und der anschließenden Resolvatation der RNA mit einem polarem Lösungsmittel wie RNAse freies H_2O.

Die Qualität und Konzentration der gewonnene RNA wurden mit dem *Nano-Drop* bestimmt. Das Prinzip liegt hier bei einer spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung. Das Gerät bestimmt die optische Dichte bei λ=260 nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und bei λ=280 nm (OD_{280}), dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Aus dem Quotienten OD_{260} und OD_{280} kann nun der Kontaminationsgrad mit genomischer DNA bzw. aromatischem Lösungsmittel ermittelt werden.

Bei reiner RNA sollte der Wert bei 2,0 liegen. Es wurden nur Proben verwendet, dessen $OD_{260}/OD_{280} > 1,6$ waren. Da die OD_{260} von 1 genau 40 µg/mL RNA entspricht, kann hieraus die vorliegende RNA Menge berechnet werden. Die RNA wurde anschließend gleich weiter zur cDNA-Synthese verwendet oder bei -80ºC eingefroren.

2.2.8.2 Reverse Transkriptase Reaktion zur cDNA-Synthese

1. 1 µg mRNA wurde auf ein Volumen von 12,5 µL mit H_2O aufgefüllt und mit 1 µL Random Primern versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 5 min. bei 70ºC denaturiert.
2. Die Probe wurde sofort für 10 min. auf Eis gestellt und anschließend mit folgendem Reaktionsansatz versetzt:

4 µL	MLV – Puffer (5x)
1 µL	dNTP – Mix 10 mM
1 µL	M-MLV Reverse Transkriptase
0,5 µL	RNAsin
20 µL	Gesamtvolumen

3. Die Probe wurde für 1 h bei 37ºC inkubiert.

Zusätzlich wurden noch Reverse Transkriptase negativ (RT-) Proben synthetisiert, um den Einfluss von genomischer DNA während der Genexpressionsmessung auszuschließen.

2.2.8.3 Quantitative Real-Time PCR

Prinzip

Die Genexpressionsanalysen wurden mit der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Verwendung eines mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, dem SYBR® Green I. Durch die Bindung an die doppelsträngige DNA nimmt die Fluoreszenz vom SYBR® Green proportional mit der Menge des PCR Produktes zu. Für einige Gene wurden sequenzspezifische TaqMan® Sonden eingesetzt, mit welchen man eine höhere Spezifität und Sensitivität als mit dem

unspezifischen SYBR® Green System erreicht. Die Sonden sind an einem Ende mit dem Quencher und an dem anderen Ende mit einem Reporter-Floureszenzfarbstoff (5´-FAM als Farbstoff und 3´-TAMRA als Quencher) markiert. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.

Die PCR beruht auf einem Zyklus, welcher sich in drei Schritte unterteilt:

1. die *Denaturierung* zur Trennung der DNA-Stränge,
2. das *Annealing* zur Hybridisierung der Primer an die *single-stranded* DNA (ssDNA),
3. die *Elongation*, in welcher die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert werden, so dass die DNA im Anschluss wieder doppelsträngig vorliegt.

Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus kommt es schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Menge.

Standard Real-Time Reaktionsansatz für Systeme mit SYBR® Green:

12,5 ng	cDNA
12,5 µL	Mastermix (2x) Sybrgreen®
0,25 µL	Forward-Primer 20µM
0,25 µL	Reverse-Primer 20 µM
ad 25 µL	H_2O

Das Verzeichnis der verwendeten Primer Sequenzen ist in Tab. 2.1 angegeben.

Real-Time Reaktionsansatz für Systeme mit TaqMan® Sonde:

12,5 ng	cDNA
10,0 µL	TaqMan® (2x) Gene Expression Master Mix
1,0 µL	TaqMan® (20x) Gene Expression Assay
ad 20 µL	H_2O

Das Verzeichnis der verwendeten Assay on Demand (AOD) Primer-Sondengemische ist in Tab. 2.2 angegeben.

Messung und Quantifizierung

Die Messungen wurden am *MX3000P* durchgeführt. Alle Gene mit SYBR® Detektions-System wurden standardmäßig mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen. Dieses Programm bestand aus 30 s bei 95ºC für die *Denaturierung*, 30 s bei 60ºC für das *Annealing* und 30 s bei 72ºC für die *Elongation*. Die *Annealling*-Temperatur wurde für alle Primer optimal angepasst und etabliert und betrug immer 60ºC. Am Ende der PCR-Reaktion wird eine Schmelzkurve aufgezeichnet, die zur Überprüfung des Produktes herangezogen wurde. Anhand dieser Dissoziationskurve ist auch die Entstehung von unspezifischen Primer-Dimeren erkennbar. Das Thermalprofil für TaqMan® Systeme bestand aus 15 s für die *Denaturierung* bei 95ºC und 1 min. bei 60ºC für *Annealing* und *Elongation*.

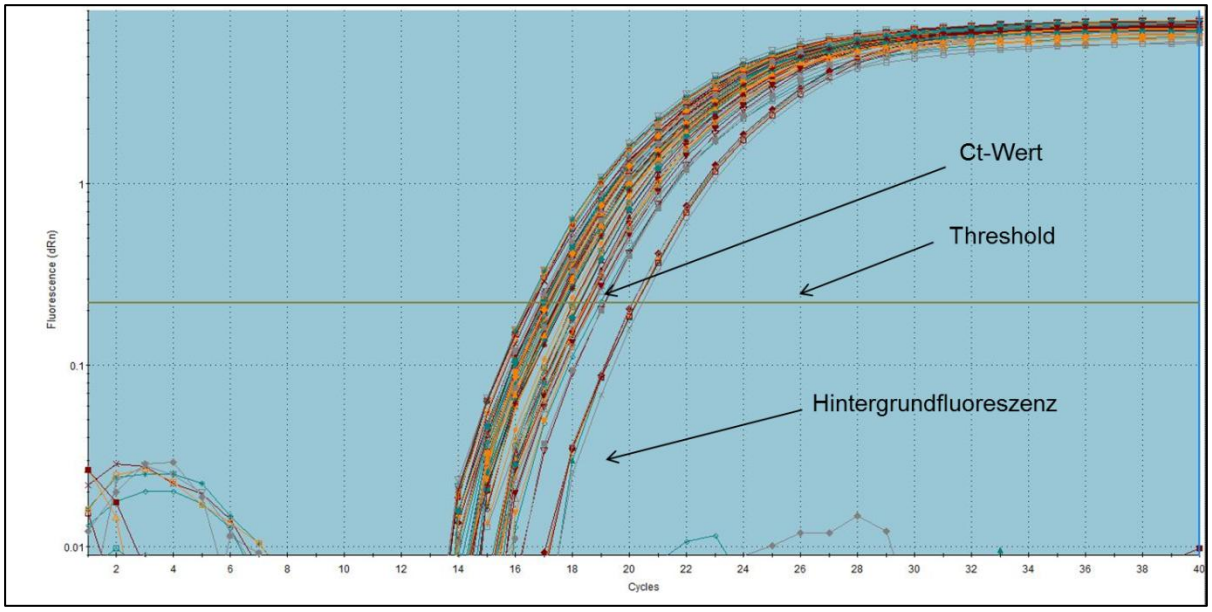

Abb. 2.2 Amplifikations-Beispiel von Adiponektin

Bei der Quantifizierung wird das nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenzsignal gegen die Zykluszahl aufgetragen (siehe Abb. 2.2). Anhand dieser Darstellung wird für die Hintergrund-Fluoreszenz ein Schwellenwert (Threshold) festgelegt. Dies geschieht aufgrund der PCR-Reaktionskinetik, da in den frühen PCR-Zyklen eine weitestgehend exponentielle Amplifikation stattfindet. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt, wird als Ct-Wert (*Cycle of threshhold* für Schwellenwert-

Zyklus) bezeichnet. Das Setzen des Schwellenwertes sollte hierbei im Bereich der maximalen exponentiellen Zunahme des PCR-Produktes liegen. Jede Probe wurde in der Regel dreifach-bestimmt und dann auf die Expression eines stabil exprimierten Gens (Housekeeping-Gen) bezogen. Die Proben aus Zellkulturversuchen wurden auf die mitochondriale Untereinheit 18s und die Proben aus tierischem Gewebe auf das saure ribosomale Phosphoprotein PO (36B4) bezogen.

Die Genexpression wurde mit Hilfe der ΔΔ-Ct Methode berechnet. Der Ct-Wert vom Housekeeping-Gen wird hierbei vom Ziel-Gen abgezogen (Δ-Ct). Die beiden Δ-Ct-Werte zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe werden dann ein weiteres Mal voneinander abgezogen (ΔΔ-Ct) und als n-fache Expression gegenüber der Kontrolle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) angegeben.

2.2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.2.9.1 Proteinbestimmung

Proteingewinnung

Für die Bestimmung der Proteinexpression in den 3T3-L1 Adipozyten wurde der Zellüberstand vorsichtig abgesaugt und bei -20ºC für weitere Proteinbestimmungen eingefroren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µL Protein-Lysispuffer (RIPA-Puffer) lysiert. Zur besseren Zell-Lyse wurden die Zellen kurz im Ultraschallbad behandelt. Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 14.000 RPM wurde die klare Proteinschicht mit einer Spritze vom fetthaltigen Überstand und dem Zellrest getrennt.

Quantifizierung

Der Proteingehalt wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* bestimmt. Mit Hilfe eines parallel mitlaufenden BSA Standards wird mittels linearer Regression eine Standardkurve erstellt, mit welcher der Proteingehalt der Proben aufgrund der gemessenen Absorptionen des entstehenden Farbkomplexes berechnet werden kann.

2.2.9.2 Western Blotting

Für die Bestimmung des Adiponektins wurden 30 µg Gesamtprotein mit Protein-Ladepuffer versetzt und auf ein 10% bzw. 15% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine unter Verwendung einer Nassblotkammer im Towbin-Transfer-Puffer auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Überprüfung des erfolgreichen Protein-Transfers wurden die Gele mit einer Comassie-Lösung und die Membranen mit einer Ponceau-Lösung gefärbt. Die Membran wurde anschließend in 7% Milchpulver in TBS-T zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 60 min. inkubiert. Nach der Etablierung der optimalen Antikörperkonzentrationen wurde der Erstantikörper gegen Adiponektin 1:8000 und gegen Glycerinaldehyd-3-Phospat-Dehydrogenase (GAPDH) 1:20000 eingesetzt und über Nacht bei 4ºC inkubiert. Die stabil exprimierte GAPDH diente hierbei als Ladekontrolle. Der Zweitantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper) wurde 1:1000 eingesetzt und über 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Peroxidasereaktion mit dem *ECL™ Western Blotting Detection Reagents Kit* als Chemolumineszenz und der Auflage eines Filmes nach entsprechender Expositionszeit (5 s bis 5 min.). Anschließend wurde der Film entwickelt und eingescannt.

2.2.9.3 ELISA

Die Sezernierung bestimmter Proteine ins Zellmedium wurde mit der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Methode gemessen. Hierfür wurde der Zellüberstand abgenommen und für 10 min. bei 3.000 RPM zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vom Zellrest abgenommen und für die Quantifizierung weiter verwendet. Für die Bestimmung des humanen IL-6 im Zellüberstand der THP-1 Makrophagen wurde das *Quantikine® human IL-6 ELISA Kit* und für das murine Adiponektin der 3T3-L1 Adipozyten das *Mouse / Rat Adiponectin ELISA Kit* verwendet (Siehe 2.1.2). Es wurden hierbei jeweils streng die Instruktionen des jeweiligen Herstellers eingehalten. Am Ende der Reaktion wurden jeweils die Absorptionen am Photospektrometer *Benchmark Plus* bestimmt und die Konzentrationen mit Hilfe eines mitgemessenen Standards ausgerechnet.

2.2.9.4 Multiplex Assay

Bestimmte Proteine aus dem Zellüberstand der 3T3-L1 Adipozyten und dem Serum der Versuchsmäuse wurden mit der Multiplex Methode der Firma *Bio-Rad* bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein immunbasiertes multiples Verfahren zur Bestimmung von Zytokinen und Peptiden.

Prinzip

Ähnlich wie die ELISA-Methode arbeitet dieses Prinzip mit bestimmten Antikörpern, die spezifisch gegen den zu bestimmenden Analyten gerichtet sind. Während bei dem ELISA der Antikörper fest an den Boden einer Platte gekoppelt ist und man hierbei immer nur einen Analyten bestimmen kann, basiert der Multiplex Assay auf einem Suspensions-Gemisch aus verschiedenen magnetischen Antikörper-gekoppelten Kügelchen. Diese Kügelchen haben einen Durchmesser von ca. 5,6 µm und sind zusätzlich Fluoreszenz-Farbmarkiert. Jeder spezifische Antikörper erhält hierbei eine bestimmte Farbkodierung nach der sogenannten xMAP® Karte (Siehe Abb. 2.3) Je nach Mischungsverhältnis der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, erhält man einen individuellen Farbton für den jeweiligen Analyten.

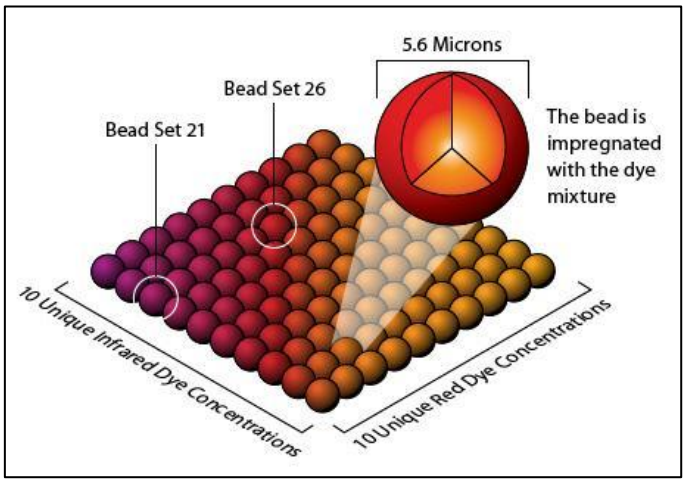

Abb. 2.3 Lumniex xMAP® Farbkodierungs-Karte

Quelle: Alexander Fleming - Biomedical Sciences Research Center (Vari, GRE)[172]

Es ist somit möglich bis zu 100 verschiedene Analyten gleichzeitig mit nur einer Messung zu erfassen. Dies ergibt sich aus den möglichen 10 x 10 verschiedenen Farbkombinationen. Die verschiedenen Antikörper werden jeweils durch einen Biotin-Antikörper und Streptavadin-Phycoerythrin (SA-PE) mit der Bildung eines „Immun-Sandwichs“ erfasst. Da die Kügelchen

magnetisch sind, ist es möglich für die einzelnen Waschschritte die automatisierte *Bio-Plex Pro Wasch-Station* zu verwenden.

Messung und Quantifizierung

Die Messung fand an einen Bio-Plex 200 Sytem der Firma *Bio-Rad* statt. Dieses System ist mit einem Doppel-Laser ausgestattet. In einem Durchflusszytometer regt ein Laser (rot) bei 635 nm das gemischte Fluorophor zur Erfassung der individuelle Farbkodierung des Analyten im Dye-Detektor (DD) an. Der andere Laser (grün) dient zur Erfassung SA-PE Signals bei 532 nm im Assay Detektor. (Siehe Abb. 2.4) Die Bead Detektoren dienen zur Unterscheidung und Erfassung von einzelnen und aggregierten Kügelchen.

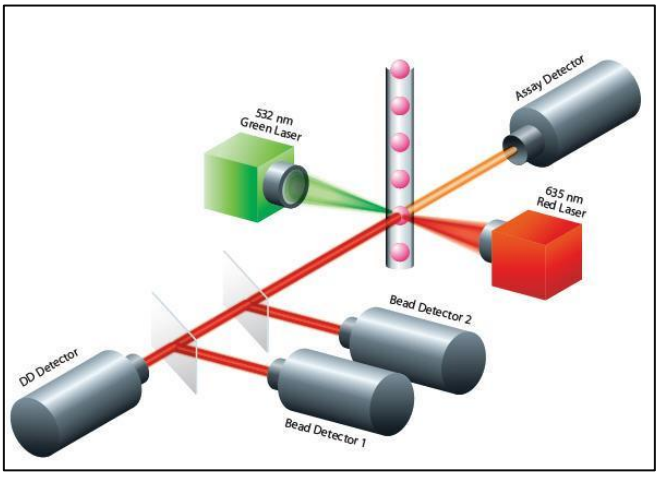

Abb. 2.4 Detektions-Laser im Bio-Plex 200 System

Quelle: Alexander Fleming - Biomedical Sciences Research Center (Vari, GRE)[173]

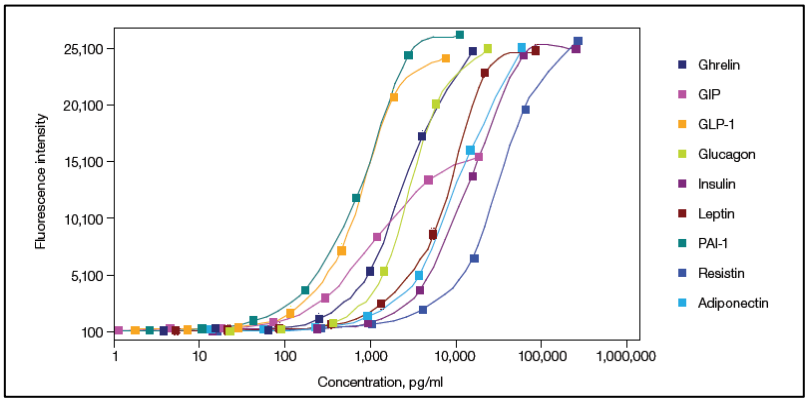

Abb. 2.5 Standardkurven am Beispiel eines Bio-Plex Diabetes Assays

Quelle: Bio-Rad (München, D)

Anhand der spezifischen Farbkodierung und der Fluoreszenzintensität des SA-PE-Signals kann mit Hilfe des mitgemessenen Standards der Gehalt des jeweiligen Analyten bestimmt werden (siehe Abb. 2.5). Neben fertigen Kits mit bestimmten vorgegebenen Biomarkern bietet die Firma *Bio-Rad* auch die Möglichkeit der individuellen Zusammenstellung der gewünschten Analyten (x-Plex). Basierend auf den Zellkulturversuchen (siehe 3.1) wurden folgende Analyten ausgewählt und quantifiziert:

- Adiponektin
- Leptin
- Resistin
- GLP-1
- GIP
- IL-6
- TNF-α
- IL-10

Für die Bestimmung von Maus-Seren wurden 12,5 µL bzw. 50 µL für die Bestimmung der Zellüberstande der 3T3-L1 Adipozyten eingesetzt. Die Seren bzw. Kulturmedien wurden jeweils 1:4 verdünnt. Die magnetischen Kügelchen mit den gegen die oben genannten Analyten gerichteten Antikörpern wurden gemischt und der Assay wurde nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt und vermessen. Da beim Adiponektin deutlich höhere physiologische Konzentrationen vorliegen als bei den anderen Analyten, wurden hier die Proben 1:1600 verdünnt. Das Adiponektin Bio-Plex Assay ist nicht zur Parallelmessung mit anderen Analyten kompatibel und musste daher als „single-Plex“ separat gemessen werden. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung.

2.2.10 Triglyzeridbestimmung

Die Bestimmung der Triglyzeride im Serum bzw. in den Leben der Versuchsmäuse erfolgte mit dem *Triglycerides FS Kit (*Diasys). Es handelt sich hierbei um ein kolorimetrisches Bestimmungsverfahren. Die Bestimmung erfolgt nach enzymatischer Spaltung mit Lipoproteinlipase. Als Indikator entsteht ein Chinonimin, welches unter katalytischer Wirkung von Peroxidase aus Wasserstoffperoxid, 4-Aminoantipyrin und 4-Chlorphenol

entsteht. Die Extinktion wurde bei 500 nm gegen den Reagenzienleerwert am Photospektrometer *Benchmark Plus* bestimmt und die Konzentrationen mit Hilfe eines mitgemessenen Standards ausgerechnet. Alle Schritte wurden nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung.

Für die Bestimmung des Triglyzeridgehaltes in den Lebern der Mäsue wurde ca. 100 mg Gewebe unter Trockeneis-Kühlung eingewogen. Anschließend wurden 1 mL eines Chloroform-Methanol-H_2O (2T:1T:0,8T)-Gemisches hinzugegeben und mit dem *Polytron PT2100* homogenisiert. Zur weiteren Phasenbildung wurden weitere 2 mL Chloroform und 1 mL H_2O hinzugegeben und 2 min. lang kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 4.000 RPM für 10 min. zentrifugiert und der triglyzeridhaltige Chloroform-Unterstand abgenommen und bei 70ºC eingedampft. Zum Schluss wurden die Triglyzeride in Isopropanol resuspendiert und kolorimetrisch mit dem *Triglycerides FS Kit* vermessen[174].

2.2.11 Histologische Untersuchungen

2.2.11.1 Dehydrierung und Einbettung

Nach der Organentnahme wurden die Lebern der Versuchstiere in Formaldehydlösung verbracht und für 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach dem Protokoll der Tab. 2.3 dehydriert, in Paraffin eingebettet und für Färbeversuche geschnitten.

Subtanz	Wirkdauer
EtOH 70%, 80%, 96 %	Jeweils 1 h
EtOH 100%	2x 1 h
Neo-Clear	2x 40 min.
Paraffin 60	1 h
Paraffin 90	1 h

Tab. 2.3 Protokoll zur Dehydrierung der Lebern

2.2.11.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxyllin-Eosin Färbung stellt eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie dar. Mit dieser ist es möglich, Gewebestrukturen von Gewebeschnitten durch den Kernfarbstoff Hämatoxyllin und dem Plasmafarbstoff Eosin durch Kontrastierung darzustellen. In der Tab. 2.4 ist das Färbeprotokoll aufgeführt.

Subtanz	Wirkdauer
Neo-Clear	2x 5 min.
EtOH 100%	2x 2 min.
EtOH 96%, 80%, 70%	Je 2 min.
H_20 dest.	5 min.
Hämatoxyillin	5 min.
Leitungswasser (warm)	5 min
Eosin	5 min.
Leitungswasser (kalt)	5 min
EtOH 70%, 80%, 96 %	Je 2 min.
EtOH 100%	2x 2 min.
Neo-Clear	2x 5 min.

Tab. 2.4 Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin Färbung an Paraffinschnitten

2.2.12 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5. Für die Zellkulturexperimente wurden unter Annahme einer Normalverteilung mit einfaktoriellen Varianzanalysen und anschließender α-Fehlerkorrektur (1-fach ANOVA post-hoc Bonferroni) bzw. zum Vergleich zweier Gruppen ungepaarte t-Tests durchgeführt. Für die statistische Analyse der Tierexperimente wurden entweder 1-fach bzw. 2-fach ANOVA post-hoc Bonferroni Berechnungen durchgeführt. Die Signifikanzstufen wurden herbei auf $p<0,05$ (signifikant) und $p<0,01$ bzw. $p<0,001$ (hoch signifikant) definiert. Alle Daten werden als ±SEM (Standardfehler) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 AT2R-Stimulation in eukaryotischen Zellen

Zur Charakterisierung inflammatorischer und metabolischer Prozesse wurden in *in-vitro* Versuchen verschiedene Inflammationsmodelle an 3T3-L1 Adipozyten und THP-1 Makrophagen untersucht. In der Einleitung wurde die Relevanz der beiden Zelltypen in der Pathophysiologie der Fettgewebsinflammation und IR beschrieben. Alle Versuche wurden, wenn nicht anders angeben, in drei unabhängigen Versuchen (n=3) wiederholt.

3.1.1 AT2R-Aktivierung in 3T3-L1 Adipozyten

Murine 3T3-L1 Präadipozyten wurden, wie in 2.2.7.1 beschrieben, zu adulten Adipozyten differenziert. Nach 24 h Serumentzug (0,5% FBS) wurden die Zellen zur Induktion der *in-vitro* Inflammation mit TNF-α 10 ng/mL Zellmedium behandelt. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Modell zur Erzeugung einer *in-vitro* IR in Adipozyten. Parallel hierzu wurden die Zellen mit und ohne C21 1 µM stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 mit der qRT-PCR bestimmt (siehe 2.2.9.3).

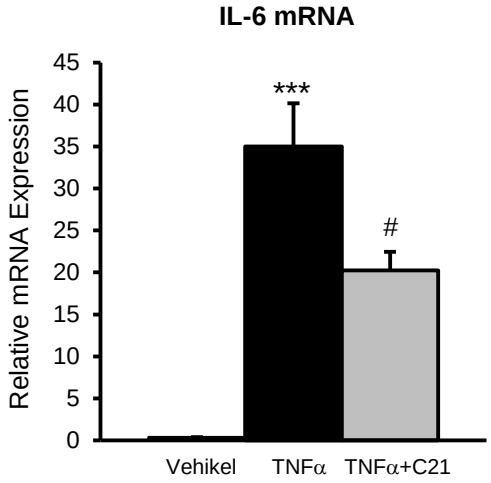

Abb. 3.1 IL-6 mRNA in 3T3-L1 Adipozyten

C21 reduziert die TNF-α induzierte IL-6 Expression.

*** p<0,001 vs. Vehikel; # p<0,05 vs. TNFα; n=3

Die Abb. 3.1 zeigt die IL-6 Expression, die durch die TNF-α Behandlung stark induziert wurde (35±5,1-fach). Durch die parallele Behandlung mit C21 konnte die Expression

signifikant reduziert werden (20,3±2,2-fach). Zur Überprüfung des Effektes auf Proteinebene wurde in einem ähnlichen Versuchsaufbau mittels Multiplex Assay (siehe 2.2.10.4) das IL-6 Protein im Zellüberstand quantifiziert (siehe Abb. 3.2). Zusätzlich wurde zur Überprüfung der Spezifität von C21 der AT2R-Blocker PD123319 eingesetzt. Die Zellen wurden 30 min. vor der TNF-α bzw. TNF-α/C21 Kombinationsbehandlung mit PD123319 10 µM preinkubiert.

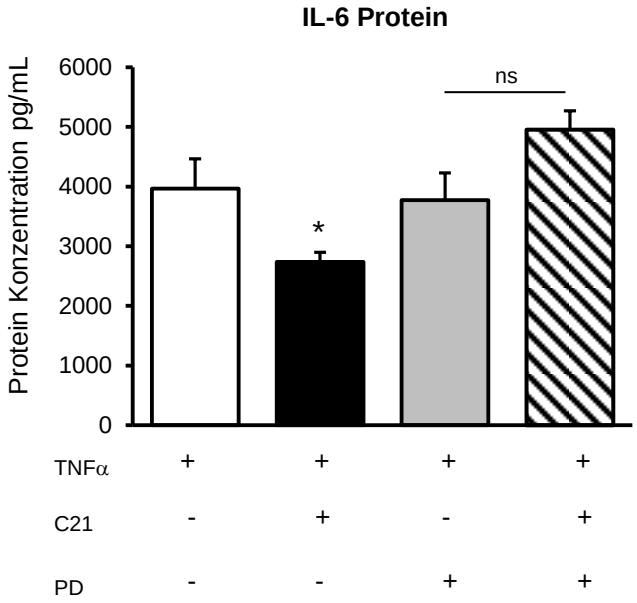

Abb. 3.2. IL-6 Protein Freisetzung

Die Behandlung mit C21 führt auch auf der Proteinebene zu einer Reduktion der IL-6 Freisetzung ins Medium. Der Effekt tritt nicht auf, wenn der AT2R blockiert ist.

* p <0,05 vs. TNFα; ns: nicht signifikant

Die Abb. 3.2 zeigt, dass die 24-stündige AT2R-Aktivierung in Adipozyten ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des IL-6 Proteins im Zellüberstand von TNF-α: 3963,8±501,2 auf TNF-α/C21: 2739,3±159,4 pg/mL führte. Die Blockade des AT2R mit PD123319 führte zu einer deutlichen Induktion der IL-6 Freisetzung durch TNF-α auf 3770,7±457,4 pg/mL, wobei die parallele C21-Inkubation keinen signifikanten Effekt auswies und mit 4952,8±318,4 pg/mL quantifiziert wurde.

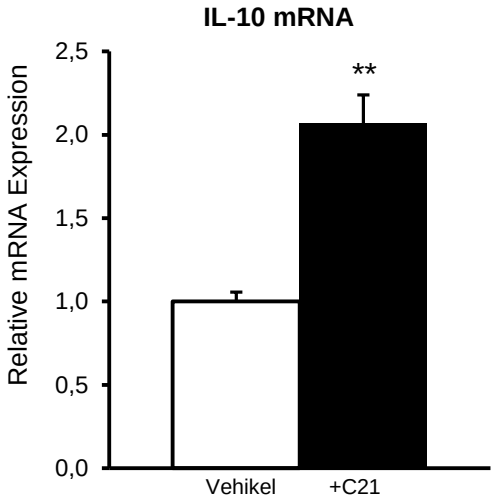

Abb. 3.3 Basale IL-10 mRNA Expression

Die AT2R-Aktivierung über 24 h erhöht die basale IL-10 Expression.

** p<0,01 vs. Vehikel; n=3

Die Abb. 3.3 zeigt, dass die 24 stündige AT2R-Stimulation zu einer Verdopplung der IL-10 Expression führte (von 1±0,06-fach auf 2,07±0,17-fach). Zusammengenommen konnte somit erstmals ein AT2R-spezifischer anti-inflammatorischer Effekt von C21 in Adipozyten gezeigt werden.

3.1.1.1 Regulation von Adipozytokinen

Es gab Hinweise darauf, dass es zusätzlich zu den erwarteten anti-inflammatorischen Effekten auch Einflüsse auf die Adipozytokin-Regulation geben könnte, denn *Clasen et al.* aus unserer Arbeitsgruppe beschrieben bereits 2005 eine AT2R-abhängige Adiponektin-Regulation in 3T3-L1 Adipozyten[175]. Daraufhin wurde wie im obigen Inflammationsmodell die Adiponektin-Regulation untersucht (Abb. 3.4).

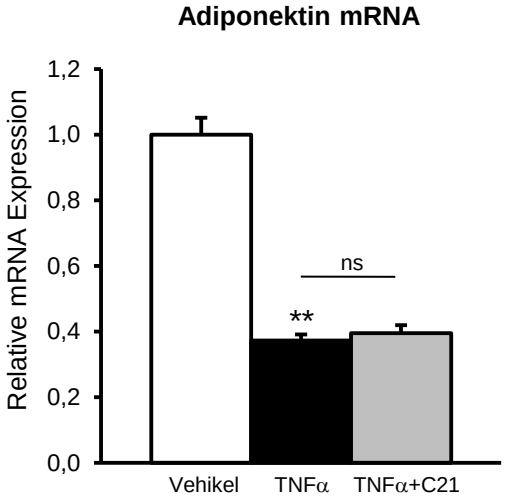

Abb. 3.4 Adiponektin mRNA Expression

Die AT2R-Stimulation führt auf mRNA zu keiner Regulation der Adiponektin-Expression.

