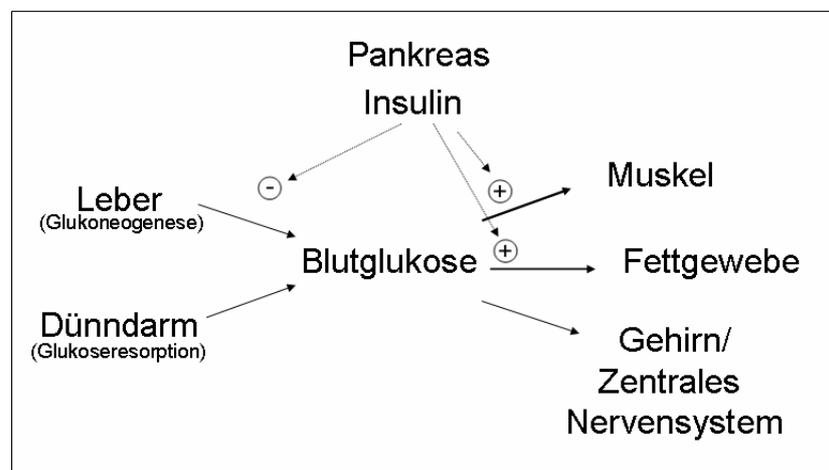


# 1. Einleitung

## 1.1 Regulation der Glukosehomöostase

Die Versorgung der Körperzellen mit Substraten zur Energiegewinnung ist eine lebenswichtige Grundfunktion des Organismus. Trotz Perioden von Nahrungsaufnahme und Fasten bleiben die Blutglukosespiegel in gesunden Individuen in einem Bereich von 4 bis 7 mmol/Liter (mM) konstant [1]. Diese Balance wird durch eine genaue Abstimmung von intestinaler Aufnahme, hepatischer Eigenproduktion und Aufnahme, Speicherung und Metabolisierung in peripheren Geweben aufrechterhalten. Durch erhöhte Plasmaspiegel von Glukose und Aminosäuren infolge von Nahrungsaufnahme, wird Insulin aus den Betazellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas freigesetzt [2]. Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor initiiert eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade, was zu einer Verlagerung von glukosetransporterhaltigen Vesikeln an die Plasmamembran, und damit zu einer verstärkten Glukoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe führt [3]. Insulin hemmt zusätzlich die hepatische Glukoneogenese. Aus diesen Gründen fungiert es als primärer Regulator der Blutglukosespiegel (Abbildung 1.1) [3].



**Abb. 1.1.: Schema der Regulation von Blutglukose**

Glukoseaufnahme, infolge von Nahrungsresorption im Dünndarm oder der hepatischen Synthese im basalen Zustand, steht die insulininduzierte Aufnahme in periphere Gewebe, wie Muskel und Fettgewebe, gegenüber.

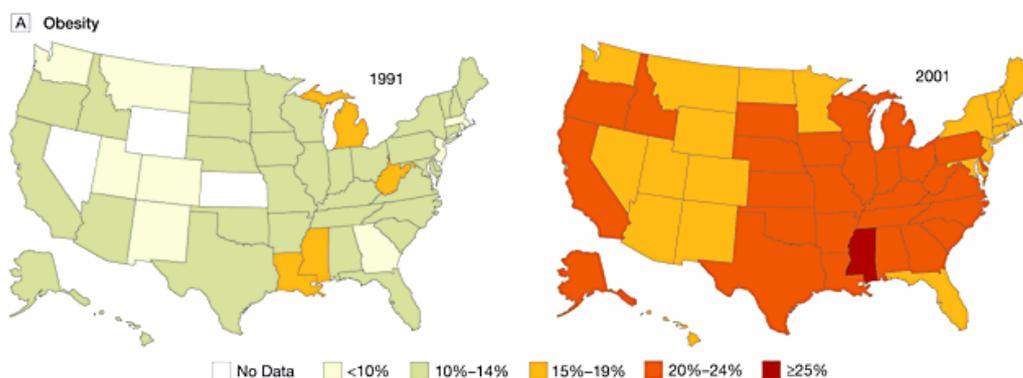
Außerdem stimuliert Insulin Zellwachstum und Differenzierung und fördert die Speicherung von Substraten im Fettgewebe, Leber und Muskel durch eine Stimulation der Lipogenese, Glykogenolyse und Proteinsynthese und einer Hemmung des Abbaus

dieser Substanzen [2]. Mit bis zu 75% der insulininduzierten Glukoseaufnahme macht die Muskulatur den wichtigsten Ort für die Glukoseverwertung aus, wogegen die Aufnahme in das Fettgewebe nur für einen geringen Teil verantwortlich ist [4].

Die im folgenden diskutierten Einflüsse des Lebensstils auf die Glukosehomöostase ergeben sich zum einen durch die Menge an zugeführter Nahrung, und zum anderen durch den Verbrauch der gespeicherten Reserven in der Muskulatur durch körperliche Aktivität.

## 1.2 Adipositas und deren Folgen

In den letzten 50 Jahren vollzog sich in den industrialisierten Ländern ein grundlegender Wandel der Lebensumstände. Schwere körperliche Arbeit wurde immer stärker durch spezialisierte Maschinen erledigt. Außerdem führte der wirtschaftliche Aufschwung in Nordamerika und Westeuropa nach dem 2. Weltkrieg zu einem Angebot an Nahrungsmitteln, das eine ausreichende Versorgung der Bevölkerung sicherstellte. Der Einzug elektronischer Technik in den letzten 20 Jahren hatte eine weitere Änderung der gewohnten Lebensumstände zur Folge. All diese Faktoren zusammen begünstigen einen Lebensstil, der durch verminderte körperliche Aktivität und hohe Kalorienaufnahme gekennzeichnet ist. Die langfristige Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch führt zu einer positiven Energiebilanz und damit zur Zunahme an Körperfettgewebe [5]. Die Entwicklung des Anteils adipöser Menschen in den USA ist in Abbildung 1.2. veranschaulicht.



**Abb. 1.2.: Prävalenz von Übergewicht BMI  $\geq 30$  in den USA im Jahr 1991 und 2001[6]**

Wie ersichtlich verdoppelte sich in vielen amerikanischen Staaten der Anteil übergewichtiger Menschen in nur 10 Jahren, wobei ähnliche Daten für Europa

existieren [7, 8]. Besonders dramatisch stellt sich die Körpergewichtsentwicklung bei Kindern dar [9, 10].

In Tierstudien konnte schon vor etlichen Jahren gezeigt werden, dass eine verminderte Kalorienaufnahme und die damit einhergehende Gewichtsreduktion die Lebensdauer beträchtlich verlängert [11]. Als Gründe dafür werden, neben den später diskutierten Folgen der vermehrten Fettmasse, ein vermindertes Auftreten von Sauerstoffradikalen [12] diskutiert. Außerdem wird durch eine Verlangsamung der glykolytischen Stoffwechselwege eine verminderte Konversion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  beobachtet, welches mit einer verminderten Sekretion von Wachstumsfaktoren, Insulin bzw. des Insulin-like growthfactors (IGF-1) [13, 14] einhergeht und als frühes Ereigniss in der Entstehung von Folgekrankheiten gilt. Im Gegensatz zu verminderter Kalorienaufnahme weisen Mäuse mit erhöhter Fettmasse eine kürzere Lebensdauer auf [15].

