

Pharmakologie und Toxikologie

**ANGIOTENSIN-REZEPTOREN UND PEPTIDE ALS BESTANDTEIL
EINES PARAKRINEN ANGIOTENSIN-SYSTEMS IM FETTGEWEBE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Felix Weiland
aus München

-2005-

Dekan:	Prof. Dr. B. Wunsch
Erster Gutacher:	Prof. Dr. E.J. Verspohl
Zweiter Gutacher:	Prof. Dr. H. Glasl
Tag der mündlichen Prüfungen:	13.10.2005/ 19.10.2005/ 20.10.2005
Tag der Promotion:	20.10.2005

MEINER FAMILIE, MEINEN FREUNDEN, MEINER LIEBE

1	EINLEITUNG	1
1.1	GRUNDLAGEN DES METABOLISCHEN SYNDROMS	1
1.1.1	Bedeutung des Fettgewebes	4
1.1.2	Lokale Effektoren im weissen Fettgewebe	7
1.1.3	Klinische Studien	8
1.2	DAS FETTGEWEBE	11
1.2.1	Aufbau des Fettgewebes	12
1.2.2	Funktion des Fettgewebes	12
1.2.3	Die Entwicklung des weissen Fettgewebes	14
1.2.3.1	Frühphase der Differenzierung	14
1.2.3.2	Mittlere Phase der Differenzierung	14
1.2.3.3	Terminale Phase der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten	14
1.2.3.4	Postrezeptorkopplung während der terminalen Phase der Fettzellendifferenzierung	19
1.3	DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM	21
1.3.1	Rezeptoren des RAA-Systems	23
1.3.1.1	AT ₁ -Rezeptoren	23
1.3.1.2	AT ₂ -Rezeptoren	24
1.3.1.3	AT ₁ /AT ₂ -Rezeptor-Dimere	26
1.3.1.4	Angiotensin (1-7) Rezeptoren/ Mas	27
1.3.1.5	Angiotensin IV Rezeptoren/ IRAP	29
1.3.2	Bildung der Angiotensin-Peptide	32
1.3.3	Angiotensin-Peptide	35
1.3.3.1	Angiotensinogen	35
1.3.3.2	Angiotensin (2-10)	35
1.3.3.3	Angiotensin II (1-8)	35
1.3.3.4	Angiotensin III (2-8)	36
1.3.3.5	Angiotensin IV (3-8)	36
1.3.3.6	Angiotensin (1-7)	36
1.3.4	Enzyme des Angiotensinogen Metabolismus	37
1.3.4.1	Renin	37
1.3.4.2	ACE-1	38
1.3.4.3	ACE-2	38
1.3.4.4	Nepriylisin	39
1.3.4.5	α -Chymase	40
1.3.4.6	Aminopeptidasen	40
1.3.5	Das parakrine RA-System des Fettgewebes	41
1.3.6	Weitere lokale Angiotensin-Systeme	42

2	MATERIAL	44
<hr/>		
2.1	ZELLINIEN	44
2.1.1	INS-1	44
2.1.2	3T3-L1	44
2.1.3	3T3-F442A	44
2.2	ZELLKULTUR	45
2.3	SONSTIGE CHEMIKALIEN	48
2.4	REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN, RADIOAKTIVE ASSAYS	50
2.5	IRAP-ENZYM ASSAY	51
2.6	[³H]2-DESOXYGLUKOSE-AUFNAHME	52
2.7	INSULIN-SEKRETIONSVERSUCHE, INSULIN-RIA	52
2.8	KAPILLARELEKTROPHORESE	53
3	METHODEN	54
<hr/>		
3.1	ZELLKULTUR	54
3.1.1	INS-1 Zellen	54
3.1.2	Prädipozytäre Zelllinien	54
3.1.2.1	3T3-L1 Prädipozyten	54
3.1.2.2	3T3-F442A Prädipozyten	58
3.2	ÖLROT-FÄRBUNG	59
3.3	REZEPTORBINDUNGS-STUDIEN	61
3.3.1	Suspensionsmethode	61
3.3.2	Lysemethode	62
3.3.3	Bestimmung der steady state Bindung	63
3.4	SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE	63
3.5	IRAP-ENZYM ASSAY	64
3.6	[³H]2-DESOXYGLUKOSE-AUFNAHME	65
3.7	KAPILLARELEKTROPHORESE	66
3.7.1	Methode A: Biuret-UV-Detektion im Alkalischen	69
3.7.2	Methode B: UV-Detektion im Sauren	71
3.8	INSULIN-SEKRETIONSVERSUCHE, INSULIN-RIA	73

4	ERGEBNISSE	74
4.1	VERDRÄNGUNGSVERSUCHE	74
4.1.1	¹²⁵ I-Angiotensin II (1-8)	74
4.1.2	¹²⁵ I-(Sar1;Ile8)-Angiotensin II (1-8)	77
4.1.3	¹²⁵ I-CGP-42112A	79
4.1.4	¹²⁵ I-D-Pro7-ANG II (1-7)	81
4.1.5	¹²⁵ I-Angiotensin IV (3-8)	82
4.2	SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE	85
4.3	IRAP-ENZYMSSAY	88
4.3.1	Vorversuche	88
4.3.2	IC ₅₀ -Bestimmung der Angiotensin-Peptide	89
4.3.3	ANG III (2-8) als AT ₄ -Agonist	90
4.3.4	Zeitabhängige Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	90
4.3.5	Nle1-ANG IV als stabiles ANG IV-Analogen	92
4.3.6	IRAP-Aktivität in Gegenwart von Zink-Ionen	92
4.3.7	IRAP-Aktivität bei unterschiedlichen Differenzierungsstadien	93
4.4	[³H]2-DESOXYGLUKOSE-AUFNAHME	94
4.5	KAPILLARELEKTROPHORESE	95
4.5.1	Methode A: Trennung bei alkalischem pH	95
4.5.1.1	Bestimmung des AGT (1-14) Abbaus	95
4.5.1.2	Bestimmung des ANG I (1-10) Abbaus	96
4.5.2	Methode B: Trennung bei saurem pH	97
4.5.2.1	Abbau von ANG I (1-10)	97
4.5.2.2	Abbau von ANG (1-9)	100
4.5.2.3	Abbau von ANG II (1-8)	100
4.5.2.4	Abbau von ANG (1-7)	101
4.5.2.5	Abbau von ANG III (2-8)	103
4.5.2.6	Abbau von ANG IV (3-8)	103
4.6	UNTERSUCHUNGEN AN INSULINOMA-ZELLEN (INS-1)	105
4.6.1	IRAP-Assay	105
4.6.2	Insulin-Sekretion, RIA	106

5	DISKUSSION	107
5.1	G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN	107
5.1.1	Methodenkritik	107
5.1.2	Literaturvergleich	109
5.1.3	Nachweis des Mas-Rezeptors	110
5.1.4	AT ₁ /AT ₂ -Rezeptoren in Präadipozyten	111
5.1.5	AT ₁ /AT ₂ -Rezeptoren in Adipozyten	111
5.1.6	Bedeutung der niederaffinen Bindungsstelle	112
5.2	AT₄-REZEPTOREN	115
5.2.1	Methodenkritik	115
5.2.2	Literaturvergleich	116
5.2.3	Bedeutung des AT ₄ -Rezeptors	118
5.3	ANGIOTENSIN-METABOLISMUS IM FETTGEWEBE	120
5.3.1	Methodenkritik	120
5.3.2	Literaturvergleich	121
6	ZUSAMMENFASSUNG	124
6.1	ERGEBNISSE	124
6.2	SCHLUSSFOLGERUNGEN	126
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	127
8	LITERATURVERZEICHNIS	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-779	D-Ala7-ANG (1-7)
ACE	Angiotensin converting enzyme
AGT	Angiotensinogen
ANG	Angiotensin
AP	Aminopeptidase
aP2	Adipocyte-specific fatty acid-binding protein
ATx	Angiotensin Rezeptor Subtyp x
B2	Bradykinin Rezeptor Subtyp 2
BSA	Bovines Serum Albumin
CE	Capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
C/EBP	CCAAT/ Enhancer binding Protein
CGP42112A	Nikotinsäure-(N- α -benzyloxycarbonyl-Arg)-Lys-His-Pro-Ile-OH
Chy	Chymase
CPM	Counts per minute
DAA-I	Des-Aspartat-Angiotensin I
DAP	Diaminopeptidase
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
EC27	AP-N-Inhibitor: (S)-2-amino-pentan-1,5-dithiol
EC33	AP-A-Inhibitor: (S)-3-amino-4-mercaptobutyl sulfonic acid
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale NO-Synthetase
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FAAR	Fatty acid activated receptor
FAS	Fatty acid synthetase
FCS	Fetal calf serum
FS	Fused silica (Quarzglas)
GLUT	Glukosetransporter
GPDH (GAPDH)	Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBMX	1-Methyl-3-isobutylxanthine
IGF	Insulin like growth factor
IRAP	Insulin regulated aminopeptidase

IRS	Insulin receptor substrate
I.D.	Inner diameter (Innendurchmesser)
I.U.	International Units
JAK	Janus kinase
JHF-27A	dualer DAP und NEP-Inhibitor
K _D	Dissoziationskonstante
Leu-NA	Leucyl-β-Naphthylamid
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
MALDI	Matrix assisted Laser desorbed ionisation
MAP	Mitogen associated protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase
mRNA	Messenger RNA
NA	β-Amino-Naphthalin
NCS	Neonatal calf serum
NEP	Nepriylsin; Neutrale Endopeptidase
NLE	Norleucin
NSB	Nonspecific binding (unspezifische Bindung)
O.D.	Outer diameter (Aussendurchmesser)
PAI-1	Plasminogen-Activator Inhibitor 1
PC18	Unselektiver AP-Inhibitor: 2-amino-4-methylsulphonylbutane thiol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEP	Prolyl-Endopeptidase
PG-I ₂	Prostaglandin I ₂
PLC	Phospholipase C
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptors
PPRE	PPAR response element
PREF-1	Preadipocyte factor 1
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
RAS/Raf	Subklasse kleiner G-Proteine
RIA	Radioimmunoassay
RPM	Rounds per minute
RXR	Retinoid x receptor
SARILE	(Sar1;Ile8)-Angiotensin II (1-8)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
VSMC	Vascular smooth muscle cells (glatte Gefäßmuskelzelle)

1 EINLEITUNG

1.1 GRUNDLAGEN DES METABOLISCHEN SYNDROMS

Seit langem ist bekannt, dass Störungen der Glukosehomöostase mit Insulinresistenz, Hypertonie, Lipidstoffwechselstörungen, erhöhter Thromboseneigung und Adipositas vergesellschaftet sind¹. Abdominales Übergewicht mit einer Akkumulation viszeralen Fettgewebes gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung einer Hypertonie² und ist gleichzeitig mit einer Insulinresistenz³ und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert⁴. Diese Koexistenz verschiedener Störungen wird als metabolisches Syndrom bezeichnet.

Außerdem ist Adipositas mit einer Vielzahl funktioneller und morphologischer Veränderungen assoziiert. Dies sind u.a.: Natrium-Retention⁵, renale Hyperfiltration, endotheliale Dysfunktion, Linksherzhypertrophie, Mikroalbuminurie und erhöhte Konzentrationen an Entzündungsmarkern^{6,7}. Damit gilt Adipositas als ein wichtiger Indikator für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität².

Bis heute stehen nur Arzneistoffe zur Verfügung, die einzelne Symptome des metabolischen Syndroms therapieren können. Eine Kausaltherapie ist mit den üblichen Therapeutika bisher nicht möglich. Die genauen Ursachen für die Koexistenz der einzelnen Krankheitsbilder sind dabei immer noch nicht geklärt.

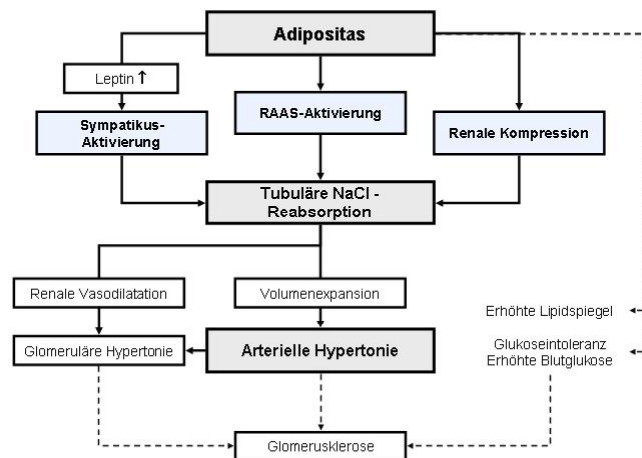
MECHANISMEN DER ADIPOSITAS-ASSOZIIERTEN HYPERTONIE

Eine Natrium-Retention scheint bei der Vergesellschaftung von Hypertonie und Adipositas von zentraler Bedeutung zu sein (s. Abbildung 1-1). Dafür kommen prinzipiell drei Mechanismen in Frage⁸.

- **AKTIVIERUNG DES SYMPATHISCHEN NERVENSYSTEMS**

Vor allem im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Adipositas mit einem erhöhten Sympathikustonius und damit auch mit einer Natrium-Retention vergesellschaftet ist. Das aus den Fettzellen sezernierte Hormon Leptin ist an der zentralen Sympathikusaktivierung beteiligt, um den Appetit zu hemmen und die Thermogenese im braunen Fettgewebe zu stimulieren. Bei adipösen Menschen sind die Leptinplasmaspiegel erhöht.

Abbildung 1-1: Ursachen der Adipositas-assoziierten Hypertonie¹



Nierenkompression, RAAS^{II}-Aktivierung und Sympathikusaktivierung erhöhen die tubuläre Natriumresorption bis zur arteriellen Hypertonie.⁸

- **ANATOMISCHE VERÄNDERUNGEN DER NIERE**

Die Nieren sind von einer Fettgewebsschicht eingekapselt. Bei adipösen Patienten kann das umgebende Fettgewebe in das Nierengewebe penetrieren und über eine Kompression der Niere zu erhöhten intrarenalen Drücken führen. Eine Verstärkung der Natriumretention, Volumenexpansion und Erhöhung des Blutdrucks sind die Folge, auch eine Albuminurie kann begünstigt werden.

- **AKTIVIERUNG DES RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS (RAS)**

Die Aktivierung des RAS im Fettgewebe könnte mehrfach an der Entstehung der Hypertonie beteiligt sein. Das Fettgewebe ist neben der Leber eine der bedeutendsten Produktionsstätten von Angiotensinogen (AGT). Beim Menschen sind die AGT-mRNA^{III} Konzentrationen im viszeralen Fettgewebe höher als im subkutanen Fettgewebe. Zusammen mit erhöhter Renin-Aktivität durch eine

¹ Abbildung in Anlehnung an Hall (2003)

^{II} RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron System

^{III} mRNA = messenger RNA

Sympathikusaktivierung kann das Fettgewebe eine ANG II^{IV} vermittelte Hypertonie begünstigen⁹. Auf der anderen Seite beeinflussen lokal gebildete Angiotensin-Peptide die Fettzellentwicklung und die Speicherung von Lipiden.

PPAR γ -AGONISTEN

Die Markteinführung der Glitazone (Thiazolidindione, PPAR γ -Agonisten) als orale Antidiabetika mit antihypertonen und lipidsenkenden Nebenwirkungen eröffnete eine Option auf die parallele Behandlung mehrerer Symptome gleichzeitig¹⁰. Allerdings sind antihypertone und lipidsenkende Eigenschaften dieser Substanzgruppe nicht ausreichend ausgeprägt, um auf eine Begleittherapie des Diabetes mellitus mit Antihypertonika und Lipidsenkern verzichten zu können. Die klinische Bedeutung der antihypertonen und lipidsenkenden Nebenwirkungen einer Glitazontherapie lassen sich noch nicht abschätzen, genauso ist das molekulare Verständnis für diese Nebeneffekte noch lange nicht ausreichend¹¹. Aussagekräftige Langzeitstudien, die zum einen Mortalität und Morbidität als harte Endpunkte einschließen und auch die Diabetesmanifestierung untersuchen, sind noch nicht abgeschlossen^{12,13}. Die Ergebnisse der DREAM und der ONTARGET-Studie, welche die Diabetesmanifestierung als Endpunkt einschließen, könnten für die Entwicklung neuer Arzneistoffe mitentscheidend sein.

Die PPARs^V sind dabei für die Entwicklung neuer Arzneistoffe von besonderem Interesse. Der Subtyp PPAR α wird durch die lipidsenkenden Fibrate und der Subtyp PPAR γ durch die Glitazone aktiviert. Da gerade Typ 2 Diabetiker von der Therapie mit Fibraten profitieren, bieten sich kombinierte PPAR α/γ Agonisten als neue Therapeutika an. Farglitazar (NovoNordisk), Tesaglitazar (AstraZeneca) und MK-0767 (Merck) befinden sich als Substanzen dieser Gruppe in Phase III der klinischen Entwicklung.

^{IV} ANG = Angiotensin

^V PPAR = peroxisome proliferator activated receptor

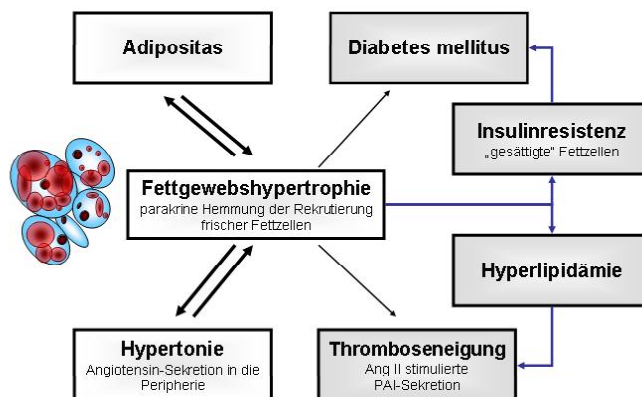
1.1.1 BEDEUTUNG DES FETTGEWEBES

Von zentraler Bedeutung für das metabolische Syndrom scheint das Fettgewebe zu sein. Es ist das Hauptzielorgan der Thiazolidindione. Lange Zeit wurde das Fettgewebe als reines Speichergewebe betrachtet. Spätestens seit der Entdeckung des Leptins muss diese Betrachtung deutlich revidiert werden, hin zu einem Gewebe mit metabolischer, sekretorischer und regulatorischer Funktion.

Neben Leptin sezerniert das Fettgewebe u.a. $TNF-\alpha^{VI}$, Adiponectin, $PAI-1^{VII}$, Interleukine und Faktoren des Komplementsystems. Systemisch hemmt sekretiertes PAI-1 die Fibrinolyse und könnte mit einer erhöhten Thromboseneigung verbunden sein¹⁴. $TNF-\alpha$, Interleukine und Faktoren des Komplementsystems sind an Immunprozessen und entzündlichen Erkrankungen beteiligt. Die Angiotensinogen-Produktion des Fettgewebes kann nicht nur systemische Effekte hervorrufen, sondern zusammen mit weiteren Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems auch von parakriner Bedeutung sein.

Geht man davon aus, dass das Fettgewebe das primäre Zielorgan des Insulins ist, so lässt sich ein insulinresistenter Diabetes mellitus als eine fehlende metabolische Funktion des Fettgewebes darstellen. Eine fehlende Antwort des Fettgewebes auf Insulin führt damit zu einer Hyperglykämie und gleichzeitig zu einer Hyperlipidämie, wie es für das metabolische Syndrom typisch ist. Dies kann als ein erstes Indiz für die zentrale Funktion des Fettgewebes gewertet werden (s. Abbildung 1-2).

Abbildung 1-2: Das Fettgewebe als Bindeglied des metabolischen Syndroms



Fettgewebshypertrophie, Adipositas und Hypertonie begünstigen Symptome des metabolischen Syndroms

Ausgehend von dieser zentralen Funktion muss ein komplettes Fehlen des Fettgewebes zu einem ähnlichen klinischen Bild führen wie ein insulinresistentes Fettgewebe. Dies lässt sich bei lipodystrophischen Erkrankungen wie dem Berardinelli-Syndrom beobachten¹⁵. Dieser genetische Defekt führt zu einer progressiven Atrophie des Fettgewebes. Der Verlust des Fettgewebes geht mit der

^{VI} $TNF-\alpha$ = Tumor-necrosis-factor- α

^{VII} PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1

Entwicklung eines mit Insulin nicht therapierbaren Diabetes mellitus und Lipidstoffwechselstörungen einher¹⁶.

Eine Störung des Fettgewebes ist somit mit Insulinresistenz bis hin zu Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Adipositas vergesellschaftet. Die Sekretion von Adipokinen verstärkt dabei parakrin und autokrin die Insulinresistenz.

Da ausdifferenzierte Adipozyten nicht mehr in der Lage sind sich mitotisch zu teilen, muss die Rekrutierung frischer Adipozyten aus den entsprechenden Vorläuferzellen, den Präadipozyten, erfolgen. Diese mitotische Teilung der Präadipozyten und die darauf folgende Differenzierung zu erwachsenen Adipozyten wird als „adipose tissue remodeling“ bezeichnet.

„ADIPOSE TISSUE REMODELING“

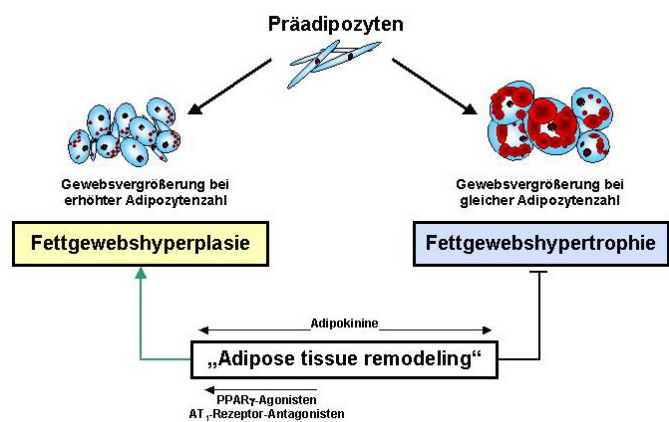
Insgesamt kann der Organismus auf ein unphysiologisches Überangebot an Glukose und Lipiden auf zwei Arten reagieren:

- Durch Erhöhung der Zellzahl **(adipozytäre Hyperplasie)**
- Durch Vergrößerung der Zelle **(adipozytäre Hypertrophie)**

Bei einer Vergrößerung der Zellen entsteht Fettgewebe mit hyperplastischen Riesenzellen, die durch gemästete Lipidvakuolen gekennzeichnet sind. Diese Zellen sind oftmals hochgradig insulinresistent und sezernieren resistenzfördernde Adipokine¹⁷ (s. Abbildung 1-3).

Zum anderen kann sich das Fettgewebe durch eine Erhöhung der Zellzahl bei gleichbleibender Zellgröße anpassen: Im Rahmen des „adipose tissue remodeling“ entsteht ein hyperplastisches Fettgewebe aus einer Vielzahl kleiner Adipozyten. Dieses ist noch in der Lage Nahrungsbestandteile in Antwort auf Insulin zu speichern. Diese Zellen sind hochgradig insulinsensitiv.

Abbildung 1-3: Adipose tissue remodeling



Glitazone und Losartan begünstigen die Ausbildung einer Hyperplasie mit kleinen insulinsensitiven Adipozyten.

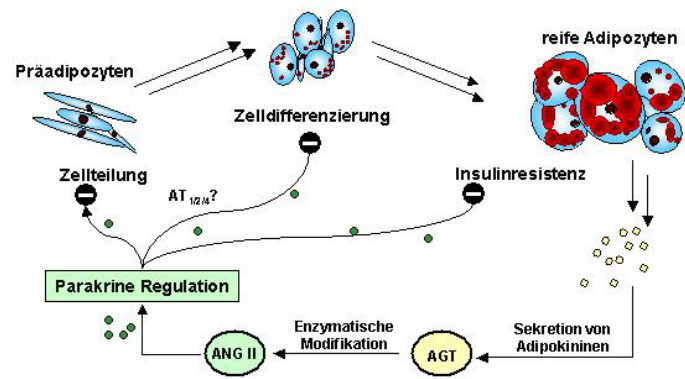
Die Proliferation der Präadipozyten, die Adipozytenkonversion und die Regulation der Adipozytengröße unterliegen dabei einer strengen autokrinen, parakrinen und endokrinen Kontrolle. Dabei ist neben der Zell-Zell-Kommunikation auch das Zusammenspiel verschiedener Gewebe zu beachten¹⁸. Während der Fettzellentwicklung befinden sich Präadipozyten im engen Kontakt mit vaskulären

Endothelzellen, welche z.B. über eine neutrale Endopeptidase in der Lage sind, ANG (1-7)^{VIII} zu bilden. Die Fettgewebshomöostase hängt von einem Gleichgewicht lokal formierter Wachstumsstimulatoren und –inhibitoren ab¹⁷.

PARAKRINE REGULATION DES ADIPOSE TISSUE REMODELINGS

Gemästete insulinresistente Adipozyten hemmen die Rekrutierung von Präadipozyten. In Kokultivierungsexperimenten konnte diese Hemmung durch Zugabe von Losartan als AT₁-Rezeptor-Antagonist aufgehoben werden¹⁹. Dies spricht für eine Beteiligung von Angiotensin-Peptiden und Rezeptoren an der Fettzellentwicklung²⁰⁻²² (s. Abbildung 1-4).

Abbildung 1-4: Angiotensin vermittelte Hemmung der Adipozytenrekrutierung



Erwachsene Adipozyten hemmen die Differenzierung kokultivierter Präadipozyten. Losartanzugabe hebt diese Hemmung wieder auf. ACE-Inhibitoren zeigen *in vitro* keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung, besitzen aber *in vivo* ein vergleichbares antidiabetisches Potential.

Fraglich bleibt, ob die Hemmwirkung der erwachsenen Adipozyten dem AT₁-Rezeptor zuzuordnen ist. Ein knockout des AT₂-Rezeptors reduziert ebenfalls die Zellgröße bei erhöhter Zellzahl²³. Eine Hemmung negativer Feedback-Mechanismen durch Losartan in einem parakrinen System, könnte in der vermehrten Bildung verwandter Angiotensin-Peptide und damit indirekt in einer vermehrten Aktivierung weiterer Rezeptoren (z.B. AT₂, AT₄) resultieren²⁴.

Entsprechende Rezeptoren und Angiotensin-formierende Enzyme als Bestandteil eines parakrinen RAS könnten auch Gen-Produkte des PPAR γ sein²⁵. Dies wäre ein weiterer Erklärungsansatz für die antidiabetische und antihypertone Wirkung der Thiazolidindione. Dazu passt, dass die volle Wirksamkeit der Glitazone nicht direkt, sondern erst nach einer 3-4 wöchigen Therapie erreicht wird. Eine Reduzierung der AT₁-Rezeptor-Expression durch PPAR γ -Agonisten ist an glatten Gefäßmuskelzellen bereits beschrieben worden^{26,27}. *In vitro* fördern PPAR γ -Agonisten, AT₁-Rezeptor Antagonisten und auch COX-Inhibitoren wie Indomethacin die Entwicklung kleinerer Adipozyten^{12,22,28}.

^{VIII} ANG (1-7) = Abkürzung für Angiotensin-Derivate mit den Aminosäuren von Position 1 bis 7

1.1.2 LOKALE EFFEKTOREN IM WEISSEN FETTGEWEBE

	Produziert von	Effekt auf Präadipozyten	Effekt auf Adipozyten
Adenosin	Adi	Differenzierung	Antilipolyse verbesserte Insulinsensitivität
Adiponectin	Adi		Verbessert Insulinsensitivität ²⁹
ANG II	PreA, Adi, VEC, VSMC,	Keine Differenzierung ³⁰	Lipogenese in 3T3-L1 ³¹ Leptinfreisetzung durch endogen freigesetztes ANG II unterscheidet sich von exogenem ANG II ³²
ANG (1-7)	VEC	Keine Effekte bekannt	Keine Effekte bekannt
ASP	Adi		Lipogenese
bFGF	PreA, Adi, VEC, VSMC	Proliferation	
CNP	VEC		Lipolyse
Endothelin	VEC	Keine Differenzierung	Verstärkte Insulinresistenz, keine Lipogenese (außer 3T3-L1)
IGF	PreA, Adi, VEC, VSMC	Proliferation, Differenzierung	Lipogenese
Interleukin-6	Adi, VEC		Lipolyse
Kinine	Adi, VEC		Verbesserte Insulinsensitivität
Monobutylin	Adi		
NO	Adi, VEC, VSMC	Differenzierung	Antilipolyse
PDGF	VEC	Proliferation (außer 3T3-L1), Keine Differenzierung	
PGI₂	PreA, Adi, VEC, VSMC	Differenzierung (außer 3T3-L1)	Antilipolyse
PGE₂	Adi, VEC		Antilipolyse
TGF-β	PreA, Adi, VEC, VSMC	Proliferation, Keine Differenzierung	Lipolyse
TNF-α	Adi	Proliferation, Keine Differenzierung	Lipolyse, Insulinresistenz

PreA = Präadipozyten
 Adi = Adipozyten
 ANG II = Angiotensin II (1-8)
 VEC = vascular endothelial cells
 VSMC = vascular smooth muscle cells
 ASP = Acylation-stimulating protein
 bFGF = basic fibroblasts growth factor

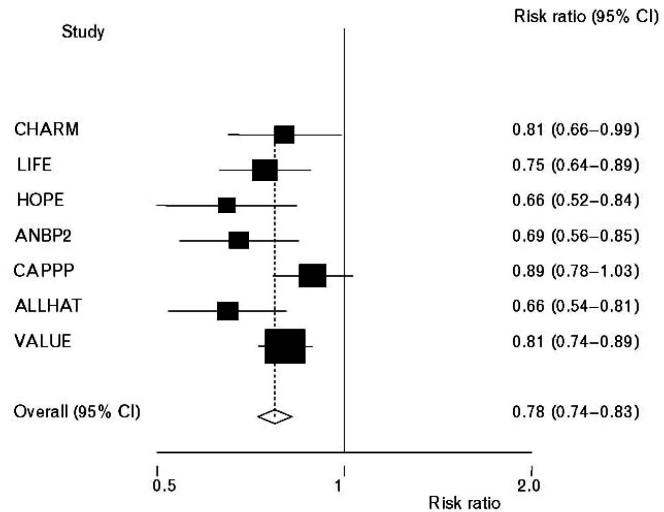
CNP = C-type natriuretic peptide
 PDGF = platelet derived growth factor
 IGF = insulin like growth factor
 PGI₂ = Prostaglandin I₂
 PGE₂ = Prostaglandin E₂
 TGF = tissue growth factor
 TNF-α = tumor necrosis factor

Tabelle in Anlehnung an Schling, Löffler (2002)¹⁷

1.1.3 KLINISCHE STUDIEN

Gerade bei der Betrachtung klinischer Studien zur Behandlung der Hypertonie, ist zu bedenken, dass Patienten mit einem BMI >30 kg/m² aus dem Probandenkollektiv oftmals ausgeschlossen sind (z.B.: CAPPP, INSIGHT, NORDIL, HOT, HOPE). Dies reduziert die Übertragbarkeit klinischer Studien mit AT₁-Rezeptor Antagonisten und ACE-Inhibitoren auf adipöse Patienten.

Abbildung 1-5: Diabetesmanifestierung unter einer RAS-Blockade^{IX}



Es bleibt eine Tendenz, dass speziell adipöse hypertensive Patienten von einer RAS-Blockade profitieren könnten und metabolische Funktionen wie die Glukosehomöostase positiv beeinflusst werden^{6,12,34}.

Am stärksten gewichtet wurden die VALUE (36,4 %), LIFE (13,8 %) und die CAPPP-Studie (16,2 %) ³³.

Tierexperimentelle Untersuchungen bestätigen einen Einfluss auf die Glukosehomöostase. Die Diabetesmanifestierung ist in klinischen Studien unter einer RAS-Blockade deutlich reduziert (s. Abbildung 1-5). Neuere Meta-Analysen verdeutlichen dass ACE-Inhibitoren und AT₁-Rezeptor Antagonisten gleichermaßen eine Diabetesmanifestierung reduzieren^{33,35}.

Im Folgenden werden klinische Studien und tierexperimentelle Beobachtungen tabellarisch dargestellt:

^{IX} Meta-Analyse nach Jandeleit-Dahm (2005)

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

Studie	Arzneistoffe (Vergleich)	Versuchstier	Ergebnisse
Henriksen et al. (2001) ³⁶	Irbesartan	Obese Zucker Rats OGTT	25 mg/kg Irbesartan reduzieren Blutglucose um 14 % (120 min).
Hsieh et al. (2005) ³⁷	Losartan PD123319	Sprague-Dawley Ratten Fructose induzierte Glukoseintoleranz	Losartan verschiebt Glukose-Aufnahme zu vermehrter hepatischer Glykolyse unter hyperinsulinämischen und unter euinsulinämischen Bedingungen. PD alleine zeigt keinen Effekt auf Glukose-Stoffwechsel, verhindert aber die Losartan-vermittelte Glykolyse
Juan et al. (2005) ³⁸	ANG II	Sprague-Dawley Ratten	ANGII fördert die Insulinsensitivität durch eine verstärkte Autophosphorylierung des Insulin-Rezeptors, vermutlich über den AT ₁ -Rezeptor vermittelt.
Kouyama et al. (2005) ³⁹	-	Maus (AT _{1A} -/-) knockout	AT _{1A} -Rezeptor knockout Mäuse reagieren weniger sensibel auf Diät induzierte Adipositas
Massiera et al. (2001) ²¹	-	Maus (AGT -/-) knockout	AGT ^x (-/-) Mäuse haben ein geringeres Körpergewicht bei gleichbleibender Zellzahl und kleineren Adipozyten in epididymalen Fettgeweben.
Wang et al. (2003) ⁴⁰	Omapatrilat ^x Ramipril Losartan	Zucker fatty Ratten	Ramipril aber nicht Losartan verbessert die Insulinsensitivität und Glukoseaufnahme von Fett- und Muskelzellen. Omapatrilat verbessert die diabetische Stoffwechsellaage stärker als Losartan und Ramipril
Yvan-Charet et al. (2005) ²³	-	Maus (AT ₂ -/-) knockout	Reduzierte Adipozytengröße im epididymalen Fettgewebe. Durch Fettdiät induzierte Adipositas und Begleiterscheinungen sind bei (-/-)-Mäusen reduziert.

EXPERIMENTELLE KLINISCHE STUDIEN

Studie	Arzneistoffe (Vergleich)	Patientenzahl	Ergebnisse
Fliser et al. (1993) ⁴¹	ANG II Infusion	8 Probanden	ANG II fördert die Insulinsensitivität in Dosen, die den Blutdruck nicht wesentlich beeinflussen. Indomethazin-Vorbehandlung hat keinen Einfluss

^{xx} AGT = Angiotensinogen

^{xi} Omapatrilat = dualer Vasopeptidaseinhibitor auf NEP und ACE

KLINISCHE STUDIEN MIT ACE-INHIBITOREN

Studie	Arzneistoffe (Vergleich)	Patientenzahl	Ergebnisse
ALLHAT ⁴²	Lisinopril (Amlodipin, Chlortalidon)	12063 hypertone Diabetiker	Diabetesentwicklung 8,1 % (Lisinopril), 9,8 % (Amlodipin), 11,6 % (Chlortalidon)
ANBP-2 ⁴³	Enalapril (Hydrochlorothiazid)	6083	31 % relative Risikoreduktion der Diabetesinzidenz
CAPP ⁴⁴	Captopril	11019	Weniger kardiovaskuläre Ereignisse und weniger Diabetesmanifestierung in der Captopril-Gruppe
HOPE ⁴⁵	Ramipril (Placebo)	5720	Diabetesentwicklung 3,6 % (Ramipril) vs. 5,4 % (Placebogruppe) → 34 % relative Risikoreduktion
TROPHY	Lisinopril, (Hydrochlorothiazid)	Übergewichtige Patienten (BMI 27-40)	Plasma-Glucose -0,21 mmol/l (Lisinopril) vs. +0,31 mmol/l (Hydrochlorothiazid)

KLINISCHE STUDIEN MIT AT₁-REZEPTOR ANTAGONISTEN

Studie	Arzneistoffe (Vergleich)	Patientenzahl	Ergebnisse
CROSS	Candesartan (Hydrochlorothiazid)	172	Verbesserung der Insulinsensitivität unter Candesartan bei gleicher antihypertensiver Wirkung wie Hydrochlorothiazid
DREAM	Ramipril, Rosiglitazon	4000	In Planung, Diabetesprävention als primärer Endpunkt
Laakso ⁴⁶	Losartan (Metoprolol)	40 hypertensive insulinresistente Patienten	keine Effekte auf Insulinsekretion und Glukosetoleranz.
LIFE (ICARUS substudy)	Losartan (Atenolol)	1195 hypertone Diabetiker	Stärkere Reduzierung der Gesamtmortalität und der kardiovaskulären Morbidität durch Losartan in der Subgruppe mit Diabetes mellitus
LIFE ⁴⁷	Losartan (Atenolol)	9193 Hypertoniker	25 % Reduktion der Diabetesentwicklung im Vergleich zu Atenolol als diabetogenes Antihypertonikum
ONTARGET	Telmisartan (Telmi. + Ramipril)	29000	In Planung
SCOPE ⁴⁸	Candesartan (HCT, Placebo)	4964	Diabetes-Entwicklung bei 4,4 % der Patienten vs. 5,3 % in der Kontrollgruppe (P = 0,09)
VALUE ⁴⁹	Valsartan	>15000	23 % niedrigere Diabetesinzidenz in der Valsartangruppe
CHARM ⁵⁰	Candesartan (Placebo)	5436	Diabetesmanifestierung bei 6,0 % der Probanden unter Candesartantherapie im Vergleich zu 7,4 % unter Placebo

1.2 DAS FETTGEWEBE

Das Fettgewebe besteht im erwachsenen Organismus, größtenteils aus adulten Adipozyten. Diese spielen durch ihre Beteiligung am Lipid- und Glukosestoffwechsel eine entscheidende Rolle in der Glukosehomöostase. Außerdem sind Adipozyten in der Lage eine Vielzahl an Faktoren, Enzymen und Hormonen zu sekretieren. TNF- α , IL-6^{XII}, Adiponectin, Resistin und Leptin sind bekannte Beispiele⁵¹.

Damit stellt das Fettgewebe ein sehr interessantes Ziel der pharmazeutischen und biologischen Forschung im Bereich Endokrinologie, Diabetes, Adipositas und Herz-Kreislauf dar, bleibt aber *in vitro* relativ schlecht untersucht. Dies lässt sich alleine durch die Größe und durch die besonderen physikalischen und biologischen Eigenschaften der Adipozyten erklären, so dass zellbasierte Methoden wie Neubauer-Zählkammern, Vitalfärbung u.v.m. nicht anwendbar sind. Alleine im Verhalten der Zellkultur unterscheiden sich Fettzelllinien und Primärkulturen der mitotisch inaktiven Adipozyten deutlich von anderen Zelllinien.

Der starke Auftrieb der Zellen bis zu ihrem Aufschwimmen bedingt durch die Lipidvakuolen verhindert die Anwendung von Standardmethoden wie Zentrifugation und zellbasierte Versuche, bei denen die Zellen ständig von Medium oder Puffer umspült sein müssen⁵². Der hohe Lipidgehalt reduziert die Menge und Qualität des Probenmaterials, welches durch Standardmethoden zur Bestimmung von Proteinen, RNA und DNA gewonnen werden kann.

^{XII} IL-6 = Interleukin 6

1.2.1 AUFBAU DES FETTGEWEBES

Das Fettgewebe lässt sich prinzipiell in einen braunen und einen weißen Typus unterteilen.

WEISS

Im Vergleich mit anderen Zelltypen sind weisse Adipozyten mit 40-150 µm Durchmesser sehr groß. Sie besitzen eine große Lipidvakuole, welche bis zu 95 % des Gesamtvolumens einnimmt. Dies macht die Zelle äußerst empfindlich gegenüber mechanischen Reizen und die Zelle verliert ihre Fähigkeit zur Mitose. Eine große Vakuole füllt das gesamte Zytoplasma der Adipozyten aus (univakuoläres Fett). Der Zellkern liegt an den Rand gedrängt (Siegelring-Form). Die Fettzellen messen im Durchmesser ca. 100 µm und verleihen dem nativen Fettgewebe ein körniges Aussehen. Das weiße Fettgewebe soll im Folgenden weiter untersucht werden.

BRAUN

Die Zellen des braunen Fettgewebes sind relativ mitochondrienreich und erscheinen im Lichtmikroskop bräunlich. Sie sind wesentlich kleiner als die weissen Fettzellen und enthalten viele kleine Lipidvakuolen (multivakuoläres Fett).

Ihre Funktion liegt in der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Kleinere Lebewesen (v.a. kleine Säuger) und Winterschläfer müssen vergleichsweise große Wärmeverluste kompensieren und behalten ihr braunes Fettgewebe lebenslang. Bei größeren Säugetieren wie dem Menschen kommt es zu einer fast vollständigen Rückbildung des braunen Fettgewebes. Beim erwachsenen Menschen sind die Zellen des braunen Fettgewebes im weißen Fettgewebe dispergiert und nur sporadisch in der Nähe von Organkapseln und in der Nähe von Blutgefäßen und Lymphknoten zu finden, während der Anteil des braunen Fettgewebes bei Neugeborenen noch relativ groß ist.

1.2.2 FUNKTION DES FETTGEWEBES

LIPIDSPEICHERUNG (LIPOGENESE UND LIPOLYSE)

Die wesentlichste Funktion des Fettgewebes besteht in der Speicherung von Triglyceriden. Dies beruht auf der Reaktion des α -Glycerophosphats (GAP-3) mit zwei Molekülen Acyl-CoA zu einer Phosphatidsäure. Diese reagiert weiter mit Acyl-CoA zum Triacylglycerol.

Da die Glycerinkinaseaktivität im Fettgewebe gering ist wird die Vorstufe α -Glycerophosphat durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat aus der Glykolyse

gewonnen. Die Lipidspeicherung ist somit eng mit der Glykolyseintensität der Fettzelle verknüpft. Beim Menschen ist die Synthese von Fettsäuren aus Glukose von untergeordneter Bedeutung, während bei Nagetieren ein Großteil der Glukose in die Fettsäurereste eingebaut wird. Das menschliche Fettgewebe scheint auf die Aufnahme von Fettsäuren spezialisiert zu sein, die durch die Lipoproteinlipase aus den plasmatischen Lipoproteinen abgespalten werden⁵³.

Das Wechselspiel von Lipogenese und Lipolyse unterliegt einer strengen hormonellen Regulation. Das wichtigste Lipogenese-regulierende Hormon ist das Insulin. Insulin bewirkt, dass der Stoffwechsel der Zelle auf Lipogenese und Glukoseaufnahme umgestellt wird, unter anderem durch die folgenden Wirkungen:

- Stimulation der Glukoseaufnahme über Translokation von GLUT-4 Transportern in die Plasmamembran
- Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase
- Aktivierung einer cAMP abhängigen Phosphodiesterase und Erniedrigung intrazellulärer cAMP-Spiegel
- Induktion der Lipoproteinlipase

Substanzen wie Prostaglandin E₁ und Adenosin können über eine Senkung des cAMP-Spiegels ebenfalls antilipolytische Wirkungen entfalten. Das sympathische Nervensystem ist an der Regulation über antilipolytische α_2 - und lipolytische β_3 -Rezeptoren beteiligt¹.

THERMOGENESE

Das Fettgewebe ist wesentlich an der Wärmeregulation des Körpers beteiligt. Die Wärmeisolierung durch das weisse Fettgewebe ist von geringerer Bedeutung als die Fähigkeit des braunen Fettgewebes Wärme zu produzieren.

Unter dem Einfluss von Schilddrüsenhormonen und Katecholaminen kommt es im braunen Fettgewebe zur Expression des Entkopplungsproteins Thermogenin (uncoupling protein, UCP). Dieses UCP dient als Protonencarrier in der inneren Mitochondrienmembran und entkoppelt den Elektronen- und Protonentransport während der ATP-Bildung. Die normalerweise auf ADP + P_i übertragene Energie wird stattdessen als Wärme abgegeben und dient der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Als Substrat wird das gespeicherte Triacylglycerol verwendet.

Eine Gewichtsreduktion durch gesteigerte Thermogenese wäre durch β_3 -Agonisten möglich, scheitert aber an der geringen Verbreitung des braunen Fettgewebes im Menschen. Interessanterweise führt in der Ratte eine Hyperleptinämie zu einer gesteigerten Expression der Isoform UCP-2 im Fettgewebe⁵³.

1.2.3 DIE ENTWICKLUNG DES WEISSEN FETTGEWEBES

Adipozyten entwickeln sich ähnlich den Myozyten und Osteozyten relativ spät in der embryonalen Entwicklung aus multipotenten Stammzellen mesodermalen Ursprungs. Bei der Entwicklung des Fettgewebes reift der Großteil der Zellen heran, ein Rest an pluripotenten Stammzellen bleibt erhalten und steht bei Zellverlusten (Alter, Verletzungen) als Reserve zur Verfügung⁵⁴.

1.2.3.1 FRÜHPHASE DER DIFFERENZIERUNG

Embryonale Stammzellen (z.B. gewonnen aus Mausembryonen) können benutzt werden, um diese Differenzierungsphase zu untersuchen. Diese Zellen lassen sich in eine Vielzahl von Zelltypen differenzieren, einschließlich Fettzellen und Muskelzellen.

Die Behandlung embryonaler Stammzellen mit Retinsäure induziert die Bildung größerer Zellverbände mit erwachsenen Adipozyten. Allerdings scheint die Retinsäure in späteren Stadien die Fettzellendifferenzierung zu verhindern. Diese Effekte scheinen ERK^{XIII}-vermittelt zu sein.

1.2.3.2 MITTLERE PHASE DER DIFFERENZIERUNG

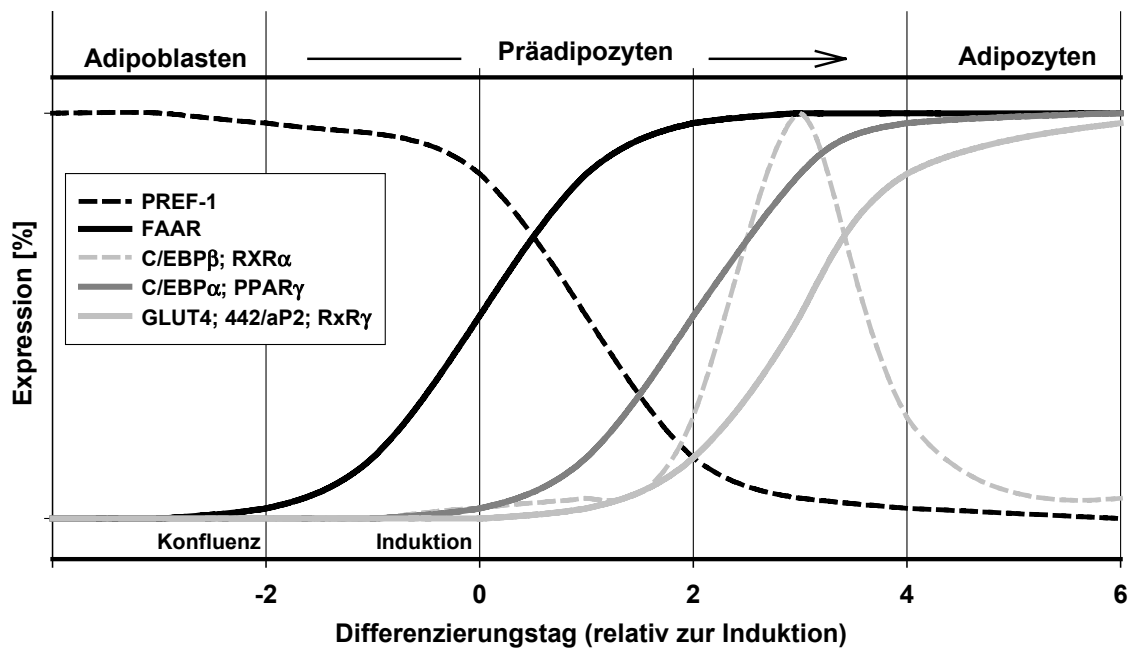
Osteozyten und Adipozyten haben gemeinsame mesenchymale Präkursor-Zellen. BMP's (bone morphogenetic proteins) scheinen hier eine entscheidende Rolle zu spielen.

1.2.3.3 TERMINALE PHASE DER DIFFERENZIERUNG VON PRÄADIPOZYTEN ZU ADIPOZYTEN

Die terminale Differenzierung wird begleitet von einer vermehrten Lipideinlagerung und deutlichen morphologischen Veränderungen von einer länglichen fibroblastenähnlichen zu einer eher rundlichen Zellform.

^{XIII} ERK = extracellular regulated kinase

Abbildung 1-6: Entwicklungsstadien und wichtigste Marker während der Adipozytendifferenzierung^{XIV}



PREF-1^{XV}: Für die Zelldifferenzierung ist der Zell-Zell-Kontakt unerlässlich. Daran scheint unter anderem der PREF-1 beteiligt zu sein. Dieses 6 fach membrangängige Zelloberflächenprotein hemmt die Zelldifferenzierung und ist während der Adipozytendifferenzierung reduziert. Bereits der erste Zellkontakt führt zur Ausprägung sogenannter „early markers“ der Zelldifferenzierung wie Lipoprotein-Lipase und von FAAR^{XVI}.

442/aP2: Die Gensequenz kodiert für adipozytenspezifische Genprodukte

Gleichzeitig kommt es zu einer vielfältigen Aktivierung von Genen, unter anderem zur Exprimierung des PPAR γ und von C/EBP α ^{XVII} als nukleären Faktor. Daneben spielen RXR's^{XVIII} eine Rolle.

Die Exprimierung der Proteine einer Fettzelle, welche für die metabolische Aktivität der Zelle verantwortlich sind und diese Zelle von anderen Geweben unterscheiden, (z.B. Enzyme des Glukosestoffwechsels, Glukosetransporter, Rezeptoren) wird über diese nukleären Promotoren angesteuert. Zeitlich erfolgt die Expression von Glukosetransportern und anderen Genprodukten des Glukosestoffwechsels, direkt nach der Transkription der PPAR γ -mRNA und der C/EBP α -mRNA⁵⁵.

BEDEUTUNG DES CCAAT/ ENHANCER BINDING PROTEIN α (C/EBP α)

Bei C/EBP α handelt es sich um ein Protein, welches an die DNA-Sequenz CCAAT bindet. Das Protein bindet am N-terminalen Teil zum einen an die DNA-Sequenz und kann gleichzeitig über einen sogenannten Leucin-Zipper Dimere bilden. Diese

^{XIV} in Anlehnung an MacDougald (1995)

^{XV} PREF-1 = Preadipocyte factor 1

^{XVI} FAAR = fatty acid activated receptor

^{XVII} C/EBP α = CCAAT/ enhancer binding protein α

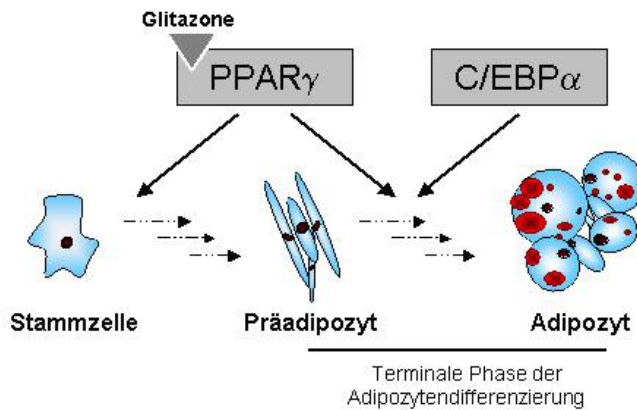
^{XVIII} RXR = retinoid X receptors

Dimere bewirken eine Transaktivierung oder auch Transrepression von kodierenden DNA-Domänen.

C/EBP α kommt während der Adipozytendifferenzierung eine Schlüsselfunktion zu. Es koordiniert die Transkription diverser adipozytenspezifischer Gene und terminiert auch die mitotische Teilung des Zellklons. Die Expression von C/EBP α nimmt z.B. während der Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie stark zu⁵⁶.

Versuche mit Antisense-RNA für C/EBP α haben diese Schlüsselfunktion als „master regulator“ der Fettzellendifferenzierung bestätigt. So kommt es durch Verlust der C/EBP α -Aktivität auch zu einem Verlust der Differenzierungsfähigkeit. Es werden keine GLUT 4 Transporter mehr exprimiert und die cyto-

Abbildung 1-7: Beteiligung von PPAR γ und C/EBP α an der Fettzellendifferenzierung



plasmatische Triacylglycerolsynthese aufgehoben. Ein knockout des C/EBP α führt in Mäusen zu einem kompletten Verlust der Fettzellentwicklung nach der Geburt.

Die Expression von C/EBP α wird über eine PPAR γ -vermittelte Autoaktivierung der eigenen Proteinexpression immer weiter voran getrieben⁵⁷. Die resultierende hohe Konzentration an C/EBP α wird über PPAR γ vermittelt und hält die terminale Phase der Differenzierung aufrecht (s. Abbildung 1-7).

Zytokine wie TNF- α können die Autoaktivierung unterbrechen und zu einer Dedifferenzierung der Zelle führen. Ansonsten ist eine Dedifferenzierung nur durch Zusatz von Retinsäure oder einen Verlust des Zell-Zell Kontakts möglich.

BEDEUTUNG DES PPAR γ

Präadipozyten verfügen zu Beginn der Differenzierung über kaum messbare Aktivität der PPAR γ -mRNA, diese steigt aber in den ersten Tagen der Differenzierung peakartig an⁵⁸ und fördert unter anderem die Entwicklung des C/EBP α (s. Abbildung 1-6). Bei der Entwicklung der Präadipozyten aus den entsprechenden Stammzellen scheint er keine Rolle zu spielen.

Kurz nach dem ersten Auftreten der PPAR γ -mRNA treten auch weitere mRNA's (z.B. für Leptin, Angiotensin-Rezeptoren, Angiotensinogen) in Erscheinung¹⁹. Der PPAR γ ist damit auf genomischer Ebene an der Fettzellendifferenzierung der Fibroblasten zum reifen Adipozyt beteiligt⁵⁹.

Die Thiazolidindione als PPAR γ -Agonisten gelten als starke Induktoren der Fettzellendifferenzierung und sind in der Lage, auch Zellen ohne adipogenes Potential (z.B. Myoblasten) in Fettzellen umzuwandeln. Die vollständige Entwicklung von weissem und braunem Fettgewebe aus den entsprechenden Stammzellen ist nur mit einem funktionstüchtigen Allel für den PPAR γ möglich^{60,61}.

Der PPAR γ funktioniert als Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor α (RXR α). Dieser Rezeptorkomplex bindet an regulatorische DNA-Sequenzen, die sogenannten „Peroxisome proliferator response elements“ (PPRE)⁶⁰. Vom Subtyp PPAR γ sind zwei Isoformen (γ 1 und γ 2) bekannt.

Gene, deren regulatorische Sequenzen PPRE enthalten, werden unter anderem in Adipozyten exprimiert. Eine PPAR γ Aktivierung bewirkt somit die Aktivierung einer Vielzahl adipozytenspezifischer Gene. Dies erklärt auch die große Zahl an Proteinen, die prinzipiell von PPAR γ Liganden beeinflussbar sind.

Dies resultiert nicht zuletzt in einer Modulierung von Genen des lokalen RAS, einer verbesserten Insulinsensitivität (Translokation von GLUT 4-Transportern, erhöhte Sensitivität der Insulinpostrezeptorkaskade) und der Aktivierung einer Vielzahl von bisher nicht weiter beschriebenen Genen. Es werden mehrere für die Differenzierung bedeutende Proteine exprimiert, die auch darauf hinwirken Triglyceride einzulagern. Dabei stellt die „fatty acid synthetase“ (FAS) ein Leitenzym dar, dessen Aktivitätsbestimmung als *in vitro* Erfolgskontrolle der Fettzellendifferenzierung dienen kann. Daneben kommt der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eine Schlüsselrolle zu.

PPAR γ und PPAR α finden sich auch in glatten Gefäßmuskelzellen. Dort wurde unter anderem eine verringerte AT $_1$ -Rezeptor-Expression bei PPAR γ -Aktivierung nachgewiesen²⁷. Dies wäre eine mögliche Erklärung für antihypertone Nebenwirkungen der Thiazolidindione⁶². Dabei finden sich bedeutende Unterschiede zwischen verschiedenen PPAR γ -Liganden. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Teil dieser Wirkungen durch PPAR γ unabhängige Mechanismen erfolgt⁶³.