** p<0,01 vs. Vehikel; n=3

Die Expression wurde durch die Behandlung mit TNF-α auf 0,37±0,02-fach stark reduziert (Abb 3.4). Die Parallelbehandlung mit C21 führte auf mRNA-Ebene zu keiner Regulation von Adiponektin. In der oben beschriebenen Arbeit von *Clasen et al.* wurden ebenfalls Disparitäten zwischen der AT2R-abhängigen Transkription und Translation beobachtet. Daher wurde die Regulation auf Proteinebene in einem gleichen Versuchsaufbau mittels Western Blot analysiert.

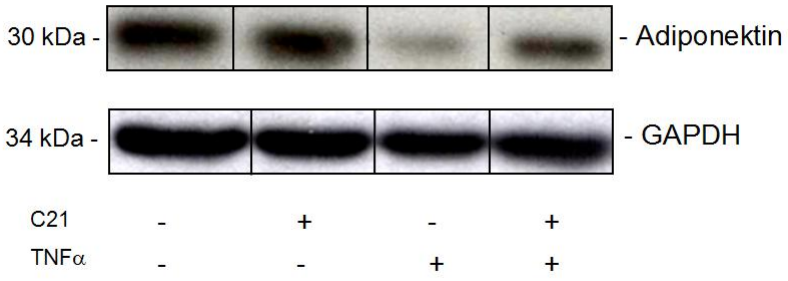

Abb. 3.5 Adiponektin Western Blot

Die AT2R-Stimulation erhöht die Adiponektin-Protein-Menge.

Repräsentativer Western Blot aus n=3

Abb. 3.5 zeigt korrespondierend mit der mRNA-Regulation den starken Rückgang des Adiponektin-Proteins durch die TNF-α Behandlung. Im Gegensatz zu den mRNA-Expressionsdaten kam es hier zu einer deutlichen Erhöhung des Adiponektin-Proteins.

Zusätzlich wurde die Adiponektin-Freisetzung in das Zellmedium mittels ELISA quantifiziert (siehe 2.2.10.3).

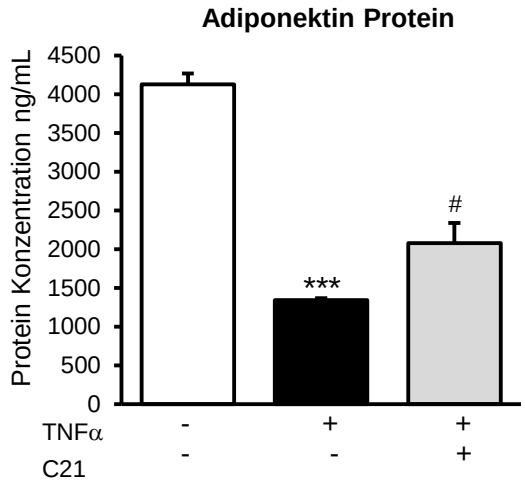

Abb. 3.6 Adiponektin Protein-Freisetzung

AT2-R Stimulation erhöht die Adiponektin-Konzentration im Zellüberstand.
*** p<0,001 vs. Kontrolle; # p<0,05 vs. TNFα

Die Abb. 3.6 zeigt ebenfalls den Rückgang der Adiponektin-Freisetzung ins Zellmedium durch TNF-α Zugabe (von basal 4128,4±138,8 auf 1341,0±26,5 ng/mL). Übereinstimmend mit den Western Blot Ergebnissen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration in den mit C21-behandelten Zellen auf 2078,1±260 ng/mL. Zum Ausschluss von unselektiven Mechanismen wurden die Zellen zusätzlich mit PD123319 10 µM behandelt, um den AT2R zu blockieren.

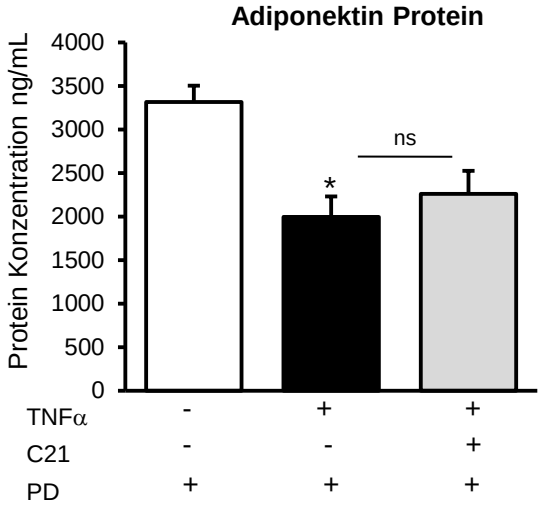

Abb. 3.7 Adiponektin Protein Freisetzung unter AT2R-Blockade.

Es findet kein Effekt auf die Freisetzung unter AT2R-Blockade statt.

* p<0,05 vs. PD; ns: nicht signifikant.

Abb. 3.7 zeigt den signifikanten Rückgang des Proteins durch den TNF-α Einfluss bei blockiertem AT2R (von basal 3317,8±186,2 auf 1996,1±235,9 ng/mL). Die zusätzliche C21-Inkubation führte zu keinem Effekt (2260,0±267,1 ng/mL) und bestätigt den AT2R-selektiven Effekt der Substanz. Zur weiteren metabolischen Charakterisierung wurde das pro-inflammatorische Adipozytokin Leptin untersucht.

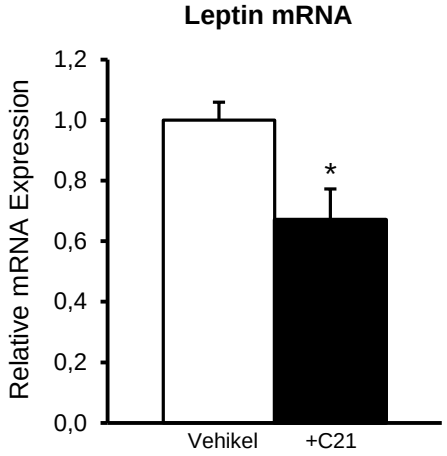

Abb. 3.8 Basale Leptin mRNA Expression

* p<0,05 vs. Vehikel; n=3

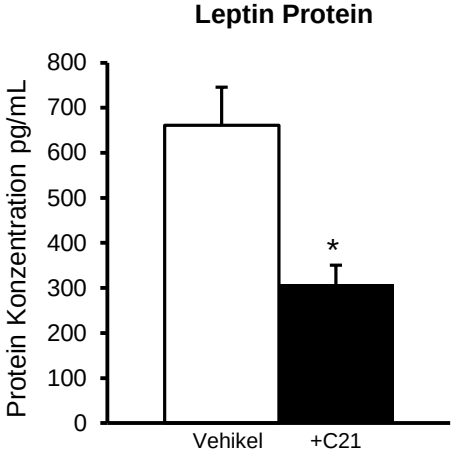

Abb. 3.9 Basale Leptin Protein Freisetzung

* p <0,05 vs. Vehikel

Abb. 3.8 und 3.9 zeigen, dass die Behandlung mit C21 über 24 h zu einer starken Reduktion des basalen Leptins führte, sowohl auf Transkriptionsebene (von 1±0,06 auf 0,67±0,10-fach) als auch auf Proteinebene (von 661,5±84 auf 308,2±42 pg/mL. Die Reduktion auf der Proteinebene war mit über 50% deutlich stärker ausgeprägt. Hier wurde die Leptin-Freisetzung ins Medium mit der Multiplex-Methode (siehe 2.2.10.4) gemessen.

3.1.2 AT2R-Aktivierung in THP-1 Makrophagen

Humane THP-1 Monozyten wurden zu Makrophagen differenziert (siehe 2.2.7.1). Nach 24 h Serumentzug (0,5% FBS) wurden die Zellen zur Induktion der *in-vitro* Inflammation mit 10 ng/mL LPS Zellmedium behandelt. Zur Charakterisierung der anti-inflammatorischen Wirkung wurden die Zellen ebenfalls über 24 h mit C21 1 µM behandelt.

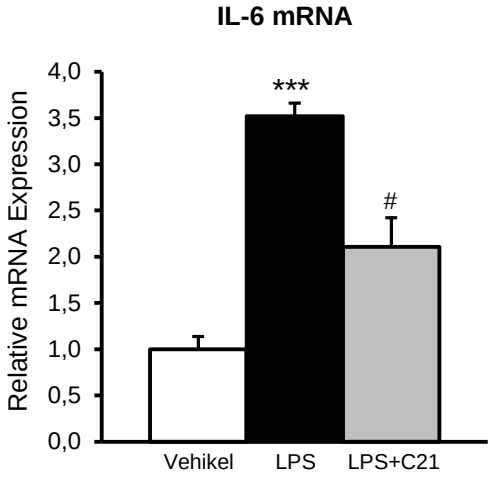

Abb. 3.10 IL-6 mRNA Expression

*** p<0,001 vs. Vehike; # p<0,05 vs. LPS; n=3

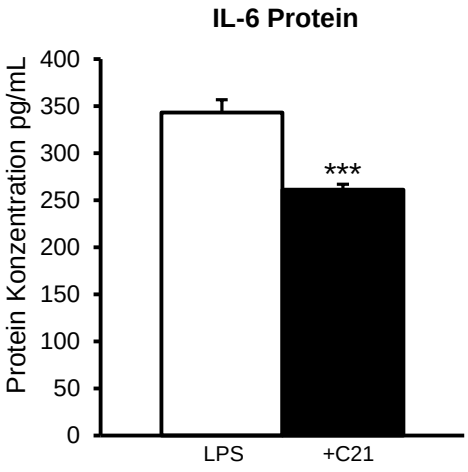

Abb. 3.11 IL-6 Protein Freisetzung

*** p<0,001 vs. LPS; n=3

Die Abb. 3.10 und 3.11 zeigen, dass die 24-stündige AT2R-Aktivierung auch in den Makrophagen zu einer Reduktion des IL-6 führte. LPS induzierte die IL-6 Epression auf das 3,5±0,13-fache, was wiederum durch C21-Behandlung auf das 2,10±0,32-fache gesenkt werden konnte. Abb. 3.11 zeigt das mittels ELISA quantifizierte IL-6, welches von 343,4±13,8 auf 261,4±5,9 pg/mL durch C21-Behandlung signifikant reduziert wurde. Die anti-inflammatorische Regulation durch C21 konnte auch durch die Untersuchung zweier weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, dem MCP-1 und TNF-α, bestätigt werden.

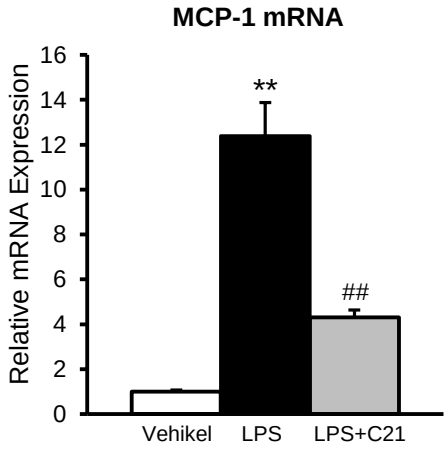

Abb. 3.12 MCP-1 mRNA Expression

** p<0,01 vs. Vehikel; ## p<0,01 vs LPS; n=3

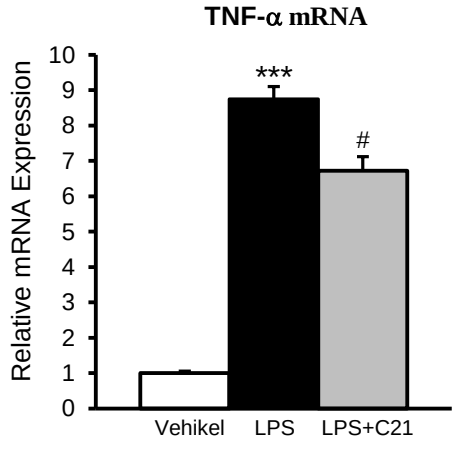

Abb. 3.13 TNF-α mRNA Expression

*** p<0,001 vs. Vehikel; # p<0,05 vs. LPS; n=3

Abb. 3.12 und 3.13 zeigen, dass die Stimulation mit C21 sowohl die LPS-induzierte MCP-1 als auch TNF-α Expression signifikant senken konnte.

In Anlehnung an die Analysen in 3T3-L1 Adipozyten wurde ebenfalls die IL-10 mRNA-Expression in Makrophagen untersucht.

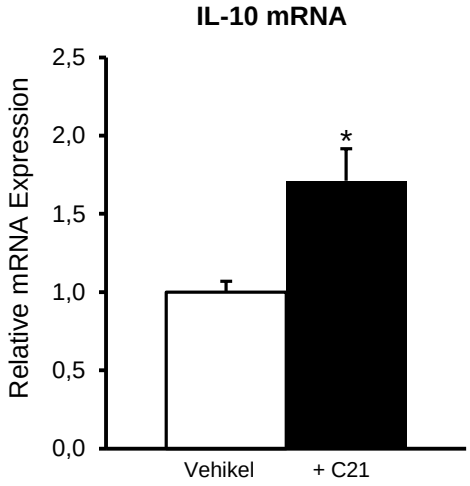

Abb. 3.14 Basale IL-10 mRNA Expression
AT2R-Stimulation induziert die IL-10 Transkription.
* p<0,05 vs. Vehikel; n=3

Aus Abb. 3.14 wird deutlich, dass die AT2R-Aktivierung ebenfalls die basale mRNA-Expression von IL-10 in den Makrophagen erhöhte.

3.1.3 Überprüfung der PPARγ Aktivität von C21

Zur mechanistischen Aufklärung der oben gezeigten Ergebnisse wurden Versuche zur Aktivierung von PPARγ durch die Substanz C21 durchgeführt. Eine pleiotrope PPARγ-Aktivierung, die für einige AT1R-Blocker gezeigt werden konnte, könnte für die anti-inflammatorischen Effekte inklusive der Adiponektin-Regulation durch C21 verantwortlich sein.

3.1.3.1 Öl-Rot O Färbung

Die Öl-Rot O Färbung stellt eine gängige zellbiologische Methode zur Prüfung auf PPARγ-Aktivität dar[169]. Hierfür wurden 3T3L-1 Präadipozyten, wie in 2.2.7.2 beschrieben, mit dem Induktionsgemisch bzw. den Testsubstanzen über neun Tage differenziert und mit dem Farbstoff Öl-Rot O gefärbt (siehe Abb. 3.15). C21 wurde in der Konzentration 0,1 und 1 µM eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der volle PPARγ-Agonist Pioglitazon mit 1 und 10 µM.

Da es sich beim PPARγ um einen Masterregulator der Fettzelldifferenzierung handelt, kann somit durch Differenzierung und Färbung der Fetteinlagerung auf die PPARγ-Aktivität geschlossen werden.

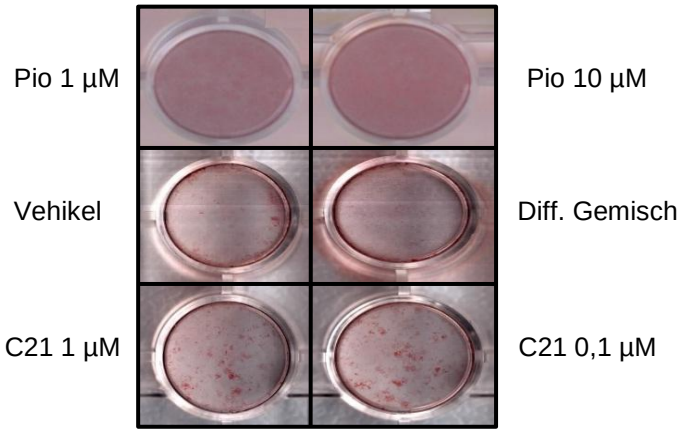

Abb. 3.15 Öl-Rot O Färbung

Der volle PPARγ-Agonist Pioglitazon führt zu einer vollständigen Differenzierung von 3T3-L1 Zellen. Dieser Effekt bleibt bei den C21 behandelten Zellen in den Konzentrationen 0,1 und 1 µM aus.

Repräsentatives Foto aus n=3

Der volle PPARγ-Agonist Pioglitazon führte zur vollständigen Differenzierung, während C21 in den getesteten Konzentrationen keine adipogenen Effekte aufwies. Zur Quantifizierung wurde der Öl-Rot O Farbstoff in Isopropanol gelöst und die Absorption bei 515 nm am Photospektrometer bestimmt.

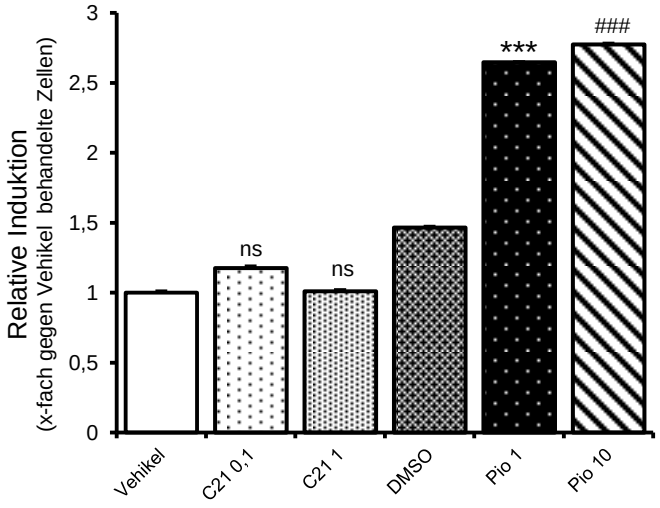

Abb. 3.16 Relative Induktion der Fettzell-Differenzierung

*** und ### p<0,001 vs. DMSO; ns: nicht signifikant; n=3

In Abb. 3.16 ist die Quantifizierung der Beobachtungen von Abb. 3.15 dargestellt. Pioglitazon führte zu einem hochsignifikanten Anstieg intrazellulär gefärbter Lipide, während C21 keinen Effekt aufwies. Zusammen weisen diese Daten darauf hin, dass C21 keine wesentliche PPARγ-Aktivierung induziert.

3.1.3.2 PPARγ LBD Reporterassay

Humane HEK-293 Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für die PPARγ Liganden-Bindungsdomäne (LBD), dem Reportervektor und dem Kontrollvektor transfiziert (siehe 2.2.7.3). Die Zellen wurden wie in Abb. 3.17 angegeben über 24 h behandelt. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität gemessen und relativ zur Renilla-Aktivität angegeben (siehe 2.2.7.4).

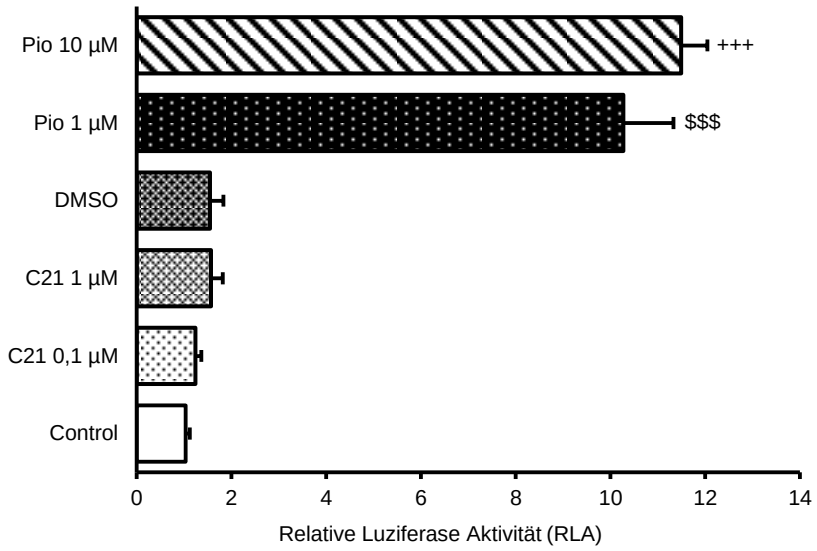

Abb. 3.17 PPARγ LBD Aktivitäts-Luziferase

§§§ und +++ p <0,001 vs. DMSO; n=6 aus 2 unabhängigen Versuchen

Im Einklang mit den Ergebnissen der Fettzelldifferenzierung führte Pioglitazon in den Konzentrationen 1 und 10 µM zu einem hochsignifikanten Anstieg der Luziferase-Aktivität der PPARγ-LBD wohingegen C21 keinen Effekt auf die Aktivität besaß.

Die beiden Versuche zur Überprüfung auf PPARγ-Aktivität deuten also darauf hin, dass C21 seine anti-inflammatorischen Effekte in den Adipozyten und Makrophagen und die zusätzliche Adipozytokinregulation in den Adipozyten PPARγ-unabhängig ausübt.

Zusammenfassung der in-vitro Versuche

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit erstmalig anti-inflammatorische Effekte durch die spezifische AT2R-Aktivierung mit C21 in Adipozyten und Makrophagen gezeigt werden. In den Adipozyten kam es zusätzlich zur anti-inflammatorischen und metabolisch positiven Regulation von Adipozytokinen.

3.2 AT2R-Stimulation im Adipositas-Modell der Maus

Ausgehend von den Erkenntnissen der *in-vitro* Versuche wurde die Substanz C21 im DIO-Modell der Maus eingesetzt, um die Relevanz der AT2R-Stimulation auf Fettgewebsinflammation, IR und IGT metabolisch zu untersuchen. Hierfür wurden C57Bl-6 (WT) und AT2R-KO Mäuse zunächst über 10 Wochen mit HFD bzw. LFD gefüttert (siehe 2.2.1)

3.2.1 Körpergewichtsentwicklung

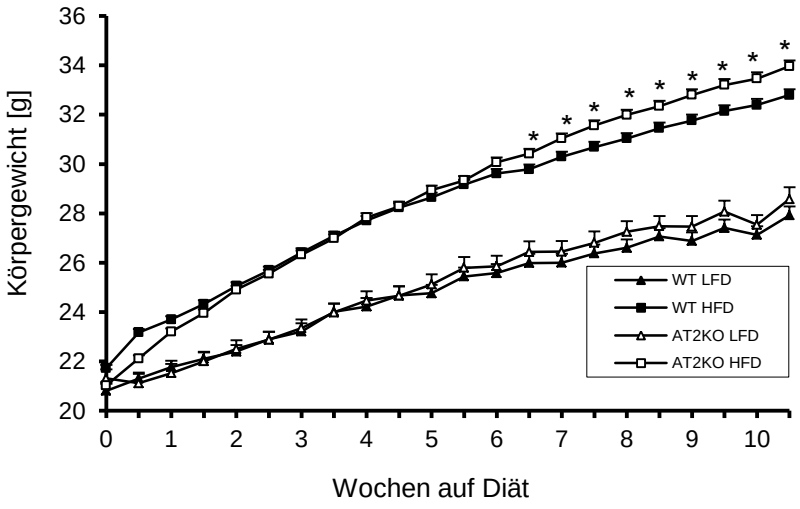

Abb. 3.18 Körpergewichtsentwicklung während den Diäten
AT2R-Defizienz führt zu einer Erhöhung des Körpergewichtes.
* p<0,05 vs. WT HFD

Während der Fütterungsphase nahmen die beiden HFD-Gruppen rasch an Körpergewicht zu. Nach ungefähr sechs Wochen wiesen die HFD AT2R-KO Mäuse ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu den WT-Tieren auf. Unter der LFD wurden keine

Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung zwischen den Genotypen beobachtet. Nach zehn Wochen Fütterung schloss sich die vierwöchige Behandlungsphase an. Die Tiere wurden entweder mit Vehikel (LFD und HFD), C21, Valsartan, C21/Valsartan oder dem Antihypertensivum Hydralazin (jeweils HFD) behandelt (siehe 2.2.1).

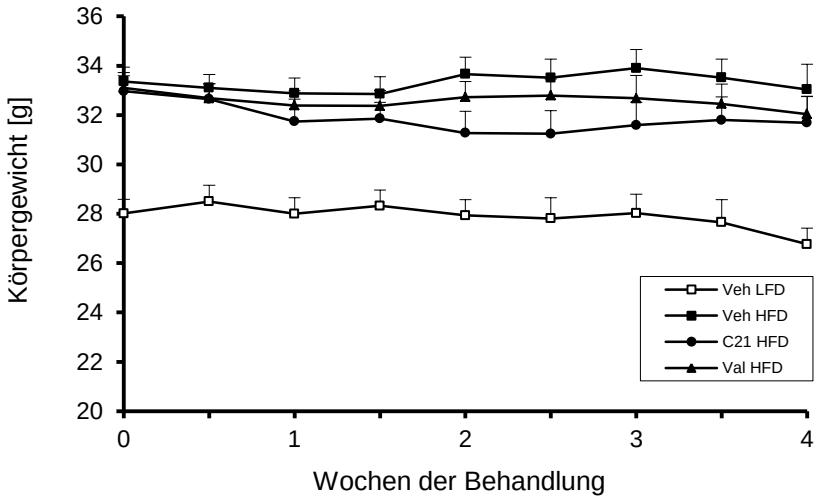

Abb. 3.19 Körpergewichtsentwicklung während der Behandlung
Die Behandlungen besaßen keine Effekte auf das Körpergewicht in den WT HFD-Gruppen.

Während der vierwöchigen Behandlungsphase hatte keine der Behandlungen einen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere (siehe Abb. 3.19). In der Kombinationsgruppe bzw. der Hydralazin-Gruppe kam es ebenfalls zu keinem signifikanten Einfluss. Die Körpergewichtverläufe der beiden Gruppen sind grafisch nicht dargestellt.

3.2.2 Blutdruckmessung

Nach Ende der vierwöchigen Behandlungsphase wurde, wie in 2.2.2 beschrieben, nicht-invasiv der systolische Blutdruck gemessen (Abb. 3.20).

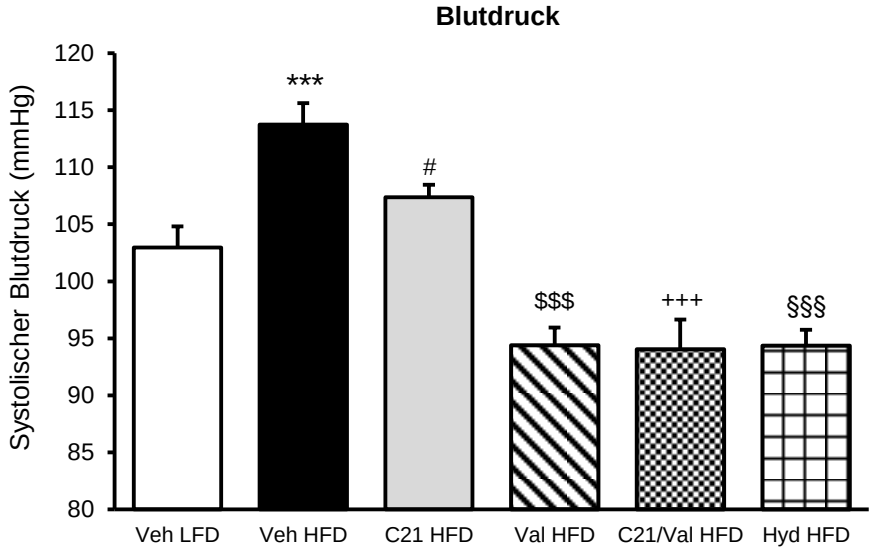

Abb. 3.20 Systolischer Blutdruck der WT-Mäuse

Die HFD erhöht den systolischen Blutdruck. Der AT1-Blocker Valsartan reduziert den Blutdruck ähnlich wie Hydralazin. C21 hat einen leichten, aber signifikanten Einfluss auf den systolischen Blutdruck.

*** p<0,001 vs. Veh LFD; # p<0,05 vs. Veh HFD; $$$, +++ und §§§ p<0,001 vs. Veh HFD; n=9-10 (Hydralazin n=6) pro Gruppe

Die LFD-Tiere wiesen einen systolischen Blutdruck von103±2 mmHg auf, während der Blutdruck durch die HFD um ca. 10 mmHg auf 114±2 mmHg erhöht wurde. Der AT1R-Blocker Valsartan senkte wie erwartet den systolischen Blutdruck signifikant auf 94±2 mmHg, wobei die Senkung durch Hydralazin annähernd identisch war. Die C21-Behandlung hatte einen leichten, aber signifikanten Einfluss und senkte den Blutdruck auf 107±1 mmHg. Die Kombination aus C21 und Valsartan hingegen hatte keinen zusätzlichen reduzierenden Einfluss auf den Blutdruck im Vergleich zur Monotherapie mit Valsartan. Zusätzlich wurde der Blutdruck auch in den AT2-KO Mäusen bestimmt.

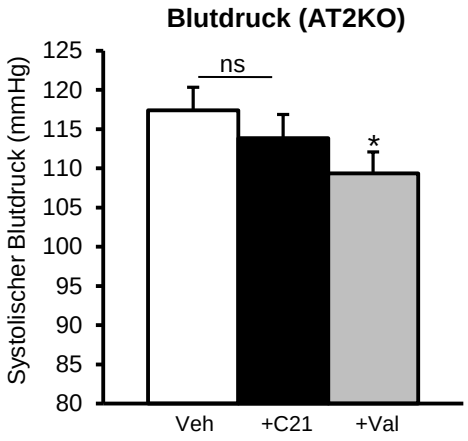

Abb. 3.21 Systolischer Blutdruck in AT2-KO HFD-Mäusen

C21 verliert in den AT2R-KO Tieren seinen Effekt auf den Blutdruck. Die Blutdrucksenkung durch Valsartan ist schwächer ausgebildet als in den WT-Mäusen.

* p<0,05 vs. Veh; n=8-10 pro Gruppe

Abb. 3.21 zeigt, dass C21 bei Abwesenheit des AT2R seinen Einfluss auf den Blutdruck verliert. Die Blutdrucksenkung durch Valsartan um ca. 8 mmHg war zwar noch signifikant (von Veh 117±3 auf Val 109±3 mmHg), aber bedeutend weniger stark ausgeprägt als in den WT-Mäusen mit ca. 20 mmHg. Diese Beobachtungen deuten stark auf einen Einfluss des AT2R auf die Blutdruckregulation hin.