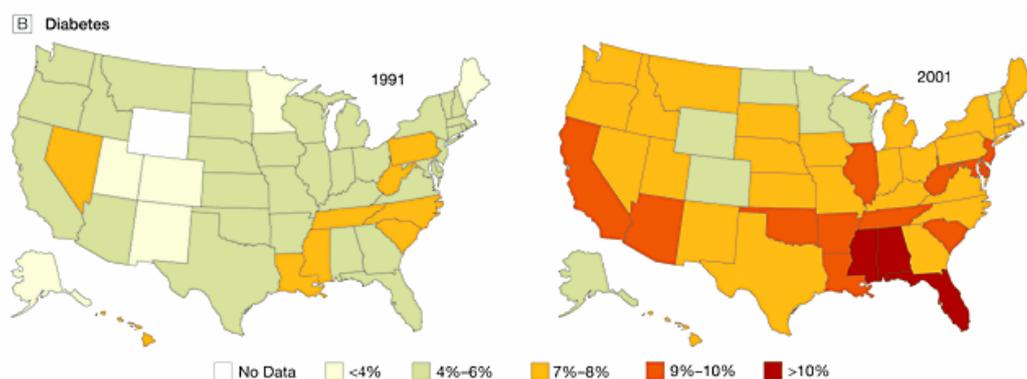
Es besteht auch beim Menschen eine direkte Verbindung zwischen dem Körpergewicht und verschiedenen degenerativen Erkrankungen, sodass ab einem *Body Mass Index* (BMI)  $> 25 \text{ kg/m}^2$  die Gesamtmortalität erhöht ist [16]. Bezüglich der Lebensqualität zeigte es sich, dass die oft verminderte soziale Kompetenz von adipösen Menschen nur teilweise durch die körperlichen Nachteile zu erklären ist, sondern dass auch psychische Faktoren und die Reaktion der Umwelt eine erhebliche Rolle spielen [17]. Trotz vermehrter Maßnahmen im Bereich der Gesundheitserziehung und eines gestiegenen Gesundheitsbewusstseins hat sich nichts an der sich aus epidemiologischer Sicht dramatisch entwickelnden Lage geändert [6].

### **1.3. Insulinresistenz und Typ-II- Diabetes**

Eine vermehrte Ansammlung von Fettgewebe, besonders im viszeralen Kompartiment, hat negative Konsequenzen auf den Insulin- und Glukosestoffwechsel bei adipösen Menschen. Dabei kommt es zu einer Verschiebung der unter 1.1 beschriebenen Homöostase: Durch eine höhere lipolytische Aktivität der viszeralen Adipozyten, mit gleichzeitig verminderter antilipolytischer Aktivität von Insulin, kommt es zum Anstieg der freien Fettsäuren im Plasma [18]. Die Folgen davon sind eine gesteigerte hepatische Glukoneogenese [19], die Entstehung von Insulinresistenz im Muskel [20] und eine Beeinträchtigung der Betazellfunktion [21]. Als diskutierte Mechanismen gelten die direkte Inhibierung der Insulinsignalwege sowie eine Aktivierung der Proteinkinase C durch freie Fettsäuren, eine Konkurrenz zwischen Fettsäuren und Glukose im Muskel und die Einlagerung von Triglyzeriden in periphere Gewebe [19, 20, 22]. Eine

exzessive viszerale Fettmasse führt außerdem zur Veränderung der Plasmaspiegel von Adipozyten- sezernierten Adipokinen (Abschnitt 1.4.), deren Einflüsse auf Insulin- und Glukosestoffwechsel Gegenstand derzeitiger Forschung sind. [23, 24]. Die negative Korrelation zwischen viszeraler Fettmasse und Insulinsensitivität [25] wird durch eine Studie in Ratten bestätigt, bei der nach chirurgischer Entfernung von viszeralem Fettgewebe die hepatische Insulinsensitivität zunahm [26]. Trotz der Adipositas-assoziierten Insulinresistenz kann initial die Euglykämie durch eine gesteigerte Insulinfreisetzung aus dem Pankreas aufrechterhalten werden, d.h. viele Patienten mit leichter Insulinresistenz können durch eine kompensatorisch gesteigerte Insulinausschüttung eine Blutzuckererhöhung vermeiden [22]. Kommt es jedoch zu einer Verstärkung der Resistenz bzw. zu einer zusätzlichen Störung der Betazellfunktion, wie z.B. durch die oben erwähnte Einlagerung von Triglyzeriden, resultieren daraus eine gestörte Glukosetoleranz, Hyperglykämie oder Typ-II- Diabetes [27]. Der wichtigste zugrundeliegender Mechanismus, der zur Entstehung von Typ-II- Diabetes führt, ist neben einer gestörten Insulinsekretion, die periphere Insulinresistenz [22].

Die epidemiologischen Daten zur Verbreitung des Diabetes sind nahezu identisch zu denen der Adipositas. In Abbildung 1.3. werden Daten aus den USA von 1991 mit 2001 verglichen.



**Abb. 1.3.: Verbreitung von Diabetes in den USA im Jahr 1991 und 2001[6]**

In Deutschland ist die Prävalenz von Typ-II- Diabetes in den letzten Jahren auf ca. 8% gestiegen, wobei zu den 8 Millionen Diabetikern geschätzte 4 Millionen nicht-diagnostizierte Fälle hinzukommen [1]. Die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter zu, was durch den Verlust an Muskelmasse und einer Zunahme an Fettgewebe (= geringere

Glukoseverwertung), als auch einer nachlassenden Betazellfunktion erklärt werden kann [22].

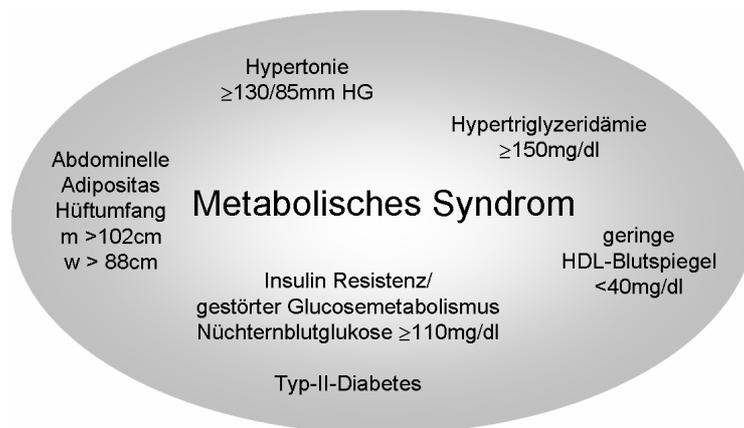
Zur Diagnose des Typ-II- Diabetes nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Diabetes (DGD) werden Überprüfung von Glukosurie, Gelegenheits- Plasmaglukose und Orale Glukosetoleranztest (OGTT) herangezogen [28]. Primäres Ziel einer optimalen Diabetestherapie ist die normnahe Blutzuckereinstellung beim Patienten, die jedoch häufig infolge von biologischem Alter, Aktivität und Compliance der Patienten individuell angepasst werden muss (Richtwerte: Nüchternblutzucker 90-120 mg/dl (5,0-6,7mM) ,2h postprandial 130-160 mg/dl (7,2- 8,9mM) bzw. Langzeitwert  $HbA_{1c} < 6,5\%$ ). Die erste Wahl bei der Therapie des Typ-II- Diabetes stellen nichtpharmakologische Maßnahmen wie eine Veränderung des Lebensstiles mit Diät bzw. Gewichtsreduktion und Anpassung der körperlichen Aktivität, dar. Als medikamentöse Therapie werden zum einen Substanzen eingesetzt, welche die Insulinresistenz und den Glukosemetabolismus beeinflussen (Metformin, alpha-Glucosidase-Hemmer und Thiazolidindione (TZDs)), zum anderen insulinotrope Substanzen (Sulfonylharnstoffe und Glinide). Ist mit diesen Mitteln keine ausreichende Senkung der Blutglukosespiegel möglich, muss Insulin substituiert werden. Die neuesten deutschen Richtlinien der DGD zur Therapie der Typ-II- Diabetes sind in Referenz [1] beschrieben. Der Typ-II- Diabetes ist eine Erkrankung, die zu Stoffwechselentgleisungen, häufiger aber zu schwerer Mikro- und Makroangiopathie sowie Neuropathie, führen kann [28]. Die Zielwerteinstellung korreliert eng mit der Verminderung von Diabetes- assoziierten Erkrankungen. So wurde in der United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) durch einen 1% niedrigeren  $HbA_{1c}$ -Wert eine Risikoreduktion des Myokardinfarktes um 14%, der mikrovaskulären Endpunkte um 37%, der Amputationen/ Todesfälle durch periphere Verschlusskrankheit um 43%, des Schlaganfalls um 19% sowie der Herzinsuffizienz um 16% beschrieben [29].