Troglitazon hemmt daneben auch die wachstumsfördernde Wirkung von ANG II auf glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) und verringert gleichzeitig eine ANG II vermittelte Insulinresistenz. Dies könnte die antiarteriosklerotischen Begleitwirkungen von Troglitazon erklären⁶⁴. Diese wären damit qualitativ vergleichbar mit der Wirkung von AT $_1$ -Rezeptor Antagonisten und ACE-Hemmern.

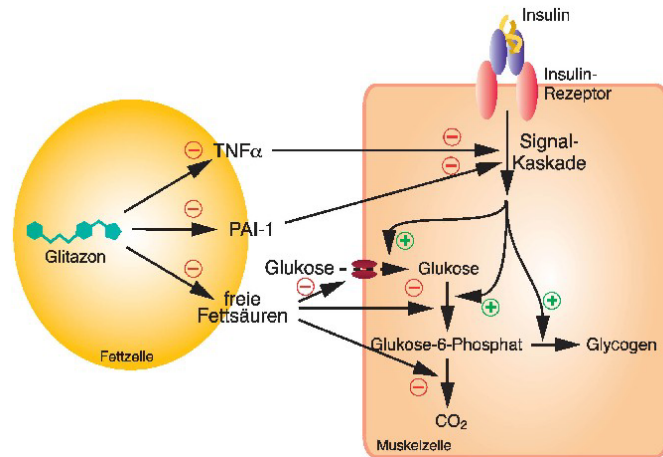
LIGANDEN DES PPAR γ

Die Glitazone als orale Antidiabetika aktivieren über PPAR γ über 100 kodierende Gene. Die resultierenden Wirkungen sind vielfältig und erstrecken sich

hauptsächlich auf Leber-, Fett- und Muskelzellen⁶⁵. Dabei besitzen Thiazolidindione alleine keine antidiabetischen Effekte, sondern vermögen nur die insulinabhängige Wirkung zu verstärken. Glitazone hemmen die Ausschüttung insulinresistenzfördernder Substanzen wie TNF- α , Leptin und freie Fettsäuren⁶⁶. Dadurch wird das Postrezeptorsignal des Insulins verstärkt und damit die Stoffwechselsituation der Zelle verbessert (s. Abbildung 1-8).

Im Gegensatz dazu sind hochaffine physiologische Liganden noch nicht entdeckt worden. Es sind verschiedene Fettsäure-Derivate, die in oxidierten LDL-Partikeln vorkommen, wie 15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂, 9-Hydroxyoktadensäure (9-HODE), 13-HODE und Linolensäure als Liganden beschrieben. Diese scheinen erst in relativ hohen

Abbildung 1-8: Einfluss der PPAR γ Agonisten auf die Insulinwirkung^{XIX}



Konzentrationen wirksam zu werden. Außerdem können Sartane direkt mit PPAR γ interagiert⁶⁸. Vor allem Telmisartan scheint als partieller Agonist an PPAR γ zu agieren^{22,28}.

BEDEUTUNG DES PPAR γ IM ADULTEN FETTGEWEBE

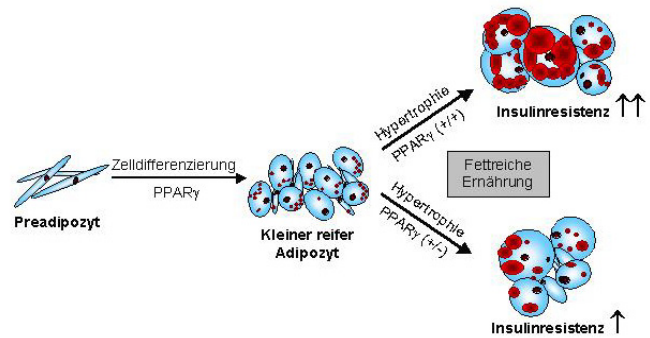
In Tiermodellen hat sich gezeigt, dass die Menge des PPAR γ Rezeptors entscheidenden Einfluss auf das Fettgewebe hat. Hierbei wurden Mäuse mit nur einem intakten Allel des PPAR γ -Gens untersucht.

Es zeigte sich, dass PPAR γ -heterozygote Mäuse (+/-) bei normaler Nahrungsaufnahme keine gesundheitlichen Schäden aufwiesen und auch auf fettreiche Diäten relativ gering reagierten. Die Adipozyten bleiben relativ klein mit geringfügiger Insulinresistenz⁶⁹. Bei Mäusen, die dem Wild-Typ entsprechen (++) führt die fettreiche Diät zu einer Hypertrophie der Fettzellen, mit einer Verstärkung der Insulinresistenz und Freisetzung resistenzfördernder Faktoren^{60,70}.

^{XIX} Abbildung aus Verspohl, Weiland (2002)⁶⁷

Die Thiazolidindione induzieren nicht nur die Entwicklung neuer Zellen aus den Stammzellen, sondern führen zu einem gesamten „remodeling“ des Fettgewebes. Es entstehen vermehrt schmale insulinsensitive Adipozyten, während die Apoptose der älteren insulinresistenten Adipozyten eingeleitet wird (s. Abbildung 1-9). Dabei wirken PPAR γ -Agonisten hauptsächlich auf das subcutane und weniger auf das viscerale Fettgewebe⁶¹. Präadipozyten aus dem omentalen Fettdepots scheinen dabei trotz vergleichbarer PPAR γ -Expression wesentlich resistenter auf eine PPAR γ -Aktivierung zu reagieren als Präadipozyten aus dem viszeralen Fettgewebe⁵⁹.

Abbildung 1-9: Einfluss von Ernährung und PPAR γ auf die Insulinresistenz



Ein PPAR γ -heterozygoter Phänotyp ist von antiadipösen und antidiabetischen Effekten begleitet.

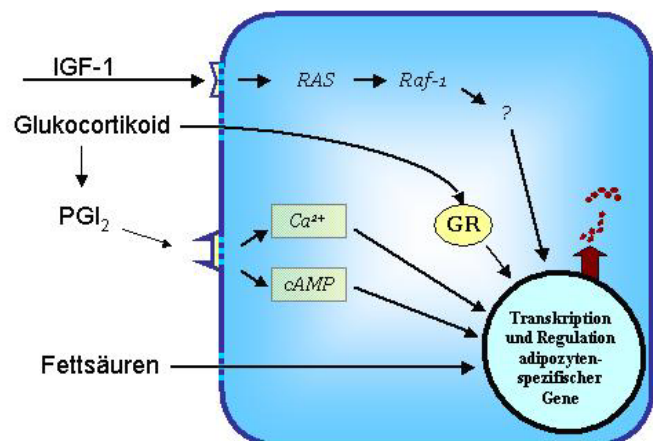
Eine unphysiologische PPAR γ -Aktivierung durch Thiazolidindione führt zu den gleichen Beobachtungen. Vermutlich liegen unterschiedliche molekularbiologische Mechanismen zugrunde, die zu einer ähnlichen Verbesserung der Insulinresistenz führen⁷¹.

1.2.3.4 POSTREZEPTORKOPPLUNG WÄHREND DER TERMINALEN PHASE DER FETTZELLDIFFERENZIERUNG

IGF-AKTIVIERTER TYROSINKINASE-PATHWAY

Insulin entfaltet seine Wirkung an Präadipozyten nicht über den Insulinrezeptor, sondern hauptsächlich über den IGF-1^{XXI} Rezeptor. Dessen Aktivierung vermittelt seine Wirkung über eine Tyrosinkinase und weiter über IRS-1^{XXII} und das RAS/RAF^{XXIII} System⁷² (s. Abbildung 1-10).

Abbildung 1-10: second messenger Wege der Fettzellendifferenzierung^{XX}



In vitro ist die Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten hemmbar durch eine Überexprimierung der

^{XX} Abbildung in Anlehnung an MacDougald (1995)

^{XXI} IGF = insulin like growth factor

^{XXII} IRS = insulin receptor substrate

^{XXIII} RAS/Raf = Subklasse kleiner G-Proteine

Phosphotyrosinphosphatase als Gegenspieler der Tyrosinkinase⁵⁵.

GLUKOCORTICOID, PROSTACYCLIN PATHWAY

Glukocorticoide entfalten ihre adipogene Wirkung zum einen über ihre nukleären Rezeptoren (genomischer Effekt). Zum anderen fördern Kortikoide die Bildung von PGI₂^{xxiv} (nicht-genomischer Effekt).

CAMP ABHÄNGIGER PROTEIN-KINASE PATHWAY

PGI₂ erhöht die intrazellulären Ca²⁺-Spiegel; zusätzlich wird über eine Adenylylcyclase der cAMP-Spiegel als second messenger erhöht. Hohe cAMP-Konzentrationen fördern die Fettzellendifferenzierung. In der Kultur der 3T3-L1 Präadipozyten wird die Zelldifferenzierung durch Zugabe von IBMX^{xxv} als Phosphodiesteraseinhibitor induziert⁷².

FATTY ACID ACTIVATED RECEPTOR PATHWAY

Konfluente Präadipozyten reagieren auf Zugabe von Palmitinsäure über 3 Tage mit mitotischer Aktivität und beginnen Triglyceride zu akkumulieren. Dabei wirken Fettsäuren synergistisch mit Wachstumshormonen und IBMX. Es ist denkbar, dass dieser Effekt über den PPAR_γ-Rezeptor vermittelt ist. Hierfür kommen langkettige ungesättigte Fettsäuren in Frage. Außerdem könnte der dem PPAR verwandte FAAR (fatty acid activated receptor) beteiligt sein.

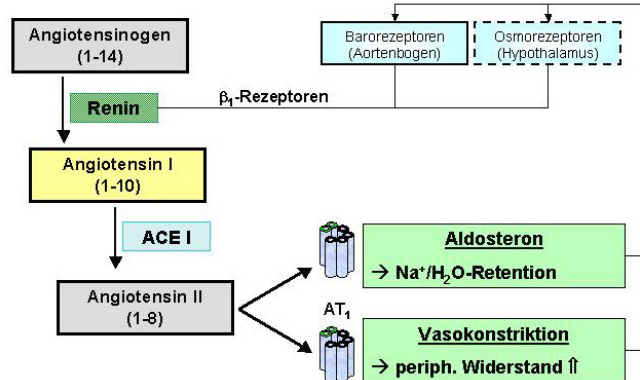
^{xxiv} PGI₂ = Prostaglandin I₂

^{xxv} 1-Methyl-3-isobutylxanthine

1.3 DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM

Das systemische RAAS ist seit Einführung der ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor Antagonisten gut untersucht. Eine Aktivierung des RAAS dient sowohl der kurzfristigen Blutdruckregulation als auch der eher langfristig orientierten Modulation der Na⁺/H₂O-Retention.

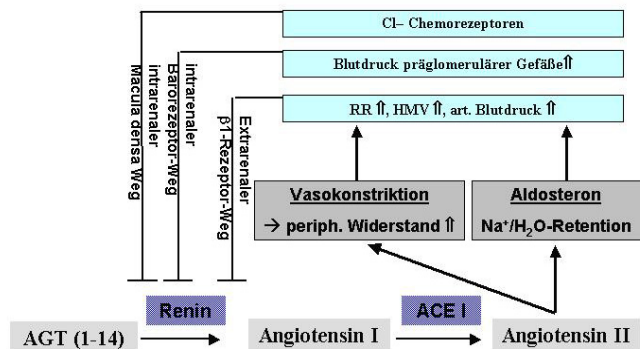
Abbildung 1-11: Aufbau des RAA-Systems, zentrale Baroregulation über das adrenerge System



Bei der Blutdruckregulation wird nach Aktivierung von Barorezeptoren im Aortenbogen der Sympathikus aktiviert und Adrenalin ausgeschüttet (Barorezeptorreflex). Adrenalin aktiviert über β₁-Rezeptoren der juxtaglomerulären Nierenzellen die Renin-Ausschüttung. Renin spaltet als Aspartylprotease aus dem α₂-Globulin Angiotensinogen (AGT) das ANG I (1-10), welches über ACE im peripher wirksamen ANG II (1-8) resultiert (s. Abbildung 1-11).

ANG II führt unter anderem zu einer peripheren Vasokonstriktion mit erhöhtem arteriellen Blutdruck und gilt als einer der höchst potenten Vasokonstriktoren. Dies erklärt die hohe Potenz der AT₁-Rezeptor Antagonisten und der ACE-Hemmer. Auch β₁-Rezeptor-Blocker entfalten einen Großteil ihrer antihypertonen Wirkung über eine Hemmung der β₁-Rezeptoren der Niere und der damit vermittelten Hemmung des RAAS über eine verminderte Renin-Ausschüttung. Am Myokard wirkt ANG II über AT₁-Rezeptoren direkt positiv inotrop als auch indirekt über Modulation einer Calciumkanal regulierten Freisetzung von Noradrenalin.

Abbildung 1-12: Intrarenale und extrarenale Baro- und Osmoregulation



Daneben dient das RAAS der langfristigen Stabilisierung des Blutdrucks gegen physiologische Schwankungen der NaCl-Aufnahme. Chloridsensitive Chemorezeptoren auf Chlorid-Ionen in der Macula densa der Niere erkennen Schwankungen des NaCl-Transport (s. Abbildung 1-12).

Die Baroregulation ist dabei von der zentralen Vorgabe eines Sollwertes im nucleus tractus solitarii abhängig. Aufgrund dieser extrarenalen und intrarenalen feedback-Mechanismen führt eine exogene Blutdrucksenkung durch Pharmaka reflektorisch zu einer vermehrten RAAS-Aktivierung. Im Falle einer Therapie mit Losartan resultiert z.B. eine 2,5 fache Erhöhung der ANG II Plasmaspiegel und eine 1,7 fache Erhöhung der Reninkonzentration. Im Falle einer Blutdrucksenkung durch Enalapril als ACE-Inhibitor wird ebenfalls eine Erhöhung der Reninkonzentration (2,8 fach) beobachtet, allerdings wird gleichzeitig die Plasmaangiotensin II Konzentration um 77 % reduziert⁷³. Dies sind erste Indizien, dass sich AT₁-Rezeptor Antagonisten und ACE-Inhibitoren deutlich unterscheiden können. Außerdem kann an der Wirkung der ACE-Hemmer das Bradykinin-System beteiligt sein.

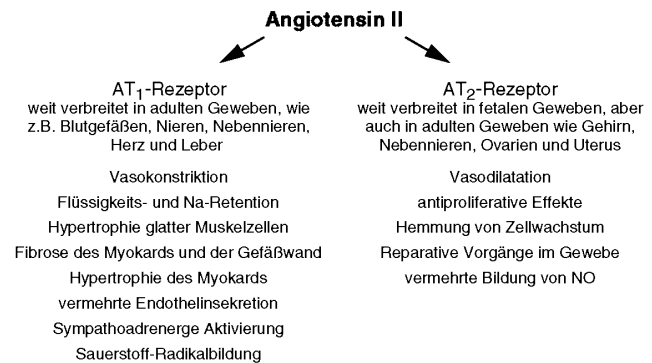
Ungeachtet dessen, werden bis heute in der Hypertoniebehandlung nahezu alle bedeutenden Wirkprinzipien des Angiotensin-Systems dem AT₁-Rezeptor zugeordnet. Besonderes Augenmerk gilt dabei auch dem Angiotensin-vermittelten Zellwachstum, welches bei artherosklerotischen Veränderungen eine Rolle spielen kann.

Interessanterweise finden sich auch bei Vertebraten und vielen anderen Spezies ohne komplexe Kreislaufregulation intakte RAA-Systeme. Dies lässt darauf schliessen, dass Angiotensin an vielen ursprünglichen Regulationsmechanismen beteiligt ist.

1.3.1 REZEPTOREN DES RAA-SYSTEMS

Als klassische G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind vor allem die AT₁- und AT₂-Rezeptor Subtypen gut beschrieben (s. Abbildung 1-13). Allem voran sind die Wirkungen des AT₁-Rezeptors seit Markteinführung der Sartane als spezifische Liganden gut untersucht, während bei den weiteren Subtypen noch viele Fragen offen bleiben. Bisher ist nur die Existenz der AT₁- und AT₂-Rezeptoren durch Klonierung endgültig bewiesen.

Abbildung 1-13: Verbreitung und Funktion der AT₁- und AT₂-Rezeptoren^{xxvi}



1.3.1.1 AT₁-REZEPTOREN

Hohe Rezeptordichten finden sich vor allem in adulten Geweben, wie im arteriellen Endothel, in der Niere, Nebenniere, Herz und Leber⁷⁴. Interessanterweise verteilen sich im Arbeitsmyokard (einem typischen Zielgewebe der AT₁-Rezeptor-Antagonisten) die Angiotensin-Rezeptoren zu 1/3 auf AT₁ und zu 2/3 auf AT₂-Rezeptoren, wobei die Bedeutung des Verteilungsmusters noch nicht geklärt ist. Am Gefäßendothel vermittelt ANG II über den AT₁-Rezeptor vor allem eine arterielle Vasokonstriktion und eine vaskuläre Hypertrophie. Dies geht einher mit oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies, endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen Veränderungen^{75,76}. Auch im Hypothalamus finden sich AT₁-Rezeptoren und sind dort an der physiologischen Volumen- und Osmoregulation beteiligt⁷⁷.

AT₁-Rezeptoren lassen sich bei Mensch und Tier nachweisen. Bei Nagetieren sind zwei verschiedene Subtypen (AT_{1A} und AT_{1B}) beschrieben^{78,79}. Bei Ratten findet sich der AT_{1A}-Rezeptor vor allem im kardiovaskulären Gewebe und der AT_{1B}-Rezeptor vermehrt in Geweben mit endokrinen Funktionen. Er ist vor allem in adulten Geweben stark exprimiert und im Gegensatz zu den AT₂-Rezeptoren nahezu ubiquitär vertreten. Als spezifische Liganden werden u.a. Losartan und PD123177 eingesetzt. Als peptidischer Antagonist wird SARILE^{xxvii} verwendet;

^{xxvi} Abbildung aus PharmUZ 4/2001

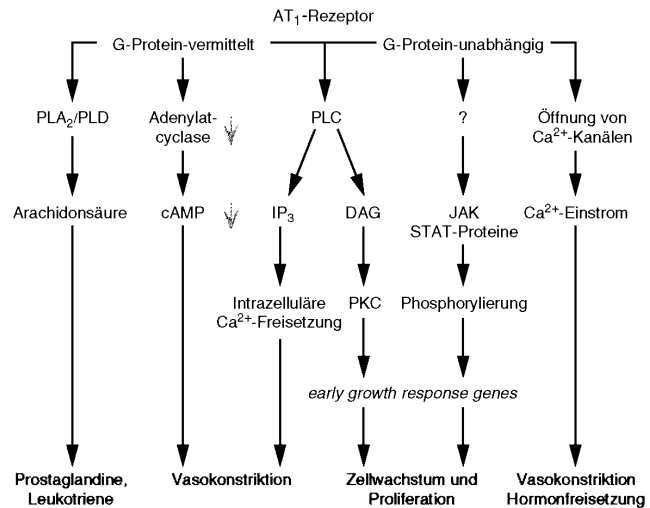
^{xxvii} (Sar1;Ile1)-Angiotensin II (1-8)

dieser besitzt eine ca. 4 fach höhere Affinität zum Typ 2 Rezeptor als zum Typ 1 Rezeptor⁸⁰.

POSTREZEPTORKOPPLUNG DES AT₁-REZEPTORS

Der AT₁-Rezeptor gehört zur Klasse der G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren⁸¹. Im Rahmen der Postrezeptorkaskade führt eine Aktivierung des G α_q -gekoppelten Rezeptors zur Aktivierung der PLC- β ^{XXIX} mit Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Spiegel. Im Gefäßendothel wird über diesen Weg eine Vasokonstriktion vermittelt. Daneben findet man am C-Terminus des Rezeptors

Abbildung 1-14: Second messenger Wege des AT₁-Rezeptors^{XXVIII}



Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C. Diese G-Protein unabhängige Rezeptorkopplung scheint für Einflüsse auf Wachstumsprozesse und eine AT₁-vermittelte Inhibierung des Zellwachstums verantwortlich zu sein (s. Abbildung 1-14)^{78,79,82,83}.

1.3.1.2 AT₂-REZEPTOREN

Der AT₂-Rezeptor weist eine 34 %ige Homologie zum AT₁-Rezeptor auf und gehört wie der Typ 1-Rezeptor zur Klasse der membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren⁸⁴. Als solcher aktiviert er selektiv G α_q -Proteine und ist sensitiv gegenüber Pertussistoxin⁸⁵.

Das Expressionsmuster des AT₂-Rezeptors ist gerade in adulten Organismen im Vergleich zum AT₁-Rezeptor stark begrenzt auf einzelne Zielgewebe und scheint vor allem am Zellwachstum, -differenzierung und -entwicklung mitbeteiligt zu sein. An adulten Geweben sind vor allem das Herz, glatte Gefäßmuskelzellen, Gehirn, Nebennierenrinde, Uterus und die Follikel der Ovarien reich an AT₂-Rezeptoren.

Eine AT₂-Rezeptor-Aktivierung führt dabei zu einer Dilatation der Blutgefäße und zu einer Wachstumsinhibierung⁸⁶. An der Niere antagonisiert eine AT₂-Rezeptor Aktivierung eine AT₁-Rezeptor vermittelte Vasokonstriktion deutlich⁸⁷. Damit kann

^{XXVIII} Abbildung aus PharmUZ 4/2001

^{XXIX} PLC = Phospholipase C

der AT₂-Rezeptor die antihypertensive Wirkung eines AT₁-Rezeptor Antagonisten verstärken. Weiterhin vermittelt der AT₂-Rezeptor antidiuretische Effekte⁷⁹.

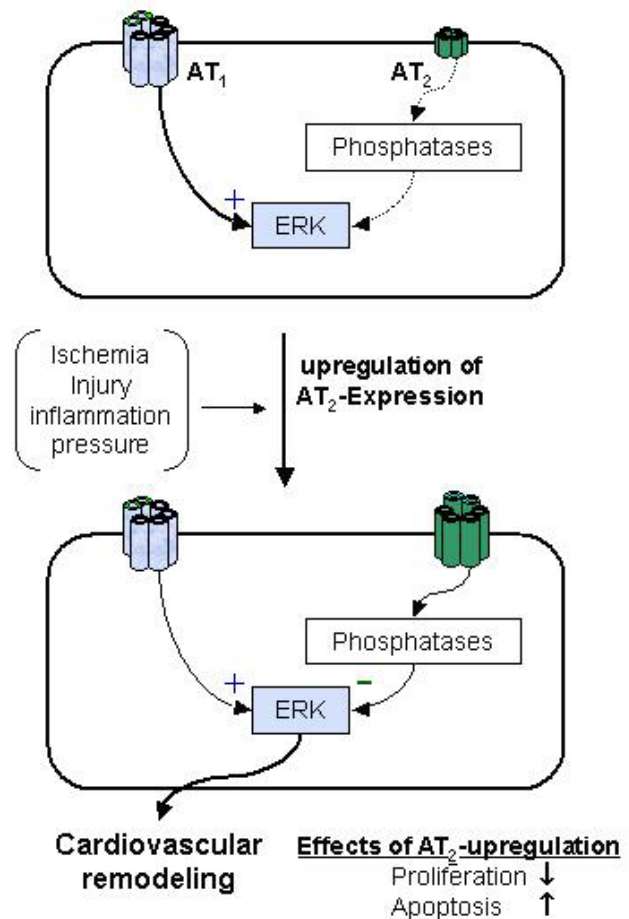
Daneben wird der AT₂-Rezeptor vor allem in fetalen Zellen hochgradig exprimiert⁷⁴. Zellen des humanen Myometriums schwangerer Frauen und fetale Stammzellen sind reich an AT₂-Rezeptoren⁸⁸. Diese sind verantwortlich für die ANG II vermittelte Inhibierung der Zellproliferation und sind auch an der Apoptose beteiligt⁸⁹.

In vernarbenden Gewebe nach einer Verletzung der Haut ist die Expression des AT₂-Rezeptors ebenfalls hochreguliert. Ein ähnliches Bild findet sich auch in der Neointima von Blutgefäßen nach einer Verletzung und während der Phase des „cardiac remodeling“ nach einem Myokardinfarkt²⁴ (s. Abbildung 1-15).

Zentrale AT₂-Rezeptoren sind an Lern- und Denkprozessen beteiligt. AT₂-Rezeptor knockout Mäuse zeigen im Tiermodell Anzeichen von Lern- und Denkschwächen, Anzeichen emotionaler Störungen, sowie Störungen der zentralen Osmoregulation⁷⁹.

Interessanterweise wird der AT₂-Rezeptor nicht internalisiert, nicht durch Lysosomen aufgenommen und abgebaut bzw. wieder zur Zelloberfläche rücktransportiert. Damit unterliegt der Typ 2-Rezeptor keiner Agonisten induzierten Down-Regulation, wie dies für den AT₁- und AT₄-Rezeptor beschrieben wurde⁷⁴.

Abbildung 1-15: Beteiligung des AT₂-Rezeptors am Zellwachstum^{xxx}



Der AT₂-Rezeptor führt ERK^{xxxii}-vermittelt zu antiproliferativen, antihypertrophen und proapoptischen Effekten und antagonisiert damit AT₁-vermittelte Effekte. Ein Fehlen des AT₂-Rezeptors (z.B. als knockout) führt zu einem anormalen Zellwachstum glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC^{xxxii})²⁴.

^{xxx} In Anlehnung an Horiuchi (1999)

^{xxxii} ERK = extracellular activated kinase

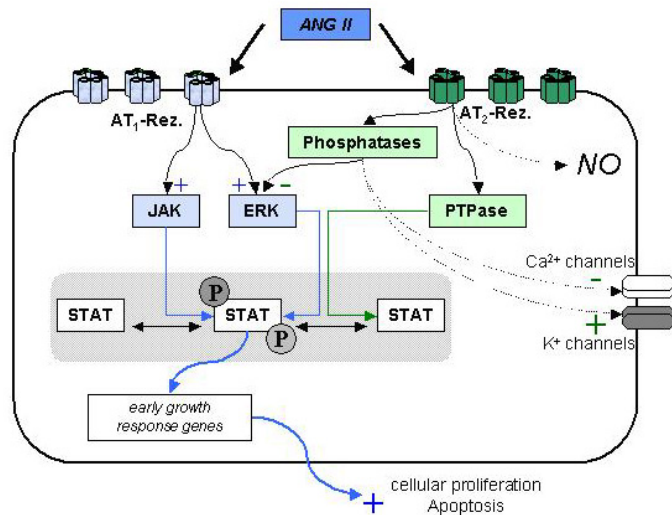
^{xxxii} VSMC = vascular smooth muscle cell

Als Ligand kommen die Substanzen PD123319 und CGP42112A in Frage. Letzterer gilt als partieller Agonist am AT₂-Rezeptor⁸⁵.

POSTREZEPTORKOPPLUNG DES AT₂-REZEPTORS

Eine Vielzahl von Phosphatasen werden über G-Protein abhängige Aktivierung des AT₂-Rezeptors stimuliert. Dies führt zu einer Hemmung der „extracellular regulated signal kinase“ (ERK), einer Hemmung von Calcium-Kanälen, einer Öffnung von Kalium-Kanälen und einer Steigerung der NO-Synthese²⁴.

Abbildung 1-16: AT₂-Postrezeptorkopplung^{xxxiii}



AT₂ vermittelte ERK-Inhibierung und gleichzeitige Aktivierung von PTPasen reduziert die STAT^{xxxiv}-Phosphorylierung und greift damit hemmend in die Signalkaskade von Wachstumsfaktoren und Zytokinen ein. Eine AT₁-Rezeptor-Aktivierung stimuliert ERK und JAK^{xxxv} und wirkt damit funktionell antagonistisch zum AT₂-Rezeptor wachstumsfördernd und proliferativ⁹⁰.

second messenger Wege bei AT₁- bzw. AT₂-Rezeptor Aktivierung mit Einfluss auf das Zellwachstum sind mit durchgezogenen Linien dargestellt. Auf gestrichelt dargestellte Reaktionen wird im folgenden nicht weiter eingegangen²⁴.

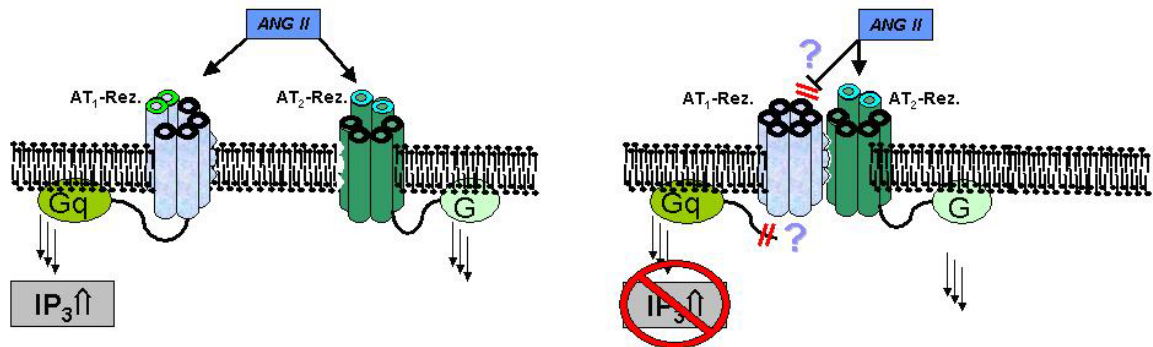
1.3.1.3 AT₁/AT₂-REZEPTOR-DIMERE

Daneben zeigen AT₂-Rezeptoren ligandenunabhängige AT₁-Rezeptor antagonistische Wirkungen. Der AT₂-Rezeptor scheint durch eine direkte Bindung als ligandenunabhängiger AT₁-Antagonist zu fungieren⁹¹ (s. Abbildung 1-17). In Fibroblasten liegt der Großteil der Rezeptoren in der dimeren Form vor.

^{xxxiii} In Anlehnung an Horiuchi (1999)

^{xxxiv} STAT = Signal transducer and activator of transcription

^{xxxv} JAK = Janus Kinase

Abbildung 1-17: Heterodimerisierung von AT₁- und AT₂-Rezeptoren

Eine vermehrte Expression von AT₂-Rezeptoren führt zur Bildung von AT₁/AT₂-Rezeptor Dimeren. Die Bildung der Dimere geht einher mit einer Abschwächung der AT₁-Rezeptor vermittelten Erhöhung intrazellulärer IP₃-Spiegel. Außerdem führt eine Coexpression des AT₂-Rezeptors zu einer Hemmung der AT₁-Rezeptor vermittelten Aktivierung von G $\alpha_{q/11}$ und G $\alpha_{i/o}$.

Die Heterodimerisierung erfolgt dabei ligandenunabhängig. AT₁/B₂-Rezeptor-Dimere^{xxxvi} wurden ebenfalls beschrieben⁹². Diese reagieren auf ANG II mit einer verstärkten Postrezeptorkopplung im Vergleich zur monomeren Form⁹³.

Die Autoren fanden in fetalen Fibroblasten der Ratte fast nur Rezeptordimere (ca. 130 kDa). Durch Transfektion dieser Zellen mit inaktiven Spleiß AT₂-Rezeptor-Varianten erhöht sich die Menge des monomeren AT₁-Rezeptors (ca. 67 kDa). Dies wird begleitet von einer 3fachen Verstärkung der AT₁-vermittelten Effekte auf die intrazellulären IP₃ und cAMP Spiegel. Darüber, ob ähnliche Dimerisierungen auch in pluripotenten Präadipozyten vorliegen, kann bisher nur spekuliert werden.

Heterogene AT₁/AT₂-Rezeptordimere könnten damit untypische AT₂-Rezeptorwirkungen erklären. Da der genaue Angriffspunkt des AT₂-Rezeptors am AT₁-Rezeptor noch nicht geklärt ist, aber oberhalb der G-Protein-Ebene zu finden sein muss, bieten sich als Interpretation Veränderungen in der Ligandenbindung der AT₁-Rezeptoren an. Eine niedermolekulare AT₁-Bindungsstelle, wie sie im Rahmen der Rezeptorbindungsstudien beschrieben wird, wäre eine mögliche Erklärung.

1.3.1.4 ANGIOTENSIN (1-7) REZEPTOREN/ MAS

Eine zunehmende Zahl an Studien belegt, dass neben den AT₁- und AT₂-Rezeptoren weitere Rezeptoren für die Wirkungen des RAS verantwortlich sind. Als endogener Ligand gilt das Angiotensin-Peptid (1-7), während ANG II (1-8) keine

^{xxxvi} B₂ = Bradykinin Rezeptor Typ 2

Aktivität am Mas-Rezeptor aufweist. Dabei sind die physiologischen Plasmaspiegel von ANG (1-7) mit 10-40 fmol/ml in Ratten etwas niedriger als für ANG II.

ANG (1-7) vermittelt eine Vielzahl von pleiotropen Effekten und kommt vermehrt im Hypothalamus und in der Neurohypophyse vor. Hochaffine Bindungsstellen finden sich auch im Bereich des Nucleus tractus solitarii. Es ist unklar, ob ANG (1-7) intrazellulär oder extrazellulär gebildet wird. Dabei beeinflussen ACE-Inhibitoren die zentrale Bildung aus ANG I (1-10) im Gehirn nicht, während die orale Gabe von ACE-Inhibitoren zu einem deutlichen Anstieg der ANG (1-7) Plasmakonzentration führt, vermutlich weil ANG (1-7) über ACE zu inaktiven Fragmenten wie ANG (1-5) abgebaut wird⁹⁴.

Hypertensive Ratten erfahren dabei durch ACE-Inhibitoren eine Verbesserung des Barorezeptorreflexes, welche durch Infusion von A-779^{xxxvii} als ANG (1-7) Antagonist teilweise wieder aufgehoben werden konnte⁹⁵. *In vitro* bewirkt das Peptid eine Sekretion von Vasopressin und vermittelt auch *in vivo* deutliche antidiuretische Effekte und beeinflusst Natriuresis und Diuresis. Besonders hervorzuheben sind die angiotensinergen Effekte auf das kardiovaskuläre System und auf die Osmoregulation. Spontan hypertensive Ratten (SHR) erfahren durch eine ANG (1-7)-Infusion einen reduzierten Blutdruck, niedrige Konzentrationen verbessern die physiologische Antwort auf Bradykinin.

In glatten Gefäßmuskelzellen besitzt ANG (1-7) antiproliferative Effekte. Mitogen stimulierte [³H]Thymidin-Inkorporation und Serum stimuliertes Zellwachstum werden gehemmt. *In vivo* kann z.B. eine Vasokonstriktion der Mäuseaorta durch ANG (1-7) teilweise aufgehoben werden. Diese kardiovaskulären Effekte sind den ANG II vermittelten Effekten entgegengerichtet⁹⁶. ANG (1-7) kann die Expression der AT₁-Rezeptor-mRNA heraufregulieren⁹⁷. Diese Verbindung zwischen ANG (1-7) und ANG II (1-8) könnte zum einen in Situationen mit erhöhten Plasmaspiegeln von ANG (1-7) bedeutend sein (z.B. klinische Behandlung mit Captopril), zum anderen kann diese Interaktion feedback-Mechanismen des RAAS ohne Beteiligung von ANG II erklären⁹⁸.

Als Rezeptor kommt der G-Protein gekoppelte Rezeptor Mas^{xxxviii} in Frage. Das Mas-Oncogen ist vor allem in Hoden und Hirn stark exprimiert. Der 7 fach membrangängige Rezeptor vermittelt seine Effekte über den Arachidonsäurestoffwechsel mit Inositoltrisphosphat als second messenger⁹⁹.

Heterodimere des AT₁-Rezeptors mit dem Mas-Oncogen sind ebenfalls beschrieben¹⁰⁰ und beeinflussen den zellulären Calcium-Influx¹⁰¹.

^{xxxvii} A-779 = D-Ala⁷-ANG (1-7)

^{xxxviii} kodiert durch das Mas proto-onkogen

Als selektive Antagonisten stehen D-Ala⁷-ANG (1-7) (A-779) und D-Pro⁷-ANG (1-7) zur Verfügung, die praktisch keine Affinität zu AT₁- und AT₂-Rezeptoren mehr aufweisen. ACE und Bradykinin werden durch diese Liganden ebenfalls nicht beeinflusst⁹⁶.

1.3.1.5 ANGIOTENSIN IV REZEPTOREN/ IRAP

2001 wurde bekannt, dass das Enzym IRAP^{xxxix} (insulin regulated aminopeptidase) eine Bindungsstelle für ANG IV besitzt⁷⁴. Die enzymatische Aktivität der IRAP wird durch die Agonisten ANG IV und LVV-H7 (hemorphin) inhibiert. Bei IRAP handelt es sich um ein integrales Membranprotein, welches sich in den gleichen Vesikeln findet, wie die GLUT 4 Transporter der Fettzelle¹⁰². Zusätzlich findet sich eine lösliche Form als Oxytocinase im maternalen Serum und spaltet dort Oxytocin und Vasopressin.

IRAP besteht aus einer 109 Aminosäuren großen cytoplasmatischen Domäne, einem transmembranären Bereich und einer luminalen Region, welche das aktive Zentrum des Enzyms enthält¹⁰³. In Antwort auf eine Insulinstimulation kommt es zur Co-Translokation von IRAP und GLUT 4 an die Zelloberfläche der Fettzelle^{102,104,105}. Die cytoplasmatische Domäne des Proteins ist dabei hauptverantwortlich für das endozytotische Recycling^{81,106}.

An der zellulären Plasmamembran liegt die katalytische Domäne extrazellulär vor und die aminotermine Domäne intrazellulär. Innerhalb der GLUT 4 Vesikel dagegen findet sich das aminotermine Ende im Cytoplasma und die katalytische Domäne im Lumen, so das IRAP über Proteinkinase C vermittelt phosphoryliert wird. Die genaue Funktion von IRAP in der intrazellulären Signalübertragung ist noch ungeklärt¹⁰⁷. Unter anderem existieren Hinweise auf ANG IV vermittelten Ca²⁺-Influx, Na⁺-Influx und eine Beeinflussung des MAP^{xl}-Kinase Weges als second messenger¹⁰⁸.

GLUT 4 und IRAP sind auch in Fibroblasten bereits intrazellulär vorhanden, aber es kommt noch nicht zu einer insulinabhängigen Translokation an die Zelloberfläche¹⁰⁹. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei GLUT 4-transfizierten CHO-Zellen. Das Fehlen bisher unbekannter „Vesikeltransporter“ wie z.B. p115 als IRAP-bindendes Protein¹¹⁰ kann erklären, warum auch hier die überexprimierten Glukosetransporter intrazellulär verbleiben.

Ein knockout von IRAP resultiert in einer deutlichen Abnahme der GLUT 4 Dichte der Fettzellen, dabei sind Plasmamembran und mikrosomale Fraktionen

^{xxxix} IRAP (insulin regulated aminopeptidase) wird auch als Oxytocinase, vp165 oder gp160 bezeichnet

^{xl} MAP = mitogen associated protein

gleichmäßig betroffen. Die Aufnahme von [¹⁴C]Glukose in isolierte Adipozyten ist bei den knockout Mäusen in An- und Abwesenheit von Insulin deutlich reduziert¹¹¹. IRAP scheint damit eher insulinunabhängig die Glukoseverwertung zu beeinflussen¹⁰⁶. Möglicherweise führt der Verlust von IRAP zu einer Störung der GLUT 4 Translokation, so dass GLUT 4 einem verstärktem Abbau unterliegt. Damit wäre der Effekt unabhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms.

Es lässt sich spekulieren, dass eine IRAP-Translokation die Wirkung von Peptidhormonen beeinflusst, die als IRAP-Substrate in Frage kommen¹¹². Diese IRAP-kontrollierten Peptide könnten zu einer Herabregulation der GLUT 4 Dichte führen. Eine Agonisten-abhängige Internalisierung des AT₄-Rezeptors ist beschrieben¹¹³.

IRAP spaltet als Aminopeptidase vor allem N-terminale Leucin- und Cystein-Reste ab. Als Substrate kommen vor allem Vasopressin, Oxytocin, Met-Enkephalin, ANG III und im geringen Maße auch ANG IV in Frage¹¹². ANG I, ANG II und das Peptidanalogen SARILE^{XLI} werden nicht abgebaut¹¹⁴. Im Gehirn wird der IRAP-vermittelte Abbau von Dynorphin, Met-Enkephalin und vor allem Vasopressin durch ANG IV gehemmt. ANG IV verlängert die Wirkdauer dieser Peptide in nanomolaren Konzentrationen und ist an Lern- und Denkprozessen beteiligt¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Ein Grund für die Verbesserung der Lern- und Gedächtnisleistung von Versuchstieren könnte daneben auch die verbesserte Glukoseutilisation sein¹¹¹. Substanzen wie Endothelin 1 stimulieren die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten über eine Translokation von IRAP mit einer EC₅₀ von 1 nM, während ANG II keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme und die IRAP-Translokation aufweist^{118,119}.

Der AT₄-Rezeptor findet sich vor allem im Gehirn¹²⁰. Die Verteilung des Rezeptors im Gehirn ist bei Ratte, Meerschweinchen, Affe und Mensch ähnlich. Die höchste Rezeptordichte findet sich in Gehirnarealen, die an Denkprozessen beteiligt sind¹²¹. Dazu passt, dass der AT₄-Rezeptor im zentralen cholinergen System stark vertreten ist. Die histologische Verteilung von GLUT 4 überlappt mit IRAP in einigen Gehirnarealen, vor allem im Hippocampus. Das Opioid LVV-hemorphin-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) kommt hier als endogener Ligand in Frage¹¹⁶.

In der Peripherie findet sich die höchste Rezeptordichte in Nebennierenrinde, Gefäßendothel und Herzmuskel, wo ANG IV der Kollagenbildung im hypertrophen Herzen entgegenwirkt⁷⁷. Bei i.v.-Gabe scheint ANG IV die renale und cerebrale Durchblutung über eine verstärkte NO-Freisetzung zu verbessern. ANG IV

^{XLI} SARILE = (Sar1;Ile8)-Angiotensin II(1-8)

stimuliert die eNOS-Aktivität stärker als eine Äquivalentdosis ANG II. Der spezifische Antagonist Divalinal-ANG IV verhindert sowohl ANG II als auch ANG IV vermittelte Effekte auf die NO-Freisetzung. Daraus lässt sich ableiten, dass das ANG IV/AT₄-System großteils an der ANG II vermittelten Vasorelaxation beteiligt ist^{77,122}. ANG IV induziert daneben die Expression von PAI-1 in Endothelzellen¹⁰⁷ und Adipozyten¹²³, was auf eine Beteiligung am Fibrinolyse-System hindeutet.

In der Niere sind AT₄-Rezeptoren im proximalen Tubulus zu finden. Eine Aktivierung durch ANG IV bewirkt eine Abnahme der Na-Reabsorption, es resultiert eine natriuretische Wirkung.

Bisher wurden in der Ratte zwei unterschiedliche Bindungsstellen des AT₄-Rezeptors beschrieben, eine hochaffine Bindungsstelle (K_D ca. 2,7-5,7 nM)^{112,114} und eine niederaffine Bindungsstelle (K_D ca. 277-727 nM)¹²⁴. Ob es sich um unterschiedliche Rezeptorsubtypen handelt ist nicht geklärt. Man geht von einer allosterischen Interaktion von ANG IV an juxtamembranen Enzymregionen aus. Da ANG IV (3-8) außerdem als Substrat von IRAP diskutiert wird, kommt zusätzlich eine Bindung am aktiven Zentrum in Frage¹⁰³. Heterodimere des AT₄-Rezeptors werden als Erklärung ebenfalls diskutiert¹²⁵.

1.3.2 BILDUNG DER ANGIOTENSIN-PEPTIDE

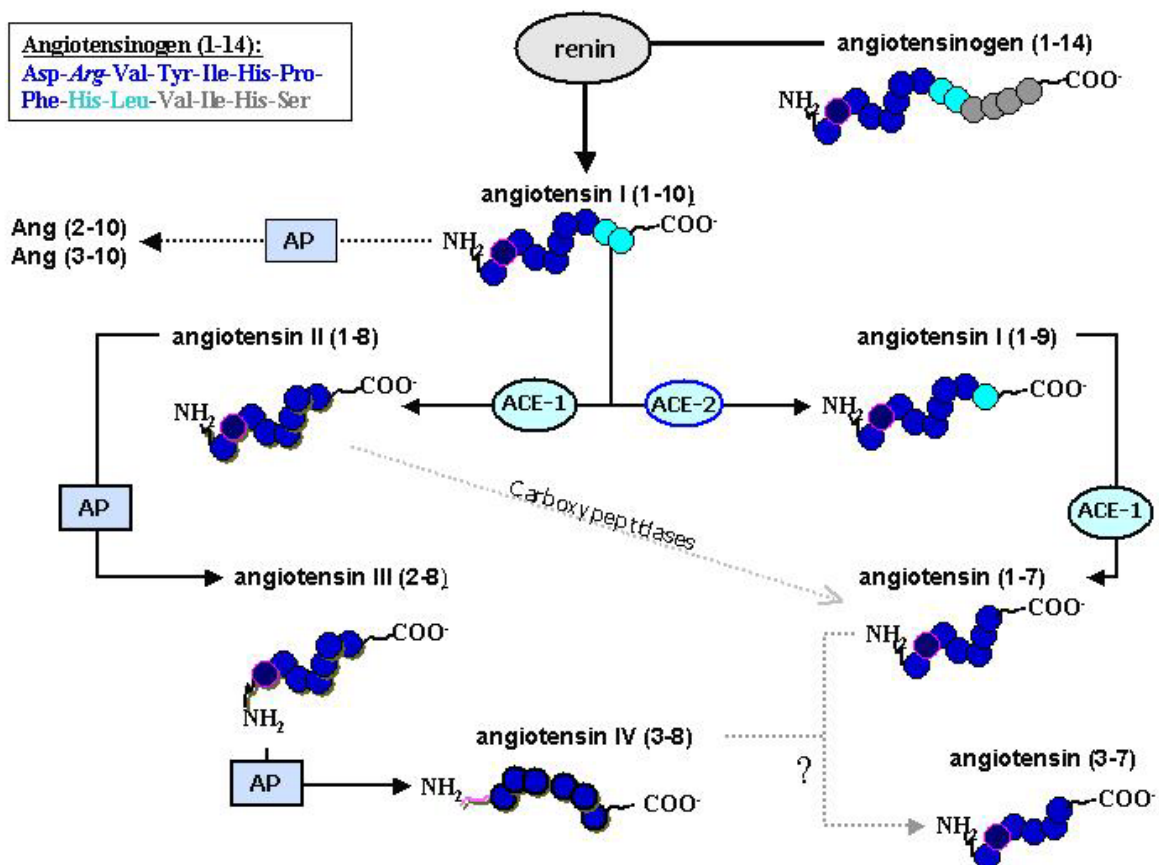
RENIN UND ACE-ABHÄNGIGE BIOGENESE VON ANG II, III UND IV

ANG I (1-10) entsteht über Renin. Die Reninkonzentration im Plasma ist gleichzeitig die Regelgröße des ANG II vermittelten Barorezeptorreflexes. ANG II entsteht klassisch ACE-vermittelt. Daneben wird ANG (1-7) gebildet, welches am AT₂- und am Mas-Rezeptor aktiv ist.

ANG II (1-8) kann zum einen über unspezifische Endopeptidasen inaktiviert werden oder über die Aminopeptidase A zu ANG III (2-8) umgesetzt werden. ANG III (2-8) interagiert mit AT₁-, AT₂- und AT₄-Rezeptoren gleichermaßen.

Aus ANG III entsteht über Aminopeptidase N ANG IV (3-8) als spezifischer Agonist am AT₄-Rezeptor. Die Bildung von Ang (2-10) und weiteren bisher nicht näher untersuchten Peptide mit unbekanntenen Eigenschaften ist ebenfalls möglich.

Abbildung 1-18: Bildung und Abbau von ANG II und verwandten Peptiden mit intrinsischer Aktivität

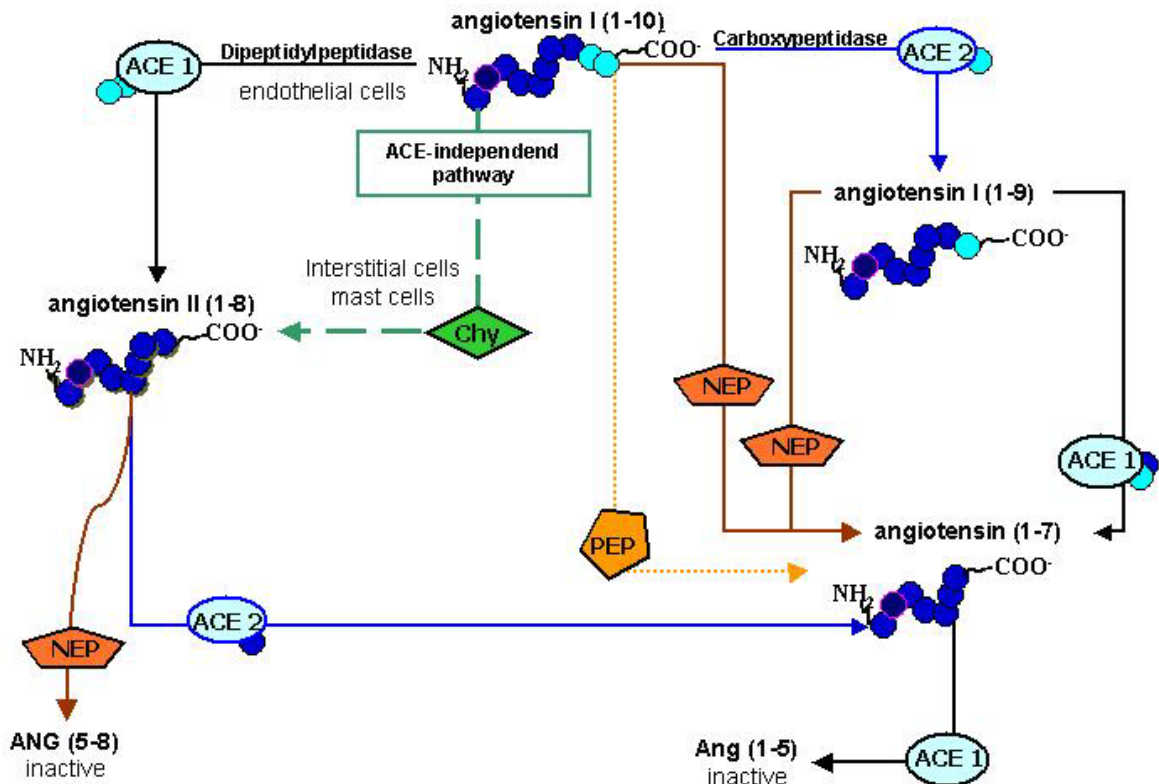


Hauptabbauwege sind mit durchgezogenen Linien dargestellt. Nebenwege mit unklarer Bedeutung sind mit gepunkteten Linien angedeutet. AP = Aminopeptidase

ACE-UNABHÄNGIGE ANG II BILDUNG; BIOGENESE VON ANG (1-7)

ANG II (1-8) kann nicht nur auf dem klassischen ACE-abhängigen Weg gebildet werden. ACE-unabhängige Mechanismen (v.a. Chymasen am Herzen) gewinnen immer mehr an Bedeutung. Auch die direkte Bildung aktiver Peptide über Endopeptidasen (PEP^{XLII} und NEP^{XLIII}) ist denkbar^{126,127}.

Abbildung 1-19: ACE-abhängige und unabhängige Abbauwege von ANG I (1-10)^{XLIV}



Neben den typischen Abbauwegen über ACE-1 sind diverse Endopeptidasen und Chymasen an der Entstehung aktiver Peptide beteiligt. Welche Enzyme wesentlich sind, hängt von deren Verteilung und Kompartimentierung am Wirkort ab. So findet sich ACE überwiegend am Gefäßendothel, während Chymasen unter anderem am Herzen und in Mastzellen eine Rolle spielen¹²⁷.

Neben ANG II kann über ACE-2/ACE-1 vermittelt auch ANG (1-7) entstehen. Da ACE-1 eine höhere Affinität zu ANG (1-10) besitzt als ACE-2 wird bevorzugt ANG II (1-8) gebildet, wenn beide Enzyme zur Verfügung stehen. Gebildetes ANG (1-9) wird dagegen sehr zügig durch ACE-1 zu ANG (1-7) umgesetzt¹²⁸.

ANG (1-7) wird gleichzeitig über ACE-1 weiter abgebaut⁹⁴. Unter Therapie mit ACE-Inhibitoren finden sich im Plasma erhöhte Konzentrationen von ANG (1-7)¹²⁹. Es ist zu bedenken, dass bei der Bestimmung der Angiotensin-Peptide mittels RIA Kreuzreaktionen auftreten. Selektive Antikörper stehen bisher nicht zur Verfügung.

^{XLII} PEP = prolyl endopeptidase

^{XLIII} NEP = neutral endopeptidase

^{XLIV} in Anlehnung an Rice et al. (2004)

ENTSTEHUNG UND ABBAU VON ANGIOTENSIN IV

Wie bereits in Abbildung 1-18 beschrieben wurde, kann Ang II (1-8) durch aminoterminalen Verkürzung um eine Aminosäure zu ANG III und weiter zu ANG IV abgebaut werden¹²⁸. Dies geschieht durch die Aminopeptidase A (AP-A, EC 3.4.11.7) und Aminopeptidase N (AP-N; EC 3.4.11.2)¹³⁰.

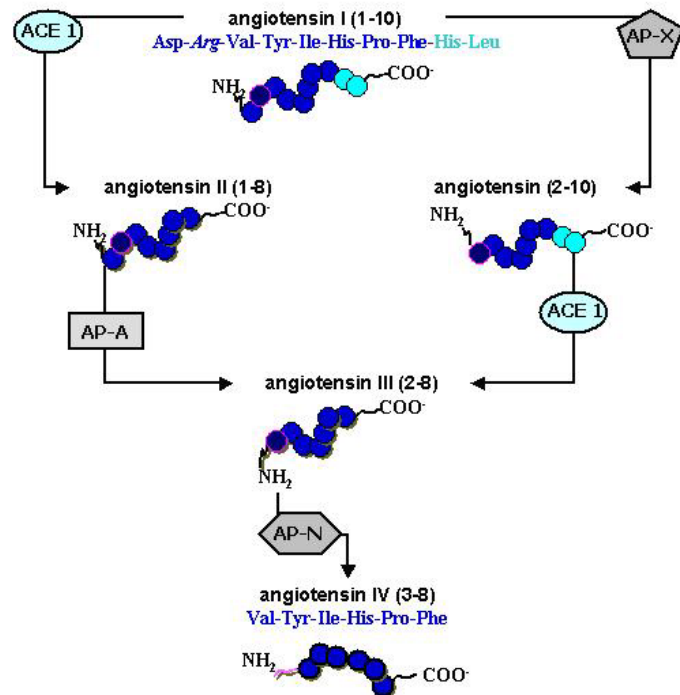
AP-A baut relativ spezifisch Asp1-Arg2 Bindungen ab und lässt sich spezifisch inhibieren durch EC33^{XLV}, als spezifischer AP-N Inhibitor steht EC27^{XLVI} zur Verfügung. PC18^{XLVII} gilt als eher unselektiver Inhibitor¹³¹.

Oftmals lassen sich *in vivo* und *in vitro* Effekte von ANG II nicht mit AT₁-Antagonisten aufheben, während Aminopeptidaseinhibitoren diese Effekte verhindern. Dies zeigt, dass ANG IV für Wirkungen verantwortlich sein kann, die bisher alleine ANG II zugesprochen wurden¹³².

Daneben ist die Aminopeptidase X (AP-X) von Interesse, weil sie ANG I (1-10) zu ANG (2-10) metabolisiert, welches weiter zu ANG III (2-8) umgebaut werden kann. Somit kann ACE-vermittelt ANG III und ANG IV entstehen ohne ANG II (1-8) als Zwischenprodukt (s. Abbildung 1-20).

Letztendlich wird ANG IV durch AP-N und Diaminopeptidase (DAP) weiter in vermutlich inaktive Peptide abgebaut. Dieser Abbau wird durch eine Mischung aus PC18 und JFH-27A^{XLVIII} komplett inhibiert, während Thiorphan als spezifischer NEP-Inhibitor wirkungslos bleibt¹³³.