3.3 Metabolische Phänotypisierung

	Veh LFD	Veh HFD	C21 HFD	Val HFD
Spontan Glukose [mg/dL]	184,86± 15,59	236,88± 13,35*	219,11± 18,54ns	251,11± 10,15ns
Nüchtern Glukose [mg/dL]	110,00± 4,73	136,63± 10,00*	129,60± 4,15ns	125,44± 5,28ns

Tab. 3.1 Spontan- und Nüchternglukose

* p<0,05 vs. Veh LFD; n=7-10 pro Gruppe

Die Tab. 3.1 zeigt, dass sowohl die spontan-Glukosewerte als auch die nüchtern-Glukosewerte, nach nächtlichem Futterentzug, durch die HFD signifikant erhöht wurden. Diese Werte geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Mäuse durch die HFD eine Glukose-Intoleranz entwickeln. Die C21-Behandlung führte bei beiden Parametern zu tendenziell reduzierten Werten, die jedoch keine Signifikanz erreichen. Valsartan wies bei der spontanen Glukose tendenziell erhöhte und bei der nüchternen Glukose erniedrigte Werte auf.

3.3.1 Glukose Toleranz Test (GTT)

GTT der Vehikel Gruppen

Zur Überprüfung der Glukose-Toleranz wurde ein Glukose Toleranz Test (GTT) durchgeführt. Für diesen wurden die Tiere über Nacht nüchtern gesetzt und es wurde initial eine Bolus-Injektion 1 g/kg KG Glukose i.p. verabreicht. Anschließend wurde die Blutglukose nach definierten Zeitpunkten quantifiziert (siehe 2.2.3.1).

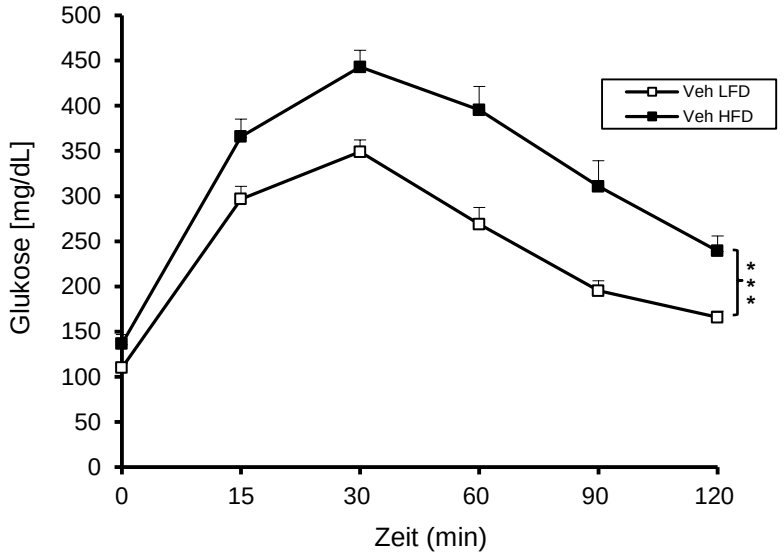

Abb. 3.22 Glukose Toleranz Test (GTT) der Vehikel Tiere

***p<0,001 vs. Veh LFD; n=7-8 pro Gruppe

Die Abb. 3.22 zeigt den i.p. GTT der Vehikel-behandelten Tiere. Die Blutglukosekurve der gesunden LFD-Tiere verläuft deutlich flacher als die der HFD-Tiere. Diese metabolische Veränderung bestätigt, dass die Tiere im vorliegenden Hochfett-Modell eine Glukoseintoleranz entwickelten.

GTT der Behandlungsgruppen

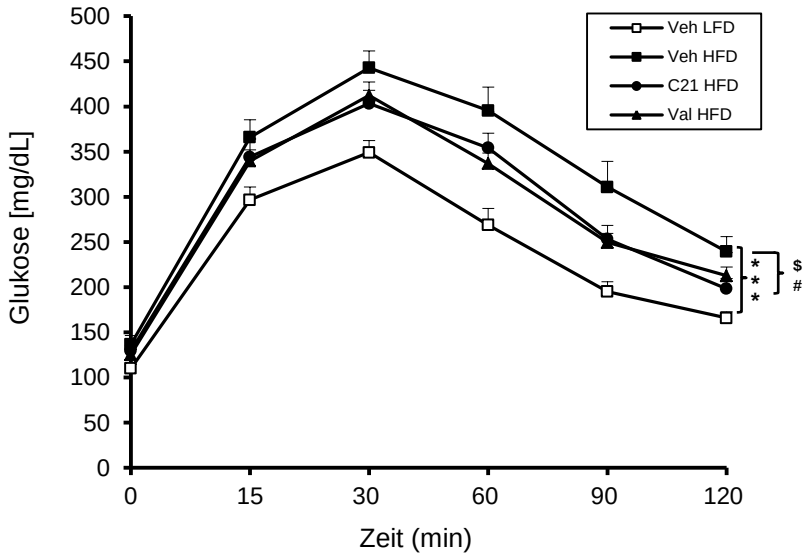

Abb. 3.23 Glukose Toleranz Test (GTT) der Behandlungsgruppen

Die Behandlung mit C21 und Valsartan führen zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz.

*** p<0,001 vs. Veh LFD; # und $ p<0,05 vs. Veh HFD; n=7-10 pro Gruppe

Abb. 3.23 zeigt den i.p. GTT der Behandlungsgruppen. Der Kurvenverlauf wurde durch die Behandlung mit C21 und Valsartan im Vergleich zu den HFD Vehikel-Tieren abgeflacht. Die Verläufe der Kombinationsgruppe und von Hydralazin wurden hier grafisch nicht dargestellt. Die quantifizierte Fläche unter den Kurven (AUC) ausgedrückt als relative Glukose Intoleranz wird in der folgenden Abbildung beschrieben.

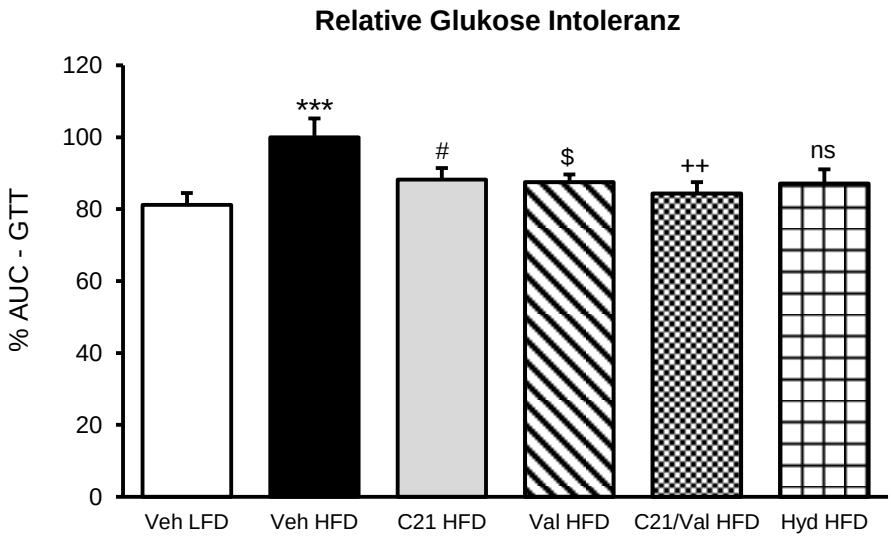

Abb. 3.24 Relative Glukose Intoleranz

C21 und Valsartan verbessern die Glukosetoleranz. Die Doppelintervention in das RAS durch C21/Val verbessert ebenfalls die Glukosetoleranz. Hydralazin besitzt nur einen tendenziellen Einfluss und verbessert die Glukosetoleranz nicht signifikant.

*** p<0,001 vs. Veh LFD; # und $ p<0,05 vs. Veh HFD; ++ p<0,01 vs. Veh HFD;
n=7-10 (Hydralazin n=6) pro Gruppe

Abb. 3.24 zeigt die relative Glukose-Intoleranz. Diese wurde bei den HFD-Tieren auf 100% gesetzt. Der Unterschied zu den LFD-Tieren betrug ca. 20% (81,14±3,35%). Verbessert werden konnte die Glukose-Intoleranz sowohl durch die C21-Behandlung (auf 88,24±3,21%), durch Valsartan-Behandlung (auf 87,48±3,21) als auch durch die Kombinationsbehandlung (auf 84,31±3,16%). Die Hydralazin Behandlung führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Glukose-Intoleranz. Zur Untersuchung der Spezifität von C21 wurde der GTT ebenfalls in den AT2R-KO Mäusen durchgeführt.

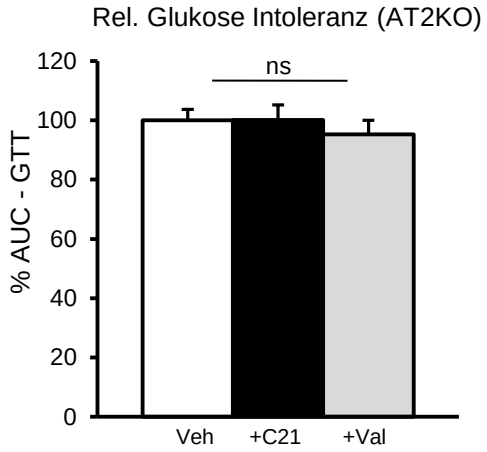

Abb. 3.25 Relative Glukose Intoleranz (AT2KO)

Die Behandlungen mit C21 und Valsartan führen zu keinem Effekt in den KO-Tieren.

n=7-10 pro Gruppe

Die Abb. 3.25 zeigt die quantifizierten AUCs des GTTs in den AT2-KO Tieren. Die C21-Behandlung führte zu keinem Effekt und bestätigt die Selektivität des Effektes für den AT2R. Valsartan verlor, entgegen der Erwartung, ebenfalls seinen signifikanten Effekt auf die Glukosetoleranz und verbesserte diese nur noch tendenziell auf 95,28±4,71%. Somit scheint der Einfluss von Valsartan auf den Glukose-Metabolismus u.a. auch AT2R-abhängig zu sein.

3.3.2 Insulin Toleranz Test (ITT)

Zur Messung der peripheren Insulinsensitivität wurde ein i.p. Insulin Toleranz Test durchgeführt. Wie beim GTT wurden die Tiere über Nacht nüchtern gesetzt und nach i.p. Applikation von Insulin 0,25 I.E./kg KG nach definierten Zeitpunkten die Blutglukose quantifiziert (siehe 2.2.3.2).

ITT der Vehikel Gruppen

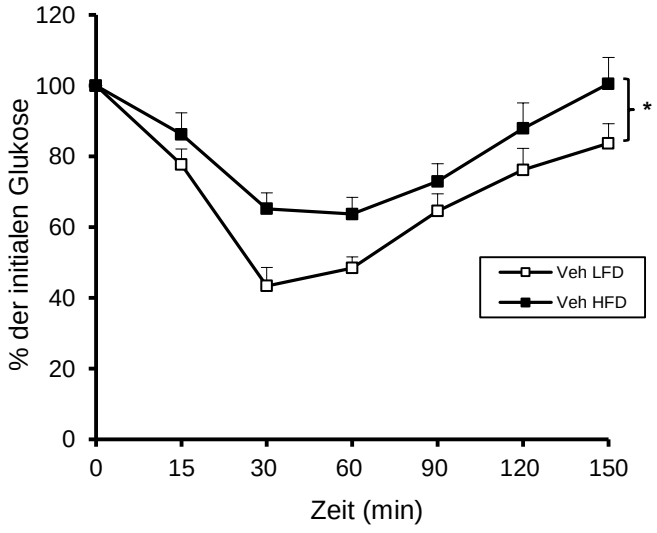

Abb. 3.26 Insulin Toleranz Test (ITT) der Vehikel Tiere

Die Hochfett-Diät führt zur Insulinresistenz in den Vehikel behandelten Tieren.

* p<0,05 vs. Veh LFD; n=8-9 pro Gruppe

Abb. 3.26 zeigt, dass die HFD über 14 Wochen zu einer signifikanten Verminderung der Insulinsensitivität der Vehikel-Tiere führte.

ITT der Behandlungsgruppen

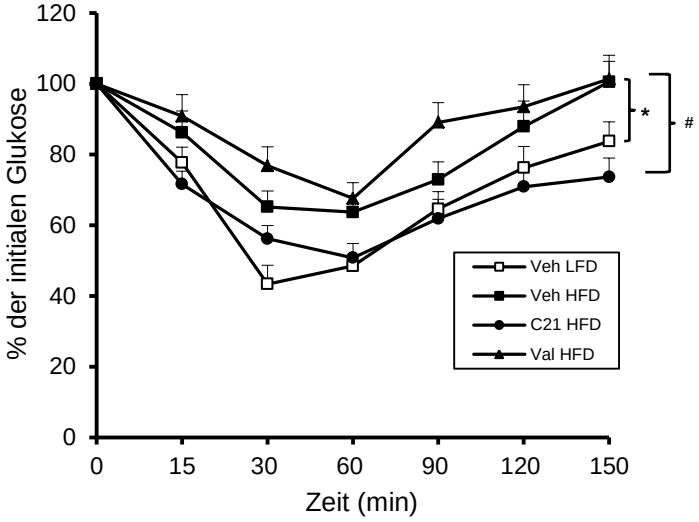

Abb. 3.27 Insulin Toleranz Test (ITT) der Behandlungsgruppen

Auf die Insulinempfindlichkeit hat nur die C21-Behandlung einen positiven Einfluss.

* p<0,05 vs. Veh LFD; # p<0,05 vs. Veh HFD; n=7-10 pro Gruppe

Die Abb. 3.27 zeigt deutlich, dass nur die C21-behandelten Tiere durch die Insulin-Applikation mit einer starken Verminderung der Blutglukose reagierten. Die Abflachung der Blutglukosekurve reichte an das Niveau der gesunden LFD-Tiere heran. Die Valsartan-Behandlung besaß keinen signifikanten Effekt auf die Insulinempfindlichkeit und verschlechterte diese sogar tendenziell. Im Folgenden wurden die AUCs quantifiziert und reziprok als relative Insulin-Sensitivität dargestellt.

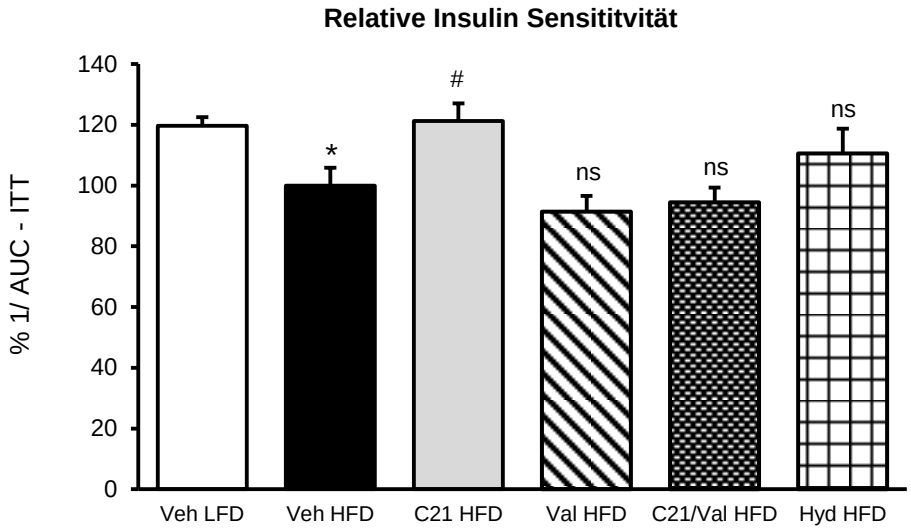

Abb. 3.28 Relative Insulin Sensitivität

Nur die Behandlung mit C21 hat einen positiven Effekt auf die Insulinempfindlichkeit.

* p<0,05 vs. Veh LFD; # p<0,05 vs. Veh HFD; n=7-10(Hydralazin n=6) pro Gruppe

In Abb. 3.28 sieht man die quantifizierte Verbesserung der Insulinempfindlichkeit durch die C21-Behandlung um ca. 20% (von Vehikel HFD 100% auf 121,20±5,81%), welche nahezu den LFD-Tieren entsprach (119,64±2,87%). Interessanterweise verlor C21 seinen Einfluss auf die Insulinempfindlichkeit in der Kombinationsbehandlung C21/Valsartan. So scheint die AT1R-Blockade einen negativen Effekt in der Kombination mit der AT2R-Stimulation auf die periphere Insulinantwort zu besitzen. Die Monotherapie mit Valsartan zeigte ebenso wie die Behandlung mit dem Vasodilatator Hydralazin keinen signifikanten Effekt auf die Insulinsensitivität. Außerdem wurde der ITT in den AT2R-defizienten Tieren durchgeführt.

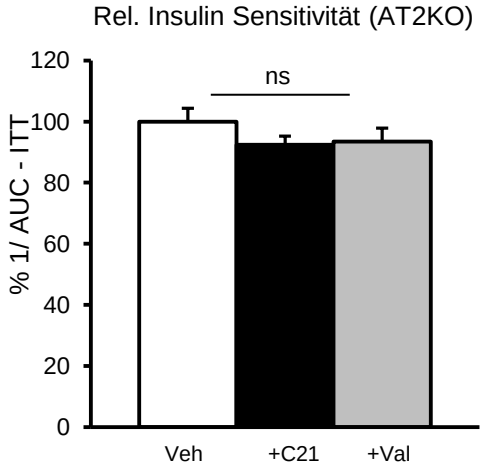

Abb. 3.29 Relative Insulin Sensitivität (AT2KO)

C21 verliert auch beim ITT seinen Effekt in den AT2-KO Tieren. n=7-10 pro Gruppe

In Abb.3.29 ist erkennbar, dass C21 seinen Effekt in den KO-Tieren verlor. Dies unterstützt erneut die Selektivität der Substanz für den AT2R im Kontext der Insulinempfindlichkeit.

Zusammenfassend konnte C21 sowohl die Glukosetoleranz als auch Insulinempfindlichkeit in adipösen Mäusen verbessern. Der ARB Valsartan konnte lediglich die Glukosetoleranz verbessern. Die Effekte der Substanzen sind AT2R-abhängig, denn sowohl der AT2R-Agonist C21 als auch der AT1R-Blocker Valsartan verloren ihre Effekte in den KO-Tieren. Die Kombinationsbehandlung aus C21/Valsartan ergab keine synergistischen Effekte. Hydralazin hatte weder einen signifikanten Effekt auf die Glukosetoleranz noch auf die Insulinempfindlichkeit.

3.3.3 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig

In der vierten bis sechsten Woche nach Behandlungsbeginn wurden die Tiere im Stoffwechselkäfig-System Labmaster (TSE Systems) untersucht (siehe 2.2.5).

3.3.3.1 Indirekte Kalorimetrie

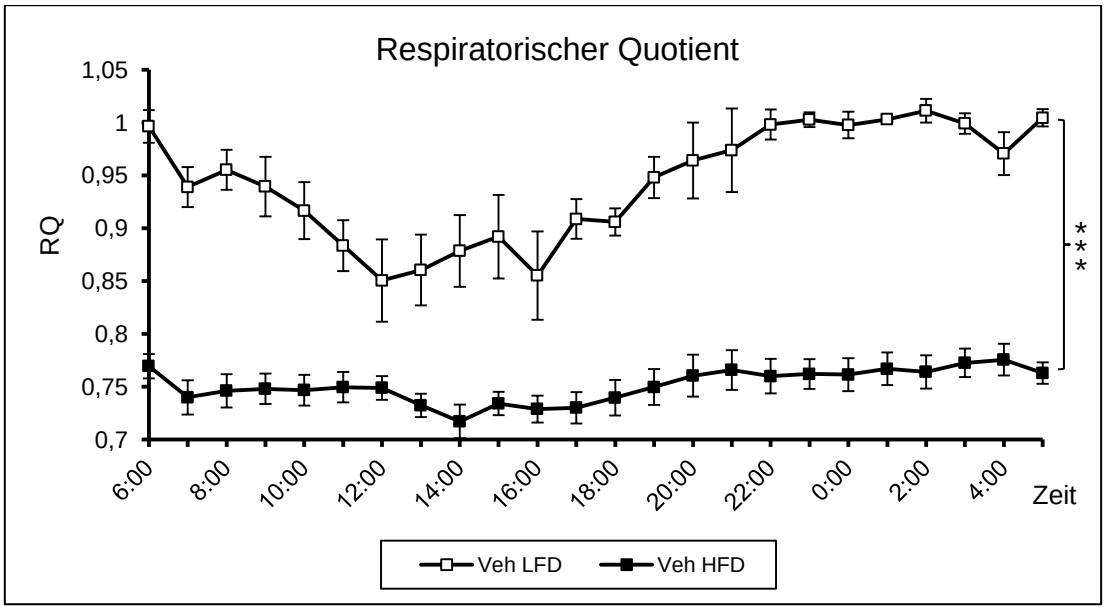

Abb. 3.30 Verlauf des respiratorischen Quotienten über 24 h

Die Hochfett-Diät senkt den RQ in den Vehikel Tieren über 24 h herab.

*** p< 0,001 vs. Veh LFD

Abb. 3.30 zeigt, dass die HFD den RQ der Tiere über 24 h deutlich herabsenkte und dass somit entsprechend der verabreichten Diät deren Energie überwiegend aus der Oxidation von Lipiden gewonnen wurde (siehe 2.2.5.1). Aus Tab. 3.2 wird ersichtlich, dass die Futteraufnahme und damit auch die Kalorienaufnahme durch die Behandlung mit C21 bzw. Valsartan korrespondierend mit der Körpergewichtsentwicklung tendenziell reduziert war. Darüber hinaus waren in der aktiven Phase (18 - 6 Uhr) die RQs durch beide Substanzen signifikant reduziert. Die Behandlungen mit beiden Substanzen führten zudem zu einem tendenziell erhöhten Gesamtenergieumsatz. Diese Tendenz scheint nicht in einer erhöhten Bewegung der Tiere begründet zu liegen, denn die lokomotorische Aktivität war im Vergleich zu den Vehikel HFD-Tieren nicht erhöht.

	Veh LFD	**Veh HFD**	**C21 HFD**	**Val HFD**
Futteraufnahme [g/24h]	4,08± 0,33	2,76± 0,43ns	2,24± 0,22ns	2,14± 0,12ns
Kalorienaufnahme [kcal/24h]	14,08± 1,12	14,77± 2,13ns	11,13± 1,10ns	10,66± 0,61ns
24 h RQ [VCO_2/VO_2]	0,944± 0,022	0,751± 0,006***	0,747± 0,004ns	0,739± 0,004$$
RQ 6-18 Uhr [VCO_2/VO_2]	0,906± 0,019	0,741± 0,005***	0,743± 0,004ns	0,732± 0,004ns
RQ 18-6 Uhr [VCO_2/VO_2]	0,982± 0,014	0,762± 0,003***	0,749± 0,004##	0,747± 0,002$$$
Energy expenditure [kcal/kg/h]	13,718± 0,230	12,320± 0,239**	13,050± 0,238ns	12,469± 0,29ns
Lokomotorische Aktivität [counts/h]	1250± 229	1875± 105*	1630± 88ns	1839± 134ns

Tab. 3.2 Metabolische Paramter der Stoffwechselkäfig-Untersuchungen

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0.001 vs. Veh LFD; ## p<0,01 vs. Veh HFD; $$ p<0,01; $$$ p<0,001 vs. Veh HFD; n= 5-10 pro Gruppe

3.3.3.2 Untersuchung der Körperzusammensetzung

Die totale Fettmasse wurde mittels NMR-Kernspinresonanzspektroskopie (siehe 2.2.4) bestimmt und die Fettkompartimente nach dem Töten der Versuchstiere eingewogen.

	Veh LFD	Veh HFD	C21 HFD	Val HFD
Totale Fettmasse [g]	2,85± 0,22	5,69± 0,58***	5,17± 0,73ns	5,59± 0,55ns
Gonadale Fettmasse [g]	0,39± 0,04	0,97± 0,13**	0,61± 0,11ns(p=0,055)	0,74± 0,06ns
Perirenale Fettmasse [g]	0,17± 0,02	0,47± 0,07**	0,30± 0,05ns(p=0,067)	0,35± 0,03ns

Tab. 3.3 Körperfettmassen ** p<0,01; *** p<0,001 vs. Veh LFD; NMR n=8-10; Organmassen n=7-9 pro Gruppe

Die Tab. 3.3 zeigt die Zunahme der Fettmassen durch die HFD. Die Behandlungen mit C21 bzw. Valsartan führten jeweils zur tendenziellen Reduktion sowohl der Gesamtfettmasse als auch der Fettkompartimente. Statistische Signifikanz wurde nicht erreicht. Die moderat reduzierten Körpergewichte sind somit wahrscheinlich teilweise auf eine leicht reduzierte Fettmasse zurückzuführen. Die Beobachtungen aus 3.3.3.1 liefern weitere Grundlagen für die reduzierten Fettmassen. So könnten diese in einer Kombination aus reduzierter Kalorienzufuhr, erhöhter Fettverbrennung und Energieumsatz begründet liegen.

3.4 Untersuchungen von Serum und Fettgewebe

Zur weiteren inflammatorischen und metabolischen Charakterisierung wurden, basierend auf den Erkenntnissen der *in-vitro* Experimente, bestimmte Biomarker und Parameter im Serum mit Multiplex Assays (siehe 2.2.9.4) analysiert. Darüber hinaus wurden einige der Parameter zur Beschreibung der lokalen Regulation zusätzlich im Fettgewebe untersucht.

3.4.1 Adipozytokine

3.4.1.1 Adiponektin

Serum

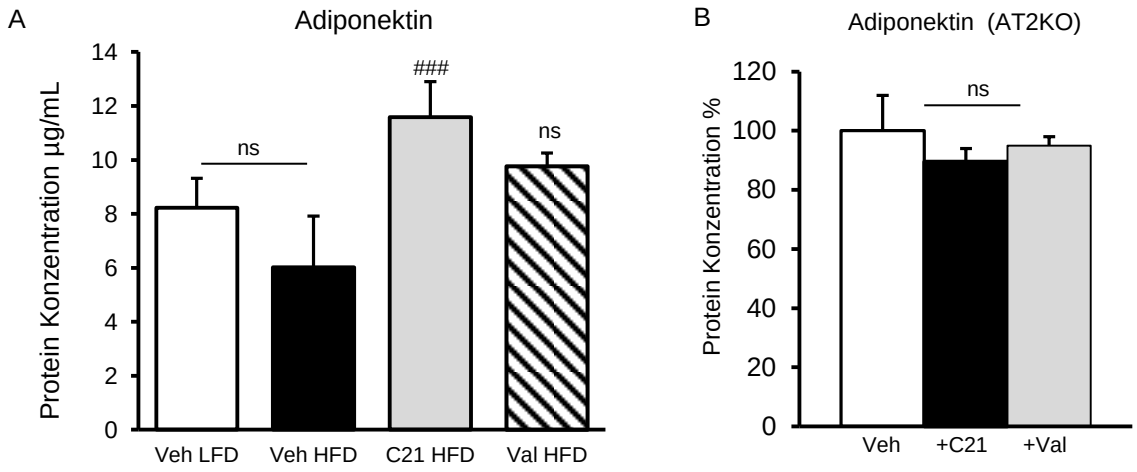

Abb. 3.31 Adiponektin Serum Konzentrationen

A Adiponektin wird durch C21 signifikant erhöht. Die Valsartan-Gruppe weist tendenziell erhöhte Spiegel auf. ### p<0,001 vs. Veh HFD; n=5-6 pro Gruppe

B In den AT2-KO Tieren bleibt der C21 Effekt aus. n=5-7 pro Gruppe

Abb.3.31 A zeigt, wie die Adiponektin-Spiegel signifikant von 6,02±1,90 µg/mL in der Vehikel HFD-Gruppe auf 11,59±1,32 µg/mL in der C21 HFD-Gruppe anstiegen. Damit konnten die Spiegel in dieser Gruppe nahezu verdoppelt werden. Durch die Valsartan-Behandlung wurden die Spiegel auf 9,77±0,49 µg/mL nicht signifikant erhöht. Der AT2R-spezifische Effekt auf das Adiponektin wird durch die Abb. 3.31 B erneut unterstrichen. Hier blieb der C21 Effekt auf das Adiponektin aus.

Fettgewebe

Adiponektin wird überwiegend im Fettgewebe produziert (siehe 1.1.4.1). Zur Untersuchung der lokalen Regulation und Produktion wurde zunächst die Expression, wie in 2.2.8 beschrieben, mit der qRT-PCR analysiert.

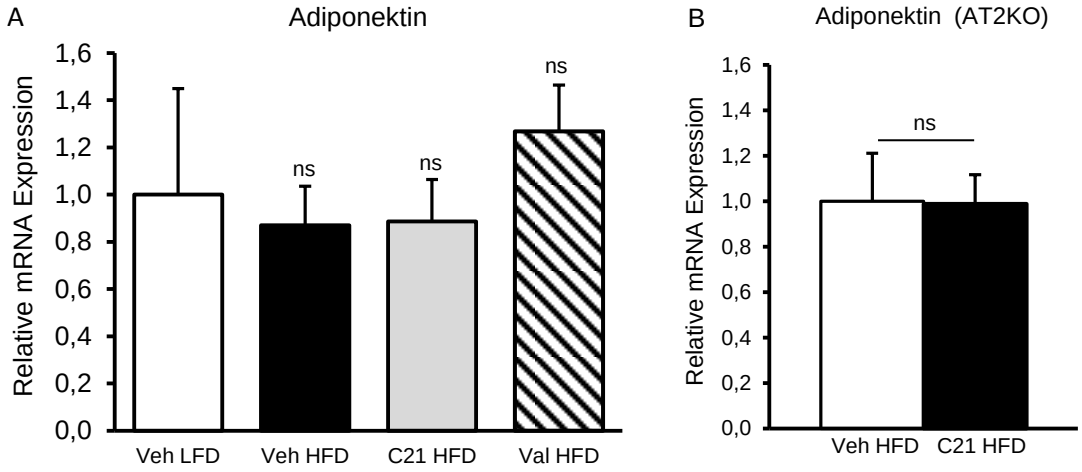

Abb. 3.32 Adiponektin mRNA Expression im Fettgewebe

A+B C21 führt zu keiner Regulation der Adiponektin mRNA weder in den WT-Mäusen noch in den AT2-KO Mäusen.

n=5 pro Gruppe

Abb. 3.32 A teigt zunächst ein ähnliches Bild wie in den *in-vitro* Untersuchungen. Der AT2R-Agonismus führte zu keiner Regulation der mRNA-Expression von Adiponektin. Die mRNA-Expression von Adiponektin in den Valsartan-behandelten Mäusen war minimal erhöht. Erwartungsgemäß gab es auch keinen Effekt im Fettgewebe der AT2R-KO Mäuse (Abb. 3.32 B). Aufgrund der Erfahrung aus den *in-vitro* Versuchen bezüglich der Disparität des Adiponektins zwischen mRNA- und Protein-Expression wurde im Fettgewebe das Adiponektin-Protein mittels Western Blot untersucht.