#### **1.4. Das Metabolische Syndrom**

Der Adipositas- assoziierte Anstieg der freien Fettsäuren und die damit verbundene Entstehung von Insulinresistenz begünstigt die Manifestierung einer Dyslipidämie [19]. Dabei induzieren die erhöhten Plasmaspiegel an freien Fettsäuren einer stärkere hepatische Generierung und Sekretion von VLDL- Partikeln, was zu einer

Hypertriglyzeridämie führt. Der vermehrte Austausch von Cholesterinestern zwischen VLDL und HDL- Partikeln hat eine stärkere HDL- Clearance und die Senkung der HDL- Spiegel zur Folge [30]. Auch Hypertonie kann durch Insulinresistenz bzw. Hyperinsulinämie hervorgerufen werden. Eine Resistenz gegenüber den normalerweise vasodilatatorischen Effekten von Insulin konnte in adipösen und diabetischen Patienten gezeigt werden [19]. Weiterhin kann Insulin auch in resistenten Patienten zu einer Natriumretention [31] und zu einer Sympathikusaktivierung [32] und damit zu einem erhöhtem Blutdruck führen.

Insulinresistenz als Folge von Adipositas kann somit als zugrundeliegender Defekt neben der Entstehung eines Typ-II- Diabetes eine Reihe weiterer Erkrankungen nach sich ziehen [33]. Ein gleichzeitiges Auftreten dieser Erkrankungen, wird als Syndrom X oder auch metabolisches Syndrom bezeichnet [19, 34]. Abbildung 1.4. zeigt die Kriterien zur Diagnose des metabolischen Syndroms nach den neuesten Richtlinien der National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel (ATP) III in den USA.



**Abb. 1.4.: Diagnose des metabolischen Syndroms nach den NCEP ATP III- Kriterien[19]**

Bei der Diagnose von 3 oder mehr dieser Kriterien spricht man vom Metabolischen Syndrom

Jede Erkrankung, die als Bestandteil des metabolischen Syndroms definiert ist, stellt selbst einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar [33]. Epidemiologische Studien zeigten jedoch, dass die Diagnose des metabolischen Syndroms stärker mit dem Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen korrelierte, als die einzelnen Kriterien [35]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem diagnostiziertem metabolischen Syndrom ohne Typ-II- Diabetes eine starke Prädisposition zur Entwicklung eines Typ-II- Diabetes besitzen [36] und deshalb versucht werden muss, präventive Maßnahmen zu ergreifen. Zur Therapie des metabolischen Syndroms zählen in erster Linie Gewichtsreduktion durch Diät und Bewegung, aber auch die

medikamentöse Therapie der einzelnen Krankheiten bzw. Symptome [33]. Keines der dafür verwendeten Medikamente ist speziell für die Behandlung des metabolischen Syndroms entwickelt worden, und selten werden durch eine Substanz therapeutische Nutzen für mehr als eine Komponente des gesamten Syndroms erzielt.

Eine Verbesserung der Insulinsensitivität, verbunden mit einer blutdrucksenkenden Wirkung und Beeinflussung des Fettstoffwechsels, sollten im Mittelpunkt einer medikamentösen Intervention stehen. Neue therapeutische Konzepte zielen auf das Fettgewebe als Herkunftsort von freien Fettsäuren und der metabolisch-aktiven Adipokine. Eine Verringerung des viszeralen Fettanteils (= Fettumverteilung hin zu mehr subkutanem Fett) und eine Änderung der Struktur (mehr kleinere insulinresistente Adipozyten) spielen dabei eine wichtige Rolle [37].

## 1.5. Die Rolle des Fettgewebes

Die klassische Sicht auf die Funktion des Fettgewebes ist die eines Langzeitspeichers für Energie, die in Zeiten von Nahrungsmangel mobilisiert werden kann. Fettsäuren werden durch Lipolyse im Adipozyten freigesetzt und über den Blutkreislauf in die Organe transportiert und dort unter Energiefreisetzung oxidiert. Somit nimmt die Fettmasse bei einer negativen Energiebalance ab und steigt an, sobald die Aufnahme den Energieverbrauch übersteigt [38].

Ein Wandel im Verständnis des Fettgewebes erfolgte 1994 mit der Identifizierung und Charakterisierung von Leptin, womit die Rolle dieses Gewebes auf die eines endokrinen Organes erweitert wurde [39]. Mittlerweile sind eine Reihe von bioaktiven Proteinen identifiziert, die von Adipozyten produziert und sezerniert werden [38, 40, 41]. Eine Auswahl davon ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

<b>Zytokine und verwandte Proteine</b>	Leptin Tumor Nekrose Faktor alpha Interleukin-6
<b>Proteine involviert in fibrinolytisches System</b>	Plasminogen activator inhibitor 1
<b>Proteine des RAS</b>	Angiotensinogen
<b>Komplement und Komplement-assoziierte Proteine</b>	Adipsin Adiponektin
<b>Proteine für Lipstoffwechsel und Lipide</b>	Lipoproteinlipase Apolipoprotein E
<b>Andere</b>	Resistin (FIZZ3)

**Tabelle 1.1.: Sezernierte Proteine des Fettgewebes mit auto- para- oder endokriner Wirkung**

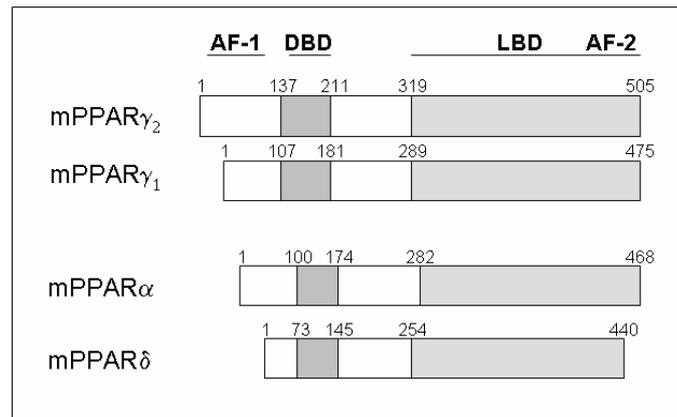
Zusätzlich zu diesen efferenten Signalen exprimiert das Fettgewebes verschiedenste Rezeptoren. Damit kann es auf afferente Stimuli von traditionellen Hormonsystemen (wie Insulin, Glukagon und Thyrotropin) wie auch des zentralen Nervensystems (ZNS), reagieren [41]. Die Bedeutung des Fettgewebes für die Glukosehomöostase zeigt sich an der Inzidenz von Typ-II- Diabetes und des metabolischen Syndroms bei Krankheiten, die mit einer Dysregulation des Fettgewebes einhergehen. Übergewicht bzw. Adipositas, besonders im viszeralen Kompartiment, ist, wie bereits erwähnt, mit Insulinresistenz und Hyperglykämie assoziiert. In Abwesenheit von Fettgewebe kommt es zur Ablagerung von Triglyzeriden in peripheren Geweben und zur Entstehung von Insulinresistenz. So zeigt sich bei bestimmten Lipodystrophien bei Nagern, wie auch beim Menschen, ein Bild, das dem des metabolischen Syndroms sehr ähnlich ist [42, 43].