Abbildung 1-20: Entstehung von ANG IV



^{XLV} AP-A-Inhibitor: (S)-3-amino-4-mercaptobutyl sulfonic acid

^{XLVI} AP-N-Inhibitor: (S)-2-amino-pentan-1,5-dithiol

^{XLVII} unselektiver AP-Inhibitor: 2-amino-4-methylsulphonylbutane thiol

^{XLVIII} dualer DAP und NEP-Inhibitor

1.3.3 ANGIOTENSIN-PEPTIDE

1.3.3.1 ANGIOTENSINOGEN

Das 452 Aminosäuren große Glykoprotein (ca. 60 kDa) Angiotensinogen (AGT) wird in der Leber synthetisiert und in die Blutbahn abgegeben, wo es in hohen Konzentrationen (μM) vorhanden ist und als Reninsubstrat zu ANG I (1-10) gespalten wird. Neben der Leber, wird AGT vor allem im Fettgewebe gebildet. Dabei ist die Expression im viszeralen Fettgewebe größer als im subcutanen Fettgewebe.

1.3.3.2 ANGIOTENSIN (2-10)

ANG (2-10)^{XLIX} ist ein möglicher Präkursor von ANG III (2-8). ANG (2-10)-Plasma-Spiegel sind in SHR-Ratten (46 pmol/l) niedriger als in Wistar-Ratten (66 pmol/l)¹³⁴. Außerdem wurde gezeigt, dass ANG (2-10) ein besseres Substrat für ACE ist, als ANG I (1-10) und damit zu ANG III (2-8) als bioaktives Peptid umgesetzt werden kann¹³⁵. Gleichzeitig ist die Aktivität von Aminopeptidase X als ANG (2-10) formierendes Enzym im Endothel und Plasma von SHR-Ratten erhöht¹³⁶. Es ist denkbar, dass es sich bei der Formierung von ANG (2-10) über Aminopeptidase X um eine Art Escape-Mechanismus bei Hypertonie handelt.

1.3.3.3 ANGIOTENSIN II (1-8)

ANG II gilt als der stärkste physiologische Vasokonstriktor. Es ist 40 fach stärker vasokonstriktorisch wirksam als Noradrenalin, wobei ANG II vor allem auf Arteriolen wirkt und im geringeren Umfang auf venöse Gefäße. Die ACE-abhängige Biogenese findet hauptsächlich am Gefäßendothel statt. Eine ACE-unabhängige Biogenese über Chymasen wurde vor allem am Herzen beschrieben.

In 3T3-L1 Adipozyten erhöht ANG II u.a. die Fettsäuresynthese und den Triglyceridgehalt. Außerdem soll ANG II über Prostaglandin-abhängige messenger-Systeme die Fettzellendifferenzierung beeinflussen und stimuliert die Leptinsekretion aus 3T3-L1 Adipozyten über PG-unabhängige Mechanismen¹³⁷.

^{XLIX} ANG (2-10) wird in der Literatur auch als Des-Aspartat-Angiotensin I (DAA-I) bezeichnet

1.3.3.4 ANGIOTENSIN III (2-8)

Prinzipiell ist die aminoterminal Bildung von ANG III aus ANG II durch Aminopeptidase A oder durch ACE-abhängige Spaltung der inaktiven Vorstufe ANG (2-10) möglich.

ANG III fungiert als unselektiver AT₁/AT₂-Agonist⁸⁵ und bedient anscheinend auch AT₄-Rezeptoren. Der zentrale Einfluss der Angiotensin-Peptide auf die Vasopressin-Freisetzung scheint vor allem durch ANG III und weniger durch ANG II vermittelt zu werden¹³⁰. Hierfür ist die Funktionalität der abbauenden Aminopeptidasen A und N entscheidend^{131,135}.

1.3.3.5 ANGIOTENSIN IV (3-8)

ANG III und ANG IV werden *in vivo* wesentlich schneller abgebaut als ANG II^{138,139}. Dies lässt sich möglicherweise durch eine geringere Proteinbindung erklären. Inwieweit Plasmaspiegel und Wirkung der unterschiedlichen Peptide korrelieren, bleibt dabei offen.

Ein Abbauprodukt von ANG IV (3-8) ist ANG (3-7), welches ebenfalls noch Affinität zum AT₄-Rezeptor besitzt. ANG (3-7) ist dabei gleichzeitig Produkt der ANG (1-7)-Degradation. ANG IV wird auch in Gegenwart gängiger Proteaseinhibitoren abgebaut¹²⁴. Es ist also denkbar, dass vergleichbare Wirkungen von ANG (1-7) und ANG IV auf ein gemeinsames Abbauprodukt zurückzuführen sind.

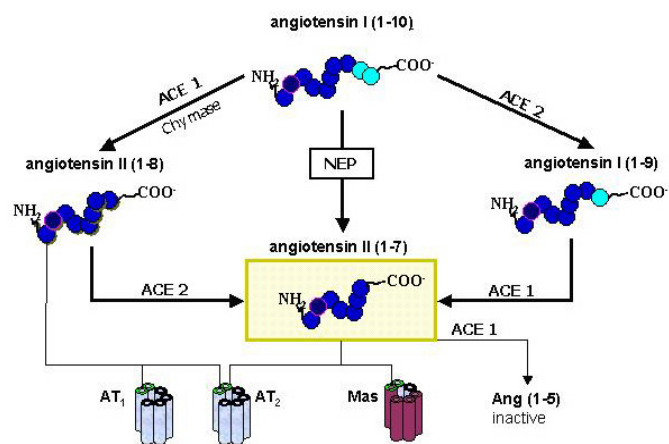
Für die Bindung des Peptids an IRAP ist die Tripeptiddomäne (Val-Tyr-Ile) essentiell¹⁴⁰. Losartan, PD 123319 und ANG II besitzen im Gegensatz zu ANG III (2-8) und ANG (4-8) keine Affinität zum AT₄-Rezeptor^{117,125}.

1.3.3.6 ANGIOTENSIN (1-7)

ANG (1-7) bindet relativ selektiv an den Mas-Rezeptor, aktiviert in höheren Konzentrationen jedoch auch den AT₂-Rezeptor^{95,141}. Die Affinität zum AT₁- und zum AT₄-Rezeptor ist gering¹⁴⁰. Es ist das einzige Peptid, für das eine Affinität zum Mas-Rezeptor beschrieben wurde^{85,142}.

ANG (1-7) kann unter Beteiligung verschiedener Enzyme entstehen:

Abbildung 1-21: Entstehung von ANG (1-7)



- aus ANG I (1-10) über gewebsspezifische Endopeptidasen
- durch carboxyterminale Spaltung von ANG II (1-8) mittels Carboxypeptidase P oder ACE-2
- aus ANG I (1-10) entsteht mittels ACE-2 ANG (1-9), welches als ACE-1-Substrat zum ANG (1-7) umgesetzt wird¹²².

Gleichzeitig wird ANG (1-7) durch die N-Domäne der ACE-1 zum ANG (1-5) abgebaut¹⁴³. ANG (1-5) besitzt keine Affinität mehr zu abbauenden Enzymen wie ACE-2 und NEP¹²⁷.

1.3.4 ENZYME DES ANGIOTENSINOGEN METABOLISMUS

1.3.4.1 RENIN

Renin (EC 3.4.23.15) zählt trotz eines neutralen pH-Optimums zur Klasse der sauren Proteasen. Das 43 kDa große Enzym besteht aus zwei Peptidketten und wird u.a. in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet und in subzellulären Granula gespeichert und im Rahmen des Barorezeptorreflexes auf einen Reiz hin sekretiert. Die Reninplasmaaktivität stellt für das systemische RAA-System den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ANG II Bildung dar.

Neben der Niere, findet sich Renin-mRNA auch in vielen anderen Organen, wie z.B. im Gehirn, Fettgewebe und Nebennieren. Dort ist Renin vermutlich ein Bestandteil lokaler RA-Systeme. Daneben können Mastzellen ebenfalls Renin produzieren und darüber lokale RA-Systeme stimulieren, die selbst über keine Renin-Aktivität aber über ACE und AT-Rezeptoren verfügen (z.B. Myozyten des Herzens, Nervenzellen)¹⁴⁴. Die Funktion des Renins im Gehirn könnte bei der zentralen Blutdruck und Osmoregulation zu finden sein.

Im Plasma findet sich Renin in aktiver und inaktiver Form und wird selbst durch Proteasen aktiviert. Renin spaltet am Carboxylende zwischen Position 10 und 11 des Angiotensinogens das inaktive Deckpeptid ANG I ab. ANG I (1-10) wird damit als Prohormon bezeichnet.

Renininhibitoren galten lange Zeit als vielversprechende antihypertone Arzneistoffe. Als Aspartylprotease-Inhibitoren sind sie verwandt mit den Proteaseinhibitoren zur virustatischen HIV-Therapie.

Renin selbst wird nicht direkt synthetisiert, sondern die peptidische Vorstufe Präprorenin; dieses wird initial um 23 Aminosäuren verkürzt zum Prorenin, welches vorwiegend sezerniert wird. Prorenin kommt 10 mal höher konzentriert vor als das aktive Renin, welches eine Plasmahalbwertszeit von nur 15 Minuten besitzt. Aufgrund der kurzen Plasmahalbwertszeit kann das aktive Renin als sensitive

Regelgröße des RAA-Systems fungieren. AGT-Plasmakonzentration nahe der Michaelis-Menten-Konstante des Renins für AGT sind eine Voraussetzung für die regulatorische Funktion.

Im humanen Fettgewebe konnte Renin selbst bisher nicht nachgewiesen werden auch in anderen Spezies sowie der 3T3-F442A Zelllinie gilt die Renin-Aktivität als gering. Warum in Fettzellen trotzdem das Renin-binding-protein (RENBP) exprimiert wird bleibt unklar¹⁴⁵.

Es lässt sich vermuten, dass die Formierung aktiver Angiotensin-Peptide im Fettgewebe über Renin-unabhängige Mechanismen erfolgt¹²⁸. Cathepsin D als Bestandteil eines Renin-unabhängigen Angiotensin-Systems wurde in Adipozyten bereits nachgewiesen¹²⁶.

1.3.4.2 ACE-1

Das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE, EC 3.4.5.1) gehört zur Klasse der Zink-Metalloproteasen und spaltet als Dipeptidylcarboxypeptidase zwei Aminosäuren von dem entsprechenden Substrat ab. Dabei besitzt ACE-1 die größte Affinität zum Bradykinin, spaltet inaktives ANG I (1-10) zum aktiven ANG II (1-8) und kann an vielen weiteren Stellen in den Angiotensin-Metabolismus eingreifen.

ACE scheint nahezu ubiquitär vorhanden zu sein. Dabei hat die zuerst entdeckte lösliche Form im Plasma eher untergeordnete Bedeutung. Der Großteil des ACE-Enzyms findet sich auf der luminalen Seite des Gefäßendothels, ein kleiner transmembranärer Rest sorgt für die Verankerung des Enzyms in der Zellmembran. Die somatische ACE entsteht aus der membrangebundenen Form durch peptidische Abspaltung des Membranankers durch eine ACE-Sekretase. Dieser Prozess wird als "shedding" bezeichnet¹⁴³.

Es existieren zwei Formen der ACE-1: Somatische ACE und testikuläre ACE. Somatische ACE besitzt zwei aktive Bindungsdomänen (N-Domäne und C-Domäne) mit ähnlichen aber nicht identischen katalytischen Aktivitäten. Testikuläre ACE besitzt nur die aktive C-Domäne. *In vitro* wird ANG I (1-10) überwiegend über diese C-Domäne abgebaut, während *in vivo*-Daten eine Beteiligung beider Domänen am Abbau von ANG I (1-10) vermuten lassen¹⁴⁶.

Neben ACE-1 kann auch Cathepsin G ANG II (1-8) bilden. Cathepsin G wurde in Adipozyten ebenfalls nachgewiesen¹²⁶.

1.3.4.3 ACE-2

ACE-2 weist 42 % Sequenzidentität und 61 % Sequenzähnlichkeit zu ACE-1 auf¹⁴⁷. Im Gegensatz zu ACE-1 besitzt ACE-2 nur ein einzelnes aktives Motiv und

unterschiedet sich als reine Carboxypeptidase deutlich in seiner Substratspezifität¹²⁷. Wie bei ACE-1 handelt es sich um ein integrales Membranprotein. Die carboxyterminale Seite ist in der Membran verankert und die N-terminale aktive Domäne liegt extrazellulär. Neben der membrangebundenen Form existiert eine lösliche Form. Eine posttranslationale proteolytische Spaltung des Membranankers (wie bei ACE-1 beschrieben) ist wahrscheinlich.

Das Enzym ist vor allem am Herzen, in den Testes und in der Niere stark exprimiert. In der Niere findet sich ACE-2 in renalen Arterien und in Epithelzellen des proximalen Tubulus und spielt vermutlich im systemischen und auch in gewebsspezifischen RAS eine Rolle¹⁴⁸ und ist an der Kreislaufregulation über ANG (1-7) beteiligt. Es wurden zwei „single nucleotid polymorphisms“ (SNPs) des ACE-2-kodierenden Gens beschrieben und mit kardiovaskulären Endpunkten in Verbindung gebracht¹⁴⁹.

ACE-2 kann im Gegensatz zu ACE-1 ANG I (1-10) und ANG II (1-8) umsetzen, bevorzugt aber ANG II^{149,150}. Dabei wird eine Aminosäure am carboxyterminalen Ende des Substrats abgespalten. Neben den Angiotensin-Peptiden werden auch opioide Peptide wie Dynorphin A (1-13) und des-Arg9-Bradykinin umgesetzt¹⁵¹.

ACE-2 ist als Zink-abhängige Metalloprotease durch EDTA hemmbar. Captopril und Enalapril beeinflussen als Dipeptid-Analoga nur ACE-1. ANG I ist ein moderater Inhibitor von ACE-2 ($K_i = 2,2 \mu\text{M}$), als potenter Inhibitor wurde das künstliche Peptid DX600 entwickelt ($K_i = 2,8 \text{ nM}$)¹⁴⁹. Sowohl für ACE-1 als auch für ACE-2 werden Chlorid-Ionen benötigt, um die Enzymaktivität zu erhalten.

1.3.4.4 NEPRILYSIN

Die neutrale Endopeptidase (NEP, Neprilysin, Enkephalinase, EC 3.4.24.11) gehört ebenfalls zur Klasse der Zink-abhängigen Metalloproteasen. Als Endopeptidase spaltet NEP vor allem N-terminale hydrophobe Regionen einer Vielzahl von Peptiden. NEP kommt hauptsächlich in der Niere und im Gehirn vor. Im Gehirn ist NEP für den eher unspezifischen Abbau von Neuropeptiden mitverantwortlich¹⁵².

Als Substrate kommen unter anderem Enkephaline, Bradykinin, Substanz P, ANP und auch Angiotensin-Peptide in Frage¹²⁷. Hier baut NEP vor allem ANG (1-9) und auch ANG I (1-10) zu ANG (1-7) ab¹⁵³. ANG (1-7) ist kein Substrat von NEP.

NEP weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem aktiven Zentrum des ACE-1 auf. Die Expression von NEP führt ebenfalls zur Bildung von ANG (1-7), NEP unterscheidet sich aber deutlich in seiner Substratspezifität von ACE-1 und ACE-2¹²⁷ und besitzt nur eine aktive Domäne. Außerdem kann NEP auch größere Peptide wie Insulin und das mit Alzheimer assoziierte Amyloid β spalten^{127,153}.

Der duale Vasopeptidaseinhibitor Omapatrilat hemmt ACE-1 und NEP und wurde zur Behandlung der Hypertonie zugelassen. Das duale Wirkprinzip führt zu einer stärkeren Senkung des Blutdrucks im Vergleich zu ACE-Inhibitoren^{154,155}. In Zuckerfatty Ratten verbesserte Omapatrilat vermutlich über Bradykinin-abhängige Mechanismen die Insulinsensitivität und die Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen stärker als Losartan und Ramipril⁴⁰.

Neprilysin wird auch in Adipozyten exprimiert und ist am ANG II -Abbau beteiligt. ANG II wird von Adipozyten schneller abgebaut als von Präadipozyten. Es ist denkbar, dass in einem lokalen Angiotensin-System des Fettgewebes NEP bedeutender ist, als ACE-1 und ACE-2. Hohe ANG II Konzentrationen scheinen dabei ihren eigenen Abbau zu induzieren¹⁵⁶.

1.3.4.5 α-CHYMASE

In vivo kommt Chymase in Mastzell-Granula vor und bildet dort einen Komplex mit Heparin. Das Enzym bewirkt eine ACE-unabhängige Formierung von ANG II (1-8) und beeinflusst somit den arteriellen Blutdruck deutlich¹⁵⁷. Chymase-abhängig gebildetes ANG II ist am Wachstum des Gefäßendothels nach einer Verletzung beteiligt. Chymase-Inhibitoren könnten in der Prophylaxe des Herzinfarkt Bedeutung erlangen¹⁵⁸.

α-Chymase wurde auch in humanen Adipozyten nachgewiesen. Welche Bedeutung die adipozytäre Chymase im Vergleich zu den konkurrierenden Enzymen ACE-1 und ACE-2 hat, ist bisher unklar¹⁴⁵.

1.3.4.6 AMINOPEPTIDASEN

Die entsprechenden Enzyme werden im Kapitel 1.3.2 (Entstehung und Abbau von Angiotensin IV) besprochen.

1.3.5 DAS PARAKRINE RA-SYSTEM DES FETTGEWEBES

Im humanen Fettgewebe wurden AT_1 -Rezeptoren mittels konfokaler Lasermikroskopie nachgewiesen¹⁵⁹. Während der Fettzellendifferenzierung nimmt die Dichte an AT_1 -Rezeptoren kontinuierlich zu¹⁶⁰, so dass in erwachsenen Adipozyten fast nur noch Typ 1-Rezeptoren gefunden werden können. Mittels Western-Blotting wurden zwar AT_1 -Rezeptoren nebst AT_2 -Rezeptoren in Fibroblasten nachgewiesen, eine quantitative Auswertung war jedoch nicht möglich. Genauso wenig können Aussagen getroffen werden über die Aktivität der Rezeptoren. Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen mittels Rezeptor-Bindungsstudien hochaffine ANG II-Bindungsstellen ausschließlich in differenzierten Adipozyten finden³¹ und weisen diese als AT_2 -Rezeptoren aus. In 3T3-L1 Präadipozyten wurden überhaupt keine hochaffinen Bindungsstellen gefunden. In humanen Präadipozytenmembranen wurden AT_1 -Rezeptoren mittels Sättigungsexperiment in Gegenwart von Losartan als AT_1 -Rezeptoren identifiziert³⁰.

Es gibt eine große Zahl unterschiedlicher Rezeptoruntersuchungen an Fettzellen (s. Abbildung 1-22). Insgesamt bleibt die Verteilung und Bedeutung der Angiotensin-Rezeptoren in differenzierenden Fettzellen widersprüchlich (v.a. in den Nagetierzelllinien 3T3-L1 und 3T3-F442A). Einzig die Existenz von AT_1 -Rezeptoren in Adipozyten ist eindeutig. Unklar bleibt die relative Verteilung von AT_1 und AT_2 -Rezeptoren vor allem in Präadipozyten.

Mas-Rezeptoren und AT_4 -Rezeptoren sind bisher nicht weiter untersucht worden.

Abbildung 1-22: Untersuchungen zu Angiotensin-Rezeptoren an Adipozyten und Präadipozyten

Studie	Zelltyp	Methode	Ergebnisse
Crandall (1994) ¹⁶¹	Isolierte Adipozyten-membran	Verdrängungsversuche und Sättigungsexperimente	Es wurden nur AT ₁ -Rezeptoren an Adipozyten von Ratten und Menschen gefunden. Zellen mit der geringsten Menge an Rezeptoren haben die höchste Affinität für Losartan. Adipozyten wurden von vaskulären Zellen durch Fehlen von ACE-mRNA unterschieden. In Adipozyten sollte allerdings ACE-mRNA vorliegen. Keine Untersuchungen an Präadipozyten
Crandall (1999) ³⁰	Humane Präadipozyten	Sättigungsexperimente mit ¹²⁵ I-SARILE (0,2 - 2,5 nM) Bestimmung der cyclin d1-mRNA in Fibroblasten. (Northern blotting)	Hochaffine Bindung von SARILE an Präadipozyten (K _D = 1,5 nM). Die Bindung kann durch Losartan verdrängt werden (IC ₅₀ = 20 nM) aber nicht durch PD123,319 (IC ₅₀ = 10 µM). Die Autoren schließen, dass nur AT ₁ -Rezeptoren vorhanden sind. Die Sättigungsexperimente im nM-Bereich passen nicht zu einer Erhöhung der cyclin-mRNA durch ANG II in 10 µM Konzentrationen. Die Existenz der AT ₁ -Rezeptorbindung ist recht eindeutig, Aussagen über AT ₂ -Rezeptoren sind dagegen eher fragwürdig. Kurven zu subtypspezifischer Verdrängung werden nicht gezeigt.
Gorzelniaik (2002) ¹⁵⁹	Humane Adipozyten	Konfokale Lasermikroskopie	Die Bildung des membranären AT ₁ -Rezeptors in Adipozyten wird durch Corticoide stimuliert.
Jones (1997) ³¹	3T3-L1 Adipozyten und Präadipozyten	Sättigungsexperimente mit ¹²⁵ I-ANG II (0-2 nM)	Keine hochaffine Bindung an Präadipozyten. Hochaffine Bindung an Adipozyten. (K _D = 0,7 nM); Losartan verdrängt ANG II erst in hohen Konzentrationen (>10 µM) Der Rezeptor wird dem AT ₂ -Rezeptor zugeordnet obwohl Losartan ANG II vermittelte Effekte abschwächt. Eine niederaffine Bindungsstelle wird in Adipozyten erwähnt aber nicht genauer beschrieben.
Juan (2005) ³⁸	Isolierte Ratten-Adipozyten	Verdrängungsversuche in Suspension mit Zentrifugation mit ¹²⁵ I-ANG II	AT-Rezeptoren wurden an suspendierten Adipozyten mit ¹²⁵ I-ANG II nachgewiesen. Die Zuordnung der Rezeptorsubtypen erfolgt nur mittels PCR. Demnach sind sowohl AT ₁ - als auch AT ₂ -Rezeptoren vorhanden.
Mallow (2000) ¹⁶⁰	3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten	Western-Blot	Konstante Expression von AT ₁ -Rezeptoren und abnehmende Expression von AT ₂ -Rezeptoren während der Adipozytendifferenzierung. Keine AT ₂ -Rezeptoren mehr nachweisbar in Adipozyten. Ein quantitativer Vergleich von AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptoren ist nicht möglich.
Schling (2002) ⁹⁰	Humane Adipozyten	Western-Blotting	AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptor-mRNA sind invers korreliert während des Differenzierungsprozesses. Beide Subtypen finden sich in Präadipozyten Das Verhältnis AT ₁ /AT ₂ sinkt während der Adipozytendifferenzierung weil die Expression des AT ₂ -Rezeptor heraufreguliert wird.

1.3.6 WEITERE LOKALE ANGIOTENSIN-SYSTEME

Neben dem klassischen endokrinen System sind in letzter Zeit diverse lokale RAS beschrieben worden. Unter anderem in Gehirn, Testes, Herz, Gefäßen und der Niere wurden parakrine Systeme nachgewiesen¹⁵⁰. Für das metabolische Syndrom könnten das bereits beschriebene RAS des Fettgewebes^{52,162} und des Pankreas¹⁶³⁻¹⁶⁶ von Bedeutung sein.

Zwar sind in einer Vielzahl von Geweben Schlüsselenzyme des Angiotensin-Systems nachgewiesen worden. Ob ein Gewebetypus über alle Schlüsselenzyme in ausreichender Menge verfügt und ob lokale RAS und das systemische RAAS über die gleichen Effektoren funktioniert ist oftmals ungeklärt. Z.B. am Herzen spricht die Existenz von Chymasen und weiteren Enzymen für eine zusätzliche Komplexität lokaler Angiotensin-Systeme im Vergleich zum systemischen RAAS¹⁵⁰.

DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM DES PANKREAS

Angiotensin-Rezeptoren und Peptide sind im Pankreas prinzipiell nachgewiesen worden¹⁶⁷. Eine geringe Aktivität von AGT und Renin im pankreatischen Gewebe sind aber Indizien, dass das Angiotensin-System des Pankreas von systemischen Peptiden abhängig sein könnte. Eine vergleichsweise hohe Angiotensinogen-mRNA Expression in Inselzelltumoren und der RIN Zelllinie lässt vermuten, dass sich die pankreatische Inselzelle von anderen Zielzellen des exokrinen und endokrinen Pankreas unterscheidet. Möglicherweise wird extrazelluläres AGT nach Internalisierung eines Peptid-Liganden-Komplexes reninunabhängig abgebaut¹⁶⁸.

Bindungsstellen für ANG II wurden in A-, B- und D-Zellen der Pankreas nachgewiesen und beeinflussen u.a. die Prostaglandinsynthese, was für eine direkte Modulation der Glukagon- und der Insulinsekretion spricht. Daneben kann die Insulinsekretion der B-Zelle indirekt durch eine ANG II vermittelte Vasokonstriktion und damit veränderte Substratversorgung der Inselzellen beeinflusst werden. Denkbar ist, dass ANG II mehr das Zellwachstum als die Hormonsekretion beeinflusst¹⁶³. IRAP als Träger des AT₄-Rezeptors wurde zusammen mit GLUT 4 Transportern ebenfalls in der pankreatischen B-Zelle nachgewiesen¹⁶⁹.

Im isolierten perfundierten Pankreas der Ratte mit einem intakten vaskulären System hemmt ANG II vor allem die erste Phase der glukosestimulierten Insulinfreisetzung, während ACE-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Insulinsekretion haben¹⁶⁸. An isolierten Inselzellen kann ANG II (100 nM) die glukoseinduzierte Insulinsekretion vollständig verhindern. Losartanvorbehandlung stellt die Insulinsekretion wieder her, was für eine ausschließliche Beteiligung des AT₁-Rezeptors spricht. AT₁-Rezeptoren wurden auf der Zelloberfläche der Inselzellen nachgewiesen¹⁶⁴. Die Glukoseoxidation wird dabei nicht beeinflusst, sondern die Biosynthese des Proinsulins und die Prostaglandin-vermittelte Insulinsekretion¹⁷⁰.

2 MATERIAL

2.1 ZELLINIEN

Bei allen Zelllinien wird auf in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Stocks zurückgegriffen. Um eine konstante Zellqualität zu garantieren, wird die Zelllinie bei hohen Passagennummern neu gestartet. Die hier verwendeten permanenten Zelllinien werden im Zellkulturschrank bei 37° C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

Die Passage der jeweiligen Zelllinie erfolgt spätestens bei einer 70-80% igen Konfluenz. Dabei wird das Zellkulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS (37°C) gewaschen, mit Trypsin/ EDTA angelöst und vom Flaschenboden abgeschlagen. Die Trypsinisierung wird durch Zugabe von 20 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation (300 g, 5 min) lassen sich die Zellen absetzen und der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird in 10-15 ml Kulturmedium aufgenommen, mit einer Pipette suspendiert und je 2-3 ml auf neue Kulturflaschen oder Multiwell-Platten verteilt. Alle Arbeiten werden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Bei den INS-1 Zelllinie wurde die Zellkonzentration zusätzlich durch eine Zellzählung mittels Neubauerzählkammer standardisiert.

2.1.1 INS-1

Die INS-1 Zelllinie ist eine aus einem Röntgenstrahlen induzierten Ratteninsulinom kultivierte permanente Zelllinie. Die Zelllinie wurde in der Arbeitsgruppe von Wollheim ca. 1990 etabliert und von seinem Mitarbeiter Asfari genau charakterisiert¹⁷¹. Verwendet wurden die Passagen 55-75.

2.1.2 3T3-L1

Die Präadipozytäre 3T3-L1 Zelllinie stammt von ECACC^L. Verwendet wurden die Passagen 22-52.

2.1.3 3T3-F442A

Die 3T3-F442A Zellen stammen ebenfalls von ECACC. Verwendet wurden die Passagen 4-24.

^L (European Collection of Cell Cultures)

2.2 ZELLKULTUR

CHEMIKALIEN

	Hersteller	Anmerkung
Ciglitazon	Sigma-Aldrich	
Dexamethason	Sigma-Aldrich	
DMEM ^{LI} high glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories	
Dulbecco's PBS Lösung	PAA Laboratories	ohne Ca ²⁺ ; Mg ²⁺
Foetales Bovines Serum (FCS ^{LII})	PAA Laboratories	Hitzeinaktiviert
HEPES Pufferlösung 1 M	PAA Laboratories	5 ml Aliquote, gelagert bei 4°C
IBMX ^{LIII}	Sigma-Aldrich	
Insulin bovin für Zellkultur	Sigma-Aldrich	10 mg/ml in HEPES 25 mM pH 8,2
L-Glutamin-Lösung 200 mM	PAA Laboratories	5 ml Aliquote, gelagert bei -20°C
Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe	50 mM
Neonatales Kälberserum (NCS ^{LIV})	PAA Laboratories	Hitzeinaktiviert
Penicillin/ Streptomycin 100 fach	PAA Laboratories	5 ml Aliquote, gelagert bei -20°C
Pyruvat-Na Lösung 100 mM	PAA Laboratories	5 ml Aliquote, gelagert bei 4°C
Quantum ® 333	PAA Laboratories	serumfreies Fibroblastenmedium
RPMI 1640	PAA Laboratories	
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories	5 ml Aliquote 0,25 %, gelagert bei -20°C

MATERIALIEN

	Hersteller	Anmerkung
Kryobehälter	Taylor-Wharton	
Kryogefäße 1,5 ml	Nalgene	
Kühlzentrifuge CR412	Jouan GmbH, Dinslaken	
Lichtmikroskop	Krüss GmbH	
Multiwell Platten 6, 24, 96er	Nunc	Nunclon ® , farblos
Pipettboy	Abimed	
Proben-Einfriercontainer	National Lab	
Probenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt	
sterile Werkbank	Antair BSK, Kaarst	
Sterilfilter PTFE	Millipore	für aggressive Lösungen (DMSO)
Sterilfilter PVDF	Millipore	für wässrige Lösungen
Zellkulturflaschen	Sarstedt	
Zellkulturschrank HeraCell 240	Kendro-Heraeus, Berlin	
Zellkulturschrank IG 150	Jouan GmbH, Dinslaken	

^{LI} DMEM = Dulbecco's minimum essential medium

^{LII} FCS = fetal calf serum

^{LIII} IBMX = 3-Isobutyl-1-methylxanthine

^{LIV} NCS = neonatal calf serum

ZELLKULTURMEDIEN FÜR 3T3-L1 ZELLEN

	Zusätze	Endkonzentration
Fibroblastenkulturmedium	DMEM high glucose Neonatales Kälberserum (NCS) Glutamin Penicillin Streptomycin HEPES Natrium Pyruvat	10 % 2 mM 100 I.U./ml 100 µg/ml 10 mM 1 mM
Komplettmedium (= Adipozytenkulturmedium)	DMEM high glucose Fötales Kälberserum Glutamin Penicillin Streptomycin HEPES Natrium Pyruvat	10 % 2 mM 100 I.U./ml 100 µg/ml 10 mM 1 mM
Fibroblasten- differenzierungsmedium	Komplettmedium IBMX Dexamethason Insulin Das Medium wird lichtgeschützt gelagert und max. 3 Wochen verwendet.	0,5 mM 0,25 µM 1 µg/ml (ca. 26 I.U./ml)
Adipozyten- differenzierungsmedium	Komplettmedium Insulin	1 µg/ml
Standardisierungsmedium	Quantum 333®	serumfrei
Einfriermedium	Fibroblastendifferenzierungsmedium 16 ml; NCS 2 ml; DMSO 2 ml Das Pellet einer Passage wird in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und eingefroren	

ZELLKULTURMEDIEN FÜR 3T3-F442A ZELLEN

	Zusätze	Endkonzentration
Kulturmedium	DMEM high glucose Neonatales Kälberserum (NCS) Glutamin Penicillin Streptomycin HEPES Natrium Pyruvat	10 % 2 mM 100 I.U./ml 100 µg/ml 10 mM 1 mM
Differenzierungsmedium	DMEM high glucose Fötales Kälberserum (FCS) Glutamin Penicillin Streptomycin HEPES Natrium Pyruvat Insulin bovin	10 % 2 mM 100 I.U./ml 100 µg/ml 10 mM 1 mM 1 µg/ml

ZELLKULTURMEDIEN FÜR INS-1 ZELLEN

	Zusätze	Endkonzentration
Kulturmedium	RPMI 1640	
	Foetales Kälberserum (FCS)	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 I.U./ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	HEPES	10 mM
	Natrium Pyruvat	1 mM
	Mercaptoethanol	0,5 ml

ADDITIVE

	Herstellung
Dexamethasonstammlösung 5mM	9,8 mg werden in 1 ml Ethanol gelöst und mit sterilfiltriertem ddH ₂ O auf 5,0 ml aufgefüllt. 25 µl Aliquote werden bei -20°C gelagert
Insulin, bovin 10 mg/ml	Die Stammlösung wird direkt verwendet und in situ zugegeben.(55 µl auf 550 ml)
IBMX 10 mM	55 mg IBMX werden in 250 µl sterilfiltrierten DMSO gelöst und direkt zu 550 ml Adipozytenkulturmedium gegeben

ÖLROT-FÄRBUNG

	Herstellung
Neutral gepuffertes Formalin 10 % pH 7	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 46 mM, 8,2 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 29 mM 2,0 g ddH ₂ O 450 ml, Formaldehyd 36 % 50 ml
Harris Hematoxylin Lösung (Accustain®)	Hematoxylin 7,5 g/l, modifiziert mit Natriumiodat, Aluminiumammoniumsulfat, u.a. Die Lösung wird direkt verwendet
Ölrot-Stammlösung	600 mg Ölrot-Pulver werden in 200 ml Isopropanol (99 %) gelöst, Die Lösung ist 1 Jahr haltbar.
Ölrot Arbeitslösung	3 Teile Stammlösung mit 2 Teilen dH ₂ O versetzen, 10 Minuten stehen lassen und filtrieren. Die wasserhaltige Lösung ist maximal 2 h stabil
Isopropanolol 60 % (v/v)	60 ml Isopropanol 99 % + 40 ml dH ₂ O

2.3 SONSTIGE CHEMIKALIEN

UNMARKIERTE ANGIOTENSIN-PEPTIDE

	Hersteller	Anmerkung
(D-Pro7)-Angiotensin-(1-7)	phoenixpeptide	
(Nle1)-ANG IV (3-8)	phoenixpeptide	
(Sar1)-Angiotensin II	Sigma-Aldrich	
(Sar1,Ile8)-Angiotensin II	Sigma-Aldrich	"SARILE"
(Val5)-Angiotensin II	Sigma-Aldrich	
Angiotensin (1-5)	Bachem	
Angiotensin (1-7)	Sigma-Aldrich	
Angiotensin (1-9)	phoenixpeptide	
Angiotensin (3-7)	Bachem	
Angiotensin (5-8)	Bachem	
Angiotensin I (1-10)	Biotrend	
Angiotensin II (1-8)	Biotrend	
Angiotensin II (4-8)	phoenixpeptide	
Angiotensin III (2-8)	Biotrend	
Angiotensin IV (3-8)	Biotrend (Tocris)	
Angiotensinogen (1-14)	Sigma-Aldrich	(Renin substrat)
Angiotensinogen Fragment (11-14)	Sigma-Aldrich	

RADIOLIGANDEN

Radioliganden	Hersteller	Anmerkung
¹²⁵ I-(D-Pro7)-Angiotensin (1-7)	phoenixpeptide	
¹²⁵ I-Angiotensin II (1-8)	Biotrend	
¹²⁵ I-(Sar1,Ile8)-Angiotensin II (1-8)	Biotrend	
¹²⁵ I-Angiotensin II (3-8)	Biotrend	
[³ H]2-Desoxyglucose	Biotrend	Wird direkt verwendet

▪ STAMMLÖSUNGEN

5-10 mg des gewünschten Peptides werden in bidest H₂O zu 1 mM gelöst und 70 µl und/ oder 200 µl Aliquote eingefroren (-20°C). Jedes Aliquot wird nach dem Auftauen maximal für 24 h verwendet. Einmal verwendete Aliquote werden nicht wieder eingefroren.

▪ RADIOAKTIVE STAMMLÖSUNGEN

Die gelieferte Radioaktivität (10-50 µCi) wird in Inkubationspuffer + 0,1 % BSA zu 10 µCi/ml aufgenommen. Je 100 µl Aliquote werden eingefroren.

SONSTIGE CHEMIKALIEN

	Hersteller	Anmerkung
Aprotinin	Sigma-Aldrich	
Bovines Serum Albumin	hausintern	
BSA Albumin 1mg/ml Standard	Pierce	
Dithiothreitol	Fluka	
Ölrot-Farbstoff	Sigma-Aldrich	
HEPES	Sigma-Aldrich	
Indomethacin	Sigma-Aldrich	
Leupeptin	Sigma-Aldrich	
Serva Blue G	Serva	
Sojabohnen Trypsin-Inhibitor	Fluka	
Tris-base	Sigma-Aldrich	cell culture tested

2.4 REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN, RADIOAKTIVE ASSAYS

GERÄTE, MATERIALIEN

Geräte, Materialien	Hersteller	Anmerkung
Dounce Homogenisator	Braun, Melsungen	
Eppendorfszentrifuge	Eppendorf, Hamburg	
Gammacounter LB 2111	Berthold, Wildbad	
Mikroplattenphotometer VIS	Molecular Devices, München	
Multiwell Platten 96er	Nunc	Nunclon ®
Multiwell Platten 96er, f. Bradford	Greiner	
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym	
Pipettenspitzen 0,2 ml Cellsaver	Biozym	
Reaktionsgefäße 1,5 ml PP	Eppendorf, Hamburg	
Soniprep 150	Sanyo Gallenkamp; UK	
Zellschaber	Biochrom	

PUFFER, LÖSUNGEN

Lösung	Beschreibung
Inkubationspuffer 5x	NaCl-39,42 g; KCl 1,86 g; MgCl ₂ ·6 H ₂ O 1,02 g; HEPES 11,92 g; CaCl ₂ ·3H ₂ O 0,735 g ddH ₂ O ad 500,0 ml. Der Stammpuffer wird kühl gelagert.
Inkubationspuffer 1x	Wird am Versuchstag hergestellt durch 1/5 Verdünnung und Zusatz von 0,1 % (w/w) BSA. Danach wird der pH-Wert auf 7,35 eingestellt.
Unmarkierter Working stock für Bindungsstudien	Aus der entsprechenden Stammlösung wird am Versuchstag durch Zugabe von Inkubationspuffers mit 0,1 % BSA ein Working stock (400 µM) hergestellt. Bei Zugabe von 50 µl Working stock zum Inkubationsansatz (Gesamtvolumen 200 µl) ergibt sich eine 100 µM Lösung. Dies entspricht der höchsten einsetzbaren Angiotensin-Konzentration. Niedrigere Konzentrationen werden durch 1/10 Verdünnungen in Inkubationspuffer hergestellt.
Radioaktiver Working stock für Bindungsstudien	Am Versuchstag wird das eingefrorene Aliquot der Stammlösung mit Inkubationspuffer + 0,1 % BSA zum benötigten Volumen (ca. 1,0 bis 1,5 ml) ergänzt. Es sollte eine Gesamtradioaktivität von etwa 70.000 cpm/50 µl resultieren.
Waschpuffer	Der Waschpuffer entspricht dem Inkubationspuffer, wird aber eisgekühlt verwendet
SDS-Lösung 0,5%	2,5 g SDS-Pulver werden möglichst staubfrei in 500 ml dH ₂ O eingewogen

2.5 IRAP-ENZYM ASSAY

GERÄTE

Geräte, Materialien	Hersteller	Anmerkung
Fluoreszenzreader Fluostar®	BMG Labtech	
Multiwell-Platten 96er, schwarz	Nunc	
Reaktionsgefäße 1,5 ml PP	Eppendorf, Hamburg	

CHEMIKALIEN

Geräte, Materialien	Hersteller	Anmerkung
β -Amino-Naphthalin	Sigma-Aldrich	
L-Leucin-2-Naphtylamid-HCl	Fluka	

PUFFER, STAMMLÖSUNGEN

Lösung	Beschreibung
NA Stammlösung (10 μM)	14,3 mg 2-Amino-Naphthalin werden in 10 ml Ethanol gelöst (10 mM). 50 μ l werden entnommen und auf 50 ml Puffer verdünnt (10 μ M). Aus der 10 μ M Stammlösung werden weitere Verdünnungen für die Kalibriergerade hergestellt (0,5, 1, 2, 5 μ M)
Leu-NA Stammlösung (5 mM)	14,6 mg Leucyl-Naphtylamid werden in 10 ml Puffer gelöst.
Leu-NA Lösung (100 μM)	200 μ l der Stammlösung werden auf 10 ml verdünnt. Bei einem Versuchsansatz von 200 μ l ergibt sich bei 50 μ l Substratlösung ein 25 μ M Ansatz.
EDTA-Stammlösung (1 mM)	100 μ l einer EDTA-Maßlösung (1 M) werden auf 100 ml ddH ₂ O verdünnt
Zellsuspension	Der Inhalt einer Zellkulturflasche wird 3 fach mit Inkubationspuffer gewaschen und vorsichtig in 15 ml Puffer abgeschabt.
Versuchsansatz für adhärenente Zellen (24er Multiwell)	Bei Versuchen an adhärenente Zellen werden die Verdünnungen an das Volumen (300 μ l) angepasst und vorgemischt, so dass eine Lösung von 25 μ M Leu-NA mit gewünschter Konzentration an Angiotensin-Peptid entsteht. Die Reaktion startet mit Zugabe von 300 μ l der vorgemischten Lösung zu den adhärenente Zellen.

Es werden die gleichen Inkubationspuffer (ohne BSA) und Stammlösungen der Angiotensin-Peptide verwendet wie für die Rezeptorbindungsstudien.

Alle Lösungen, die β -Amino-Naphthalin bzw. Leucyl-Naphtylamid enthalten müssen bis zu Versuchsbeginn lichtgeschützt aufbewahrt werden.

2.6 [³H]2-DESOXYGLUKOSE-AUFNAHME

GERÄTE, MATERIALIEN

Geräte, Materialien	Hersteller	Anmerkung
Betacounter LS 6000	Beckmann	
Flüssigszinti-Lösung Unisafe 1	Zinsser Analytics	
Microbeta 1450	Wallac Oy, Finland	
Multiwell Platten 24er	Nunc	Nunclon ®
Multiwell-Platten PET 1ml für Microbeta	Wallac Oy, Finland	
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym	0,7 ml
Szintillationsröhrchen 5ml	Zinsser Analytics	
Zellschaber	Biochrom	

PUFFER, LÖSUNGEN

Lösung	Beschreibung
[³H]2-Desoxyglukose-Stammlösung	Die Stammlösung (1 mCi/ml in Ethanol 96 %) wird direkt weiter verwendet.
[³H]2-Desoxyglukose-Lösung (6 µCi/ml)	18 µl der radioaktiven Stammlösung werden zu Versuchsbeginn in 3,0 ml Inkubationspuffer verdünnt. Für den Versuch ergibt sich bei Zugabe von 50 µl Lösung auf 300 µl Gesamtvolumen eine Inkubationsansatz von 1 µCi/ml
ANG IV Wworking stock	Aus der 1 mM Stammlösung wird am Versuchstag ein 600 µM working stock hergestellt. (150 µl ad 250 µl) Bei Zugabe von 50 µl Working stock zum Inkubationsansatz (Gesamtvolumen 300 µl) ergibt sich eine 100 µM Lösung. Dies entspricht der höchsten einsetzbaren Angiotensin-Konzentration. Niedrigere Konzentrationen werden durch 1/10 Verdünnungen in Inkubationspuffer hergestellt.
Waschpuffer	Inkubationspuffer + Glukose 100 µg/ml. Der Puffer wird eisgekühlt verwendet

Inkubationspuffer und 0,5 %ige SDS-Lösung entsprechen den Vorgaben für Rezeptorbindungsstudien.

2.7 INSULIN-SEKRETIONSVERSUCHE, INSULIN-RIA

Die Versuche an INS-1 Zellen wurden exakt nach bereits etablierten Methoden durchgeführt. (s. z.B. Rüsing et al. 2005)¹⁷². Methode und Materialien werden deswegen im Folgenden nicht weiter aufgeführt.

2.8 KAPILLARELEKTROPHORESE

GERÄTE

Geräte, Materialien	Hersteller	Anmerkung
Beckman P/ACE System MDQ	Beckman Coulter	Analytik aus 96er wells bei saurem pH
Beckman Kühlflüssigkeit	Beckman Coulter	
Beckman P/ACE System 5510	Beckman Coulter	Analytik aus Glasvials nach Derivatisierung oder Biuret-Reaktion
Fused-silica Kapillaren, unbehandelt	BGP Analytik GmbH	75 µM Innendurchmesser. 375 µM Außendurchmesser

CHEMIKALIEN

Geräte, Materialien	Hersteller	Anmerkung
DTT	hausintern	
Natronlauge 0,1 N	hausintern	Maßlösung wird direkt verwendet
ddH ₂ O	Hausinterne Destillation	
o-Phthaldialdehyd	Fluka	Derivatisierungsreagenz für Peptide

TRENNPUFFER, STAMMLÖSUNGEN

Lösung	Beschreibung
Borat-Trennpuffer 100 mM pH 9,8	Borsäure 100 mM (618 mg), L-Weinsäure 3 mM (46 mg), CuSO ₄ 1 mM (41,7 mg) werden in ca. 95 ml ddH ₂ O gelöst, der pH-Wert mit NaOH 1 M auf 9,80 eingestellt und anschließend das Volumen auf 100,0 ml ergänzt.
Phosphat-Stammlösung 1 M	Etwa 100 ml ddH ₂ O werden vorgelegt und mit 28,8 g H ₃ PO ₄ (85 %) versetzt. Danach wird auf 250 µl ergänzt.
Phosphat-Laufpuffer 100 mM pH 1,95	Der Laufpuffer wird durch 1:10 Verdünnung der 1 M Stammlösung hergestellt. Der pH-Wert wird eingestellt und der Puffer vor Gebrauch sterilfiltriert.
Inkubationspuffer für Zellen	entspricht dem Inkubationspuffer für Rezeptorbindungsstudien

▪ STANDARDLÖSUNGEN FÜR DIE KAPILLARELEKTROPHORESE

Die Stammlösung eines Peptids wird mit ddH₂O zu 100 µg/ml ergänzt und zu 200 µl aliquotiert. Ein Aliquot wird maximal 24 h verwendet.

Zur Überprüfung der Trennleistung wird eine Mischung von je 20 µg/ml ANG I (1-10), ANG I (1-9), ANG II (1-8), ANG IV (3-8), ANG IV (4-8) hergestellt und ebenfalls zu 200 µl aliquotiert.

3 METHODEN

3.1 ZELLKULTUR

3.1.1 INS-1 ZELLEN

Die Zellen der INS-1 Zelllinie weisen ähnliche Charakteristika auf wie native Beta-Zellen. Sie produzieren Proinsulin und reagieren auf einen Glukosestimulus mit einer Insulinsekretion. Dabei entspricht der Gehalt der INS-1 Zellen an immunoreaktivem Insulin (IRI) etwa 20 % der nativen Beta-Zellen. Die Kultivierung der Zelllinie und die Bestimmung der Insulinsekretion erfolgt unter den üblichen Bedingungen¹⁷².

3.1.2 PRÄADIPOZYTÄRE ZELLINIEN

Zur Untersuchung der Fettzellentwicklung existieren prinzipiell zwei Arten von Zelllinien.

- Multipotente Stammzelllinien (10T1/2) und B(albc/3T3). Diese sind noch nicht Teil der Fettzellentwicklung im engeren Sinne, können aber zu solchen Zellen ausgeprägt werden.
- Präadipozytäre Zelllinien, die sich bereits in der Frühphase der Entwicklung zu Adipozyten befinden und durch Zusatz geeigneter Induktoren zu erwachsenen Adipozyten ausdifferenziert werden können. Im Gegensatz zu den multipotenten Stammzellen reagieren sie sensibel auf exogene Induktoren der Zelldifferenzierung (z.B: IGF, Corticoide)⁵⁵. Als solche kommen die Zelllinien 3T3-L1 bzw. 3T3-F442A und Ob1771 in Frage.

Die Zelllinien 3T3-F442A und 3T3-L1 wurden für die Experimente verwendet.

3.1.2.1 3T3-L1 PRÄADIPOZYTEN

GRUNDLAGEN

Dieser Subklon der 3T3-Zellen wurde erstmals 1974 von Green und Meuth etabliert¹⁷³. Bis heute steht keine humane Zelllinie mit ähnlichen Eigenschaften zur Verfügung, weil murine Fibroblasten humanen Ursprungs sehr schwer zu immortalisieren sind, im Vergleich zu Fibroblasten aus Mäuseembryonen.

Das exponentielle Wachstum der 3T3-Zelllinien ist stark abhängig von der Zelldichte. Bei einer Zelldichte von ca. 50.000 Zellen/cm² schwächt das Wachstum stark ab. Diese stark ausgeprägte dichteabhängige Wachstumshemmung („growth

arresting conditions“) bei bereits relativ geringer Zelldichte trägt dazu bei, dass die 3T3-Zelllinien gut geeignet sind zur Untersuchung wachstumsfördernder Effekte onkogener Viren und als Ziel viraler Transformationen.

Auf Grundlage der 3T3-Zelllinie wurden pluripotente Subklone mit unterschiedlichen Eigenschaften etabliert. Darunter fallen unter anderem die NIH-3T3, 3T3-F442A und 3T3-L1 Zellen. Diese sind als Fibroblasten zur Kollagen- und Hyaluronsäuresynthese befähigt.

Abhängig von äußeren Bedingungen kann der Subklon 3T3-L1 zu Adipozyten differenzieren, wieder dedifferenzieren oder sich z.B. zu Macrophagen umwandeln¹⁷⁴. Für eine erfolgreiche Zelldifferenzierung ist der Zell-Zell-Kontakt unerlässlich. Daran scheint unter anderem der PEF-1 beteiligt zu sein⁵⁵.

ZELLKULTIVIERUNG

Die Zellen werden in 75 cm² Zellkulturlaschen kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert (ca. 70 %ige Konfluenz). Die Passage erfolgt mit DMEM-high glucose + 10 % NCS. Foetales Serum wird nicht verwendet, um eine spontane Veränderung des Phänotyps zu verhindern. Im Gegensatz zum verwandten 3T3-F442A Klon erfolgt bei alleinigem Zell-Zell-Kontakt ohne weitere Induktoren kaum eine spontane Differenzierung. Die Zelllinie ist somit robuster in der Handhabung, muss dafür jedoch durch diverse Additive zur Differenzierung gebracht werden und die Differenzierung erfolgt nicht so vollständig.

ZELLDIFFERENZIERUNG ZU ADIPOZYTEN

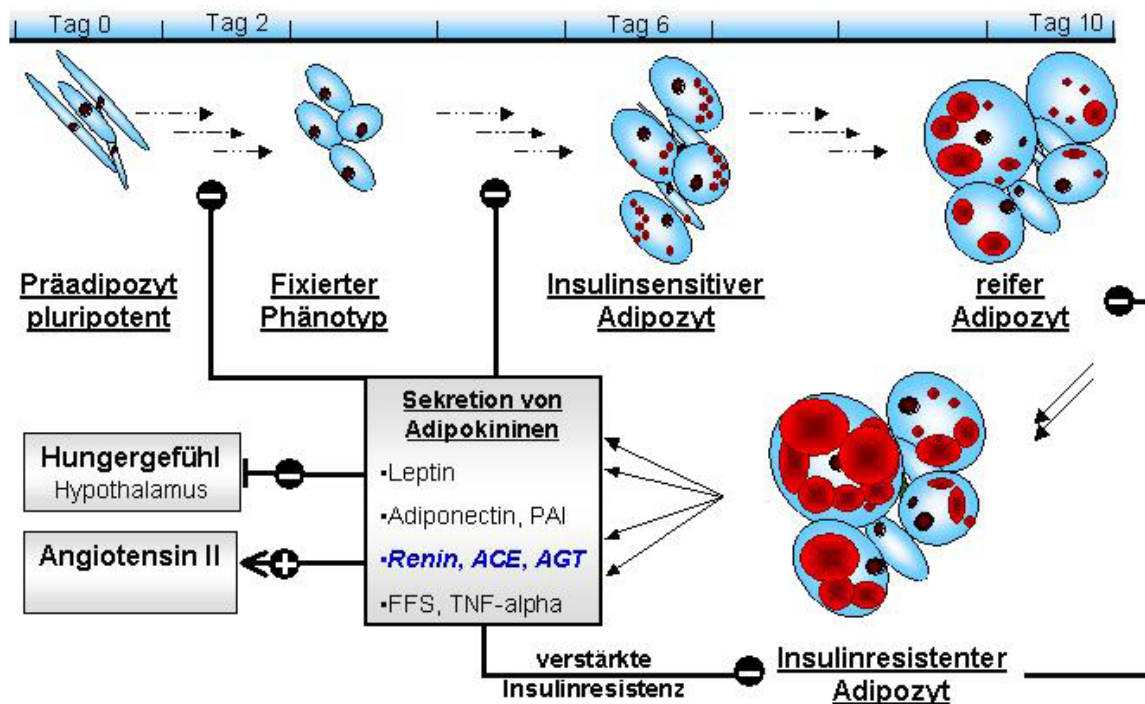
Die Differenzierung wird gestartet nach 3 Tagen Konfluenz der Zellen, also etwa 7-10 Tage nach einer Passage.

Die Präadipozyten werden durch Zusatz mitogener und differenzierungsfördernder Substanzen zu Adipozyten ausdifferenziert. Diese besitzen unter anderem die Eigenschaft zur insulinabhängigen Lipidakkumulation. Heranwachsende Adipozyten und präadipöse Zellen sind nicht mehr teilungsfähig. Folglich werden diese zum Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums aus einer Zellkultur eliminiert. Erst unter den „growth arresting conditions“ -also postkonfluent- kann die Fettzelldifferenzierung induziert werden.

Die fortschreitende Zelldifferenzierung kann durch Formveränderung und Lipideinlagerung kontrolliert werden. Die Aktivität der FAS¹⁷⁵ (fatty acid synthetase) als eines der Markerenzyme der Fettzelldifferenzierung und die PPAR γ -mRNA⁵⁸ steigen proportional zur Proteinmenge und erreichen nach 3 Tagen ein Maximum. Dabei sind Insulin, Glucocorticoide und IBMX alleine nicht in der Lage die

Fettzellendifferenzierung einzuleiten, erst die Kombination der drei Stoffklassen führt in der 3T3-L1 Zelllinie zu einem erkennbaren Anstieg der PPAR γ -Expression¹⁷⁶.

Abbildung 3-1: 3T3-L1 Fettzellendifferenzierung, Modulation durch Adipokine



Die Zelldifferenzierung benötigt *in vitro* etwa 10 Tage. Etwa ab Tag 6 sind adipozytentypische Strukturen zu erkennen. Bei der weiteren Zellreifung entwickeln sich größere insulinresistente Adipozyten. Diese können diverse Adipokine sezernieren. Adipokine können systemische Wirkungen induzieren (z. B. Leptin) oder parakrin die Insulinsensitivität, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung modulieren.

▪ TAG 0: FIBROBLASTENDIFFERENZIERUNGSMEDIUM

Durch den Wechsel auf ein fötales Kälberserum enthaltendes Medium mit Zusatz von IBMX zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel, Dexamethason und Insulin als mitogene und differenzierungsinduzierende Substanzen wird die Fettzellendifferenzierung gestartet.

Die Herstellung und Lagerung des Mediums erfolgt lichtgeschützt, da Dexamethason und IBMX photolabil sind. IBMX ist zytotoxisch und muss deswegen spätestens nach 72 h entfernt werden.

Es werden erste Formveränderungen mit Verlust der fibroblastenähnlichen Erscheinung sichtbar.