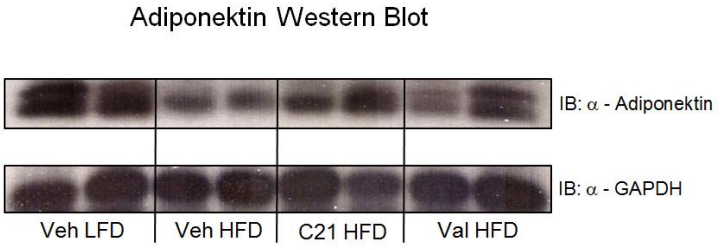

Abb. 3.33 Adiponektin Western Blot

Die Hochfett-Diät zeigt hier eine deutliche Reduktion der Adiponektins. Durch C21 Behandlung wird das Adiponektin-Protein erhöht. Auch beim Valsartan findet man den tendenziell positiven Einfluss auf die Regulation wieder.

Repräsentativer Blot mit n=2 pro Gruppe.

Für den Western Blot wurden, wie in 2.2.9.1 beschrieben, Proteine aus dem gonadalen Fett der Versuchstiere isoliert, mit der SDS-PAGE aufgetrennt und ein Immuno-Blot gegen Adiponektin bzw. den Housekeeper GAPDH durchgeführt. Man erkennt in der Abb. 3.33 deutlich, dass die lokale Adiponektin-Menge durch die HFD stark reduziert und durch die C21-Behandlung erhöht wurde. In der Valsartan-Gruppe kam es korrespondierend mit den lokalen mRNA-Daten bzw. Serum-Konzentrationen zu einem leichten Anstieg des Proteins. Der moderate Valsartan-Effekt scheint über die mRNA-Expression reguliert zu werden wohingegen der C21 Effekt posttranskriptional verläuft. Dieser Punkt wird in der Diskussion noch einmal aufgegriffen.

3.4.1.2 Leptin

Serum

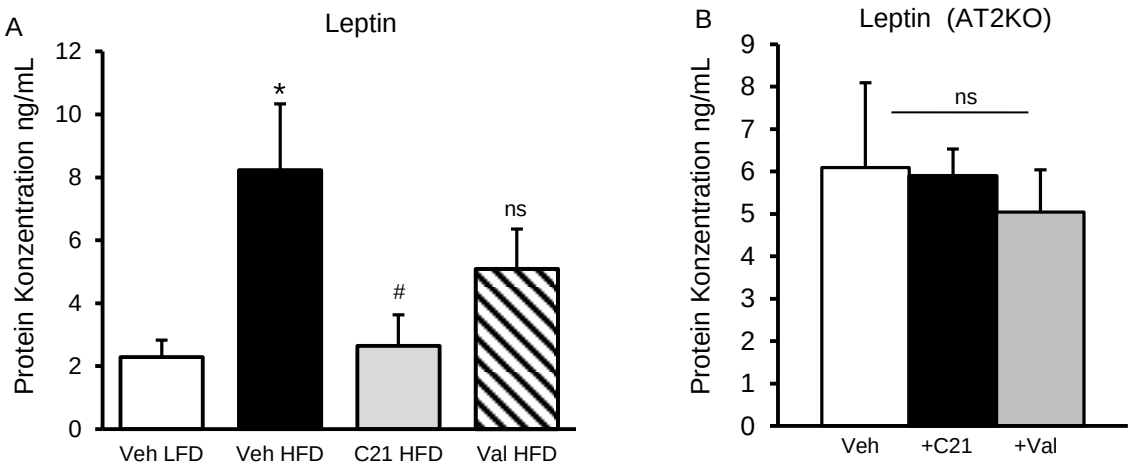

Abb. 3.34 Leptin Serum Konzentrationen

A Periphere Leptin Spiegel werden durch die C21-Behandlung stark reduziert.

* p<0,05 vs. Veh LFD; # p<0,05 vs. Veh HFD; n=6 pro Gruppe

B In den AT2-KO Tieren bleib der C21 Effekt aus. n=6 pro Gruppe

Periphere Leptin-Spiegel wurden durch die HFD erwartungsgemäß stark erhöht (von 2,29±0,54 auf 8,23±2,10 ng/mL). Durch die C21-Behandlung wurden die Konzentrationen dieses pro-inflammatorischen Adipozytokins nahezu wieder auf gesundes Ausgangsniveau gesenkt und mit 2,64±0,99 ng/mL quantifiziert. Der Effekt war ebenfalls WT-spezifisch (Abb. 3.34 B).

Fettgewebe

Leptin wird ebenfalls überwiegend im Fettgewebe sezerniert (siehe 1.4.4.1).

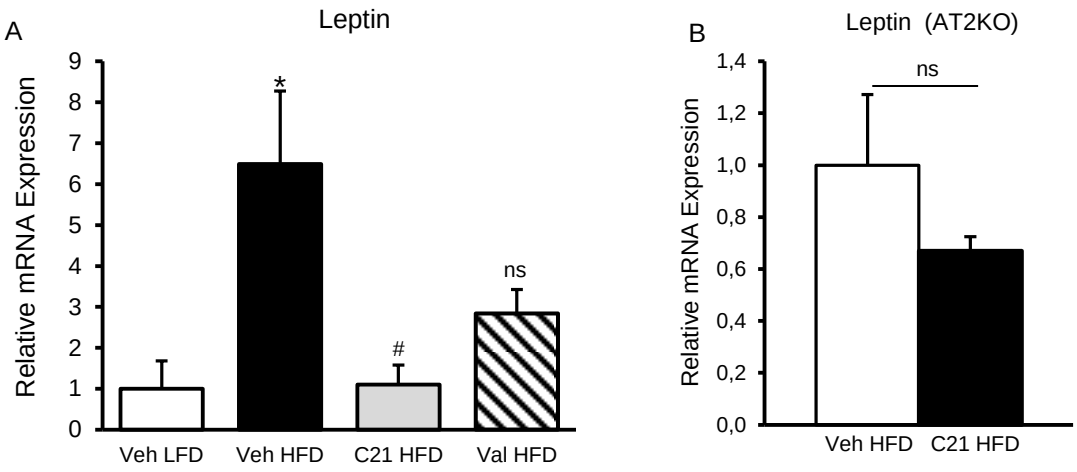

Abb. 3.35 Leptin mRNA Expression im Fettgewebe

A Die C21 Behandlung reduziert die stark erhöhte mRNA-Expression auf gesundes Niveau.

* p<0,05 vs. Veh LFD; # p<0,05 vs. Veh HFD; n=5 pro Gruppe

B In den AT2-KO Tieren bleib der C21 Effekt erneut aus. n=5 pro Gruppe

Korrespondierend mit den Serum-Konzentrationen wurde die Leptin-Expression durch die HFD stark induziert (von 1 auf 6,49±1,78-fach) und durch AT2R-Agonismus wieder signifikant gesenkt (auf 1,11±0,47-fach). Der C21-vermittelte mRNA-Effekt war in den AT2R-KO Tieren abgeschwächt (Abb.3.35 B) Die AT1R-Blockade besaß, wie bei den Serum-Konzentrationen, einen stark reduzierenden Trend auf die Leptin-Expression, wobei ebenfalls keine Signifikanz erreicht wurde.

3.4.1.3 Resistin

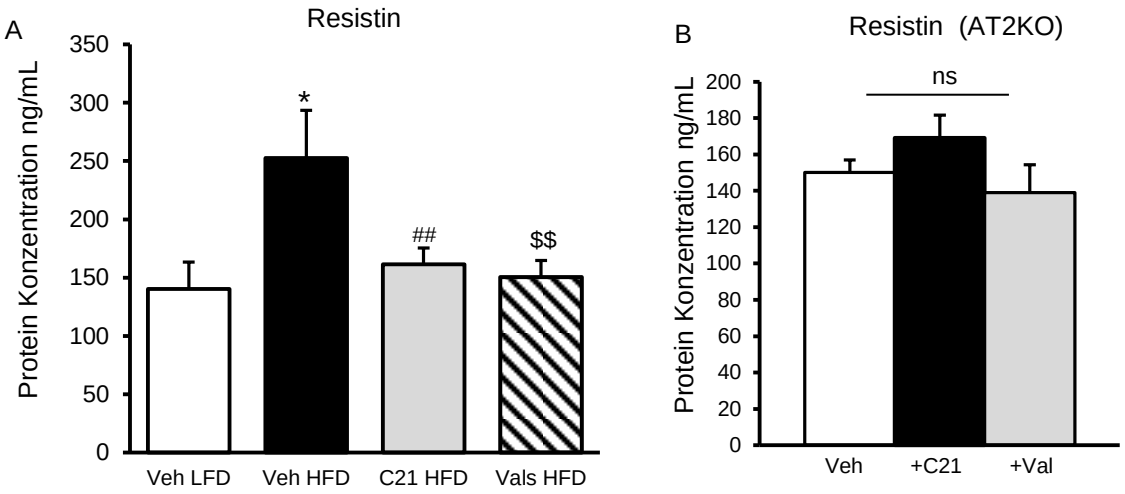

Abb. 3.36 Resistin Serum Konzentrationen

A Resistin Serum-Spiegel werden sowohl durch C21 als auch Valsartan Behandlung stark reduziert.

* p<0,05 vs. Veh LFD; ## und $$ p<0,01 vs. Veh HFD; n=5-6 pro Gruppe

B In den AT2-KO Tieren bleiben die Effekte beider Substanzen aus. n=6 pro Gruppe

Abb. 3.36 A zeigt, dass auch die Resistin Serum-Konzentrationen durch die HFD stark erhöht wurden (von 140,17±23,29 auf 252,62±40,80 ng/mL). Diese konnten sowohl durch die C21-Behandlung auf 161,56±13,8 ng/mL als auch durch die Valsartan-Behandlung auf 150,49±14,32 ng/mL signifikant auf nahezu LFD Vehikel-Niveau reduziert werden. Abb. 3.36 B zeigt das Ausbleiben der C21-vermittelten Resistin-Regulation in den AT2R-KO Mäusen. Ebenfalls blieb der Effekt unter AT1-Blockade aus und gibt ein weiteres Mal einen Hinweis auf eine Beteiligung des AT2R an den metabolischen Effekten des Valsartans.

3.4.2 Inkretine

Inkretine sind Zielpeptide der jüngsten Generation oraler Antidiabetika und besitzen einen positiven Einfluss auf die Insulinempfindlichkeit und -sekretion (siehe hierfür 4.2.5). Im Folgenden wurden das *Glucagon like peptide 1* (GLP-1) und das G*lucose-dependent insulinotropic peptide* (GIP) im Serum der Versuchstiere untersucht.

3.4.2.1 GLP-1

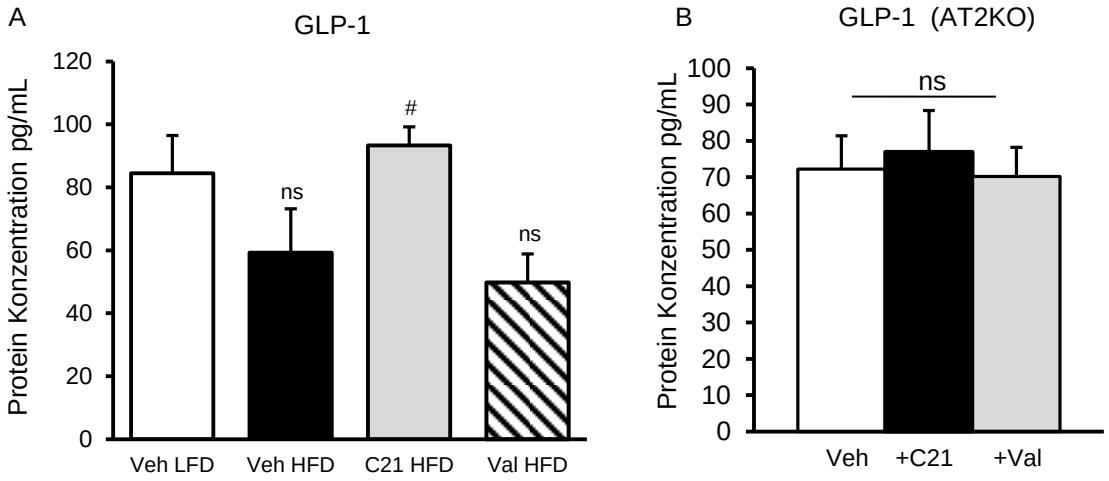

Abb. 3.37 GLP-1 Serum Konzentrationen

A Serum GLP-1 Spiegel werden durch AT2R-Agonismus erhöht.

# p<0,05 vs. Veh HFD; n=5-6 pro Gruppe

B Kein Effekt in den AT2-KO Tieren. n=6 pro Gruppe

Abb. 3.37 A zeigt deutlich, dass die AT2R-Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der GLP-1 Spiegel führte (von Veh HFD: 59,26±13,95 pg/mL auf C21: 93,308±5,95 pg/mL). Die Abb 3.37 B zeigt das Ausbleiben des Effektes von C21 auf das GLP-1.

3.4.2.2 GIP

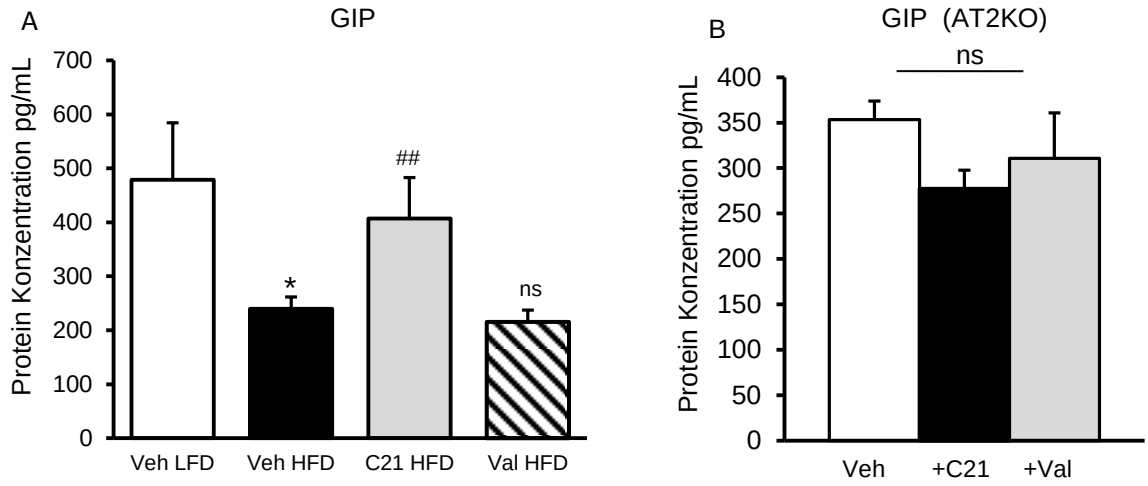

Abb. 3.38 GIP Serum Konzentrationen

A Serum GIP Spiegel werden durch AT2R-Agonismus erhöht.

# $p<0,05$ vs. Veh HFD; n=5-6 pro Gruppe

B Kein Effekt in den AT2-KO Tieren. n=6 pro Gruppe

Abb. 3.38 A zeigt, wie die HFD die GIP-Konzentration im Serum nahezu halbierte (von Veh LFD: 479,07±105,41 auf Veh HFD: 239,81±22,03 pg/mL). C21 erhöhte die GIP-Spiegel hochsignifikant mit 407,21±75,82 pg/mL. In Abb. 3.38 B bleibt der Effekt unter AT2R-Stimulation erneut aus. Valsartan besaß insgesamt keinen Einfluss auf die Regulation der beiden Inkretine.

3.4.3 Untersuchung der Zytokine IL-6, TNF-α und IL-10

Die Zellkulturexperimente an Adipozyten und Makrophagen konnten einen eindeutigen AT2R-vermittelten anti-inflammatorischen Effekt durch die Substanz C21 liefern. In 1.4.2 wurden die systemischen bzw. in 1.4.5 die lokalen Zusammenhänge zwischen der Inflammation und IR beschrieben.

3.4.3.1 IL-6 und TNF-α

Serum

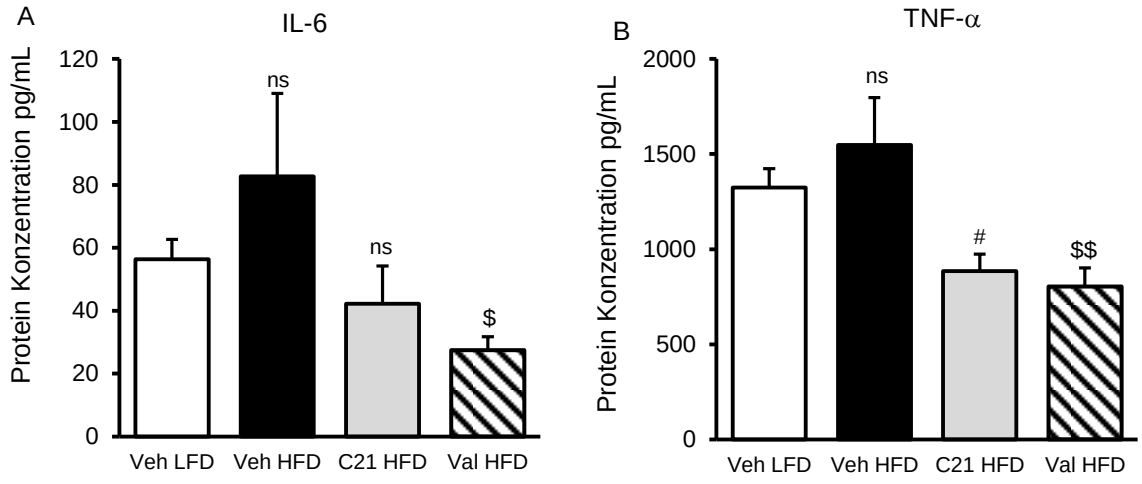

Abb. 3.39 Serum Konzentrationen inflammatorischer Zytokine

A Serum IL-6 Spiegel werden nur durch Valsartan reduziert.

$ p<0,05 vs. Veh HFD; n=4-6 pro Gruppe

B Serum TNFα Spiegel werden sowohl durch C21 als Valsartan stark verringert.

# p<0,05 vs. Veh HFD; $$ p <0,01 vs. Veh HFD n=5-6 pro Gruppe

Abb. 3.39 A zeigt, dass die systemische IL-6 Konzentration nur durch die Valsartan Behandlung signifikant gesenkt wurde, wenngleich die Reduktion durch C21 einen starken Trend aufwies (Veh HFD: 82,95±26,36 pg/mL auf C21: 42,21±12,02 pg/mL). In Abb. 3.39 B hingegen wurden die Serum TNF-α Spiegel sowohl durch die C21-Behandlung als auch durch die Behandlung mit Valsartan signifikant reduziert. Die Effekte von beiden Subtanzen auf beide Zytokine bleiben in den AT2R-KO Tieren aus (Abb. 3.40 A+B).

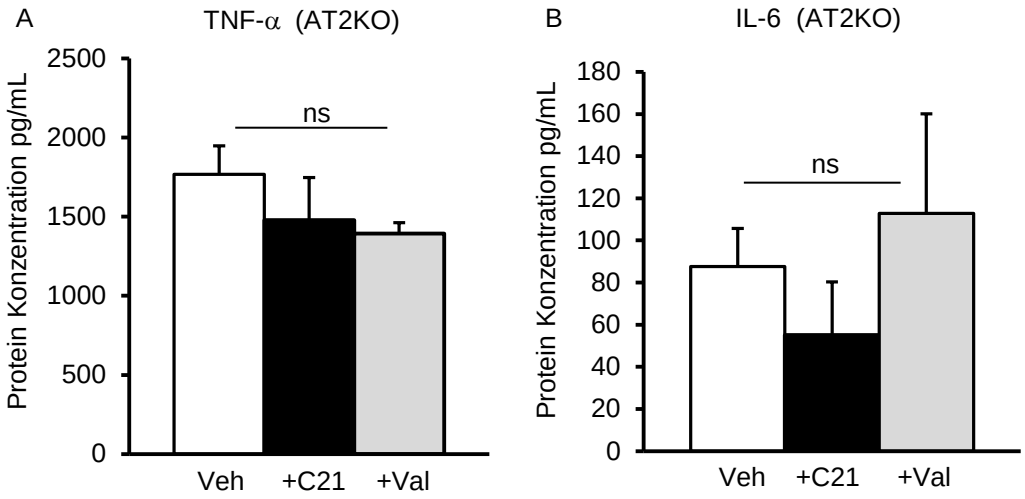

Abb. 3.40 Serum Konzentrationen inflammatorischer Zytokine in AT2R-KO Tieren

A + B Keine Effekte in den AT2R-KO Tieren; n=5-6 pro Gruppe

Fettgewebe

Zur Überprüfung der lokalen Regulation der Inflammationsmarker wurden Expressionsanalysen von TNF-α und IL-6 im gonadalen Fettgewebe der Versuchstiere durchgeführt.

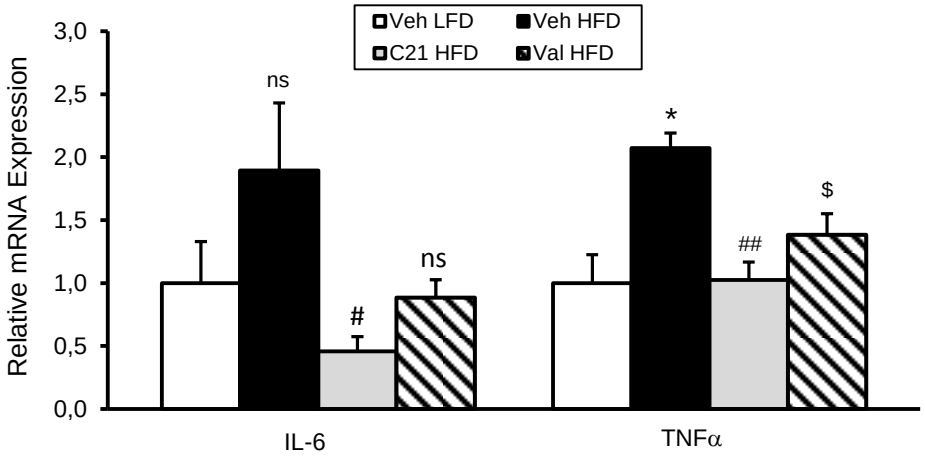

Abb. 3.41 IL-6 und TNF-α Expression im Fettgewebe

Die lokale IL-6 Expression wird von nur C21 signifikant reduziert. Beim TNF-α kommt es sowohl durch C21 als Valsartan zu einer Reduktion der Expression.

# p<0,05 vs. Veh HFD; * p< 0,05 vs Veh LFD; ## p<0,01 vs. Veh HFD; $ p<0,05 vs Veh HFD; n=5 pro Gruppe

Im Gegensatz zu den systemischen Spiegeln zeigt Abb. 3.41, dass C21 lokal die IL-6 Expression mit über 75% (von Veh HFD 1,89±0,54-fach auf C21 0,46±0,11-fach) reduzierte.

Der Valsartan-Effekt war zwar knapp nicht signifikant, wurde aber auf 0,67±0,14-fach sogar noch unter die Vehikel LFD-Gruppe abgesenkt. Beim TNF-α führte die HFD zunächst zu einer signifikanten Verdopplung der Expression, welche durch C21 und Valsartan signifikant abgesenkt werden konnte.

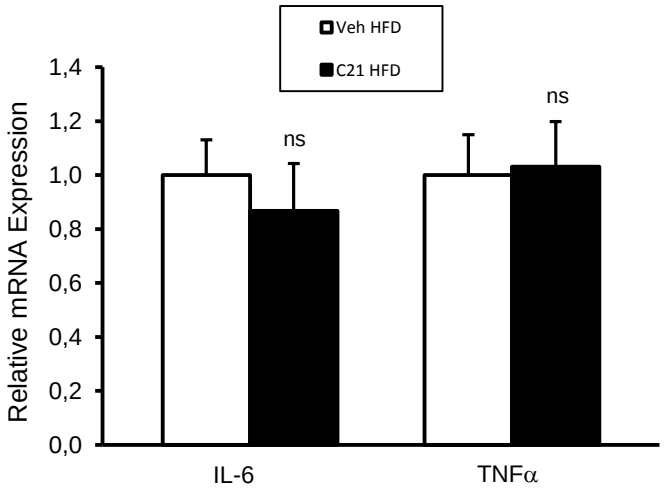

Abb. 3.42 IL-6 und TNF-α Expression im Fettgewebe der KO-Tiere
Keine Effekte in den AT2R-KO Tieren. n=5 pro Gruppe

Abb. 3.42 zeigt dass sowohl C21 als auch Valsartan ihre anti-inflammatorischen Effekte auf IL-6 und TNF-α durch Fehlen des AT2R-Signals verloren.

3.4.3.2 IL-10

Serum

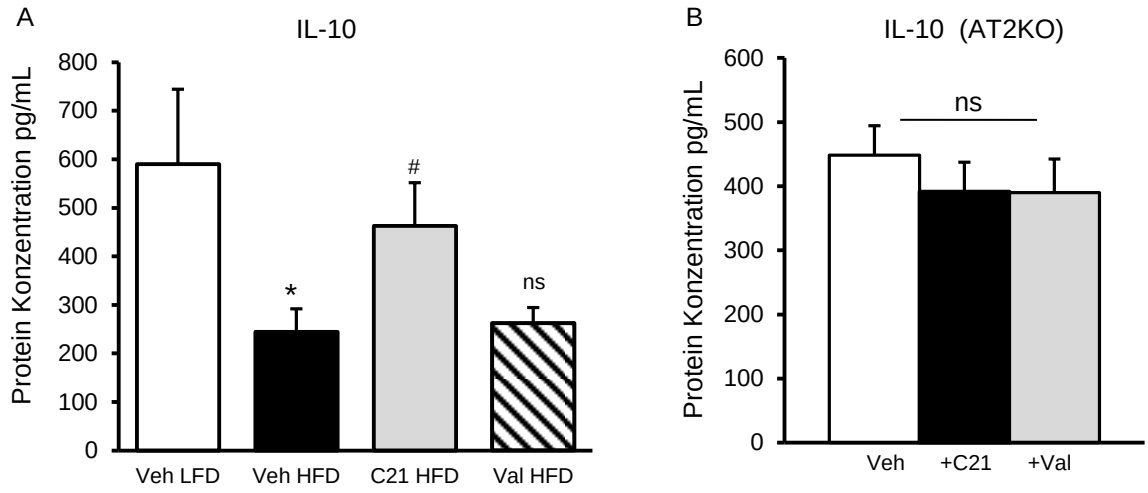

Abb. 3.43 IL-10 Serum Konzentrationen

A Serum IL-10 Spiegel werden nur durch C21 erhöht.

* p<0,05 vs. Veh LFD; # p<0,05 vs. Veh HFD; n=4-6 pro Gruppe

B Kein Effekt in den AT2R-KO Tieren; n=5-6 pro Gruppe

In der Abb. 3.43 A erkennt man deutlich, dass durch die HFD die anti-inflammatorischen IL-10 Konzentrationen signifikant um ca. 50% abnahmen. Die C21-Behandlung hingegen konnte die abgesenkten Konzentrationen von 244,48±47,49 pg/mL auf 462,56±89,09 pg/mL wieder signifikant anheben. Abb. 3.43 B beschreibt das Ausbleiben des Effektes von C21 auf die IL-10 mRNA-Expression.

Fettgewebe

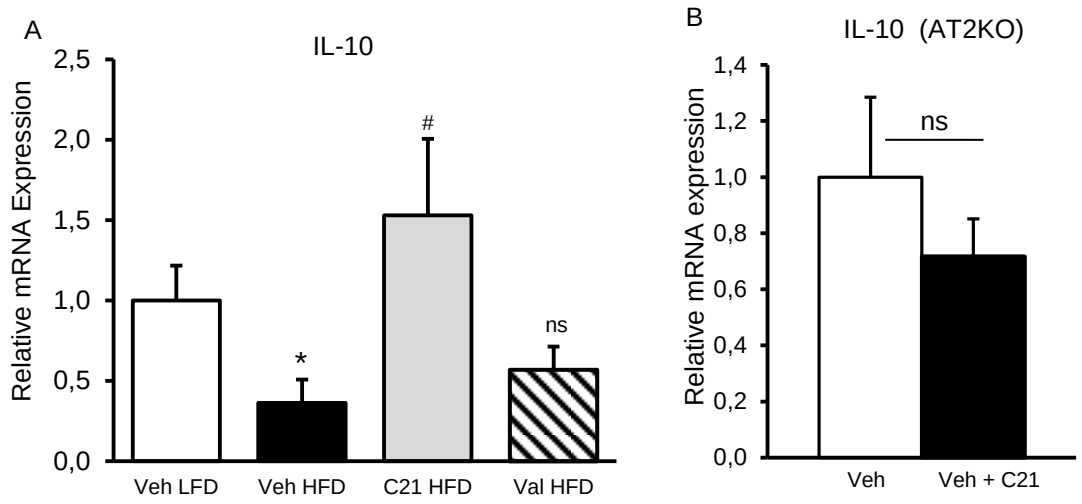

Abb. 3.44 IL-10 Expression im Fettgewebe

A Die lokale IL-10 Expression wird von C21 signifikant reduziert.

* p<0,05 vs. Veh LFD; # p< 0,05 vs. Veh HFD; n=5 pro Gruppe

B Keine Effekte im Fettgewebe der AT2R-KO Tiere

Abb. 3.44 A zeigt, dass im Fettgewebe korrespondierend mit den Serum-Konzentrationen die IL-10 Expression durch die HFD stark auf 0,36±0,15-fach reduziert wird und durch die C21-Behandlung auf 1,53±0,48-fach wieder angehoben wurde. Dieser Effekt blieb im Gewebe der KO-Tiere aus (Abb. 3.44 B).

Zusammenfassung Serum-Marker

Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem selektiven AT2R-Agonisten C21 in adipösen Mäusen die Serumspiegel an Adiponektin erhöhte bzw. von Leptin und Resistin reduzierte. Dies konnte für Adiponektin und Leptin lokal im Fettgewebe bestätigt werden. Die AT1R-Blockade reduzierte nur die Resistin-Spiegel. Darüber hinaus führte die C21-Behandlung zur Reduktion von TNF-α und tendenziell von IL-6 bei gleichzeitig erhöhten IL-10 Spiegeln im Serum. Diese Effekte konnten zusätzlich für das Fettgewebe bestätigt werden. Dabei verlor C21 seine Effekte in den AT2R-KO Mäusen. Valsartan wirkte stark anti-inflammatorisch ohne Einfluss auf IL-10 und verlor ebenfalls seine Effekte in den AT2R-KO Tieren.