## **1.6. Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptoren**

Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Historisch erhielten sie ihren Namen durch chemische Substanzen (bestimmte Herbizide, Weichmacher und lipidsenkende Substanzen), welche in Nagern zur Peroxisomproliferation führen. Diese Substanzen aktivieren außerdem ein Protein, welches zur Gruppe der nukleären Transkriptionsfaktoren gehört und als PPAR bezeichnet wurde [44]. Liganden (siehe 1.6.7.), die heute therapeutisch benutzt werden, führen nicht zur Peroxisomproliferation im Menschen [45]. PPARs weisen eine hohe Ähnlichkeit mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren, wie z.B. mit Retinoid- oder Kortikoidrezeptoren, bezüglich Struktur und Mechanismus auf. Große Unterschiede dagegen gibt es in der Art und Affinität der jeweiligen Liganden [46].

### **1.6.1. PPAR Subtypen und Struktur**

Bis heute konnten 3 verschiedene Subtypen von PPAR- Rezeptoren identifiziert werden: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und PPAR $\delta$  (auch als PPAR $\beta$  bezeichnet) [47]. Die Struktur ist in Abbildung 1.5. veranschaulicht.



**Abb. 1.5.: Organisation der murinen PPAR- Rezeptoren**

Alle PPARs besitzen: eine NH<sub>2</sub>- terminale Region, welche eine ligandenunabhängige-transkriptionelle Aktivierungsfunktion (AF-1) enthält; eine Kern- DNA-Bindungsdomäne (DBD), bestehend aus zwei hochkonservierten Zinkfingermotiven, die den Rezeptor zu spezifischen DNA- Sequenzen, definiert als Response-Elemente, dirigiert; eine Hinge (=Gelenk)- Region, die Proteinflexibilität für simultane Dimerisierung und DNA-Bindung erlaubt; eine räumlich große C- terminale Region, welche die Ligandenbindungsdomäne (LBD), ein Dimerisierungsinterface und eine ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF-2) beinhaltet [48]. Die Anordnung der Proteindomänen ist identisch und weist eine Homologie von ca. 70 % der LBD und ca. 85% der DBD für die verschiedenen PPAR- Subtypen auf [49]. Die beiden PPAR $\gamma$ -Isoformen unterscheiden sich durch zusätzliche 30 NH<sub>2</sub>- terminale Aminosäuren (AS) des PPAR $\gamma_2$  Proteins [50, 51]

### 1.6.2. Mechanismus

Nach Bindung eines synthetischen oder endogenen Liganden an nukleär lokalisiertes PPAR führt der dadurch induzierte Konformationswechsel zur Dimerisierung mit dem Retinolsäurerezeptor (RXR) [47]. Gleichzeitig dissoziieren Korepressoren vom Proteinkomplex ab, Koaktivatoren dagegen werden rekrutiert [52]. Eine Vielzahl dieser Kofaktoren, fähig mit PPAR $\gamma$  ligandenabhängig oder -unabhängig zu interagieren, sind beschrieben [53, 54]. Der entstehende Proteinkomplex bindet dann an bestimmte Sequenzen in Promoterregionen von Zielgenen, welche so durch Transaktivierung oder Transrepression in ihrer Expression gesteuert werden. Diese Erkennungssequenzen, charakterisiert durch einen Direct-Repeat (DR) AGGTCA, auch als PPAR $\gamma$ - *Response Element* (PPRE) bezeichnet, konnte im Promoter einer Vielzahl von PPAR $\gamma$ - regulierten

Genen identifiziert werden. Durch verschiedene enzymatische Aktivitäten (wie z.B. Histon- Acetyltransferase- Aktivität) der rekrutierten Kofaktoren wird infolge von Histonmodifizierungen und Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie die transkriptionelle Aktivität des Komplexes reguliert [54], was die Art und Ausmaß der Aktivierung bezüglich der beeinflussten Zielgene bestimmt. In Abbildung 1.6. ist dieser für ligandenaktivierte nukleäre Rezeptoren ermittelte Mechanismus dargestellt, mit dem *Nuclear receptor corepressor 1* (NCoR) und *Transcriptional intermediary factor 2* (TIF-2) als Beispiele für Kofaktoren. Durch eine Interaktion mit der AF-1 Domäne kann jedoch der Vorgang der transkriptionellen Aktivierung auch ligandenunabhängig geschehen, was am Beispiel von PPAR $\gamma_2$  und Insulin gezeigt wurde [50]. Neben diesen transkriptionellen Regulationen durch PPAR $\gamma$  können posttranskriptionelle und DNA-unabhängige Mechanismen nicht ausgeschlossen werden.

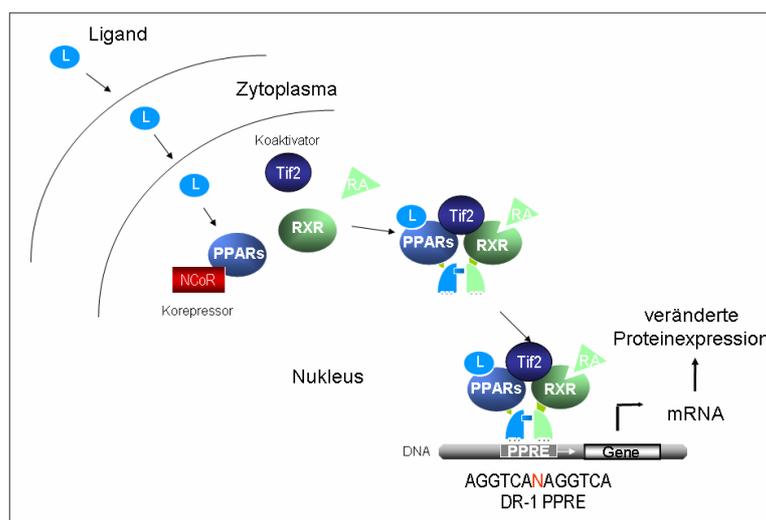


Abb. 1.6.: Molekularer Mechanismus der Genregulation durch PPAR $\gamma$

### 1.6.3. Expressionsmuster

PPAR $\gamma_1$  wird in der Milz, der Niere, der Leber, der Muskulatur, dem Darm, der Nebenniere und dem Fettgewebe exprimiert, wobei die Expressionsmuster zwischen Nagern und Menschen sehr ähnlich sind [47, 55]. Aber auch die Gefäßwand [56] und Makrophagen [56] exprimieren PPAR $\gamma_1$ . Bei Nagern findet man PPAR $\gamma$  außerdem im braunen Fettgewebe [57]. Die mit Abstand höchste Expression findet man im weißen Fettgewebe [57]. Im Gegensatz zur verbreiteten Expression von PPAR $\gamma_1$  wird PPAR $\gamma_2$  nur dort exprimiert [58].

#### 1.6.4. Funktionelle genetische Studien im murinen Modell und im Menschen

Ursprünglich galt PPAR $\gamma$  als insulinsensitivierendes Protein, was aber mit Hilfe von transgenen Mausmodellen und der Untersuchung von humanen Mutationen nicht unbedingt bestätigt werden konnte.