▪ TAGE 3, 5 ADIPOZYTENDIFFERENZIERUNGSMEDIUM

Das FibroblastendifferenzierungsmEDIUM wird gegen DMEM high glucose +10 % FBS + Insulin 1 μ g/ml ausgetauscht und alle zwei Tage erneuert, um dem steigenden Stoffumsatz der Zellen gerecht zu werden. Ungefähr nach Tag 5-7 sind deutliche Formveränderungen zu erkennen. Die Ausprägung des neuen Phänotyps

wird mikroskopisch sichtbar. Adipozyten beginnen vereinzelte Lipidtröpfchen einzulagern. Die hohe eingesetzte Dosis Insulin (1-10 µg/ml) ist durch die Kreuzreaktion von Insulin mit dem IGF-Rezeptor in unphysiologisch hohen Konzentrationen zu erklären. Ein Austausch des Insulins gegen physiologische IGF-Konzentrationen wäre denkbar, bringt aber für die Zellkultur keinen Vorteil.

▪ TAGE 7, 9 ADIPOZYTENKULTURMEDIUM

Gegen Ende werden die Zellen ohne weiteren Insulinzusatz kultiviert. Physiologische Insulinkonzentrationen bleiben durch die FCS-Zugabe im Medium.

Die Differenzierung kann mit Hilfe der Ölrot-Färbung kontrolliert werden. Je nach Versuchsaufbau sollten mindestens 50 % der Zellen als differenzierte Adipozyten vorliegen. Die Zellen werden an den Tagen 10-14 für Versuche eingesetzt.

3.1.2.2 3T3-F442A PRÄADIPOZYTEN

GRUNDLAGEN

Der F442A Klon wurde ebenfalls von Green et al. als Subklon der 3T3 Zelllinie etabliert und unterscheidet sich morphologisch kaum vom 3T3-L1 Klon. Er wurde gewonnen durch einfache Subkultivierung konfluenter 3T3 Zellen, welche erste Anzeichen einer Lipidakkumulation aufwiesen. Die 3T3-F442A Zellen werden als Stammzellen der Adipozytendifferenzierung bezeichnet.

Im Gegensatz zur 3T3-L1 Zelllinie neigt die 3T3-F442A Zelllinie zur spontanen Differenzierung. Ein Zellkontakt muss verhindert werden. Die Passage erfolgt somit bei geringerer Zelldichte und in kürzeren Abständen. Beim Ansatz von Versuchen muss ein konstanter Konfluenzgrad der ganzen Oberfläche gewährleistet werden.

Die Anzucht der Zellen unterscheidet sich kaum. Entsprechend der Lieferantenempfehlungen wurde Neonatales Kälberserum verwendet.

ZELLDIFFERENZIERUNG

Die Zelldifferenzierung erfolgt nahezu spontan bei übermäßigem Zell-Zell-Kontakt.

Der Wechsel auf ein insulinhaltiges Differenzierungsmedium führt zur Fettzelldifferenzierung. Im Gegensatz zur 3T3-L1 Zelllinie sind IBMX und Corticoidzusätze nicht nötig. Die Zugabe von Ciglitazon als PPAR γ -Agonist beschleunigt die Differenzierung. Der hohe Zellstoffwechsel erfordert den zweitäglichen Mediumwechsel, um dem hohen Substratbedarf gerecht zu werden.

Die Differenzierung erfolgt vollständiger und es kommt ohne IBMX und Dexamethason-Zugabe zu einem Anstieg der PPAR γ -Expression als Marker der erfolgreichen Fettzelldifferenzierung¹⁷⁶. Die Zelllinie ist gut geeignet für Untersuchungen an differenzierten Adipozyten, zur Studie von Einflüssen auf die Differenzierung selbst ist sie schlechter geeignet, als der 3T3-L1 Zellklon.

3.2 ÖLROT-FÄRBUNG

Durch den fettlöslichen Farbstoff Ölrot O lässt sich der Verlauf der Fettzellendifferenzierung kontrollieren. Im Laufe der Differenzierung erscheinen mehrere kleine zytoplasmatische Vesikel, welche gegen Ende der Differenzierung zu wenigen größeren Tröpfchen verschmelzen.

Diese Lipideinlagerungen erscheinen intensiv rot, Hematoxylin wird zur Gegenfärbung der Nuklei verwendet.

FIXIERUNG DER ZELLKULTUR

- Das Medium wird abgesaugt und der Zellrasen zweifach mit erwärmter DPBS^{LV} gespült.
- Die Zellen werden vorsichtig mit 20 ml neutral gepufferter Formalinlösung überschichtet, ohne den Zellrasen zu zerstören.
- Die Zellkulturflasche wird 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Formalin abgegossen und einmal mit dH₂O gespült.

VORBEREITUNG DES ÖLROT-FARBSTOFFES

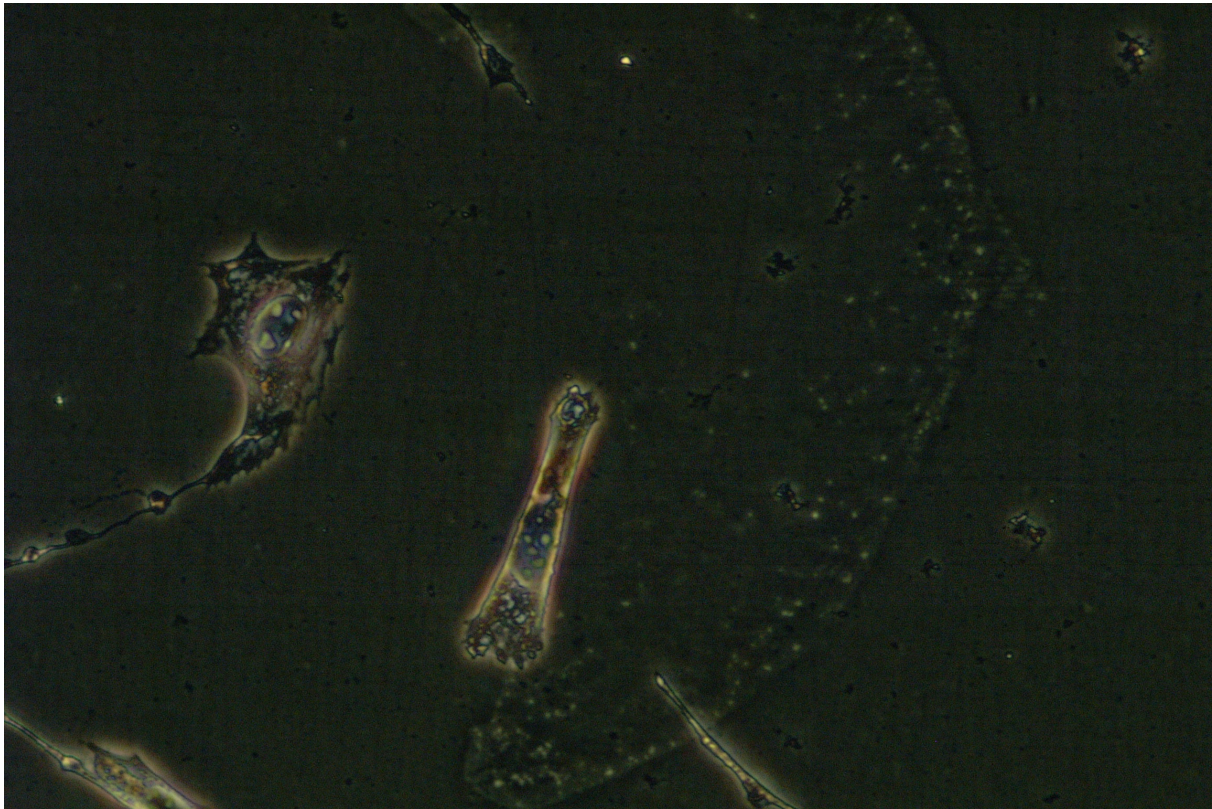
- 600 mg Ölrot O Farbstoffpulver werden in 200 ml Isopropanol 99 % gelöst. Ohne Wasserzusatz bleibt die Lösung mindestens ein Jahr stabil.
- 3 Teile Ölrot-Stammlösung werden in situ mit 2 Teilen dH₂O gemischt und nach 10 Minuten die entstandenen Kristalle abfiltriert. Die Farbstofflösung ist für 2h stabil.

FÄRBUNG

- Die formalinfreie Zellkulturflasche wird mit 20 ml Isopropanol 60 % (v/v) für 2 Minuten inkubiert.
- Nach Entfernen des Isopropanols werden 5 ml Ölrot-Arbeitslösung zupipettiert und der Farbstoff durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt. Nach 5 min wird der Farbstoff vorsichtig mit handwarmen Leitungswasser entfernt.
- Der Zellrasen wird mit 5 ml Hematoxylin-Färbelösung gleichmäßig überschichtet und für eine Minute stehen gelassen. Anschließend wird der überflüssige Farbstoff durch mehrfaches waschen mit lauwarmen Leitungswasser entfernt.
- Die Zellkultur kann unter dem Mikroskop beobachtet werden. Lipideinlagerungen erscheinen rot, die Nuklei blau.

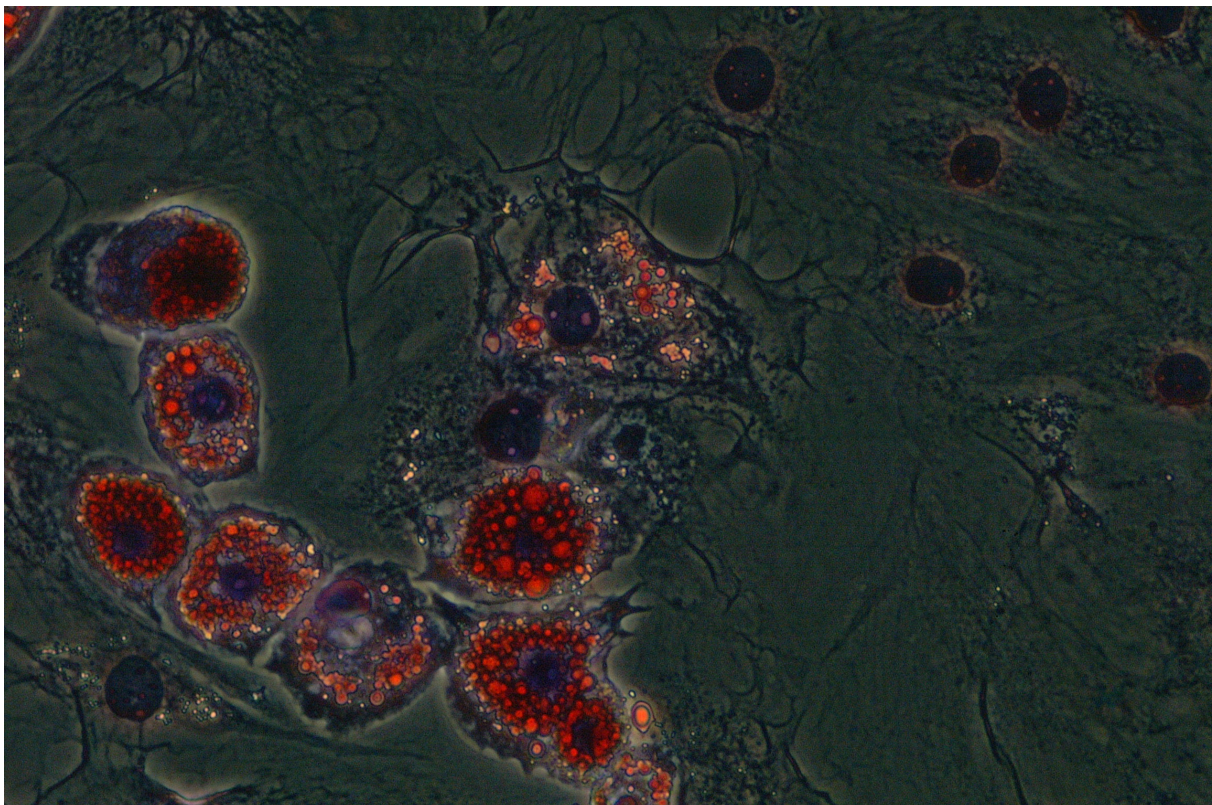
^{LV} DPBS = Dulbecco's phosphate buffered saline

Abbildung 3-2: 3T3-L1 Präadipozyten im Lichtmikroskop



3T3-L1 Präadipozyten (lichtmikroskopische Aufnahme ohne Anfärbung) werden aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung auch als Fibroblasten bezeichnet. Im Rahmen der Fettzellendifferenzierung werden die Zellen rundlicher und es entstehen kleine Lipidvakuolen mit Lipideinlagerungen.

Abbildung 3-3: Ölrot Färbung von 3T3-L1 Adipozyten, 10 Tage nach Induktion der Differenzierung



Die Lipidvakuolen erscheinen leuchtend rot, die rote Färbung der Zellkerne wird durch die Hematoxylin-Gegenfärbung überdeckt. Es erscheinen noch viele kleinere Lipidvakuolen. Mit zunehmenden Zellafter vereinigen sich die Lipidvakuolen zu einer großen Vakuole und drängen den Zellkern an den Rand der Zelle (univakuoläres Fettgewebe).

3.3 REZEPTORBINDUNGS-STUDIEN

Membrangebundene Angiotensin-Bindungsstellen lassen sich mittels Rezeptorbindungsstudien durch die quantitative Verdrängung einer konstanten Menge an radioaktiv markiertem Liganden durch steigende Konzentrationen an unmarkiertem Liganden charakterisieren.

Daneben ist die direkte Charakterisierung mittels Sättigungsexperimenten anhand steigender Konzentrationen des markierten Liganden möglich.

3.3.1 SUSPENSIONSMETHODE

Fibroblasten lassen sich als Ganzzellsuspension oder als aufbereitete Membranfragmente suspendieren. Die Trennung von gebundenen und ungebundenen Liganden erfolgt durch Zentrifugation. Diese Methode gewährleistet die Vermessung ganzer Zellen. Die Standardisierung der Zellkonzentration erfolgt kurz vor Versuchsbeginn. Der komplette Versuchsansatz wird im γ -Counter vermessen und die eingesetzte Radioaktivität des Verdrängungsversuches auf 70.000 cpm umgerechnet. Damit liefert die Suspensionsmethode wesentlich präzisere Werte, als es mit der Lysemethode möglich ist. Die Lysemethode kommt zum Einsatz bei differenzierten Adipozyten, die aufschwimmen und sich nicht als Suspension bestimmen lassen.

ZELLAUFBEREITUNG

Die Zellen einer Zellkulturflasche werden mit 10 ml Inkubationspuffer (37°C) gewaschen und anschließend zweimal in 10 ml Puffer (37°C) abgeschabt (rubber policeman).

Danach wird die erhaltene Suspension 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, um tote Zellen und Zellfragmente von den ganzen Zellen zu trennen. Das Zellpellet wird in 10 ml Puffer resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt.

Das Zellpellet wird im gewünschten Puffer (4°C) bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt und kurz vor Versuchsbeginn erneut suspendiert.

VERSUCHSANSATZ

Es werden je 100 μ l Zellsuspension (in Inkubationspuffer + 0,1 % BSA) auf die gewünschte Anzahl PCR-Probengefäße verteilt. Nach 15 Minuten Temperaturangleich werden je 50 μ l unmarkierter Ligand (in Inkubationspuffer + 0,1% BSA) und 50 μ l 125 I-markierter Ligand pipettiert. Der Versuchsansatz wird im γ -Counter vermessen und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Liganden ein.

Nach 2 h wird die Zellsuspension bei 13.000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und die Reaktion durch Eiskühlung beendet. Der Überstand mit ungebundenem Liganden wird mit Hilfe einer Pasteurpipette und Membranpumpe vorsichtig abgesaugt, ohne das Pellet zu berühren und das ungewaschene Pellet vermessen. Die Messung vor und nach den Waschschrritten dient der Plausibilitätskontrolle und der Optimierung der Waschschrritte.

Der Rückstand wird nach der Messung für weitere 5 Minuten auf Eis gelagert und dreimal mit je 200 µl eisgekühlten Inkubationspuffer + 0,1% BSA mit Hilfe einer Eppendorfpipette mit Cellsaver Spitzen gewaschen. Der Überstand wird direkt mit der Eppendorfpipette abgesaugt und die Zellsuspension erneut vermessen.

AUSWERTUNG

Die Auswertung der Verdrängungsversuche erfolgt nach Umrechnung der eingesetzten cpm je Versuchsansatz auf 70.000 cpm zum Zeitpunkt der ersten Versuchsreihe. Die Aktivität zum Zeitpunkt der ersten Versuchsreihe ergibt sich aus dem Zerfall der ¹²⁵I-Markierung ($t_{1/2}$ ca. 60 d). Nach dem Massenwirkungsgesetz sind die gebundenen cpm proportional zur Proteinmenge und zur Menge der eingesetzten cpm. Die statistische Auswertung und die Regression der Messreihen erfolgt mittels Sigmaplot®.

3.3.2 LYSEMETHODE

Die Adipozyten werden unter physiologischen Bedingungen in 24er wells inkubiert, der Überstand abgesaugt und nach Lyse mit 0,5 %iger SDS-Lösung wird der gebundenen Anteil entnommen und vermessen. Im Vergleich zur Suspensionsmethode erfolgt die Standardisierung der eingesetzten Zellmenge über die Wachstumsfläche, da konfluent gewachsene Zellen die Zellteilung einstellen. Die Bindung an lipidreiche Adipozyten lässt sich nur mittels der Lysemethode bestimmen, weil diese aufgrund ihrer geringen Dichte aufschwimmen und sich nicht suspendieren lassen.

ZELLAUFBEREITUNG

Das Medium der 24er wells wird abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 1 ml Inkubationspuffer +0,1 % BSA (37°C) gewaschen.

Anschließend werden die Wells mit 500 µl eiskaltem Puffer befüllt und die Zellen bis zum Versuchsbeginn auf Eis gehalten.

VERSUCHSANSATZ

Der eisgekühlte Puffer wird abgesaugt. Der Versuchsansatz erfolgt analog zur Suspensionsmethode mit 100 µl Inkubationspuffer + 0,1 % BSA, 50 µl markiertem

und 50 µl unmarkiertem Ligand. Anschließend werden die Multiwells vom Eis genommen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Überstand wird abgesaugt und die Multiwells für 5 Minuten auf Eis gekühlt, der Zellrasen 3 fach mit 200 µl Inkubationspuffer + 0,1 % BSA (4°C) gewaschen.

Danach werden die Zellen zweimal mit 200 µl einer 0,5 % igen SDS-Lösung herausgelöst. Die entnommenen Lysate werden vereinigt und samt Pipettenspitzen im γ -Counter vermessen.

3.3.3 BESTIMMUNG DER STEADY STATE BINDUNG

Der Versuchsansatz entspricht der Beschreibung der Verdrängungsversuche. Die Bestimmung kann mittels Lysemethode oder Suspensionsmethode erfolgen. Für die Bestimmung der Gesamtbindung wird der kalte Ligand durch 50 µl Inkubationspuffer + 0,1 % BSA ersetzt.

3.4 SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

Anstatt mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten indirekt auf die Rezeptorbindung zu schließen, lassen sich Bindungsstellen mit steigenden Konzentrationen des Radioliganden direkt bestimmen. Da hierfür hohe Mengen an Radioaktivität benötigt werden, ist dieser Versuchsansatz nur für hochaffine Bindungsstellen mit Ligandenkonzentrationen bis zu 5-10 nM praktikabel.

VERSUCHSANSATZ

Die 24er-Multiwells werden analog der Lysemethode aufbereitet und vor Versuchsbeginn für 5 Minuten auf Eis gehalten.

Es wird ein passendes Volumen eisgekühlter Inkubationspuffer + 0,1 % BSA und weitere 50 µl Puffer (Gesamtbindung) oder 400 nM unmarkierter Ligand (NSB^{LVI}) vorgelegt, so dass sich mit Zugabe des Radioliganden ein Gesamtvolumen von 200 µl ergibt.

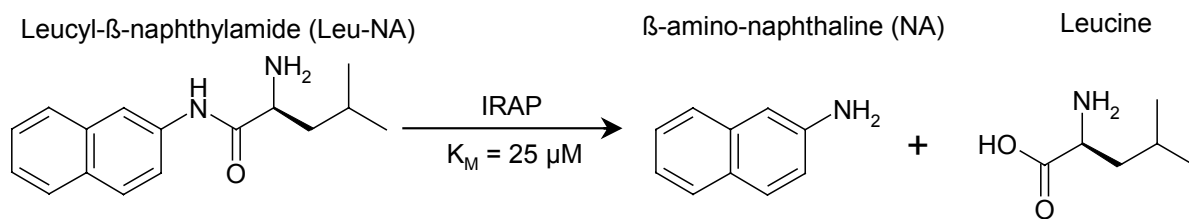
Die Multiwells werden vom Eis genommen und nach 2 h Inkubation analog zur Lysemethode vermessen.

^{LVI} NSB = nonspecific binding

3.5 IRAP-ENZYMSSAY

Die Aktivität von Aminopeptidasen kann durch den Stoffumsatz von Aminosäurederivaten des β -Amino-Naphthalin (NA) bestimmt werden. Für das Enzym IRAP wird als Substrat Leucyl- β -Naphthylamid (Leu-NA) in einer 25 μ M Lösung verwendet. Dies entspricht in etwa dem K_M -Wert des Enzyms, so dass sich eine Hemmung der Enzymaktivität im IC_{50} -Wert zeigen muss, während eine Veränderung der Enzymdichte den maximalen Stoffumsatz V_{max} beeinflusst.

Abbildung 3-4: Umsatz von Leucyl- β -Naphthylamid zu Amino-Naphthalin



VERSUCHSANSATZ

Eine Zellkulturflasche wird wie bei den Verdrängungsversuchen beschrieben gewaschen und abgeschabt. Die Zellen einer Zellkulturflasche werden in 15 ml Inkubationspuffer (4° C) aufgenommen und suspendiert. In eine schwarze 96er Platte zur Fluoreszenzmessung werden 100 μ l Substratlösung (50 μ M) vorgelegt und 50 μ l des Testliganden zupipettiert. Die Reaktion startet mit Zugabe von 50 μ l der Zellsuspension. Auf Zugabe von EDTA oder Proteaseinhibitoren wird verzichtet.

Nach 10 Minuten bei 20° wird das Multiwell vermessen. Die Menge des gebildeten NA ergibt sich aus der Differenz der Fluoreszenzintensität (Ex.: 330 nm; Em.: 390 nm) gegen einen Leerwertmessung ohne Zellzusatz. Die Konzentration lässt sich aus einer Kalibriergerade von NA (0-10 μ M) ablesen.

Als Kontrolle wird ein Ansatz mit 50 μ l 0,1 M EDTA-Lösung statt des Testliganden mitinkubiert. EDTA führt durch Zink-Komplexierung zu einer kompletten Inhibierung des Enzyms.

3.6 [3H]2-DESOXYGLUKOSE-AUFNAHME

Glukose wird in Fettzellen hauptsächlich über GLUT 4 Transporter aufgenommen. GLUT 4 finden sich in unterschiedlichen Kompartimenten. In Antwort auf Insulin kommt es hauptsächlich zur Translokation der endosomalen GLUT 4¹⁷⁷. Diese membranständigen Transporter sind für die Glukoseaufnahme in die Zelle verantwortlich, ein funktioneller Glukosetransport ist für den Zellstoffwechsel und für die Glukosehomöostase essentiell.

Die insulinstimulierte Glukoseaufnahme lässt sich mit Hilfe radioaktiv markierter Glukosederivate bestimmen. Das Derivat [3H]2-Desoxyglukose wird verwendet, da es analog zu Glukose über Glut 4 aufgenommen, aber nach einer Phosphorylierung über Hexokinase und Glukokinase im Rahmen der Glykolyse nicht weiter abgebaut werden kann. Die Aufnahme von [3H]2-Desoxyglukose ist damit direkt auf die intrazelluläre Aufnahme und nicht auf eine Steigerung nachgeschalteter Stoffwechselwege zurückzuführen.

Für die Versuche wurden 3T3-L1 bzw. 3T3-F442A Adipozyten in 24er Multiwells passagiert und mindestens 14 Tage differenziert. Am Versuchstag werden die Zellen für 90 Minuten mit serumfreien Quantum®-Medium inkubiert. Zu Versuchsbeginn werden die Zellen 3 fach mit Inkubationspuffer (37°C) gewaschen. In jedes well werden 200 µl Puffer ohne BSA vorgelegt, danach werden je 50 µl einer Lösung der Testliganden (ANG IV bzw. Insulin) zupipettiert. Die 24er Multiwells werden für 20 Minuten bei 37°C mit den Testliganden inkubiert. Die Reaktion wird gestartet mit der Zugabe von 50 µl der [3H]2-Desoxyglukose-Stammlösung (6 µCi/ml). Nach exakt 10 Minuten wird die Glukoseaufnahme durch Absaugen des Überstandes und waschen mit eisgekühltem Inkubationspuffer (+100 µg/ml Glukose) gestoppt.

Die Zellen werden anschließend zweifach mit 200 µl SDS 0,5%ig lysiert, die Lysate vereinigt. Mit Hilfe eines Flüssigszintillationscocktails wird die in die Zelle aufgenommene Radioaktivität bestimmt.

Als Kontrolle dient die insulin-stimulierte Glukoseaufnahme. Zur Bestimmung der unspezifischen Aufnahme (z.B. durch Diffusion) kann der Transport durch Cytochalasin B gehemmt werden.

3.7 KAPILLARELEKTROPHORESE

Um zu untersuchen, ob bzw. welche Angiotensin-Peptide in Gegenwart von Adipozyten gebildet werden können, werden entsprechende Zellen entweder direkt in autoklavierten, CE-geeigneten Glasvials (für Beckman P/ACE 5510) oder in Nunclon® 96er Multiwell (für Beckman P/ACE MDQ) angezchtet und differenziert.

Die Zellen werden 3 fach mit Inkubationspuffer (20°C ohne BSA) gewaschen und mit Inkubationspuffer und zu untersuchendem Ligand überschichtet. Der Überstand der kultivierten adhärennten Adipozyten wird per Druck oder Vakuum direkt in die CE-Trennkapillare^{LVII} injiziert und analysiert. Somit lässt sich der Angiotensin-Abbau durch lebenden Zellen über die Zeit bestimmen, ohne den Inkubationsansatz zu stören.

Davon abweichend wurde der quantitative Vergleich des Abbaus verschiedener Angiotensin-Peptide in 24er-Multiwells durchgeführt. Die Zellen werden dafür ebenfalls dreifach gewaschen und mit 300 µl Inkubationspuffer + 100 µM Ligand bei 37°C inkubiert. Nach 2 h und 4 h werden je 50 µl des Ansatzes entnommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Proben werden kurz vor der Analyse wieder aufgetaut, 1:5 (40 µl + 160 µl) in ddH₂O verdünnt und analysiert.

Das entstehende Spektrum an Abbauprodukten gibt Aufschluss auf Art und Bedeutung der abbauenden Enzyme an Adipozyten. Die Peaks wurden durch zuspiken bekannter Peptide identifiziert.

PRINZIP DER KAPILLARELEKTROPHORESE

Die Kapillarelektrophorese ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, bei dem die Trennung in wässrigem Probenpuffer in Fused-silica^{LVIII} Kapillaren erfolgt. Durch Anlegen von Hochspannung (bis zu 30 kV) werden geladene Moleküle anhand ihrer Ladungsdichte getrennt.

Damit unterscheidet sich das Trennprinzip der CE deutlich von der HPLC. Prinzipiell zeichnet sich die CE durch eine höhere Trennleistung bei schlechterer Nachweisgrenze aus. Außerdem besitzt die CE vor allem bei wasserlöslichen hydrophilen Analyten Vorteile, weil diese direkt injiziert werden können. Die direkte Injektion wässriger Lösungen wird hier ausgenutzt. Bei kostenintensiven peptidischen Liganden ist das geringe Probenvolumen (wenige Nanoliter) ein weiterer Vorteil. Dem stehen Nachteile in der Reproduzierbarkeit und Robustheit der Analyseverfahren gegenüber.

^{LVII} CE = capillary electrophoresis

^{LVIII} fused silica = Quarzglas

Bei einer Trennung wird die puffergespülte Kapillare kurz in die Probe getaucht und die Analyse mittels Druck oder Vakuum in die Kapillare injiziert. Anschließend wird das Probenvial gegen ein Puffervial getauscht und Spannung angelegt.

An der Fused-silica Kapillare werden bei pH-Werten $>1,9$ die Silanolgruppen deprotoniert und es bildet sich eine negativ geladene Oberfläche mit kationischen Gegenionen als Doppelschicht aus (Helmholtz-

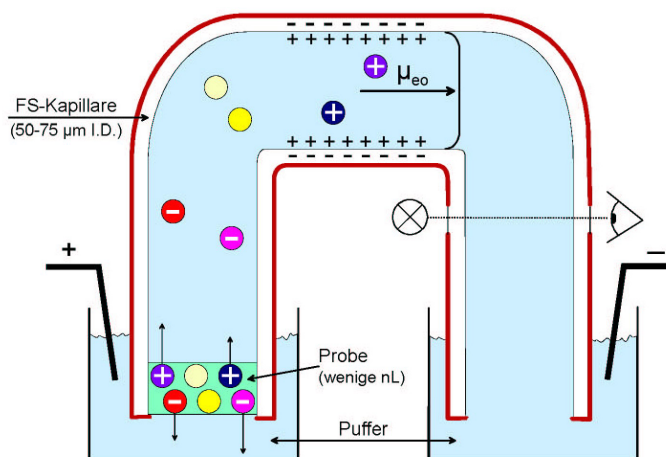
Schicht). Durch die angelegte Spannung bzw. das resultierende elektrische Feld werden die kationischen Pufferionen zur Kathode transportiert. Es entsteht ein EOF^{LIX} der auch neutrale und anionische Moleküle zum Detektor an der Kathodenseite transportiert (s. Abbildung 3-5).

Die Gesamtmobilität (μ_{EFF}) eines Analyten ergibt sich aus der Mobilität des EOF (μ_{EO}) und des Ions (μ_{EP}) mit $\mu_{EFF} = \mu_{EO} + \mu_{EP}$. Mit Hilfe des EOF gelangen also auch Anionen zum Detektor. Kationen erreichen den Detektor zuerst, gefolgt von ungeladenen Teilchen und zuletzt Anionen, sofern ihre eigene Mobilität geringer ist als die Mobilität des EOF.

Sobald die Probenzone eine geringere Leitfähigkeit aufweist als der Trennpuffer, resultiert eine höhere Feldstärke in der Probenzone. Die Ionen der Probenzone werden in Richtung der Grenzschicht Probenzone/Laufpuffer beschleunigt und dort aufkonzentriert. Mit Hilfe dieses „stacking effekts“ entstehen verhältnismäßig scharfe Peaks, was zur hohen Trennleistung der CE beiträgt.

Da Ionen in der CE im Gegensatz zur HPLC mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das Detektionsfenster migrieren, hängt die Peakfläche neben der Analytenkonzentration auch von der Migrationsgeschwindigkeit ab. Je schneller ein Analyt durch das Detektionsfenster wandert, desto geringer das Signal. Deswegen erfolgt die Auswertung der Detektion erst nach Korrektur der Geschwindigkeiten (corrected peak area).

Abbildung 3-5: Kapillarelektrophoretisches Trennprinzip



Nach Vakuuminjektion wird die Kapillare in die Puffervials getaucht. An der negativ geladenen Oberfläche angelagerte Kationen wandern im elektrischen Feld in Richtung Kathode (μ_{EO}). Dieser elektroosmotische Fluss transportiert auch Anionen gegen deren eigene Laufrichtung in Richtung Kathode und damit zum Detektor.

^{LIX} EOF = elektroosmotischer Fluß

KAPILLARELEKTROPHORESE VON PEPTIDEN

Die Trennung hydrophiler Oligopeptide und Proteine ist mittels HPLC oftmals nur schwer zu realisieren. So gelingt die Trennung von Angiotensin-Peptiden mittels HPLC ebenfalls nur mangelhaft. Eine komplexe Beschreibung von Angiotensin und Metaboliten gelingt aufgrund von Kreuzreaktionen der Antikörper fast nur mittels HPLC-RIA Kopplung^{178,179}.

Prinzipiell bieten sich hier CE-Methoden an. Im alkalischen pH-Bereich kommt es durch eine starke Adsorption der Aminofunktionen an die Kapillaroberfläche zu einer Peakverbreiterung und zu starkem Tailing.¹⁸⁰ Dies kann durch die Analytik bei saurem pH oder durch Derivatisierung reduziert werden.

Es wurde eine Derivatisierung der Peptide mit o-Phthaldialdehyd in Gegenwart von Borationen und Mercaptoethanol als reduzierendes Agens versucht¹⁸¹⁻¹⁸³. Die „of-column“-Derivatisierung mit Fluoreszenzdetektion brachte jedoch kaum eine Verbesserung der Nachweisgrenze bei hohem Aufwand und schlechter Trennleistung der derivatisierten Produkte. Deswegen wurde dieser Ansatz wieder verlassen und zur Detektion nach Biuret-Reaktion¹⁸⁴ (pH 9,8) bzw. zur direkten UV-Detektion bei pH 1,95 gewechselt¹⁷⁹.

3.7.1 METHODE A: BIURET-UV-DETEKTION IM ALKALISCHEN

Kupfer-Ionen bilden im alkalischen Milieu mit der Aminosäure-Struktur von Peptiden Komplexe. Da nur Peptide von 3-18 Aminosäuren Länge diese Biuret-Reaktion eingehen, resultiert eine gewisse Selektivität bei der Detektion der Cu^{2+} -Peptid Komplexe. Als Detektion bietet sich neben der UV-Detektion die selektivere elektrochemische Detektion an¹⁸⁴.

Wir verwenden die direkte UV-Detektion bei 200 nm. Die Bildung des Cu^{2+} -Komplexes verstärkt die UV-Absorption bei niedrigen Wellenlängen. Die Komplexbildung mit anschließender Detektion ist bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Peptid stabil (s. Abbildung 3-9a/b).

Kupfer-Ionen und Tartrat können dem Laufpuffer direkt zugesetzt werden, weil sie ohne Komplexbildung nicht UV-aktiv sind. Die Komplexbildung findet damit während des Laufes direkt auf der Kapillare („on-column“) statt und ist abhängig von Ionenstärke und pH-Wert des Borat-Puffers als Laufpuffer. Deswegen ist diese Methode nur in einem relativ engen pH-Bereich (ca. pH 9,4 bis 10,4) anwendbar.

Bei pH 9,8 liegen die neutralen Angiotensin-Peptide deprotoniert vor. Der EOF ist relativ stark ausgeprägt (s. Abbildung 3-7). Die anionischen Peptide wandern entgegen dem EOF in Richtung Anode. Die Cu^{2+} -Ionen beeinflussen die Trennung, so dass die Ladungsdichte eines Analyts (Ladung/Masse) praktisch nur noch vom Molekulargewicht abhängig ist. Kleinere Moleküle werden stärker retiniert als größere Peptide und erscheinen später im Elektropherogramm.

Abbildung 3-6: CE-Bedingungen, Methode A

Gerät	Beckman P/ACE 5510
Kapillare	Untreated fused silica, 60/67 cm 75 μM I.D. 350 μM O.D.
Detektion	UV-Detektion 200 nm
Laufpuffer	100 mM Borat, 3 mM Tartrat 1 mM Kupfer, pH 9,80
Spannung	18 kV
Kapillartemp.	20°C
Probenpuffer	Inkubationspuffer
Injektion	Druckinjektion 30 mbar 5 Sekunden aus Glasvials
LOD	1 $\mu\text{g/ml}$ (ANG II)

Abbildung 3-7: Trennung in Gegenwart von Kupfer-Ionen bei alkalischem pH

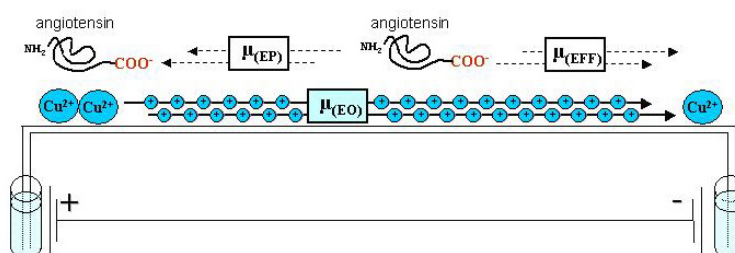


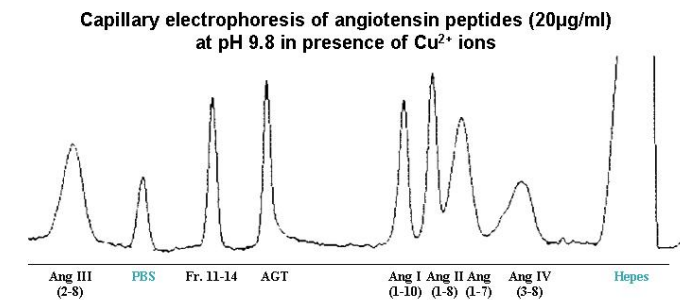
Abbildung 3-8 zeigt ein Beispieleretropherogramm von Angiotensin-Peptiden.

AGT (1-14), ANG I (1-10), ANG II (1-8) und ANG (1-7) eluieren im Sinne einer homologen Reihe. ANG III und ANG IV weisen stark unterschiedliche Migrationszeiten auf. Dies ist auf ein aminoterminal endständiges Arginin bei ANG III zurückzuführen, das beim Abbau zu ANG IV abgespalten wird.

Das Elektropherogramm zeigt, dass sich AGT (1-14), ANG I, II, III und IV vollständig trennen lassen. Die Zuordnung von ANG (1-7) und der hier nicht gezeigten Vorstufe ANG (1-9) ist jedoch nicht möglich.

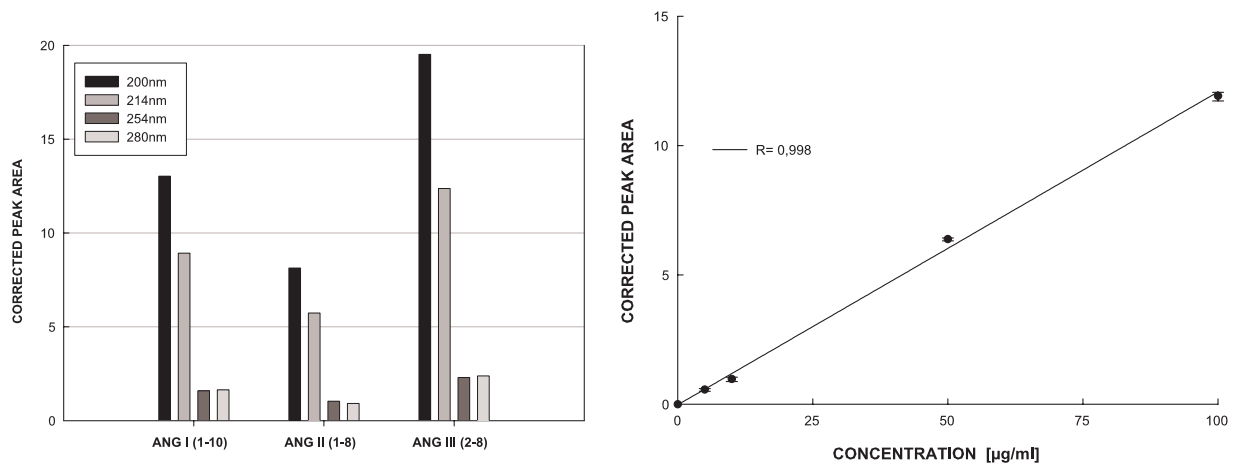
Damit eignet sich diese Methode hauptsächlich für die Bestimmung der Reninaktivität und zum Nachweis von ANG III und ANG IV. Zur Bestimmung des ACE-1 und ACE-2 abhängigen Abbaus eignet sich die Trennung im sauren Milieu (Methode B) dagegen besser.

Abbildung 3-8: Beispieleretropherogramm (Methode A)



Messung in Gegenwart von Cu^{2+} Ionen als Biuret-Reagenz (je 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Abbildung 3-9: UV-Detektion der Angiotensin-Peptide nach Biuret-Reaktion



- (a) Detektion des Peptid-Kupfer-Komplexes bei unterschiedlichen Wellenlängen
- (b) Kalibriergerade am Beispiel von ANG II bei 200 nm

3.7.2 METHODE B: UV-DETEKTION IM SAUREN

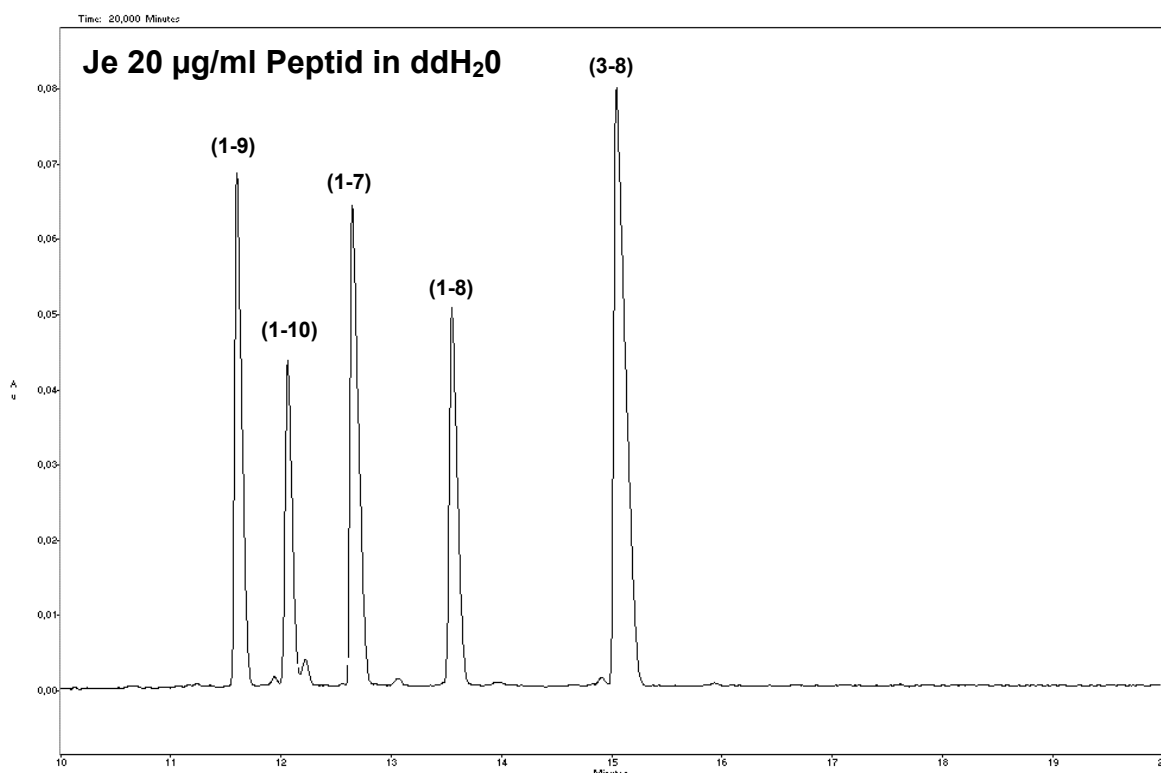
Um die Angiotensin-Peptide zu analysieren, die nach Biuret-Reaktion (Methode A) nicht getrennt werden konnten, wurde eine Trennung bei pH 1,95 etabliert¹⁷⁹. Um die Nachweisgrenze zu verbessern, wurde eine Kapillare mit 75 µm Innendurchmesser gewählt. Bei pH < 2 ist die Deprotonierung der Silanolgruppen sehr gering. Es ist fast kein EOF zu beobachten, gleichzeitig sind alle zwitterionischen Peptide zum Kation protoniert. Durch den niedrigen Ionisierungsgrad der Kapillaroberfläche wird die Adsorption der basischen Peptide (und damit ein Tailing der Peaks) minimiert.

Abbildung 3-10: CE-Bedingungen, Methode B

Gerät	Beckman P/ACE MDQ System
Kapillare	Untreated fused silica, 60/70 cm 75 µm I.D. 350 µm O.D.
Detektion	UV-Detektion 200 nm
Laufpuffer	100 mM Phosphat, pH 1,95
Spannung	20 kV
Kapillartemp.	25°C (bis 40°C bei verkürzter Laufzeit)
Probenpuffer	Inkubationspuffer wird vor der Analyse 1:5 verdünnt
Injektion	Vakuuminjektion 30 mbar, 10 Sekunden aus 96er Multiwell
LOD	ca. 0,25 µg/ml

Die Migrationsreihenfolge der Peptide korreliert bei dieser Methode nicht mit der Größe der Peptide. Abbildung 3-11 zeigt ein Beispielelektropherogramm mit Trennung der wichtigsten Peptide aus einem wässrigen Probenpuffer innerhalb von

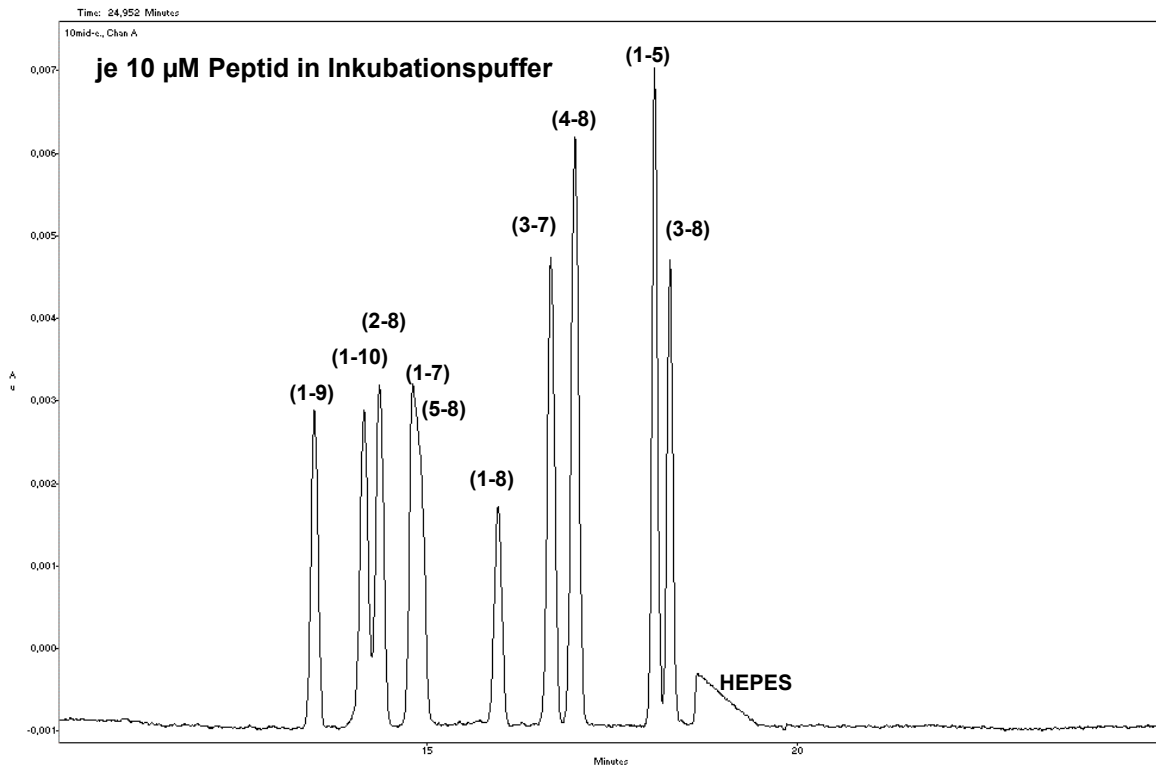
Abbildung 3-11: Trennung der Angiotensin-Peptide aus wässrigem Probenpuffer



Die Analysenzeit kann durch Erhöhung der Kapillartemperatur auf 40° C deutlich reduziert werden. Die Trennschärfe wird wenig beeinflusst, aber die Zuordnung unbekannter Peaks wird erschwert.

15 Minuten. ANG I (1-10), ANG (1-9), ANG II (1-8) und ANG (1-7) sind deutlich getrennt. Damit eignet sich die Methode vor allem zum Nachweis des ACE-1 und ACE-2 abhängigen Abbaus. Die Bildung von ANG I (1-10) aus AGT (1-14) lässt sich nicht bestimmen, da in dieser Methode AGT und ANG I (1-10) comigrieren (hier nicht gezeigt). Die Trennung von ANG (1-7) von ANG (5-8) ist ebenfalls nicht möglich. (s. Abbildung 3-12)

Abbildung 3-12: Trennung der Angiotensin-Peptide 10 µM aus HEPES-Puffer (1:10 Verdünnung)



Das Beispielerktropherogramm zeigt die Trennung von 10 Angiotensin-Peptiden unter Inkubationsbedingungen.

Vor der Injektion wird die Peptidmischung mit ddH₂O verdünnt, um den stacking-Effekt auszunutzen. Ohne Verdünnungsschritt (mind. 1:4) geht die Trennung von ANG IV (3-8) von ANG (1-5) und die Trennung von ANG (4-8) und ANG (3-7) durch massive Peakverbreiterung verloren.

Der HEPES-Puffer (10 mM) des Versuchsansatzes wird gleichzeitig als interner Standard verwendet.

3.8 INSULIN-SEKRETIONSVERSUCHE, INSULIN-RIA

Zur Bestimmung der Insulinsekretion unter ANG IV-Behandlung wurden die Zellen in 24er Multiwells für 90 Minuten mit Liganden (in KRH-Puffer + 5,6 mM Glukose) behandelt. Als Kontrolle dient die Stimulation mit Glibenclamid und der Vergleich der Sekretion bei niedriger Glukosekonzentration (3,0 mM). Aliquote des Überstandes werden entnommen und bei -20°C eingefroren. Die Insulinbestimmung erfolgt mittels RIA^{LX} auf Ratteninsulin.

Die Sekretionsversuche an INS-1 Zellen und das Radioimmunoassay wurden nach bereits etablierten Methoden durchgeführt¹⁷². Methode und Materialien werden deswegen im Folgenden nicht weiter aufgeführt.

^{LX} RIA = Radioimmunoassay

4 ERGEBNISSE

4.1 VERDRÄNGUNGSVERSUCHE

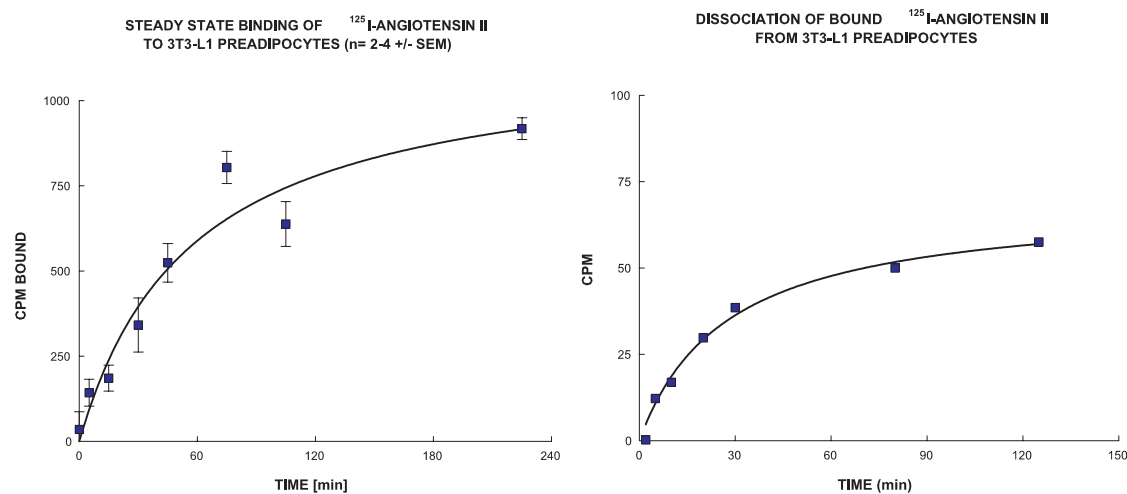
4.1.1 ¹²⁵I-ANGIOTENSIN II (1-8)

¹²⁵I markiertes ANG II (1-8) fungiert als unselektiver Ligand an AT_{1/2} Rezeptoren. Als Agonist ist seine Bindung abhängig von Cofaktoren. Dies erschwert den Versuchsaufbau, kommt aber der Bindung von physiologischem ANG II (1-8) am nächsten.

VORVERSUCHE

Mit Hilfe der steady state Bindung lässt sich die Funktionalität der folgenden Verdrängungsversuche überprüfen. Abbildung 4-1a zeigt eine sättigbare und stabile Bindung. Abbildung 4-1b verdeutlicht, dass es sich um eine reversible Bindung handelt.

Abbildung 4-1: Vorversuche mit ¹²⁵I-ANG II (1-8) an Präadipozyten



(a) Steady state Bindung von ¹²⁵I-ANG II (1-8)

(b) Dissoziation von gebundenem ¹²⁵I-ANG II (1-8) in das umgebende Medium

Die Inkubation über 120 min garantiert eine nahezu konstante Bindung, so dass Schwankungen der Inkubationszeit die Messung der gebundenen Radioaktivität wenig beeinflussen.

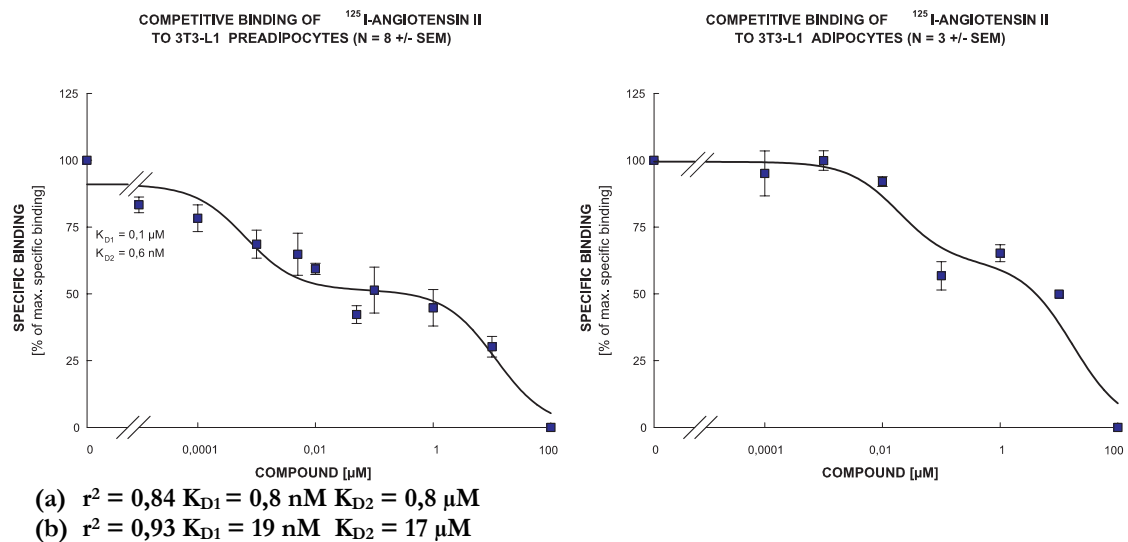
Eine stabile Bindung gilt als Indiz, dass der proteolyselabile Ligand während des Versuches nicht nennenswert abgebaut wird. Eine nicht sättigbare (unspezifische) Bindung und Aufnahme in intrazelluläre Zellkompartimente ist ebenfalls unwahrscheinlich. Dies würde zu einer nicht sättigbaren Zunahme der gebundenen Radioaktivität über die Zeit führen.

BESTIMMUNG DER REZEPTORBINDUNG

Abbildung 4-2 zeigt die Verdrängung von radioaktiv markiertem ANG II (1-8) mit unmarkiertem Liganden an Präadipozyten und Adipozyten. Es lässt sich ein biphasischer Kurvenverlauf beobachten. Dies spricht für mindestens zwei Bindungsstellen im micromolaren und im nanomolaren Bereich ($K_{D1} = 0,1 \mu\text{M}$; $K_{D2} = 0,8 \text{ nM}$).

Die Bindung an Präadipozyten und Adipozyten lässt sich nicht quantitativ vergleichen, da für die Verdrängungsversuche unterschiedliche Methoden verwendet wurden (s. Kapitel 3.3). Qualitativ sind bei 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten ähnliche Affinitäten anzutreffen. Auch das Verhältnis der nanomolaren und micromolaren Bindungsstellen zueinander scheint ähnlich zu sein.

Abbildung 4-2: Verdrängung von ^{125}I -ANG II (1-8) an 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten



▪ HOCHAFFINE REZEPTORBINDUNGSSTELLEN

AT₁- und AT₂-Rezeptoren sind in der Literatur mit nanomolaren K_D -Werten beschrieben, so dass die erste Bindungsstelle diesen G-Protein gekoppelten Rezeptoren AT₁ und/ oder AT₂ zuzuordnen ist. Mit Hilfe der unselektiven Liganden ANG II und SARILE lassen sich AT₁- und AT₂-Rezeptoren nicht weiter unterscheiden.

Bei Betrachtung der Abbildung 4-2a fällt auf, dass der Verdrängungsverlauf vor allem im piko- bis nanomolaren Konzentrationsbereich recht flach verläuft und sich vom gemodelten Kurvenverlauf unterscheidet. Dies gilt als Indiz für eine Beeinflussung der Bindung durch Cofaktoren und weitere Bindungsproteine wie z.B. G-Proteine¹⁸⁵. Die Abhängigkeit der Bindung von aktivierenden Cofaktoren kann nur bei Liganden mit intrinsischer Aktivität auftreten. Messwerte und rechnerischer Kurvenverlauf stimmen für den Agonisten ANG II (1-8) ($r^2 = 0,84$)

schlechter überein als für den unspezifischen AT_{1/2}-Rezeptor Antagonisten SARILE ($r^2 = 0,91$; s. Abbildung 4-3).

Nimmt man die hochaffine Bindungsstelle alleine als spezifische Bindung an, liegt die nichtspezifische Bindung (NSB) bei 80-90 % der Gesamtbindung. Bezogen auf beide Bindungsstellen, liegt die NSB bei ca. 50 %. Die Bindung an Geräte und Plastikmaterialien ist sehr gering (ca. 50-150 cpm), so dass die hohen prozentualen NSB-Werte eher auf eine geringe spezifische Bindung (d.h. eine geringe Zahl von exprimierten Rezeptoren) zurückzuführen ist. Die Dichte der membranständigen (und damit in Ganzzellversuchen nachweisbaren) Rezeptoren in Adipozyten und Präadipozyten muss alleine deswegen als sehr gering angesehen werden.

▪ NIEDERAFFINE REZEPTORBINDUNG

Unklar bleibt die Bedeutung der micromolaren Bindungsstelle. Diese zeigt bis zur höchsten verwendeten Ligandenkonzentration (100 μ M) keinen Wendepunkt. Damit ist der Endpunkt des sigmoidalen Kurvenverlaufs schwer abschätzbar. Für eine präzise Charakterisierung des Wendepunkts werden je zwei stabile Messwerte oberhalb und unterhalb des sigmoidalen Kurvenverlaufs empfohlen. Eine Berechnung der Bindungskapazität und der K_D -Werte kann und soll deswegen nicht präzise erfolgen.

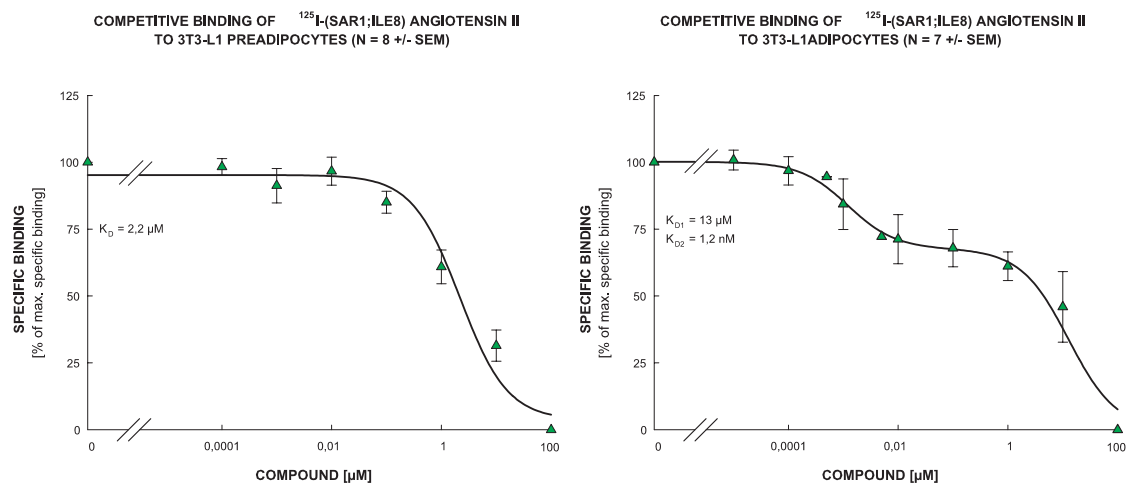
Die zweite Bindungsstelle lässt sich als spezifische Bindung mit micromolarer Affinität (0,1 μ M - 1 μ M) charakterisieren; die Bindungskapazität der zweiten Bindungsstelle ist mindestens 5-10 fach höher im Vergleich zur hochaffinen Bindungsstelle.

4.1.2 ¹²⁵I-(SAR1;ILE8)-ANGIOTENSIN II (1-8)

¹²⁵I-SARILE und unmarkiertes SARILE werden als unspezifischer Antagonist an AT₁- und AT₂-Rezeptoren eingesetzt. Allerdings gibt es Hinweise, dass SARILE eine 4 fach höhere Affinität zum AT₂-Rezeptor (K_D = 0,3 nM) besitzt als zum AT₁-Rezeptor (K_D = 1,2 nM). Die K_D Werte von Proben die nur AT₁- oder AT₂-Rezeptoren besitzen, unterscheiden sich im Vergleich zu Proben, die beide Rezeptorsubtypen aufweisen⁸⁰.

Die Veränderung der Aminosäurestruktur mit Sarcosin (N-methyl-glycin) schützt vor aminoterminalen Abbau durch Aminopeptidasen, der carboxyterminale Austausch gegen Isoleucin soll das Peptid gegen Carboxypeptidasen wie z.B. ACE-2 schützen. Als antagonistischer proteasestabiler Ligand ist SARILE damit wesentlich komfortabler zu handhaben als ANG II (1-8).

Abbildung 4-3: Verdrängung von ¹²⁵I-SARILE an 3T3-L1 Präadipozyten und 3T3-F442A Adipozyten



BESTIMMUNG DER REZEPTORBINDUNG

▪ PRÄADIPOZYTEN

Abbildung 4-3a zeigt die Rezeptorbindung an Präadipozyten unter Verwendung von ¹²⁵I-SARILE als markierten Liganden bei Verdrängung mit unmarkiertem SARILE. Der Kurvenverlauf entspricht einer Verdrängung mit einer Bindungsstelle mit micromolarer Affinität. Der Kurvenverlauf ist im Gegensatz zu ¹²⁵I-ANG II (1-8) nicht abhängig von Cofaktoren. Unklar ist, wieso hier keine hochaffine Bindungsstelle gefunden wurde. Zu alte Passagen mit veränderter Rezeptordichte der Präadipozyten sind eine mögliche Erklärung¹⁸⁶. Einzelne Messreihen geben zwar Indizien für eine hochaffine Bindungsstelle, ein Nachweis hochaffiner Bindungsstellen ist aber vermutlich aufgrund hoher NSB-Werte (s. Kap. 4.1.1) nicht

möglich. Die micromolare Bindungsstelle ($K_D = 2,2 \mu\text{M}$) dominiert in Präadipozyten. Die Affinität von SARILE ($K_D = 2,2 \mu\text{M}$ bzw. $13 \mu\text{M}$) scheint etwas niedriger zu sein, als von ANG II ($K_D = 0,1 \mu\text{M}$).

▪ ADIPOZYTEN

In Abbildung 4-3b zeigt sich wieder der typische biphasische Verlauf. Der K_D -Wert der hochaffinen Bindungsstelle stimmt mit $1,2 \text{ nM}$ mit den Literaturangaben überein. Es zeigt sich, dass sowohl nanomolare als auch eine micromolare Bindungsstellen in Adipozyten vorkommen. Das Verhältnis der Bindungsstellen liegt ebenfalls bei 5-10:1 und ist den Beobachtungen an Präadipozyten sehr ähnlich.

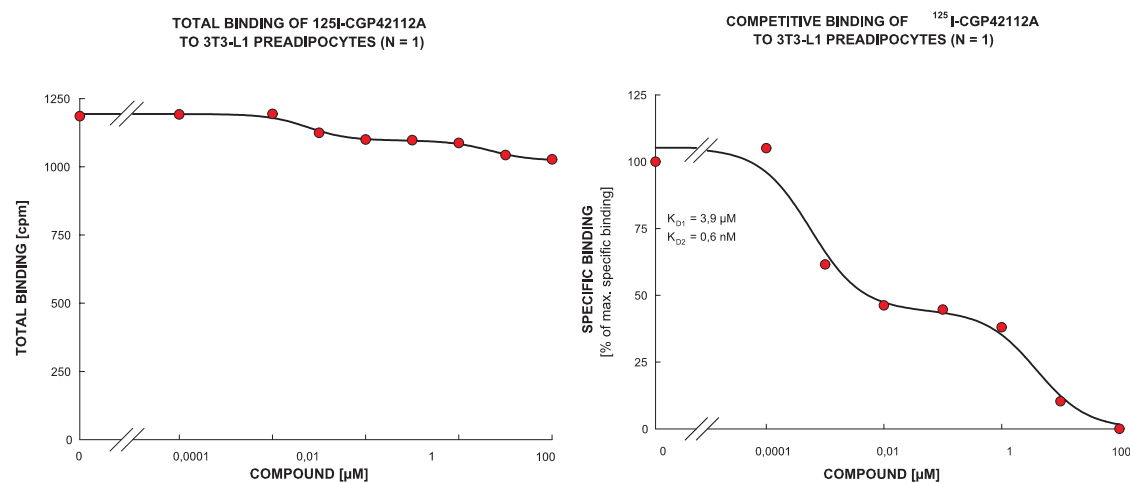
F442A-Adipozyten wurden verwendet, weil diese im Gegensatz zu 3T3-L1 Adipozyten zu fast 100 % ausdifferenzieren. Die Existenz zu großer Anteile von Präadipozyten im Versuchsansatz (Multiwell) erschwert die Zuordnung der Rezeptoren zu den Differenzierungsstadien bzw. macht sie unmöglich. Der Vergleich von 3T3-L1 Präadipozyten mit F442A-Adipozyten ist also aussagekräftiger als der interne Vergleich von 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten.

4.1.3 ¹²⁵I-CGP-42112A

Wie unter 4.1.1 beschrieben, ist es das erste mal gelungen, nanomolare Bindungsstellen mit Hilfe von Verdrängungsversuchen an 3T3-L1 Präadipozyten zu beschreiben. Die Existenz von AT₁-Rezeptoren in humanen Präadipozyten (die bereits mit FCS stimuliert wurden) ist gesichert durch Sättigungsexperimente in Gegenwart von Losartan³⁰. Umstritten ist vor allem die Existenz des AT₂-Subtyps in Präadipozyten. An undifferenzierten 3T3-L1 Zellen konnten bisher keine hochaffinen AT-Rezeptoren nachgewiesen werden³¹, hier existieren nur Hinweise aus Western-Blots und PCR-Versuchen¹⁶⁰.

Die micromolare Bindung bei SARILE und ANG II (1-8) erschwert die Charakterisierung der nanomolaren Bindung. Als Bezugswert für die unspezifische Bindung müsste ein Messwert in der Nähe des zweiten K_D-Wertes gewählt werden, was zu großen Streuungen führt. Für die weitere Charakterisierung wurde zu ¹²⁵I-CGP42112A^{LXI} als partiellen Agonisten am AT₂-Rezeptor gewechselt. Gegenüber dem AT₁-Rezeptor ist eine 3000 fache Selektivität beschrieben^{84,85}.

Abbildung 4-4: Gesamtbindung und spezifische Bindung von CGP42112A an Präadipozyten



- (a) Gesamtbindung bei Verdrängung mit unmarkiertem Liganden.
 (b) Die spezifische Bindung ergibt sich aus der Differenz der Gesamtbindung in Abwesenheit und in Anwesenheit von 100 µM CGP42112A (NSB) ($r^2 = 0,99$)

BESTIMMUNG DER REZEPTORBINDUNG

In Abbildung 4-4a ist wiederum eine extrem hohe unspezifische Bindung (bis zu 90 %) zu erkennen. Mit Hilfe der Suspensionsmethode lassen sich dennoch präzise Werte ermitteln. Die Bestimmung der spezifischen Bindung über einen weiten Konzentrationsbereich (0-100 µM) wurde aus Kostengründen nur einfach durchgeführt (s. Abbildung 4-4b). Die ermittelten K_D-Werte sind mit 3,9 µM und

^{LXI} ¹²⁵I-CGP42112A = Nikotinsäure-(¹²⁵I-Tyr)-(N-α-benzyloxycarbonyl-Arg)-Lys-His-Pro-Ile-OH

0,6 nM vergleichbar mit der Bindung an AT₁- und AT₂-Rezeptoren transfizierter COS-1 Zellen ($K_D = 11 \mu\text{M}$; 4,0 nM)⁸⁴.

▪ MICROMOLARE REZEPTORBINDUNG

Es zeigt sich, dass eine niederaffine Bindungsstelle zwar vorhanden ist, (s. Abbildung 4-4b) sich aber in der Bindungskapazität deutlich von der micromolaren Bindungsstelle bei ANG II und SARILE unterscheidet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich in diesem Fall um eine niedrigaffine Bindung des selektiven AT₂-Liganden an den AT₁-Rezeptor handelt, also eine niederaffine Bindung mit niedriger Bindungskapazität.

Diese Bindungsstelle ist nicht mit der micromolaren Bindungsstelle mit hoher Bindungskapazität gleichzusetzen, die mit den unselektiven Liganden nachgewiesen wurde. Vielmehr zeigt sich, dass CGP42112A für diese micromolare Bindungsstelle keine Affinität aufweist. Auch gegenüber dem AT₄-Rezeptor ist CGP42112A damit selektiv (s. Kapitel 4.1.5).

Vergleicht man das Verhältnis der gebundenen Menge Ligand an 1. und 2. Bindungsstelle, so fällt auf, dass jeweils etwa 50 % der gesamten spezifischen Bindung auf eine Bindungsstelle entfallen. Dies spricht für eine ungefähr äquimolare Verteilung von AT₁- und AT₂-Rezeptoren in Präadipozyten.

▪ NANOMOLARE REZEPTORBINDUNG

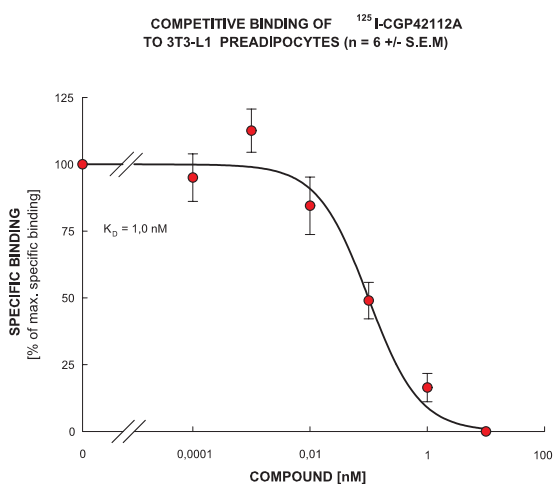
Zur Charakterisierung des AT₂-Rezeptors wird der nanomolare Bereich genauer untersucht. Als NSB wird die Bindung in Gegenwart von 100 nM CGP42112A angenommen.

In Abbildung 4-5 zeigt sich eine hochaffine Bindung des Radioliganden an Präadipozyten. Damit sind AT₂-Rezeptoren in Präadipozyten nachgewiesen.

An Adipozyten konnte keine spezifische Bindung gefunden werden. Dies kann zum einen methodische Gründe haben (höhere Schwankungen bei der Lysemethode) oder auf ein

Fehlen hochaffiner membranständiger AT₂-Rezeptoren hindeuten. Dies würde die Erkenntnisse aus Western-Blotting Versuchen bestätigen^{90,160}.

Abbildung 4-5: Verdrängung von ¹²⁵I-CGP42112A an 3T3-L1 Präadipozyten



Der Messwert bei 0,01 nM CGP42112A weicht vom theoretischen Kurvenverlauf ab. Es ist denkbar, dass es sich um eine positive Kooperativität der Rezeptoraffinität handelt, die durch CGP42112A als Agonist induziert wird. ($r^2 = 0,89$; $K_D = 1,0 \text{ nM}$)

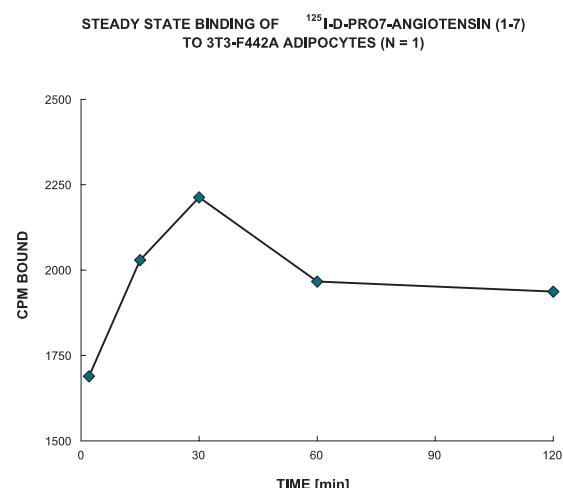
4.1.4 ¹²⁵I-D-PRO7-ANG II (1-7)

STEADY STATE BINDUNG

Mit ¹²⁵I-D-Pro7-ANG (1-7) als Antagonist für den Mas-Rezeptor wurde ebenfalls eine steady state Bindung über die Zeit aufgenommen (Abbildung 4-6).

Die Gesamtbindung ist nach 120 Minuten zwar stabil, es zeigt sich aber kein Unterschied zur unspezifischen Bindung. Dies spricht für eine sehr geringe bzw. nicht nachweisbare Rezeptordichte in Adipozyten.

Abbildung 4-6: Steady state Bindung von ¹²⁵I-D-Pro7-ANG (1-7)

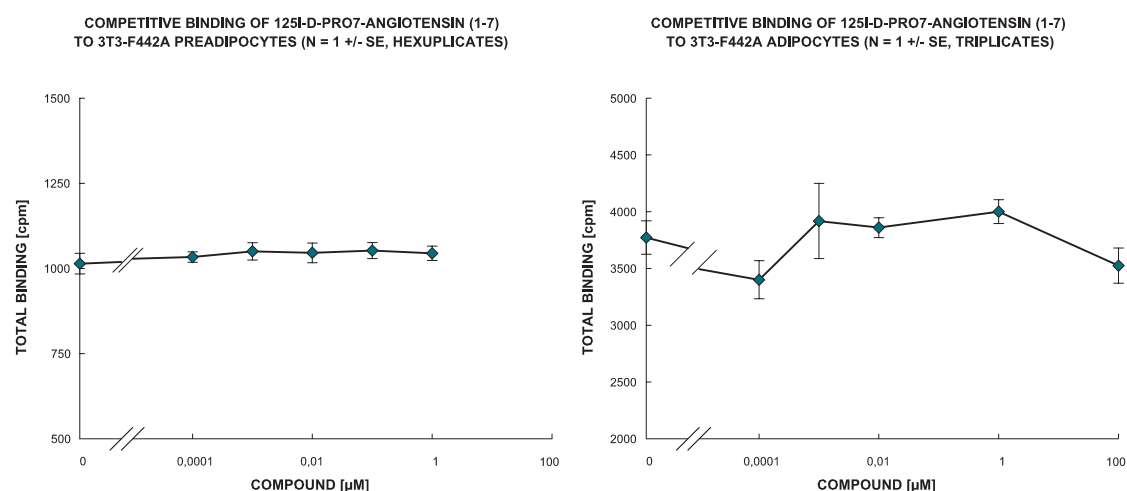


BESTIMMUNG DER REZEPTORBINDUNG

Die Verdrängungsversuche zeigen ebenfalls keine spezifische Bindung. Messwerte mit hohen Konzentrationen (bis 100 µM) an D-Pro7-ANG (1-7) wurden dabei nur einfach bestimmt (s. Abbildung 4-7).

Die Existenz des Mas-Rezeptors kann dennoch nicht komplett ausgeschlossen werden. Dafür fehlt zum einen eine Positivkontrolle und wie bereits beim AT₂-Rezeptor beschrieben kann die Rezeptordichte unter dem Detektionslimit liegen.

Abbildung 4-7: Verdrängung von ¹²⁵I-D-Pro7-Angiotensin (1-7)



- (a) Abbildung 4-7a zeigt die Gesamtbindung bis 1 µM. Der Versuch wurde an Präadipozyten nur einfach bis 100 µM durchgeführt. Es gab keine Hinweise auf eine spezifische Bindung.
- (b) Die Verdrängung an Adipozyten zeigt ebenfalls keine spezifische Bindung. Die größeren Schwankungen ergeben sich aus methodischen Unterschieden und der Zahl der Wiederholungen.

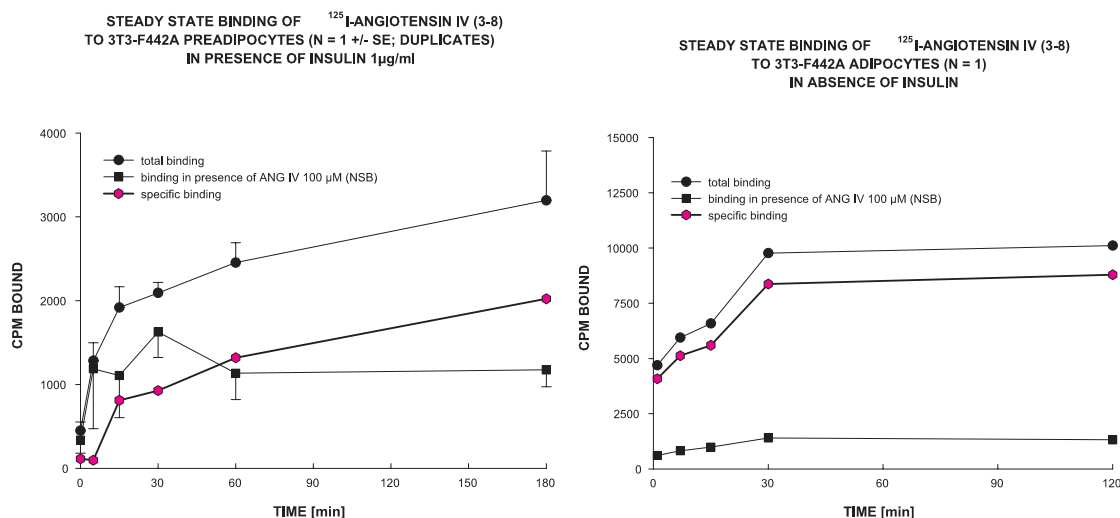
4.1.5 ¹²⁵I-ANGIOTENSIN IV (3-8)

ANG IV (3-8) fungiert als selektiver Agonist am AT₄-Rezeptor und besitzt keinerlei Restaffinität zu AT_{1/2}-Rezeptoren. Nicht endgültig geklärt ist die genaue Bindungsstelle von ANG IV (3-8). Prinzipiell kommen eine membranernahe Interaktion als allosterischer Enzyminhibitor und die Interaktion mit dem aktiven Zentrum des Enzyms in Frage. Es ist denkbar, dass Verdrängungsversuche mit ANG IV in erster Linie mit dem aktiven Zentrum des IRAP-Enzyms interagieren¹⁰³.

STEADY STATE BINDUNG

Die steady state Bindung wurde an Präadipozyten und Adipozyten getestet (Abbildung 4-8) und zeigt deutliche Unterschiede zu den vorherigen Liganden. Die unspezifische Bindung liegt mit 5-20 % bei Adipozyten (Lysemethode) und 30-50 % nach der Suspensionsmethode an Präadipozyten sehr niedrig.

Abbildung 4-8: steady state Bindung mit ¹²⁵I-ANG IV (3-8)



Das steady state wird wesentlich schneller erreicht (30-60 Minuten) als bei ANG II (1-8). Die Inkubationszeit wurde für die folgenden Verdrängungsversuche dennoch nicht verändert, um die Versuche besser vergleichen zu können. Auch hier ist kein Hinweis auf einen Abbau unter Versuchsbedingungen zu erkennen. Die folgenden Verdrängungsversuche wurden deswegen nur nach der Lysemethode durchgeführt.

Da eine insulinabhängige Translokation beschrieben ist¹⁰², wurde der Versuch an Präadipozyten in Gegenwart von Insulin durchgeführt. Dies soll eine Translokation der IRAP stimulieren und die maximale Bindung erhöhen. Es ist aber zu bedenken, dass der Pufferzusatz von BSA bereits Insulin enthält.

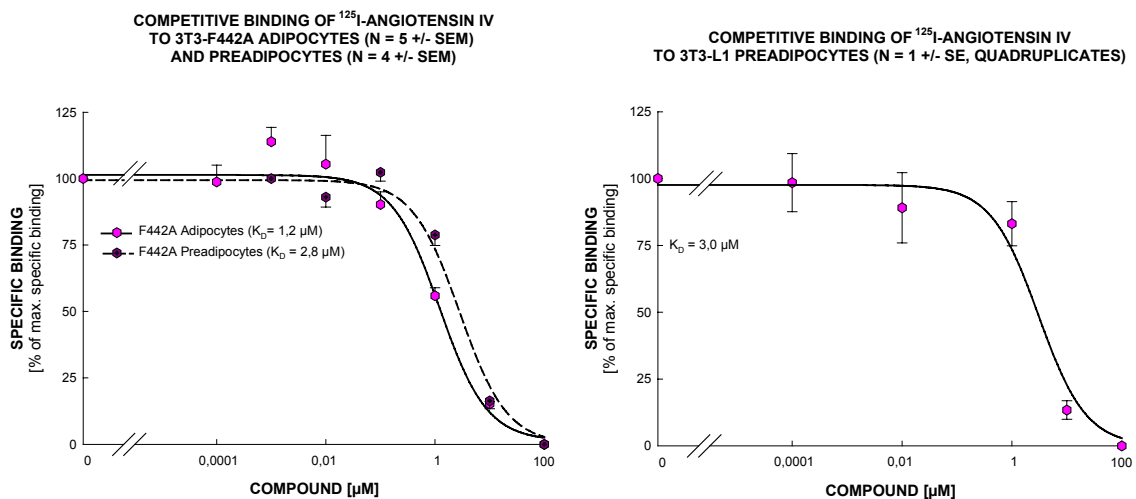
Abbildung 4-8a zeigt nach 30 Minuten einen linearen Anstieg der spezifischen Bindung. Möglicherweise ein Indiz, dass ANG IV in Gegenwart von Insulin durch eine Internalisierung von GLUT 4 Vesikeln zusammen mit IRAP aufgenommen wird.

BESTIMMUNG DER REZEPTORBINDUNG

Die Verdrängungsversuche an den unterschiedlichen Zellsystemen offenbaren eine Bindungsstelle von micromolarer Affinität (s. Abbildung 4-9). In der Literatur werden zwei verschiedene Bindungsstellen des AT₄-Rezeptors erwähnt, der K_D-Wert von ANG IV an AT₄-Rezeptoren liegt dabei vor allem bei Bindungsstudien im Gehirn im nanomolaren Bereich^{112,114}. Der hier beschriebene K_D-Wert von 1-3 μM liegt vermutlich nicht im physiologischen Bereich, sondern erinnert eher an den K_M-Werte von ACE-1 für ANG I (1-10).

Der Zusatz von EDTA und DTT sollte bei der Charakterisierung zinkabhängiger Proteasen vermieden werden. Die folgenden Versuche wurden bewusst in Abwesenheit von Proteaseinhibitoren, DTT und EDTA durchgeführt und es wurden ganze Zellen vermessen. Die katalytische Aktivität bei Zugabe von ANG IV (3-8) wird später noch genauer untersucht (s. Kapitel 4.3).

Abbildung 4-9: Verdrängungsversuche mit ¹²⁵I-ANG IV (3-8)



- (a) Abbildung 4-9a zeigt die Rezeptorbindung von ANG IV (3-8) an Adipozyten und Präadipozyten der 3T3-F442A Zelllinie. Vor allem an Adipozyten fällt eine positive Kooperativität der Rezeptorbindung im nanomolaren Bereich auf. Es ist damit denkbar, dass sich *in vivo* niedrige und hohe Konzentrationen ANG IV unterschiedlich verhalten.
- (b) An 3T3-L1 Präadipozyten ist die Affinität der Rezeptorbindung vergleichbar zum F442-Subklon. Der Kurvenverlauf lässt eine zweite Bindungsstelle im nanomolaren Bereich erahnen.

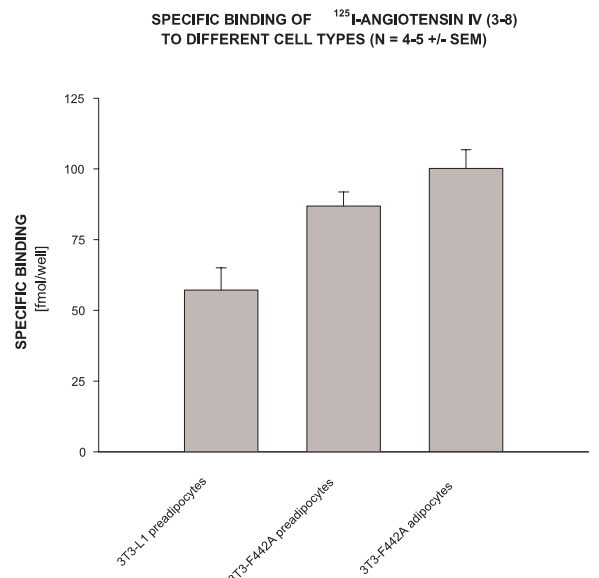
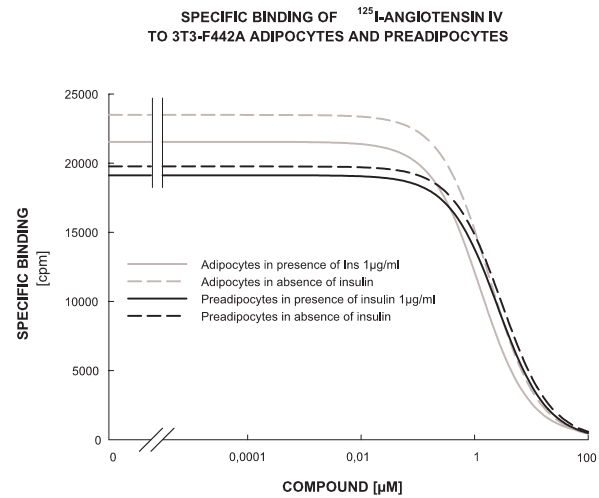
Aufgrund der wesentlich höheren Gesamtbindung ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei der hier beobachteten Bindung um die gleiche Bindungsstelle handelt, die mit ANG II (1-8) und SARILE im micromolaren Bereich beobachtet wurde.

Der Zusatz von Insulin veränderte weder B_{MAX} noch K_D -Werte wesentlich. (s. Abbildung 4-10 oben) Im folgenden wurden Versuchsreihen mit und ohne Insulin zusammen ausgewertet. Ein Hinweis auf eine insulinabhängige Translokation ist den Verdrängungsversuchen nicht zu entnehmen.

K_D -Werte an Adipozyten und Präadipozyten der unterschiedlichen Zelllinien sind ebenfalls nahezu identisch. B_{MAX} Werte unterscheiden sich dagegen deutlich, was auf Unterschiede der Rezeptordichte in den Zellsystemen schliessen lässt.

Entsprechend der Zelllinien lässt sich vermuten, dass während des Differenzierungsprozesses die Bildung von AT_4 -Rezeptoren induziert wird (s. Abbildung 4-10 unten). Der Unterschied zwischen 3T3-L1 Präadipozyten und 3T3-F442A Präadipozyten spricht für eine erhöhte Proteinsynthese zu Beginn der Präadipozytendifferenzierung, während nach der Fixierung des Phänotyps (Differenzierung von F442 Präadipozyten zu Adipozyten) die Rezeptordichte nicht wesentlich ansteigt.

Abbildung 4-10: Spezifische Bindung von ^{125}I -ANG IV an unterschiedlichen Zellsystemen



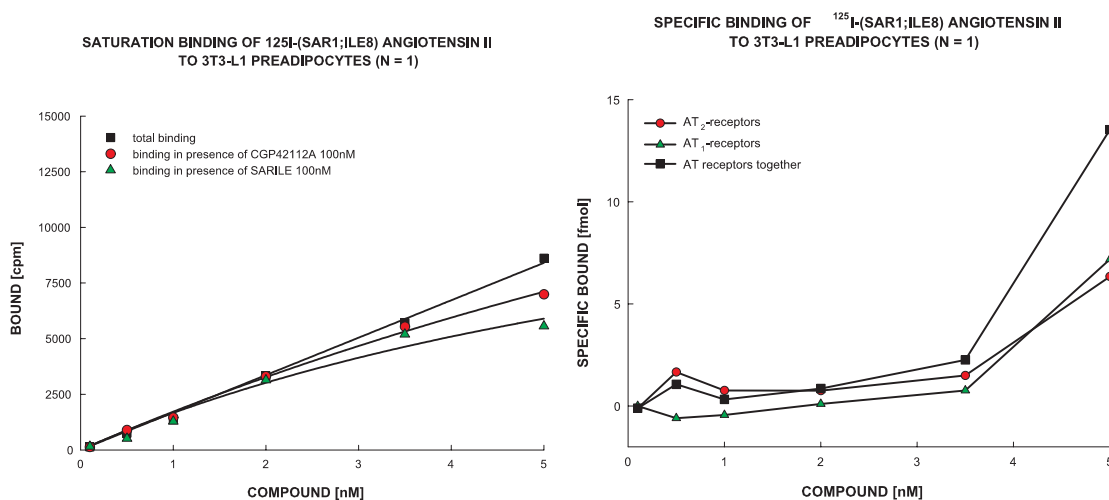
(a) spezifische Rezeptorbindung bei Insulinzusatz an Adipozyten und Präadipozyten
 (b) Vergleich der maximalen Rezeptorbindung an unterschiedlichen Zellsystemen.

4.2 SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

Zur näheren Charakterisierung der nanomolaren Bindungsstellen in Adipozyten und Präadipozyten wurden Sättigungsexperimente durchgeführt. Die niederaffinen Bindungsstellen werden bei den in dieser Versuchsanordnung gewählten Konzentrationen nicht berücksichtigt. Als Ligand dient ^{125}I -SARILE, welcher als unselektiver Antagonist⁸⁰ in den Verdrängungsversuchen wesentlich präzisere Ergebnisse erzielt hat, als ^{125}I -ANG II (1-8).

Auch in den Sättigungsexperimenten erschweren hohe NSB-Werte (bis 90 %) die Auswertung. Eine qualitative Zuordnung der Rezeptorsubtypen ist zwar möglich, quantitative Auswertung sind dagegen sehr spekulativ. Die maximale Bindung ist angegeben, muss aber in der Interpretation entsprechend vorsichtig bewertet werden. Präzise B_{MAX} Bestimmungen sind erst möglich, wenn zumindest der Wendepunkt der Sättigungskurve durch Messwerte abgedeckt ist. Entsprechend hohe Radioaktivitätsmengen können nicht eingesetzt werden.

Abbildung 4-11: Sättigungsexperimente mit ^{125}I -SARILE an 3T3-L1 Präadipozyten



- (a) Beispieldaten eines Sättigungsexperiments zeigen die Gesamtbindung in Gegenwart unterschiedlicher Liganden. Die Differenz von Gesamtbindung und Bindung in Gegenwart von CGP42112A (100 nM) entspricht der spezifischen Bindung an AT₁-Rezeptoren. Die spezifische Bindung an AT₂-Rezeptoren ergibt sich aus der Bindung in Gegenwart von CGP42112A minus der Bindung in Gegenwart von SARILE.
- (b) Die Differenz der Gesamtbindung und der Bindung in Gegenwart von SARILE (100 nM) entspricht der spezifischen Gesamtbindung an AT_{1/2}-Rezeptoren (siehe Abbildung 4-11a).

PRÄADIPOZYTEN

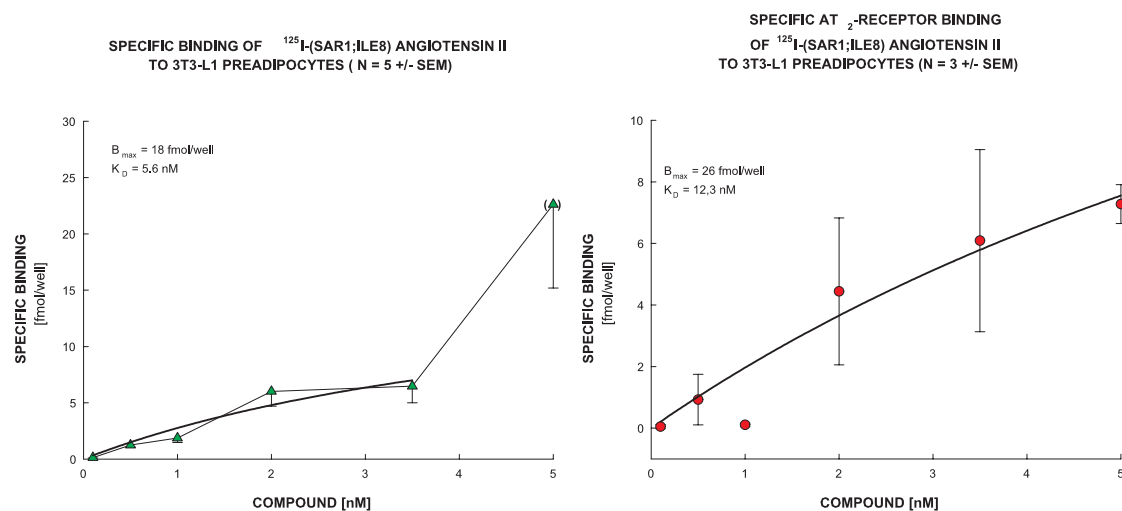
Die Bindung von ^{125}I -SARILE lässt sich an Präadipozyten durch CGP42112A und durch unmarkiertes SARILE verdrängen (s. Abbildung 4-11a). Die spezifische Bindung an AT-Rezeptoren beinhaltet also beide Subtypen. Dies bestätigt nicht nur die Existenz der AT₂-Rezeptoren, die in den Verdrängungsversuchen bereits

nachgewiesen wurden. Gleichzeitig wird die Existenz des AT₁-Rezeptors aufgezeigt.

An Präadipozyten wird etwa doppelt so viel ¹²⁵I-SARILE von unmarkiertem SARILE verdrängt wie durch CGP42112A. Dies lässt auf eine etwa gleichwertige Verteilung von AT₁- und AT₂-Rezeptoren in Präadipozyten schliessen (s. Abbildung 4-11b) und bestätigt die Beobachtung von einer ungefähren Gleichverteilung von AT₁- und AT₂-Rezeptoren an der Oberfläche von Präadipozyten (s. Kapitel 4.1.3).

Abbildung 4-12 zeigt die Auswertung mehrerer Sättigungsexperimente als Mittelwert. Dies führt bei hohen NSB-Werten aufgrund starker Schwankungen von Versuch zu Versuch zu großen Streuungen.

Abbildung 4-12: Spezifische Bindung von ¹²⁵I-SARILE an Präadipozyten



- (c) Der Messwert bei 5 nM wurde bei der Berechnung von K_D und B_{MAX} als Ausreisser gewertet. Es ist denkbar, dass die unterschiedliche Affinität von SARILE an AT₁- und AT₂-Rezeptoren zu einer höheren Bindung bei 5 nM geführt hat und die Auswertung mit einer Bindungsstelle erschwert. Der theoretische Kurvenverlauf würde dann eher eine Modell mit zwei Bindungsstellen entsprechen.
- (d) Die spezifische Bindung an AT₂-Rezeptoren ergibt sich aus der Differenz der Gesamtbinding und der Bindung in Gegenwart von CGP42112A (100 nM)

ADIPOZYTEN

An erwachsenen Adipozyten zeigt sich ein ähnliches Bild wie an Präadipozyten. Mit Hilfe einer spezifischen Verdrängung lässt sich die Existenz hochaffiner Angiotensin-Rezeptoren ebenfalls bestätigen (s. Abbildung 4-13).

Eine Zuordnung der Rezeptor-subtypen mittels CGP42112A gelingt dagegen nicht (s. Abbildung 4-14a). Daraus lässt sich schliessen, dass in Adipozyten der AT₂-Rezeptor im Vergleich zum AT₁-Rezeptor von

eher untergeordneter Bedeutung ist. Die Existenz von AT₁-Rezeptoren in Adipozyten ist bereits seit längerem unstrittig. Weitere Untersuchungen mit spezifischen AT₁-Antagonisten erübrigen sich damit.

Eine Restaktivität von AT₂-Rezeptoren kann durch restliche Präadipozyten in der Zellkultur erklärt werden. Vor allem in der 3T3-L1 Zelllinie differenzieren nur ca. 70 % der Zellen zu Adipozyten. Der Rest verbleibt in einem früheren Differenzierungsstadium und kann damit zu falsch positiven Nachweisen der AT₂-Rezeptoren in Adipozyten führen. Deswegen wurde an dieser Stelle nur die 3T3-F442A-Zelllinie verwendet, die sich nahezu vollständig zu Adipozyten differenzieren lässt.

Abbildung 4-13: Spezifische Bindung von ¹²⁵I-SARILE an 3T3-F442A Adipozyten

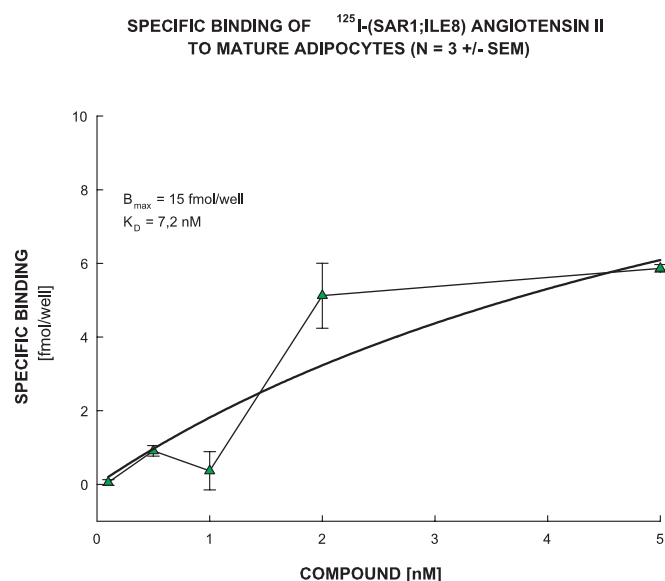
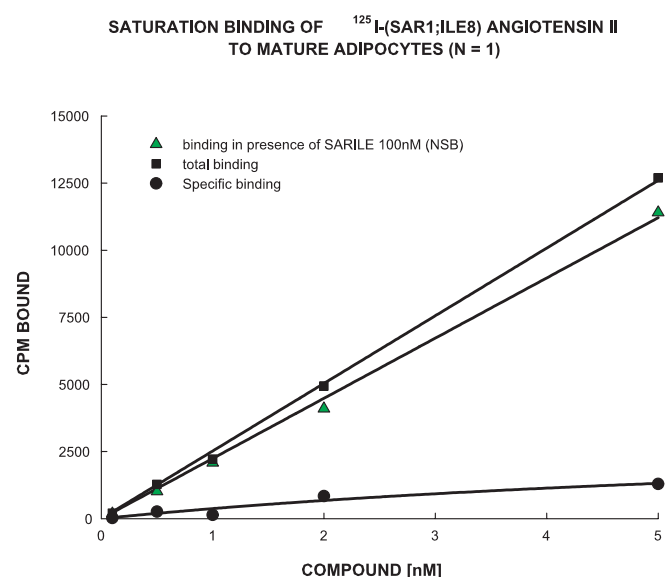


Abbildung 4-14: Gesamtbindung von ¹²⁵I-SARILE an 3T3-F442A Adipozyten



Die spezifische Bindung ergibt sich der Differenz der Gesamtbindung und der Bindung in Gegenwart von SARILE (100 nM). Die Verwendung von CGP42112A (100 nM) zeigte keine Verdrängung.

4.3 IRAP-ENZYMSSAY

4.3.1 VORVERSUCHE

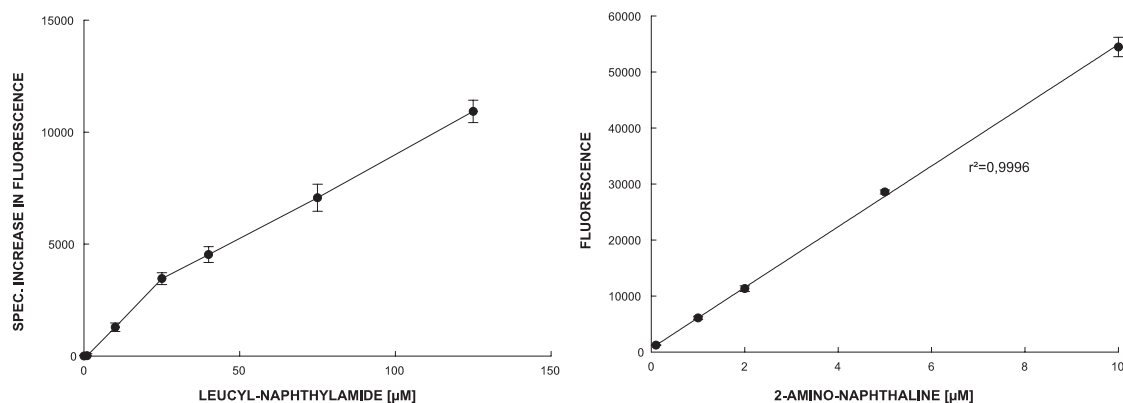
Mit Hilfe des synthetischen Aminopeptidase-Substrats Leucyl- β -Naphthylamid (Leu-NA) kann die Enzymaktivität von Aminopeptidasen in Fettzellen untersucht werden. Die Enzymaktivität der Zink-abhängigen Aminopeptidase IRAP soll spezifisch durch ANG IV gehemmt werden. Gleichzeitig ist auch ein unspezifischer Umsatz des Substrats durch ANG IV-unempfindliche Aminopeptidasen denkbar.

Um Einflüsse der Liganden auf die Enzymaktivität zu untersuchen, bietet sich eine Stoffkonzentration nahe der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) an. Diese wird in Abbildung 4-15a untersucht. Nach Literaturangaben liegt der K_M -Wert von IRAP für Leu-NA bei ca. 25 μ M, während sich hier bei höheren Konzentrationen auch Hinweise auf weitere abbauende Enzyme finden.

Um den unspezifischen Substratumsatz möglichst gering zu halten wurde die in der Literatur bereits empfohlene Konzentration von 25 μ M Leu-NA verwendet¹¹⁴. Abbildung 4-15b zeigt eine Kalibriergerade des Fluoreszenzprodukts β -Amino-Naphthalin (NA) bis zu einer Konzentration von 10 μ M. Bei zu hohen Konzentrationen an Produkt (d.h. an umgesetzten Substrat) geht diese Linearität verloren. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen werden innerhalb von 15 Minuten max. 10 μ mol/l Fluoreszenzprodukt gebildet. Als Kontrolle wird zusätzlich die Inhibierung des Stoffumsatz durch EDTA (0,1 M) bestimmt.

Da Leu-NA in die Zelle penetrieren kann, entspricht der gemessene Stoffumsatz der IRAP-Gesamtkonzentration der Zelle und nicht nur dem membranständigen Anteil.

Abbildung 4-15 Vorversuche zur Bestimmung der IRAP-Aktivität



- (a) Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetik an 3T3-L1 Adipozyten
 (b) Kalibriergerade des Produkts Amino-Naphthalin (Ex. 330 nm Em. 390 nm)

4.3.2 IC₅₀-BESTIMMUNG DER ANGIOTENSIN-PEPTIDE

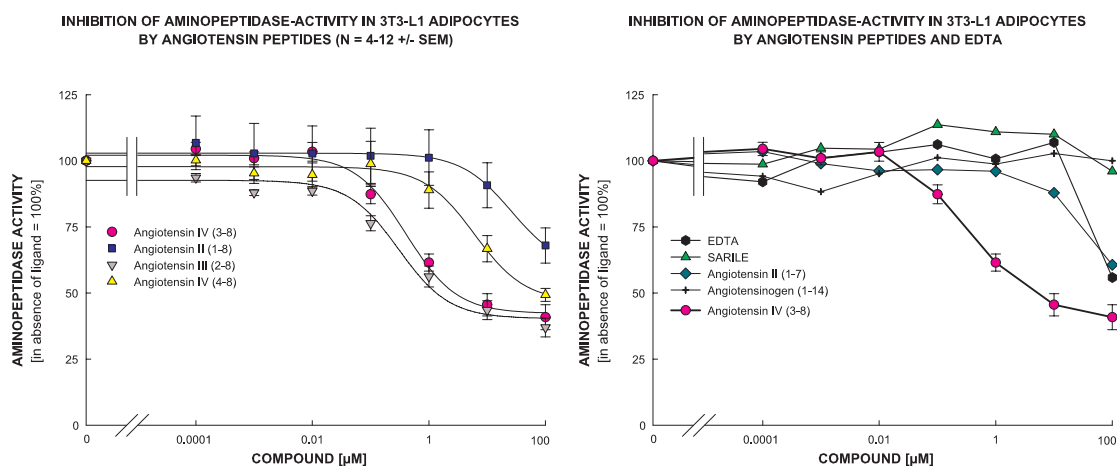
Das IRAP-Fluoreszenzassay offenbart eine Hemmung von IRAP durch ANG IV (3-8) und ANG III (2-8) im hohen nanomolaren Bereich, während ANG II (1-8) und ANG (4-8) als Edukte und Produkte des Angiotensin-Metabolismus nur wenig wirksam sind. ANG III und ANG IV kommen damit als hochaffine AT₄-Rezeptor-Agonisten in Frage. Die IC₅₀-Werte von ANG II (1-8), ANG (1-7) und ANG (4-8) sind vergleichbar mit einer unspezifischen Hemmung durch EDTA (s. Abbildung 4-17a).

SARILE und AGT (1-14) zeigen überhaupt keine Wirkung, dies könnte auch durch einen Antagonismus am AT₄-Rezeptor erklärt werden. Eine Bindung dieser Peptide an den AT₄-Rezeptor ist jedoch unwahrscheinlich (s. Kapitel 1.3.3.5).

Abbildung 4-16: IC₅₀-Werte der Angiotensin-Peptide im katalytischen IRAP-Assay

Compound	IC ₅₀	r ²	n
ANG II (1-8)	> 10 µM	0,98	5
ANG III (2-8) (1-site model)	300 nM	0,93	4
ANG III (2-8) (2-site model)	0,1 nM 500 nM	0,96	4
ANG IV (3-8)	410 nM	0,99	12
ANG IV (4-8)	6 µM	0,99	6
ANG (1-7)	> 10 µM	0,97	4
SARILE	-	-	5
AGT (1-14)	-	-	1
EDTA	> 10 µM	-	4
Nle1-ANG IV (3-8)	520 nM	0,97	3

Abbildung 4-17 Inhibition der Amino-peptidase-Aktivität durch Angiotensin-Peptide



- (a) Abbildung 4-17a zeigt die Inhibition des IRAP-abhängigen Stoffumsatzes durch ANG IV (3-8) und verwandte Peptide. Zugehörige r² und IC₅₀-Werte finden sich in Abbildung 4-16.
- (b) In Abbildung 4-17b wird die unselektive Hemmung durch EDTA mit ANG IV und weiteren Substanzen verglichen.

4.3.3 ANG III (2-8) ALS AT₄-AGONIST

Betrachtet man den Kurvenverlauf der ANG III vermittelten Hemmung der IRAP-Aktivität, so fällt eine vergleichsweise schlechtere Regression im nanomolaren Bereich auf. Da es Hinweise auf zwei AT₄-Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität gibt, wurden die Daten auf Hinweise für weitere Bindungsstellen untersucht (s. Abbildung 4-18).

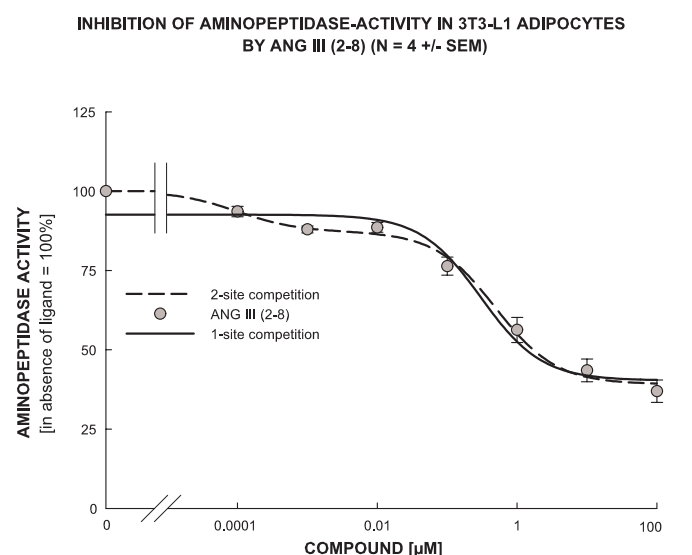
Neben der einfachen Regression mit einem Wendepunkt (s. Abbildung 4-17), können die Messwerte auch mit zwei Wendepunkten geschätzt werden. Das komplexere Modell liefert dabei meistens eine genauere Schätzung (hier $r^2 = 0,93$ vs. $0,96$). Ob das komplexere Modell zu einer überproportional besseren Regression führt (Verkleinerung der „sum of squares“), wird mittels des F-Tests analysiert.

Bei ANG III zeigt sich, dass die Regression mit zwei Wendepunkten der Regression mit einer Bindungsstelle signifikant überlegen ist ($P = 0,037$).

Für ANG III lässt sich damit vermuten, dass es mehrere Bindungsstellen bzw. Cofaktoren mit Einfluss auf die IRAP-Aktivität gibt. Für ANG IV ergibt die Regression mit zwei Bindungsstellen keine Vorteile.

Bei der Untersuchung der Rezeptorbindung von ANG IV (s. Kapitel 4.1.5) gab es vereinzelt Hinweise auf eine positive Kooperativität der Rezeptorbindung an differenzierten Adipozyten. Ein Zusammenhang ist denkbar.

Abbildung 4-18: Regression der Messwerte von ANG III (2-8) mit mehreren Bindestellen



Der sigmoidale Kurvenverlauf lässt sich rechnerisch als Modell mit einem oder mehreren Wendepunkten darstellen. Ob das komplexere Modell sinnvoll ist, lässt sich mit Hilfe des F-Tests ermitteln.

$IC_{50(1)} = 500 \text{ nM}$; $IC_{50(2)} = 0,1 \text{ nM}$

4.3.4 ZEITABHÄNGIGE BESTIMMUNG DER IC₅₀-WERTE

Neben einer zweiten Bindungsstelle wäre auch eine sehr schnelle Degradation zu Peptiden mit veränderter Affinität und Aktivität möglich. Dies trifft vor allem auf die Bindungsstudien mit 120 Minuten Inkubationszeit zu. Bis zu 200 fache Unterschiede zwischen K_D -Werten aus Bindungsversuchen und IC_{50} aus dem

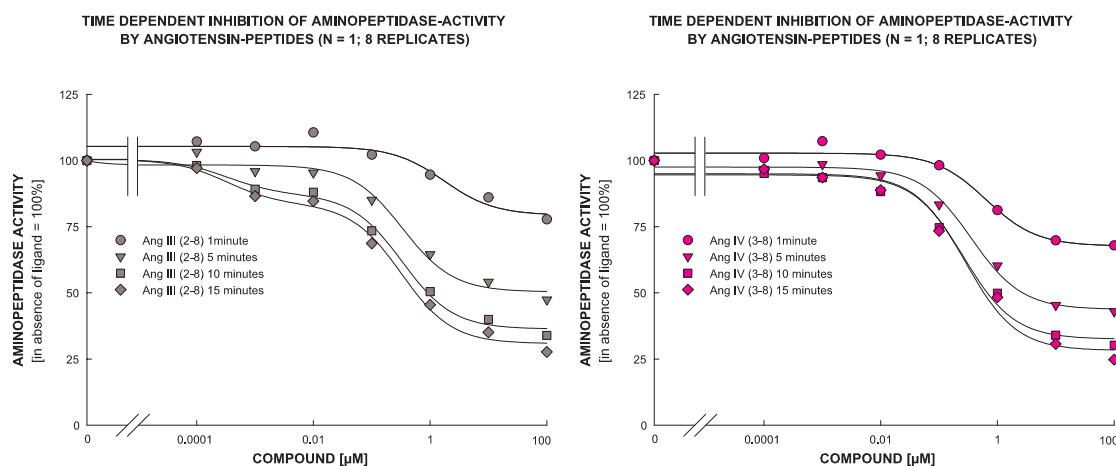
katalytischen IRAP-Assay sind bekannt¹¹⁴. Diese können zum einen durch den Zusatz von EDTA und Proteaseinhibitoren verursacht werden oder Zeichen eines Abbaus während der Versuchsbedingungen sein.

Die Ergebnisse des IRAP-Assays bestätigen die eigenen Rezeptorbindungsdaten, trotzdem ist ein schneller Abbau der Angiotensin-Peptide innerhalb von 10 Minuten denkbar und könnte gleichzeitig den bei ANG III beobachteten Kurvenverlauf mit zwei Bindungsstellen erklären. Deswegen wird im Folgenden die Enzyminhibition in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht.

In Abbildung 4-19 wird die Hemmung der IRAP-Aktivität bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten gezeigt. Nach 1 Minute ist bereits eine Enzymhemmung zu erkennen. Nach 5 Minuten werden zuverlässige Messwerte erreicht. Der Kurvenverlauf ändert sich bei ANG III im Vergleich zu 10 und 15 Minuten kaum; die Regression mit zwei Wendepunkten gelingt erst ab 10 Minuten, was durch methodische Ungenauigkeiten direkt zu Versuchsbeginn erklärt werden kann.

Bei ANG IV ist kein Unterschied in der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit zu erkennen. Ein nennenswerter Abbau von ANG III und ANG IV während der Inkubationszeit von 15 Minuten kann damit nahezu ausgeschlossen werden.

Abbildung 4-19 Bestimmung der IC₅₀-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit



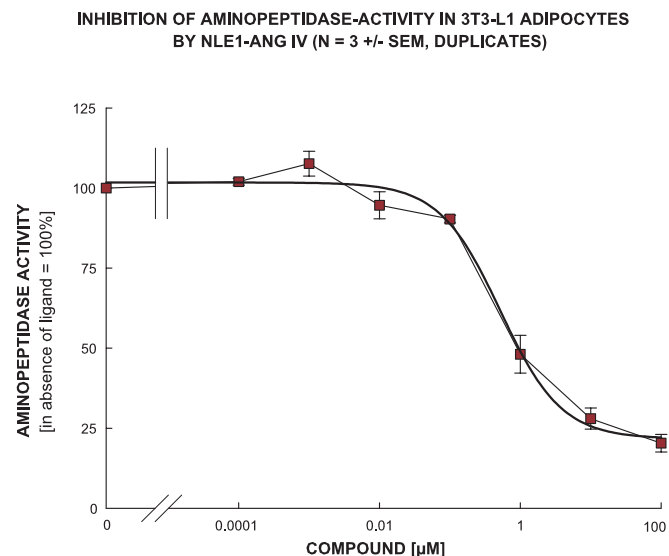
- (a) Der Regression liegt die Annahme von zwei Wendepunkten zugrunde. Die IC₅₀-Werte bleiben nach ca. 10 Minuten konstant ($r^2 = 0,911; 0,984; 0,995; 0,994$).
 IC₅₀₍₁₎ = 1700; 370; 330; 320 nM
 IC₅₀₍₂₎ = n.d.; n.d.; 0,3; 0,3 nM
- (b) Der Regression liegt die Annahme von einem Wendepunkt zugrunde, da es keine Hinweise auf eine präzisere Regression mit zwei Bindungsstellen gibt (s. Kapitel 4.3.3) ($r^2 = 0,981; 0,994; 0,986; 0,984$). Die IC₅₀-Werte sind ebenfalls relativ konstant.
 IC₅₀ = 640; 360; 260; 280 nM

4.3.5 NLE1-ANG IV ALS STABILES ANG IV-ANALOGON

Neben ANG IV und ANG III steht das modifizierte Peptid Nle1-ANG IV zur Verfügung. Die Modifizierung mit einer nicht proteinogenen Aminosäure an Position 1 verhindert den aminoterminalen Abbau. Nle1-ANG IV ist als hochaffiner Agonist beschrieben. Der IC_{50} -Wert unterscheidet sich mit 520 nM kaum von ANG IV (s. Abbildung 4-20).

Damit steht Nle1-ANG IV als weiteres Analogon zur Verfügung. Eine Dosisreduktion ist aufgrund der IC_{50} -Werte nicht zu erwarten. Ein geringerer Abbau könnte bei Versuchen mit längeren Inkubationszeiten von Vorteil sein (z.B. Stimulation der PAI-1-Sekretion über 24 h oder *in vivo* Versuche). Eine zweite Bindungsstelle mit einer IC_{50} von ca. 5 nM ist sehr wahrscheinlich, aber statistisch nicht zu erfassen.

Abbildung 4-20: Nle1-ANG IV (3-8)

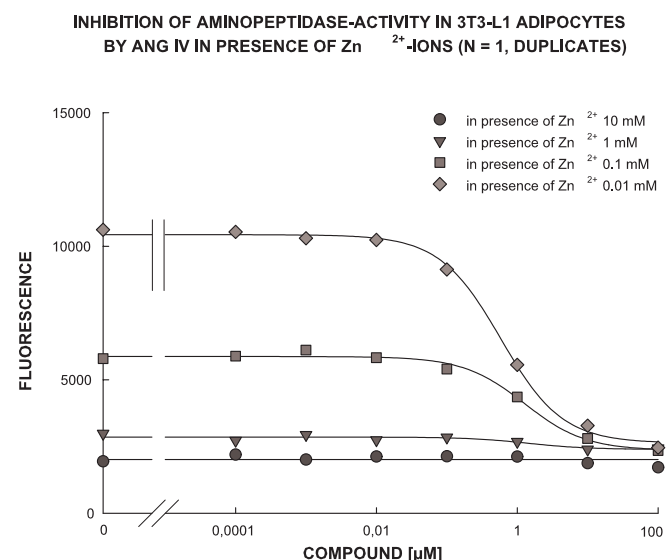


Der Regression erfolgt mit einer Bindungsstelle ($r^2 = 0,97$). Es lässt sich eine zweite hochaffine Bindungsstelle (IC_{50} ca. 5 nM) erahnen. Die nichtlineare Regression ist bei Messwerten mit einer Aktivität >100 % (hier bei 1 nM) mittels Sigmaplot® fehlerbehaftet und gelingt in diesem Fall nicht. Ohne Regression mit zwei Wendepunkten ist eine statistische Auswertung mittels F-Test ebenfalls nicht möglich.

4.3.6 IRAP-AKTIVITÄT IN GEGENWART VON ZINK-IONEN

Obwohl IRAP als Zink-abhängiges Enzym beschrieben ist und deshalb durch EDTA gehemmt wird, führen hohe Zink-Konzentrationen ebenfalls zu einer Hemmung. Dieser Effekt ist spezifisch, andere zweiwertige Kationen haben in vergleichbaren Konzentrationen keinen Einfluss¹⁸⁷. Da nicht auszuschliessen ist, dass sowohl K_D -Werte der Verdrängungsversuche als auch IC_{50} der Fluoreszenz-Assays im

Abbildung 4-21: IRAP-Aktivität in Gegenwart von Zink-Ionen



gleichen Maße durch Zn^{2+} beeinflusst werden, wurde der IC_{50} -Wert von ANG IV in Gegenwart von Zink-Ionen bestimmt. Abbildung 4-21 verdeutlicht, dass die Zink-vermittelte Hemmung von IRAP nicht kompetitiv zu einer ANG IV vermittelten Enzymhemmung auftritt. IC_{50} -Werte sind in Gegenwart von 0,01 mM bis 1 mM Zn^{2+} sehr ähnlich. Es ist damit auszuschließen, dass die relativ niedrige AT_4 -Rezeptoraffinität und die entsprechende Enzyminhibierung im IRAP-Assay durch Schwankungen der Zinkkonzentration im Versuchsansatz beeinflusst werden.

4.3.7 IRAP-AKTIVITÄT BEI UNTERSCHIEDLICHEN DIFFERENZIERUNGSSTADIEN

Wie in Abbildung 4-10 bereits beschrieben wurde, scheint die AT_4 -Rezeptordichte teilweise abhängig zu sein vom Status der Fettzellendifferenzierung. Also könnte die Genexpression von IRAP durch Induktoren der Fettzellendifferenzierung (wie $PPAR\gamma$, $C/EBP\alpha$) ausgelöst werden¹⁰⁹.

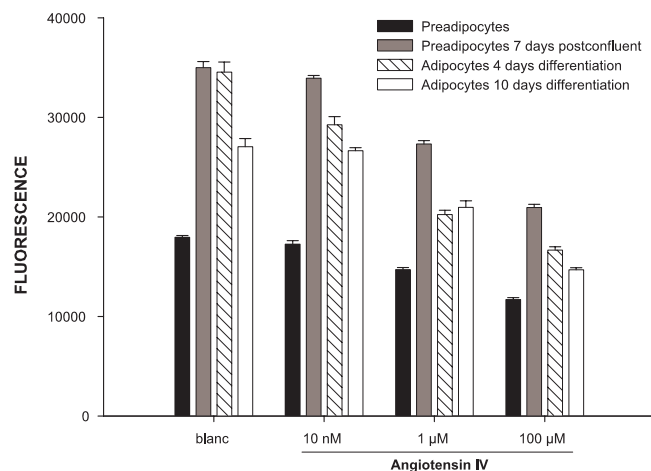
3T3-L1 Zellen wurden in 24er Multiwells unterschiedlich lange differenziert (4 bzw. 10 Tage) oder postkonfluent nur mit

Fibroblastenkulturmedium behandelt, ohne eine Differenzierung zu induzieren. In Anlehnung an die bereits beschriebenen Versuche, wurde nach 10 Tagen die IRAP-Aktivität an adhären Zellen bestimmt (s. Abbildung 4-22).

Die spezifische IRAP-Aktivität ergibt sich aus der Differenz der Fluoreszenz in An- und Abwesenheit von 100 μ M ANG IV als Inhibitor.

Es lässt sich kaum ein Unterschied in der IRAP-Aktivität zwischen postkonfluenten Fibroblasten und Adipozyten feststellen. Dafür unterscheiden sich Präadipozyten ohne längeren Zell-Zellkontakt sehr deutlich von Präadipozyten, die längere Zeit konfluent gewachsen sind. Dieser Zell-Zell-Kontakt scheint also wesentlich bedeutender zu sein, als z.B. eine $PPAR\gamma$ -Aktivierung. Dies entspricht auch der Beobachtung, dass die AT_4 -Rezeptordichte bei 3T3-F442A Adipozyten und 3T3-F442A Fibroblasten zwar sehr ähnlich ist, aber dafür in 3T3-L1 Fibroblasten wesentlich geringer ausgeprägt ist (s. Abbildung 4-10 unten).

Abbildung 4-22: IRAP-Aktivität bei unterschiedlichen Differenzierungsstadien (n = 4 + SEM)



4.4 [³H]2-DESOXYGLUKOSE-AUFNAHME

Bisher ist noch nicht genau geklärt, wie Angiotensin-Peptide mit der Glukoseaufnahme interagieren, bzw. die Insulinsensitivität beeinflussen. So ist einerseits eine Verbesserung der Insulinsensitivität durch ACE-Inhibitoren und AT₁-Rezeptor Antagonisten unstrittig, gleichzeitig hat ANG II keinen direkten Einfluss auf die [³H]2-Desoxyglukose-Aufnahme¹¹⁹.

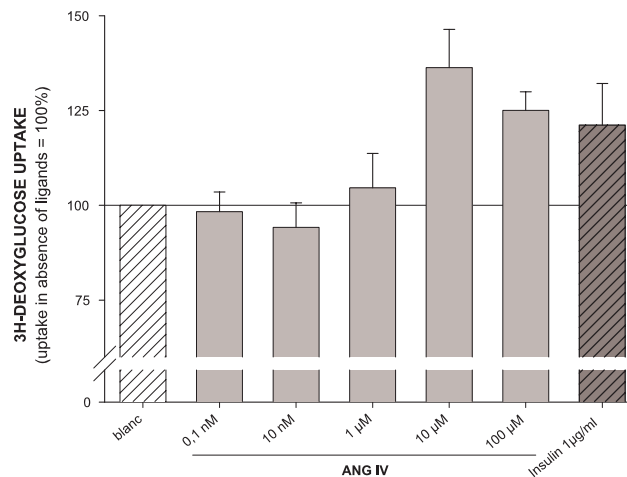
Die Beteiligung von IRAP an der Glukosehomöostase ist ebenfalls

recht eindeutig. Die Art der Interaktion bleibt unklar. Es ist denkbar, dass IRAP nicht direkt die GLUT 4 Translokation, sondern den Abbau aktiver Peptide beeinflusst. Dieser Effekt wäre *in vitro* durch Glukoseaufnahmeversuche nur schlecht zu bestimmen.

Abbildung 4-23 zeigt die ANG IV vermittelte Stimulation der Glukoseaufnahme. ANG IV fördert die Glukoseaufnahme in 10-100 µM Konzentrationen. Dies passt zur bereits beschriebenen Bestimmung der IC₅₀ und K_D-Werte im gleichen Konzentrationsbereich.

Die Aussagekraft der Glukoseaufnahmeversuche wird durch eine sehr geringe Stimulation durch Insulin als Vergleichssubstanz und durch die Testpeptide eingeschränkt. Der genaue Grund hierfür ist unklar, die Anwesenheit von Insulin im BSA-haltigen Inkubationspuffer ist ein möglicher Grund. Wird auf BSA verzichtet, könnte die Adsorption von Insulin an die Plastikmaterialien die Stimulation v.a. bei niedrigen Insulinkonzentrationen stören. Weitere Versuche sind nötig, um Unterschiede zu Literaturangaben (bis zu 15 fache Stimulation durch Insulin) zu erklären.

Abbildung 4-23: ANG IV stimulierte [³H]2-Desoxyglukoseaufnahme in Adipozyten (n = 8 + SEM)



4.5 KAPILLARELEKTROPHORESE

4.5.1 METHODE A: TRENNUNG BEI ALKALISCHEM PH

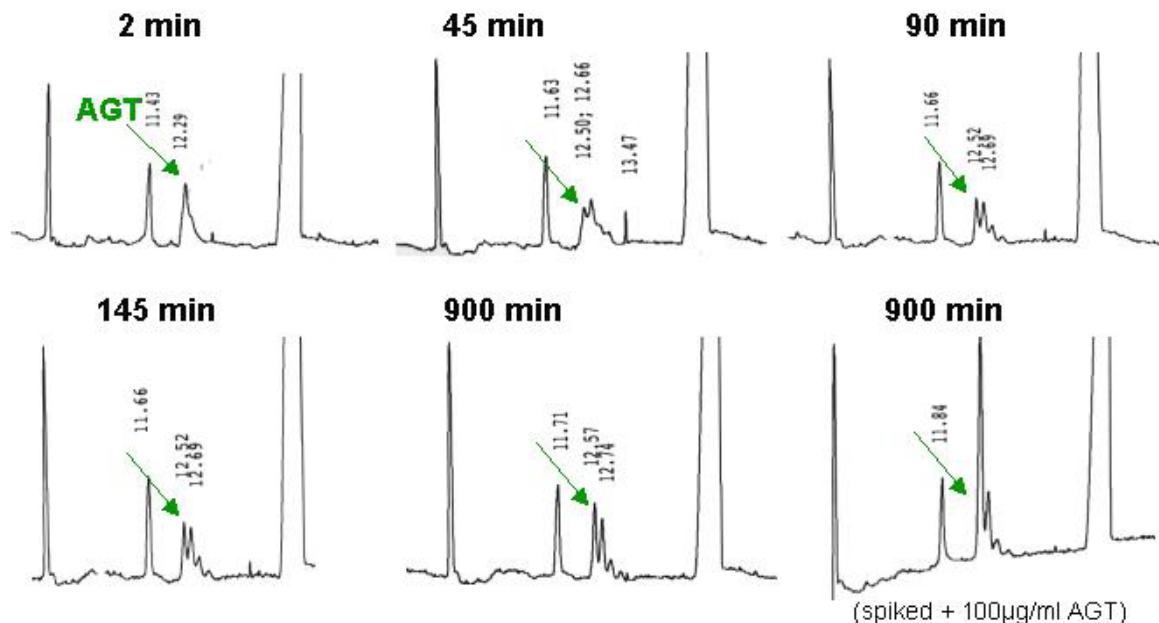
4.5.1.1 BESTIMMUNG DES AGT (1-14) ABBAUS

Wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, bietet sich für die Beschreibung des Renin-abhängigen Abbaus von Angiotensinogen zu ANG I (1-10) die CE-Bestimmung im alkalischen Milieu an. Anstelle des α_2 -Globulins Angiotensinogen wird das künstliche Reninsubstrat AGT (1-14) verwendet, welches durch Renin zu ANG I (1-10) und Fragment (11-14) abgebaut werden kann.

Abbildung 4-24 zeigt den Abbau von AGT (1-14) im Überstand adhärenter Adipozyten bei verschiedenen Inkubationszeiten. Die Adipozyten werden für diesen Zweck in CE-geeigneten Glasvials kultiviert und differenziert. AGT (1-14) wird zeitabhängig abgebaut. Eine Kumulation von ANG I (1-10) und anderen Peptiden lässt sich nicht feststellen. Das zeigt, dass gebildetes ANG I direkt weiter abgebaut wird.

Die homologe Reihe der elektrophenetischen Trennung spricht dafür, dass es sich bei den nicht weiter identifizierten Peaks um carboxyterminale Abbauprodukte wie ANG (1-13); (1-12) und (1-11) handelt. Es lässt sich vermuten, dass in Adipozyten die Aktivität von Renin vergleichsweise gering ausgeprägt ist. Eine vergleichsweise niedrige Renin-mRNA-Aktivität wurde in Adipozyten bereits beschrieben¹⁹. Möglicherweise sind weitere zellgebundene Enzyme beteiligt¹⁸⁸.

Abbildung 4-24: AGT (1-14)-Abbau durch 3T3-F442A Adipozyten (Methode A)

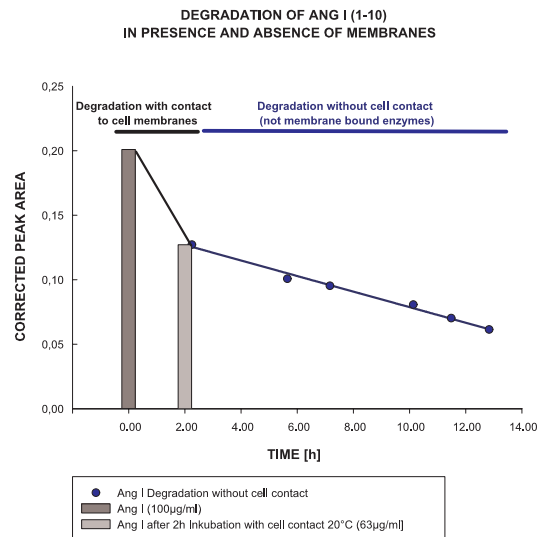


4.5.1.2 BESTIMMUNG DES ANG I (1-10) ABBAUS

Da für Adipozyten eine gewisse ACE-Aktivität beschrieben ist, wurde versucht, den ACE-abhängigen Abbau von ANG I (1-10) zu beschreiben. Hier stellt sich die Frage, ob ACE und weitere abbauende Enzyme nur an der Adipozytenmembran gebunden vorkommen oder auch in löslicher Form in das umgebende Medium sezerniert werden.

In Abbildung 4-25 lässt sich erkennen, dass der Abbau von ANG I (1-10) in Gegenwart von Zellen wesentlich schneller voranschreitet als ohne Zellkontakt. Das lässt vermuten, dass der Abbau von ANG I großteils membrangebunden stattfindet und dass lösliche Enzyme von untergeordneter Bedeutung sind. Dies gilt auch für ACE-1, welches in einer löslichen und einer membrangebundenen Form vorliegen kann (s. Kapitel 1.3.4.2).

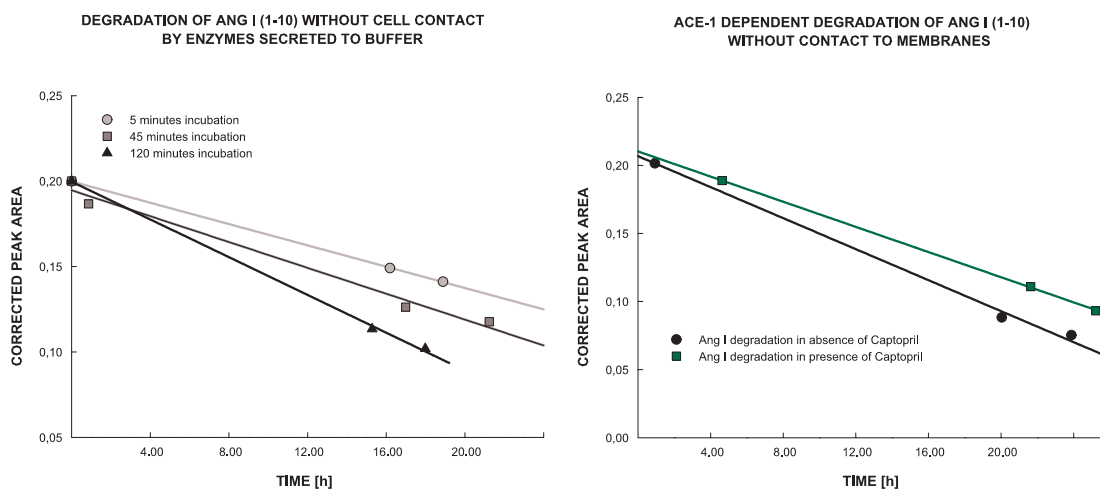
Abbildung 4-25: Abbau von ANG I (1-10) mit/ohne Zellkontakt



Adipozyten werden in 24er Multiwells differenziert und mit 100 µg/ml ANG I (1-10) inkubiert. Der Zellüberstand wurde zu Versuchsbeginn (0 h) und nach 2 h Inkubation in Gegenwart von Zellen analysiert. Nach 2 h wird der Zellüberstand von den adhären Zellen getrennt und der weitere Abbau ohne Zellkontakt analysiert.

Abbildung 4-26 zeigt den Abbau von ANG I (1-10) alleine durch lösliche Enzyme (ohne Zellkontakt). Die Abbaugeschwindigkeit steigt mit steigender Inkubationszeit

Abbildung 4-26: Abbau von ANG I (1-10) durch lösliche Enzyme



- (a) Zellen werden zuerst ohne Zusatz von Angiotensin für 5, 45, 120 Minuten mit Puffer inkubiert. Anschließend wird der Inkubationspuffer abgenommen und mit 100 µg/ml ANG I versetzt.
- (b) Abbildung b zeigt den Abbau durch lösliche Enzyme unter gleichen Bedingungen (120 min) mit/ohne Zusatz von Captopril 10 µg/ml.

an. Dies spricht für eine zeitabhängige Sekretion oder Abspaltung abbauender Enzyme in die Umgebung der Zelle als Bestandteil eines lokalen Angiotensin-Systems. Nur ein geringer Teil des ANG I-Abbaus scheint ACE-1 vermittelt zu sein (s. Abbildung 4-26b).

4.5.2 METHODE B: TRENNUNG BEI SAUREM PH

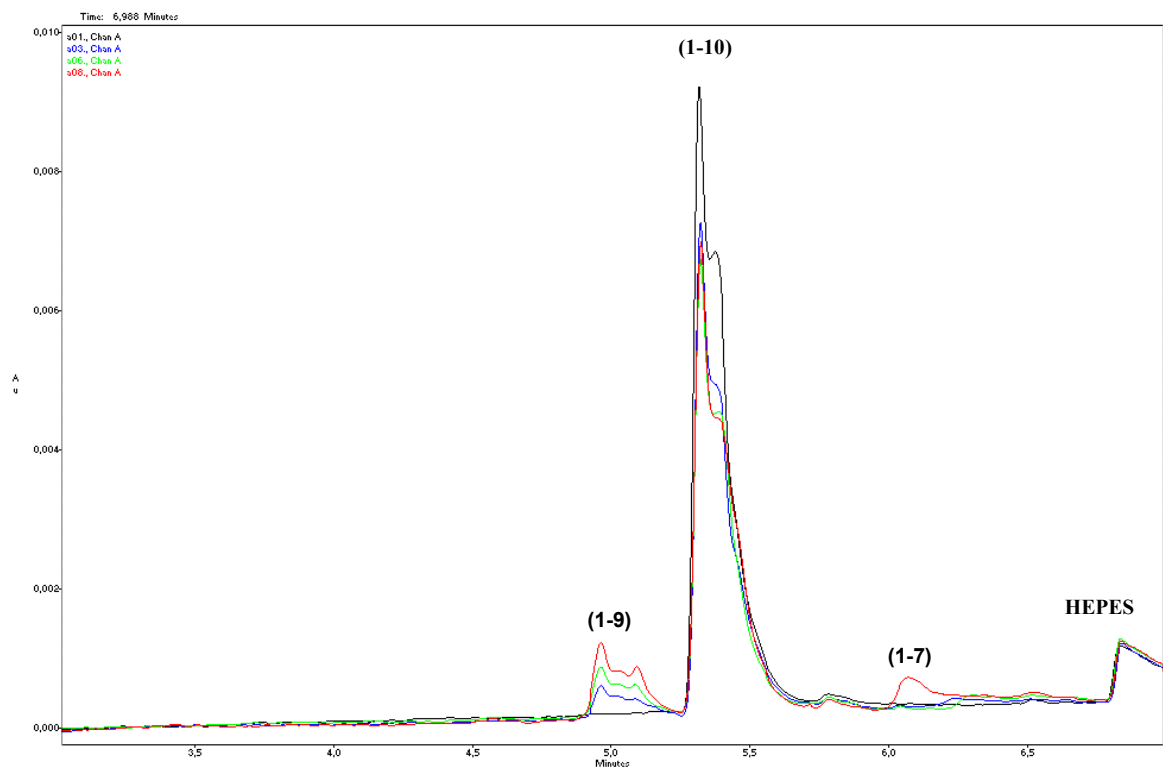
Zur weiteren Untersuchung des ACE-1/ACE-2 abhängigen Angiotensin-Metabolismus wurde zur UV-Bestimmung bei pH 1,95 übergegangen. Die bessere Trennung von ANG I (1-10), ANG (1-9), ANG II (1-8) und ANG (1-7) erleichtert die quantitative und qualitative Auswertung.

4.5.2.1 **ABBAU VON ANG I (1-10)**

Abbildung 4-27 zeigt den Abbau von ANG I (1-10) durch 3T3-L1 Adipozyten. Die Elektropherogramme bei 0, 20, 50, 70 Minuten Inkubation sind in der Abbildung übereinander gelegt dargestellt.

Da der ionenstarke Inkubationspuffer vor der Trennung unter diesen Versuchsbedingungen nicht verdünnt werden kann, kommt es zu einer

Abbildung 4-27: Abbau von ANG I (1-10) 100 μ M durch 3T3-L1 Adipozyten



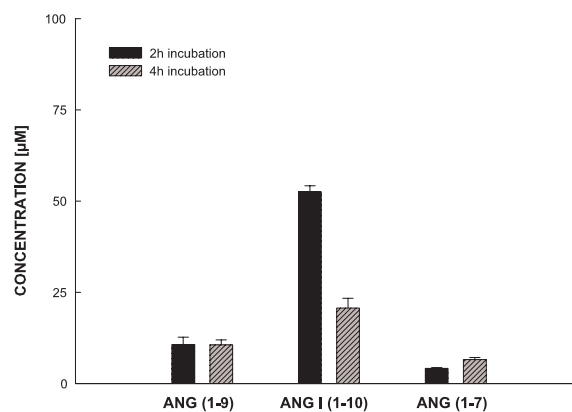
3T3-L1 Adipozyten wurden in 96er Multiwells differenziert und vor Versuchsbeginn 3 fach gewaschen. Die Zellen werden mit Inkubationspuffer + 100 μ g/ml ANG I (1-10) überschichtet und während des Versuchs bei 37°C inkubiert. Per Vakuuminjektion wird der Zellüberstand mehrfach hintereinander im Beckman P/ACE MDQ analysiert ohne den Zellrasen zu beschädigen. Die CE-Analyse erfolgt bei 40° C Kapillartemperatur, um die Analysenzeit auf 10 Minuten zu verkürzen.

Peakverbreiterung (Elektrodispersion). Durch die kurzen Injektionsintervalle lässt sich beobachten, in welcher chronologischen Reihenfolge die einzelnen Peptide gebildet und wieder abgebaut werden.

In diesem Fall wird initial ANG I (1-10) abgebaut und als erstes der Peak von ANG (1-9) sichtbar, wesentlich später (>50 Minuten) erscheint der Peak von ANG (1-7).

Der Nephrylisin vermittelte Abbau von ANG II (1-8) zu ANG (5-8) ist ebenfalls denkbar, da diese beiden Peptide unter diesen Versuchsbedingungen nicht voneinander getrennt werden. Das zeitlich versetzte Erscheinen der Peaks und die im Folgenden durchgeführten Abbauversuche von ANG (1-9) verdeutlichen jedoch, dass es sich bei dem zweiten Abbauprodukt hauptsächlich um ANG (1-7) handelt. Dies spricht dafür, dass ANG (1-7) über ANG (1-9) als Zwischenstufe gebildet wird.

Abbildung 4-28: Abbau von ANG I (1-10) zu ANG (1-9) und ANG (1-7)



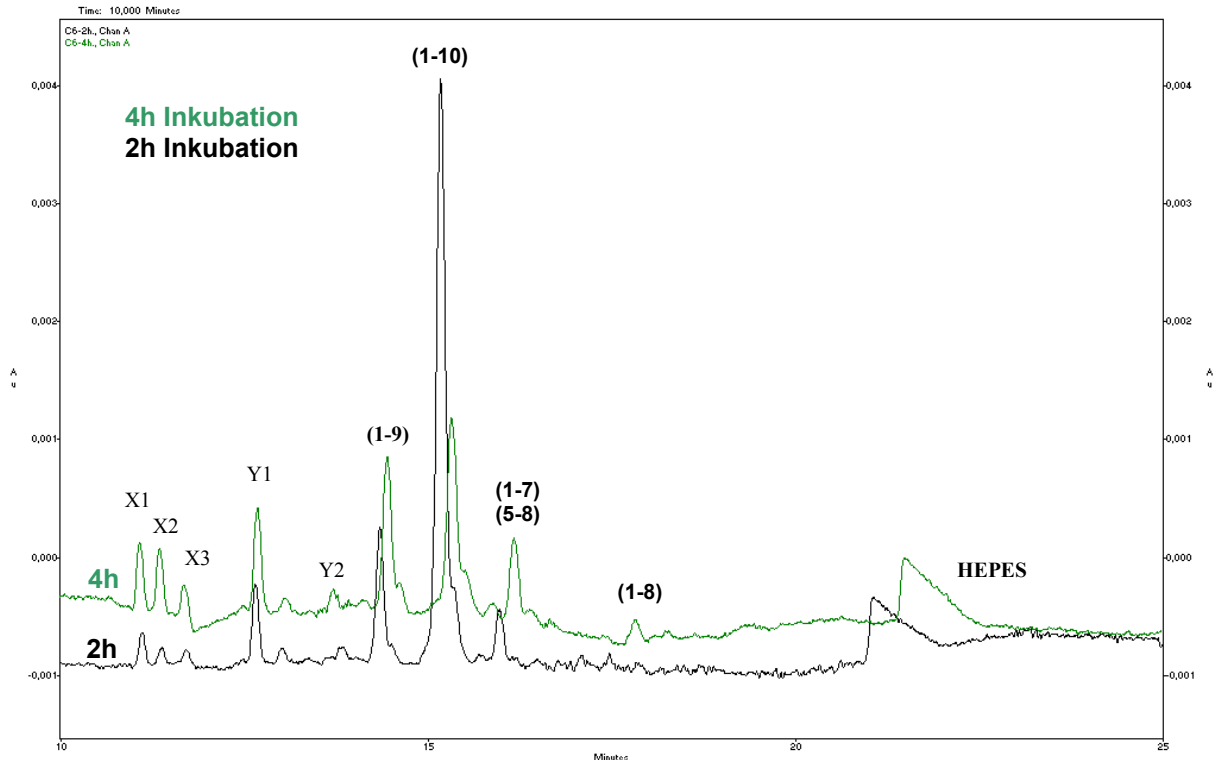
Gezeigt werden die Mittelwerte + SEM (n = 4) in Bezug auf eine Vergleichsprobe (100 µM ANG I). Die folgenden Balkendiagramme wurden analog ausgewertet.

Abbildung 4-29 zeigt den Abbau von ANG I (1-10) bei 2 h und 4 h Inkubationszeit. Man erkennt eine deutliche Akkumulation von ANG (1-9) und ANG (1-7) als wichtigste Metaboliten. In Abbildung 4-28 werden diese quantitativ beschrieben (n=4).

ANG (1-7) und ANG (1-9) werden demnach schneller gebildet als wieder abgebaut. Nach 4 h Inkubationszeit wird im Elektropherogramm zusätzlich ein Peak von ANG II (1-8) sichtbar ohne weiter anzusteigen. Vermutlich wird gebildetes ANG II (1-8) relativ schnell weiter abgebaut. Im Sinne einer Gleichgewichtsreaktion bleiben relativ geringe Mengen ANG II als Zwischenprodukt erkennbar.

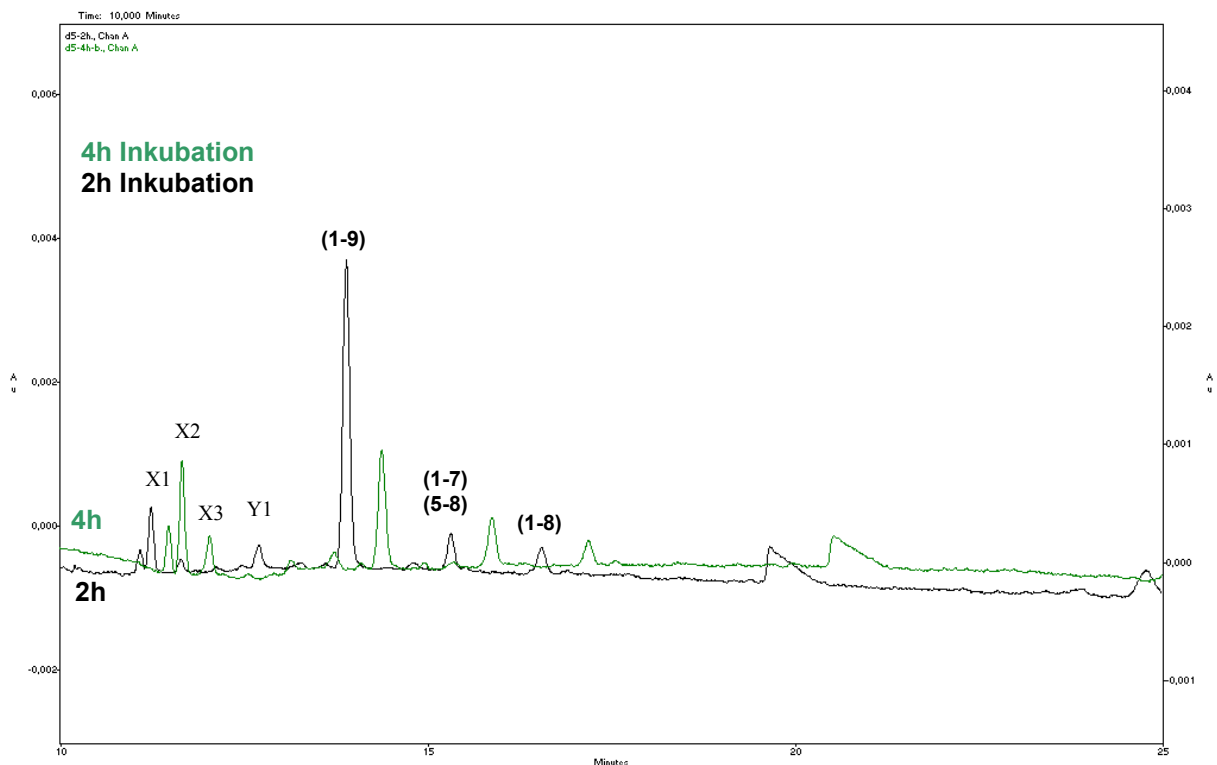
Daneben werden weitere bisher nicht identifizierbare Peaks mit kurzen Migrationszeiten sichtbar (X1-X3, Y1). Bei Y2 könnte es sich nach Lim et al. (1994) um ANG (2-9) bzw. ANG (2-10) als aminoterminalen Abbauprodukte handeln¹⁷⁹.

Abbildung 4-29: Abbau von ANG I (1-10) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten



3T3-L1 Adipozyten werden in 24er Multiwells mit unterschiedlichen Angiotensin-Peptiden bei 37°C inkubiert, um den Abbau der Peptide vergleichen zu können. Nach 2 h und 4 h werden je 50 µl Überstand entnommen und eingefroren. Zur Bestimmung der gebildeten Peptide werden je 40 µl mit 160 µl ddH₂O verdünnt und analysiert. Jeder Versuch wird 4 fach wiederholt.

Abbildung 4-30: Abbau von ANG I (1-9) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten



Probenentnahme und Analyse erfolgt wie in Abbildung 4-29 beschrieben. Bei einem von 4 Versuchen war zusätzlich ein Peak von ANG (1-5) detektierbar.

4.5.2.2 ABBAU VON ANG (1-9)

Wie erwartet, wird auch bei direkter Zugabe von ANG (1-9) dieses zu ANG (1-7) eliminiert (s. Abbildung 4-30). Eine direkte Bildung von ANG (5-8) aus ANG (1-9) ist prinzipiell nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich und in der Literatur nicht beschrieben. Dagegen spricht auch das zeitlich versetzte Erscheinen der Peaks (s. Abbildung 4-27).

ANG II (1-8) konnte in geringer Konzentration durch zuspiken identifiziert werden. ANG III und ANG IV waren nicht zu erkennen, es

gibt aber Hinweise auf ANG (1-5) als weiteres Abbaupепtid bei 4 h Inkubationszeit. Bei 10-12 Minuten Migrationszeit findet sich eine Folge von drei Peaks (X1-X3), wie es bereits beim Abbau von ANG I (1-10) zu sehen war. Der Peak Y2 erscheint nicht mehr, möglicherweise handelt es sich also um ANG (2-10) als spezifisches Abbauprodukt von ANG I (1-10).

Beim quantitativen Vergleich fällt auf, dass ANG (1-9) wesentlich langsamer abgebaut wird als ANG I (1-10). Es ist damit sehr wahrscheinlich, dass ANG I (1-10) zum einen über ANG (1-9) zu ANG (1-7) und in geringerem Maße zu ANG II (1-8) metabolisiert wird. Daneben muss ein weiterer Abbauweg für ANG I (1-10) bestehen.

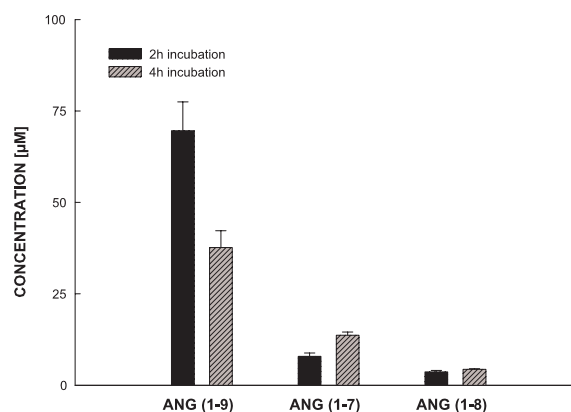
4.5.2.3 ABBAU VON ANG II (1-8)

Zur weiteren Betrachtung des Adipozyten vermittelten Abbaus der Angiotensin-Peptide wurden die Zellen mit dem Octapeptid ANG II (1-8) für 2 h bzw. 4 h inkubiert.

Innerhalb von 2 h werden ca. 70 % des Peptids abgebaut (s. Abbildung 4-32). Die Abbaugeschwindigkeit ist vergleichbar mit dem Abbau von ANG (1-9).

Als Hauptmetaboliten kommen ANG (1-7) und ANG (5-8) in Frage (s. Abbildung 4-34). Nach Schling (2002) ist zumindest in humanen Adipozyten der Abbau zu ANG (5-8) von besonderer Bedeutung¹⁵⁶.

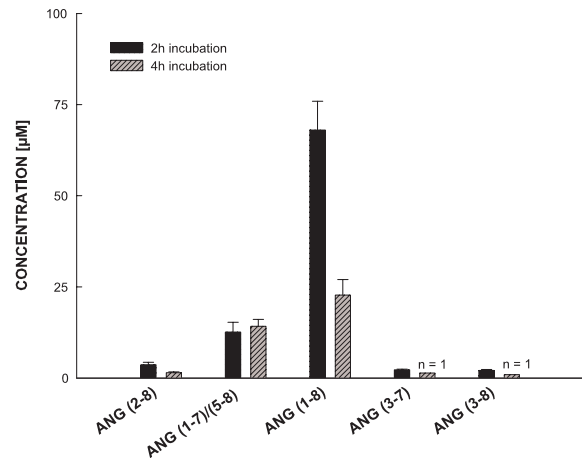
Abbildung 4-31: Abbau von ANG I (1-9) zu ANG II (1-8) und ANG (1-7)



Von 100 µM ANG (1-9) werden in 2 h etwa 25 % abgebaut. Der Abbau erfolgt im Vergleich zu ANG I (1-10) etwa halb so schnell. MW + SEM (n=4)

Betrachtet man die Bildung von ANG III (2-8) und ANG IV (3-8), so sind in Abbildung 4-34 nach 2 h Inkubation noch beide aktiven Abbauprodukte in geringer Konzentration sichtbar. Nach 4 h Inkubationszeit sind sie nicht mehr zu erkennen. Die aktiven Metaboliten werden also relativ schnell inaktiviert. Die intrazelluläre Aufnahme aus dem Inkubationspuffer ist ebenfalls denkbar. Die Peaks Y2 und X2 sind nicht mehr wieder zu finden.

Abbildung 4-32: Abbau von ANG I (1-8) zu ANG (1-7) und ANG (2-8)

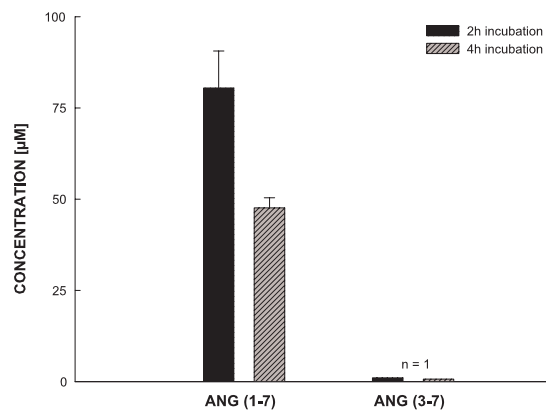


MW + SEM (n=4). ANG (3-7) und ANG (3-8) waren nur in einem von 4 Versuchen quantifizierbar (n=1).

4.5.2.4 ABBAU VON ANG (1-7)

Der Abbau von ANG (1-7) erfolgt relativ langsam. Dies erklärt, warum in anderen Abbauversuchen gebildetes ANG (1-7) über die Zeit akkumuliert (s. Abbildung 4-33).

Abbildung 4-33: Abbau von ANG (1-7)



Neben ANG (3-7) und den bereits bekannten Peaks X1 und X3 lassen sich eine Vielzahl bisher nicht bekannter Peaks beobachten, möglicherweise kleinere Peptidfragmente und Aminosäuren (s. Abbildung 4-35). Ob es sich hier um

MW + SEM (n=4). ANG (3-7) war nur in einem Versuchen quantifizierbar (n=1).

Produkte eines spezifischen Abbaus handelt, ist schwer abzuschätzen. Die Bildung von ANG (1-5) war ebenfalls vereinzelt zu erkennen.

Bei den Peaks Z1-Z3 mit längeren Migrationszeiten handelt es sich vermutlich um anionische (also saure) Abbauprodukte. Da es sich hier höchstwahrscheinlich nicht mehr um Peptide mit Restaffinität zu Angiotensin-Rezeptoren handelt, wurde auf eine entsprechende Methodenoptimierung und Zuordnung der Peaks verzichtet.

Abbildung 4-34: Abbau von ANG II (1-8) 100 μ M durch 3T3-L1 Adipozyten

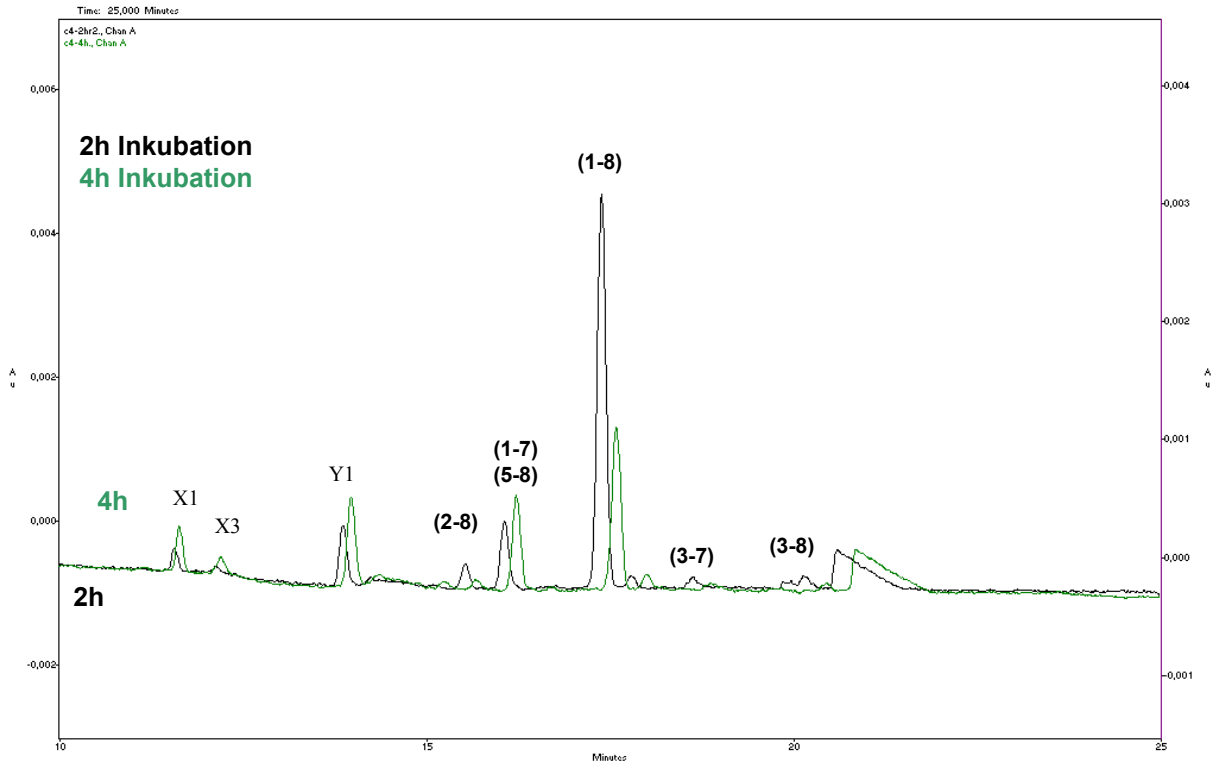
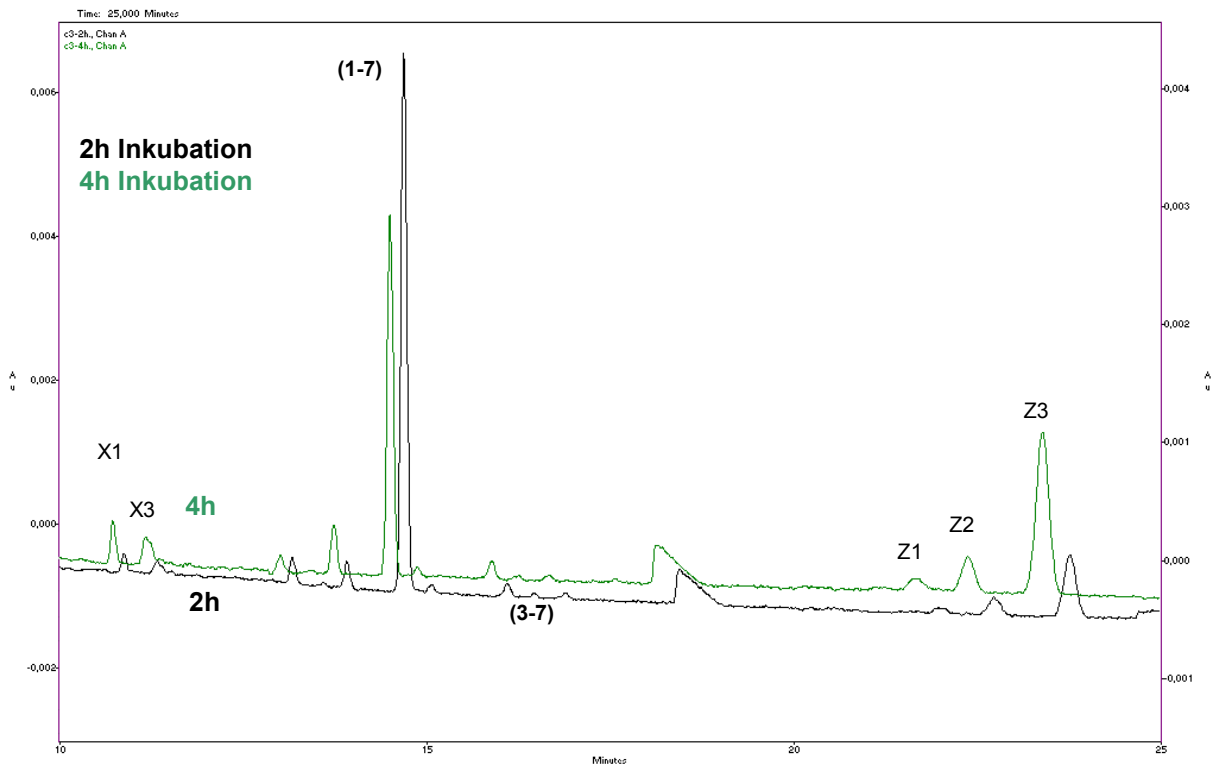


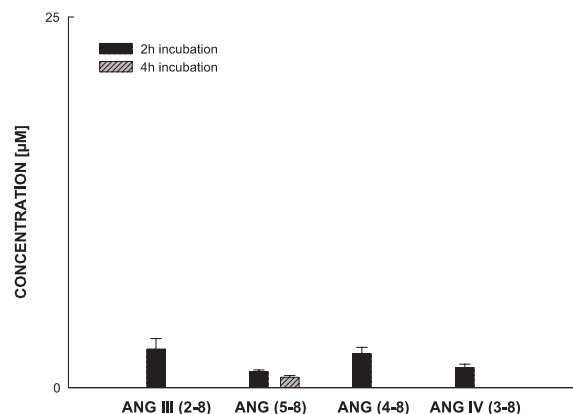
Abbildung 4-35: Abbau von ANG (1-7).100 μ M durch 3T3-L1 Adipozyten



4.5.2.5 ABBAU VON ANG III (2-8)

ANG III (2-8) wird im Gegensatz zu allen vorher getesteten Peptiden extrem schnell eliminiert (s. Abbildung 4-36). Innerhalb von 4 h sind weder Edukt noch Produkte der Abbaureaktionen zu erkennen. Bei 2 h Inkubation erscheinen ANG (3-8), ANG (4-8) und ANG (5-8) als aminoterminaler Abbauprodukte. ANG (3-7) ist nur unterhalb der Nachweisgrenze zu erahnen.

Abbildung 4-36: Abbau von ANG III (2-8)

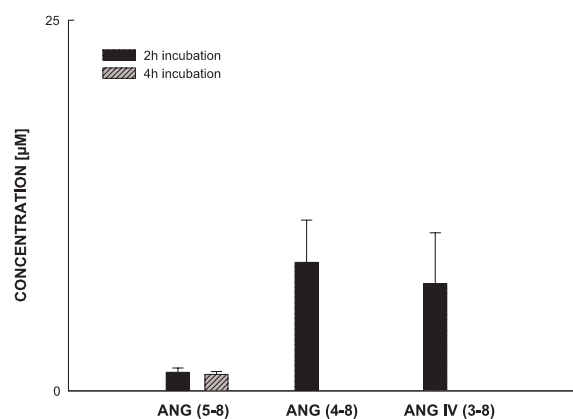


MW + SEM (n=4). Nach 4 h Inkubation ist nur noch ein Peak erkennbar.

4.5.2.6 ABBAU VON ANG IV (3-8)

Der Abbau von ANG IV (3-8) ähnelt dem Abbau von ANG III (2-8) in Geschwindigkeit und in der Art der gebildeten Peptide. ANG (4-8) und ANG (5-8) sind nach 2 h Inkubation mit ANG III bzw. ANG IV ähnlich gut erkennbar.

Abbildung 4-37: Abbau von ANG IV (3-8)



MW + SEM (n=3). Nach 4 h Inkubation ist nur noch ein Peak erkennbar.

Die Y-Achse weist eine andere Skalierung auf als die vorher gezeigten Diagramme.

ANG IV kann damit als aktives Produkt des aminoterminalen Abbaus von ANG III beschrieben werden.

Der vergleichsweise schnelle Abbau von ANG III und ANG IV zeigt bereits, dass die Konzentration dieser Peptide mit intrinsischer Aktivität am AT₄-Rezeptor in der Umgebung von Adipozyten streng kontrolliert wird. Darüber, ob IRAP an dieser Regulation nur als Zielrezeptor oder auch als abbauendes Enzym beteiligt ist, kann bisher nur spekuliert werden.

Abbildung 4-38: Abbau von ANG III (2-8) 100 μ M durch 3T3-L1 Adipozyten

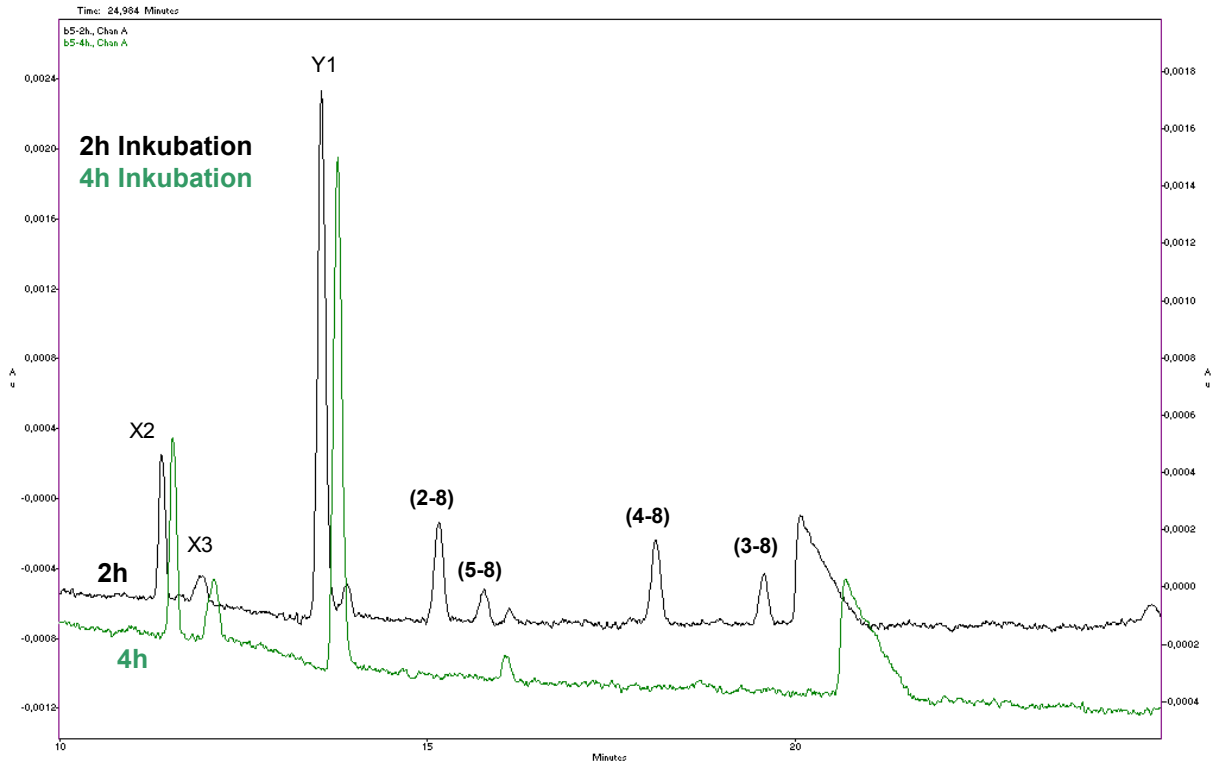
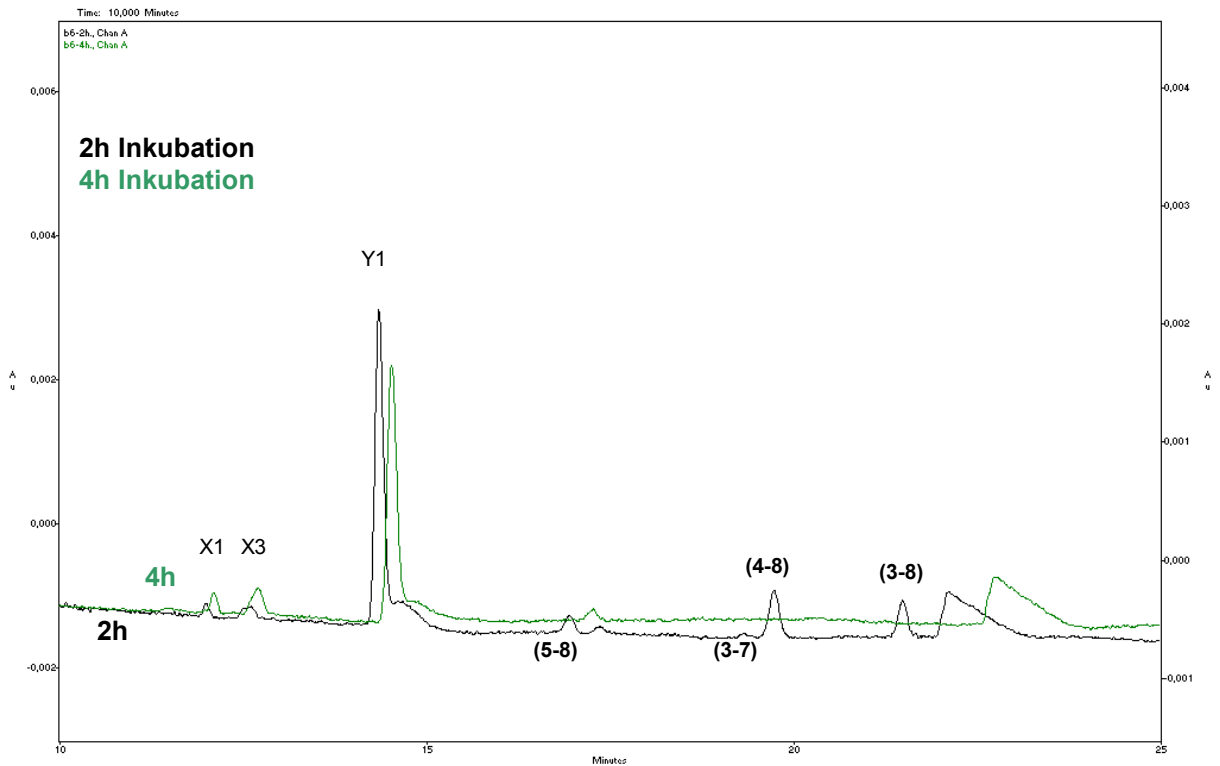


Abbildung 4-39: Abbau von ANG IV (3-8) 100 μ M durch 3T3-L1 Adipozyten



4.6 UNTERSUCHUNGEN AN INSULINOMA-ZELLEN (INS-1)

Teile eines parakrinen Angiotensin-Systems sind in der B-Zelle des Pankreas ebenfalls beschrieben worden. Daneben ist eine systemische Beeinflussung durch im Fettgewebe gebildete Angiotensin-Peptide möglich. Da die Insulinsekretion der B-Zelle streng an die Blutglukosespiegel und eher an die GLUT 2 gekoppelte Glukoseaufnahme gekoppelt ist, war die Beteiligung von IRAP und GLUT 4 eher unwahrscheinlich. Vor kurzem wurde IRAP und GLUT 4 in der B-Zelle des Pankreas nachgewiesen¹⁶⁹. In die B-Zelle aufgenommene Glukose wird direkt der Glykolyse zugeführt. Da die Insulinsekretion mechanistisch streng an das Verhältnis ATP/ADP gekoppelt ist, muss jede Stimulation der Glukoseaufnahme automatisch auch die Insulinsekretion stimulieren

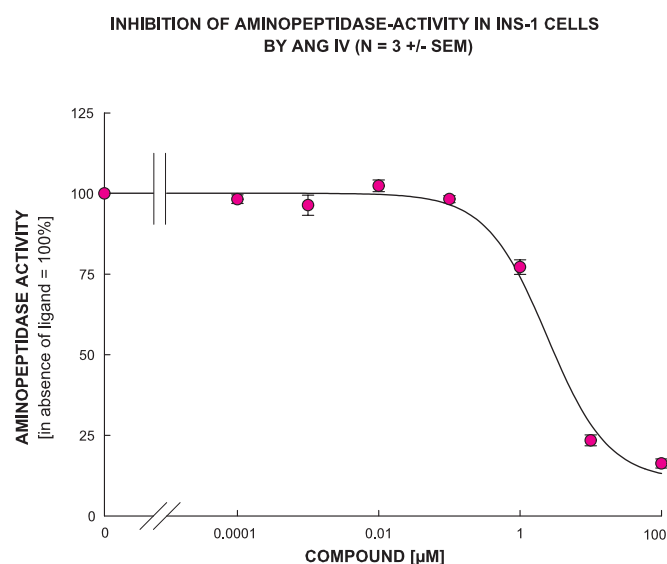
Vor allem im Hinblick auch *in vivo* Studien an der Ratte ist es wichtig zu wissen, ob Testsubstanzen die Insulinsekretion beeinflussen. Gerade an gesunden Versuchstieren, äußert sich eine Verstärkung oder Verbesserung der Insulinresistenz im Fettgewebe weniger an den Blutglukosespiegeln, sondern in einer entsprechenden Veränderung der Insulinsekretion.

4.6.1 IRAP-ASSAY

Die IRAP-Aktivität wurde nach der bereits beschriebenen Methode analysiert (s. Abbildung 4-40). Die IC_{50} -unterscheidet sich mit $2,4 \mu\text{M}$ kaum von den Beobachtungen am Fettgewebe.

Geht man davon aus, dass IRAP die Glukoseaufnahme beeinflusst, dass müsste im entsprechenden Konzentrationsbereich eine Stimulation der Insulinsekretion beobachtet werden.

Abbildung 4-40: IRAP-Aktivität in INS-1 Zellen



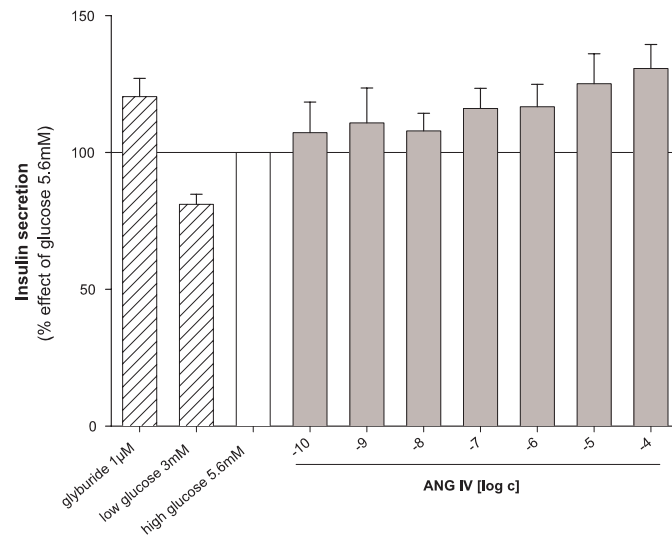
4.6.2 INSULIN-SEKRETION, RIA

Abbildung 4-41 zeigt die Stimulation der Insulinsekretion durch ANG IV. In micromolarer Konzentration wird die Insulinsekretion durch ANG IV ähnlich stark stimuliert wie durch Glibenclamid. Vermutlich wird dieser Effekt über eine verstärkte Glukoseaufnahme in die Zelle vermittelt.

ANG IV ist damit nicht nur im Fettgebe antidiabetisch wirksam, sondern auch an der B-Zelle.

Für *in vivo* Experimente muss der zweite Wirkort in die Versuchsplanung mit einfließen. Z.B. ließe sich die Insulinsekretion durch Streptozotocin-Behandlung oder durch diabetische Versuchstiere anderer Art unterdrücken¹⁸⁹.

Abbildung 4-41: ANG IV vermittelte Insulinsekretion



5 DISKUSSION

5.1 G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN

5.1.1 METHODENKRITIK

BINDUNGSSTUDIEN:

VERWENDUNG VON PROTEASEINHIBITOREN UND ANDEREN ZUSÄTZEN

Zu Beginn der Erforschung der Angiotensin-Rezeptoren wurden die meisten Versuche in Gegenwart reduzierender Reagenzien (DTT^{LXII}) durchgeführt. Mittlerweile ist bekannt, dass die Reduzierung der Sulfhydrylgruppen die spezifische Bindung dramatisch beeinflusst, so dass auf entsprechende Zusätze verzichtet werden sollte¹⁹⁰. Das ist auch bei Western-Blots unter reduzierenden Bedingungen zu beachten.

Dies ist nicht weiter verwunderlich, da für die Funktionalität und Rezeptorbindung des AT₁-Rezeptors eine Disulfidbrücke essentiell ist. Gleichzeitig erhöht der Zusatz von BSA die Bindungskapazität des AT₁-Rezeptors über im BSA enthaltene Sulfidbrücken, die dessen Tertiärstruktur schützen. Demnach würde ein Rezeptornachweis in Gegenwart von BSA der physiologischen Situation näher kommen als ohne BSA-Zusatz¹⁹⁰.

Der Ligand ¹²⁵I-ANG II (1-8) ist im Vergleich zu ¹²⁵I-SARILE relativ proteaselabil¹⁹¹. Dies äußerte sich in vergleichsweise großen Schwankungen der Messergebnisse. Dagegen wird der Ligand ¹²⁵I-SARILE nur geringfügig abgebaut¹⁹⁰.

EDTA und andere Proteaseinhibitoren können die Wiederfindungsrate des Radioliganden ¹²⁵I-SARILE verbessern. Der geringe Abbau in Abwesenheit von EDTA und Proteaseinhibitoren scheint die Messergebnisse aber nicht maßgeblich zu beeinflussen. Der Zusatz von EDTA verändert jedoch die Bindungsaffinität und damit auch die Gesamtbindung¹⁹¹. Der Mechanismus ist unbekannt und nicht über die Chelatisierung von Metallionen zu erklären.

Die eigenen Verdrängungs- und Sättigungsexperimente wurden ausnahmslos in Gegenwart von BSA durchgeführt. Auf Proteaseinhibitoren wurde vollständig verzichtet.

ALLGEMEINES

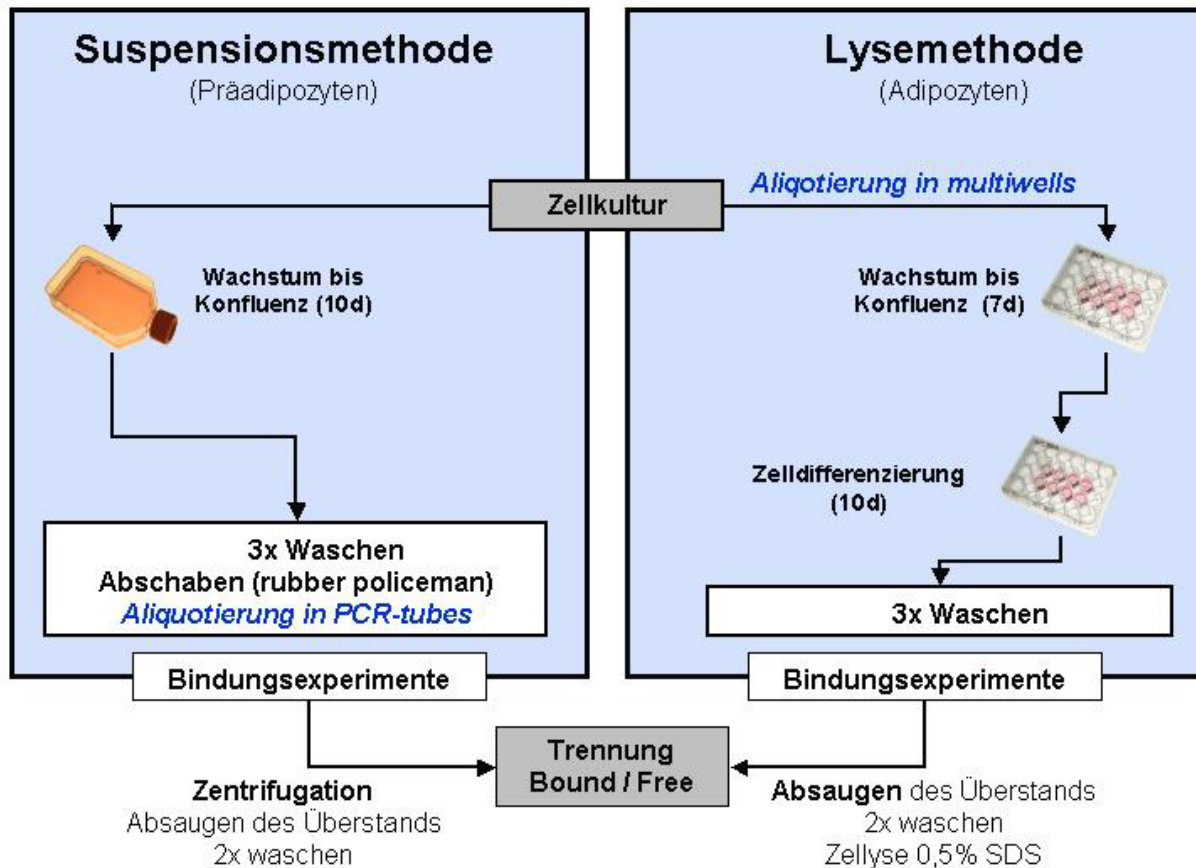
Wie bereits beschrieben wurde, ist der Nachweis von Rezeptoren im Fettgewebe schwierig. Standardmethoden, die auf Membranpräparationen beruhen sind bei

^{LXII} DTT = Dithiothreitol

Adipozyten fehlerbehaftet. Bei der Autoradiographie gelangen die Rezeptornachweise im Fettgewebe oftmals nicht. Auf der anderen Seite ist in Präadipozyten als pluripotenten Stammzellen die Proteinexpression nur sehr wenig ausgeprägt. Die Genexpression wird größtenteils erst später im Differenzierungsprozess (z.B. über C/EPB und PPAR's) aktiviert.

In Antwort auf diese Besonderheiten wurde die Methode der Verdrängungsversuche an Präadipozyten so ausgelegt, dass das Probenmaterial (Ganzzellsuspension) erst kurz vor Versuchsbeginn standardisiert wird (s. Abbildung 5-1). Gleichzeitig lässt sich die Radioaktivität für jedes einzelne PCR-Probengefäß bestimmen und somit ein Pipettierfehler bei der Zugabe der Radioaktivität mathematisch korrigieren.

Abbildung 5-1: Rezeptorbindungsstudien an ganzen Zellen



Die Suspensionsmethode erlaubt also die Arbeit mit einem höchstmöglich standardisierten Probenmaterial bei möglichst wenig Pipettierschritten. Schwankungen von Versuchsansatz zu Versuchsansatz lassen sich bei einer hohen Zahl von Versuchswiederholungen (bis zu 8) durch einen 100 % Bezug für jeden Versuchstag minimieren. Die Standardisierung des Zellmaterials erfolgt dabei erst wenige Minuten vor Versuchsbeginn. Die Werte sind damit wesentlich präziser als bei der Verwendung der Lysemethode an ganzen Zellen. Damit unterscheiden

sich die eigenen Ergebnisse auch von den bisher in der Literatur beschriebenen Rezeptornachweisen an Präadipozyten (Übersicht siehe Abbildung 1-22).

Bei der Lysemethode werden dagegen ganze Zellen in Multiwells vermessen. Die Standardisierung des Zellmaterials resultiert aus der Wachstumsfläche. Der Gesamtprozess von Zellwachstum über Induktion der Fettzellendifferenzierung bis zum Versuchsansatz kann bis zu 3 Wochen in Anspruch nehmen. Also erfolgt in diesem Fall auch die Standardisierung schon mehrere Wochen vor Versuchsbeginn. Trotz interner Standardisierung resultieren zwangsläufig wesentlich stärkere Schwankungen.

Die Lysemethode muss zur Anwendung kommen, da sich Adipozyten nicht durch Zentrifugation abtrennen lassen. Filtermethoden ganzer Zellen sind schwer zu etablieren, da Lipide die Poren verstopfen können. Gleichzeitig lösen freiwerdende Lipide die Ligandenbindung und können Membranstrukturen durch Emulsion mit enthaltenen Phospholipiden stören. Dieses Problem wird hier umgangen, da ganze Zellen vermessen werden. Solange diese intakt bleiben, können kompartimentierte Lipide die Nachweise membranständiger Rezeptoren nicht stören.

Die eigenen Bindungsversuche charakterisieren als Ganzzellversuche nur den membranständigen Anteil aktiver Rezeptoren. Inaktivierte Rezeptoren (z.B. durch Heterodimerisierung oder Internalisierung) werden nicht erfasst. Dies unterscheidet die eigenen Versuche von Verdrängungsversuchen an Membranpräparationen. Gleichzeitig werden im Gegensatz zu Western-Blots nur aktive Rezeptoren bestimmt.

5.1.2 LITERATURVERGLEICH

Jones et al. (1997)³¹ gelang es AT-Rezeptoren an erwachsenen Adipozyten nachzuweisen; der Nachweis an Präadipozyten gelingt jedoch mit der beschriebenen Methode (Lysemethode an ganzen Zellen in 6er wells) nicht. An Präadipozyten wird nur eine niederaffine Bindungsstelle erwähnt, ohne diese Daten zu veröffentlichen. Dies deckt sich mit den eigenen Versuchsbeobachtungen, dass Rezeptornachweise an Präadipozyten nach der Lysemethode nicht erfolgreich sind. Die Rezeptoren an Adipozyten werden trotz widersprüchlicher Daten dem AT₂-Rezeptor zugeordnet.

Crandall et al. (1999) haben in Sättigungsexperimenten (bis 2,5 nM) eine hochaffine Bindung von SARILE ($K_D = 1,5$ nM) nachweisen können und ordnen diese durch Verdrängung mit Losartan dem AT₁-Rezeptor zu³⁰. Die Präadipozyten wurden in Gegenwart von FCS kultiviert. Der Zellzyklus der Präadipozyten wurde dagegen erst durch unphysiologisch hohe Konzentrationen (1-10 µM) ANG II beeinflusst.

Sehr gute Beschreibungen zur Verteilung von AT₁- und AT₂-Rezeptoren auf Proteinebene stammen aus Western-Blotting Versuchen^{90,160}. Danach sind AT₁- und AT₂-Rezeptoren in Präadipozyten nebeneinander vorhanden. Während des Differenzierungsprozesses geht die AT₂-Rezeptordichte in 3T3-L1 Zellen zurück. Betrachtet man alleine die Rezeptornachweise an Präadipozyten von Nagetieren, so sind die Daten von Jones et al. (1997) und von Mallow et al. (2000) widersprüchlich. Die nahezu alleinige Existenz des AT₁-Rezeptors (neben dem AT₄-Rezeptor) an ausdifferenzierten 3T3-L1 Zellen kann durch die eigenen Versuche bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu beschreibt Schling (2002) mit Hilfe von Western und Northern-Blots ein anderes Verhältnis von AT₁/AT₂-Rezeptoren in humanen Adipozyten. An Präadipozyten finden sich beide Subtypen gleichermaßen. Die AT₁-Rezeptordichte bleibt während der Fettzellendifferenzierung trotz einer Abnahme der AT₁-mRNA unverändert. Die Ausprägung des AT₂-Rezeptors nimmt dagegen zu. Dabei kommen Ganzzelllysate zum Einsatz, so dass der membranständige Anteil nicht abgeschätzt werden kann⁹⁰.

Andere Gruppen wie z.B. Crandall et al. (1994)¹⁶¹ verwendeten Membranpräparationen isolierter Adipozyten. Dieser Ansatz ist vor allem an Adipozyten erfolgreich, Präadipozyten wurden nicht untersucht. Der resultierende Nachweise von AT₁-Rezeptoren an Adipozyten ist unstrittig und konnte mittels Western-Blots, RT-PCR und Konfokal Laser Mikroskopie durch mehrere Publikationen bestätigt werden. Allerdings beschreiben die Autoren, dass sie die Abwesenheit von Gefäßendothelzellen gewährleisten, indem sie die ACE-mRNA bestimmen. Es wurde nur Zellmaterial verwendet, in dem keine mRNA für ACE nachweisbar war. Wenig später wurde die Existenz von ACE-mRNA in Adipozyten jedoch wiederholt beschrieben¹⁹.

5.1.3 NACHWEIS DES MAS-REZEPTORS

Fraglich bleiben dagegen die Versuche mit ¹²⁵I-D-Pro7-ANG (1-7) zum Nachweis des Mas-Rezeptors. Eigene Versuche geben bei den etablierten Methoden keinen Hinweis auf eine spezifische Rezeptorbindung, es fehlen aber eine gute Charakterisierung des Radioliganden und erfolgreiche Positivkontrollen. Letztendlich darf aus einer nicht erfolgreichen Nachweisreaktion nicht direkt auf das Fehlen des Rezeptors geschlossen werden. Hier wären PCR gestützte Nachweise der mRNA-Expression in Adipozyten hilfreich.

5.1.4 AT₁/AT₂-REZEPTOREN IN PRÄADIPOZYTEN

Die eigenen Verdrängungsversuche (s. Kapitel 4.1.3) und Sättigungsexperimente (s. Kapitel 4.2) mit CGP42112A verdeutlichen die Koexistenz von AT₁- und AT₂-Rezeptoren in nicht differenzierten 3T3-L1 Präadipozyten. Die Quantifizierung der Rezeptordichten ist zwar nur bedingt möglich, es lassen sich aber deutliche Hinweise auf eine ungefähre Gleichverteilung der Subtypen finden.

Interessant ist, dass eine 1:1-Verteilung auch im Rahmen von Rezeptordimerisierungen zwischen AT₁- und AT₂-Rezeptor auftreten könnte. Rezeptor-Heterodimere sind in Präadipozyten bisher nicht untersucht worden, sind aber in anderen fetalen Zellsystemen bereits bekannt⁹¹.

ANG II beeinflusst an humanen Präadipozyten den Zellzyklus angeblich über den AT₁-Rezeptor³⁰. Da der Effekt erst ab einer Konzentration von 1-10 µM ANG II beobachtet wird, muss die zweite niederaffine Bindungsstelle bedacht werden. Die direkte Zuordnung des Effekts zum AT₁-Rezeptor ist kritisch.

Ein enges Zusammenspiel von AT₁/AT₂-Rezeptoren ist im Rahmen des „cardiac remodelings“ von Bedeutung²⁴. Es ist gut denkbar, dass eine ERK-vermittelte Regulierung von Zellwachstum und Apoptose (s. Abbildung 1-15) im gleichen Maße auch am „adipose tissue remodeling“ (s. Abbildung 1-3) beteiligt ist. Dass C/EBP α und PPAR γ über MEK^{LXIII}/ERK aktiviert wird, ist bereits bekannt¹⁹². Ein direktes Zusammenspiel von AT₁- und AT₂-Rezeptoren ist im Fettgewebe bisher nicht bewiesen aber sehr wahrscheinlich. Damit wären beide Rezeptorsubtypen bzw. ein Gleichgewicht der Rezeptoren für die Entwicklung eines funktionellen Fettgewebes von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass ein knockout von AT₂-Rezeptoren die Adipozytengröße reduziert und Diät induzierter Adipositas entgegenwirkt²³.

5.1.5 AT₁/AT₂-REZEPTOREN IN ADIPOZYTEN

Die eigenen Bindungsstudien offenbaren an 3T3-L1 Adipozyten vor allem den AT₁-Rezeptor. Dennoch könnte an humanen Adipozyten auch der AT₂-Rezeptor Effekte vermitteln.

Von entscheidender Bedeutung ist bei der Interpretation Angiotensin induzierter Effekte die Beachtung des biphasischen Bindungsverlaufs (s. Abbildung 4-2b in Gegenwart von ¹²⁵I-ANG II und Abbildung 4-3b in Gegenwart von ¹²⁵I-SARILE). Eine spezifische Besetzung des AT₁-Rezeptors durch ANG II (1-8) kann nur bei Konzentrationen bis maximal 100 nM garantiert werden. Bei Versuchen mit

^{LXIII} MEK = mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase

höheren Konzentrationen sind Kreuzreaktionen zu dieser zweiten Bindungsstelle zu beachten.

Diese Kreuzreaktionen kann auch an Präadipozyten auftreten (s. Abbildung 4-2a und Abbildung 4-3a). Die niederaffine Bindungsstellen in Präadipozyten wurde auch von Jones (1997) bereits erwähnt³¹.

Werden Sartane als AT₁-Rezeptor Antagonisten verwendet, muss deren Aktivität am PPAR γ beachtet werden⁶⁸. Konzentrationen >1 μ M führen durch eine Aktivierung von PAR γ zu Mischeffekten. Daneben kann bei Verwendung peptidischer Liganden der Abbau zu ANG III, IV und ANG (1-7) auftreten.

Eindeutig dem AT₁- bzw. dem AT₂-Rezeptor zuzuordnen ist z.B. die ANG II (1-10 nM) induzierte Leptinsekretion an primären Ratten-Adipozyten über Prostaglandin-abhängige Mechanismen¹³⁷. Genauso konnte gezeigt werden, dass ANG II (1-10 nM) den Triglyceridgehalt von Fettzellen erhöht³¹, auch wenn FAS^{LXIV} und GPDH^{LXV}-Aktivität durch niedrige Konzentrationen an ANG II gefördert und durch höhere Konzentrationen (>10 nM) wieder reduziert werden.

Im Gegensatz dazu lassen sich z.B. Effekte auf die Adiponektinsekretion wesentlich schwerer interpretieren. Die Adiponektinsekretion wird durch ANG II (1-5 nM) stimuliert, höhere Konzentrationen verlieren an Aktivität²⁹. PD123319 (0,5-5 μ M) als AT₂-Rezeptorantagonist hemmt und CGP42112A (1-10 μ M) als AT₂-Rezeptoragonist fördert die Adiponektin-Sekretion¹⁹³. Den eigenen Versuchen mit CGP42112A zufolge (s. Abbildung 4-4) ist in diesen Konzentrationen eine Kreuzreaktion an den AT₁-Rezeptor möglich. Es lässt sich also vermuten, dass hier Effekte auf die Adiponektinsekretion nicht ohne weiteres alleine dem AT₂-Rezeptor zugeordnet werden können.

5.1.6 BEDEUTUNG DER NIEDERAFFINEN BINDUNGSSTELLE

Wie bereits mehrfach erwähnt wurde, existiert neben nanomolaren Bindungsstellen eine weitere niederaffine Bindungsstelle für ANG II (K_D = 800 nM) und SARILE (K_D = 2-12 μ M). Worum es sich dabei handelt ist nicht genau geklärt.

Ein Erklärungsmodell bietet die Interaktion mit dem AT₄-Rezeptor. ANG II hemmt die IRAP-Aktivität im Fluoreszenzassay allerdings erst in Konzentrationen >10 μ M (s. Abbildung 4-17). K_D und IC₅₀-Werte unterscheiden sich also mindestens um den Faktor 10. Eine ähnliche Situation ist bei der Verwendung von SARILE zu beobachten. Die niederaffine Bindungsstelle ist stark ausgeprägt, aber SARILE ist

^{LXIV} FAS = fatty acid synthetase

^{LXV} GPDH = Glycerol-3-phosphate dehydrogenase

im IRAP-Assay nicht aktiv. Dies spricht gegen eine Interaktion von SARILE am AT₄-Rezeptor, auch wenn ein direkter Beweis noch aussteht. Eine hochaffine Interaktion von SARILE ohne intrinsische Aktivität am AT₄-Rezeptor kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Ein besseres Erklärungsmodell für die zweite Bindungsstelle ist die Interaktion von Angiotensin-Peptiden mit PPAR γ . Es wäre denkbar, dass nicht nur Sartane in Konzentrationen >1 μ M den PPAR γ aktivieren. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten ist in unphysiologischen Konzentrationen eine Interaktion der Angiotensin-Peptide mit PPAR genauso denkbar. Sartane sind als relativ lipophile Substanzen bekannt und sind daher imstande, für eine direkte Aktivierung in den Zellkern zu penetrieren¹⁹⁴. Dies soll die relativ niedrigen EC₅₀-Werte der PPAR γ -Aktivierung durch AT₁-Rezeptor Antagonisten (ca. 1-10 μ M) erklären. Unterschiedliche EC₅₀-Werte verschiedener Sartane werden mit Unterschieden in der Lipophilie in Verbindung gebracht¹⁹⁵. Der Nachweis einer direkten Aktivierung steht allerdings noch aus. Hydrophile Peptide passen nicht in dieses Erklärungsmodell, aber anstelle einer passiven Diffusion ist ein aktiver Transport denkbar. Neben einer direkten Rezeptor-Interaktion ist auch eine Interaktionen mit Corepressoren und Coaktivatoren des PPAR γ möglich.

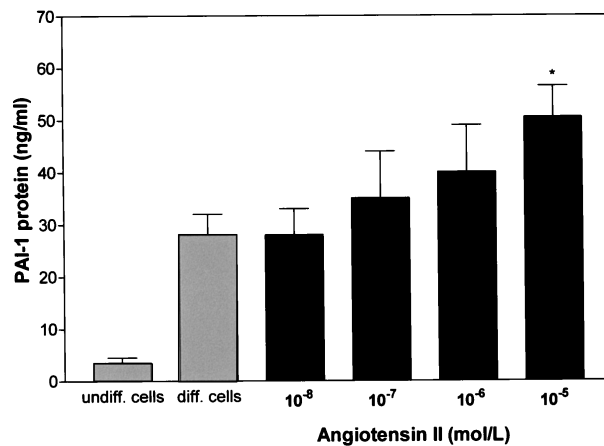
In den meisten Fällen werden niederaffine Bindungsstellen als wenig relevant angesehen. Plasmaspiegel von AT₁-Rezeptor Antagonisten können in der Therapie mikromolare Konzentrationen erreichen. Bei einer oralen Einzeldosis von 50 mg Losartan werden c_{max}-Werte von ca. 230 – 250 ng/ml (ca. 380 nM) erreicht¹⁹⁶. Damit ist eine klinische Relevanz auf keinen Fall auszuschließen. Ein ähnliches Bild findet sich bei einer Vielzahl von *in vitro* Experimenten.

Die wichtigsten Beispiele werden im Folgenden vorgestellt:

- Der bereits beschriebene Einfluss auf den Zellzyklus von Präadipozyten lässt sich erst ab Konzentrationen von 1 μ M beobachten³⁰.
- Telmisartan fördert die Adipozytendifferenzierung erst ab 1 μ M (Ölrot Färbung). Telmisartan 10 μ M erhöht die 2-Desoxyglukoseaufnahme auf das 3 fache in Abwesenheit und Anwesenheit von Insulin²².

- Klinische Studien verdeutlichen, dass eine Aktivierung des RAAS über eine erhöhte Sekretion von PAI-1 mit dem Gerinnungssystem verknüpft ist^{14,197,198}. Gleichzeitig senkt Troglitazon die PAI-1 Sekretion aus dem Fettgewebe¹⁹⁹. Systemisch erhöhte PAI-1 Spiegel können durch eine Angiotensin vermittelte PAI-1 Sekretion des Fettgewebes erklärt werden²⁰⁰.

Abbildung 5-2: ANG II vermittelte Sekretion von PAI-1 in Adipozyten^{LXVI}



Dieser Effekt wurde zuerst auf ANG II bzw. AT₁- und AT₂-Rezeptoren zurückgeführt. Daneben ist die ANG IV vermittelte PAI-1 Sekretion denkbar²⁰¹. Abbildung 5-2 zeigt die Stimulation durch ANG II¹²³. Vergleicht man die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts mit den eigenen Ergebnissen von Verdrängungsversuchen, so fällt auf, dass eine Aktivierung nanomolarer Bindungsstellen (1-10 nM) wirkungslos bleibt. Höhere Konzentrationen (1-10 µM), die in den eigenen Experimenten zusätzlich die niederaffine Bindungsstelle besetzen, führen dagegen zu einer deutlichen Stimulation der PAI-1 Sekretion. Da dieser Effekt zeitabhängig auftritt und teilweise durch Peptidaseinhibitoren aufgehoben wird, sollte außerdem ein Abbau zu ANG IV als aktiven Liganden bedacht werden¹³³.

Vor allem die Angiotensin-vermittelte PAI-1 Sekretion bietet sich als prominentes Beispiel für die *in vitro*-Aktivität zusätzlicher Bindungsstellen an. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese zu charakterisieren.

^{LXVI} Abbildung übernommen aus Skurk et al. (2002)

5.2 AT₄-REZEPTOREN

5.2.1 METHODENKRITIK

Verdrängungsversuche mit ¹²⁵I-ANG IV wurden nach der Lysemethode durchgeführt. Da die unspezifische Bindung mit ca. 20-30 % wesentlich geringer ist als bei den vorher untersuchten G-Protein gekoppelten Rezeptoren, war eine Methodenoptimierung in Anlehnung an die bereits beschriebene Suspensionsmethode nicht mehr notwendig. Adipozyten und Präadipozyten werden nach der Lysemethode bestimmt, dadurch wird ein Vergleich der unterschiedlichen Zelltypen und Differenzierungsstadien möglich.

Bei dem Enzym IRAP als Träger des AT₄-Rezeptors handelt es sich um eine Zink-abhängige Peptidase. Alleine deswegen empfiehlt es sich, dass Untersuchungen am AT₄-Rezeptor in Abwesenheit von EDTA und Proteaseinhibitoren durchgeführt werden.

Rezeptoraffinität und die spezifische Bindung zum AT₄-Rezeptor werden bei Bindungsstudien an Membranpräparationen durch EDTA, DTT und den Zusatz von mono- und divalenten Ionen stark beeinflusst. Alleine die Auswahl des Puffersystems kann die Rezeptoraffinität um den Faktor 10 verändern, zusätzlich wird die Selektivität von ¹²⁵I-ANG IV gegenüber dem AT₁- und AT₂-Rezeptor verändert²⁰².

Um den Vergleich zu den bereits beschriebenen Bindungsstudien zu ermöglichen, wurde weiterhin auf den Zusatz von Proteaseinhibitoren und EDTA verzichtet, BSA wurde zugesetzt. Außerdem wäre die Bestätigung von Bindungsstudien in Gegenwart von EDTA und DTT durch ein Fluoreszenzassay in Abwesenheit dieser Zusätze nicht sinnvoll. Lew et al. (2003) vergleichen Affinitäten in Verdrängungsversuchen mit den Ergebnissen aus einem Fluoreszenzassay und beobachten bis zu 200 fache Unterschiede zwischen IC₅₀ und K_D-Werten¹¹⁴. Dies wird auf den Zusatz von EDTA und Proteaseinhibitoren zurückgeführt.

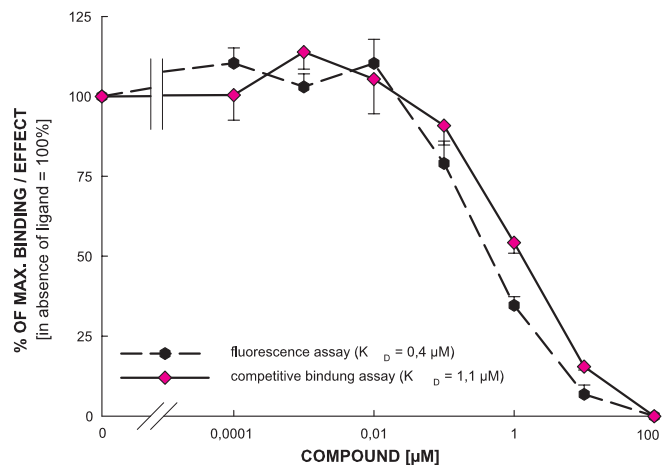
Die eigenen Versuche wurden in An- und Abwesenheit von Insulin durchgeführt, dies brachte aber keine neuen Erkenntnisse. Es ist sehr wahrscheinlich, dass im BSA enthaltenes Insulin entsprechende Untersuchungen zur Insulinstimulierbarkeit erschwert. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der [³H]2-Desoxyglukoseaufnahme diskutiert.

Da der AT₄-Rezeptor als hochaffiner Rezeptor beschrieben ist²⁰³ und die eigenen Versuche eine wesentlich geringere Affinität aufzeigen, wurde versucht, die eigenen Verdrängungsversuche ebenfalls durch ein Fluoreszenzassay der

Peptidase-Aktivität zu bestätigen. IC_{50} -Wert ($0,4 \mu\text{M}$) und K_D -Wert ($1,1 \mu\text{M}$) sind für ANG IV sehr ähnlich (s. Abbildung 5-3).

Es ist zwar prinzipiell denkbar, dass die Affinität in beiden Assays reduziert ist, allerdings existieren hierfür keinerlei Hinweise. Die Inkubationszeit des Fluoreszenzassays unterscheidet sich mit 10 Minuten von den 120 Minuten Inkubationszeit der Rezeptorbindungsstudien. Die kurze Inkubationszeit gewährleistet einen möglichst geringen Abbau der Testliganden. Dass innerhalb von 10 Minuten die IC_{50} -Werte nicht nennenswert beeinflusst werden, wurde bereits gezeigt (s. Abbildung 4-19). Eine Inaktivierung des Liganden während des Versuches kann damit ausgeschlossen werden.

Abbildung 5-3: Vergleich von Rezeptorbindung und Enzyminhibition am AT_4 -Rezeptor



Im Nachhinein wären Verdrängungsversuche in Gegenwart von Zink-Ionen (1 mM) (s. Abbildung 4-21) eine interessante Alternative gewesen. Die eigenen Versuche bestätigen eine Enzyminhibition ohne Interaktion mit der Bindungsstelle für ANG IV. Zink-Ionen könnten einen IRAP-vermittelten Abbau des Radioliganden unterbinden, ohne dabei die Affinität des Rezeptors zu verändern.

5.2.2 LITERATURVERGLEICH

Die Existenz von IRAP ist an Adipozyten bereits länger beschrieben. Erst kürzlich wurde bekannt, dass der AT_4 -Rezeptor mit IRAP gleichzusetzen ist. Dennoch existieren bisher keine Aussagen zur Aktivität des AT_4 -Rezeptors an Adipozyten. Die hier vorgestellten Daten stellen demnach die erste erfolgreiche Beschreibung des AT_4 -Rezeptors im Fettgewebe dar. Am Pankreas ist die Situation ähnlich.

Der Vergleich der eigenen IC_{50} und K_D -Werte kann also nur mit anderen Gewebetypen erfolgen. Lew et al. (2003) beschreiben eine nanomolare Affinität von ANG IV¹¹⁴. Die Inhibition der IRAP-Aktivität erfolgt bei einem biphasischen Kurvenverlauf mit einer IC_{50} von 113 nM . Andere Arbeitsgruppen erzielen Effekte (z.B. auf die Dopaminfreisetzung im Striatum) ebenfalls erst in micromolaren Konzentrationen von ANG IV¹³² und widersprechen damit den Bindungsstudien von Lew et al. mit Hinweis auf die Analyse in Gegenwart von EDTA.

An neuronalen Zellen der Ratte wurde ein biphasischer Bindungsverlauf beobachtet. Greenland et al. (1996) benennen diese Bindungsstellen als AT_{4A} und AT_{4B}-Rezeptoren. Die niederaffine Bindungsstelle ($K_D = 277 \text{ nM}$) ist mit den eigenen Ergebnissen gut vergleichbar¹²⁴. Es existieren mehrere Hinweise auf unterschiedliche AT₄-Rezeptor Subtypen oder zumindest unterschiedliche Bindungsstellen. An renalen Zellsystemen, die weder AT₁- noch AT₂-Rezeptoren exprimieren, offenbart sich ein biphasischer Effekt von ANG IV auf den intrazellulären Calcium-Influx²⁰³, gleichzeitig wird in Bindungsstudien erneut ein biphasischer Kurvenverlauf beobachtet ($IC_{50} = 0,08 \text{ nM}$ und 76 nM)¹⁰⁸.

Die eigenen Versuche ergeben ebenfalls Hinweise auf eine biphasische Bindung. In einzelnen Versuchen lässt sich eine positive Kooperativität der Rezeptorbindung von ANG IV in nanomolarer Konzentration beobachten. Der Nachweis von zwei Bindungsstellen gelingt statistisch aus den eigenen Daten mit ANG III im Fluoreszenzassay (s. Abbildung 4-18). Der erste IC_{50} -Wert ($0,1 \text{ nM}$) passt gut zu den Beobachtungen von Handa et al. (2001). Der zweite IC_{50} -Wert liegt mit 500 nM etwas niedriger. Auch bei Verwendung von Nle1-ANG IV lässt sich eine zweite Bindungsstelle erahnen aber nicht statistisch auswerten (s. Abbildung 4-20).

Wie erwähnt erhöht ANG IV den Calcium-Influx in subnanomolaren Konzentrationen ($0,1 \text{ nM}$). Dieser Effekt wird durch hohe Konzentrationen ($10 \mu\text{M}$) jedoch wieder eliminiert. Möglicherweise haben die beiden Bindungsstellen entgegengesetzte Effekte. Dieser biphasische Effekt tritt bei Divalinal-ANG IV nicht im gleichen Maße auf. Divalinal-ANG IV wird als reiner Antagonist beschrieben, erhöht aber in subnanomolarer Konzentration ebenfalls den Calcium-Influx. Der Calcium-Influx wird durch hohe Konzentrationen jedoch nicht abgeschwächt. Es macht den Anschein, dass Divalinal-ANG IV an der ersten Bindungsstelle als Agonist und an der zweiten Bindungsstelle als Antagonist fungiert. ANG IV ist ein Agonist an beiden Bindungsstellen.

Denkbar ist auch, dass die hochaffine Bindungsstelle eine Aktivierung von intrazellulären second messenger Wegen bewirkt, während höhere Konzentrationen mit dem aktiven Zentrum des Enzyms interagieren. In ausgewählten Zellsystemen existieren auch Hinweise auf eine Beteiligung von G-Proteinen.

Beim Vergleich verschiedener Zellsysteme und unterschiedlicher K_D -Werte muss bedacht werden, dass verschiedene Isoformen des AT₄-Rezeptors existieren können²⁰⁴. Möglicherweise sind die Rezeptoren in einer aktiven und in einer nicht aktiven Form vorhanden.

Die eigenen Bindungsdaten verdeutlichen, dass der AT₄-Rezeptor an 3T3-L1 und 3T3-F442A Adipozyten und Präadipozyten der dominante Rezeptor ist. Er wird

mindestens 5-10 fach stärker exprimiert als alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Im Gegensatz zu GLUT 4 ist IRAP in 3T3-L1 Präadipozyten bereits vorhanden¹⁰⁹.

Die Rezeptordichte des AT₄-Rezeptors wurde an Adipozyten verschiedener Zelltypen und unterschiedlicher Differenzierungsstadien untersucht. Dabei zeigte sich kaum ein Unterschied zwischen 3T3-F442A Adipozyten und Präadipozyten. 3T3-F442A Präadipozyten benötigen im Gegensatz zu 3T3-L1 Präadipozyten keine starken Induktoren der Fettzellendifferenzierung. 3T3-L1 Fibroblasten müssen diese Induktionsphase der Fettzellendifferenzierung noch durchlaufen und weisen eine geringere IRAP-Dichte an der Zelloberfläche auf (s. Abbildung 4-10).

Mit Hilfe des Fluoreszenz-Assays wurden Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien auf ihre IRAP-Gesamtaktivität untersucht (s. Abbildung 4-22). Danach wird die IRAP-Expression in einem relativ frühen Stadium der Fettzellendifferenzierung induziert. Möglicherweise reicht dafür bereits ein Zell-Zell-Kontakt aus (s. Abbildung 1-6).

Bei Typ 2 Diabetikern ist IRAP im gleichen Maße wie beim Stoffwechselgesunden vorhanden, aber die Translokation zur Oberfläche ist reduziert. Auch während der Fettzellendifferenzierung wird eher die Translokation als die Expression von IRAP beeinflusst¹⁰⁹. Eine Insulinresistenz scheint also eher mit einem Fehler in der GLUT4/ IRAP Translokation vergesellschaftet zu sein als mit Veränderungen der IRAP-Expression²⁰⁵. Dieser Effekt kann mit dem hier durchgeführten Fluoreszenzassay zur Bestimmung der IRAP-Aktivität der Ganzzelle nicht nachgewiesen werden.

5.2.3 BEDEUTUNG DES AT₄-REZEPTORS

Der Großteil der Angiotensin induzierten Wirkungen wird immer noch dem AT₁-Rezeptor zugewiesen. Gerade bei älteren Untersuchungen waren aktive Metaboliten wie ANG (1-7) und ANG IV noch nicht bekannt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kann ein Abbau von ANG II zu ANG IV stattfinden. Immunoassays zur Bestimmung der Angiotensin-Konzentration unterscheiden kaum zwischen diversen Angiotensin-Peptiden.

Eine Beteiligung des RAS an der Entwicklung des metabolischen Syndroms ist unstrittig. Über die Rolle von ANG IV bzw. von AT₄-Rezeptoren ist bisher wenig bekannt. Bei der Beachtung klinischer und tierexperimenteller Studien fällt auf, dass sowohl AT₁-Rezeptor Antagonisten als auch ANG II die Insulinsensitivität verbessern^{38,41} (Übersicht s. Kapitel 1.1.3). Sowohl die Therapie mit AT₁-Blockern, Omapatrilat und ACE-Inhibitoren wirkt sich eindeutig positiv auf die diabetische Stoffwechsellage aus. Dieser Widerspruch deutet bereits an, dass der antidiabetische Effekt einer RAS-Blockade nicht nur über den AT₁-Rezeptor

vermittelt wird. Eine Interaktion mit anderen Bindungsstellen wäre eine mögliche Erklärung.

Hier bietet die Interaktion der AT₁-Rezeptorantagonisten mit PPAR γ ein gutes Erklärungsmodell¹⁹⁵, kann aber den antidiabetischen Effekt der ACE-Inhibitoren nicht erklären. Möglich ist ein Einfluss der ACE-Inhibitoren auf das Bradykinin-System¹⁹ oder eine Beteiligung des AT₂-Rezeptors. Die eigenen Versuche lassen vermuten, dass die Bildung von ANG III und ANG IV von Bedeutung sein könnte. Unter einer AT₁-Blockade wird das systemische RAAS heraufreguliert und über eine gesteigerte Renin-Aktivität vermehrt ANG I gebildet. Im Falle einer Blutdrucksenkung durch Enalapril als ACE-Inhibitor wird ebenfalls eine Erhöhung der Reninkonzentration (2,8 fach) beobachtet, allerdings wird gleichzeitig die Plasmaangiotensin II Konzentration um 77% reduziert⁷³. Entstandenes ANG I muss also durch alternative Abbauewege metabolisiert werden.

Nach Cassis et al. (2004) finden sich ANG III und IV im Medium inkubierter Adipozyten. *In vitro* sind ACE-Inhibitoren am Fettgewebe größtenteils inaktiv und können die Bildung von Angiotensin-Peptiden nicht verhindern³². Denkbar ist also ein antidiabetischer Effekt im Rahmen einer RAAS-Blockade, die durch eine vermehrte Aktivierung des AT₄-Rezeptors hervorgerufen wird.

Wie bereits im Kapitel 1.3.1.5 erwähnt wurde, beeinflusst ANG IV im Gehirn die Gedächtnisleistung. Als Ursache kommt unter anderem eine positive Beeinflussung der Glukoseaufnahme in Frage. Bei der zentralen Blutdruckregulation reguliert der kombinierte AT_{1/2/4}-Agonist ANG III die Vasopressinausschüttung stärker als ANG II¹³⁰.

Daneben können Angiotensin-Peptide im Gehirn auch die Dopaminausschüttung im Striatum beeinflussen. Stragier et al. (2004) gelang es mittels Mikrodialyse-techniken zu zeigen, dass alleine ANG IV (10-100 μ M) und nicht ANG II die Dopaminsekretion steigert. Die effektiven Konzentrationen von 10-100 μ M passen wiederum zu den eigenen Beobachtungen der IRAP-Hemmung im vergleichbaren Konzentrationsbereich¹³².

Der AT₄-Rezeptor ist eng mit der Glukoseaufnahme verknüpft. Kürzlich wurde die Existenz von IRAP und GLUT 4 im Pankreas bekannt. Da eine physiologisch gesteigerte Glukoseaufnahme an der B-Zelle des Pankreas direkt zu einer gesteigerten Insulinsekretion führen muss, wurde die IRAP-Aktivität im Pankreas bestimmt und mit einer ANG IV vermittelten Insulinsekretion gleichgesetzt (s. Abbildung 4-40 und Abbildung 4-41).

5.3 ANGIOTENSIN-METABOLISMUS IM FETTGEWEBE

5.3.1 METHODENKRITIK

Der *in vitro* Abbau von Angiotensinogen in Gegenwart von Adipozyten wurde mit Hilfe der Kapillarelektrophorese untersucht. Die Nachweisgrenze der CE (und auch der HPLC) reicht nicht bis in den physiologischen nanomolaren Konzentrationsbereich. Die verwendeten Konzentrationen der Angiotensin-Peptide sind mit 100 μM also vergleichsweise hoch. Dieser hochkonzentrierte Ansatz entspricht allerdings den Methodenbeschreibungen hochrangiger Publikationen^{147,156}. Von besonderer Aussagekraft ist dabei die von Schling et al. (2002) verwendete Kombination selektiver HPLC-Methoden millimolarer Versuchsansätze mit weniger selektiven Immunoassays zur Untersuchung physiologischer Konzentrationen.

Die eigenen Versuche offenbaren ein sehr komplexes Bild des Angiotensinogen-Abbaus. Deswegen ist die hohe Trennleistung der Kapillarelektrophorese von großer Bedeutung. Die geringe Robustheit der CE erschwert jedoch die praktische Anwendung. Ein Problem der Analytik bleibt hier die Nachweisgrenze. Es wurde versucht, die Nachweisgrenze durch Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion zu verbessern. Dabei ging gleichzeitig die Trennleistung (und damit der größte Vorteil der CE) verloren. Die eigene Nachweisgrenze (<1 $\mu\text{g/ml}$ ANG II) reicht in diesem Fall sogar an HPLC-Methoden heran. Die besten Ergebnisse wurden mit der einfachsten CE-UV Methode erzielt. Elektrochemische Detektion oder 185 nm-Filter könnten die Nachweisgrenze dabei noch weiter verbessern. CE-MS und CE-RIA Kopplungen oder die direkte Detektion der Radioaktivität markierter Liganden nach einer CE-Trennung sind ebenfalls von Interesse. Aufgrund des kleinen Probenvolumen ist außerdem die Kombination der CE mit *in vivo* Mikrodialysetechniken äußerst reizvoll.

Durch die direkte Injektion des wässrigen Inkubationspuffer ist die direkte Analyse des Zellüberstands möglich ohne die Zellen zu beeinflussen. Dieser Ansatz kommt der physiologischen Situation mit unterschiedlich kompartimentierten Enzymen eine Zelle näher als die Inkubation einer Membranpräparation mit den entsprechenden Peptiden. Zusätzlich resultiert ein sehr sauberes Probenmaterial, welches ohne weitere Aufarbeitung analysiert werden kann. Dafür sind Methodenoptimierungen durch eine Probenaufbereitung nicht möglich.

Wünschenswert wäre, wenn unbekannte Peaks nicht nur durch Zuspiken identifiziert werden. Hier bieten sich massenspektrometrische Verfahren an. CE-MS

Kopplungen sind schwierig. MALDI^{LXVII}-Techniken oder HPLC-MS Kopplungen sind hier vermutlich überlegen.

5.3.2 LITERATURVERGLEICH

BILDUNG VON ANG I (1-10) UND ANG II (1-8)

Untersuchung zur Formierung der Angiotensin-Peptide im Fettgewebe sind eher spärlich. Alleine Schling et al. (2002) beschreiben den Abbau von ANG II (1-8) zu ANG (5-8) über Nephilysin durch Membranpräparationen humaner Adipozyten¹⁵⁶. Ansonsten existieren nur indirekte Hinweise auf Bildung und Abbau der Angiotensin-Peptide.

Wie erwähnt, ist die Renin-mRNA im Fettgewebe niedrig. Pepstatin als Inhibitor saurer Proteasen hatte keinen Einfluss auf die Bildung von ANG I an 3T3-F442A Adipozyten, die Formierung von ANG II (1-8) erfolgt ACE-unabhängig¹⁸⁸. Anstatt Renin könnten Cathepsin D/E beteiligt sein¹²⁸. Die eigenen Versuche ergeben keine Hinweise auf eine spezifische Bildung von ANG I (1-10) (s. Abbildung 4-24). Möglicherweise ist für die ANG I Bildung das Zusammenspiel verschiedener Gewebe und die Infiltration von Monozyten mitentscheidend²⁰⁶.

Die ACE-abhängige Bildung von ANG II (1-8) im Fettgewebe ist ebenfalls umstritten. Engeli (1999) und Gorzelniak (2002) beschreiben ACE-mRNA und α -Chymase-mRNA in humanen Präadipozyten und Adipozyten^{145,159}, zu ACE-2 existieren keinerlei Aussagen. EDTA und Proteaseinhibitoren können den membrangebundenen Abbau von AGT an 3T3-F442A Adipozyten nicht verhindern¹⁸⁸. Die eigenen Versuche bestätigen, dass der Abbau großteils membrangebunden stattfindet (s. Abbildung 4-25).

Die eigenen Versuche offenbaren zusätzlich einen eher geringen Einfluss von ACE-Inhibitoren auf den Abbau von ANG I (1-10). Denkbar ist, dass ACE-1 weniger an der Bildung von ANG II sondern vielmehr am Abbau von ANG (1-7) zu ANG (1-5) beteiligt ist. ACE-Inhibitoren sind in den meisten *in vitro* Assays der Fettzellendifferenzierung inaktiv^{19,32}. ANG II (1-8) ist im Medium von Primärkulturen humaner Präadipozyten und Adipozyten vorhanden, die Konzentration wird über Nephilysin kontrolliert¹⁵⁶.

BILDUNG VON ANG III (2-8) UND ANG IV (3-8)

Daneben wurden auch ANG III und ANG IV im Zellkulturmedium nachgewiesen, machen aber weniger als 2 % der Gesamtkonzentration an Angiotensin-Peptiden in der Umgebung isolierter Adipozyten aus³². Schling et al. (2002) fanden dagegen

^{LXVII} MALDI = Matrix assisted Laser desorbed ionisation

keine Hinweise auf ANG III. Die eigenen Versuche verdeutlichen, dass ANG III und ANG IV schneller abgebaut als gebildet werden und damit nicht akkumulieren können (s. Abbildung 4-36 bis Abbildung 4-39).

Über die Nephrylysin-Aktivität können aus den eigenen Versuchen wenig Aussagen abgeleitet werden. Die Methode ist nicht auf die Detektion der Nephrylysin-Metabolite ausgelegt, alleine die Comigration von ANG (1-7) und ANG (5-8) machen Aussagen über die Nephrylysin-Aktivität schwierig (s. Abbildung 3-12).

In Abbildung 4-38 und Abbildung 4-39 wird gezeigt, dass zumindest an 3T3-L1 Adipozyten ein aminoterminaler Abbau von ANG II (1-8) über ANG III (2-8) zu ANG IV (3-8) und weiter zu ANG (4-8) stattfinden kann. Entsprechende Abbauwege wurden am Fettgewebe bisher nicht untersucht, sind aber im Gehirn und an der Niere bereits gut beschrieben^{132,207} (Übersicht siehe Abbildung 1-20).