3.5 Triglyzeride

Zur Bestimmung der Serum-TG wurden diese, wie in 2.2.10 beschrieben, kolorimetrisch quantifiziert.

3.5.1 Serum

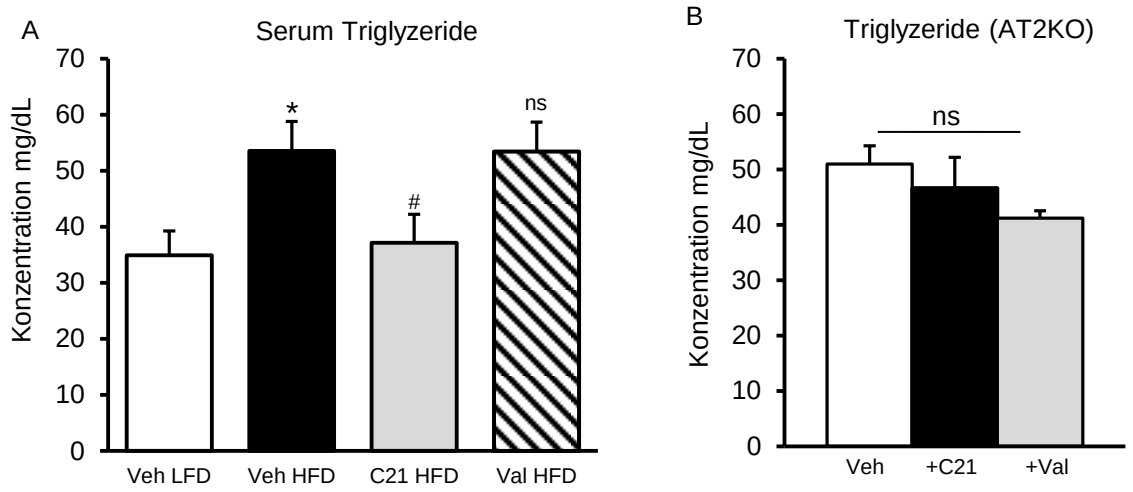

Abb. 3.45 Serum-Triglyzerid Konzentrationen

A Die C21 Behandlung senkt die Triglyzeride auf gesundes Vehikel LFD-Niveau herab.

* p<0,05 vs. Veh LFD; # p< 0,05 vs. Veh HFD; n=5-7 pro Gruppe

B Keine Effekte in AT2R-KO Tieren auf die Serum-Triglyzeride; n=6-7 pro Gruppe

Abb. 3.45 A zeigt, dass die HFD die Serum-TG von Veh LFD 34,95±4,33 mg/dL auf Veh HFD 53,57±5,25 mg/dL signifikant anhob. Durch die C21-Behandlung konnten diese auf 37,16±5,08 mg/dl signifikant reduziert werden. Die AT1R-Blockade hatte keinen Effekt auf die TG. Aus Abb. 3.45 B wird zudem deutlich, dass C21 seinen Effekt auf die Triglyzeride in den AT2R-KO Tieren erneut verlor.

3.5.2 Leber

Zur weiteren Charakterisierung des Lipidstoffwechsels wurden die Lebern der Versuchstiere auf TG-Einlagerungen überprüft. TG-Einlagerungen treten sehr häufig im Zusammenhang mit IR und Adipositas in Form der nichtalkoholischen Steatosis hepatis auf[176].

3.5.2.1 Histologie: Hämatoxyllin-Eosin Färbung

Die Lebern der Versuchstiere wurden, wie in 2.2.11.1 beschrieben, dehydriert, in Paraffin eingebettet und für die Färbung geschnitten. Anschließend wurden die Leberschnitte mit Hämatoxyllin und Eosin gefärbt (siehe 2.2.11.2).

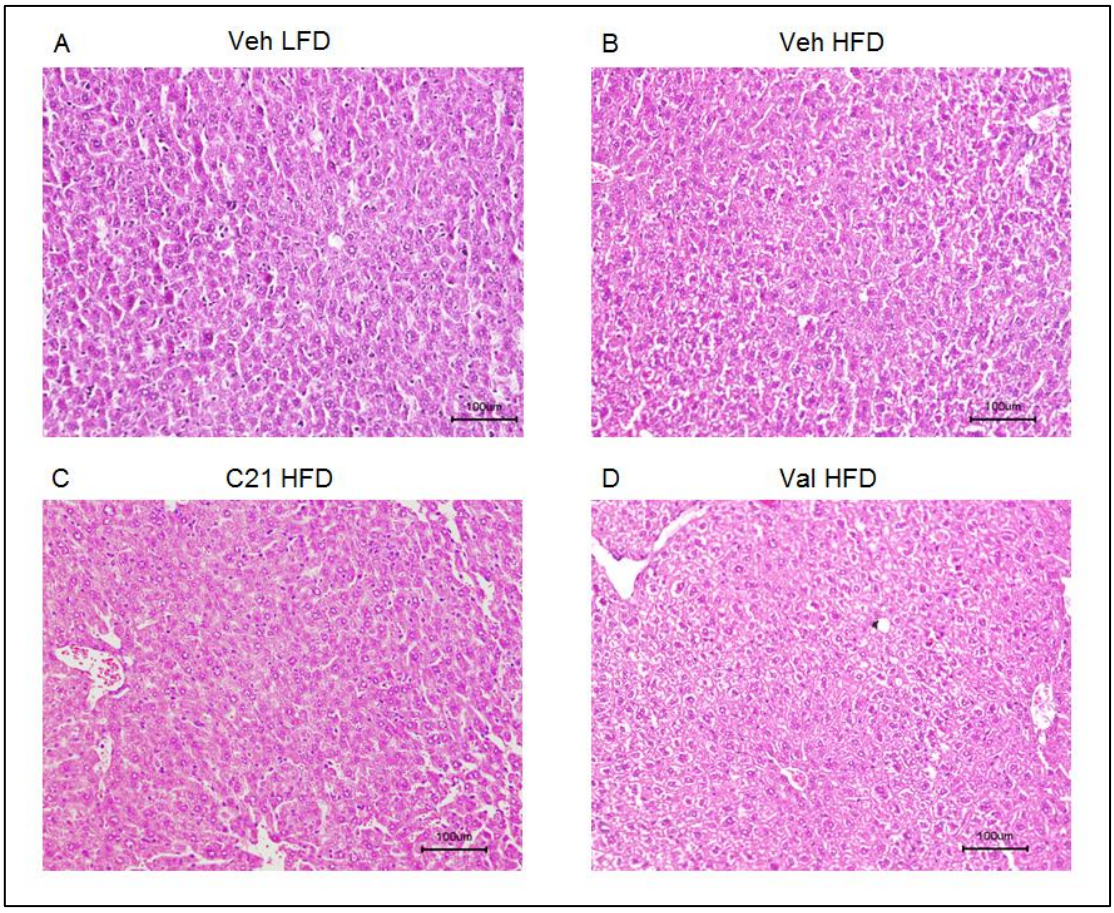

Abb. 3.46 Hämatoxyllin-Eosin Färbung der Lebern

Die C21 Behandlung reduziert die hepatische Steatose.

Repräsentatives Bild aus n=3 pro Gruppe

Abb. 3.46 A zeigt die gesunde Leberzellstruktur. Aus dem Bild B wird deutlich, dass die HFD zu einer moderat gesteigerten Fetteinlagerung in der Leber führte. Die einstigen TG-Einlagerungen sind durch die weißen Fettvakuolen in den Hepatozyten zu erkennen. Das Bild C zeigt, dass die C21-Behandlung zu einer Reduktion der TG-Einlagerungen zu führen scheint und dem morphologischen Erscheinungsbild der der LFD-Tiere ähnelt. Die Valsartan-Behandlung (Bild D) wies keine Verbesserung der TG-Einlagerung auf und ähnelt der Struktur der HFD Vehikel-Tiere.

3.5.2.2 Quantifizierung

Zur Bestimmung der TG in den Lebern wurden diese, wie in 2.2.10 beschrieben, eingewogen und die TG in eine lipophile Phase überführt. Anschließend wurden die TG kolorimetrisch quantifiziert.

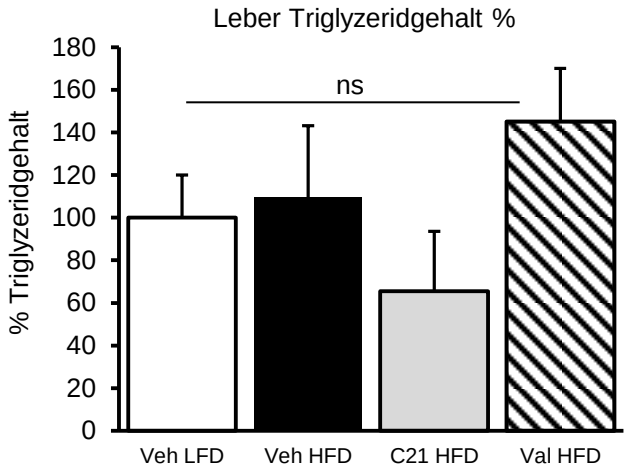

Abb. 3.47 Leber Triglyzeridgehalt

Keine signifikanten Effekte der Behandlungen auf die Leber Triglyzeride.

n=7-9 pro Gruppe

Abb. 3.47 zeigt, dass keine der Behandlungen einen signifikanten Effekt auf den Leber-TG-Gehalt besaß, wenngleich die Reduktion durch C21 von 100% auf 65,45±28,19% knapp nicht signifikant war und somit mit der morphologischen der Reduktion der Fettvakuolen aus 3.5.2.1 korrespondiert. Ebenfalls vergleichbar ist die morphologische Struktur der Valsartan-Gruppe mit dem tendenziell erhöhten TG-Gehalt.

Zusammenfassung in-vivo

Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass die spezifische AT2R-Stimulation mit C21 zu einer Verbesserung des Glukosestoffwechsels führte. Gleichzeitig führte die AT2R-Aktivierung zu einer positiven Regulation von Adipozytokinen und anti-inflammatorischen Effekten sowohl systemisch als auch lokal im Fettgewebe. Darüber hinaus führte die C21 Behandlung zur positiven Inkretin-Regulation mit reduzierten Serum-TG.

4 Diskussion

4.1 In-vitro

Anhand von *in-vitro* Experimenten wurde an verschiedenen Zelltypen der inflammatorische und metabolische Einfluss durch C21 untersucht.

4.1.1 AT2R-Aktivierung führt zur Anti-Inflammation mit Modulation der Adipozytokin-Expression in 3T3-L1 Adipozyten

Die 3T3-L1 Zelllinie stellt hierbei ein ideales *in-vitro* Modell zur Untersuchung von Adipozytenfunktionen dar, da die Zellen im differenzierten Zustand vergleichbare Charakteristika sowie morphologische und biochemische Eigenschaften zu tierischem Fettgewebe aufweisen[177]. Für die Zellen konnte zudem das Vorhandensein eines funktionellen lokalen RAS nachgewiesen werden. So produzieren 3T3-L1 Adipozyten alle essentiellen Peptide des RAS wie AGT, ANG II, AT1R und AT2R[178,179]. Die AT2R-Expression wurde zudem nochmals auf Transkriptionsebene bestätigt, was eine wichtige Voraussetzung für die AT2R-vermittelten Effekte der Substanz C21 in diesem Zellmodell darstellt. Die Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten mit TNF-α stellt zudem ein etabliertes Modell zur Induktion von *in-vitro* Inflammation und IR dar[180].

Die Transkription von IL-6 wurde hierbei als Leitzytokin angenommen, da diesem Zytokin eine entscheidende Rolle in der TNF-α induzierten IR in 3T3-L1 Adipozyten zugeschrieben wird[181]. Die optimale anti-inflammatorische Konzentration von C21 in diesem TNF-α Inflammationsmodell und der IL-6 Transkription wurde bei 1 µM identifiziert. Dies entspricht der Konzentration, die *Rompe et al.* ebenfalls als optimal anti-inflammatorische *in-vitro* Konzentration für die Regulation diverser inflammatorischer Marker in dermalen Fibroblasten bestimmen konnten[130]. Die schon in anderen Zellmodellen gezeigte anti-inflammatorische Potenz von C21[107,129,130] konnte in der vorliegenden Arbeit auf die TNF-α induzierte IL-6 Produktion bestätigt werden (siehe 3.1.1). Ein Hinweis auf die Spezifität konnte durch Ausbleiben der Effekte unter AT2R-Blockade erbracht werden.

Zur weiteren mechanistischen Aufklärung und metabolischen Charakterisierung der Adipozyten wurden Adipozytokine untersucht. Im Jahr 2005 machten *Clasen et al.* aus unserer Arbeitsgruppe die Beobachtung, dass sowohl die indirekte AT2R-Aktivierung durch die Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten mit dem ARB Irbesartan und ANG II als auch die direkte AT2R-Aktivierung mit dem Peptid CGP-42112A zu einer Induktion der Adiponektin-Expression führte[175]. Im vorliegenden Zellmodell führte die 24-stündige TNF-α Behandlung zu einer hochsignifikanten Reduktion der Adiponektin mRNA-Expression (siehe 3.1.1.1). Mehrere Studien beschreiben diesen Effekt in diesem Zelltyp. So führen sowohl TNF-α als auch das induzierte IL-6 zu einer Reduktion der Adiponektin-mRNA. Die Reduktion durch das IL-6 beruht wahrscheinlich auf der Aktivierung von MAPK[55,182]. Ein weitere Studie beschreibt eine direkte Inhibierung der Adiponektin-Promoteraktivität in diesem Zelltyp durch TNF-α[183].

Die parallele AT2R-Stimulation mit C21 führte auf der Transkriptionsebene zu keinem Effekt. Ähnliche Beobachtung haben *Clasen et al.* in ihren Versuchen ebenfalls gemacht. So führte weder die Behandlung mit Irbesartan bzw. Telmisartan noch die Stimulation mit dem vollen PPARγ-Agonisten Pioglitazon in 3T3-L1 Adipozyten zu einer Regulation der Adiponektin mRNA-Expression[175]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sowohl der Western Blot als auch die Quantifizierung des Zellüberstandes (ELISA) korrelierend mit der mRNA-Expression eine starke Reduktion des Adiponektins durch TNF-α Behandlung. Auf Proteinebene hingegen führte die AT2R-Aktivierung zu einer signifikanten Erhöhung des Adiponektins sowohl in der zellulären Expression als auch in der Freisetzung.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der oben beschriebenen Arbeit von *Clasen et al.* gewonnen. Hier kam es zu einer klaren Induktion des Adiponektin-Proteins durch Irbesartan, Telmisartan und Pioglitazon. Als Begründung für die Disparität zwischen mRNA- und Proteinexpression wurde eine posttranskriptionale Modifikation des Proteins in Betracht gezogen. Durch die Inhibierung der *de-novo* Proteinsynthese mit Cycloheximid konnte gezeigt werden, dass die Degradation des Adiponektins durch Irbesartan-Stimulation verzögert wurde. Des Weiteren konnte Adiponektin von *Clasen et al.* als Zielprotein für die Ubiquitinierung über das 26S Proteasom identifiziert werden[175]. Über den 26S Ubiquitin-Proteasom Signalweg werden die meisten Proteine im Nukleus und Zytosol der Zelle abgebaut[184]. Eine Inhibierung des 26S Proteasoms mit MG132 und MG262 führte in

ähnlicher Dimension zu Erhaltung der Adiponektin-Level wie die Behandlung mit Irbesartan. Der ARB hatte hierbei keinen Einfluss auf die Proteasom-Aktivität, was einen Einfluss oberhalb der Signalkaskade (Upstream) vermuten lässt[175].

Auf der Basis dieser Beobachtungen kann man schlussfolgern, dass die ATR2-vermittelte Adiponektin-Induktion der vorliegenden Arbeit möglicherweise ebenfalls auf einer Stabilisierung und Verhinderung der Degradation des Proteins über den 26S-Proteasom Komplexes beruht. Zudem bleibt der Schutz vor Degradation durch Blockade des AT2R aus.

Die anti-inflammatorischen Mechanismen des Adiponektins liegen wahrscheinlich in einer direkten Hemmung der NF-κB Aktivität[57] und Hemmung der endogenen TNF-α Produktion[185]. Weiterhin konnte in verschiedenen Zellmodellen gezeigt werden, dass Adiponektin zur Induktion von IL-10 führt[58,186]. Einhergehend mit der Stabilisierung bzw. der Induktion der Adiponektin-Spiegel durch die AT2R-Aktivierung führte die Behandlung der 3T3-L1 Adipozyten mit C21 in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einer signifikanten Induktion der basalen IL-10 mRNA-Expression (siehe 3.1.1). Durch direkte Inhibierung der NF-κB Transkriptionsaktivität, nämlich durch Hemmung von IKKs, und zusätzlicher Bindungshemmung des NF-κB Komplexes an die DNA, verhindert IL-10 auch die Transkription weiterer pro-inflammatorischer Gene[187]. Für diesen Effekt wird zusätzlich diskutiert, dass IL-10 direkt die Aktivität der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 erhöht und somit die IKK-vermittelte Aktivierung von NF-κB durch Dephosphorylierung wieder aufhebt[188]. So konnte von *Feuerer et al.* in 3T3-L1 Adipozyten gezeigt werden, dass durch die Behandlung von rekombinantem IL-10 die TNF-α induzierte Expression pro-inflammatorischer Zielgene nahezu unterdrückt wurde[180]. Auch die TNF-α induzierte und NF-κB vermittelte Verminderung der insulinabhängigen Tyrosin-Phosphorylierung des IRS bzw. verstärkte alternative Serin 307-Phosphorylierung und damit verbundene Störung des Insulin-Signalweges konnte in der Arbeit *Lumeng et al.* durch die Behandlung mit IL-10 verbessert werden. Durch eine verstärkte Aktivierung des PI3K-Signalweges wirkt IL-10 zusätzlich positiv auf die Insulinempfindlichkeit. Die TNF-α bedingte GLUT-4 Expressionsminderung wurde ebenfalls durch IL-10 verbessert[76].

4.1.2 AT2R-Aktivierung führt zur Anti-Inflammation in THP-1 Makrophagen

Für das *in-vitro* Modell der Fettgewebsinflammation wurde im zweiten wichtigen Zelltyp die AT2R-Aktivierung an THP-1 Makrophagen untersucht. Die Immunzellen sind besonders geeignet, um RAS-abhängige Effekte zu untersuchen, da die differenzierten Makrophagen ebenfalls alle wichtigen Komponenten des RAS (AGT, ACE, AGT, AT1R und AT2R) produzieren. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die Aktivität der Enzyme des RAS sowie die Expression von AT1R und AT2R während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen stark zunimmt[168].

Die AT2R-Expression wurde in den THP-1 Zellen überprüft und bestätigt. Zur Induktion der *in-vitro* Inflammation wurde LPS ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen weit verbreiteten und sehr gut dokumentierten Induktor zur Untersuchung von inflammatorischen Prozessen in THP-1 Makrophagen[189,190]. LPS führt über TLR4-Rezeptoren zur Aktivierung von IKK und damit konsekutiv zur Aktivierung von NF-κB und Transkription seiner Zielgene[191]. Durch die Induktion mit LPS konnte die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, MCP-1 und TNFα signifikant gesteigert werden, wobei durch direkte AT2R-Aktivierung alle induzierten Spiegel wieder signifikant gesenkt werden konnten (siehe 3.1.2). Dies konnte zusätzlich und spezifisch auf der Proteinebene für das IL-6 gezeigt werden.

4.1.3 Mechanismus der AT2R-vermittelten Anti-Inflammation

Die vorliegende Arbeit konnte erstmalig zeigen, dass die direkte AT2R-Aktivierung mit C21 in 3T3-L1 Adipozyten und THP-1 Makrophagen zu anti-inflammatorischen Effekten mit einer positiven Verschiebung der Adipozytokin-Balance zwischen Adiponektin und Leptin führt.

Die anti-inflammatorische Potenz der Substanz wurde zuvor schon an anderen Zellmodellen gezeigt und untersucht. *Rompe et al.* hatten hierfür mehrere Versuche zur mechanistischen Aufklärung durchgeführt. Wie in der Einleitung beschrieben, geht die Signaltransduktion des AT2R mit der Aktivierung von Phosphatasen einher. Durch die spezifische Hemmung von Serin/Threonin-Phosphatasen (z.B. PP2A) mit Okadasäure[192] (OA) bzw. von Tyrosin-Phosphatasen (z.B. SHP-1) mit Natriumorthovanadat[193] (Na_3VO_4) wurde die TNF-α induzierte Reduktion der IL-6 Expression durch die Behandlung mit C21 wieder aufgehoben.

Somit konnte gezeigt werden, dass C21 seine AT2R-vermittelten anti-inflammatorischen Effekte verliert, sobald diese Phosphatasen gehemmt werden. Durch Inhibierung der Phosphatasen können diese die Degradation durch Dephoshorylierung von IκB nicht mehr verhindern. In der Folge kommt es zur Translokation des NF-κB Komplexes in den Nukleus. Wie in der Einleitung beschrieben, konnten bereits *Bedecs et al.* (an murinen N1E-115 Neuroblastom-Zellen) und *Wu et al.* (an glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten) die Induktion der SHP-1 durch AT2R-Stimulation als anti-inflammatorisches Enzym identifizieren[113,122].

Die entscheidende AT2R-vermittelte Hemmung der NF-κB Aktivität wurde ferner durch *Rompe et al.* belegt, die zeigten, dass die C21-Behandlung die Translokation der p50-UE des NF-κB Komplexes in den Nukleus hemmt. Gleichzeitig konnte in der gleichen Arbeit gezeigt werden, dass die NF-κB vermittelte IL-6 Transkription durch Reduktion der Aktivität des IL-6 Promoters gesenkt wurde. Die Reduktion der Promoter-Aktivität war in einer ähnlichen Dimension wie der von Glukokortikoiden, hier Hydrokortison, zu beobachten[130]. Glukokortikoide finden als sehr starke Antiphlogistika unter anderem bei ausgeprägten inflammatorischen Indikationen ihren klinischen Einsatz. Ihre anti-inflammatorischen Effekte sind größtenteils auf eine Hemmung der NF-κB Aktivität zurückzuführen[194]. Darüber hinaus beschreibt eine kürzlich veröffentliche Studie von *Tadevosyan et al.* anhand von isolierten Kardiomyozyten aus Wistar-Ratten das Vorhandensein von nuklearen AT1R und AT2R mit direktem Einfluss auf die Transkription von NF-κB[195].

Des Weiteren konnte von *Rompe et al*. der Arachidonsäuremetabolit Epoxyeicosatriensäure (EET) als second Messenger der anti-inflammatorischen Effekte von C21 mit konsekutiver Hemmung von NF-κB in den Fibroblasten identifiziert werden[130]. Die ETT wurde bereits in anderen Arbeiten als anti-inflammatorischer Metabolit[196] mit zusätzlichem positiven Effekt auf die Insulinsensitivität und Adiponektin-Produktion beschrieben[197]. Die ETT ist darüber hinaus Zielmetabolit neuer innovativer Arzneimittel, die sich zurzeit noch in der klinischen Entwicklung befinden. Diese Inhibitoren der s-EH (soluble-Epoxid Hydrolase) verhindern den Abbau der ETT und erhöhen somit deren systemische Konzentration[198]. In einem Mausmodell an adipösen Mäusen konnte bereits die orale Gabe des selektiven sEH Inhibitors AR9281 dosisabhängig die Glukose-Toleranz verbessern. Derzeit befindet sich AR9281 in der klinischen Phase II für inflammatorische Indikationen wie unter anderem auch für DMT2[199].

Die beobachteten Effekte sowohl auf die Produktion von IL-6, Adiponektin und Leptin in den Adipozyten auch als auf die Produktion von IL-6, MCP-1 und TNF-α in den Makrophagen der vorliegenden Arbeit sind aufgrund der oben beschriebenen Mechanismen erklärbar (siehe Abb. 4.1). Im Mittelpunkt steht hierbei als „Downstream-Target“ die direkte bzw. indirekte Inhibierung von NF-κB, welche neben der Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokinpiegel - einschließlich denen des Resistins - auch gleichzeitig die Induktion bzw. Aufrechterhaltung der Adiponektinspiegel erklärt. Zusätzlich wurde hierzu oben bereits die posttranslationale Stabilisierung des Adiponektins durch die AT2R-Aktivierung diskutiert. In beiden Zellentypen wurde zusätzlich eine AT2R-vermittelte erhöhte mRNA-Expression von IL-10 beobachtet. Wie oben erwähnt, könnte diese Beobachtung mit den erhöhten Adiponektinspiegeln in Zusammenhang gebracht werden und die IL-10 resultierende Hemmung von NF-κB könnte, zumindest teilweise, an den oben beschriebenen Effekten beteiligt sein.

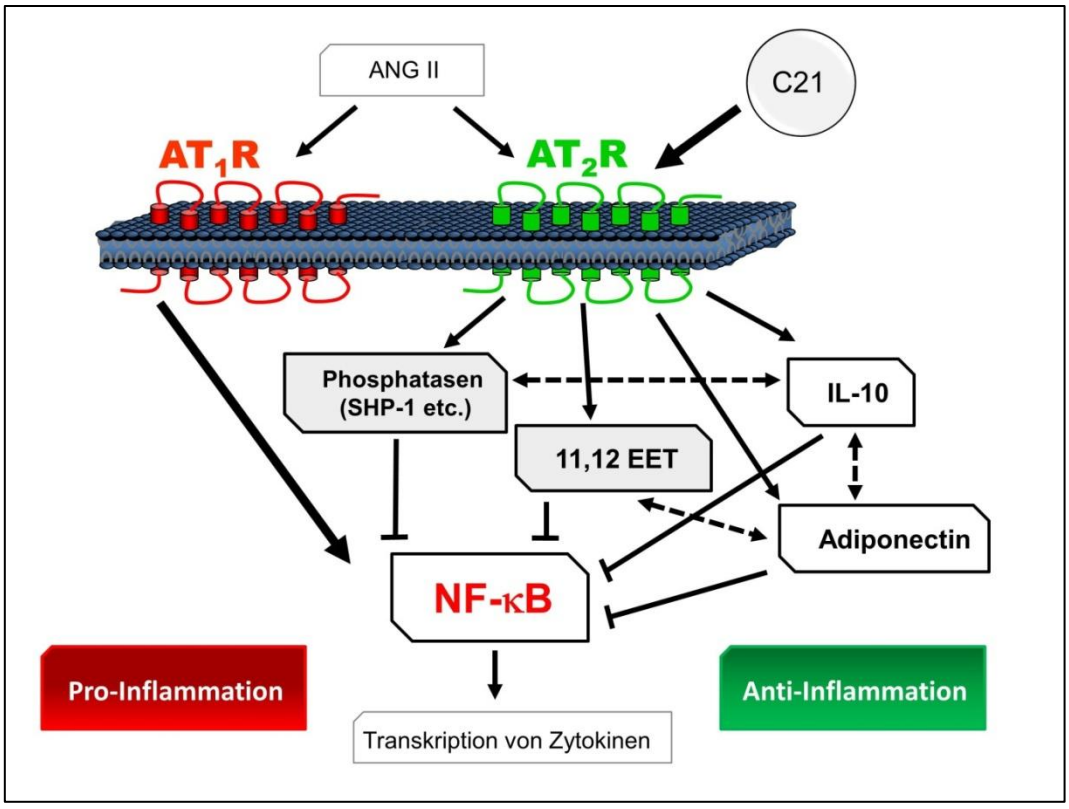

Abb. 4.1 Arbeitsmodell für die Mechanismen der C21-vermittelten Anti-Inflammation

4.1.4 C21-Effekte sind PPARγ-unabhängig

Thiazolidindione oder Glitazone werden zurzeit noch als orale Antidiabetika zur Behandlung des T2DM als „Insulin Sensitizer“ eingesetzt. Trotz ihrer Wirksamkeit sind Glitazone seit ihrer Einführung stark umstritten[200]. So bekam ihr erster Vertreter, das Troglitazon, in Deutschland wegen starker Hepatotoxizität nie eine Zulassung. Auch die beiden Nachfolgesubstanzen (Schrittinnovationen) werden aufgrund ihres ungünstigen Nutzen-Risiko-Profils stark kritisiert. So darf Rosiglitazon (Avandia®) seit November 2010 aufgrund einer Anordnung des *Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte* (BfArM) wegen nicht vertretbarer kardiovaskulärer Risiken in Deutschland nicht mehr vertrieben werden[201]. Auch für Pioglitazon (Actos®), für das kürzlich ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Blasentumoren gezeigt werden konnte[202], empfiehlt das BfArM den Medizinern keine Patienten mehr auf das Arzneimittel einzustellen. Dies könnte das Ende der Ära der Glitazone bedeuten[203].

Glitazone fördern als volle Agonisten am PPARγ die Adipozytendifferenzierung (siehe 1.6.4). Des Weiteren führt eine PPARγ-Aktivierung zu anti-inflammatorischen Effekten. Neben einer Reduktion von TNF-α, Leptin und Resistin kommt es gleichzeitig zur Induktion von Adiponektin mit weiterer Steigerung der Insulinsensitivität[154,155]. Wie bereits erwähnt, konnten unter anderen *Schupp et al.* aus unserer Arbeitsgruppe für den AT1R-Blocker Telmisartan beschreiben, dass dieser pleiotrop und partiell den PPARγ aktiviert[204,205].

Die AT2R-vermittelten anti-inflammatorischen Effekte in den 3T3-L1 Adipozyten und THP-1 Makrophagen einschließlich der Regulationen der Adipozytokine der vorliegenden Arbeit wären somit mechanistisch ebenfalls, zumindest teilweise, in einer pleiotropen PPARγ-Aktivierung zu begründen. Insbesondere beim Adiponektin handelt es sich um ein klassisches Ziel-Gen des PPARγ[62].

Beim Differenzierungsversuch (siehe 3.1.3) mit anschließender Öl-Rot O Färbung handelt es sich um ein etabliertes Modell zur Überprüfung auf PPARγ-Aktivität[169]. Der volle PPARγ-Agonist Pioglitazon führte, wie erwartet[206], zur vollständigen Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten, wohingegen die AT2R-Aktivierung mit C21 in der *in-vitro* eingesetzten Konzentration keine adipogene Wirkung aufwies. Bestätigt werden konnte diese

Beobachtung ebenfalls durch das PPARy-LBD Reporterassay, in welchem nur der Vollagonist Pioglitazon, wie erwartet[204], zu einer Aktivierung der LBD führte.