PPAR $\gamma$  (-/-) Mäuse starben während der intrauterinen Entwicklung infolge von Plazentadysfunktion [59]. Dadurch wird die physiologische Charakterisierung von PPAR $\gamma$  Defizienz auf die heterozygoten PPAR $\gamma$  (+/-) Mäuse reduziert. Überraschenderweise zeigen diese Tiere, die theoretisch nur ca. 50% Rezeptoraktivität durch die Auslöschung eines Alleles besitzen, unter einer Standarddiät ein normales Körpergewicht und eine vergleichbare Fettspeicherung [60]. Genauso erstaunlich war die Erhöhung der insulinstimulierten Glukoseverwertung [60]. Unter diätischen Bedingungen, die zu Gewichtszunahme führen, zeigten PPAR $\gamma$  (+/-) Mäuse eine geringere Gewichtszunahme und Fettakkumulation als ihre Wildtyp- Geschwister [60].

Beim Menschen führt eine Punktmutation im NH<sub>2</sub>-terminalen Teil von PPAR $\gamma_2$  in Position 12, die zum Tausch von Prolin zu Alanin führt (Pro12Ala), zu einer eingeschränkten Rezeptoraktivität [61]. Menschliche Träger dieser funktionseingeschränkten Mutante besitzen erhöhte Insulinsensitivität, einen geringeren BMI und ein günstigeres Lipidprofil [61-63]. Die Assoziation zwischen Alaninsubstitution und Insulinsensitivierung bleibt nicht bestehen, wenn die Daten zum BMI korrigiert werden, ein Umstand der darauf hinweist, dass es einen primären Effekt der Mutation auf die Körperfettakkumulation gibt [61]. Der Austausch von Prolin zu Glutamin an Position 115 (Pro115Gln) resultiert in einem konstitutiv aktivierten Protein durch eine Modulation der Mitogen- aktivierten Proteinkinasen (MAPK) Phosphorylierungsstelle am Serin 114 [64]. Phosphorylierung an diesem Serin führt zur Inhibierung der transkriptionellen Aktivierung [65]. Im Gegensatz zur Pro12Ala Mutation, ist diese Mutation eher selten [66]. Davon betroffene Individuen sind extrem adipös und insulinresistent, die meisten haben Diabetes [64].

Zusammengenommen unterstützen diese Studien die Hypothese, dass eine reduzierte PPAR $\gamma$ - Aktivierung die glykämische Kontrolle verbessert, was theoretisch im Gegensatz zur Wirkung der TZDs als PPAR $\gamma$ - Aktivatoren steht. Dieser Widerspruch ist noch nicht aufgeklärt. Er wird auch als PPAR $\gamma$ - Paradox bezeichnet [67] und unter 4.9. weiter diskutiert.

Neuere Hypothesen zielen auf eine moderate Aktivierung von PPAR $\gamma$  als den optimalen therapeutischen Ansatz, wobei eine verbesserte Insulinsensitivität ohne die TZD-typischen Nebenwirkungen erreicht werden soll (siehe 1.6.8.) [13, 67].

### 1.6.5. Die Rolle von PPAR $\gamma$ in der Fettzellendifferenzierung und im Adipozyten

Die Differenzierung von Fibroblasten/Prädipozyten zu Adipozyten spielt eine wichtige Rolle in der Physiologie des Fettgewebes. *In-vivo* können während des ganzen Lebens aus Vorläuferzellen neue Adipozyten entstehen [68]. Der Differenzierungsprozess, auch Adipogenese genannt, besteht aus verschiedenen Stadien: der frühen Zellzyklusregulation, der klonalen Expansionsphase und der terminalen Differenzierung [68, 69]. PPAR $\gamma$  spielt bei diesen Vorgängen als steuernder Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle. Er wird auch als „Masterregulator“ der Fettzellendifferenzierung bezeichnet. In Funktionsverlust- Experimenten konnte gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  notwendig für die Fettzellendifferenzierung ist [70]. Konfluent gewachsene Prädipozyten können *in-vitro* durch die Zugabe eines Hormoncocktails, bestehend aus Dexamethason, Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Insulin zum Differenzierungsvorgang angestoßen werden. Es läuft eine Kaskade von verstärkter Expression und Aktivierungen/Transaktivierungen verschiedener Transkriptionsfaktoren ab, wie den *CCAAT-enhanced* Bindungsproteinen (C/EBPs)  $\beta$  und  $\delta$ , die dann wiederum die Expression von PPAR $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  induzieren. Auch ein endogener PPAR $\gamma$  Ligand scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen [71]. In Abbildung 1.7. ist diese Differenzierungskaskade veranschaulicht.

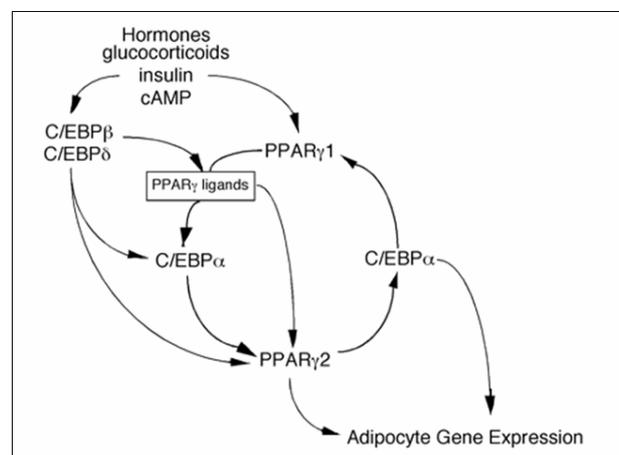


Abb. 1.7.: Differenzierungskaskade der Adipogenese, aus [72]

Eine Induktion von C/EBP $\alpha$  zusammen mit PPAR $\gamma$  führt zur Expression vieler fettzellspezifischer Gene, deren Promotoren Bindungsstellen für diese beiden Transkriptionsfaktoren enthalten. Die Expression dieser Proteine generiert in der terminalen Differenzierung eine Zelle, die fähig zur Synthese und Speicherung von Triglyzeriden ist und das morphologisch typische Erscheinungsbild eines Adipozyten aufweist. Wird dagegen im reifen Adipozyten die Expression von PPAR $\gamma$  vermindert (z.B. durch TNF $\alpha$ ) bzw. ektopisch dominant-negatives PPAR $\gamma$  transfiziert, so kommt es zur Dedifferenzierung der Adipozyten, charakterisiert durch verringerte Fetteinlagerung und Glukoseaufnahme sowie einer veränderter Expression der fettzellspezifischen Proteine [73, 74].

### 1.6.6. PPAR $\gamma$ außerhalb des Fettgewebes

Infolge der geringeren Expression von PPAR $\gamma$  wurde den anderen Organen wie Muskel und Leber primär weniger Beachtung geschenkt. Die Expression im Muskel beträgt nur ca. 5-10% im Vergleich zum Fettgewebe [75]. Die Muskulatur ist aber der quantitativ wichtigste Ort für insulininduzierte Glukoseverwertung (siehe 1.1.) und rückte deshalb wieder in den Vordergrund. Außerdem sollte die Rolle des Muskels für die TZD-Wirkung untersucht werden. Mit Hilfe der neu entwickelten Technik einer gewebespezifischen Ausschaltung eines Genes (Cre-LoxP Technik), konnten zwei muskelspezifische PPAR $\gamma$  *Knock-out* Mäuse generiert werden [76, 77]. Beide Modelle zeigten die Entstehung von Insulinresistenz in diesem Organ. Sekundäre negative Effekte wurden auch in der Leber und im Fettgewebe beobachtet. Somit scheint das im Muskel vorhandene PPAR $\gamma$  trotz seiner niedrigen Expression wichtig für die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase zu sein. Widersprüchliche Ergebnisse wurden bezüglich der Verbesserung der *Knock-out* bedingten Erniedrigung der Glukoseverwertung im Muskel durch den Einsatz von TZDs erzielt [76, 77]. Eine direkte Wirkung von TZDs auf Muskelzellen und deren Glukoseaufnahme, in Abhängigkeit von der PPAR $\gamma$ -Expression, konnte in *in-vitro* Experimenten bereits gezeigt werden [78].