Die Peptidaseinhibitoren Bestatin und Amastatin inhibieren zumindest teilweise den Abbau von ANG III zu ANG IV, gleichzeitig findet unter einer Enzyminhibition eine vermehrte Bildung von ANG (2-7) statt²⁰⁷. Solche Escape-Mechanismen könnten bei der Beurteilung des antidiabetischen Effekts von ACE-Inhibitoren eine Rolle spielen. Im Gehirn ist der aminoterminaler Abbau vermutlich der Hauptabbauweg¹³⁰. ANG III wird im Gehirn wesentlich schneller abgebaut als ANG II²⁰⁸.

BILDUNG UND FUNKTION VON ANG (1-7)

ANG (1-7) ist nach den eigenen Beobachtungen Hauptmetabolit des ANG I (1-10)-Abbaus. Mas-Rezeptoren konnten nicht nachgewiesen werden, allerdings kann ANG (1-7) den AT₂-Rezeptor aktivieren. Zusätzlich wird aus ANG (1-7) unter anderem ANG (3-7) als AT₄-Agonist geringerer Affinität gebildet¹⁴⁰. Dies könnte *in vitro* vergleichbare Effekte von ANG (1-7) und ANG IV (3-8) erklären.

Die Akkumulation von ANG (1-7) wurde durch einen vergleichsweise langsamen Abbau erklärt (s. Abbildung 4-33). An der Niere findet sich ein ähnliches Bild: ANG IV wird hier mit einer Halbwertszeit von 8 Sekunden umgesetzt, ANG II mit 48 Sekunden und ANG (1-7) mit 101 Sekunden deutlich langsamer¹⁴⁰.

Wahrscheinlich ist also, dass in Adipozyten gebildetes ANG (1-7) weniger von parakriner Bedeutung ist, sondern über den Mas-Rezeptor systemische Effekte erzielt bzw. vor allem Rezeptoren benachbarter Gewebe aktiviert.

Es ist bekannt, dass ANG (1-7) im Gefäßendothel gebildet wird und dort vasodilatatorisch wirkt (NO-Liberation). ANG (1-7) aus dem Fettgewebe könnte in gleicher Weise auf das Gefäßendothel wirken und über eine Prostaglandin- und NO-Sekretion aus dem Gefäßendothel indirekt den Fettzellstoffwechsel beeinflussen¹⁷ (s. Abbildung 5-4).

Das Fettgewebe wird durch eine Vielzahl kleiner Gefäße mit Substraten versorgt. Bei Adipositas liegt eine Hypertrophie des Fettgewebes ohne entsprechende Vaskularisierung zugrunde. Es kann eine Unterversorgung des Fettgewebes resultieren. Im Fettgewebe gebildetes ANG (1-7)

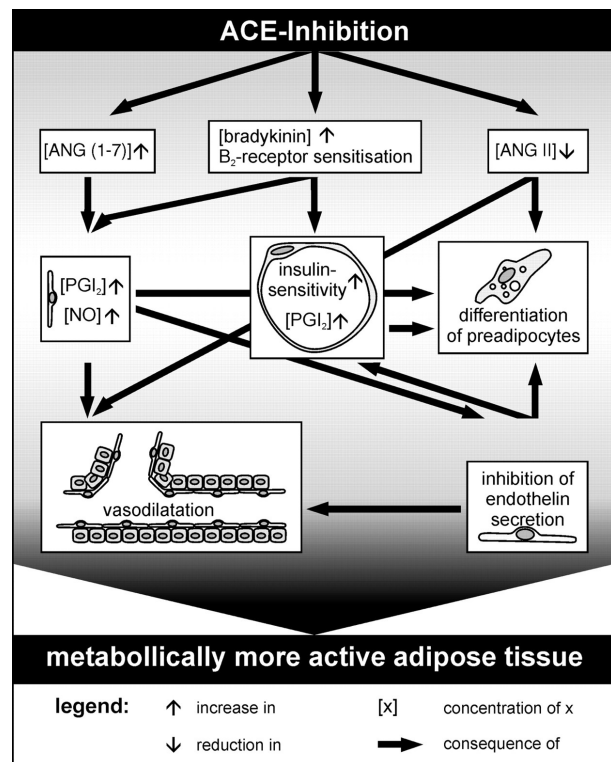
würde also durch eine Vasodilatation der versorgenden Gefäße den Substrattransport zum Zielgewebe wieder herstellen.

Unter einer ACE-Inhibition sind die ANG (1-7)-Plasmaspiegel erhöht, obwohl eine ACE-abhängige Bildung von ANG (1-7) beschrieben ist (s. Abbildung 1-21). Möglicherweise ist eine Inhibierung des ACE-abhängigen Abbaus von ANG (1-7) zu ANG (1-5) entscheidend.

Diese ANG (1-7) vermittelten indirekten Effekte der ACE-Inhibitoren auf die Insulinsensitivität wären in den meisten *in vitro* Untersuchungen nicht nachzuweisen. Sie bieten aber interessante Erklärungsansätze und würden die antidiabetischen Effekte von ACE-Inhibitoren und AT₁-Antagonisten gleichermaßen erklären. Unter einer AT₁-Blockade findet eine kompensatorische Aktivierung des systemischen RAAS statt. Daraus resultiert unter anderem eine vermehrte Bildung von ANG (1-7), wie sie unter ACE-Inhibitoren ebenfalls beschrieben wird.

Das Fettgewebe gilt neben der Leber vor allem bei adipösen Patienten als der wichtigste Produzent von AGT. Ein ähnlicher Stellenwert des Fettgewebes lässt sich also auch für ANG (1-7) vermuten.

Abbildung 5-4: Zusammenspiel von Endothel und Fettgewebe unter einer ACE-Inhibition^{LXVIII}



^{LXVIII} Abbildung aus Schling, Löffler (2002)

6 ZUSAMMENFASSUNG

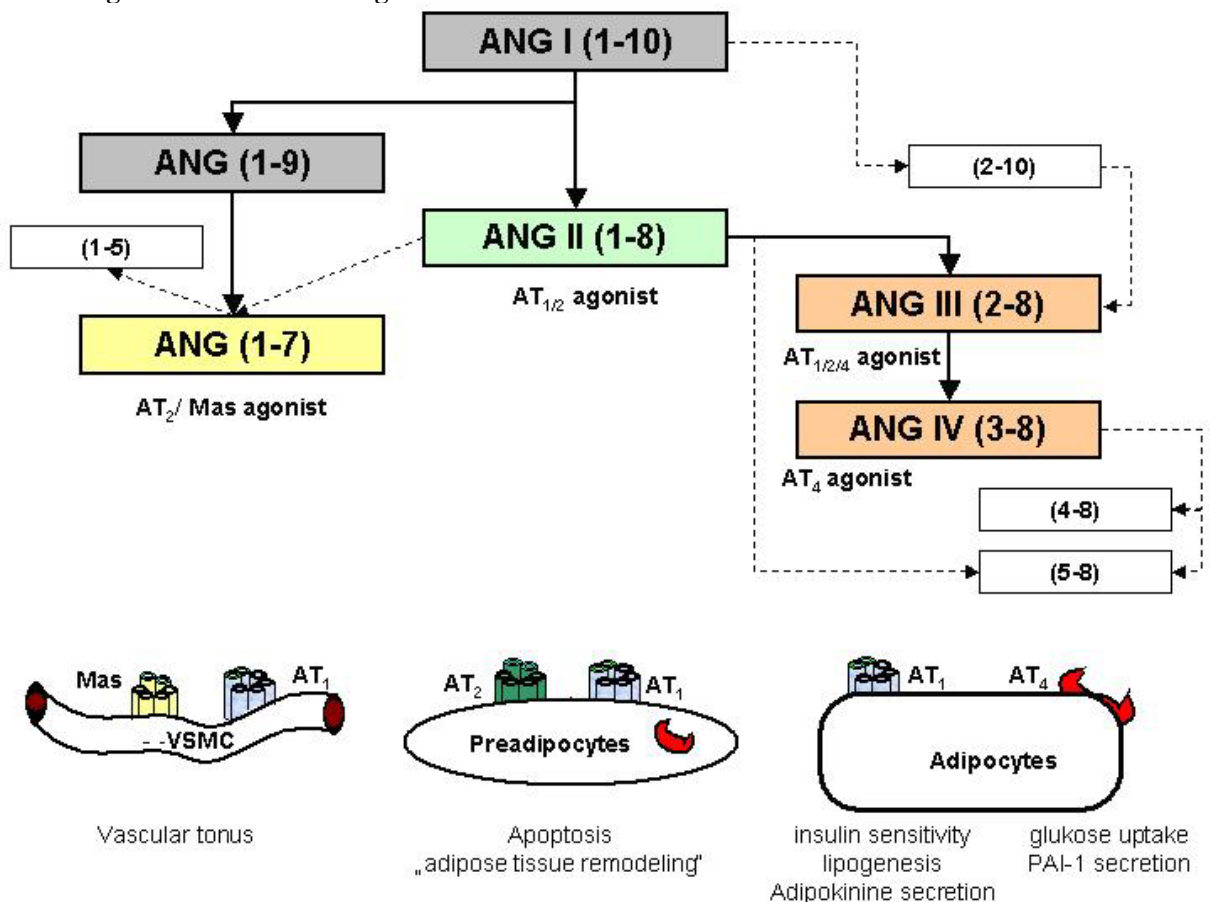
6.1 ERGEBNISSE

Es werden die wichtigsten Ergebnisse kurz zusammengefasst. Abbildung 6-1 zeigt eine Übersicht der nachgewiesenen Peptide und Rezeptoren.

- Präadipozyten verfügen über AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren mit geringer Rezeptordichte. Beide Subtypen sind in etwa gleich stark in Präadipozyten vertreten. An 3T3-L1 Adipozyten ist der AT_1 -Rezeptor dominant.
- AT_2 -Rezeptoren wurden in Präadipozyten erstmals mit nanomolarer Affinität beschrieben. Zu hohe Konzentrationen AT_2 -selektiver Liganden führen zur Kreuzreaktion mit dem AT_1 -Rezeptor.
- Mas-Rezeptoren waren weder in Präadipozyten noch in Adipozyten nachweisbar.
- Adipozyten und Präadipozyten besitzen eine weitere Bindungsstelle (K_D ca. 500 nM). Es handelt sich vermutlich nicht um den AT_4 -Rezeptor, möglicherweise ist $PPAR\gamma$ beteiligt. Assays, die Konzentrationen von $>1 \mu M$ ANG II verwenden, werden also durch mehrere Bindungsstellen beeinflusst.
- Der dominante Rezeptor in Adipozyten und Präadipozyten ist der AT_4 -Rezeptor. Er wird wesentlich stärker exprimiert als alle anderen AT-Rezeptoren.
- Die Bindung von ANG IV ist mit ca. 500 nM bis 1 μM relativ niedrig affin. Diese Bindungsaffinität wurde durch das Assay der Aminopeptidase-Aktivität einwandfrei bestätigt.
- Das Assay zeigt, dass neben ANG IV weitere Peptide des Angiotensin-Systems aktiv sind, vor allem ANG III (2-8).
- Es gibt wiederholt Hinweise auf eine Beeinflussung der Bindung durch Cofaktoren, dies gilt für die agonistischen Liganden ANG II, ANG III, ANG IV und CGP42112A.
- Vor allem ANG III weist einen biphasischen Kurvenverlauf im Fluoreszenzassay auf. Der Hintergrund bleibt unklar. An Adipozyten ist die Existenz hoch- und niederaffiner AT_4 -Bindungsstellen wahrscheinlich.
- Auch Nle1-ANG IV bedient zwei Bindungsstellen und ist als peptidasestabiler Ligand ein potentieller Kandidat für *in vivo* Untersuchungen zur Charakterisierung des antidiabetischen Potentials von AT_4 -Agonisten.

- Eine Hemmung der IRAP-Aktivität im Fettgewebe durch ANG IV fördert die Glukoseaufnahme. Durch eine IRAP-Hemmung an der B-Zelle des Pankreas wird die Insulinsekretion stimuliert.
- Das Fettgewebe ist nicht nur Zielgewebe von Angiotensin-Peptiden, sondern ist aktiv am Metabolismus von Angiotensin beteiligt. Insgesamt ist der Abbaumechanismus sehr komplex.
- Die Reninaktivität im Fettgewebe ist gering, ACE-Hemmer sind *in vitro* nahezu unwirksam.
- ANG (1-7) ist das Hauptabbaupeptid bei Belastung des Fettgewebes mit ANG I als Präkursor. Es entsteht über ANG (1-9), ob ACE-1 und ACE-2 beteiligt sind, bleibt unklar.
- ANG III und IV werden aus ANG II gebildet. Diverse Aminopeptidasen könnten entscheidend beteiligt sein.
- ANG III und IV werden wesentlich schneller abgebaut als alle anderen Peptide. Vermutlich wird ihre Konzentration im Fettgewebe streng reguliert.

Abbildung 6-1: Zusammenfassung



6.2 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die im Rahmen dieser Dissertation aufgezeigten Ergebnisse bieten wichtige Anhaltspunkte zur Charakterisierung des Angiotensin-Systems im Fettgewebe. Es wurden Ursachen des metabolischen Syndroms abgeleitet und bisher unbekannte Therapieoptionen aufgezeigt.

Es ergeben sich die folgenden Schlussfolgerungen und Arbeitshypothesen:

- Das parakrine Angiotensin-System des Fettgewebes unterscheidet sich deutlich vom systemischen RAAS.
- Für Präadipozyten ist ein enges ERK vermitteltes Zusammenspiel von AT₁- und AT₂-Rezeptoren im Rahmen des „adipose tissue remodeling“ sehr wahrscheinlich.
- Neben den bereits bekannten AT_{1/2/4}-Rezeptoren existiert eine weitere Bindungsstelle für ANG II. Denkbar ist eine direkte oder indirekte Interaktion mit PPAR_γ. Die niedriger affine Bindungsstelle ist *in vitro* und *in vivo* relevant.
- Die Expression von IRAP wird in einer relativ frühen Phase der Präadipozyten-differenzierung reguliert. Postkonfluente Präadipozyten und Adipozyten unterscheiden sich dagegen kaum in ihrer IRAP-Konzentration.
- Der ANG I (1-10) Hauptmetabolit ANG (1-7) beeinflusst über AT₂-Rezeptoren das Zellwachstum von Präadipozyten und dilatiert über Mas-Rezeptoren Gefäßmuskelzellen.
- ANG II (1-8) kann als Gegenspieler von ANG (1-7) Gefäßmuskelzellen kontrahieren. An Präadipozyten werden AT₁- und AT₂-Rezeptoren aktiviert und an Adipozyten wird über AT₁-Rezeptoren deren Lipogenese beeinflusst.
- ANG III (2-8) kann ähnliche Effekte hervorrufen wie ANG II (1-8) und aktiviert zusätzlich den AT₄-Rezeptor, wird aber sehr schnell weiter abgebaut.
- ANG IV (3-8) fördert parakrin die Glukoseaufnahme der Fettzelle. Systemische Effekte auf die B-Zelle des Pankreas sind ebenfalls möglich.
- Die Konzentration von ANG IV (3-8) wird im Fettgewebe streng kontrolliert.
- AT₄-Agonisten fördern die Insulinsekretion und verbessern die Glukoseaufnahme des Fettgewebes als wichtigstes Zielgewebe des Insulins. Der AT₄-Rezeptor vermittelt hochinteressante antidiabetische Effekte.
- AT₄-Agonisten kommen als Zielstruktur für neue Antidiabetika in Frage. Direkte kardiovaskuläre Nebenwirkungen sind aufgrund der hohen Selektivität gegenüber dem AT₁-Rezeptor nicht zu erwarten.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Ursachen der Adipositas-assoziierten Hypertonie	2
Abbildung 1-2: Das Fettgewebe als Bindeglied des metabolischen Syndroms	4
Abbildung 1-3: Adipose tissue remodeling	5
Abbildung 1-4: Angiotensin vermittelte Hemmung der Adipozytenrekrutierung	6
Abbildung 1-5: Diabetesmanifestierung unter einer RAS-Blockade	8
Abbildung 1-6: Entwicklungsstadien und wichtigste Marker während der Adipozytendifferenzierung	15
Abbildung 1-7: Beteiligung von PPAR γ und C/EBP α an der Fettzellendifferenzierung	16
Abbildung 1-8: Einfluss der PPAR γ Agonisten auf die Insulinwirkung	18
Abbildung 1-9: Einfluss von Ernährung und PPAR γ auf die Insulinresistenz	19
Abbildung 1-10: second messenger Wege der Fettzellendifferenzierung	19
Abbildung 1-11: Aufbau des RAA-Systems, zentrale Baroregulation über das adrenerge System	21
Abbildung 1-12: Intrarenale und extrarenale Baro- und Osmoregulation	21
Abbildung 1-13: Verbreitung und Funktion der AT $_1$ - und AT $_2$ -Rezeptoren	23
Abbildung 1-14: Second messenger Wege des AT $_1$ -Rezeptors	24
Abbildung 1-15: Beteiligung des AT $_2$ -Rezeptors am Zellwachstum	25
Abbildung 1-16: AT $_2$ -Postrezeptorkopplung	26
Abbildung 1-17: Heterodimerisierung von AT $_1$ - und AT $_2$ -Rezeptoren	27
Abbildung 1-18: Bildung und Abbau von ANG II und verwandten Peptiden mit intrinsischer Aktivität	32
Abbildung 1-19: ACE-abhängige und unabhängige Abbauwege von ANG I (1-10)	33
Abbildung 1-20: Entstehung von ANG IV	34
Abbildung 1-21: Entstehung von ANG (1-7)	36
Abbildung 1-22: Untersuchungen zu Angiotensin-Rezeptoren an Adipozyten und Präadipozyten	42
Abbildung 3-1: 3T3-L1 Fettzellendifferenzierung, Modulation durch Adipokinine	56
Abbildung 3-2: 3T3-L1 Präadipozyten im Lichtmikroskop	60
Abbildung 3-3: Ölrot Färbung von 3T3-L1 Adipozyten, 10 Tage nach Induktion der Differenzierung	60
Abbildung 3-4: Umsatz von Leucyl- β -Naphthylamid zu Amino-Naphthalin	64
Abbildung 3-5: Kapillarelektrophoretisches Trennprinzip	67
Abbildung 3-6: CE-Bedingungen, Methode A	69
Abbildung 3-7: Trennung in Gegenwart von Kupfer-Ionen bei alkalischem pH	69
Abbildung 3-8: Beispielelektropherogramm (Methode A)	70
Abbildung 3-9: UV-Detektion der Angiotensin-Peptide nach Biuret-Reaktion	70
Abbildung 3-10: CE-Bedingungen, Methode B	71
Abbildung 3-11: Trennung der Angiotensin-Peptide aus wässrigem Probenpuffer	71
Abbildung 3-12: Trennung der Angiotensin-Peptide 10 μ M aus HEPES-Puffer (1:10 Verdünnung)	72
Abbildung 4-1: Vorversuche mit 125 I-ANG II (1-8) an Präadipozyten	74
Abbildung 4-2: Verdrängung von 125 I-ANG II (1-8) an 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten	75

Abbildung 4-3: Verdrängung von ¹²⁵ I-SARILE an 3T3-L1 Präadipozyten und 3T3-F442A Adipozyten	77
Abbildung 4-4: Gesamtbindung und spezifische Bindung von CGP42112A an Präadipozyten	79
Abbildung 4-5: Verdrängung von ¹²⁵ I-CGP42112A an 3T3-L1 Präadipozyten	80
Abbildung 4-6: Steady state Bindung von ¹²⁵ I-D-Pro7-ANG (1-7)	81
Abbildung 4-7: Verdrängung von ¹²⁵ I-D-Pro7-Angiotensin (1-7)	81
Abbildung 4-8: steady state Bindung mit ¹²⁵ I-ANG IV (3-8)	82
Abbildung 4-9: Verdrängungsversuche mit ¹²⁵ I-ANG IV (3-8)	83
Abbildung 4-10: Spezifische Bindung von ¹²⁵ I-ANG IV an unterschiedlichen Zellsystemen	84
Abbildung 4-11: Sättigungsexperimente mit ¹²⁵ I-SARILE an 3T3-L1 Präadipozyten	85
Abbildung 4-12: Spezifische Bindung von ¹²⁵ I-SARILE an Präadipozyten	86
Abbildung 4-13: Spezifische Bindung von ¹²⁵ I-SARILE an 3T3-F442A Adipozyten	87
Abbildung 4-14: Gesamtbindung von ¹²⁵ I-SARILE an 3T3-F442A Adipozyten	87
Abbildung 4-15 Vorversuche zur Bestimmung der IRAP-Aktivität	88
Abbildung 4-16: IC ₅₀ -Werte der Angiotensin-Peptide im katalytischen IRAP-Assay	89
Abbildung 4-17 Inhibition der Aminopeptidase-Aktivität durch Angiotensin-Peptide	89
Abbildung 4-18: Regression der Messwerte von ANG III (2-8) mit mehreren Bindestellen	90
Abbildung 4-19 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	91
Abbildung 4-20: Nie1-ANG IV (3-8)	92
Abbildung 4-21: IRAP-Aktivität in Gegenwart von Zink-Ionen	92
Abbildung 4-22: IRAP-Aktivität bei unterschiedlichen Differenzierungsstadien (n = 4 + SEM)	93
Abbildung 4-23: ANG IV stimulierte [³ H]2-Desoxyglukoseaufnahme in Adipozyten (n = 8 + SEM)	94
Abbildung 4-24: AGT (1-14)-Abbau durch 3T3-F442A Adipozyten (Methode A)	95
Abbildung 4-25: Abbau von ANG I (1-10) mit/ohne Zellkontakt	96
Abbildung 4-26: Abbau von ANG I (1-10) durch lösliche Enzyme	96
Abbildung 4-27: Abbau von ANG I (1-10) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten	97
Abbildung 4-28: Abbau von ANG I (1-10) zu ANG (1-9) und ANG (1-7)	98
Abbildung 4-29: Abbau von ANG I (1-10) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten	99
Abbildung 4-30: Abbau von ANG I (1-9) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten	99
Abbildung 4-31: Abbau von ANG I (1-9) zu ANG II (1-8) und ANG (1-7)	100
Abbildung 4-32: Abbau von ANG I (1-8) zu ANG (1-7) und ANG (2-8)	101
Abbildung 4-33: Abbau von ANG (1-7)	101
Abbildung 4-34: Abbau von ANG II (1-8) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten	102
Abbildung 4-35: Abbau von ANG (1-7).100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten	102
Abbildung 4-36: Abbau von ANG III (2-8)	103
Abbildung 4-37: Abbau von ANG IV (3-8)	103
Abbildung 4-38: Abbau von ANG III (2-8) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten	104
Abbildung 4-39: Abbau von ANG IV (3-8) 100 µM durch 3T3-L1 Adipozyten	104
Abbildung 4-40: IRAP-Aktivität in INS-1 Zellen	105
Abbildung 4-41: ANG IV vermittelte Insulinsekretion	106

Abbildung 5-1: Rezeptorbindungsstudien an ganzen Zellen	108
Abbildung 5-2: ANG II vermittelte Sekretion von PAI-1 in Adipozyten	114
Abbildung 5-3: Vergleich von Rezeptorbindung und Enzyminhibition am AT ₄ -Rezeptor	116
Abbildung 5-4: Zusammenspiel von Endothel und Fettgewebe unter einer ACE-Inhibition	123
Abbildung 6-1: Zusammenfassung	125

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Parati G. Obesity, hypertension and the sympathetic nervous system. *J Hypertens.* 2002;20:835-7.
2. Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Galuska DA, Dietz WH. Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990 through 2000. *Jama.* 2002;288:1758-61.
3. Sharma AM, Chetty VT. Obesity, hypertension and insulin resistance. *Acta Diabetologica.* 2005;42:3-8.
4. Meigs JB. Epidemiology of the insulin resistance syndrome. *Curr Diab Rep.* 2003;3:73-9.
5. Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *PNAS.* 2003;100:14211-14216.
6. Sharma AM. Is There a Rationale for Angiotensin Blockade in the Management of Obesity Hypertension? *Hypertension.* 2004;44:12-19.
7. Wellner M, Herse F, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Bechart D, Lasalle P, Luft FC, Sharma AM. Endothelial cell specific molecule-1--a newly identified protein in adipocytes. *Horm Metab Res.* 2003;35:217-21.
8. Hall JE. The Kidney, Hypertension, and Obesity. *Hypertension.* 2003;41:625-633.
9. Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM. Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension.* 2005;45:356-362.
10. Raji A, Seely EW, Bekins SA, Williams GH, Simonson DC. Rosiglitazone improves insulin sensitivity and lowers blood pressure in hypertensive patients. *Diabetes Care.* 2003;26:172-8.
11. EMEA. Scientific Discussion. *European Public Assessment Report.* 2005.
12. Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs.* 2004;64:2537-65.
13. Prisant LM. Preventing type II diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol.* 2004;44:406-13.
14. Brown NJ, Kumar S, Painter CA, Vaughan DE. ACE inhibition versus angiotensin type 1 receptor antagonism: differential effects on PAI-1 over time. *Hypertension.* 2002;40:859-65.
15. Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:170-4.
16. Garg A, Fleckenstein JL, Peshock RM, Grundy SM. Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:358-61.
17. Schling P, Loffler G. Cross talk between adipose tissue cells: impact on pathophysiology. *News Physiol Sci.* 2002;17:99-104.
18. Ailhaud G. Cross talk between adipocytes and their precursors: relationships with adipose tissue development and blood pressure. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;892:127-33.
19. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes.* 2002;51:1699-707.
20. Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension.* 2002;40:609-11.
21. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G, Teboul M. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology.* 2001;142:5220-5.
22. Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, Yasue S, Tomita T, Okazawa K, Fujikura J, Chusho H, Ebihara K, Hayashi T, Hosoda K, Nakao K. An angiotensin II AT1 receptor antagonist,

- telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 2004;576:492-7.
23. Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M, Guerre-Millo M, Moustaid-Moussa N, Ferre P, Quignard-Boulange A. Deletion of the Angiotensin Type 2 Receptor (AT2R) Reduces Adipose Cell Size and Protects From Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes.* 2005;54:991-999.
 24. Horiuchi M, Lehtonen JYA, Daviet L. Signaling Mechanism of the AT2 Angiotensin II Receptor: Crosstalk between AT1 and AT2 Receptors in Cell Growth. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 1999;10:391-396.
 25. Harte A, McTernan P, Chetty R, Coppack S, Katz J, Smith S, Kumar S. Insulin-Mediated Upregulation of the Renin Angiotensin System in Human Subcutaneous Adipocytes Is Reduced by Rosiglitazone. *Circulation.* 2005;111:1954-1961.
 26. Sugawara A, Takeuchi K, Urano A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, Sato K, Taniyama Y, Ito S. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 2001;142:3125-34.
 27. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;102:1834-9.
 28. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension.* 2004;43:993-1002.
 29. Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, Clemenz M, Krikov M, Thone-Reineke C, Unger T, Kintscher U. PPAR{gamma}-Activating Angiotensin Type-1 Receptor Blockers Induce Adiponectin. *Hypertension.* 2005;01.HYP.0000168046.19884.6a.
 30. Crandall DL, Armellino DC, Busler DE, McHendry-Rinde B, Kral JG. Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology.* 1999;140:154-8.
 31. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology.* 1997;138:1512-9.
 32. Cassis LA, English VL, Bharadwaj K, Boustany CM. Differential Effects of Local Versus Systemic Angiotensin II in the Regulation of Leptin Release from Adipocytes. *Endocrinology.* 2004;145:169-174.
 33. Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, Cooper ME. Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *J Hypertens.* 2005;23:463-73.
 34. Katovich MJ, Pachori A. Effects of inhibition of the renin-angiotensin system on the cardiovascular actions of insulin. *Diabetes Obes Metab.* 2000;2:3-14.
 35. Hussam A. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin Receptor Blockers for Prevention of Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Cardiology.* 2005;46.
 36. Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonist reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension.* 2001;38:884-90.
 37. Hsieh P-S, Tai Y-H, Loh C-H, Shih K-C, Cheng W-T, Chu C-H. Functional interaction of AT1 and AT2 receptors in fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Metabolism.* 2005;54:157-164.
 38. Juan C-C, Chien Y, Wu L-Y, Yang W-M, Chang C-L, Lai Y-H, Ho P-H, Kwok CF, Ho L-T. Angiotensin II Enhances Insulin Sensitivity in Vitro and in Vivo. *Endocrinology.* 2005;2004-1136.
 39. Kouyama R, Suganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyoda T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, Ogawa Y. Attenuation of Diet-Induced Weight Gain and Adiposity through Increased Energy Expenditure in Mice Lacking Angiotensin II Type 1a Receptor. *Endocrinology.* 2005;146:3481-3489.

40. Wang C-H, Leung N, Lapointe N, Szeto L, Uffelmann KD, Giacca A, Rouleau JL, Lewis GF. Vasopeptidase Inhibitor Omapatrilat Induces Profound Insulin Sensitization and Increases Myocardial Glucose Uptake in Zucker Fatty Rats: Studies Comparing a Vasopeptidase Inhibitor, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, and Angiotensin II Type I Receptor Blocker. *Circulation*. 2003;107:1923-1929.
41. Fliser D, Arnold U, Kohl B, Hartung R, Ritz E. Angiotensin II enhances insulin sensitivity in healthy volunteers under euglycemic conditions. *J Hypertens*. 1993;11:983-8.
42. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Jama*. 2002;288:2981-97.
43. Wing LMH, Reid CM, Ryan P, Beilin LJ, Brown MA, Jennings GLR, Johnston CI, McNeil JJ, Macdonald GJ, Marley JE, Morgan TO, West MJ, the Second Australian National Blood Pressure Study Group. A Comparison of Outcomes with Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitors and Diuretics for Hypertension in the Elderly. *N Engl J Med*. 2003;348:583-592.
44. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, de Faire U, Morlin C, Karlberg BE, Wester PO, Bjorck JE. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*. 1999;353:611-6.
45. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000;342:145-53.
46. Laakso M, Karjalainen L, Lempiainen-Kuosa P. Effects of losartan on insulin sensitivity in hypertensive subjects. *Hypertension*. 1996;28:392-6.
47. Lindholm LH, Ibsen H, Borch-Johnsen K, Olsen MH, Wachtell K, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman JM, Snapinn S. Risk of new-onset diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study. *J Hypertens*. 2002;20:1879-86.
48. Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens*. 2003;21:875-86.
49. Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *The Lancet*. 2004;363:2022-2031.
50. Yusuf S, Ostergren JB, Gerstein HC, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Olofsson B, Probstfield J, McMurray JV, on behalf of the Candesartan in Heart Failure--Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program (CHARM) Investigators. Effects of Candesartan on the Development of a New Diagnosis of Diabetes Mellitus in Patients With Heart Failure. *Circulation*. 2005;112:48-53.
51. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548-56.
52. Gorzelniak. Untersuchungen zur quantitativen Genexpression in Primärkulturen humaner Adipozyten am Beispiel ausgewählter Gene des Renin-Angiotensin-Systems. *Dissertation*. 2002.
53. Löffler. Biochemie und Molekularbiologie des Fettgewebes. *Biochemie und Pathobiochemie, 7.Auflage*.
54. Company ETBE. Kit #992 Differentiation of Fat cells. 2002.
55. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. *Annual Review of Biochemistry*. 1995;64:345-373.

56. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:18464-71.
57. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 1999;3:151-8.
58. Staiger H, Haring HU, Loffler G. Serum-free differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is characterized by only transient expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296:125-8.
59. Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 1997;100:3149-53.
60. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999;4:611-7.
61. Furnsinn C, Waldhausl W. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia.* 2002;45:1211-23.
62. Kemnitz JW, Elson DF, Roecker EB, Baum ST, Bergman RN, Meglasson MD. Pioglitazone increases insulin sensitivity, reduces blood glucose, insulin, and lipid levels, and lowers blood pressure, in obese, insulin-resistant rhesus monkeys. *Diabetes.* 1994;43:204-11.
63. Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Sato K, Kudo M, Taniyama Y, Ito S. Differential effects among thiazolidinediones on the transcription of thromboxane receptor and angiotensin II type 1 receptor genes. *Hypertens Res.* 2001;24:229-33.
64. Fukuda N, Hu WY, Teng J, Chikara S, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K. Troglitazone inhibits growth and improves insulin signaling by suppression of angiotensin II action in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Atherosclerosis.* 2002;163:229-39.
65. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, Kahn CR. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest.* 2003;112:608-18.
66. Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:5793-6.
67. Verspohl EJ, Weiland F. [Against insulin resistance. Insulin sensitizers]. *Pharm Unserer Zeit.* 2002;31:280-92.
68. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation.* 2004;109:2054-7.
69. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Maintenance of the Characteristics of Mature 3T3-L1 Adipocytes *Diabetes.* 2002;51:2045-2055.
70. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem.* 2001;276:41245-54.
71. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The Mechanisms by Which Both Heterozygous Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPARgamma) Deficiency and PPARgamma Agonist Improve Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* 2001;276:41245-41254.

72. Schmidt W, Poll-Jordan G, Loffler G. Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J Biol Chem*. 1990;265:15489-95.
73. Goldberg MR, Bradstreet TE, McWilliams EJ, Tanaka WK, Lipert S, Bjornsson TD, Waldman SA, Osborne B, Pivadori L, Lewis G, Blum R, Herman T, Abraham PA, Halstenson CN, Lo M-W, Lu H, Spector R. Biochemical Effects of Losartan, a Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonist, on the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Hypertensive Patients. *Hypertension*. 1995;25:37-46.
74. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FAO, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence That the Angiotensin IV (AT4) Receptor Is the Enzyme Insulin-regulated Aminopeptidase. *J. Biol. Chem*. 2001;276:48623-48626.
75. Nickenig G, Harrison DG. The AT1-Type Angiotensin Receptor in Oxidative Stress and Atherogenesis: Part II: AT1 Receptor Regulation. *Circulation*. 2002;105:530-536.
76. Nickenig G, Harrison DG. The AT1-Type Angiotensin Receptor in Oxidative Stress and Atherogenesis: Part I: Oxidative Stress and Atherogenesis. *Circulation*. 2002;105:393-396.
77. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52:415-472.
78. Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26:544-9.
79. Inagami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10 Suppl 11:S2-7.
80. McMullen JR, Gibson KJ, Lumbers ER, Burrell JH. 125I[Sar1Ile8] Angiotensin II has a different affinity for AT1 and AT2 receptor subtypes in ovine tissues. *Regulatory Peptides*. 2002;105:83-92.
81. Thomas WG, Mendelsohn FA. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:774-9.
82. Thomas WG, Qian H, Smith NJ. What's new in the renin-angiotensin system? Uncoupled AT1 receptor-stimulated signalling on its head. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004;61:2687-2694.
83. Liakos P, Bourmeyster N, Defaye G, Chambaz EM, Bottari SP. ANG II AT1 and AT2 receptors both inhibit bFGF-induced proliferation of bovine adrenocortical cells. *Am J Physiol*. 1997;273:C1324-34.
84. Hines J, Heerding JN, Fluharty SJ, Yee DK. Identification of angiotensin II type 2 (AT2) receptor domains mediating high-affinity CGP 42112A binding and receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298:665-73.
85. Hansen JL, Servant G, Baranski TJ, Fujita T, Iiri T, Sheikh SP. Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circ Res*. 2000;87:753-9.
86. Widdop RE, Matrougui K, Levy BI, Henrion D. AT2 receptor-mediated relaxation is preserved after long-term AT1 receptor blockade. *Hypertension*. 2002;40:516-20.
87. Duke LM, Eppel GA, Widdop RE, Evans RG. Disparate roles of AT2 receptors in the renal cortical and medullary circulations of anesthetized rabbits. *Hypertension*. 2003;42:200-5.
88. Guy Servent ea. Photoaffinity Labeling of Subtype 2 Angiotensin Receptor of Human Myometrium. *Molecular Pharmacology*. 1993;43:677-683.
89. Li W, Ye Y, Fu B, Wang J, Yu L, Ichiki T, Inagami T, Ichikawa I, Chen X. Genetic deletion of AT2 receptor antagonizes angiotensin II-induced apoptosis in fibroblasts of the mouse embryo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:72-6.
90. Schling P. Expression of angiotensin II receptors type 1 and type 2 in human preadipose cells during differentiation. *Horm Metab Res*. 2002;34:709-15.
91. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*. 2001;276:39721-6.

92. AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*. 2000;407:94-8.
93. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001;7:1003-9.
94. Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 1998;32:496-502.
95. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000;91:45-62.
96. Santos RA, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simoes e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SV, Leite MF, Lemos VS, Silva DM, Guerra MT, Khosla MC. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2003;41:737-43.
97. Neves LA, Santos RA, Khosla MC, Milsted A. Angiotensin-(1-7) regulates the levels of angiotensin II receptor subtype AT1 mRNA differentially in a strain-specific fashion. *Regul Pept*. 2000;95:99-107.
98. Mendes ACR, Ferreira AJ, Pinheiro SVB, Santos RAS. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats. *Regulatory Peptides*. 2005;125:29-34.
99. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8258-63.
100. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss H-P, Walther T. G-Protein-Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation*. 2005;111:1806-1813.
101. Ambroz C, Clark AJ, Catt KJ. The mas oncogene enhances angiotensin-induced [Ca²⁺]_i responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1133:107-11.
102. Ross SA, Scott HM, Morris NJ, Leung W-Y, Mao F, Lienhard GE, Keller SR. Characterization of the Insulin-regulated Membrane Aminopeptidase in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem*. 1996;271:3328-3332.
103. Caron AZ, Arguin G, Guillemette G. Angiotensin IV interacts with a juxtamembrane site on AT(4)/IRAP suggesting an allosteric mechanism of enzyme modulation. *Regul Pept*. 2003;113:9-15.
104. Garza LA, Birnbaum MJ. Insulin-responsive Aminopeptidase Trafficking in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem*. 2000;275:2560-2567.
105. Liu G, Hou JC, Watson RT, Pessin JE. Initial Entry of IRAP into the Insulin-Responsive Storage Compartment Occurs Prior to Basal or Insulin-Stimulated Plasma Membrane Recycling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;00175.2005.
106. Subtil A, Lampson MA, Keller SR, McGraw TE. Characterization of the Insulin-regulated Endocytic Recycling Mechanism in 3T3-L1 Adipocytes Using a Novel Reporter Molecule. *J. Biol. Chem*. 2000;275:4787-4795.
107. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye S-Y, Mendelsohn FAO, Jenkins TA, Albiston AL. What's new in the renin-angiotensin system? The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004;61:2728-2737.
108. HANDA RK. Characterization and Signaling of the AT4 Receptor in Human Proximal Tubule Epithelial (HK-2) Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:440-449.
109. Ross SA, Keller SR, Lienhard GE. Increased intracellular sequestration of the insulin-regulated aminopeptidase upon differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem J*. 1998;330/2:1003-8.
110. Hosaka T, Brooks CC, Presman E, Kim S-K, Zhang Z, Breen M, Gross DN, Sztul E, Pilch PF. p115 Interacts with the GLUT4 Vesicle Protein, IRAP, and Plays a Critical Role in Insulin-stimulated GLUT4 Translocation. *Mol. Biol. Cell*. 2005;16:2882-2890.

111. Keller SR, Davis AC, Clairmont KB. Mice Deficient in the Insulin-regulated Membrane Aminopeptidase Show Substantial Decreases in Glucose Transporter GLUT4 Levels but Maintain Normal Glucose Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2002;277:17677-17686.
112. Herbst JJ, Ross SA, Scott HM, Bobin SA, Morris NJ, Lienhard GE, Keller SR. Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1997;272:E600-606.
113. Briand SI, Neugebauer W, Guillemette G. Agonist-dependent AT(4) receptor internalization in bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem.* 1999;75:587-97.
114. Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY, Albiston AL. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *J Neurochem.* 2003;86:344-50.
115. Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FAO, Lee J, Chai SY. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2003;14:72-77.
116. Albiston AL, Pederson ES, Burns P, Purcell B, Wright JW, Harding JW, Mendelsohn FA, Weisinger RS, Chai SY. Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. *Behavioural Brain Research.* 2004;154:239-243.
117. Wright JW, Stubley L, Pederson ES, Kramar EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the Brain Angiotensin IV-AT4 Receptor Subtype System to Spatial Learning. *J. Neurosci.* 1999;19:3952-3961.
118. Wu-Wong JR, Berg CE, Kramer D. Endothelin stimulates glucose uptake via activation of endothelin-A receptor in neonatal rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36:S179-83.
119. Wu-Wong JR, Berg CE, Wang J, Chiou WJ, Fissel B. Endothelin stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation via activation of endothelin ETA receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1999;274:8103-10.
120. Fernando RN, Larm J, Albiston AL, Chai SY. Distribution and cellular localization of insulin-regulated aminopeptidase in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 2005;487:372-90.
121. Lee J, Chai SY, Morris MJ, Mendelsohn FA, Allen AM. Effect of fimbria-fornix lesion on 125I-angiotensin IV (Ang IV) binding in the guinea pig hippocampus. *Brain Res.* 2003;979:7-14.
122. Kirchheim HR. Our fragmentary knowledge of the regulatory functions of ANG II "fragments": are we beginning to see the light? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R937-938.
123. Skurk T, Lee YM, Hauner H. Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture. *Hypertension.* 2001;37:1336-40.
124. Greenland K, Wyse B, Sernia C. Identification and characterization of angiotensinIV binding sites in rat neurone and astrocyte cell cultures. *J Neuroendocrinol.* 1996;8:687-93.
125. Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. The Angiotensin IV System: Functional Implications. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 1995;16:23-52.
126. Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LMS. Human Adipose Tissue Expresses Angiotensinogen and Enzymes Required for Its Conversion to Angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3925-3929.
127. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* 2004;383:45-51.
128. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F, Sharma AM. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:807-25.
129. Ferrario CM. Angiotensin I, angiotensin II and their biologically active peptides. *J Hypertens.* 2002;20:805-7.

130. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11968-73.
131. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2001;12:157-162.
132. Stragier B, Sarre S, Vanderheyden P, Vauquelin G, Fournie-Zaluski MC, Ebinger G, Michotte Y. Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat. *J Neurochem*. 2004;90:1251-7.
133. Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Ruffet E, Fournie-Zaluski M-C, Ardaillou R. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1998;275:F535-542.
134. Sim MK, Qui XS. Angiotensins in plasma of hypertensive rats and human. *Regul Pept*. 2003;111:179-82.
135. Tsai BS, Peach MJ, Khosla MC, Bumpus FM. Synthesis and evaluation of (Des-Asp1)angiotensin I as a precursor for (Des-Asp1)angiotensin II ("Angiotensin III"). *J Med Chem*. 1975;18:1180-3.
136. Sim MK, Lim BC. Determination of aminopeptidase X activity in tissues of normo- and hypertensive rats by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;697:259-62.
137. Kim S, Whelan J, Claycombe K, Reath DB, Moustaid-Moussa N. Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism. *J Nutr*. 2002;132:1135-40.
138. Plovsing RR, Wamberg C, Sandgaard NCF, Simonsen JA, Holstein-Rathlou N-H, Hoiland-Carlsen PF, Bie P. Effects of truncated angiotensins in humans after double blockade of the renin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285:R981-991.
139. Wamberg C, Plovsing RR, Sandgaard NCF, Bie P. Effects of different angiotensins during acute, double blockade of the renin system in conscious dogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285:R971-980.
140. Handa RK. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptors. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:1377-86.
141. Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) Acts as a Vasodepressor Agent Via Angiotensin II Type 2 Receptors in Conscious Rats. *Hypertension*. 2005;45:960-966.
142. Ferrario CM, Chappell MC. What's new in the renin-angiotensin system? *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004;61:2720-2727.
143. Sturrock ED, Natesh R, Rooyen JMv, Acharya KR. What's new in the renin-angiotensin system? *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004;61:2677-2686.
144. Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, Herzlinger D, Levi R. Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13607-12.
145. Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R, Runkel N, Distler A, Sharma AM. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens*. 1999;17:555-60.
146. Georgiadis D, Beau F, Czarny B, Cotton J, Yiotakis A, Dive V. Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin: insights from selective inhibitors. *Circ Res*. 2003;93:148-54.
147. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. Cloning and functional expression as a Captopril-Insensitive Carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275:33238-33243.
148. Huentelman MJ, Zubcevic J, Katovich MJ, Raizada MK. Cloning and characterization of a secreted form of angiotensin-converting enzyme 2. *Regul Pept*. 2004;122:61-7.
149. Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. What's new in the renin-angiotensin system? *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004;61:2704-2713.

150. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87:1e-9.
151. Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY, Penninger JM. What's new in the renin-angiotensin system? *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004;61:2714-2719.
152. Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays*. 2001;23:261-9.
153. Skidgel RA, Erdős EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides*. 2004;25:521-5.
154. Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens*. 2004;17:103-11.
155. Gonzyz Albarry O, GÃmez O, Ruiz E, Vieitez P, GarcÃa-a-Robles R. Role of systolic blood pressure on the progression of kidney damage in an experimental model of type 2 diabetes mellitus, obesity, and hypertension (Zucker rats). *Am J Hypertens*. 2003;16:979-85.
156. Schling P, Schafer T. Human Adipose Tissue Cells Keep Tight Control on the Angiotensin II Levels in Their Vicinity. *J. Biol. Chem.* 2002;277:48066-48075.
157. Li M, Liu K, Michalick J, Angus JA, Hunt JE, Dell'Italia LJ, Feneley MP, Graham RM, Husain A. Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J. Clin. Invest.* 2004;114:112-120.
158. Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Miyazaki M. Chymase-Dependent Angiotensin II Formation in Human Vascular Tissue. *Circulation*. 1999;100:654-658.
159. Gorzelniak K, Engeli S, Janke J, Luft FC, Sharma AM. Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens*. 2002;20:965-73.
160. Mallow H, Trindl A, Loffler G. Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res*. 2000;32:500-3.
161. Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD, Armellino DC, Kral JG. Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. *J Lipid Res*. 1994;35:1378-85.
162. Engeli S. Expression der Gene des Renin-Angiotensin Systems humaner Adipocyten bei adipositas-assoziiierter Hypertonie. *Dissertation*. 2002.
163. Sernia C. A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. *Jop*. 2001;2:50-5.
164. Tahmasebi M, Puddefoot JR, Inwang ER, Vinson GP. The tissue renin-angiotensin system in human pancreas. *J Endocrinol*. 1999;161:317-22.
165. Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia*. 2004;47:240-8.
166. Lau T, Carlsson PO, Leung PS, Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M, Verhave JC, Hillege HL, Burgerhof JG, Janssen WM, Gansevoort RT, Navis GJ, de Zeeuw D, de Jong PE. Why Less Diabetes with Blockade of the Renin-Angiotensin System?: Evidence for a Local Angiotensin-Generating System and Dose-Dependent Inhibition of Glucose-Stimulated Insulin Release by Angiotensin II in Isolated Pancreatic Islets. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:567-73.
167. Chappell MC, Diz DI, Gallagher PE. The renin-angiotensin system and the exocrine pancreas. *Jop*. 2001;2:33-9.
168. Carlsson PO. The renin-angiotensin system in the endocrine pancreas. *Jop*. 2001;2:26-32.
169. Kobayashi H, Mitsui T, Nomura S, Ohno Y, Kadomatsu K, Muramatsu T, Nagasaka T, Mizutani S. Expression of glucose transporter 4 in the human pancreatic islet of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314:1121-5.

170. Lau T, Carlsson P-O, Leung PS. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia*. 2004;47:240-248.
171. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*. 1992;130:167-78.
172. Ruesing D. Diadenosinpolyphosphate und P1-Rezeptorliganden: Einfluss auf den Lipid-, Glukose- und Insulinstoffwechsel *in vitro* und *in vivo* (Ratte). *Dissertation*. 2005.
173. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974;3:127-33.
174. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. 2003;278:9850-5.
175. Student AK, Hsu RY, Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 1980;255:4745-50.
176. Magun R, Gagnon A, Yaraghi Z, Sorisky A. Expression and regulation of neuronal apoptosis inhibitory protein during adipocyte differentiation. *Diabetes*. 1998;47:1948-52.
177. Liu LB, Omata W, Kojima I, Shibata H. Insulin recruits GLUT4 from distinct compartments via distinct traffic pathways with differential microtubule dependence in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 2003;278:30157-69.
178. Pelegrini-da-Silva A, Prado WA, Juliano MA, Wilk S, Martins AR. High-performance liquid chromatographic separation of renin-angiotensin system peptides and most of their metabolic fragments. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;780:301-7.
179. Lim BC, Sim MK. Determination of angiotensins by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994;655:127-31.
180. Doherty EA, Meagher RJ, Albarghouthi MN, Barron AE. Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis. *Electrophoresis*. 2003;24:34-54.
181. Bardelmeijer HA, Lingeman H, de Ruiter C, Underberg WJ. Derivatization in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1998;807:3-26.
182. Montigny PD, Stobaugh JF, Givens RS, Carlson RG, Srinivasachar K, Sternson LA, Higuchi T. Naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. *Analytical Chemistry*. 1987;59:1096-1101.
183. King C, Chan GMM, Haleem J, Issaq, . Solid-state UV laser-induced fluorescence detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000;21:2062-2066.
184. Lacher NA, Garrison KE, Lunte SM. Separation and detection of angiotensin peptides by Cu(II) complexation and capillary electrophoresis with UV and electrochemical detection. *Electrophoresis*. 2002;23:1577-84.
185. Neubig R. Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J*. 1994;8:939-946.
186. Johnson MC, Aguilera G. Angiotensin-II receptor subtypes and coupling to signaling systems in cultured fetal fibroblasts. *Endocrinology*. 1991;129:1266-74.
187. Laustsen PG, Vang S, Kristensen T. Mutational analysis of the active site of human insulin-regulated aminopeptidase. *Eur J Biochem*. 2001;268:98-104.
188. Saye JA, Ragsdale NV, Carey RM, Peach MJ. Localization of angiotensin peptide-forming enzymes of 3T3-F442A adipocytes. *Am J Physiol*. 1993;264:C1570-6.
189. Verspohl. Recommended Testing in Diabetes Research. *Planta Medica*. 2002;68:581-90.
190. Saylor DL, Speth RC, Rowe BP. Effects of peptidase inhibitors on binding at angiotensin receptor subtypes in the rat brain. *Biochem Pharmacol*. 1993;45:2109-14.
191. McQueen J, Murray GD, Semple PF. Identification of the angiotensin II receptor in rat mesenteric artery. *Biochem J*. 1984;223:659-71.
192. Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)

- and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2002;277:46226-32.
193. Clasen R. Regulation von Adiponektin durch das Renin-Angiotensin-System. *Dissertation.* 2005.
194. Schupp M. Identifizierung und Charakterisierung von AT1- Antagonisten als PPARgamma-Liganden. *Dissertation.* 2005.
195. Kintscher U, Unger T. Vascular protection in diabetes: a pharmacological view of angiotensin II type 1 receptor blockers. *Acta Diabetol.* 2005;42 Suppl 1:S26-32.
196. Tamimi JJ, Salem, II, Mahmood Alam S, Zaman Q, Dham R. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of Losartan: bioequivalence assessment. *Biopharm Drug Dispos.* 2005;26:205-10.
197. Sawathiparnich P, Murphey LJ, Kumar S, Vaughan DE, Brown NJ. Effect of Combined AT1 Receptor and Aldosterone Receptor Antagonism on Plasminogen Activator Inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3867-3873.
198. Brown NJ, Agirbasli M, Vaughan DE. Comparative Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonism on Plasma Fibrinolytic Balance in Humans. *Hypertension.* 1999;34:285-290.
199. Gottschling-Zeller H, Rohrig K, Hauner H. Troglitazone reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in cultured human adipocytes. *Diabetologia.* 2000;43:377-83.
200. Skurk T, Lee YM, Rohrig K, Hauner H. Effect of angiotensin peptides on PAI-1 expression and production in human adipocytes. *Horm Metab Res.* 2001;33:196-200.
201. Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest.* 1995;96:2515-20.
202. Jarvis MF, Gessner GW. Dithiothreitol, sodium chloride, and ethylenediaminetetraacetic acid increase the binding affinity of [125I]angiotensin IV to AT4 receptors in bovine adrenal cortex. *Peptides.* 1994;15:1037-44.
203. Handa RK, Harding JW, Simasko SM. Characterization and Function of the Bovine Kidney Epithelial Angiotensin Receptor Subtype 4 Using Angiotensin IV and Divalinal Angiotensin IV as Receptor Ligands. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291:1242-1249.
204. Zhang JH, Hanesworth JM, Sardinia MF, Alt JA, Wright JW, Harding JW. Structural analysis of angiotensin IV receptor (AT4) from selected bovine tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289:1075-83.
205. Maianu L, Keller SR, Garvey WT. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5450-6.
206. Boschmann M, Engeli S, Adams F, Gorzelnik K, Franke G, Klaua S, Kreuzberg U, Luedtke S, Kettritz R, Sharma AM, Luft FC, Jordan J. Adipose Tissue Metabolism and CD11b Expression on Monocytes in Obese Hypertensives. *Hypertension.* 2005;46:130-136.
207. Abhold RH, Harding JW. Metabolism of angiotensins II and III by membrane-bound peptidases from rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;245:171-7.
208. Harding JW, Yoshida MS, Dilts RP, Woods TM, Wright JW. Cerebroventricular and intravascular metabolism of [125I]angiotensins in rat. *J Neurochem.* 1986;46:1292-7.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an erster Stelle bei meinem „Doktorvater“ Prof. Dr. Eugen J. Verspohl für das große Vertrauen und die Freiheit eigene Fehler machen zu dürfen bedanken. Seine freundliche und zuversichtliche Art waren mir immer eine große Unterstützung. Er hat meine Ausbildung während des Studiums, als Pharmaziepraktikant und nicht zuletzt als Doktorand ganz wesentlich geprägt.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises danke ich für ein phantastisches Arbeitsklima, Freundschaft und Hilfsbereitschaft nach dem Motto „Gemeinsam sind wir stark“. Möge das OMAM mit euch sein.

Meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden gilt mein Dank für viel Unterstützung und Verständnis. Sie haben immer geduldig und verständnisvoll an meiner Seite gestanden, obwohl ich ihnen gegen Ende der Promotion viel zu wenig Zeit gewidmet habe.

Dem Institut für Lebensmittelchemie danke ich sehr für die Überlassung von Messzeiten für ein PAI-ELISA, das in diese Dissertation nicht mehr eingebunden wurde.

Bei Prof. Dr. Dr. h.c. Blaschke und seinem gesamten Arbeitskreis möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, CE-Geräte und Fachwissen des Arbeitskreises nutzen zu können. Prof. Dr. Hensel und Dr. Lechtenberg gilt mein Dank für die Zustimmung zu weiteren CE-Bestimmungen.

Bei den Wahlpflichtfachstudentinnen Heike Terfehr und Julia Alexewicz möchte ich mich für ihre sehr engagierte Mitarbeit am IRAP-Assay bedanken und wünsche Ihnen für die letzte Phase des Studiums viel Erfolg.

Außerdem bin ich allen Leuten zu Dank verpflichtet, die überdurchschnittlich viel Zeit und Elan in meine Ausbildung investiert haben. Dies sind unter vielen anderen mein Chemie-LK Lehrer KW Leienbach, viele ehemalige Institutsmitarbeiter, Prof. Dr. Derendorf und „Dr. Raj“ von der University of Florida sowie Dr. Holger Neye.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum 23. Juni 1974
Geburtsort München
Staatsangehörigkeit Deutsch
Familienstand Ledig

AUSBILDUNG

1980 – 1984 Besuch der Grundschule in München und Beuerberg
1984 – 1987 Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium München
1988 – 1994 Wilhelm Hittorf Gymnasium Münster
16.05.1994 Abiturprüfung zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
10/1995 – 10/2000 Pharmaziestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster
11.10.2000 Zweiter Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
11/2000 – 05/2001 Pharmaziepraktikant am Institut für Pharmazeutische Chemie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie
05/2001 – 11/2001 Pharmaziepraktikant in der Einhorn-Apotheke, Essen
03/2002 3. Staatsexamen Pharmazie
04/2002 Approbation zum Apotheker
Seit 03/2003 Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

07/1994 – 07/1995 Grundwehrdienst und Stabsdienstsoldat im Generalstab des I. D/ NL Korps in Münster
03/2002 – 10/2002 Anstellung als Apotheker in der Forum-Apotheke, Hamm und in der Lessing Apotheke, Bergkamen
Seit 10/2002 Promotion am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, WWU Münster. Abteilung Pharmakologie und Toxikologie unter Leitung von Herrn Prof. E.J. Verspohl