Aufgrund dieser Beobachtungen ist eine direkte PPARγ-Aktivierung durch C21 in der verwendeten Konzentration von 1 µM unwahrscheinlich. Die oben beobachteten Effekte der AT2R-Aktivierung scheinen also PPARγ-unabhängig zu sein.

4.2 In-vivo

Beim DIO-Modell der Maus handelt es sich um eine etablierte Methode zur Induktion von fettleibigkeitsbedingter IR und Glukoseintoleranz *in-vivo*[158]. Die AT2R-KO Tiere dienten hierbei als Referenz für die Spezifität der Substanz C21. Als anti-inflammatorische Positiv-Kontrolle wurde der ARB Valsartan eingesetzt, für den zusätzlich gezeigt werden konnte, dass er den Glukosemetabolismus *in-vitro* und *in-vivo* verbessern konnte[207]. Des Weiteren besitzt Valsartan, wie C21, keine pleiotrope PPARγ-Aktivität und ist daher besonders geeignet um RAS-spezifische Effekte zu untersuchen[205].

4.2.1 AT2R wirkt modulatorisch auf den Blutdruck

Valsartan führte in der verwendeten Dosierung von 3 mg/kg KG in den Mäusen zu einer erwarteten Absenkung des Blutdrucks[208]. Zur Abgrenzung metabolischer Blutdruckeffekte wurde Hydralazin eingesetzt. Die Substanz senkt RAS-unabhängig den Blutdruck und gehört in die Gruppe der peripheren Vasodilatatoren, wobei der Wirkungsmechanismus bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist. Vermutet wird die Reduktion von intrazellulärem Kalzium und eine cGMP-abhängige Relaxation von glatten Gefäßmuskelzellen[209]. Wichtig für die Blutdruck-Kontrolle Hydralazin war es, dass die Blutdrucksenkung in der gleichen Dimension wie die von Valsartan vorlag (siehe 3.2.2).

Wie in der nicht-invasiven Blutdruckmessung bestimmt werden konnte, führte die HFD in den WT-Tieren zu einer hochsignifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die in der Einleitung beschriebenen Mechanismen bezüglich der Gewichtszunahme und des Blutdrucks darstellen (siehe 1.6.1). Durch Zunahme an Körpergewicht mit Vergrößerung der Fettmasse könnte die Aktivierung des SNS und des

RAS aus der vermehrten Produktion an Leptin und Ang II aus dem Fettgewebe resultieren[133–140,210]. Diese Assoziation zwischen Adipositas und erhöhtem Blutdruck konnte ebenfalls in verschiedenen DIO-Tiermodellen sowohl an der Maus[162] als auch an der Ratte[211] beobachtet werden, wobei sich die Modelle teilweise in der Bestimmungsmethode des Blutdrucks und Futterzusammensetzung von der vorliegenden Arbeit unterscheiden. In der Arbeit von *Yvan-Charvet et al.* wurde der Blutdruck der C56Bl-6 Mäuse ebenfalls mit der nicht-invasiven „Tail-cuff" Methode bestimmt, wobei das HFD-Futter nur einen Rohfettanteil von ca. 25% (vs. 35% der vorliegenden Arbeit) besaß[162]. Bei der Arbeit von *Barnes et al.* wurde der Blutdruck von Wistar-Ratten unter Anästhesie invasiv mit einem Katheter in der Arteria femoralis bestimmt[211].

Die Behandlung mit C21 führte in der vorliegenden Arbeit zu einer leichten, aber signifikanten Senkung des Blutdrucks. In der Einleitung wurde der Einfluss des AT2R auf die NO/cGMP-vermittelten Natriurese und Vasodilatation eingegangen[108,109]. So beschreibt eine Studie von *Wan et al.* an *spontaneously hypertensive rats* (SHR) eine signifikante Blutdrucksenkung durch C21-Behandlung[128]. Dem gegenüber konnte in anderen Versuchen an Ratten kein signifikanter Einfluss auf den Blutdruck durch die Behandlungen mit C21 bzw. CGP-42112A identifiziert werden, wobei in allen Studien reduzierende Tendenzen durch die AT2R-Aktivierung zu verzeichnen waren[107,129,212]. Unterschiede zum vorliegenden Modell lagen hierbei teilweise sowohl in der Bestimmungsmethode des Blutdrucks als auch in der Behandlungsdauer.

Eine Metaanalyse aus dem *Lancet Journal* ergab, dass allein die Senkung des systolischen Blutdrucks um 2 mmHg in Patienten mittleren Alters das Mortalitätsrisiko durch Apoplex um 10% und das Auftreten kardiovaskulärer Ischämien um 7% verringert[213]. Die leichte Senkung des Blutdrucks durch C21 um etwa 7 mmHg in Mäusen wäre somit höchstwahrscheinlich als klinisch signifikant einzustufen. Eine weitere Erklärung für den moderaten Einfluss auf den Blutdruck könnte der in 4.1.3 beschriebene AT2R-vermittelte Einfluss auf die Induktion der EET liefern. So führte in einem Tierversuch von *Imig et al.* die Behandlung von Ratten mit dem Epoxid-Hydrolase-Inhibitor AR9281 zu einer signifikanten Senkung des systolischen Blutdrucks[214].

Bei den AT2R-KO Tieren war der Einfluss von C21 auf den Blutdruck aufgehoben und das Ausmaß der Blutdrucksenkung durch Valsartan war stark reduziert. In einer Studie von *Siragy et al.* wiesen AT2R-KO Mäuse einen leicht erhöhten Blutdruck verbunden mit einer verminderten Natriumausscheidung im Vergleich zu ihren WT-Tieren auf[215]. Infundiert man diesen Mäusen Ang II so ist der Blutdruckanstieg deutlich ausgeprägter als in den entsprechenden WT-Tieren[164]. Demgegenüber beobachtet *Yvan-Charvet et al.* in seinem Tiermodell, dass der HFD-induzierte Anstieg des systolischen Blutdrucks in AT2R-KO Mäusen ausbliebt[162], was eine blutdrucksteigernde Eigenschaft des AT2R bedeuten würde.

Die vermutete modulatorische Eigenschaft des AT2R auf den Blutdruck, wie in der Einleitung beschrieben, konnte somit im vorliegenden Tiermodell bestätigt werden.

4.2.2 AT2R-Aktivierung verbessert Glukose-Toleranz und Insulin-Sensitivität

Sowohl im GTT als auch im ITT konnte gezeigt werden, dass die HFD zu einer signifikanten Verbesserung der Glukoseintoleranz und IR führte. Dies stellte eine wichtige Voraussetzung für die metabolische Untersuchung im DIO-Modell dar. Sowohl die Behandlungen mit C21 und Valsartan als auch die Kombination beider Substanzen führten zu einer signifikanten Verbesserung der Glukosetoleranz (siehe 3.3.1). Die Kombination aus C21/Valsartan führte zu einer höheren Signifikanz in der Verbesserung der Glukosetoleranz im Vergleich zu den Mono-Behandlungen. Ausmaß und Effekt der Doppelintervention in das RAS waren im Vergleich zu den Mono-Behandlungen jedoch relativ gering. Somit weist die Doppelintervention wahrscheinlich keinen synergistischen Effekt gegenüber den Einzelbehandlungen bezüglich der Glukosetoleranz auf. Der periphere Vasodilatator Hydralazin hatte zwar einen tendenziellen, aber nicht signifikanten Einfluss auf die Glukosetoleranz. Die Spezifität der Effekte konnte in den AT2R-KO Mäusen bestätigt werden. Interessanterweise verliert auch Valsartan seinen Effekt in den KO-Tieren. Somit scheint der AT2R - möglicherweise durch indirekte Aktivierung[161] - an den Effekten des ARBs beteiligt zu sein.

Die periphere Insulin-Sensitivität im ITT wurde hingegen nur in der mit C21 behandelten Gruppe verbessert (siehe 3.3.2). Durch den AT2R-Agonismus konnte die Insulinempfindlichkeit auf annähernd physiologisches Niveau der LFD Kontroll-Tiere verbessert werden. Basierend auf einer anderen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe

von *Schupp et al.* könnte das Ausmaß des Effektes auf die Insulinempfindlichkeit von C21 sogar mit dem des oralen Antidiabetikums Pioglitazon verglichen werden[158].

Die Arbeit *Yvan-Charvet et al.* beschreibt auch hier konträres zur vorliegenden Arbeit. Hier wiesen adipöse AT2R-KO Mäuse im DIO-Modell jeweils eine verbesserte Glukose-Toleranz als auch eine erhöhte Insulin-Sensitivität im Vergleich zu den WT-Tieren auf[162]. Auf mögliche Ursachen für diese gegenteiligen Effekte wird in 4.2.9 genauer eingegangen.

Die Valsartan-Behandlung führte zu keiner Verbesserung der Insulinempfindlichkeit. Ähnliche Resultate wurden kürzlich von *Cole et al.* erzielt. Dort wurde beschrieben, dass Valsartan im Hochfett-Modell an Mäusen zwar die Glukosetoleranz verbessern konnte, dabei jedoch keinen signifikanten Effekt auf die periphere Insulinsensitivität besaß[207]. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert der Autor, indem er eine direkte glukose-induzierte Steigerung der pankreatischen Insulinproduktion durch die Valsartan-Behandlung zeigen konnte. In der Kombinationsgruppe wird der positive Effekt von C21 durch Valsartan wieder aufgehoben. Anscheinend hat die AT1R-Blockade durch Valsartan im vorliegenden Modell einen negativen Einfluss auf die periphere Insulinantwort. Denkbar wäre ein funktioneller bzw. physiologischer Antagonismus[92] auf die Insulin-Signaltransduktion der peripheren Organe (siehe 1.4.6.3).

Insgesamt führte der AT2R-Agonismus mit der Substanz C21 in insulinresistenten und glukoseintoleranten adipösen Mäusen - jeweils unter Ausbleiben der Effekte in den AT2R-KO Tieren - zu einer signifikanten Verbesserung der Insulinempfindlichkeit und Glukosetoleranz. Die Effekte der AT1R-Blockade schienen in einer indirekten AT2R-Aktivierung bedingt zu sein. Gleichzeitig schienen dabei die AT2R-vermittelten Effekte weitestgehend blutdruckunabhängig zu sein, denn Hydralazin hatte keine signifikanten Effekte, weder im GTT noch im ITT.

4.2.3 AT2R reguliert das Köpergewicht

Während der Fütterungsphase (siehe 3.2.1) wiesen die HFD-gefütterten AT2R-KO Tiere nach ungefähr sechs Wochen ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu den HFD WT-Tieren auf. Dabei konnte kein Unterschied in der Futteraufnahme bzw. Kalorienzufuhr zwischen den Genotypen festgestellt werden. Auch bei der Untersuchung der

Körperzusammensetzung konnte bei den AT2R-KO Tieren nur ein tendenziell erhöhter Körperfettanteil sowie eine tendenziell erhöhte fettfreie Masse ermittelt werden. Signifikanzen zwischen den Fettkompartimenten wurden ebenfalls nicht erreicht. Das Nichtüberschreiten der Signifikanzschwellen könnte darin begründet liegen, dass während der Fütterungsphase alle Körpergewichte der AT2R-KO Tiere (n=30) für den Phäntotypvergleich zu den HFD WT-Tieren (n=50) berücksichtigt wurden. Nach Aufteilung in die Subgruppen wurden dahingegen jeweils n=10 Tiere der jeweiligen Behandlungsgruppe untersucht. Gleiches wäre auch für die C21-Behandlungsgruppe denkbar, in welcher ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das Körpergewicht ermittelt werden konnte. *Schupp et al.* aus unserer Arbeitsgruppe konnten in einem ähnlichen DIO-Modell an Mäusen zeigen, dass der ARB Telmisartan - neben einer Verbesserung der Glukosetoleranz und Insulinempfindlichkeit - zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichtes der Versuchstiere führte. Dies konnte auf eine signifikant reduzierte Körperfettmasse zurückgeführt werden[158]. Hierbei ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Effekte in der pleiotropen PPARγ-Aktivierung oder in der AT1R-Blockade bzw. indirekten AT2R-Aktivierung begründet liegen.

Absolut Gegenteiliges wird erneut in der Arbeit von *Yvan-Charvet et al* beobachtet, in welcher die AT2R-KO Mäuse nach etwa acht Wochen HFD ein signifikant reduziertes Körpergewicht bei gleichzeitig signifikant reduzierter gonadalen Fettmasse im Vergleich zu den WT-Tieren aufwiesen. Dabei konnte bei den AT2R-KO Mäusen eine reduzierte Futteraufnahme bzw. Kalorienzufuhr beobachtet werden[162] (siehe 4.2.9).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass der AT2R einen Einfluss auf das Körpergewicht zu haben scheint. Hierbei sollten zukünftige metabolische Studien diesen Effekt genauer untersuchen, um die Rolle des AT2R in der Körpergewichtsregulation detailierter zu charakterisieren.

4.2.4 AT2R-Stimulation führt zu positiver Adipozytokin-Regulation

Ausgehend von der objektiven Verbesserung der metabolischen Phänotypisierung und den Erkenntnissen der *in-vitro* Experimente wurden gezielt Adipozytokine bestimmt (siehe 3.4.1). Die Adiponektin-Serumspiegel waren in den C21-behandelten Tieren erhöht. Die AT1R-Blockade erhöhte die Spiegel nur tendenziell. In Übereinstimmung mit den *in-vitro* Daten lag keine erhöhte m-RNA Expression von Adiponektin im Fettgewebe der C21-behandelten Tiere

vor. Im Western Blot des Fettgewebes hingegen war eine deutlich erhöhte Adiponektin-Menge im Vergleich zur HFD Vehikel-Gruppe zu erkennen. Somit konnte gezeigt werden, dass die erhöhten Serum Adiponektin-Spiegel vermutlich aus einer erhöhten Induktion im Fettgewebe resultieren. Es ist also denkbar, dass die *in-vivo* Regulation des Adiponektins ebenfalls auf einem posttranskriptionalen Mechanismus beruht. So wird beschrieben, dass die Infusion von ANG II in Ratten zu einer Reduktion der Adiponektin-Produktion führt, ohne dabei die Transkription zu beeinflussen[216]. Eine aktuelle Arbeit von *Iwai et al.* beschreibt zudem, dass Mäuse mit einem AT2R-KO unter einer Hoch-Cholesterol-Diät zwar keine Änderung der Adiponektin mRNA im Fettgewebe wohl aber reduzierte Plasmaspiegel aufwiesen, was eine posttranskriptionale Rolle des AT2R nochmals unterstreichen würde[217]. Die tendenziell erhöhte mRNA-Expression des Adiponektins im Fettgewebe der mit Valsartan-behandelten Tieren passt ebenfalls zu den leicht erhöhten Adiponektin-Mengen im Western Blot bzw. zu tendenziell erhöhten Serumspiegeln dieser Gruppe. Die Tendenzen auf die Adiponektin-Mengen könnten in der Kombination von indirekter AT2R-Aktivierung und AT1R-Blockade-vermittelter Inhibition von NF-κB mit positiver Folge auf die Adiponektin-Transkription begründet liegen[218].

Bestimmt wurde die Gesamt-Adiponektinmenge (30 kD) sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*. In der Einleitung wurde auf die unterschiedlichen zirkulierenden Formen des Adiponektins (LMW-, MMW- und HMW-Form) eingegangen, die durch Oligomerisierung entstehen. Welche molekulare Form die größte biologische Wirksamkeit besitzt, ist noch nicht vollständig geklärt. So gibt es Vermutungen darüber, dass nicht die absolute Adiponektinmenge, sondern das Verhältnis aus HMW- zur LMW-Fraktion entscheidend für die anti-inflammatorischen und Insulin-sensitivierenden Eigenschaften ist. Hierbei korreliert die HMW-Form, als biologisch aktive Form, besserer mit der Insulinempfindlichkeit[219,220]. Eine aktuelle Arbeit widerlegt diese Hypothese und zeigt auf, dass sowohl die HMW-Form als auch die absolute Adiponektinmenge gleichermaßen mit der Verbesserung der Insulinempfindlichkeit korrelieren[221]. Somit kann die Bestimmung des gesamten Adiponektins in der vorliegenden Arbeit als Parameter für die Verbesserung der Insulinempfindlichkeit herangezogen werden. Für Adiponektin ist darüber hinaus gezeigt worden, dass es die Produktion von NO steigert, was zusätzlich die moderaten Effekte von C21 auf den Blutdruck erklären könnte[216].

Die Plasmaspiegel der pro-inflammatorischen Adipozytokine Leptin und Resistin konnten ebenfalls durch die C21-Behandlung in den Tieren AT2R-spezifisch reduziert werden. Leptin wurde durch die AT1R-Blockade tendenziell und Resistin signifikant reduziert. Beide Effekte blieben in den AT2R-KO Tieren aus, was wiederum auf eine Beteiligung des AT2R durch indirekte Aktivierung mittels Valsartan hindeutet. Im zentralen Nervensystem hemmt Leptin den Appetit über die Regulation von Neuropeptid Y, Melanozyten stimulierende Hormon (MSH) und Proopiomelanocortin (POMC). Wie in der Einleitung beschrieben, weisen adipöse Menschen - entsprechend der erhöhten Fettmasse - sehr hohe Plasmaspiegel an Leptin auf, ohne dabei die zu erwartenden anorektischen Begleiteffekte zu besitzen[68].

Unter der Annahme, dass sich der Hauptwirkort für den appetitreduzierenden Effekt zentral im Hypothalamus befindet, könnte somit die Wirkungsvermittlung in Folge eines verminderten Übertrittes durch die Blut-Hirn-Schranke gestört sein. Auch eine reduzierte Signaltransduktion im Sinne einer zentralen Leptinresistenz wird diskutiert[222]. Somit wäre auch die periphere Leptinregulation ohne größeren Einfluss auf das Futterverhalten zu erklären, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde.

4.2.5 AT2R-Stimulation reguliert die Inkretine GLP-1 und GIP

GLP-1 (*Glucagon like peptide 1*) wird in den L-Zellen und GIP (*Glucose-dependent insulinotropic peptide*) in den K-Zellen des Dünndarms synthetisiert und dort granulär gespeichert. Nach Glukoseaufnahme werden diese exozytotisch freigesetzt. Beide Inkretine führen zur Verstärkung der Insulinsekretion aus β-Zellen bzw. zur Senkung der Glucagonproduktion der α-Zellen des Pankreas[223]. Für das GLP-1 werden zusätzliche Effekte wie die Senkung der TG und FFS, der Reduzierung des Hungergefühls und der Steigerung der Insulinsensitivität angenommen[224]. Beide Inkretine werden relativ rasch, im Minutenbereich, durch das Enzym Dipeptyl-Peptidase-4 (DPP-4) abgebaut. Patienten mit T2DM haben reduzierte Inkretin-Effekte bzw. Störungen der Inkretin-Sekretion[225].

Seit 2007 ist das GLP-1 Mimetikum Exenatide zur Injektion (Byetta®, nur in Kombination mit Metformin oder Sulfonylharnstoff) und die beiden oralen DPP-4-Inhibitoren Sitagliptin (Januvia®, Xelevia®) und Vildagliptin (Galvus®) in der EU zur Behandlung des T2DM zugelassen. Hinzu kamen 2009 der DPP-4 Inhibitor Saxagliptin (Onglyza®) und Liraglutid

als Inkretin-Mimetikum (Victoza®). Die Arzneimittel sind im Allgemeinen gut verträglich und weisen bezüglich Hypoglykämien bzw. der Entwicklung von iatrogener Gewichtszunahme ein günstigeres Nebenwirkungsprofil auf als Glinide, Sulfonylharnstoffe und Glitazone[226].

In der vorliegenden Arbeit konnten die Serumspiegel von GLP-1 und GIP durch C21-Behandlung WT-spezifisch und signifikant gegenüber der Vehikel HFD-Gruppe angehoben werden (siehe 3.4.2). Die reine AT1R-Blockade hatte dabei keinen Einfluss auf die Inkretin-Regulation. Gleichzeitig findet man in der Literatur Hinweise auf das Vorhandensein einer GLP-1R / AT1R-Achse, welche einen direkten Einfluss auf die pankreatische β-Zellfunktion ausübt[227]. Die genauen Mechanismen dieser Interaktion sind allerdings bis heute unbekannt.

Über einen Zusammenhang des AT2R und der Inkretin-Regulation ist bisher ebenfalls relativ wenig bekannt. Eine Arbeit von *Kim Chung et al.* beschreibt, dass die Behandlung von 3T3-L1 Zellen mit dem GLP-1 Agonist Exendin-4 zu einer Erhöhung der Adiponektin-mRNA und -Freisetzung führte. Außerdem wurde die Reduktion der IL-6 und MCP-1 mRNA-Expression beobachet[228]. *In-vivo* konnte kürzlich in einer anderen Arbeit eine konzentrationsabhänge Induktion von Adiponektin bzw. Reduktion von Leptin-Plasmaspiegeln im DIO-Modell an Mäusen durch die Injektion des nicht-peptidischen GLP-1 Rezeptor Agonisten Boc5 beobachtet werden[229]. Zudem gibt es eindeutige klinische Hinweise auf eine negative Korrelation zwischen GLP-1 und Adipositas, T2DM sowie systemischer Inflammation[230,231].

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse könnte somit ein Zusammenhang sowohl zwischen den anti-inflammatorischen Effekten als auch der Regulation von Adiponektin bzw. Leptin und der Inkretinregulation der vorliegenden Arbeit hergestellt werden.

4.2.6 AT2R-Aktivierung führt zu lokaler und systemischer Anti-Inflammation

Die in den Zellmodellen gesammelten Ergebnisse zur anti-inflammatorischen Wirkung von C21 konnten *in-vivo* bestätigt werden. Die Serumspiegel von IL-6 und TNF-α wurden durch die selektive AT2R-Aktivierung jeweils auf das Niveau der LFD-Kontrolltiere gesenkt. Der Effekt von C21 auf das IL-6 war hier nur als starker Trend zu beobachten (siehe 3.4.3). Hier

könnte eine nicht optimale zeitliche Ausrichtung der Diät für diesen Marker im Serum als Ursache in Betracht gezogen werden, denn die HFD Vehikel-Tiere besaßen keine signifikant erhöhten Spiegel an IL-6. Dieser Punkt wird abschließend in der Kritik am Tiermodell und der Übertragbarkeit auf den Menschen (4.2.9) aufgegriffen. Ferner korrelieren CRP bzw. IL-6 Plasmaspiegel, wie in der Einleitung beschrieben, zwar mit der Vorhersagbarkeit der Entwicklung eines T2DM[44,45], sind aber nicht direkt geeignet, um die anti-inflammatorische Potenz einer Substanz zu bewerten. Lokale Inflammationsprozesse, die bei der Adipositas in den Organen wie Leber, Muskel und Fettgewebe stattfinden, korrelieren somit nicht zu jedem Zeitpunkt der Pathophysiologie der IR mit zirkulierenden Parametern[232,233]. Lokal im Fettgewebe konnte jedoch eine AT2R-vermittelte Reduktion von IL-6 und TNF-α bestätigt werden. Der starke anti-inflammatorische Effekt von Valsartan war auch hier in den AT2R-KO Tieren gänzlich aufgehoben.

Auch andere Tierversuche an der Maus konnten dem AT2R anti-inflammatorische Effekte nachweisen. *Hu et al.* beschrieben dies an einem Atherosklerose-Modell an LDLR-KO Mäusen. Die LDLR-KO Mäuse, in denen mittels Injektion eines Adenovirus (AAV/AT2R) der AT2R überexprimiert wurde, wiesen eine deutlich reduzierte Atherosgenese der Gefäße mit geringerer Expression der extrazellulären Superoxid-Dismutase (ecSOD) und anderen Markern von oxidativem Stress auf[234]. Diese Effekte stehen in einem direkten Zusammenhang mit einer verringerten NF-κB Aktivität[235].

In der Arbeit von *Wu et al.* wiesen AT2R-KO Mäuse in einem Modell der Manschetten-induzierten Gefäßverletzung höhere Expressionen der pro-inflammatorischen Marker MCP-1, TNF-α, IL-1 und IL-6 - verbunden mit einer höheren Infiltration von Makrophagen - im Vergleich zu ihren WT-Tieren auf. Gleichzeitig war die reduzierte Neointima-Bildung und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen durch die Behandlung mit Valsartan in den AT2R-KO Mäusen weniger ausgeprägt[236]. Diese indirekte AT2R-Aktivierung, vermittelt durch AT1-Blockade, konnte ebenfalls in einem Modell von *Okada et al.* beobachtet werden. In einem Glomerulonephritis-Modell an SJL-Mäusen führte die Behandlung mit dem AT1R-Blocker CGP-48933 zu einer signifikanten Reduktion der MCP-1 mRNA-Expression in den Epithelzellen der Niere, während dieser Effekt unter gleichzeitiger AT2R-Blockade durch PD123319 wieder aufgehoben wurde[237].

Ein weiteres Tiermodell mit transgenen Mäusen von *Benndorf et al.* bestätigt die anti-inflammatorische Eigenschaft des AT2R. Hier wiesen AT2R-KO Tiere nach renaler Ablation erhöhte Expressionen pro-inflammatorischer Marker in der Rest-Niere auf[238].

Dem gegenüber beschreibt eine andere Arbeit von *Yvan-Charvet et al.* erneut gegenteilige Effekte. So zeigten transgene Mäuse, welche eine AGT-Überesspression aufwiesen (OVEX-Mäuse), erhöhte mRNA-Expressionen von TNF-α, IL-1β und IL-6 im gonadalen Fettgewebe im Vergleich zu WT-Mäusen. OVEX-Mäuse mit zusätzlichem AT2R-KO (KOVEX-Mäuse) wiesen in ihrem Fettgewebe jeweils signifikant reduzierte Expressionen der pro-inflammatorischen Marker im Vergleich zu den OVEX Mäusen auf[163]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen somit im direkten Gegensatz sowohl zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit als auch zu den oben beschriebenen Modellen und weisen dem AT2R pro-inflammatorische Eigenschaften zu.

Die *in-vitro* beobachtete Induktion von IL-10 der vorliegenden Arbeit konnte sowohl im Serum als auch im Fettgewebe bestätigt werden. Wie in 4.1.3 erläutert, könnte diese Induktion mit der des Adiponektins in Zusammenhang gebracht werden und, zumindest teilweise, an den anti-inflammatorischen Effekten beteiligt sein. Darüber hinaus könnte ein Polarisationswechsel von M1 zu M2 Makrophagen durch das Adiponektin an den anti-inflammatorischen Effekten beteiligt sein[59].

4.2.7 AT2R-Stimulation reduziert Triglyzeride

Die Serum-TG wurden WT-spezifisch durch den AT2R-Agonismus reduziert (siehe 3.5.1). Dies wäre zum einen mit der gezeigten Verbesserung der Insulinempfindlichkeit zu erklären, welche mit einer Steigerung der Aktivität des Transportproteins Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT-1) und einer Verbesserung der mitochondrialen β-Oxidation und deren Kapazität mit der Folge der Senkung von TG-Spiegeln einhergeht[41,239]. Des Weiteren konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass Adiponektin-Plasmaspiegel negativ mit TG-Spiegeln korrelieren[240]. Adiponektin senkt die Plasmaspiegel wahrscheinlich über eine erhöhte TG-Clearance durch Induktion der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und PPARα mit folgender Steigerung der β-Oxidation[241]. So führen ebenfalls orale Antidiabetika wie Metformin und die Glitazone über eine Aktvierung der AMPK - in der Folge der

Hemmung wichtiger Enzyme der TG-Synthese wie der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und der HMG-CoA-Reduktase - zu einer Reduktion von TG[242]. Für Inkretine werden ebenfalls TG-senkende Eigenschaften beschrieben, die wahrscheinlich in der Fähigkeit der erhöhten TG-Speicherung des Fettgewebes begründet liegen[224]. Eine Erklärung für die beobachtete Regulation des AT2R auf die Serum-TG könnte also in diesen Effekten begründet liegen.

Die histologischen Untersuchungen der Leber zeigten repräsentativ in der C21-Behandlungsgruppe eine leichte Reduktion der nahrungsbedingten Hepato-Steatose (siehe 3.5.2.1). Die quantifizierten TG zeigten hingegen nur eine tendenzielle Reduktion des hepatischen TG-Gehaltes durch die Behandlung mit C21 (siehe 3.5.2.2). Signifikanz wurde nicht erreicht. Somit wäre wahrscheinlich nicht nur die erhöhte TG-Clearance der Leber allein für die Senkung der Serum-TG verantwortlich.

Andereseits wurden für die histologischen Untersuchungen jeweils Leberabschnitte aus n=3 Tieren der jeweiligen Behandlungsgruppen untersucht. Zudem wurde für die Quantifizierung des Leber TG-Gehaltes, wie in 2.2.10 beschrieben, nur 100 mg des gleichen Leberabschnittes der Tiere untersucht. Unterschiedliche Fetteinlagerungsformen wie der schütter-disseminierten oder zonalen Steatose sowie weitere Übergangsformen wurden hierbei unter Umständen nicht repräsentativ erfasst[243]. Dies könnte eine Erklärung für die Disparitäten liefern.

4.2.8 C21 und Selektivität für den AT2R

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte *in-vitro* Konzentration der Substanz C21 von 1 µM[130] sowie die *in-vivo* Dosierung von 0,3 mg/kg KG[107] ist aus vorherigen Studien mit der Substanz übernommen worden. Die Selektivität der Substanz wird, wie in 1.5.6 beschrieben, mit einer Dissoziationskonstanten (Ki) von 0,4 nM für den AT2R bzw. >10 µM für den AT1R beschrieben[128]. Somit besitzt die Substanz eine etwa 25.000-fach höhere Affinität für den AT2R. Diese hohe Selektivität der Substanz wurde zudem kürzlich in weiteren Bindungsstudien an AT1R- bzw. AT2R-transfizierten HEK-293 Zellen durch *Bosnyak et al.* bestätigt[244]. Ein Nachweis auf die AT2R-spezifischen Effekte durch die Substanz sollte durch den *in-vitro* Einsatz des AT2R-Blockers PD123319 erbracht werden. Die Konzentration der Substanz betrug 10 µM, welches ebenfalls der Literatur entnommen wurde[130].