### 1.6.7. Endogene/synthetische Liganden von PPAR $\gamma$

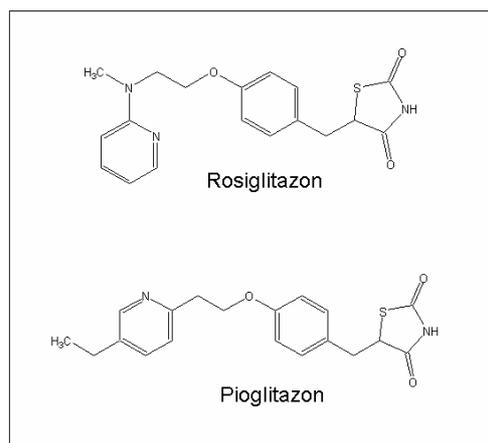
Die Identifizierung von endogenen und synthetischen Liganden für PPAR $\gamma$  spielte eine entscheidende Rolle für die Aufklärung der Rezeptorfunktion. Als endogene Liganden

für PPAR $\gamma$  wurden verschiedene lipophile Substanzen identifiziert. Diese sind meist natürliche Fettsäuren und Fettsäurederivate wie z.B. 15-deoxy-delta 12,14-Prostaglandin J<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>) [79] und diverse Eikosanoide [80, 81]. Kürzlich wurde Lysophosphatidische Säure als PPAR $\gamma$ -Ligand charakterisiert [82]. Keiner der erwähnten Verbindungen weist eine hohe Affinität zu PPAR $\gamma$  auf, so dass höchstwahrscheinlich noch andere endogene Liganden existieren. Die Beschreibung eines unbekanntes hochaffinen Liganden, freigesetzt während der Fettzeldifferenzierung, unterstützt diese These [71].

Synthetische Verbindungen, welche an PPAR $\gamma$  binden, sind die insulinsensitivierenden Thiazolidindione (TZD) [83-85], L-Tyrosin basierende Liganden [86], Fmoc-L-Leucin [87] und verschiedene nicht-steroidale Antiphlogistika [88]. PPAR $\gamma$  wurde ursprünglich als wichtiger Regulator der Adipogenese identifiziert (siehe 1.3.6.), spielt aber auch in der Zelldifferenzierung, Insulinsensitivierung, Inflammation, Atherosklerose und bei bestimmten Krebsformen eine wichtige Rolle [45, 52, 89, 90].

### 1.6.8. TZDs als Insulinsensitizer

Ein wichtiger Schritt im Verständnis erfolgte 1995 mit dem Nachweis der direkten Bindung der TZDs an PPAR $\gamma$  im nanomolaren Bereich [83]. Die Strukturen der auf dem Markt befindlichen TZDs sind in Abbildung 1.8. dargestellt.



**Abb. 1.8.: Struktur von Rosiglitazon und Pioglitazon**

Beide Substanzen besitzen die Thiazolidindionstruktur, Rosiglitazon enthält ein kettenverlängerndes tertiäres Amin

Die Bindungsaffinität korreliert dabei im Mausmodell mit den insulinsensitivierenden und hypoglykämischen Effekten. Die Wirkung dieser Substanzen im Menschen ist

jedoch schwächer als in den murinen Modellen von Insulinresistenz [37]. Durch die Verringerung der Insulinresistenz wird wieder mehr Glukose in die peripheren Organe wie Muskel und Fettgewebe aufgenommen. Außerdem kommt es durch eine Beeinflussung von Neudifferenzierung bzw. Apoptose zu einer Umstrukturierung des Fettgewebes mit mehr kleineren insulinsensitiveren Adipozyten. Die hepatische Glukoseausschüttung wird durch eine Hemmung der Glukoneogenese gedrosselt. Viele, wenn nicht alle von Adipozyten sezernierten Proteine werden durch TZDs in ihrer Expression geändert (vgl. 1.5.) [37, 48, 49, 91, 92]. Auch eine Fettumverteilung hin zu mehr subkutanem Fett findet statt [93]. Eine Zusammenfassung der Wirkungen von TZDs ist in Abbildung 1.9. dargestellt.

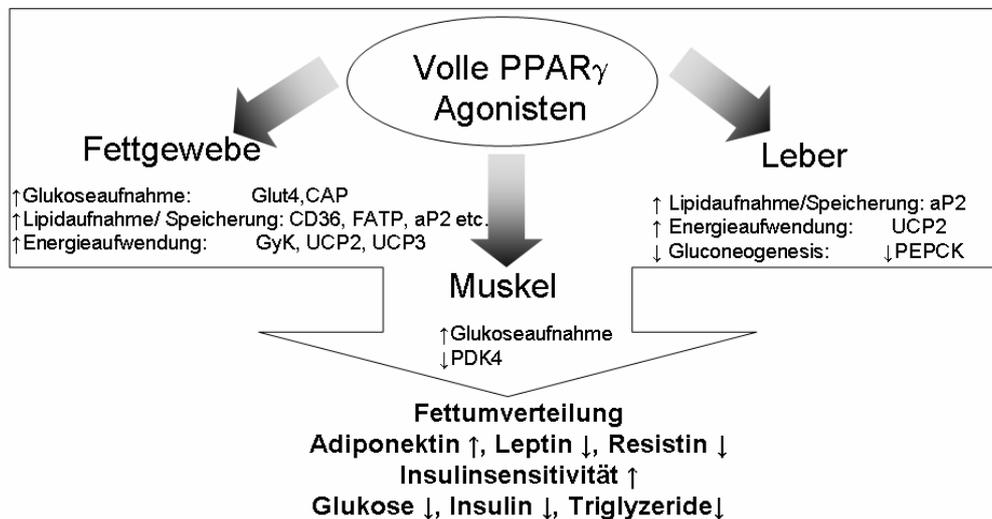


Abb. 1.9.: Insulinsensitivierung durch TZDs [48]

Troglitazon, als erster Vertreter dieser Substanzklasse, wurde 1997 zugelassen. Nach Berichten über schwere Hepatotoxizitäten mit letalem Ausgang, wurde die Substanz schnell wieder vom Markt genommen [94]. Seit dem Jahr 2000 sind Pioglitazon und Rosiglitazon in Deutschland als Begleittherapie zu Metformin oder Sulfonylharnstoffen zur Behandlung des Typ-II- Diabetes zugelassen. Seit kurzem darf Pioglitazon auch als Monotherapie eingesetzt werden [95]. Die Substanzklasse hat signifikante Nebenwirkungen, wie z.B. Flüssigkeitsretention mit verbundenen Ödembildungen, Gewichtszunahme und Herzinsuffizienz [37, 48, 96, 97]. Inwieweit die neueren Substanzen leberschädigendes Potential besitzen ist noch unklar. Risikopatienten sollten beim Einsatz von TZDs auf Leber- und Herzfunktion hin überwacht werden [37].

Die TZDs stellen eine interessante Substanzklasse dar, die eine grundlegende pathophysiologische Erscheinung des Typ-II-Diabetes, die Entstehung von

Insulinresistenz, bekämpft. Wegen der begrenzten Wirksamkeit und den beschriebenen Nebenwirkungen ist ihr Einsatz jedoch nur eingeschränkt möglich.

## **1.7. AT<sub>1</sub>- Antagonisten**

### **1.7.1. Historische Entwicklung**

Die Suche nach potenten Substanzen zur Behandlung von Bluthochdruck führte 1976 zur Patentierung von Captopril, dem ersten Vertreter aus der Klasse der ACE-Hemmer. Im Jahre 1981 wurde die Substanz in Deutschland zugelassen. Vorausgegangen waren neue Erkenntnisse über die Physiologie des Renin- Angiotensin- Systems (RAS), die ein wichtiges Enzym, das Angiotensin- konvertierende Enzym (ACE), als Angriffspunkt für einen Inhibitor aufklärten [98, 99]. Captopril hemmt irreversibel dieses Enzym und verhindert damit die Entstehung von Angiotensin II, welches zu starker Vasokonstriktion führt [100]. Die Entwicklung weiterer Derivate mit verbesserter Pharmakokinetik führte zu einem Pool von Substanzen, die auch heute noch eine starke Säule in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen sind [101]. Ein möglicher Nachteil all dieser Substanzen ist die Beeinflussung des Bradykininstoffwechsels, da das gehemmte Enzym außer Angiotensin I auch Bradykinin spaltet und inaktiviert [102, 103]. Erhöhte Bradykininspiegel können mit trockenem Reizhusten assoziiert sein [104, 105]. Außerdem kann trotz ACE-Inhibierung das kumulierende Angiotensin I durch andere Enzyme zu Angiotensin II gespalten werden [106]. Nach der Identifizierung und funktionellen Analyse der Rezeptoren von Angiotensin II, mit Hilfe von peptidischen Angiotensin II- Analoga und anderen synthetischen Strukturen [107], wurden diese Rezeptoren als neue Angriffspunkte für die RAS- Blockade untersucht. Im Jahr 1995 wurde dann der erste AT<sub>1</sub>- Antagonist Losartan auf dem deutschen Arzneimittelmarkt zur Hypertoniebehandlung zugelassen. Es folgten 1997 Valsartan, Eprosartan, Irbesartan und Candesartan, zwei Jahre später Telmisartan. Im Jahre 2002 erhielt Olmesartan die Zulassung [108].

### **1.7.2. Wirkmechanismus der AT<sub>1</sub>- Antagonisten**

Die meisten bekannten Effekte des Angiotensin II werden durch Interaktion mit zwei Subtypen von Rezeptoren vermittelt, dem AT<sub>1</sub>- und dem AT<sub>2</sub>- Rezeptor [109, 110]. Beide sind membranständige Rezeptoren mit 7 transmembranären Domänen, wobei nur

der AT<sub>1</sub>- Rezeptor ein typischer G-Protein gekoppelter Rezeptor ist. Der AT<sub>2</sub>- Rezeptor scheint auch G-Protein gekoppelt zu sein, besitzt jedoch eine atypische intrazelluläre Signaltransduktion mit z.B. einer Reihe von Bindungsproteinen [111-113]. Stimulation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors führt zu Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung, Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, Natriumretention, Aktivierung von NF-kappa-B, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und proinflammatorischer Zytokine sowie Aktivierung von Matrix- Metalloproteinasen [114]. AT<sub>1</sub>- Antagonisten sind kompetitive Antagonisten des Angiotensin II an diesem Rezeptor. Durch die lange Halbwertszeit des Antagonist-Rezeptor- Komplexes kann Angiotensin II auch in hohen Dosen den Antagonisten nicht verdrängen [115, 116]. Eine Blockade führt zu potenter Blutdrucksenkung, der je nach Kinetik des Antagonisten bis 24 Stunden anhält [117]. Eine kompensatorische Erhöhung der Angiotensin II- Blutspiegel kann diese Blockade durch den oben erwähnten Effekt nicht überwinden. Außerdem lässt die AT<sub>1</sub>- Blockade weiterhin die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch Angiotensin II zu, welcher in vielen Beziehungen als ein Gegenspieler des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gilt und positive Effekte auf das kardiovaskuläre und auch andere Systeme vermittelt [118-121]. Eine vereinfachte Übersicht über das RAS mit dem Angriffspunkt der AT<sub>1</sub>- Antagonisten ist in Abbildung 1.10. dargestellt.

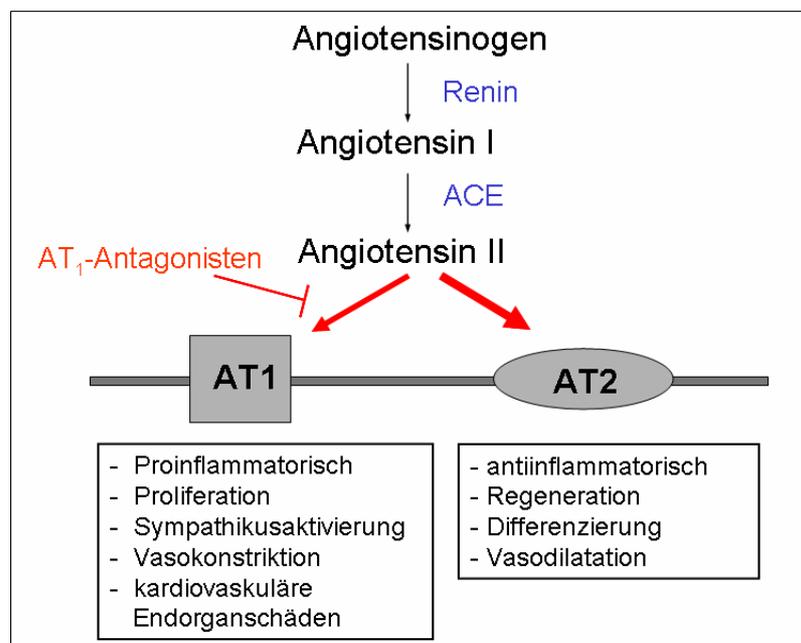


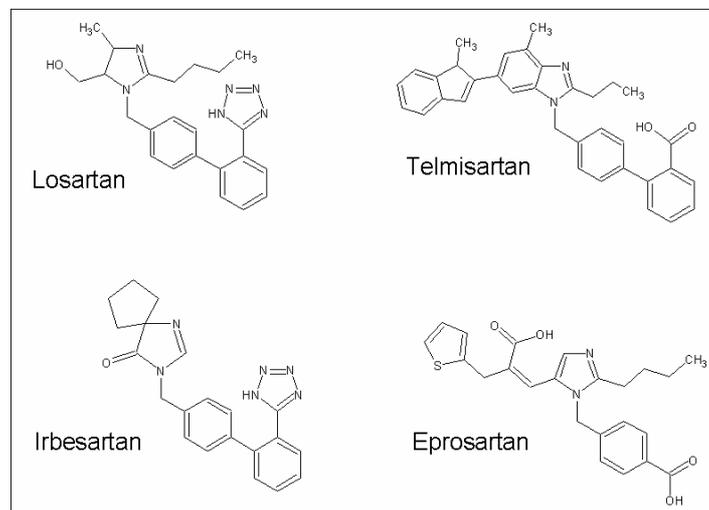
Abb. 1.10.: RAS mit Angriffspunkt der AT<sub>1</sub>-Antagonisten

Durch fehlende Interaktionen mit dem Bradykininmetabolismus tritt außerdem der unter ACE- Hemmern beschriebene Reizhusten nicht auf [122]. Zusätzlich wird eine

sympathikushemmende Wirkung der  $AT_1$ - Antagonisten beschrieben, die durch eine Blockade von präsynaptischen  $AT_1$ - Rezeptoren in sympathisch innervierten Nervenendigungen erklärt wird [123, 124].

### 1.7.3. Struktur und Hemmkonzentrationen der $AT_1$ - Antagonisten

Im Unterschied zum ersten experimentell eingesetzten  $AT_1$ -Antagonisten Saralasin [125-127], handelt es sich bei den zugelassenen Substanzen nicht um Peptide. Es lassen sich drei verschiedene Grundstrukturen unterscheiden: substituierte Biphenyle, substituierte Biphenyltetrazole und Nichtbiphenylstrukturen. In Abbildung 1.11. sind die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten  $AT_1$ - Antagonisten dargestellt.



**Abb. 1.11.: Strukturformeln der verwendeten  $AT_1$ -Antagonisten**

Bei Losartan, Telmisartan und Irbesartan handelt es sich um Strukturen mit Biphenylgrundkörper, wobei Telmisartan anstatt des Tetrazolringes eine Säuregruppe besitzt. Eprosartan hingegen besitzt ein Imidazol, welches mit einer Benzylcarbonsäure substituiert ist.

Die Bindungsaffinitäten der  $AT_1$ - Antagonisten zum  $AT_1$ -Rezeptor sind bei Substanzen mit Biphenylstruktur sehr ähnlich. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen im einstelligen nM- Bereich [115]. Bei Losartan wird dabei auch der Metabolit EXP3174 (Hydroxygruppe durch CYP2C9 zur Carbonsäure oxidiert) betrachtet, welcher höhere Affinität und auch längere Halbwertszeit als die Ausgangssubstanz an sich besitzt [115, 128]. Die Rezeptoraffinitäten und Halbwertszeiten sind in Tabelle 1.2. dargestellt.

Parameter	Eprosartan	Irbesartan	Losartan (EXP3174)	Telmisartan
Rezeptoraffinität IC <sub>50</sub> (nM L <sup>-1</sup> )	1.5-9.2	0.8-4.1	8.9-19(3.4-3.7)	3.7
Eliminations-Halbwertszeit (h)	5-9	11-15	1-2.5 (5-9)	24
Orale Erhaltungsdosis (mg)	600-800	150-300	50-100	20-80

**Tabelle 1.2.: Pharmakokinetik und Standarddosen der verwendeten AT<sub>1</sub>- Antagonisten [117, 129]**

#### 1.7.4. Die Blockade des RAS und Diabetes

Neben der Beteiligung des RAS bei kardiovaskulären Erkrankungen werden verstärkt die Einflüsse auf metabolische Vorgänge untersucht [130]. Die Bedeutung des RAS bei der Entstehung von Typ-II-Diabetes ist nicht vollständig geklärt. Interessanterweise wird verstärkt die Rolle lokaler RAS untersucht [131], die parakrine Effekte haben und organspezifisch reguliert sind. Ein solches System existiert zum Beispiel im Fettgewebe. Seine Rolle bei der Entstehung von Typ-II- Diabetes ist Gegenstand derzeitiger Forschung [40]. Die Ergebnisse großer klinischer Studien mit ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>- Antagonisten konnten bereits zeigen, dass diese Substanzen sich in vielerlei Hinsicht günstig auf Typ-II- Diabetes assoziierte Symptome auswirken. Ein Beispiel hierfür ist die diabetische Nephropathie [132, 133]. Außer den positiven Effekten bei Typ-II- Diabetikern zeigte sich außerdem eine Verminderung von diabetischen Neuerkrankungen bei Hypertonikern bzw. kardiovaskulären Hochrisikopatienten. Dieser Effekt wurde sowohl bei ACE-Hemmern (CAPPP- und HOPE- Studien) als auch bei AT<sub>1</sub>- Antagonisten (LIFE-, CHARM- und VALUE-Studien) beobachtet [134-138].

Der zugrunde liegende Mechanismus bei den ACE- Hemmern scheint die Interaktion mit dem Bradykininstoffwechsel und eine resultierende Insulinsensitivierung zu sein [139-141]. Wie die Einnahme von AT<sub>1</sub>- Antagonisten zur Verminderung der Typ-II-Diabetes Neuerkrankungen führt, ist bisher nicht aufgeklärt.

#### 1.8. Hypothese und Zielsetzung

Im Jahre 2002 wurde eine Studie in „Diabetes“ veröffentlicht, welche sich mit der Rolle des lokalen RAS während der Fettzellendifferenzierung beschäftigte [142]. Janke und Kollegen differenzierten humane Präadipozyten *in-vitro* zu Adipozyten und

untersuchten Lipideinlagerung und fettzellspezifische Genexpression. Eine der experimentellen Bedingungen war es, die Differenzierung in Anwesenheit des AT<sub>1</sub>-Antagonisten Irbesartan durchzuführen. Wie in Abbildung 1.12. zu erkennen ist, erhöhte sich mit zunehmender Irbesartankonzentration die Menge an eingelagerten Lipiden. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors die Adipogenese verstärkt und damit die Menge der eingelagerten Lipide vergrößert.

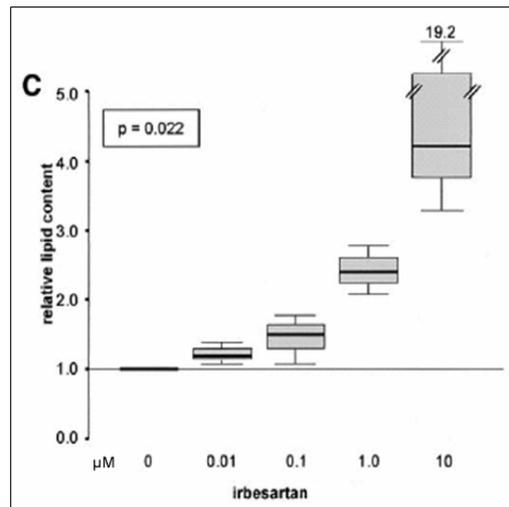


Abb. 1.12.: Einfluss von Irbesartan auf Lipideinlagerung, aus [142]

Prinzipiell erscheint diese Schlussfolgerung logisch, jedoch gab es zwei widersprüchliche Punkte:

1. Adipozyten sezernieren Angiotensinogen [41, 142], ob jedoch daraus Angiotensin II in diesen Zellen entstehen kann ist noch unklar. Da auch kein zusätzliches Angiotensin II zugegeben und das Zellmedium kein bovines Serum enthielt, dürfte sich die Konzentration von Angiotensin II im nicht nachweisbaren Bereich befinden. Somit wäre eine Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, wegen des Mangels an natürlichem Liganden, weniger relevant.
2. Wenn man sich die Bindungsaffinitäten der AT<sub>1</sub>-Antagonisten betrachtet, die wie bereits erwähnt im niedrigen nM- Bereich liegen (d.h. bei 10 nM bzw. 100nM sind praktisch alle AT<sub>1</sub>-Rezeptoren geblockt), so fällt es auf, dass die nötigen Konzentrationen von Irbesartan für die Erhöhung der Lipideinlagerung in einer anderen Dimension liegen (1 bzw. 10µM Irbesartan)

Die daraus entstehende Hypothese ist, dass AT<sub>1</sub>-Antagonisten einen zusätzlichen Einfluß auf die Fettzelldifferenzierung- bzw. Funktion haben, welcher womöglich

unabhängig von der AT<sub>1</sub>- Blockade ist und der ihre metabolischen Effekte erklären könnte.

Die Zielstellung dieser Arbeit ist es:

1. aufzuklären, ob AT<sub>1</sub>-Antagonisten einen direkten Einfluß auf den „Masterregulator“ der Fettzellendifferenzierung PPAR $\gamma$  haben, und
2. die bestehenden Interaktionen näher zu charakterisieren.