Der AT2R-Blocker besitzt ebenfalls eine relativ hohe Affinität für den AT2R (Ki von 12 nM für AT2R bzw. >100µM für den AT1R)[127]. Der gezielte Einsatz von PD123319 führte in den 3.1 beschriebenen Ergebnissen sowohl in den Adipozyten als auch in den Makrophagen zum Ausbleiben der Effekte von C21. Des Weiteren dienten die AT2R-KO als *in-vivo* Referenz für die Spezifität der Substanz C21 für den AT2R. Dabei führte der Einsatz der Substanz C21 in den KO-Tieren fortwährend zum Ausbleiben der Effekte, die in den WT-Tieren zu beobachten waren.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Effekte der vorliegenden Arbeit AT2R-spezfisch sind. Gleichzeitig konnten die in 1.5.6.1 beschriebenen Studien zur Selektivität der Substanz C21 für den AT2R bestätigt werden. Trotz der eindeutigen Datenlage zur Substanz kann hierbei ein pleiotroper Effekt nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

4.2.9 Limitierung des Tiermodells und Übertragbarkeit auf den Menschen

Der Tierversuch der vorliegenden Arbeit dient der Untersuchung metabolischer Effekte nur als Modell der hypothesengetriebenen Grundlagenforschung. Die zeitliche Koordination spielt hierbei bei Stoffwechselprozessen eine wichtige Rolle. Einige Paramater in der vorliegenden Arbeit wurden nicht so quantifiziert und bestimmt, wie dies in einem optimal ausgelenkten Modell zu erwarten ist. Gleichzeitig können falsch positive Regulationen durch Bias und anderen Faktoren nicht immer ausgeschlossen werden. Aufgrund von interindividuellen Schwankungen und der limitierten Anzahl an Tieren sowie der Komplexität metabolischer Prozesse ist es zudem nicht immer möglich, die gewonnenen Erkenntnisse auf einen bestimmten Effekt herunter zu definieren. Auch der Vergleich zu anderen Zell- und Tiermodellen ist daher mit einer gewissen Limitierung zu bewerten. Eine weitere Limitierung für den Vergleich zu anderen Modellen ist darin zu sehen, dass die vorliegende Arbeit erstmalig die AT2R-Aktivierung durch den Einsatz der Substanz C21 in einem Diät-induzierten Adipositas-Modell beschreibt.

In den Arbeiten von *Yvan-Charvet et al.* wurden zum Teil gegensätzliche Beobachtungen zur vorliegenden Arbeit bezüglich der Blutdruckregulation, der Glukose- und Insulintoleranz sowie der Körpergewichtsregulation gemacht[162,163]. Gründe hierfür könnten, wie schon angesprochen, in der unterschiedlichen Futterzusammensetzung der HFD liegen. Genaue

Angaben zum Alter der Mäuse werden zudem auch nicht gemacht. Darüber hinaus gibt es genetische Unterschiede zwischen den AT2R-KO Mäusen aus der Arbeit von *Yvan-Charvet*[245] zu den AT2R-KO Mäusen der vorliegenden Arbeit[164]. So werden beispielsweise für beide AT2R-KO-Modelle teilweise unterschiedliche phänotypische Eigenschaften beschrieben, die möglicherweise entscheidend für diese konträren Effekte sind[246]. Auf der anderen Seite lassen sich die meisten beobachteten Effekte der vorliegenden Arbeit sehr gut mit dem Großteil der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage zur Substanz C21 sowie zum AT2R in Einklang bringen und sind zudem in sich konklusiv.

Weiterhin ist wichtig zu betonen, dass die beschriebenen Beobachtungen, die am Modell der Maus gemacht wurden, unter Umständen nicht in gleicher Form und gleichem Ausmaß auf den Menschen übertragbar sind. Gleichzeitig zeigen aber beide Spezies bei kardiovaskulären Erkrankungen und Stoffwechselstörungen wie Diabetes relativ vergleichbare Krankheitsbilder[247]. Zudem kann für etwa 99% der murinen Gene ein Homolog im humanen Genom zugeordnet werden[248]. So findet man beispielsweise im Fettgewebe beider Spezies vergleichbare Expressionsmuster an Zytokinen sowie morphologische und funktionelle Gemeinsamkeiten[177,249,250]. Auch weitere grundlegende Prozesse des Fett-, Leber-, Muskel- und Glukosestoffwechsels sowie der Interaktion zwischen verschiedenen Organsystemen sind an der Maus gut erarbeitet und lassen sich mit Limitierung auf den Menschen übertragen[251].

4.3 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit konnte erstmalig zeigen, dass die spezifische Aktivierung des AT2R mit der Substanz C21 zur Verbesserung der Glukosetoleranz und Insulinempfindlichkeit in adipösen Mäusen führte. Als zentrale Effekte können hierbei die Reduktion der systemischen und lokalen Inflammation im Fettgewebe sowie der gleichzeitigen Erhöhung von Adiponektin - über die oben diskutierten möglichen Mechanismen - angenommen werden (siehe Abb. 4.2). Es bleibt zu erwähnen, dass die möglichen AT2R-abhängigen metabolischen Effekte und Mechanismen in Zukunft noch genauer sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* untersucht und charakterisiert werden müssen.

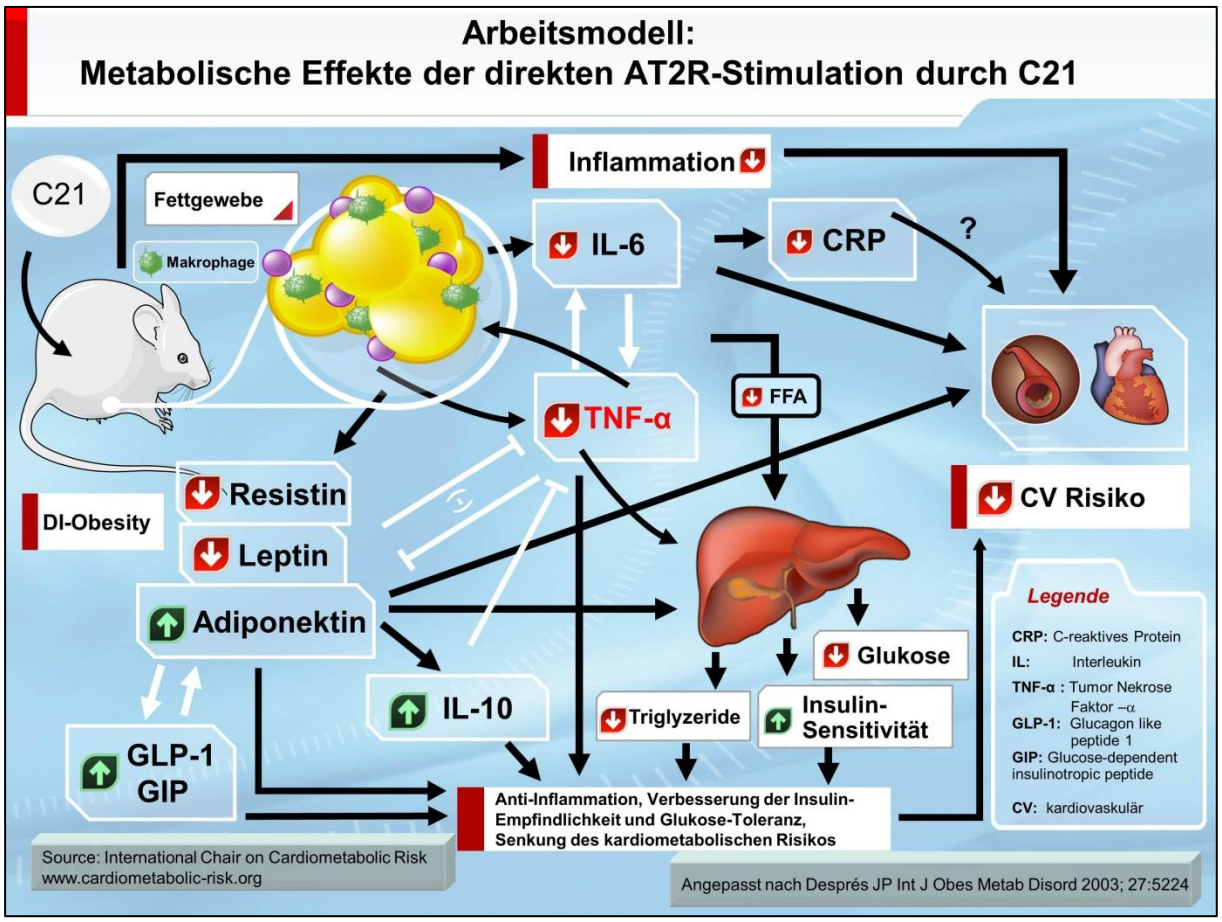

Abb. 4.2 Arbeitsmodell der hypothetischen *in-vivo* Regulation durch C21[252]

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten stark darauf hin, dass der AT2R eine wichtige positive metabolische Funktion in der Pathophysiologie der IR einnimmt. Aufgrund der vielversprechenden Datenlage der vorliegenden Arbeit könnten AT2R-Agonisten somit eine wichtige Therapieoption zur Behandlung des MS, des T2DM sowie von Adipositas-assoziierten Erkrankungen darstellen. Insbesondere durch die moderaten Blutdruck-Effekte könnten sich AT2R-Agonisten von AT1R-Blockern bei bestimmten Indikationen abgrenzen. Dabei sollten die zugrundeliegenden Mechanismen - insbesondere aufgrund der noch teilweise konträren Datenlage - weiter erforscht und die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in klinischen Studien am Menschen bestätigt werden. Die Substanz C21 könnte hierbei als wichtige Leitstruktur in der Entwicklung zukünftiger AT2R-Agonisten dienen.

5 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) stellt eines der wichtigsten Systeme zur Regulation der kardiovaskulären Homöostase und des Blutdruckes des Körpers dar. Das Angiotensin II übt dabei seine Effekte über zwei verschiedene Rezeptor-Subtypen, den AT1-Rezptor (AT1R) und den AT2-Rezeptor (AT2R), aus. Die Rolle des AT1R in der Entwicklung der Insulinresistenz (IR) ist weitestgehend untersucht und es ist bekannt, dass AT1R-Blocker (ARBs) die Glukoseintoleranz und Insulinempfindlichkeit verbessern. Einige ARBs sind zusätzlich in der Lage, partiell den Peroxisom-Proliferator-Aktivierten-Rezeptor-γ (PPARγ) zu aktivieren, was zusätzliche deren anti-inflammatorische Eigenschaften erklären könnte. Über die metabolische Rolle des AT2R ist relativ wenig bekannt, wobei diese zudem teilweise konträr diskutiert wird. Die vorliegende Arbeit soll daher die funktionelle Signifikanz des AT2R in der Entwicklung der IR und der Fettgewebsinflammation aufklären. Hierfür wurde der erste nicht-peptidische AT2R-Agonist Compound 21 (C21) bei *in-vitro* Zellmodellen mit 3T3-L1 Adipozyten und THP-1 Makrophagen sowie bei einem Diät-induzierten Adipositas (DIO)-Modell der Maus eingesetzt.

Die AT2R-Stimulation mit C21 (1 µM) reduzierte signifikant die TNF-α induzierte *in-vitro* Inflammation durch die Reduktion des IL-6 Proteins in differenzierten Adipozyten. Ausserdem wurde die Adiponektin Protein-Expression durch TNF-α Behandlung signifikant reduziert, während die Parallelbehandlung mit C21 die Spiegel des anti-inflammatorischen Adiponektins teilweise wiederherstellte. Die Effekte waren AT2R-spezifisch, da die Blockade des AT2R mit dem AT2R-Blocker PD123319 zum Verlust der C21-Effekte führte. Weiterhin führte die C21-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der basalen pro-inflammatorischen Leptin-Produktion sowie zu einer erhöhten anti-inflammatorischen IL-10 mRNA-Expression. Dabei besaß C21 (0,1 bis 1 µM) keinen Einfluss auf die PPARγ-Aktivität und induzierte folglich auch nicht die Adipozytendifferenzierung.

Die THP-1 Makrophagen wurden für die *in-vitro* Inflammation mit LPS behandelt. Dabei führte die Parallelbehandlung mit C21 zu einer signifikanten Reduktion von IL-6. Der Effekt blieb unter AT2-Blockade mit PD123319 aus. Weiterhin erhöhte C21 das basale IL-10 und reduzierte die LPS-induzierte MCP-1 mRNA-Expression.

Für das DIO-Modell wurden Wild-Typ (WT; C57Bl-6) und AT2R-Knockout (AT2R-KO) Mäuse entweder mit einer Hochfett-Diät (HFD) oder einer Kontroll-Niedrigfett-Diät (LFD) (60% kcal aus Fett bzw. 10% kcal aus Fett) zur Induktion einer Adipositas und metabolischer Veränderungen über 10 Wochen gefüttert. Anschließend wurden die Tiere (n=10 pro Gruppe) nach folgendem Protokoll zusätzlich zur Diät über 4 Wochen behandelt: Der AT2R-Agonist C21 (0,3 mg/kg KG i.p.), der ARB Valsartan (3 mg/kg KG i.p.), die Kombination C21 / Valsartan (0,3 / 3 mg/kg KG i.p.), das Antihypertonikum Hydralazin (250 mg/L im Trinkwasser) oder Vehikel. Die Glukosetoleranz (GT) und Insulinempfindlichkeit (IS) wurde mit Standard-GTTs und -ITTs bestimmt.

Die HFD reduzierte signifikant die GT und IS, wobei diese jeweils durch die C21-Behandlung signifikant verbessert werden konnten. Die GT wurde ebenfalls durch die Valsartan-Behandlung verbessert. Des Weiteren führte die C21-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion von TNF-α, Resistin und der Triglyzeride im Serum sowie zu einer Erhöhung der insulin-sensitivierenden Inkretine GLP-1 und GIP. In Übereinstimmung mit den *in-vitro* Ergebnissen wurden ebenfalls die Adiponektin und IL-10 Serumspiegel durch C21-Behandlung jeweils signifikant erhöht bzw. die Leptin-Spiegel signifikant reduziert. Dabei waren die Effekte AT2R-spezifisch, denn alle Effekte konnten nicht in den AT2R-KO Mäusen beobachtet werden. Die anti-inflammatorischen Effekte von C21 konnten zudem lokal im Fettgewebe der Mäuse bestätig werden.

C21 reduzierte leicht und Valsartan stark den Blutdruck der HFD-Gruppen, während die Effekte in den AT2R-Tieren abgeschwächt waren. Die metabolischen Effekte schienen dabei Blutdruck-unabhängig zu sein, wie durch die Hydralazin-Kontrolle ermittelt werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auf, dass die selektive und direkte AT2R-Stimulation zu anti-inflammatorischen Effekten sowie zu einer positiven Modulation von metabolischen Parametern sowohl im DIO-Modell an Mäusen als auch in entsprechenden *in-vitro* Experimenten an Adipozyten und Makrophagen führte. Demnach deuten diese Ergebnisse sehr stark darauf hin, dass der AT2R eine wichtige positive metabolische Funktion ausübt und ein mögliches pharmakologisches Ziel für die Behandlung von Adipositas-induzierten Erkrankungen darstellen könnte. Hierfür könnten AT2R-Agonisten in Zukunft eine Therapieoption bieten.

6 Summary

The renin-angiotensin-system (RAS) is one oft the most important regulator of cardiovascular homeostasis and blood pressure in the body. Angiotensin II exerts its effects through two different receptor subtypes: the AT1-receptor (AT1R) and the AT2-receptor (AT2R). The functional role of the AT1R in the development of insulin-resistance (IR) is well understood and it is known that AT1R-blockers (ARBs) improve glucose-intolerance and IR. Some of the ARBs were shown to activate the peroxisome-proliferator-activated-receptor-γ (PPARγ) partially, which may explain their anti-inflammatory properties. The metabolic contribution of the AT2R is still not clear and in parts controversial. Thus, this study aimed to determine the functional significance of the AT2R for the development of IR and adipose-tissue inflammation using the first non-peptide AT2R-agonist Compound 21 (C21) in *in-vitro* cell-models with 3T3-L1 adipocytes and THP-1 macrophages as well as in a diet-induced obesity (DIO) mouse model.

AT2R-stimulation with C21 (1 µM) significantly reduced TNF-α induced *in-vitro* inflammation by IL-6 protein-reduction in mature adipocytes. Anti-inflammatory adiponectin protein-expression was strongly reduced in adipocytes by TNF-α treatment, but partly restored by co-treatment with C21. These effects were due to specific AT2R-activation, since treatment with the AT2R-antagonist PD123319 (10 µM) abolished the effect of C21. Treatment with C21 also led to a significant reduction of basal pro-inflammatory leptin-production and increased anti-inflammatory IL-10 mRNA-expression in adipocytes. Importantly, C21 (0,1 to 1 µM) did not induce PPARγ-activity and consequently did not induce adipocyte differentiation.

THP-1 macrophages were treated with LPS for *in-vitro* inflammation. Co-treatment with C21 significantly repressed LPS-induced IL-6 protein. This effect was again abolished by PD123319 treatment. C21 treatment also increased basal IL-10 and decreased LPS-induced MCP-1 mRNA-expression.

For the DIO-model wildtype (WT; C57Bl-6) and AT2R-knockout (AT2R-KO) mice were fed with high fat diet (HFD) or control low fat diet (LFD) (60% kcal from fat or 10% kcal from fat, respectively) for 10 weeks to induce obesity and metabolic changes. Afterwards animals (n=10 per group) were treated according to the following protocol for 4 weeks in addition to

the diet: The AT2R-agonist C21 (0.3 mg/kg body weight (BW) i.p.), the ARB Valsartan (3 mg/kg BW i.p.), the combination C21 / Valsartan (0.3 / 3 mg/kg BW i.p.), the antihypertensive agent Hydralazine (250 mg/l drinking water) or vehicle. Glucose tolerance (GT) und insulin sensitivity (IS) were measured by standard ITT and GTT tests.

GT and IS were impaired by HFD-feeding but significantly improved in mice treated with C21. GT was also improved by Valsartan. Furthermore, TNF-α, resistin and serum triglycerides levels were significantly reduced, and serum levels of insulin-sensitizing incretins GLP-1 and GIP were increased by C21-treatment. Consistent with the *in-vitro* data, C21 treatment increased adiponectin as well as IL-10, and decreased leptin serum levels in a significant manner. Importantly, all effects were not observed in AT2R-KO animals treated with C21 pointing to the AT2R-specificity of these effects. Additionally the anti-inflammatory effects of C21 could be confirmed locally in the adipose-tissue of the mice.

C21 slightly and Valsartan strongly lowered blood-pressure in mice of the HFD groups, while these effects were attenuated in the AT2R-KO animals. However, metabolic effects of C21 and Valsartan were blood pressure-independent as controlled for by the Hydralazine treated group.

The present study demonstrates that selective and direct AT2R-stimulation results in anti-inflammatory actions as well as positive modulation of metabolic markers in a DIO-model in mice and related *in-vitro* experiments in adipocytes and macrophages. Thus, these data strongly indicate that the AT2R has an important positive metabolic function suggesting that the AT2R might be a pharmacological target for treatment of obesity-induced metabolic diseases. AT2R-agonists may be a theurapeutic option in the future.

7 Literaturverzeichnis

1. Khanam, M.A. *et al.* The Metabolic Syndrome: Prevalence, Associated Factors, and Impact on Survival among Older Persons in Rural Bangladesh. *PLoS ONE* 6, e20259 (2011).
2. Magliano, D.J., Shaw, J.E. & Zimmet, P.Z. How to best define the metabolic syndrome. *Ann. Med* 38, 34-41 (2006).
3. Day, C. Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 4, 32-38 (2007).
4. Ford, E.S., Li, C. & Zhao, G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes* 2, 180-193 (2010).
5. Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G. & Shaw, J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J. Atheroscler. Thromb* 12, 295-300 (2005).
6. Eddy, D.M., Schlessinger, L. & Heikes, K. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: implications for clinical practice. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 2, S5-10 (2008).
7. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894, i-xii, 1-253 (2000).
8. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 854, 1-452 (1995).
9. Friedman, J.M. A War on Obesity, Not the Obese. *Science* 299, 856 -858 (2003).
10. Kissebah, A.H. & Krakower, G.R. Regional adiposity and morbidity. *Physiol. Rev* 74, 761-811 (1994).
11. Lean, M.E., Han, T.S. & Morrison, C.E. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ* 311, 158-161 (1995).
12. Cottam, R. Obesity and culture. *The Lancet* 364, 1202-1203 (2004).
13. IASO | Obesity the Global Epidemic. auf <http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>
14. Hauner, H. *et al.* Overweight, obesity and high waist circumference: regional differences in prevalence in primary medical care. *Dtsch Arztebl Int* 105, 827-833 (2008).
15. Vital signs: state-specific obesity prevalence among adults --- United States, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep* 59, 951-955 (2010).
16. Obesity and Overweight for Professionals: Data and Statistics: U.S. Obesity Trends | DNPAO | CDC. auf <http://www.cdc.gov/obesity/data/trends.html>
17. Must, A. *et al.* The Disease Burden Associated With Overweight and Obesity. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 282, 1523 -1529 (1999).
18. Hauner, H. [Options of adiposity treatment]. *Internist (Berl)* 52, 374, 376-378, 380-382 (2011).
19. RoteListe® -Präparate-. auf <http://www.rote-liste.de/Online/jumpsearch>
20. Stumvoll, M., Goldstein, B.J. & van Haeften, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* 365, 1333-1346 (2005).
21. Bergman, R.N. & Ader, M. Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11, 351-356 (2000).
22. Kahn, S.E. *et al.* Importance of Early Phase Insulin Secretion to Intravenous Glucose Tolerance in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 5824 -5829 (2001).

23. Alberti, K.G. & Zimmet, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med* 15, 539-553 (1998).

24. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1, S5-20 (2003).

25. Scherbaum, W.A. *et al.* Diagnosis, Treatment and Follow-up of Diabetes mellitus in the Elderly. *Evidence-based Guideline by the German Diabetes Association and the German Geriatric Society* (2006).

26. Matthaei, S. *et al.* Medical antihyperglycaemic treatment of type 2 diabetes mellitus: update of the evidence-based guideline of the German Diabetes Association. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 117, 522-557 (2009).

27. PL_DDG2010_Klassifikation.pdf. auf <http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/PL_DDG2010_Klassifikation.pdf>

28. Hauner, H. & Scherbaum, W.A. [Diabetes mellitus type 2]. *Dtsch. Med. Wochenschr* 127, 1003-1005 (2002).

29. Danaei, G. *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *The Lancet* 378, 31-40 (2011).

30. Janka, H.U. *Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland*. (Foglio Medien GmbH: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinie DDG, 2000).

31. Diabetes estimates excel tables | International Diabetes Federation. auf <http://www.idf.org/node/23640>

32. Rathmann, W. *et al.* High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 46, 182-189 (2003).

33. CDC - Diabetes Public Health Resource - Data & Trends. auf <http://www.cdc.gov/diabetes/statistics/index.htm>

34. Unwin, N., Shaw, J., Zimmet, P. & Alberti, K.G.M.M. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet. Med* 19, 708-723 (2002).

35. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. *Lancet* 354, 617-621 (1999).

36. Hu, F.B. *et al.* Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N. Engl. J. Med* 345, 790-797 (2001).

37. Groop, L. Genetics of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr* 83 Suppl 1, S39-48 (2000).

38. Olefsky, J.M. & Glass, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol* 72, 219-246 (2010).

39. Miller, R.S., Diaczok, D. & Cooke, D.W. Repression of GLUT4 expression by the endoplasmic reticulum stress response in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 188-192 (2007).

40. Zeyda, M. & Stulnig, T.M. Adipose tissue macrophages. *Immunology Letters* 112, 61-67 (2007).

41. Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* 118, 2992-3002 (2008).

42. Perseghin, G. *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* 48, 1600-1606 (1999).

43. Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H. & Harris, T.B. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 282, 2131-2135 (1999).

44. Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E. & Ridker, P.M. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 286, 327 -334 (2001).

45. Shoelson, S.E., Herrero, L. & Naaz, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180 (2007).

46. Kershaw, E.E. & Flier, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 2548 -2556 (2004).

47. Wang, P., Mariman, E., Renes, J. & Keijer, J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J. Cell. Physiol* 216, 3-13 (2008).

48. Piñeiro, R. *et al.* Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Letters* 579, 5163-5169 (2005).

49. Delaigle, A.M., Jonas, J.-C., Bauche, I.B., Cornu, O. & Brichard, S.M. Induction of Adiponectin in Skeletal Muscle by Inflammatory Cytokines: in Vivo and in Vitro Studies. *Endocrinology* 145, 5589 -5597 (2004).

50. Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Walsh, K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr. Opin. Lipidol* 14, 561-566 (2003).

51. Tilg, H. & Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772-783 (2006).

52. Ryo, M. *et al.* Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J* 68, 975-981 (2004).

53. Hotta, K. *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 20, 1595-1599 (2000).

54. Ouchi, N. *et al.* Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue. *Circulation* 107, 671 -674 (2003).

55. Fasshauer, M. *et al.* Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 1045-1050 (2003).

56. Maeda, N. *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8, 731-737 (2002).

57. Yamaguchi, N. *et al.* Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett* 579, 6821-6826 (2005).

58. Wolf, A.M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B. & Tilg, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 323, 630-635 (2004).

59. Ohashi, K. *et al.* Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 285, 6153 -6160 (2010).

60. Berg, A.H., Combs, T.P. & Scherer, P.E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab* 13, 84-89 (2002).

61. Bełtowski, J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med. Sci. Monit* 9, RA55-61 (2003).

62. Maeda, N. *et al.* PPARγ Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. *Diabetes* 50, 2094 -2099 (2001).

63. Himms-Hagen, J. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci* 36, 575-655 (1999).

64. Gainsford, T. *et al.* Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14564 -14568 (1996).

65. Santos-Alvarez, J., Goberna, R. & Sánchez-Margalet, V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell. Immunol* 194, 6-11 (1999).

66. Aleffi, S. *et al.* Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 42, 1339-1348 (2005).

67. Pérez, C. *et al.* Leptin Impairs Insulin Signaling in Rat Adipocytes. *Diabetes* 53, 347 -353 (2004).

68. Friedman, J.M. & Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770 (1998).

69. Steppan, C.M. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312 (2001).

70. Savage, D.B. *et al.* Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50, 2199-2202 (2001).

71. Silswal, N. *et al.* Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-[alpha] and IL-12 in macrophages by NF-[kappa]B-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 1092-1101 (2005).

72. Kaser, S. *et al.* Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 309, 286-290 (2003).

73. Zhang, J.-L., Qin, Y.-W., Zheng, X., Qiu, J.-L. & Zou, D.-J. Serum resistin level in essential hypertension patients with different glucose tolerance. *Diabet. Med* 20, 828-831 (2003).

74. Olefsky, J.M. IKKepsilon: a bridge between obesity and inflammation. *Cell* 138, 834-836 (2009).

75. Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest* 112, 1785-1788 (2003).

76. Lumeng, C.N., Bodzin, J.L. & Saltiel, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184 (2007).

77. Murano, I. *et al.* Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J. Lipid Res* 49, 1562-1568 (2008).

78. Arkan, M.C. *et al.* IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med* 11, 191-198 (2005).

79. Yuan, M. *et al.* Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikkβ. *Science* 293, 1673 -1677 (2001).

80. Cai, D. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med* 11, 183-190 (2005).

81. Choy, E.H. & Panayi, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med* 344, 907-916 (2001).

82. Vallabhapurapu, S. & Karin, M. Regulation and Function of NF-κB Transcription Factors in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 693-733 (2009).

83. Shi, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015-3025 (2006).

84. Davis, R.J. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* 103, 239-252 (2000).

85. Hess, J., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* 117, 5965 -5973 (2004).

86. Fujioka, S. *et al.* NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol. Cell. Biol* 24, 7806-7819 (2004).

87. Arndt, P.G., Suzuki, N., Avdi, N.J., Malcolm, K.C. & Worthen, G.S. Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation in human neutrophils: role of phosphatidylinositol 3-Kinase and Syk-mediated pathways. *J. Biol. Chem* 279, 10883-10891 (2004).

88. Hirosumi, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336 (2002).

89. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 85-96 (2006).

90. de Luca, C. & Olefsky, J.M. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Letters* 582, 97-105 (2008).

91. Peart, W.S. Renin-Angiotensin System. *New England Journal of Medicine* 292, 302-306 (1975).

92. Aktories, K. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie : Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel*. (Urban & Fischer Verlag in Elsevier GmbH: München, 2009).

93. Regitz-Zagrosek, V. & Unger, T. *Angiotensin-Rezeptorantagonisten : therapeutischer Einsatz bei Hypertonie und Herzinsuffienz*. (Uni-Med Verlag: Bremen, 2003).

94. de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W. & Unger, T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacological Reviews* 52, 415 -472 (2000).

95. Schiffrin, E.L. & Touyz, R.M. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 911-913 (2003).

96. Mascareno, E. & Siddiqui, M.A. The role of Jak/STAT signaling in heart tissue renin-angiotensin system. *Mol. Cell. Biochem* 212, 171-175 (2000).

97. Touyz, R.M. & Schiffrin, E.L. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacological Reviews* 52, 639 -672 (2000).

98. Suzuki, Y. *et al.* Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 881-900 (2003).

99. Oliverio, M.I. *et al.* Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 272, F515 -F520 (1997).

100. AKISHITA, M. *et al.* Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiological Genomics* 2, 13 -20 (2000).

101. Tsutsumi, Y. *et al.* Angiotensin II Type 2 Receptor Is Upregulated in Human Heart With Interstitial Fibrosis, and Cardiac Fibroblasts Are the Major Cell Type for Its Expression. *Circulation Research* 83, 1035 -1046 (1998).

102. Busche, S. *et al.* Expression of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am. J. Pathol* 157, 605-611 (2000).

103. Zhu, Y.Z. *et al.* Effects of losartan on haemodynamic parameters and angiotensin receptor mRNA levels in rat heart after myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, 257-262 (2000).

104. Stoll, M. *et al.* The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest* 95, 651-657 (1995).

105. Kurisu, S. *et al.* Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension* 41, 99-107 (2003).

106. Kaschina, E. & Unger, T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 12, 70-88 (2003).

107. Kaschina, E. *et al.* Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation. A Novel Option of Therapeutic Interference With the Renin-Angiotensin System in Myocardial Infarction? *Circulation* (2008).doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784868

108. Widdop, R.E., Jones, E.S., Hannan, R.E. & Gaspari, T.A. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol* 140, 809-824 (2003).

109. Siragy, H.M. & Carey, R.M. Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33, 1237-1242 (1999).

110. Zhang, J. & Pratt, R.E. The AT2 receptor selectively associates with Gialpha2 and Gialpha3 in the rat fetus. *J. Biol. Chem* 271, 15026-15033 (1996).

111. Nouet, S. & Nahmias, C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol. Metab* 11, 1-6 (2000).

112. Akishita, M. *et al.* Expression of the AT2 receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth. *J. Clin. Invest.* 103, 63-71 (1999).

113. Bedecs, K. *et al.* Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem. J* 325 (Pt 2), 449-454 (1997).

114. Huang, X.C., Richards, E.M. & Sumners, C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated stimulation of protein phosphatase 2A in rat hypothalamic/brainstem neuronal cocultures. *J. Neurochem* 65, 2131-2137 (1995).

115. Fischer, T.A., Singh, K., O'Hara, D.S., Kaye, D.M. & Kelly, R.A. Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 275, H906 -H916 (1998).

116. Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T. & Dzau, V.J. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J. Biol. Chem* 272, 19022-19026 (1997).

117. Huang, X.C., Richards, E.M. & Sumners, C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J. Biol. Chem* 271, 15635-15641 (1996).

118. Steckelings, U.M., Kaschina, E. & Unger, T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 26, 1401-1409 (2005).

119. Haithcock, D., Jiao, H., Cui, X.L., Hopfer, U. & Douglas, J.G. Renal proximal tubular AT2 receptor: signaling and transport. *J. Am. Soc. Nephrol* 10 Suppl 11, S69-74 (1999).

120. Kohout, T.A. & Rogers, T.B. Angiotensin II activates the Na+/HCO3- symport through a phosphoinositide-independent mechanism in cardiac cells. *J. Biol. Chem* 270, 20432-20438 (1995).

121. Dulin, N.O., Alexander, L.D., Harwalkar, S., Falck, J.R. & Douglas, J.G. Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8098-8102 (1998).

122. Wu, L. *et al.* Regulation of inhibitory protein-kappaB and monocyte chemoattractant protein-1 by angiotensin II type 2 receptor-activated Src homology protein tyrosine phosphatase-1 in fetal vascular smooth muscle cells. *Mol. Endocrinol* 18, 666-678 (2004).

123. Tani, T. *et al.* Angiotensin II bi-directionally regulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 315, 185-193 (2008).

124. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. & Margioris, A.N. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 38, 1654-1661 (2006).

125. Horiuchi, M. *et al.* Stimulation of Different Subtypes of Angiotensin II Receptors, AT1 and AT2 Receptors, Regulates STAT Activation by Negative Crosstalk. *Circulation Research* 84, 876 -882 (1999).

126. Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL® Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention: Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. (2008).auf <http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/046-001_S2_Behandlung_der_arteriellen_Hypertonie_06-2008_06-2013.pdf>

127. Macari, D., Bottari, S., Whitebread, S., De Gasparo, M. & Levens, N. Renal actions of the selective angiotensin AT2 receptor ligands CGP 42112B and PD 123319 in the sodium-depleted rat. *European Journal of Pharmacology* 249, 85-93 (1993).

128. Wan, Y. *et al.* Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the First Selective Nonpeptide AT2 Receptor Agonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 5995-6008 (2004).

129. Gelosa, P. *et al.* Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *Journal of Hypertension* 27, 2444-2451 (2009).

130. Rompe, F. *et al.* Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 55, 924-931 (2010).

131. ZAVARONI, I. *et al.* Prevalence of hyperinsulinaemia in patients with high blood pressure. *Journal of Internal Medicine* 231, 235-240 (1992).

132. Kintscher, U. [New targets for blood pressure lowering in diabetic patients?]. *Dtsch. Med. Wochenschr* 135, 2417-2419 (2010).

133. Grassi, G. *et al.* Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome. *Diabetologia* 48, 1359-1365 (2005).

134. Landsberg, L. Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). *J. Hypertens* 19, 523-528 (2001).

135. Tuck, M.L. *et al.* Insulin stimulates endogenous angiotensin II production via a mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens* 22, 1779-1785 (2004).

136. Goossens, G.H. *et al.* Endocrine Role of the Renin-Angiotensin System in Human Adipose Tissue and Muscle. *Hypertension* 49, 542 -547 (2007).

137. Serazin, V., Dos Santos, E., Morot, M. & Giudicelli, Y. Human adipose angiotensinogen gene expression and secretion are stimulated by cyclic AMP via increased DNA cyclic AMP responsive element binding activity. *Endocrine* 25, 97-104 (2004).

138. Haynes, W.G., Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L. & Sivitz, W.I. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J. Clin. Invest* 100, 270-278 (1997).

139. Segura, J. & Ruilope, L.M. Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutr* 10, 1151-1155 (2007).

140. Sarzani, R., Salvi, F., Dessì-Fulgheri, P. & Rappelli, A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J. Hypertens* 26, 831-843 (2008).

141. Barrett, E.J. *et al.* The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. *Diabetologia* 52, 752-764 (2009).

142. Skurk, T., van Harmelen, V. & Hauner, H. Angiotensin II Stimulates the Release of Interleukin-6 and Interleukin-8 From Cultured Human Adipocytes by Activation of NF-κB. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 1199 -1203 (2004).

143. de Kloet, A.D., Krause, E.G. & Woods, S.C. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol. Behav* 100, 525-534 (2010).

144. Steckelings, U.M., Rompe, F., Kaschina, E. & Unger, T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam Clin Pharmacol* 23, 693-703 (2009).

145. Engeli, S. *et al.* The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 807-825 (2003).

146. Engeli, S. *et al.* Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension* 45, 356 -362 (2005).

147. Abuissa, H., Jones, P.G., Marso, S.P. & O'Keefe, J.H., Jr Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Am. Coll. Cardiol* 46, 821-826 (2005).

148. Elliott, W.J. & Meyer, P.M. Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis. *Lancet* 369, 201-207 (2007).

149. McMurray, J.J. *et al.* Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med* 362, 1477-1490 (2010).

150. Yusuf, S. *et al.* Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N. Engl. J. Med* 358, 1547-1559 (2008).

151. Kintscher, U. ONTARGET, TRANSCEND, and PRoFESS: new-onset diabetes, atrial fibrillation, and left ventricular hypertrophy. *J Hypertens Suppl* 27, S36-39 (2009).

152. Kintscher, U. & de la Sierra, A. Metabolic effects of telmisartan. *HTCD* (2010).doi:10.4147/HTCD-100100

153. Tao, H. & Hajri, T. Very low density lipoprotein receptor promotes adipocyte differentiation and mediates the proadipogenic effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Biochemical Pharmacology* 82, 1950-1962 (2011).

154. Berger, J. & Moller, D.E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med* 53, 409-435 (2002).

155. Sharma, A.M. & Staels, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 386 -395 (2007).

156. Henriksen, E.J., Jacob, S., Kinnick, T.R., Teachey, M.K. & Krekler, M. Selective angiotensin II receptor receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* 38, 884-890 (2001).

157. Shiuchi, T. *et al.* Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension* 43, 1003-1010 (2004).

158. Schupp, M. *et al.* Molecular Characterization of New Selective Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Modulators With Angiotensin Receptor Blocking Activity. *Diabetes* 54, 3442 -3452 (2005).

159. Niklason, A., Hedner, T., Niskanen, L. & Lanke, J. Development of diabetes is retarded by ACE inhibition in hypertensive patients--a subanalysis of the Captopril Prevention Project (CAPPP). *J. Hypertens* 22, 645-652 (2004).

160. Mason, J.M. *et al.* The diabetogenic potential of thiazide-type diuretic and beta-blocker combinations in patients with hypertension. *J. Hypertens* 23, 1777-1781 (2005).

161. Rompe, F., Unger, T. & Steckelings, U.M. The angiotensin AT2 receptor in inflammation. *Drug News Perspect* 23, 104-111 (2010).

162. Yvan-Charvet, L. *et al.* Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 54, 991-999 (2005).

163. Yvan-Charvet, L. *et al.* Deficiency of Angiotensin Type 2 Receptor Rescues Obesity But Not Hypertension Induced by Overexpression of Angiotensinogen in Adipose Tissue. *Endocrinology* 150, 1421 -1428 (2009).

164. Hein, L., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J. & Kobilka, B.K. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature* 377, 744-747 (1995).

165. Klinke, R. *Physiologie : 68 Tabellen*. (Thieme: Stuttgart ;;New York NY, 2010).

166. Frenz, U. *Bestimmung der Energie- und Makronährstoffverwertung bei Ratten unter Diäten mit leicht unterschiedlichen Aminosäuregehalten: neue optimierte Methoden der indirekten Kalorimetrie*. (Köster: 1995).

167. Frost, S.C. & Lane, M.D. Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 260, 2646 - 2652 (1985).

168. Okamura, A. *et al.* Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J. Hypertens* 17, 537-545 (1999).

169. Goebel, M. *et al.* Characterization of new PPARgamma agonists: benzimidazole derivatives-importance of positions 5 and 6, and computational studies on the binding mode. *Bioorg. Med. Chem* 18, 5885-5895 (2010).

170. Kintscher, U. *et al.* PPARα Inhibits TGF-β–Induced β5 Integrin Transcription in Vascular Smooth Muscle Cells by Interacting With Smad4. *Circulation Research* 91, e35 -e44 (2002).

171. Raspé, E. *et al.* Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPARα activation. *Journal of Lipid Research* 40, 2099 - 2110 (1999).

172. BSRC Al. Fleming's Expression Profiling Unit - xMAP Technolgy. auf <http://tpaparountas.110mb.com/expu1/index.php?option=com_content&task=view&id=78&Itemid=94>

173. BSRC Al. Fleming's Expression Profiling Unit - Luminex Technology. auf <http://tpaparountas.110mb.com/expu1/index.php?option=com_content&task=view&id=79&Itemid=94>

174. Cheng, L. *et al.* Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat. Med* 10, 1245-1250 (2004).

175. Clasen, R. *et al.* PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* 46, 137-143 (2005).

176. Fan, J.G. *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: update 2010: (published in Chinese on Chinese Journal of Hepatology 2010; 18:163-166). *J Dig Dis* 12, 38-44 (2011).

177. Gregoire, F.M., Smas, C.M. & Sul, H.S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev* 78, 783-809 (1998).

178. Jones, B.H., Standridge, M.K. & Moustaid, N. Angiotensin II Increases Lipogenesis in 3T3-L1 and Human Adipose Cells. *Endocrinology* 138, 1512 -1519 (1997).

179. GREGOIRE, F.M., SMAS, C.M. & SUL, H.S. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* 78, 783 -809 (1998).

180. Feuerer, M. *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med* 15, 930-939 (2009).

181. Rotter, V., Nagaev, I. & Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem* 278, 45777-45784 (2003).

182. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol* 115, 911-919; quiz 920 (2005).

183. Kita, A. *et al.* Identification of the promoter region required for human adiponectin gene transcription: Association with CCAAT/enhancer binding protein-beta and tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 331, 484-490 (2005).

184. Lecker, S.H., Goldberg, A.L. & Mitch, W.E. Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology* 17, 1807 -1819 (2006).

185. Masaki, T. *et al.* Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 40, 177-184 (2004).

186. Kumada, M. *et al.* Adiponectin Specifically Increased Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Through Interleukin-10 Expression in Human Macrophages. *Circulation* 109, 2046 -2049 (2004).

187. Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B. & Baldwin, A.S., Jr Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J. Biol. Chem* 274, 31868-31874 (1999).

188. Grütz, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 3 -15 (2005).

189. Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R.A.M., Savelkoul, H.F.J. & Wichers, H.J. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct* 1, 254-261 (2010).

190. Sharif, O., Bolshakov, V.N., Raines, S., Newham, P. & Perkins, N.D. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol* 8, 1 (2007).

191. Sun, S.-C. & Ley, S.C. New insights into NF-[kappa]B regulation and function. *Trends in Immunology* 29, 469-478 (2008).

192. Ishihara, H. *et al.* Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 871-877 (1989).

193. Huyer, G. *et al.* Mechanism of Inhibition of Protein-tyrosine Phosphatases by Vanadate and Pervanadate. *Journal of Biological Chemistry* 272, 843 -851 (1997).

194. Barnes, P.J. Glucocorticosteroids: current and future directions. *British Journal of Pharmacology* 163, 29-43 (2011).

195. Tadevosyan, A. *et al.* Nuclear-delimited Angiotensin Receptor-mediated Signaling Regulates Cardiomyocyte Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 285, 22338 -22349 (2010).

196. Node, K. *et al.* Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 285, 1276-1279 (1999).

197. Sodhi, K. *et al.* Epoxyeicosatrienoic Acid Agonist Rescues the Metabolic Syndrome Phenotype of HO-2-Null Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 331, 906-916 (2009).

198. Morisseau, C. & Hammock, B.D. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 311-333 (2005).

199. Chen, D. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of AR9281, an Inhibitor of Soluble Epoxide Hydrolase, in Single- and Multiple-Dose Studies in Healthy Human Subjects. *Journal of Clinical Pharmacology* (2011).doi:10.1177/0091270010397049

200. Phielix, E., Szendroedi, J. & Roden, M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact. *Trends in Pharmacological Sciences* In Press, Corrected Proof.

201. BfArM Presse Rosiglitazon: Das BfArM ordnet Vertriebseinstellung an. *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte* (2010).auf <http://www.bfarm.de/DE/BfArM/Presse/mitteil2010/pm11-2010.html>

202. Goldstein, M.R. & Mascitelli, L. Pioglitazone for diabetes prevention. *N. Engl. J. Med* 365, 183; author reply 183-184 (2011).

203. BfArM Risikoinformationen Pioglitazon. *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte* (2011).auf <http://www.bfarm.de/DE/Pharmakovigilanz/risikoinfo/2011/pioglitazon.html>

204. Schupp, M., Janke, J., Clasen, R., Unger, T. & Kintscher, U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 109, 2054-2057 (2004).

205. Benson, S.C. Identification of Telmisartan as a Unique Angiotensin II Receptor Antagonist With Selective PPAR -Modulating Activity. *Hypertension* 43, 993-1002 (2004).

206. Tao, H., Aakula, S., Abumrad, N.N. & Hajri, T. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ regulates the expression and function of very-low-density lipoprotein receptor. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 298, E68 -E79 (2010).

207. Cole, B.K. *et al.* Valsartan Protects Pancreatic Islets and Adipose Tissue From the Inflammatory and Metabolic Consequences of a High-Fat Diet in Mice. *Hypertension* 55, 715 -721 (2010).

208. Iwai, M. *et al.* Possible Inhibition of Focal Cerebral Ischemia by Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation. *Circulation* 110, 843 -848 (2004).

209. Knowles, H.J., Tian, Y.-M., Mole, D.R. & Harris, A.L. Novel Mechanism of Action for Hydralazine. *Circulation Research* 95, 162 -169 (2004).

210. MASSIÉRA, F. *et al.* Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *The FASEB Journal* 15, 2727 -2729 (2001).

211. Barnes, M.J. *et al.* High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain Res. Bull.* 61, 511-519 (2003).

212. McCarthy, C.A., Vinh, A., Callaway, J.K. & Widdop, R.E. Angiotensin AT2 Receptor Stimulation Causes Neuroprotection in a Conscious Rat Model of Stroke. *Stroke* 40, 1482 -1489 (2009).

213. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *The Lancet* 360, 1903-1913 (2002).

214. Imig, J.D., Carpenter, M.A. & Shaw, S. The Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor AR9281 Decreases Blood Pressure, Ameliorates Renal Injury and Improves Vascular Function in Hypertension. *Pharmaceuticals* 2, 217-227 (2009).

215. Siragy, H.M., Inagami, T., Ichiki, T. & Carey, R.M. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT2) angiotensin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6506 -6510 (1999).

216. Wang, Z.V. & Scherer, P.E. Adiponectin, Cardiovascular Function, and Hypertension. *Hypertension* 51, 8 -14 (2008).

217. Iwai, M. *et al.* AT2 receptor deficiency attenuates adipocyte differentiation and decreases adipocyte number in atherosclerotic mice. *Am. J. Hypertens* 22, 784-791 (2009).

218. Müller, D.N. *et al.* Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am. J. Pathol* 157, 111-122 (2000).

219. Bobbert, T. *et al.* Changes of Adiponectin Oligomer Composition by Moderate Weight Reduction. *Diabetes* 54, 2712 -2719 (2005).

220. Pajvani, U.B. *et al.* Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem* 279, 12152-12162 (2004).

221. Almeda-Valdes, P. *et al.* Total and high molecular weight adiponectin have similar utility for the identification of insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol* 9, 26 (2010).

222. Brennan, A.M. & Mantzoros, C.S. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology—emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2, 318-327 (2006).

223. Meier, J.J. & Nauck, M.A. Glucagon-like peptide 1(GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab. Res. Rev* 21, 91-117 (2005).

224. Verspohl, E.J. Novel therapeutics for type 2 diabetes: incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Pharmacol. Ther* 124, 113-138 (2009).

225. Efendic, S. & Portwood, N. Overview of incretin hormones. *Horm. Metab. Res* 36, 742-746 (2004).

226. Drab, S.R. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: current status and future prospects. *Pharmacotherapy* 30, 609-624 (2010).

227. Islam, S. *The islets of langerhans*. (Springer: Dordrecht; New York, 2010).

228. Kim Chung, L.T. *et al.* Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390, 613-618 (2009).

229. He, M. *et al.* Reversal of obesity and insulin resistance by a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist in diet-induced obese mice. *PLoS ONE* 5, e14205 (2010).

230. Laakso, M. *et al.* Insulin sensitivity, insulin release and glucagon-like peptide-1 levels in persons with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance in the EUGENE2 study. *Diabetologia* 51, 502-511 (2007).

231. Velásquez-Mieyer, P.A. *et al.* Racial Disparity in Glucagon-Like Peptide 1 and Inflammation Markers Among Severely Obese Adolescents. *Diabetes Care* 31, 770 -775 (2008).

232. Goldfine, A.B. *et al.* The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med* 152, 346-357 (2010).

233. Larsen, C.M. *et al.* Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med* 356, 1517-1526 (2007).

234. Dandapat, A. *et al.* Over-expression of angiotensin II type 2 receptor (agtr2) decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 871-877 (2008).

235. Chen, J., Li, D., Schaefer, R. & Mehta, J.L. Cross-talk between dyslipidemia and renin–angiotensin system and the role of LOX-1 and MAPK in atherogenesis: Studies with the combined use of rosuvastatin and candesartan. *Atherosclerosis* 184, 295-301 (2006).

236. Wu, L. *et al.* Roles of Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Associated With Selective Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade With Valsartan in the Improvement of Inflammation-Induced Vascular Injury. *Circulation* 104, 2716 -2721 (2001).

237. Okada, H. *et al.* A possible anti-inflammatory role of angiotensin II type 2 receptor in immune-mediated glomerulonephritis during type 1 receptor blockade. *Am. J. Pathol.* 169, 1577-1589 (2006).

238. Benndorf, R.A. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice. *Kidney Int.* 75, 1039-1049 (2009).

239. Houmard, J.A. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, R1111 -R1116 (2008).

240. Nedvídková, J., Smitka, K., Kopský, V. & Hainer, V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res* 54, 133-140 (2005).

241. Gil-Campos, M., Cañete, R. & Gil, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clinical Nutrition* 23, 963-974 (2004).

242. B, K. *et al.* AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. (2003). auf <http://www.biochemsoctrans.org/bst/031/0162/bst0310162.htm>

243. Denk, H., Stumptner, C., Fuchsbichler, A. & Zatloukal, K. Alkoholische und nichtalkoholische Steatohepatitis. *Der Pathologe* 22, 388-398 (2001).

244. Bosnyak, S. *et al.* Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin. Sci.* 121, 297-303 (2011).

245. Ichiki, T. *et al.* Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377, 748-750 (1995).

246. Avila, M.D., Morgan, J.P. & Yan, X. Genetically Modified Mouse Models Used for Studying the Role of the AT2 Receptor in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *J Biomed Biotechnol* 2011, (2011).

247. Peters, L.L. *et al.* The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet* 8, 58-69 (2007).

248. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562 (2002).

249. Weisberg, S.P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808 (2003).

250. Sugii, S. *et al.* Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3558 -3563 (2010).

251. Deutsche Forschungsgemeinschaft.;Deutsche Forschungsgemeinschaft / Kommission für Tierexperimentelle Forschung. & Exner, C. *Tierversuche in der Forschung*. (Lemmens: Bonn, 2004).

252. Despres, J.-P. Inflammation and cardiovascular disease: is abdominal obesity the missing link? *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, S22-S24 (2003).

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.1 Klassifizierungen des metabolischen Syndroms 2
Abb. 1.2 Prozentualer Anteil der adipösen Bevölkerung (BMI > 30) der USA in den Jahren 1990, 1999 und 2009 4
Abb. 1.3 Prozentualer Anteil der diabetischen Bevölkerung der USA in den Jahren 1994, 2000 und 2009 7
Abb. 1.4 Zusammenhang zwischen Adipositas und Insulinresistenz in Muskel, Fett und Leber 9
Abb. 1.5 Adipositas induzierte Inflammation und Insulinresistenz 13
Abb. 1.6 Inflammation im Fettgewebe 14
Abb. 1.7 Signaltransduktion der NF-κB und JNK vermittelten Insulinresistenz 17
Abb. 1.8 Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) 18
Abb. 1.9 Struktur des ersten nicht-peptidischen AT2R Agonisten C21[128] 24
Abb. 2.1 Behandlungsschema des Tierversuchs 44
Abb. 2.2 Amplifikations-Beispiel von Adiponektin 54
Abb. 2.3 Lumniex xMAP® Farbkodierungs-Karte 57
Abb. 2.4 Detektions-Laser im Bio-Plex 200 System 58
Abb. 2.5 Standardkurven am Beispiel eines Bio-Plex Diabetes Assays 58
Abb. 3.1 IL-6 mRNA in 3T3-L1 Adipozyten 62
Abb. 3.2. IL-6 Protein Freisetzung 63
Abb. 3.3 Basale IL-10 mRNA Expression 64
Abb. 3.4 Adiponektin mRNA Expression 65
Abb. 3.5 Adiponektin Western Blot 65
Abb. 3.6 Adiponektin Protein-Freisetzung 66
Abb. 3.7 Adiponektin Protein Freisetzung unter AT2R-Blockade. 66
Abb. 3.8 Basale Leptin mRNA Expression 67
Abb. 3.9 Basale Leptin Protein Freisetzung 67
Abb. 3.10 IL-6 mRNA Expression 68
Abb. 3.11 IL-6 Protein Freisetzung 68
Abb. 3.12 MCP-1 mRNA Expression 68
Abb. 3.13 TNF-α mRNA Expression 68
Abb. 3.14 Basale IL-10 mRNA Expression 69
Abb. 3.15 Öl-Rot O Färbung 70
Abb. 3.16 Relative Induktion der Fettzell-Differenzierung 70
Abb. 3.17 PPARγ LBD Aktivitäts-Luziferase 71
Abb. 3.18 Körpergewichtsentwicklung während den Diäten 72
Abb. 3.19 Körpergewichtsentwicklung während der Behandlung 73
Abb. 3.20 Systolischer Blutdruck der WT-Mäuse 74
Abb. 3.21 Systolischer Blutdruck in AT2-KO HFD-Mäusen 75
Abb. 3.22 Glukose Toleranz Test (GTT) der Vehikel Tiere 76
Abb. 3.23 Glukose Toleranz Test (GTT) der Behandlungsgruppen 77

Abb. 3.24 Relative Glukose Intoleranz 78
Abb. 3.25 Relative Glukose Intoleranz (AT2KO) 78
Abb. 3.26 Insulin Toleranz Test (ITT) der Vehikel Tiere 79
Abb. 3.27 Insulin Toleranz Test (ITT) der Behandlungsgruppen 80
Abb. 3.28 Relative Insulin Sensitivität 81
Abb. 3.29 Relative Insulin Sensitivität (AT2KO) 81
Abb. 3.30 Verlauf des respiratorischen Quotienten über 24 h 82
Abb. 3.31 Adiponektin Serum Konzentrationen 85
Abb. 3.32 Adiponektin mRNA Expression im Fettgewebe 86
Abb. 3.33 Adiponektin Western Blot 86
Abb. 3.34 Leptin Serum Konzentrationen 87
Abb. 3.35 Leptin mRNA Expression im Fettgewebe 88
Abb. 3.36 Resistin Serum Konzentrationen 89
Abb. 3.37 GLP-1 Serum Konzentrationen 90
Abb. 3.38 GIP Serum Konzentrationen 91
Abb. 3.39 Serum Konzentrationen inflammatorischer Zytokine 92
Abb. 3.40 Serum Konzentrationen inflammatorischer Zytokine in AT2R-KO Tieren 93
Abb. 3.41 IL-6 und TNF-α Expression im Fettgewebe 93
Abb. 3.42 IL-6 und TNF-α Expression im Fettgewebe der KO-Tiere 94
Abb. 3.43 IL-10 Serum Konzentrationen 95
Abb. 3.44 IL-10 Expression im Fettgewebe 96
Abb. 3.45 Serum-Triglyzerid Konzentrationen 97
Abb. 3.46 Hämatoxyllin-Eosin Färbung der Lebern 98
Abb. 3.47 Leber Triglyzeridgehalt 99
Abb. 4.1 Arbeitsmodell für die Mechanismen der C21-vermittelten Anti-Inflammation 105
Abb. 4.2 Arbeitsmodell der hypothetischen *in-vivo* Regulation durch C21[252] 120

Tabellen

Tab. 2.1 Verzeichnis der verwendeten Primer 39
Tab. 2.2 Verzeichnis AOD Sondengemische 39
Tab. 2.3 Protokoll zur Dehydrierung der Lebern 60
Tab. 2.4 Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin Färbung an Paraffinschnitten 61
Tab. 3.1 Spontan- und Nüchternglukose 75
Tab. 3.2 Metabolische Paramter der Stoffwechselkäfig-Untersuchungen 83
Tab. 3.3 Körperfettmassen 84

9 Danksagung

Einen besonderen persönlichen Dank möchte ich an Herrn Prof. Ulrich Kintscher richten, der mir den Einstieg in die Forschung an einem international renommierten Institut erst ermöglicht hat. Dabei möchte ich mich gleichzeitig für die Vergabe des hochspannenden Themas der vorliegenden Arbeit bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit sowie für die ständige Bereitschaft zum geistigen Austausch bedanken, welcher mitunter für den Erfolg dieser Arbeit verantwortlich ist. Seiner ständigen Anregung und Motivation zur Teilnahme an Kongressen, Foren und anderen Veranstaltungen verdanke ich zudem einen großen Teil der Ausprägung meiner Softskills.

Herrn Prof. Gerhard Wolber möchte ich recht herzlich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereiches Pharmazie danken. Er übernahm damit die Nachfolge von Herrn Prof. Ronald Gust, den es mittlerweile an die Universität Innsbruck gezogen hat. So möchte ich Herrn Prof. Ronald Gust für die anfängliche Betreuung danken.

Für die sehr gute Zusammenarbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Anna Foryst-Ludwig bedanken, die mir als Projektleiterin stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau PD Muscha Steckelings und ihrer gesamten Arbeitsgruppe samt Kooperationspartnern für die hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen der Kooperation zur vorliegenden Arbeit. Gleichzeitig möchte ich mich an dieser Stelle nochmals für die großzügige finanzielle Unterstützung, ohne die dieses Projekt und die Teilnahmen an internationalen Kongressen nicht möglich gewesen wären, bedanken.

Ein großer Dank geht natürlich an den Institutsleiter Herrn Prof. Thomas Unger, auf dessen wissenschaftlichen Leistungen das große internationale Renommee des Centers for Cardiovascular Research maßgeblich zurückzuführen ist. Miranda Schröder danke ich sehr für die aufwendige administrative Unterstützung.

Ganz besondere Erwähnung soll an dieser Stelle mein langjähriger Freund und Kommilitone Robin Winkler finden, der durch fachliche Diskussionen, Unterstützung, Verständnis, Loyalität, Rat und vor allem Humor sowohl meinen Laboralltag als auch mein privates Leben erhellt hat und immer noch erhellt. Gleiches sei auch an Verena Benz gerichtet, die durch ihre einzigartige humorvolle Art und gleichzeitiger fachlicher Kompetenz, auch nach Feierabend,

mein Leben bereichert hat. Für ihre nahezu grenzenlose Hilfe und Unterstützung bin ich ihr überaus dankbar. Herrn Dr. Ludovit Paulis möchte ich für seine wissenschaftliche Beratung und für die mitunter stundenlangen Diskussionen meiner Ergebnisse danken. Auch meiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich danken, allen voran Christiane Sprang, ohne deren Expertise und logistisches Geschick die Durchführung einiger Versuche gar nicht erst möglich gewesen wäre. Sie macht das Unmögliche möglich. Danken möchte ich auch Beata Thalke, Dr. Markus Clemenz, Mandy Bloch, Ilse Bähr, Katja Giersch, Lena Herbst und Dr. Michael Schupp für ihre Hilfe.

Es waren zum Teil wirklich stressige, nervenaufreibende, hoffnungslose aber gleichzeitig auch wirklich schöne, humorvolle und produktive drei Jahre am Center for Cardiovascular Research. Dafür möchte ich dem ganzen Institut danken. Bei Herrn Prof. Gilbert Schönfelder, Pawel Namsolleck, Lukas Maurer, Patrick Schmerler, Dr. Christoph Reichetzeder, Eva Hecht, Daniel Villela, Katja Schwengel, Verónica Valero, Sabrina Klare, Sebastian Kirsch, Dr. Jens Hahne, Dr. Matthias Goebel, Valters Stelmanis und Wayne möchte ich mich für den regen wissenschaftlichen Austausch, die traumhafte Atmosphäre und die unendlichen Stunden an Spaß bedanken.

Bedanken möchte ich auch bei meinem langjährigen Studienfreund Maximilian Wilke, der mir stets mit musikalischen, kulturellen und politischen Zerstreuungen die Möglichkeit gab, mal ordentlich vom stressigen Forschungsalltag abzuschalten und mir auch sonst immer mit Rat und Tat zur Seite stand und noch immer steht. Ferner danke ich meinem gesamten Freundeskreis, der stets für einen harmonischen Ausgleich zum Laboralltag für mich gesorgt hat. Ich möchte mich abschließend bei meiner gesamten Familie bedanken, die immer großes Interesse an meinen Forschungsergebnissen gezeigt hat und mich auch darüber hinaus immer unterstützt hat. Besondere Dankbarkeit verspüre ich meinem Großvater gegenüber, auf dessen Lebenswerk und -weg ich gleichzeitig unendlich stolz bin. Dabei besaß er als großes Vorbild für mich einen entscheidenen Einfluss für die Aufnahme meines Pharmazie-Studiums und für das Anfertigen dieser Doktorarbeit. So ist es auch eine besondere Ehre für mich als Apotheker der dritten Generation unsere Familientradition fortzuführen. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Mutter für ihre unendliche Unterstützung bedanken.

Danke Euch allen! Ihr alle habt direkt oder indirekt zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen!