

Screening pflanzlicher Extrakte
auf Aktivierung des humanen
Peroxisomen Proliferator-aktivierten
Rezeptors und seiner Subtypen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

Oliver Rau
aus Erbach (Odw.)

Frankfurt, 2007
(D30)

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe
Gutachter: Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec
Prof. Dr. T. Dingermann
Datum der Disputation: 10.7.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung	1
2.	Einleitung	2
2.1.	Nukleäre Rezeptoren	2
2.1.1.	Allgemeines, Funktion und biologische Wirkung.....	2
2.1.2.	Entwicklungsgeschichte	3
2.1.3.	Entdeckung	5
2.1.4.	Struktur nukleärer Rezeptoren.....	5
2.1.4.1.	Aminoterminale A/B-Domäne mit Aktivierungsfunktion 1 (AF-1).....	6
2.1.4.2.	DNA-Binde-Domäne (DBD) oder C-Domäne	7
2.1.4.3.	hingebereich (Domäne D)	8
2.1.4.4.	Liganden-Binde-Domäne (LBD) (Domäne E) und darin enthaltene Ligand-abhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2)	8
2.1.4.5.	Domäne F	10
2.1.5.	Nomenklatur und Familien der nukleären Rezeptoren.....	11
2.1.6.	Erkennung der DNA	13
2.1.6.1.	Erkennungssequenzen auf der DNA / Response Elemente	13
2.1.6.2.	RXR-Heterodimere / Heterodimere mit dem 9- <i>cis</i> Retinsäure Rezeptor	15
2.1.7.	Orphan Rezeptoren	16
2.2.	PPAR - Die Familie der Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptoren.....	18
2.2.1.	Allgemeines	18
2.2.2.	Überblick	19
2.2.3.	Chromosomale Lokalisation humaner PPARs, Genorganisation, mRNAs und resultierende Proteine	20
2.2.3.1.	PPAR α	20
2.2.3.2.	PPAR δ (auch PPAR β , FAAR oder NUC1).....	20
2.2.3.3.	PPAR γ	21
2.2.4.	DNA Erkennung	23
2.2.5.	Gewebespezifische Expression und Physiologische Funktion.....	24
2.2.5.1.	PPAR α	25
2.2.5.2.	PPAR γ	26
2.2.5.3.	PPAR δ	27
2.2.6.	Regulation der Aktivität von PPAR	28
2.2.6.1.	Ligand abhängige Aktivierung	28
2.2.6.2.	Beeinflussung der PPAR Aktivität durch Phosphorylierung oder RXR Agonisten.....	29
2.2.7.	Cofaktoren von PPAR	30
2.2.7.1.	Corepressoren	30
2.2.7.2.	Co-Aktivatoren	30
2.2.8.	Liganden und klinische Wirksamkeit	30
3.	Materialien und Methoden	32
3.1.	Materialien.....	32
3.1.1.	Substanzen	32
3.1.2.	Drogenmaterial	32
3.1.3.	Reagenzien.....	33
3.1.4.	Hochleistungs Flüssig Chromatographie (HPLC).....	33
3.1.5.	Zellkulturmedien	33
3.1.6.	Geräte und Software	34

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.7.	Plasmide, DNA-Primer, sonstige DNA	34
3.1.8.	Enzyme	34
3.1.9.	Bakterien- und Eukaryote Zellen.....	35
3.2.	Methoden	35
3.2.1.	Klonierung	35
3.2.1.1.	Gewinnung der DNA Fragmente von hinge Region und Liganden-Binde- Domäne der PPAR Subtypen durch Polymerase Ketten Reaktion	35
3.2.1.2.	Restriktions-Verdau der PCR Fragmente und des Klonierungsplasmids pFA- CMV und anschließende Ligation.....	37
3.2.1.3.	Plasmid Amplifikation in <i>E. coli</i> SURE.....	37
3.2.2.	Transiente Transfektion	39
3.2.2.1.	Grundsätzliche Erwägungen.....	39
3.2.2.2.	Ermittlung der optimalen Zellzahl.....	40
3.2.2.3.	Etablierung des Transfektionsprotokolls.....	40
3.3.	Bewertung des verwendeten <i>in-vitro</i> Assays für die geplanten Einsatzzwecke	42
3.3.1.	Berechnungsmethode.....	43
3.3.1.1.	nicht transfizierte Negativ-Kontrolle (Reagenzien-Wert)	43
3.3.1.2.	Normierung.....	44
3.3.1.3.	Berechnung der Aktivierungsfaktoren.....	44
3.3.1.4.	Auswertung anhand von Relativen Light Units oder Aktivierungsfaktoren?	45
3.3.1.5.	Auswertung.....	46
3.3.2.	Verwendung eines Gal4-Fusionsproteins und des zugehörigen Response Elements anstelle des PPAR Vollrezeptors und des zugehörigen Response Elements	46
3.3.3.	Robustheit der Methode im Hinblick auf Veränderungen der Parameter	48
3.3.3.1.	Reproduzierbarkeit der Basal-Aktivität.....	49
3.3.3.2.	Reproduzierbarkeit von Rohdaten und ausgewerteten Daten.....	50
3.3.4.	Validierung der Referenzsubstanzen	50
3.3.4.1.	WY-14643 (Pyrinixinsäure) und GW7647	50
3.3.4.2.	Pioglitazon	52
3.3.4.3.	L165,041	53
3.3.5.	Validierung des Assays anhand von Fettsäuren, als endogenen PPAR Aktivatoren	53
3.4.	Extraktherstellung.....	56
3.4.1.	Wahl des Extraktionsmittels	56
3.4.2.	Auswahl der Drogen	56
3.4.3.	Herstellung der Extrakte	57
3.5.	HPLC Analytik der Rosmarin und Salbei Extrakte.....	58
4.	Ergebnisse und Diskussion	59
4.1.	Screening pflanzlicher Extrakte auf PPAR Agonismus	59
4.1.1.	Pflanzenextrakte ohne oder mit überaus schwachem PPAR Agonismus.....	59
4.1.2.	Pflanzenextrakte mit geringem, aber überwiegend signifikanten PPAR Agonismus	62
4.1.3.	Aktivatoren des PPAR γ , für welche eine konzentrationsabhängige Steigerung des agonistischen Effektes aufzeigbar ist.....	67

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.	Ethanolisch-wässrige Extrakte aus <i>Rosmarinus offic.</i> und <i>Salvia offic.</i> als selektive Aktivatoren des PPAR γ	70
4.2.1.	Potentiell aktive Prinzipien der Extrakte aus <i>Rosmarinus offic.</i> und <i>Salvia offic.</i>	71
4.2.2.	Carnosolsäure und Carnosol.....	74
4.2.3.	Fußnote: Derzeitige Verwendung Carnosolsäure-haltiger Produkte.....	82
4.3.	Ausblick: PPAR γ - ein Phosphoprotein? <i>In-silico</i> Analyse zur Vorhersage möglicher Phosphorylierungsstellen der LBD des PPAR γ	83
4.4.	Testung von Resveratrol auf Agonismus am humanen PPAR.....	87
4.5.	Verwendung eines probabilistischen neuronalen Netzwerks zur Identifizierung möglicher PPAR Aktivatoren aus einer Substanzdatenbank.....	88
4.6.	Substanztestung von Pyrinixinsäure abgeleiteter PPAR Agonisten.....	89
5.	Zusammenfassung	90
6.	Literatur	93
7.	Anhänge	
	Publikationen	Seiten 108-132
	[1] Rau et al. Pharmazie (2006) 61; 952-956	108-112
	[2] Rau et al. Planta Medica (2006) 72; 881-887	113-119
	[3] Ulrich et al. Cancer Research (2006) 66; 7348-7354	120-126
	[4] Derksen et al ChemMedChem (2006); 1; 1346-1350	127-131
	Danksagung	132
	Publikationsliste	133
	Lebenslauf	135
	Eidesstattliche Erklärung	136

HINWEIS DES VERFASSERS:
AUS URHEBERRECHTLICHEN GRÜNDEN SIND DIE AUFGEFÜHRTEN
PUBLIKATIONEN NUR IN DER DRUCKSCHRIFT, NICHT ABER DIESER
ELEKTRONISCHEN VERSION ENTHALTEN

1. Zielsetzung

Menge und Zusammensetzung unserer Nahrung sind Faktoren, die wesentlichen Einfluss auf unsere Gesundheit, die Entstehung und den Verlauf von Erkrankungen nehmen. So ist zum Beispiel der Typ 2 Diabetes wegen der Assoziation mit einem erhöhten Körpergewicht, also chronisch zu hoher Energieaufnahme durch die Nahrung, als zumindest teilweise ernährungsbedingt anzusehen. Die epidemiologische und auch ökonomische Bedeutung ergibt sich aufgrund der zunehmenden Prävalenz des Typ 2 Diabetes in industrialisierten Nationen und der Schwere ihrer Folgeerkrankungen insbesondere atherosklerotischer Natur. Die in der Ätiologie des Typ 2 Diabetes involvierten Prozesse finden zu einem großen Teil auf Ebene der Genregulation statt und benötigen bis zur Manifestation der Erkrankung oftmals längere Zeiträume, dies ist der Grund für die heute nicht mehr zutreffende Bezeichnung als „Altersdiabetes“, in Zeiten schlechter Ernährungslage trat die Krankheit erst im höheren Alter auf.

Neben der reinen Quantität der Nahrung spielt beim Typ 2 Diabetes auch die qualitative Zusammensetzung der Nahrung eine Rolle. So scheint der höhere Anteil von ungesättigten Fettsäuren in Fisch und pflanzlicher Nahrung eine präventive Wirkung zu entfalten. Grund hierfür ist unter anderem die im Vergleich zu gesättigten Fettsäuren erhöhte Aktivität am nukleären Rezeptor *Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor* (PPAR) und die hierdurch bedingte Beeinflussung der Genexpression. Der PPAR Rezeptor greift hier an grundlegender Stelle in die Genese des Typ 2 Diabetes ein und senkt zum Beispiel die Insulinresistenz peripherer Gewebe, also einen wesentlichen Faktor in der Ätiologie der Erkrankung und stellt somit ein optimales Target für die Behandlung und möglicherweise auch Prävention dieser Erkrankung dar.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es nun, Gewürz- und Arzneipflanzen auf eine Aktivierung des PPAR und eine hierdurch bedingt mögliche antidiabetische Wirksamkeit hin zu untersuchen. Zum einen sollte ein möglicher Wirkmechanismus für eine volksmedizinisch oder auch präklinisch postulierte antidiabetische oder präventive Wirksamkeit dieser Pflanzen aufgezeigt werden, zum anderen sollten die aktiven Prinzipien dieser Pflanzen isoliert werden.

2. Einleitung

2.1. Nukleäre Rezeptoren

2.1.1. Allgemeines, Funktion und biologische Wirkung

Nukleäre Rezeptoren stellen eine Klasse nukleärer oder zunächst auch im Cytosol lokalisierter Proteine dar, die als Transkriptionsfaktoren fungieren.

Im Gegensatz zu den Liganden membranständiger Rezeptoren sind die Liganden nukleärer Rezeptoren lipophil und dadurch membrangängig.

Als Proteine, welche zwar im Cytosol synthetisiert werden, ihre Wirkungen aber überwiegend im Zellkern entfalten, enthalten sie Zellkern-Translokationssignale, welche ihre Verteilung zwischen Cytosol und Zellkern regulieren. Diese Translokationssignale können beim Apo-, also dem nicht Ligand gebundenen, Rezeptor durch andere Proteine maskiert werden, wie etwa beim Glucocorticoid Rezeptor durch Hitze Schock Proteine (etwa HSP60), wodurch der Apo-Rezeptor im Cytosol zurückgehalten wird.

Durch Bindung eines Agonisten werden sie in eine aktive Konformation überführt, dissoziieren von reprimierend wirkenden Proteinen und binden daraufhin –falls nötig nach vorheriger Translokation in den Zellkern- an eine Response Element genannte Erkennungs-Sequenz innerhalb der Promotor Region eines von ihnen kontrollierten Gens. Dort rekrutieren sie Transkriptions-Coaktivatoren, die z.B. Histon-Acetylase- oder Topoisomerase-Funktion aufweisen, und so den zu transkribierenden DNA-Strang freilegen. Durch die Bindung weiterer Faktoren wird schließlich der initiale Transkriptions-Komplex so stabilisiert, dass die RNA-Polymerase II gebunden wird und es zur Abschrift des entsprechenden Gens kommt.

Neben dieser direkten Gentranskriptions-Aktivierung ist von einigen nukleären Rezeptoren, wie z.B. dem Glucocorticoid-Rezeptor, eine Transkriptions-inhibitorische Funktion, eine so genannte Transrepression bekannt.

Diese kann zum einen direkt sein, durch Bindung an ein negatives Response Element, wobei in diesem Falle aber Corepressoren rekrutiert werden, welche im Gegensatz z.B. durch Histon-Deacetylase Funktion zu einer Verdichtung des Chromatins beitragen und somit eine Transkription verhindern (direkte Gentranskriptions-Hemmung).

Des weiteren kann eine Transkriptions-Inhibition durch nukleäre Rezeptoren auch auf direkten Protein-Protein Interaktionen beruhen, wobei entweder der aktivierte Rezeptor

direkt einen anderen Transkriptionsfaktor bindet und somit entweder von der Bindung an die DNA oder der Bildung des Transkriptionskomplexes abhält. Dies ist zum Beispiel bei der Inaktivierung des pro-inflammatorischen NF κ B (nukleärer Faktor κ B) durch den aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor der Fall [5-9] (auch wenn bei der Inhibition von NF κ B durch Glucocorticoide noch andere Wirkungen zum Tragen kommen, etwa die Induktion des Inhibitors von κ B (I κ B), welcher durch Bindung an NF κ B dessen Kerntranslokationssignal maskiert und so den Transkriptionsfaktor inaktiv hält [10]).

Im anderen Falle kann ein aktivierter Rezeptor Co-Aktivatoren der Transkription anderen Transkriptionsfaktoren entziehen, wobei hier allerdings ein kompetitiver Mechanismus vorliegt, der auf relativen Affinitäten der jeweiligen Proteine zueinander beruht.

Typische und wohl die bekanntesten Vertreter nukleärer Rezeptoren sind diejenigen, der lipophilen Hormone, also die der Sexual-, Nebennierenrinden und Schilddrüsenhormone, sie stellen aufgrund ihrer hohen Affinität zu ihrem jeweiligen Rezeptor und ihrer Bindungsspezifität die „klassischen“ Hormone dar.

2.1.2. Entwicklungsgeschichte

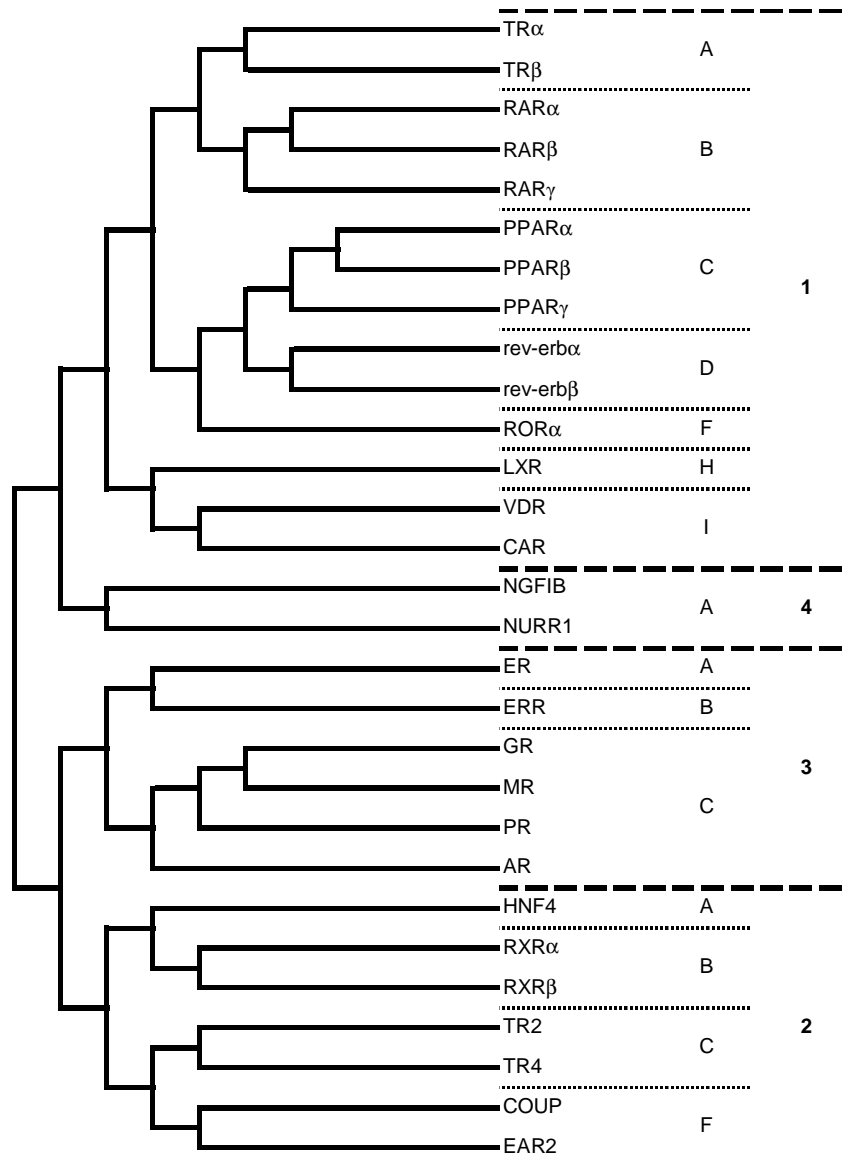
Ligand abhängige Transkriptionsfaktoren haben sich in der Evolution der Metazoen, also der zum Tierreich gehörenden Mehrzeller, recht früh entwickelt. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, bieten sie doch einem Organismus die Möglichkeit über Diffusion oder einen Kreislauf, vermittels diffusibler und im Falle der nukleären Rezeptoren auch membrangängiger Botenstoffe (Hormone) verschiedene Zellen oder auch ganze Gewebe und deren physiologische Funktion zu koordinieren. Dieser Signalaustausch ist bereits in der Embryonalentwicklung für die gerichtete Differenzierung der jeweiligen Gewebe von entscheidender Bedeutung und ermöglicht somit überhaupt erst die Entstehung von Vielzellern. Aus eben diesem Grunde weisen nukleäre Rezeptoren viele konservierte Bereiche innerhalb ihrer Struktur auf, sowohl in homologer Hinsicht, also im Vergleich verschiedener Spezies, als auch in Analogie der Rezeptoren einer Spezies untereinander.

So weisen die vielfach als Modellorganismen benutzte Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Nematode *Caenorhabditis elegans*, als nicht Vertebraten, Homologe zu den meisten nukleären Rezeptoren der Vertebraten auf, nicht aber zu den Steroid-Hormon Rezeptoren, die demnach relativ spät bei der Entwicklung der Wirbeltiere entstanden sind und erst im zu den Amphibien gehörigen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*)

EINLEITUNG

vorkommen [11]. Im Gegensatz dazu steht der zur Klasse II gehörige 9-*cis*-Retinsäure Rezeptor (RXR), welcher bereits in See-Anemonen aus dem Stamm der Nesseltiere gefunden wird und damit entwicklungsgeschichtlich relativ alt ist.

Abbildung 1: Vereinfachter phylogenetischer Stammbaum humaner nukleärer Rezeptoren nach [12]. Wiedergegeben sind relative Verwandtschaftsverhältnisse. Die Rezeptoren sind zusammengefasst in ihre Familien durch die arabische Ziffer ganz rechts, in ihre Gruppen durch den Buchstaben links davon. Also z.B. der Thyroid Rezeptor α gehört zur Gruppe A in Familie 1 der nukleären Rezeptoren (siehe hierzu auch den Abschnitt über die Nomenklatur nukleärer Rezeptoren und die dort abgedruckte Tabelle, in welcher die hier verwendeten Abkürzungen erläutert werden).



2.1.3. Entdeckung

Die „klassischen“ nukleären Hormon-Rezeptoren wurden bereits ab dem frühen 20.-Jahrhundert entdeckt, nachdem man das jeweilige Hormon isoliert, zum Beispiel Cortisol aus der Nebennierenrinde, und aufgrund der biologischen Wirkung als wirksames Agens identifiziert hatte. Diese klassischen Hormon-Rezeptoren konnten daraufhin bereits ab den siebziger Jahren des 20.-Jahrhunderts als Proteine aufgereinigt werden, was aufgrund der möglichen Aminosäure-Sequenzierung schließlich die Klonierung der zugehörigen DANN, zum Beispiel des Östrogen- [13] und des Glucocorticoid-Rezeptors [14], im Jahre 1985 erlaubte.

Im Gegensatz dazu, ergab sich die Entdeckung der zunächst als „Orphan“ bezeichneten Rezeptoren durch die in den späten 1980-er Jahren immer rascher erfolgende Sequenzierung ganzer Genome. Anhand von Sequenz-Homologien zu den bereits bekannten Hormon-Rezeptoren wurden diese „Orphan“ Rezeptoren auf der Ebene des Gens entdeckt und kloniert, lange bevor für den jeweiligen Rezeptor ein Ligand gefunden wurde [15]. Hierdurch ergab sich die Benennung als „Orphan“ also Waise, welche veranschaulicht, dass für diesen Rezeptor ein Ligand erst noch gefunden werden muss, oder zumindest zum Zeitpunkt seiner Entdeckung noch nicht gefunden war.

Auf den 1988 zuerst entdeckten „Orphan“ Rezeptor ERR (**E**strogen **R**elated **R**eceptor) [16] folgten in kurzer Zeit über ein Dutzend weitere.

So wurde der Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptor (PPAR) im Jahre 1990 zuerst kloniert [17].

2.1.4. Struktur nukleärer Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren lassen sich in vier bzw. fünf Domänen untergliedern, wobei die fünfte Domäne nicht notwendigerweise vorhanden sein muss (Siehe Abbildung 2 auf der nächsten Seite).

EINLEITUNG

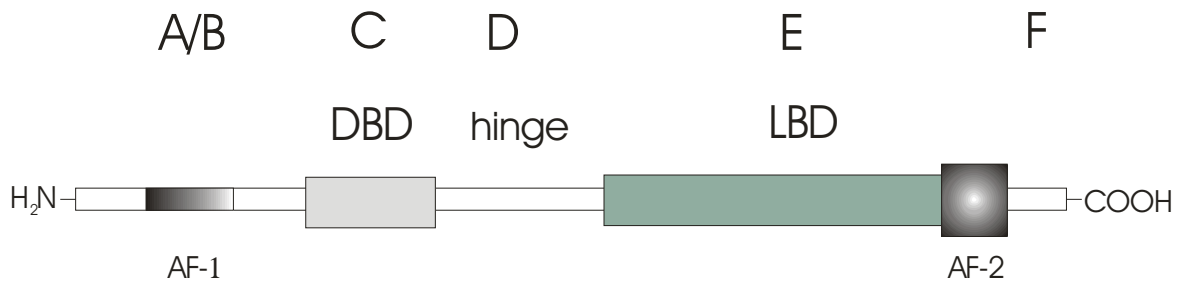


Abbildung 2: Struktureller Aufbau nukleärer Rezeptoren.

Die Buchstaben A/B bis F bezeichnen Domänen des nukleären Rezeptors, in der Reihe darunter werden, falls vorhanden, alternative Namen für die Domänen angegeben, wobei diese die teilweise eher gängigen Bezeichnungen darstellen. Dabei steht DBD für DNA-Binde Domäne, hinge (engl. für Scharnier) für die Domäne, die DBD und LBD verbindet, wobei LBD für Liganden-Binde-Domäne steht. Die Bezeichnungen AF-1 und AF-2 werden nicht ganz einheitlich teilweise alternativ für die ganze Domäne verwendet (AF-1 für A/B und AF-2 für die LBD, siehe etwa [18]), teilweise auch enger umgrenzt nur für die jeweils zur Aktivierung beitragenden Bereiche innerhalb der Domäne darstellt, wobei dies für AF-2 zumeist die Helix 12 ist (welche nicht notwendigerweise auch die 12.te Helix der LBD ist). AF steht bei beiden für Aktivierungsfunktion. Nähere Erläuterungen im Text.

2.1.4.1. Aminoternale A/B-Domäne mit Aktivierungsfunktion 1 (AF-1)

Die aminoternale A/B Domäne, welche eine Ligand-unabhängige Aktivierungsdomäne (AF-1) beinhaltet, stellt eine hypervariable Domäne mit der geringsten Sequenz Konservierung unter den nukleären Rezeptoren dar. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass ihre Länge sowohl mehr als 600 Aminosäuren betragen kann, z.B. beim Mineralcorticoid Rezeptor, als auch weniger als 15 Aminosäuren, wie im Fall des Vitamin A-Säure Rezeptors (**R**etinoic **A**cid **R**eceptor kurz RAR) [19]. Außerdem ist die A/B Domäne, wohl auch wegen dieser hohen Variabilität und der damit geringeren Vergleichbarkeit, die funktionell am wenigsten verstandene Domäne. Tatsache ist aber, dass die A/B Domäne vor allem in der AF-1 Region Phosphorylierungs-Sequenzen für Kinasen aufweist, über die der Rezeptor sowohl inaktiviert, als auch in Ligand-unabhängiger Weise aktiviert werden kann. Über Phosphorylierung der AF-1 Domäne, zum Beispiel durch Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK), lässt sich die Aktivität des Rezeptors somit mit dem Zellzyklus und Signaltransduktionsmechanismen membranständiger Rezeptoren koordinieren.

So kann etwa der Östrogen Rezeptor durch Phosphorylierung am Serin 118 sowohl synergistisch zu Östrogen [20], als auch Ligand-unabhängig [21] aktiviert werden, was zumindest einen Mechanismus zur Entstehung von Resistenzen gegen den (Partial-) Antagonisten Tamoxifen darstellt.

Ebenso kann der adipogenetisch wirkende PPAR γ , durch Insulin vermittelte Phosphorylierung des innerhalb der AF-1 Domäne gelegenen Serin 112 (PPAR γ_2 , entspricht Serin 84 in PPAR γ_1) aktiviert werden [22]. Allerdings wurde gezeigt, dass eben jene Phosphorylierung mittels anderer mitogener Stimuli -etwa des Epidermal Growth Factors (EGF) oder des Platelet Derived Growth Factors (PDGF)- den Rezeptor auch inaktivieren kann [23]. Die Tatsache, dass die Phosphorylierung an derselben Stelle, aber durch unterschiedliche Reize vermittelt, im einen Falle zu einer Aktivierung, im anderen aber zu einer Inhibition des Rezeptors führen kann, legt nahe, dass hierbei weitere Mechanismen involviert sind (zur Diskussion dieser Diskrepanz siehe auch [24]). Isoformen eines bestimmten Rezeptors unterscheiden sich überwiegend in ihrer A/B-Domäne, wobei es durch Nutzung unterschiedlicher Promotoren zu Transkripten kommt, welche sich in ihrer Länge unterscheiden. So gibt es etwa vom PPAR γ zwei Isotypen, wobei PPAR γ_2 aminoterminal 28 Aminosäuren länger ist, ansonsten aber identisch mit dem PPAR γ_1 (der ebenfalls beschriebene PPAR γ_3 stellt lediglich eine splice Variante der PPAR γ mRNA dar, das resultierende Protein ist ebenfalls PPAR γ_1).

2.1.4.2. DNA-Binde-Domäne (DBD) oder C-Domäne

An die A/B Domäne schließt sich in Richtung auf den Carboxy-Terminus die DNA-Binde-Domäne an, welche die am meisten konservierte Region unter den nukleären Rezeptoren darstellt. Sie besteht aus etwa zwischen 40 bis 100 Aminosäuren mit einer Kern-Sequenz aus etwa 65 Aminosäuren und verfügt bis auf wenige Ausnahmen [18] über zwei Zink-Finger Motive, welche die Bindung an die jeweilige Erkennungssequenz, also das Response Element, auf der DNA vermitteln. Diese Zink-Finger Motive beinhalten hoch konservierte Cystein Reste [19] und tragen teilweise zur Dimerisierung mit einem Co-Rezeptor bei [25]. Die beiden Zink-Finger sind dabei phylogenetisch distinkt, und werden auch von verschiedenen Exons kodiert. Der erste Finger bildet die so genannte P-Box, bei der jeweils zwei Cysteine, getrennt durch je zwei Aminosäuren, Anfang und Ende einer Helix aus etwa zwölf Aminosäuren bilden, welche durch Koordination eines Zink-Ions

durch die Cysteine stabilisiert wird. Auf diesen ersten Zink-Finger folgen etwa 15 weitere Aminosäuren, an die sich der zweite -auch als D-Box bezeichnete- Zink-Finger anschließt. Dieser unterscheidet sich durch einen stärker basischen Charakter vom ersten. Des Weiteren können hier zwischen den beiden Cystein-Paaren mehr als zwei Aminosäuren eingefügt sein und schließlich kann eines in der Helix des zweiten Zink-Finger enthaltenen Cysteine unter Verkürzung der Helix in die Koordination des Zinks eintreten und das Carboxy-terminale Cystein aus dieser Koordination entlassen [19].

Sowohl der erste, als auch der zweite Zink-Finger scheinen in ihrer Sequenz für die Spezifität der DNA-Erkennung [26] maßgeblich zu sein, und in Abhängigkeit vom Bindungspartner für die Rezeptor-Dimerisierung [27-29]. Die Nutzung des Dimerisierungs-Interfaces innerhalb der DBD scheint allerdings nur bei Bindung an eine Direct Repeat (siehe unten) Erkennungssequenz möglich zu sein [30].

An die Zink-Finger Motive schließt sich ein Carboxy-Terminal Extension (CTE) genannter Bereich an, welcher neben den beiden Zink-Finger Helices als dritte Helix spezifischen Kontakt zur DNA zu vermitteln vermag [31-33]. Wie Versuche mit Fusionsrezeptoren nahe legen, bei denen die DBD verschiedener Rezeptoren gegen die DBDs anderer Rezeptoren ersetzt wurden, scheint die DBD ausschließlich für die Spezifität der Bindung an das entsprechende DNA Element verantwortlich zu sein [19].

2.1.4.3. hinge region (Domäne D)

vermittelt die flexible Verbindung zwischen DNA-Binde-Domäne und Liganden-Binde-Domäne.

2.1.4.4. Liganden-Binde-Domäne (LBD) (Domäne E) und darin enthaltene Ligand-abhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2)

Die Liganden-Binde-Domäne stellt -wie sich bei der Variabilität der Liganden erwarten lässt- wiederum eine weniger konservierte Domäne dar, die mehrere Funktionen erfüllt. Zum einen stellt sie die Bindetasche für den Liganden bereit, zum anderen stellt sie die Möglichkeit zur Dimerisierung mit einem Co-Rezeptor dar und verfügt auf ihrer Oberfläche über Bindestellen für interagierende Proteine -also Transkriptionsfaktoren wie Corepressoren oder Coaktivatoren- und durch Aktivierung freigelegte

EINLEITUNG

Kerntranslokationssequenzen sowie zumeist eine Ligand abhängige, Transaktivierungsdomäne (AF-2), welche den am höchsten konservierten Bereich der Liganden-Binde-Domäne darstellt.

Die Liganden-Binde-Domäne besteht aus 12 (11-13) α -Helices, von denen die am weitesten carboxyterminal gelegene Helix 12 (per Definition, muss nicht notwendigerweise die 12. der Helices dieser Domäne sein) die AF-2 Funktion verkörpert. Diese Helix 12 stellt sowohl den Zugang zur Bindungstasche, als auch deren Verschluss dar, weshalb man hier vom Mouse Trap (Mausefallen) Modell spricht, da im Falle der Ligand Bindung Helix 12 mit dem Liganden schwache Wechselwirkungen eingeht und dadurch die vorher offenen Bindetasche nach außen hin vom hydrophilen wässrigen Milieu abschirmt und so die Affinität zum lipophilen Liganden maßgeblich erhöht [16, 18]. Die AF-2 Domäne bietet in dieser aktivierten Form Protein-Protein-Interaktionsoberflächen, etwa LXXLL-Motive zur Bindung von Co-Aktivatoren dar. In inaktiver Konformation bietet die AF-2 Domäne hierbei Transkriptions-Corepressoren wie SMRT (Silencing Mediator for **R**ARs und **T**Rs, aber auch für andere) und N-CoR (**N**uclear Receptor **C**o**R**epressor) Kontaktflächen zur Interaktion. Diese Interaktion scheint zumindest bei einigen Rezeptoren essentiell für die Repression des Rezeptors zu sein, ja geradezu die Aktivität des Rezeptors erst zu verhindern, da z.B. beim Glucocorticoid Rezeptor Mutanten, welche die Liganden-Binde-Domäne und damit die AF-2 nicht mehr enthalten, konstitutiv, also Ligand-unabhängig, aktiv sind [34, 35].

Die Aktivierung nukleärer Rezeptoren durch ihren Liganden ist damit durch die Ligand-induzierte Konformationsänderung der AF-2 Domäne und die dadurch bedingte Dissoziation der Corepressoren unter Freilegung möglicher Interaktions-Oberflächen für Coaktivatoren zu erklären.

Beim Constitutive Androstan Rezeptor (CAR) hingegen ist das Gegenteil der Fall. Bei diesem konstitutiv aktiven Rezeptor hat die AF-2 die zur Aktivierung nötige Konformation ohne einen Liganden gebunden zu haben, lässt sich aber durch Bindung von Testosteron-Metaboliten wie $5\alpha(3\alpha\text{-Androstan})\text{-ol}$ in eine inaktive Konformation überführen [36], wobei sich diese Hemmung durch Cytochrom Induktoren vom Phenobarbital-Typ, in einer nicht AF-2 oder Liganden-Binde-Domäne abhängigen Weise, überkommen lässt [37-39].

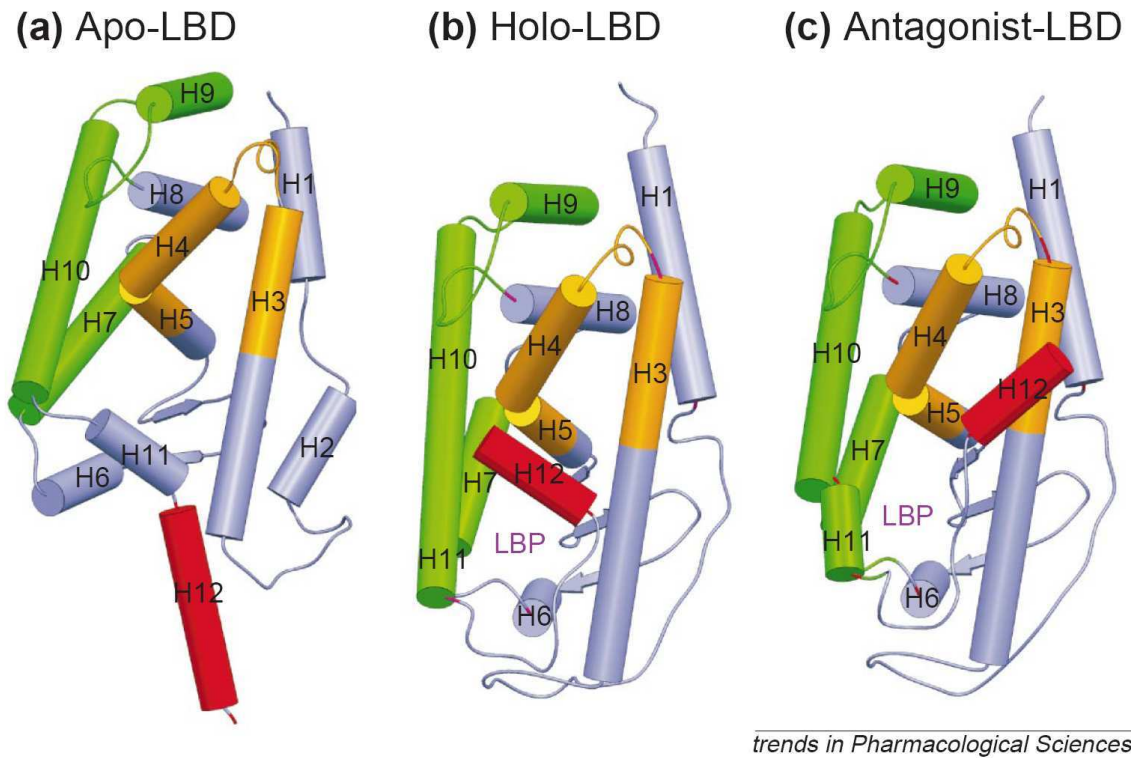


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Liganden-Binde Domäne Nukleärer Rezeptoren. Gegenüber der Apo-Form ist die konformative Lageänderung der Helix 12 (rot) in der Holo-Form des Rezeptors klar ersichtlich. Weitere essentielle konformative Änderungen umfassen Helix 10 und 11, welche nach der Bindung eines Liganden eine einzige Helix bilden. (aus [40])

2.1.4.5. Domäne F

Stellt den Carboxy-terminalen Rest nukleärer Rezeptoren dar, welcher auf die AF-2 Domäne folgt. Über seine Funktionen ist wenig bekannt. Bei einer großen, wenn nicht der überwiegenden Anzahl, nukleärer Rezeptoren ist er nicht vorhanden, weshalb diese dann nur aus 4 statt der maximal möglichen 5 Domänen bestehen.

2.1.5. Nomenklatur und Familien der nukleären Rezeptoren

Für die Nomenklatur nukleärer Rezeptoren gilt das vom Nuclear Receptors Nomenclature Committee in „A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily“ [12] festgelegte Klassifizierungssystem, welches vom International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (NC-IUPHAR) als vorläufiges Benennungssystem akzeptiert wurde. Nach diesem Klassifizierungssystem werden nukleäre Rezeptoren gekennzeichnet durch die Buchstaben NR (für „Nuclear Receptor“) gefolgt von einer arabischen Zahl, welche für die Rezeptor-Familie steht, welcher der jeweilige Rezeptor angehört. Darauf folgt ein Großbuchstabe welcher die Gruppenzugehörigkeit ausweist, eine weitere arabische Zahl beschreibt dann den individuellen Rezeptor.

Dies soll veranschaulicht werden am Beispiel des PPAR α Rezeptors, für den nach dieser Nomenklatur die Bezeichnung NR1C1 gilt: NR1 steht für nukleärer Rezeptor der Familie 1, zu der z.B. noch gehören, der Thyroid Hormon Rezeptor (TR), der Retinsäure Rezeptor (RAR), der Vitamin D Rezeptor (VDR) und mehrere der „Orphan“ Rezeptoren.

Das C in NR1C1 steht innerhalb der Familie 1 nukleärer Rezeptoren für die Gruppe der Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPAR) mit allen Subtypen (Paralogen) und die letzte 1 in NR1C1 beschreibt schließlich den PPAR α , einschließlich aller eventuell vorhandenen Rezeptor Isoformen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über derzeit bekannte nukleäre Rezeptoren des Menschen. Die Familien 4, 5, 6 und 0 umfassen ausschließlich Orphan Rezeptoren, Familie 3 umfasst abgesehen vom ERR ausschließlich die „klassischen“ Steroid-Rezeptoren, Familie 2 besteht wiederum nur aus -zumindest ursprünglich- Orphan Rezeptoren, mit dem hier herauszuhebenden 9-*cis* Retinsäure Rezeptor und die größte Familie 1 schließlich umfasst neben „klassischen“ Hormonrezeptoren wie dem Thyroid-, Retinsäure- und Vitamin D-Rezeptor wiederum Orphan Rezeptoren, wobei für diese aber zumeist bereits Liganden gefunden wurden. Von den hier aufgeführten Rezeptoren der Familie 1, abgesehen vom Reverse *erbA*, welcher Homodimere bildet, und den ROR Subtypen, welche als Monomere binden, heterodimerisieren alle mit dem 9-*cis* Retinsäure Rezeptor, während die Familie der Steroid-Rezeptoren (Familie 3) als Homodimere an die DNA binden, bzw. ERR als Monomer. Familie 2 bildet vorwiegend Homodimere. In Familie 0 wurden solche Rezeptoren zusammengefasst, die weder zueinander, noch zu andern Familien in engerer Verwandtschaftsbeziehung stehen.

EINLEITUNG

Tabelle 1

Nukleäre Rezeptoren des Menschen					
Familie	Gruppe	Trivial Namen	Gen	Abkürzung	Ligand
1	A	Thyroid Rezeptor	NR1A1	TR α	L-Thyroxin, L-Thyronin
			NR1A2	TR β	
	B	Retinsäure Rezeptor	NR1B1	RAR α	Retinsäure
			NR1B2	RAR β	
			NR1B3	RAR γ	
	C	Peroxisomen proliferierender Rezeptor	NR1C1	PPAR α	Fettsäuren
			NR1C2	PPAR β	
			NR1C3	PPAR γ	
	D	Reverse erbA	NR1D1	Rev-erb α Rev-erb β	orphan
	F	RAR-related orphan Rezeptor	NR1F1	ROR α	Cholesterol(-sulfat)?
			NR1F2	ROR β	
			NR1F3	ROR γ	Retinolsäure
	H	Liver X Rezeptor	NR1H3	LXR α	Oxysterole
			NR1H2	LXR β	
Farnesoid X Rezeptor		NR1H4	FXR α	Gallensäuren	
	NR1H5	FXR β	-		
I	Vitamin D Rezeptor Pregnan X Rezeptor Constitutiver Androstan Rezeptor	NR1I1	VDR	Vitamin D (Colecalciferol)	
		NR1I2	PXR	Xenobiotica	
		NR1I3	CAR	Xenobiotica	
2	A	Human nuclear factor 4	NR2A1	HNF4 α	orphan
			NR2A2	HNF4 γ	
	B	Retinoid X Rezeptor	NR2B1	RXR α	9-cis-Retinsäure
			NR2B2	RXR β	
			NR2B3	RXR γ	
	C	Testis Rezeptor	NR2C1	TR2	
			NR2C2	TR4	
	E	Tailless Photoreceptor-specific nuclear receptor	NR2E2	TLL	orphan
			NR2E3	PNR	
	F	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor ErbA2-related gene-2	NR2F1	COUP-TFI	
NR2F2			COUP-TFII		
		NR2F6	EAR2		
3	A	Estradiol Rezeptor	NR3A1	ER α	Estradiol
			NR3A2	ER β	
	B	Estradiol Rezeptor related receptor	NR3B1	ERR α	orphan
			NR3B2	ERR β	
			NR3B3	ERR γ	
	C	Glucocorticoid Rezeptor Mineralcorticoid Rezeptor Progesteron Rezeptor Androgen Rezeptor	NR3C1	GR	Cortisol
			NR3C2	MR	Aldosteron
NR3C3			PR	Progesteron	
NR3C4			AR	Testosteron	
4	A	NGF-Induced factor B	NR4A1	NGFIB	
		Nur related factor 1	NR4A2	NURR1	
		Neuron-derived orphan receptor 1	NR4A3	NOR1	
5	A	Steroidogenic factor 1	NR5A1	SF1	orphan
		Liver receptor homologous protein 1	NR5A2	LRH1	
6	A	Germ cell nuclear factor	NR6A1	GCNF	
0	B	DSS-AHC critical region on the chromosome gene 1	NR0B1	DAX1	
		Short heterodimer partner	NR0B2	SHP	

Tabelle 1: Nomenklatur nukleärer Rezeptoren (modifiziert nach [18]).

Unter Abkürzung ist der gegenüber der korrekten Bezeichnung gängigere Trivialname aufgeführt. Orphan bei Ligand bedeutet, dass ein Ligand derzeit nicht bekannt ist. Englische Bezeichnungen wurden übersetzt, soweit dies möglich war. Teilweise wurde nur für „Rezeptor“ die deutsche Schreibweise übernommen. Einige Namen sind nicht zu übersetzen, unter anderem, da eine Übersetzung jeglichen Zusammenhang mit der Abkürzung zerstören müsste. Mischübersetzungen tauchen da auf, wo ein Bezug zu einem übersetzbaren Rezeptor im Namen erscheint, etwa beim ERR. Dieses Vorgehen erscheint wenig einheitlich, die einzige stringente Methode aber wäre überhaupt nicht zu übersetzen.

2.1.6. Erkennung der DNA

2.1.6.1. Erkennungssequenzen auf der DNA / Response Elemente

Nukleäre Rezeptoren binden an hexamerische Erkennungssequenzen auf der DNA, welche man als Hormon Response Elemente (HRE) oder einfach nur Response Element (RE) bezeichnet. Diese Response Elemente liegen dabei innerhalb der Promotor Region des jeweiligen Gens, in Nachbarschaft zu Bindestellen für andere Transkriptionsfaktoren, etwa der TATA-Box für das TATA-Binde-Protein (TBP). Abgesehen von einigen der Orphan Rezeptoren, die als Monomere ihr Response Element erkennen, binden nukleäre Rezeptoren entweder als Homodimere oder als Heterodimere mit dem 9-*cis* Retinsäure Rezeptor (RXR) an die DNA, wobei der jeweilige Bindungspartner wiederum eine hexamerische Erkennungssequenz auf der DNA erkennt [25]. Unter Berücksichtigung der Sequenz auf dem Gegenstrang ergibt sich deshalb für die beiden Hexamere eine mehr oder weniger exakte palindromische Sequenz. Zwischen den beiden erkannten Hexameren können zwischen null bis acht Nukleotide eingefügt sein, wobei die Anzahl der Nukleotide an dieser Stelle von entscheidender Bedeutung ist, welcher Rezeptor das jeweilige Response Element erkennt. Des Weiteren gibt es Unterschiede bezüglich der Leserichtung, also der Orientierung des Rezeptors relativ zur DNA. Man unterscheidet Direct Repeat kurz (DR), wenn beide Hexamere in Leserichtung, also von 5' nach 3', angeordnet sind, Everted Repeat (ER), wenn die Leserichtung jedes Hexamers von innen nach außen ist und Inverted Repeat (IR), wenn beide Erkennungssequenzen aufeinander zulaufen [25]. Da die Konsensussequenzen der Hexamere für die jeweils beteiligten Rezeptoren nahezu identisch sind [41], kommt der Orientierung des Response Elements neben der Anzahl der eingeschobenen Nukleotide wesentlicher Anteil bei der Diskriminierung der Rezeptoren unter den verschiedenen Response Elementen zu.

EINLEITUNG

Dimerisierungspartner	Rezeptor Familie	Rezeptor	Art des Response Elements	Konsensus-Sequenz	aktivierbar durch RXR-Agonist	
RXR	2	RXR	DR-1 / IR-0		+	
		PPAR	DR-1		+	
	1	RAR	DR-1 (Repressor)	AGGTCA	nein	
				DR-5 / DR-2 / IR-0 / ER-8		+
		FXR	IR-1		+	
		VDR	DR-3	(A/G)G(G/T)TCA	nein	
		LXR	DR-4		+	
		TR	DR-4 / IR-0 / ER-6 / ER-8	(A/G)GGTCA	nein	
Homodimere	3	ER		(A/G)GGTCA		
		PR				
		GR	IR-3	AGAACA	-/-	
		MR				
		AR				
Monomere	3	ERR		tcAGGTCA		
	1	ROR	NR (no repeat)	wwcw(A/G)GGTCA	-/-	
	4	NGFIB		aaAGGTCA		
Mono- / Homodimer	1	rev Erb	NR / DR-2	wawnAGGTCA	-/-	
Mono- / RXR-Heterodimer	2	COUP	DR / IR	(A/G)GGTCA	-/-	

Tabelle 2: DNA-Bindung durch nukleäre Rezeptoren nach [25, 41].

Zu den Rezeptor Familien und den Abkürzungen für die Rezeptoren siehe auch Tabelle 1. Es bedeuten: DR: Direct Repeat, IR: Inverted Repeat, ER: Everted Repeat. Erläuterungen im Text. Basen: W = A oder T; N = A, T, G oder C.

Auch kommt es vor, dass je nach Response Element, welches erkannt wird, unterschiedliche Funktionen erfüllt werden. So hat das RAR/RXR Heterodimer an DR-1 Response Elementen teilweise Transkriptions-inhibitorische Funktion, statt einer Transkriptions-Aktivierung [42].

Zur eindeutigen Kennzeichnung der Art eines Response Elements gibt man das Kürzel für die Orientierung an, also etwa DR für Direct Repeat, gefolgt von einer arabischen Zahl für die Anzahl der eingeschobenen Nukleotide.

Konsensus-Sequenz für die hexamerische Sequenz, also die Hälfte eines Response Elements, ist bei Familie 3, also der Familie der Steroid-Rezeptoren, das Motiv AGAACA. Ausnahmen sind der Estrogen Rezeptor Related Rezeptor, welcher als Monomer bindet und der Östrogen Rezeptor, welche wie die meisten anderen Rezeptoren AGGTCA erkennen. Natürlich sind diese Konsensus-Sequenzen variabel und in den tatsächlich vorkommenden Response Elementen kaum einmal ideal verwirklicht. Aus der Tatsache aber, dass die meisten Rezeptoren ähnliche Hexamere erkennen und durch die

Dimerisierung, entweder mit einem Rezeptor desselben Typs oder mit RXR, wegen gleicher Erkennungssequenz auch keine größere Spezifität eingeführt wird, lässt sich darauf schließen, dass andere Elemente für die Bindungsspezifität zumindest mit verantwortlich sein müssen. Auch der Kontext, in den das jeweilige Response Element eingebettet ist, beeinflusst die Affinität des Rezeptors zu seinem Response Element und kann somit auch zur Bindungsspezifität beitragen. So ist vom Thyroid Rezeptor und von den als Monomeren bindenden Rezeptoren, welche ja nur eine hexamerische Erkennungssequenz aufweisen, bekannt, dass eine Helix, welche carboxyterminal der Zink-Finger in der DNA-Binde-Domäne gelegen ist (C-terminal extension kurz CTE) die Kontaktfläche zur DNA erweitert [25, 32, 33].

Zu einem weiteren Teil ist für die Spezifität der Rezeptoren in der Bindung an ihr Response Element natürlich die unterschiedliche Gewebeexpression der Rezeptoren verantwortlich. So werden etwa die Sexual-Hormon Rezeptoren in vielen Geweben nur in geringsten Mengen exprimiert und können damit natürlich nicht an Response Elemente binden und damit zur Gen-Transkription führen. Gleiches gilt auch für andere Rezeptoren. Ebenso können Response Elemente im jeweiligen Gewebe im Heterochromatin verborgen liegen, welches so dicht kondensiert ist, dass es einer Transkription nicht mehr zugänglich ist.

2.1.6.2. RXR-Heterodimere / Heterodimere mit dem 9-*cis* Retinsäure Rezeptor

Die meisten Mitglieder der Rezeptor-Familien 1 und 4, welche einander phylogenetisch näher stehen als den anderen Rezeptorfamilien, bilden Heterodimere mit dem 9-*cis* Retinsäure Rezeptor (RXR). Bei diesen fungiert RXR (abgesehen von den beiden hochaffinen Mitgliedern der Familie, dem Vitamin-D Rezeptor (VDR) und dem Thyroid Rezeptor (TR)) nicht nur als stiller Bindungspartner, sondern durch Bindung eines Agonisten auch als Transkriptions-Aktivator, auch dann, wenn sein Bindungspartner keinen Agonisten gebunden hat [25]. Beim Thyroid Rezeptor hingegen, kann dieser die Affinität des RXR zu seinem Liganden senken und so gegenüber dem RXR als Repressor fungieren [43].

Trotz dieser zentralen Bedeutung des 9-*cis* Retinsäure Rezeptors (RXR) für die Transkriptionsaktivität seines Dimerisierungspartners und umgekehrt dessen Wirkung auf den RXR, ist die Art dieser Bindung nicht bei allen Bindungspartnern stark konserviert. So

weisen mehrere der RXR-Heterodimere Response Elemente mit verschiedenen räumlichen Orientierungen der Rezeptoren zueinander auf. Der RXR und der TR z.B. werden sich an einem Direct Repeat Element einander andere Oberflächen präsentieren, als an einem Inverted oder Everted Repeat es sei denn es besteht eine freie Drehbarkeit um 180° zwischen DNA-Binde-Domäne und Liganden-Binde-Domäne. Auch kann im Falle eines Direct Repeat die DNA-Binde-Domäne zur Dimerisierung beitragen, während dies bei Inverted oder Everted Repeats wegen der dann veränderten konformativen Lage der Domänen zueinander nicht möglich ist [25].

Bei den DR3, DR4 und DR5 RXR-Heterodimeren nimmt der RXR die 5'upstream Halbseite des Response Elements in Anspruch [27, 28, 44]. An DR-1 Elementen hingegen dreht sich diese Polarität um und RXR besetzt die 3' oder downstream Hälfte des Response Elements [25], so etwa beim als Transkriptions-Repressor (s.o.) wirkenden RAR/RXR Dimer [45], welches an DR-1 Elemente bindet und bei den Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptoren [46, 47].

Wie bereits weiter oben angeführt, trägt neben der Sequenz auch die Art des Response Elements zur Diskriminierung der Rezeptoren gegenüber den Response Elementen bei. Im Falle der RXR-Heterodimere tritt beim Direct Repeat durch jede weitere Base, die zwischen den beiden Hexameren hinzukommt, eine Verwindung der beiden Rezeptoren gegeneinander um 36° auf, was dazu führt, dass RXR mit verschiedenen Dimerisierungspartnern unterschiedliche Kontaktflächen teilen kann.

2.1.7. Orphan Rezeptoren

Die Gruppe der „orphan“ (für Waise) Rezeptoren stellt eine sehr heterogene Gruppe von Rezeptoren mit Mitgliedern in allen sechs Familien nukleärer Rezeptoren dar. Wie bereits weiter oben ausgeführt, besteht die Gemeinsamkeit aller ihrer Mitglieder darin, dass sie aufgrund von Sequenzhomologien entdeckt und kloniert wurden, bevor ein Ligand für sie entdeckt werden konnte. Für einige von ihnen, vor allem diejenigen, welche Heterodimere mit RXR bilden -also die meisten Mitglieder der Rezeptor Familie 1 und RXR selbst- wurde aber inzwischen ein Ligand gefunden. Im Unterschied zu den Mitgliedern der Steroid-Rezeptor Familie mit Bindungstaschen von etwa 500 \AA^3 , sind die Bindungstaschen bei diesen Rezeptoren aber um einiges größer (zumeist $>1000 \text{ \AA}^3$), ohne das notwendigerweise auch die Liganden größer wären. Dies führt zu geringerer Selektivität

EINLEITUNG

und zumeist auch zu geringerer Affinität bezüglich der Liganden. Betrachtet man sich aber diese Klasse am Beispiel des Pregnan-X-Rezeptors mit seiner Funktion als Induktor von Cytochromen, welche an der Elimination lipophiler Xenobiotica aus dem Organismus beteiligt sind, so wird der Analogieschluss von der geringen Substratspezifität der Cytochrome zu der geringen Ligand-Spezifität ihres Induktors des PXR augenfällig. Ähnlich verhält es sich bei den anderen Orphan Rezeptoren, für die inzwischen ein Ligand gefunden wurde, abgesehen vom RXR, welcher bereits im nanomolaren Bereich auf seinen Liganden anspricht. Und so setzt sich diese große Gruppe der ursprünglich als Orphans entdeckten Rezeptoren eher mit äußeren denn mit internen Reizen auseinander.

Im Unterschied zu den „klassischen“ Hormon Rezeptoren werden die Liganden dieser Orphan Rezeptoren also zumeist exogen über die Nahrung zugeführt, oder aber sind zumindest Derivate von überwiegend über die Nahrung zugeführten Grundstoffen, die noch eine enge Beziehung zum ursprünglichen Molekül erkennen lassen. So stehen etwa die Gallensäuren und Oxysterole, als Liganden des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR) bzw. des Leber-X-Rezeptors (LXR) dem zumindest teilweise mit der Nahrung aufgenommenen Cholesterol näher, als zum Beispiel die Sexualhormone. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass aufgrund der ausgesprochenen Größe der Bindungstasche die Liganden für Orphan Rezeptoren zumeist gegenüber den „klassischen“ Hormonen eine wesentlich geringere Affinität zu ihrem jeweiligen Rezeptor aufweisen, mit Affinitätskonstanten (K_d) bzw. Aktivierungskonstanten (EC_{50}) im mikromolaren statt nanomolaren Bereich. Man könnte zusammenfassen, dass für diese Untergruppe eine ganze Reihe von natürlich in relevanten Mengen in unserer Ernährung vorkommenden Substanzen als affine Liganden bekannt sind, ja einige dieser Rezeptoren, wie der Pregnan-X-Rezeptor als Induktor von Cytochromen, scheinen geradezu geschaffen für die Auseinandersetzung des Organismus mit diesen exogen zugeführten Substanzen *Xenobiotica* und deren Elimination bzw. Aufrechterhaltung konstanter Konzentration innerhalb eines physiologischen Bereichs. Während „klassische“ Hormonrezeptoren, abgesehen von einer gerichteten Arzneimitteltherapie, durch exogene Einflüsse nur in ihrer Funktion gestört werden können, etwa durch die umwelttoxikologisch relevante Östrogen-artige Wirkung von Stilben-Derivaten und Weichmachern aus Plastik, scheinen zumindest einige der Orphan Rezeptoren in ihrer Funktion geradezu auf das Vorhandensein exogener Reize angewiesen zu sein.

2.2. PPAR - Die Familie der Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptoren

2.2.1. Allgemeines

In den 1970er Jahren wurde für eine Reihe von Substanzen der Name Peroxisomen Proliferator geprägt [48, 49], nachdem man festgestellt hatte, dass sie bei Nagetier-Spezies in der Leber zu einer Proliferation der Peroxisomen, Hepatomegalie und nachfolgendem Leberzellkrebs führen [50-53]. Zu diesen Substanzen gehörten unter anderem Weichmacher vom Phthalsäureester-Typ [54] und die Stoffklasse der Fibrate [55], für welche man bereits in den 1960ern Lipid senkende Effekte gefunden hatte [56] und die auch bereits in klinischen Studien eingesetzt wurden [57].

Im Jahre 1990 wurde dann von Issemann und Green [17] der PPAR α (NR1C1) kloniert und als Target der Peroxisomen-Proliferatoren erkannt, woraus sich der Name Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor ergab. Die beiden anderen Subtypen PPAR γ (NR1C3) und PPAR δ (NR1C2) wurden dann 1992 kloniert [58, 59].

Schließlich wurde entdeckt, dass Fettsäuren in Konzentrationen, die zumindest im Blutplasma erreicht werden, die PPARs aktiveren [59-61] und somit als endogene, wenn auch nicht sehr affine, Liganden betrachtet werden können. Schließlich wurde 1993 PPAR α als Target der Fibrate identifiziert [62] und 1995 PPAR γ als Target für die als Blutzucker senkend wirkende, bereits in Entwicklung befindliche [63-65], Substanzklasse der Thiazolidindione erkannt [66], welche wenig später als Insulin Sensitiser bekannt wurde [67] und in die Diabetes Therapie Einzug hielt.

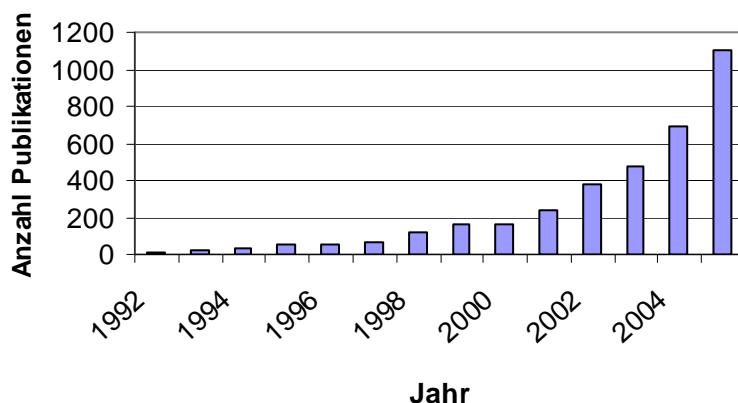


Abbildung 4:

Anzahl der Publikationen pro Jahr bei Verwendung des Suchbegriffs PPAR in der PubMed Database.

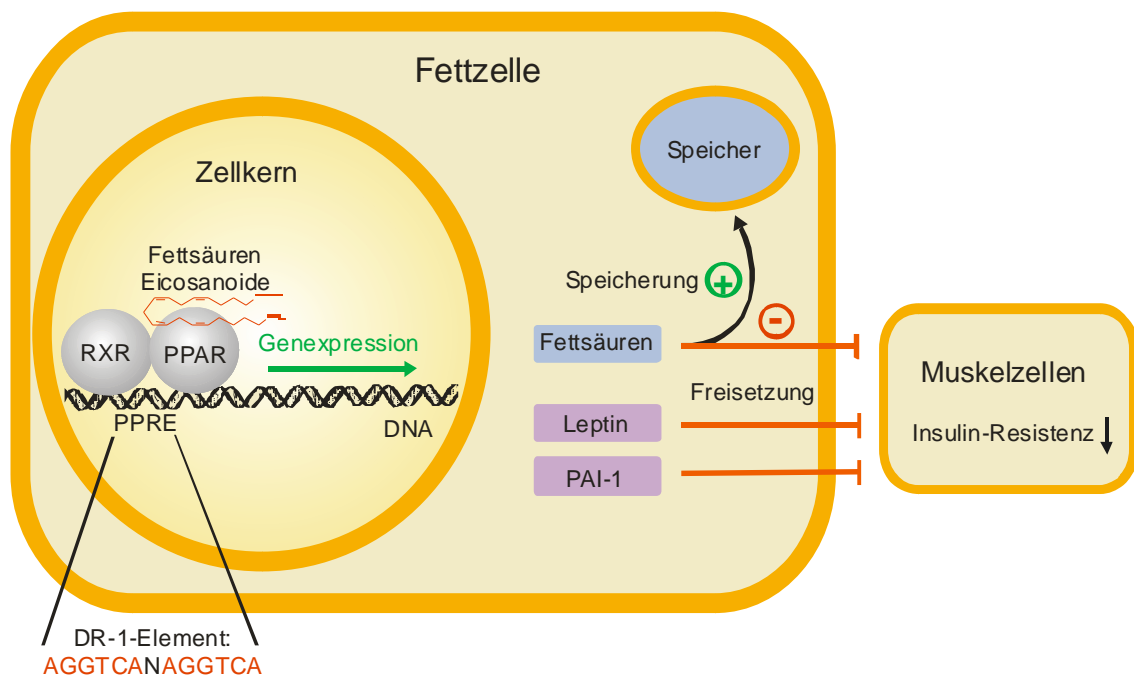
Seit ihrer Entdeckung erfahren die PPARs stetig wachsendes Interesse, was zum Teil darin begründet liegt, dass zwei der Subtypen bereits medizinisch genutzte Arzneistoff Targets darstellen.

2.2.2. Überblick

Die drei PPAR Subtypen mit freien Fettsäuren als endogenen Liganden stellen einen nukleären Sensor dar, welcher den Stoffwechsel an seine Bedürfnisse bezüglich Lipid- und Glukose-Homöostase anzupassen vermag. Die PPAR Signaltransduktionswege ergänzen und überschneiden sich hierbei an mehreren Stellen mit den Wirkungen von Insulin und dem membranständigen Insulin-Rezeptor, sowie weiterer am Energiehaushalt beteiligter Faktoren und ermöglichen so -über die Integration verschiedener Signale- eine Feinabstimmung.

PPARs erzielen ihre Wirkungen hierbei über die Induktion von Enzymen, die im primären Stoffwechsel von Fettsäuren und Glukose Schlüsselstellungen einnehmen.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der zellulären Funktion von PPAR am Beispiel des PPAR γ eines Adipocyten. (aus [68])



2.2.3. Chromosomale Lokalisation humaner PPARs, Genorganisation, mRNAs und resultierende Proteine

(siehe auch <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed> unter den Rubriken: Nukleotide, Gene, Protein. Im Text angegeben jeweils die zugehörige Accession Number)

2.2.3.1. PPAR α

Das Gen für den PPAR α (GeneID: 5465) liegt auf Chromosom 22 (Locus 22q12-q13.1) [69], erstreckt sich über 83,7 kiloBasen und enthält 8 Exons. Das mRNA Transkript (NM_005036) erstreckt sich über 10 kiloBasen. Drei weitere Transkriptvarianten, die sich in den nicht translatierten Bereichen leicht unterscheiden, sind beschrieben. Die kodierende Sequenz umfasst inklusive Stop-Codon 1407 Basenpaare der Exons 3-8 und kodiert dementsprechend für ein Protein von 468 Aminosäuren (NP_005027). Es existiert eine Isoform 2 (mRNA unter NM_032644), wobei das resultierende Protein carboxyterminal um 210 Aminosäuren verkürzt ist und somit nahezu die gesamte Liganden-Binde-Domäne, in jedem Falle aber die AF-2 Region eingebüßt hat, woraus sich ergibt, dass diese Isoform nicht aktivierbar ist.

Bei Isoform 1 des PPAR α umfasst die Domäne A/B die Aminosäuren 1-100, die DBD besteht aus den Aminosäuren 101-165, die hinge Region umfasst die Aminosäuren 166-243, und die Liganden-Binde-Domäne besteht aus den Aminosäuren 244-468.

2.2.3.2. PPAR δ (auch PPAR β , FAAR oder NUC1).

Die Bezeichnung PPAR δ wurde gewählt, weil der humane und andere Säugetier NR1C2- (PPAR δ) Isotypen aufgrund geringerer Sequenzhomologie, nicht eindeutig als Homologe des zuerst beschriebenen PPAR β aus *Xenopus* [58] auszumachen waren [24]. Da diese Bezeichnung auch die vom NCBI im PubMed bevorzugte Bezeichnung darstellt, werde ich sie an dieser Stelle für den NR1C2 benutzen.

Das Gen für den PPAR δ (GeneID: 5467) liegt auf Chromosom 6 (Locus 6p21.2-p21.1)[70]. Das mRNA Transkript (NM_006238) besteht aus 3328 Basenpaaren, mit einer kodierenden Sequenz von 1326 Basenpaaren (incl. Stop), woraus ein Protein (NP_006229) von 441 Aminosäuren resultiert. Auch hier ist eine Isoform 2 beschrieben (NM_177435), welche in einem carboxyterminal und damit in der AF-2 Domäne um 80 Aminosäuren

verkürzten Protein resultiert. Bei Isoform 1 besteht die A/B Domäne aus den Aminosäuren 1-71, die DBD aus 72-136, hinge Region aus 137-214 und die LBD aus 215-441.

2.2.3.3. PPAR γ

Vom PPAR γ sind drei Isoformen beschrieben, welche durch Nutzung unterschiedlicher Promotoren entstehen. Das Gen für den PPAR γ (GeneID: 5468) liegt mit mehr als 100 kiloBasen [24] auf Chromosom 3 (Locus 3p25) [71] und besteht aus 9 Exons. Beim PPAR γ_1 (NM_005037), mit dem am weitesten upstream gelegenen Promotor, werden alle Exons in das Primär-Transkript überführt, wobei das dritte Exon allerdings ausgespliced wird, beim PPAR γ_3 [72] wird zusätzlich das 1. Exon ausgelassen, beide PPAR γ_1 und PPAR γ_3 resultieren im selben Protein von 477 Basenpaaren (NP_005028). Beim PPAR γ_2 (NM_015869) werden zwar die beiden ersten Exons ausgelassen, dafür wird das dritte Exon nicht ausgespliced, wodurch ein Startcodon 84 Basenpaare upstream des bei den anderen beiden Isoformen genutzten Startcodons in der mRNA enthalten ist. Das resultierende Protein (NP_056953) ist somit aminoterminal um 28 Aminosäuren länger als die beiden anderen Isoformen und hat somit 505 Aminosäuren.

Bei PPAR γ_1 entfallen auf die A/B Domäne die Aminosäuren 1-109, auf die DBD die Aminosäuren 110-174, auf die hinge Region 175-250 und auf die LBD 251-477, bei PPAR γ_2 sind jeweils 28 Aminosäuren zu addieren.

Allen 3 PPAR Subtypen gemeinsam ist, dass die letztlich erhaltene mRNA aus 6 Exons resultiert, ein Exon auf die A/B Domäne entfällt, eine Domäne auf jeden der beiden Zink-Finger, eines auf die hinge Region und zwei Exons für die LBD [24].

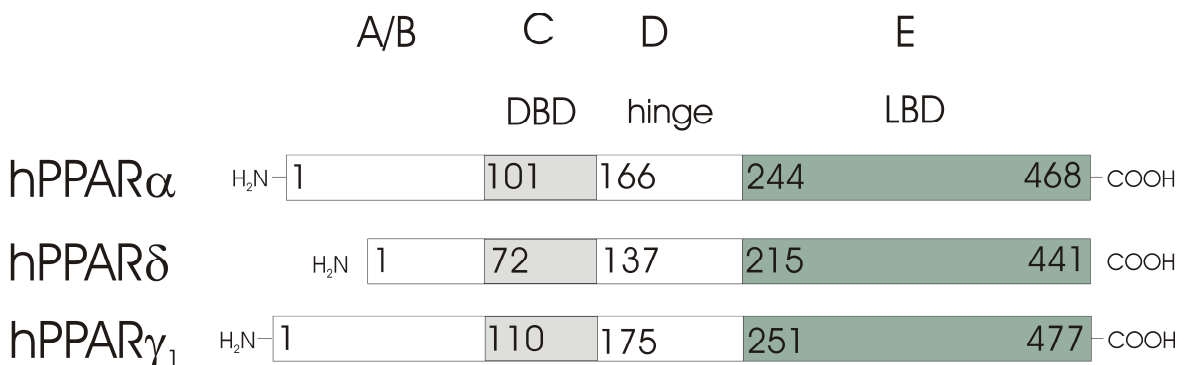


Abbildung 6: Vergleich der Domänen der drei PPAR Subtypen. Angegeben ist jeweils die Position der ersten Aminosäure einer Domäne, bei der LBD auch die letzte. Dargestellt sind jeweils die Isoformen 1 mit funktioneller LBD. Domäne F fehlt im PPAR (nach [24]).

			Helix 1		Helix 2		s1	Helix 2'		
hPPARg	aa 203	QlNPEs	ADLr	ALAKHlYdsY	iKsFplTKaK	ARaILTgKtt	dksPFVIyDM	nsLmMgEdki	kfKhitplqe	
hPPARd	aa 167	QyNPqv	ADLK	AfsKHIYnAY	LKNFNMTKkK	ARsILTgKAS	htaPFVIHDi	ETLwqAEKgL	VwKqlvNGlp	
hPPARa	aa 195	iedsEt	ADLK	sLAKrIYeAY	LKNFNmNkVvK	ARvILsGKAS	nnpPFVIHDM	ETLcMAEKtL	VaKlvaNGiq	

			Helix 3		H3'	Helix 4		Helix 5		s2	s3
hPPARg	aa 273	qsKEvaiRIE	ggCQfrSVEa	VqEiTEyAKS	IPGFvNLDLN	DQVTLLKYGV	HEiIytMLAS	lMNKDGvLis			
hPPARd	aa 237	pyKEisvhVE	yrCQCTtVET	VrELTEFAKS	IPsFsslFLN	DQVTLLKYGV	HEAIFAMLAS	ivNKDGLLVA			
hPPARa	aa 265	nkeae_vRIE	hcCQCTSVET	VtELTEFAKa	IPGFaNLdLN	DQVTLLKYGV	yEAIFAMlSs	vMNKDGmLVA			

			s4	Helix 6		Helix 7		Helix 8		Helix 9.....
hPPARg	aa 343	eGqGFmTREF	LKSLRKPFgD	fMEPKFEFAV	KFNALELDDS	DLAIFIAvII	LsGDRPGLLN	VkpIEdIQDn		
hPPARd	aa 297	nGsGFvTREF	LrSLRKPFsD	IiEPKFEFAV	KFNALELDDS	DLALFIAAII	LCGDRPGLmN	VprvEaIQDt		
hPPARa	aa 335	yGnGFiTREF	LKSLRKPFcD	IMEPKDFFam	KFNALELDDS	DisLFvAAII	cCGDRPGLLN	VghIEkmQeg		

	Helix 9		Helix 10		AF-2 Helix		
hPPARg	aa 413	lLqALELqLk	lNHPEssqLF	aKLLQKMtDL	RQiVTEHvQL	lQvIKKTETD	mSLHPLLQEI	YKDlY
hPPARd	aa 367	ILrALEfHLQ	aNHPEdaqyLF	PKLLQKMADL	RQLVTEHAQm	mQrIKKTETe	tSLHPLLQEI	YKDMY
hPPARa	aa 405	IvhvLrLHLQ	sNHPEdifLF	PKLLQKMADL	RQLVTEHAQL	vQiIKKTESD	aaLHPLLQEI	YrDMY

		P-Box		D-Box		CTE		
hPPARg	aa 110	ECRVCGDK	ASGFHYGVHA	CEGCKGFFRR	TIRLKLiyDr	CdlnCrIhKK	sRNKCQYCRF	qKCLAvGMSHNAIRFGRMPqAEKeKLLAEI
hPPARd	aa 72	mECRVCGDK	ASGFHYGVHA	CEGCKGFFRR	TIRmKLeYeK	ceRSCKIQKK	NRNKCQYCRF	qKCLAlGMSHNAIRFGRMPrsEKaKLkAEI
hPPARa	aa 101	ECRiCGDK	ASGyHYGVHA	CEGCKGFFRR	TIRLKLvYDK	CDRSCKIQKK	NRNKCQYCRF	hKCLsvGMSHNAIRFGRMPeAEKrKLvAgI

Abbildung 7: (siehe vorherige Seite) Sequenzvergleich der drei humanen PPARs (nach [24])

Oberer Abbildung: Sequenzvergleich der LBDs

■ Aminosäuren, die an der Ligand Bindung beteiligt sind

■ Aminosäuren, die an der Interaktion mit SRC-1 beteiligt sind

■ Aminosäuren, die wahrscheinlich zur Dimerisierung mit RXR beitragen

Angegeben sind außerdem oberhalb der Sequenzen für PPAR γ , Helixstrukturen (Helix 1-10 und AF-2) und β -Faltblätter (s1-s4). Kurz vor und am Anfang der AF-2 liegt ein LxxLL Motiv, welches unterstrichen ist.

Untere Abbildung: dito für DBDs

■ Cystein-Reste, welche an der Zink-Koordination beteiligt sind.

Eingezeichnet sind ferner die P- und die D-Box sowie die C-terminal extension (CTE)

Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code, Großbuchstaben stehen für Aminosäuren, die in zwei der PPARs identisch sind, bei Identität in allen Subtypen außerdem Fettdruck.

2.2.4. DNA Erkennung

Wie bereits angeführt, binden die PPARs als Heterodimere mit RXR überwiegend an DR-1 Elemente auf der DNA, wobei PPAR die upstream Halbseite einnimmt, im Gegensatz zu anderen RXR-Heterodimeren mit DR-3 bis DR-5 Elementen, bei denen RXR die upstream Position einnimmt [46, 47, 73-75]. Neben den DR-1 Elementen scheint für die effektive Bindung von PPAR an eine Promotor-Region auch die 5'-flankierende Region des DR-1 Elements von Bedeutung zu sein, an welche der PPAR mit der Carboxy-terminal-extension (CTE), also dem Bereich carboxyterminal des zweiten Zink-Fingers, der DNA-Binde-Domäne bindet: Hieraus ergibt sich auch die Notwendigkeit, dass der PPAR die upstream Position innerhalb des Heterodimers einnimmt. Zusammen mit dieser 5'-flankierenden Sequenz zeigt das Response Element des PPAR Ähnlichkeit mit dem der als Monomere bzw. Homodimere bindenden ROR und rev-Erb α , und tatsächlich bindet PPAR α zumindest *in-vitro* als Heterodimer mit RXR α an DR-2 Elemente, die die Erkennungssequenz des ROR und rev-Erb α enthalten und wirkt hier als Transkriptions-Aktivator. Aus der Dimerisierungs-Polarität ergibt sich weiterhin, dass -anders als bei anderen RXR-Heterodimeren- beim PPAR/RXR Heterodimer nur die LBD zur Dimerisierung beiträgt, nicht aber die DBD. Mitverantwortlich hierfür ist eine im PPAR ungewöhnlich modifizierte D-Box, welche normalerweise mit einigen Aminosäuren zur Dimerisierung beiträgt. Diese weist im PPAR nur drei, statt der sonst üblichen fünf Aminosäuren zwischen den Cysteinen des ersten Paares auf [73]. Bisher bekannte PPREs enthalten 5' des DR-1 Motivs eine AT-reiche Sequenz, für die für die ersten vier Basen

upstream des DR-1 A(A/T)CT als Konsensus-Sequenz gefunden wurde, so dass als erweiterte Konsensus-Sequenz für das Response Element der PPARs gilt A(A/T)CT(A/G)GGTCA(a/t)AG(G/T)TCA, wobei allerdings die natürlich vorkommenden PPAR Response Elemente keine perfekte Konsensus-Sequenz enthalten [73, 76].

Da die PPAR Subtypen in verschiedenen Geweben ko-exprimiert werden, stellt sich die Frage nach der selektiven Erkennung der Response Elemente durch die verschiedenen Subtypen. Nach [76] scheint PPAR γ an allen (zumindest der hier untersuchten) Response Elemente mit der höchsten Affinität zu binden, während PPAR α und PPAR δ mit zum Teil wesentlich geringerer Affinität als PPAR γ , aber untereinander etwa im selben Maße binden. Juge-Aubry et al schlagen in ihrer Arbeit ein Klassifizierungssystem in starke, mittlere und schwache Response Elemente vor, wobei PPAR γ an den starken DNA-Bindeelementen kaum stärker als PPAR α und PPAR δ bindet, zu den mittleren Bindeelementen etwa die doppelte Affinität aufweist, bei schwachen Response Elementen aber nahezu ausschließlich bindet.

Ein weiterer Aspekt erfasst den präferentiellen Heterodimerisierungspartner, also den jeweiligen RXR-Subtyp. Hierbei zeichnet sich die Tendenz ab, dass PPAR γ vor allem an schwachen Response Elementen bevorzugt mit RXR γ dimerisiert, während PPAR α und PPAR δ hier entweder nur wenig diskriminieren, oder aber den RXR α bevorzugen. Hierdurch mag auch der im jeweiligen Gewebe ko-exprimierte RXR-Subtyp als Dimerisierungspartner auf die PPAR vermittelte Genexpression Einfluss zu nehmen.

In-vitro wurde die Interaktion anderer an DR-1 Elemente bindender RXR-Heterodimere mit einem PPRE aufgezeigt z.B. für HNF-4 und COUP-TF, sowie die Bindung des PPAR-RXR-Dimers an ein Östrogen Respons Element. Ob diese Befunde allerdings *in-vivo* von Relevanz sind, also zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Genexpression führen, ist derzeit noch unklar [24].

2.2.5. Gewebespezifische Expression und Physiologische Funktion

Wie oben angeführt, besteht lediglich eine gering ausgeprägte Rezeptor-Selektivität der verschiedenen PPAR-Subtypen zu den Response Elementen der regulierten Gene. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass einige Response Elemente nahezu ausschließlich von PPAR γ erkannt werden. Somit muss die unterschiedliche physiologische Funktion der PPAR-Subtypen wesentlich aus ihrem Expressionmuster in den jeweiligen Gewebetypen resultieren. Dies spiegelt sich auch beim pharmakologischen

Angriff an den PPAR Rezeptoren durch Arzneistoffe wieder, bei dem sich die erzielten Effekte hauptsächlich durch die unterschiedlichen Zielgewebe erklären lassen. Neben der entwicklungs-physiologischen Bedeutung von PPAR, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll, entfalten die PPARs in adulten Geweben vielfältige physiologische Funktionen, wobei sie vorrangig bei der Lipid- und Glukose-Homöostase mitwirken und hier vornehmlich die Expression von PPAR α in der Leber und die von PPAR γ im Fettgewebe für diese Wirkung verantwortlich sind. Daneben werden die PPARs aber auch in vielen anderen Geweben exprimiert, was einige ihrer pleiotropen Effekte verständlich macht, etwa die experimentell, präklinisch und zum Teil auch klinisch beobachteten antientzündlichen Effekte von PPAR Agonisten [77-99].

Wie auch von anderen nukleären Rezeptoren bekannt, induzieren PPAR Agonisten die Expression von PPAR selbst [100-102].

2.2.5.1. PPAR α

Die Leber stellt eines der Organe bzw. Gewebetypen mit der höchsten Expressionsrate an PPAR α dar [103-107]. Anhand dieses Expressionsmusters ergibt sich die vorrangige Funktion von PPAR α , nämlich die Regulierung des Lipid-Stoffwechsels. In der Leber reguliert der PPAR α , wenn er auf erhöhte Konzentrationen seiner endogenen Liganden also langkettiger Fettsäuren trifft, die Expression von Apolipoproteinen und Lipoproteinlipasen. Dies bewirkt eine erhöhte Aufnahme vor allem von VLDL (Very Low Density Lipoprotein) aus dem Blut in die Leberzellen, also des Typs von Lipoprotein welcher einen relativ hohen Anteil an Triglyceriden und (etwas geringer) an Cholesterolestern enthält. Ferner werden in der Leberzelle diejenigen Proteine vermehrt exprimiert, welche an der intrazellulären Bindung freier Fettsäuren (FABP – Fatty Acid Binding Protein) und deren Verwertung (Acyl-CoA-Oxidase und Acyl-CoA-Synthase) beteiligt sind.

Die physiologische Funktion besteht also darin, erhöhte Blutspiegel an Fettsäuren zu erkennen und in ein gegen-regulierendes Signal umzusetzen. Diese Wirkung macht man sich medizinisch beim Einsatz der Fibrate -als Agonisten des PPAR α - bei Hyperlipidämien zunutze. Hierbei kommt es primär zu einer Senkung der Triglycerid-Werte, durch die gleichzeitige Aufnahme von Cholesterol werden allerdings sekundär auch dessen Blutwerte gesenkt. Durch die vermehrte Expression von Apolipoproteinen kommt es

außerdem zu einem Anstieg des HDL-Cholesterols. Darüber hinaus wird der PPAR α auch im Herzen, der Niere, der Skelettmuskulatur, im großen Intestinum, in Keratinocyten und in Immunzellen, teilweise allerdings erst nach Induktion, in relevanten Mengen transkribiert und exprimiert [82, 85, 106, 108-112].

2.2.5.2. PPAR γ

Wird vornehmlich im Fettgewebe exprimiert und nimmt hier wesentlichen Anteil an der Ausreifung der Prä-Adipocyten [104, 113-115]. Durch den regulatorischen Eingriff in die Expression der Proteine, die für eine ausreichende Versorgung der Fettzelle mit Nährstoffen sorgen, führt eine Aktivierung von PPAR γ außerdem zu einem Größenwachstum der Fettzelle und damit zu einer Hyperplasie des Fettgewebes. Hierbei nimmt präferentiell allerdings das subkutane Fettgewebe -also das Speicherfett- zu, im Gegensatz zum intraabdominalen Fettgewebe, welches der schnellen metabolischen Verwertbarkeit dient [116-119]. Neben der vermehrten Aufnahme von Lipiden aus dem Blut, analog der PPAR α induzierten Aufnahme von Lipiden in die Leber, geschieht dies vor allem auch durch eine vermehrte Glukose-Aufnahme über Induktion der entsprechenden Transport-Proteine etwa der Glukose-Transmembran-Transporter GLUT-2 und GLUT-4 [120-123]. Da das Fettgewebe allerdings nur zu einem geringen Anteil an der Glukose-Verwertung beteiligt ist, im Gegensatz zum quergestreiften Muskel-Gewebe, welches PPAR γ nur gering exprimiert, ist der Blutzucker senkende Einfluss einer PPAR γ -Aktivierung allein über diese Effekte noch nicht ausreichend erklärt.

Vielmehr spielt bei der zu beobachtenden PPAR γ vermittelten Senkung des Blutzuckerspiegels und der gesteigerten Wirksamkeit von Insulin unter dem Einfluss von PPAR γ -Agonisten auch der Eingriff in die Freisetzung von Adipoycten-Mediatoren etwa des Tumor Nekrose Faktors α (TNF α) und Leptin eine Rolle. Auf diese Art und Weise wird die Insulin-Resistenz, welche typischerweise mit einem Typ II Diabetes einhergeht, durch PPAR γ antagonisiert.

PPAR γ knock-out Experimente geben Aufschluss über die für Antagonisierung der Insulin-Resistenz verantwortlichen Gewebe. Während homozygote PPAR γ knock-out Mäuse aufgrund plazentärer Insuffizienz die embryonale Phase überleben, konnten sowohl Fett- als auch Muskel-gewebespezifische homozygote knock-out Mäuse hergestellt werden. Die Fett-Gewebe spezifischen knock-outs und Versuche mit Fett-Gewebe

insuffizienten Tieren, haben hierbei die essentielle Rolle dieses Gewebetyps und des hier exprimierten PPAR γ für die Antagonisierung der Insulin-Resistenz erwiesen, da beides zu Tieren führte, welche Insulin-Resistenz entwickelten [124-127]. Darüber hinaus führt die Muskel-Gewebe spezifische Deletion des PPAR γ , trotz der hier sehr geringen Expressionsrate, aber auch zu Insulin-resistenten Tieren [128-131].

Für den unter anderem von Adipocyten freigesetzten Mediator TNF α , wurden die Insulin-Resistenz fördernde Wirkungen bereits aufgezeigt [132-136]. PPAR γ aber ist nun imstande TNF α sowohl auf der Expressionsebene, also der Freisetzung durch das Fettgewebe, als auch auf der Ebene der Signaltransduktion zu inhibieren [132-135, 137-142]. Im Gegensatz dazu zeigt PPAR γ synergistische Effekte, im Sinne einer positiven Rückkopplung, mit Adiponectin, einem Adipokin, welches imstande ist, die Effekte von Insulin zu verstärken [143-146].

Weiterhin senken PPAR γ Agonisten die Spiegel der Adipocytokine Leptin und Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1).

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Fettgewebe, in Folge der Aktivierung des PPAR γ , einerseits durch Senkung der Plasmaspiegel an freien Fettsäuren und damit deren lipotoxischer Effekte, andererseits durch PPAR γ induzierte hormonelle Regelkreise eine Insulin-Resistenz verhindert. Darüber hinaus scheint aber auch die geringe Expression und Aktivierung des PPAR γ im Muskelgewebe für eine Verhinderung der Insulin-Resistenz von Bedeutung zu sein [24, 68, 94, 127, 143, 147-153].

2.2.5.3. PPAR δ

Während für die beiden anderen PPAR Subtypen anhand pharmakologischer Eigenschaften der medizinisch genutzten Agonisten, die physiologische Funktion als weitestgehend bekannt betrachtet werden kann, ist über die Funktion des PPAR δ eine klare Aussage nicht zu treffen. Bekannt ist zum einen die entwicklungsphysiologische Bedeutung, mit hohen Expressionsraten in embryonalen Geweben, welche die der anderen PPAR Subtypen bei weitem übertrifft und deren jeweiliger Expression auch zeitlich vorangeht. Daneben zeichnen sich für PPAR δ Funktionen bei der Angiogenese, bei der Verwertung von Glukose durch die quergestreifte Muskulatur und bei der Wundheilung ab. Darüber hinaus ist eine inhibitorische Wirkung auf die anderen PPAR Subtypen beschrieben.

2.2.6. Regulation der Aktivität von PPAR

2.2.6.1. Ligand abhängige Aktivierung

Aufgrund ihrer relativ großen Bindungstaschen binden die PPARs relativ unselektiv eine Vielzahl von Liganden und mit relativ niedriger Affinität im Vergleich zu „klassischen“ Hormon-Rezeptoren. So werden Fettsäuren -als endogene Liganden- im relativ hoch mikromolaren Bereich (welcher mit den Plasmaspiegeln korreliert) gebunden und zwar umso besser, je höher die Anzahl der Doppelbindungen ist und unter Bevorzugung von PPAR α . Im niedrig mikromolaren Bereich binden von mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Cyclooxygenase (COX) oder Lipoxygenase (LO) abgeleitete Eicosanoide, wobei die hier für diese instabilen Metaboliten doch relativ hohen Konzentrationen, durch die intrazelluläre Lokalisation von COX und LO ebenfalls *in-vivo* erreicht werden könnten.

PPAR verhält sich hier gegenüber den meisten Liganden eher promiskuitiv und wird durch Bindung dieser Liganden in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor aktiviert.

Wie aus den zahlreichen publizierten Kristallstrukturen von PPAR klar hervorgeht, ergibt sich bei der Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden, in Analogie zur Aktivierung anderer nukleärer Rezeptoren, eine Konformationsänderung, bei der die Helix 12 aus der frei beweglichen in eine fixierte Position schwenkt, bei der sie die Liganden-Bindetasche nach außen hin abschirmt. Neben Helix 12 tragen zur Bildung der lipophilen Bindungstasche Aminosäuren der Helices 3, 5 und 11, die β -Faltblätter s1 und s2 und einige Loops bei. Durch die bei der Aktivierung stattfindenden Konformationsänderungen werden Interaktionsflächen für Transkriptions-Cofaktoren freigelegt und die Bindung an die DNA ermöglicht [40]. Die Stabilisierung der Helix 12 wird hierbei durch Wasserstoffbrücken-Interaktion der Carboxyl-Kopfgruppe oder einer isosteren sauren Kopfgruppe mit spezifischen Histidin und Tyrosin Resten der Helix 12 und der Helices 5 und 10 erreicht. Die mit mehr als 1300 Å³ sehr große Bindungstasche der PPARs wird hierbei im Gegensatz zu den wesentlich kleineren Bindungstaschen vieler, zumindest aber der, der „klassischen“ (Steroid-) Hormon-Rezeptoren auch zu einem wesentlich geringeren Anteil vom Liganden ausgefüllt. Die Liganden-Bindungstasche ist relativ lipophil und kann nach einem Modell in verschiedene Elemente unterteilt werden, eine Akzeptor-Position für die saure Kopfgruppe, eine Linker-Region und drei, bei den verschiedenen Subtypen unterschiedlich ausgeprägte, Bindungstaschen: eine proximale und zwei distale [154].

2.2.6.2. Beeinflussung der PPAR Aktivität durch Phosphorylierung oder RXR Agonisten

Wie bereits angeführt, kann PPAR durch z.B. Insulin vermittelte Phosphorylierung, vor allem der AF-1 Domäne [22, 155-162], oder als permissives Heterodimer auch von RXR Agonisten aktiviert werden [61, 163-167]. Wobei man im Falle der RXR Agonisten allerdings -sowohl aus pharmazeutischer als auch aus pharmakologischer Sicht- einschränkend sagen muss, dass aufgrund der mangelnden Selektivität von RXR selbst eine pharmazeutische Anwendung derzeit nicht möglich ist. Weiterhin ist noch nicht völlig geklärt, ob der Effekt der RXR Agonisten nicht eher durch RXR-Homodimere, denn durch PPAR-RXR-Heterodimere bewirkt ist [24].

	PDB ID	Ligand	Dimer	Ref.
PPAR α	1I7G	Tesaglitazar	-/-	[168]
	1KKQ	Antagonist (GW6471)	NCoR2	[169]
	1K7L	GW409544	SRC	[170]
PPAR δ	2J14	Compound	-/-	[171]
	2B50	Fettsäure	-/-	[172]
	2AWH	Fettsäure	-/-	[172]
	2BAW	Fettsäure	-/-	[173]
	1Y0S	GW2331	-/-	[174]
	3GWX	EPA	-/-	[175]
	2GWX	apo	-/-	[175]
	1GWX	GW2433	-/-	[175]
PPAR γ	1NYX	Ragaglitazar	-/-	[176]
	1KNU	Derivat von Ragaglitazar	-/-	[177]
	1I7I	Tesaglitazar	-/-	[168]
	1PRG	apo	-/-	[178]
	2PRG	Rosiglitazon	-/-	[178]
	4PRG	Partial-Agonist (GW0722)	-/-	[179]
	2HFP	Compound	SRC	[180]
	2GTK	Compound	NRC1	[181]
	2ATH	Compound	-/-	[182]
	2G0H	Compound	-/-	[183]
	2G0G	Compound	-/-	[183]
	2FVJ	Partialagonist	NRC1	[184]
	1ZEO	Compound	-/-	[185]
	2F4B	Compound	-/-	[186]
	1RDT	Retinoid (an RXR) + Farglitazar	RXR	[187]
	1WM0	Compound	NRC2	[188]
1FM9	Rexinoid (an RXR) + Rosiglitazon	RXR / SRC	[189]	
1FM6	Rexinoid (an RXR) + PPAR Agonist	RXR / SRC	[189]	

Tabelle 3: Bisher veröffentlichte PPAR Kristallstrukturen

2.2.7. Cofaktoren von PPAR

2.2.7.1. Corepressoren

Corepressoren verhindern das Rekrutieren von Transkriptions-Cofaktoren und teilweise die DNA-Bindung. Für PPAR ist gezeigt worden, dass es in nicht DNA-gebundener, also inaktiver Form den Nuclear Receptor **Co**Repressor (N-CoR) und den Silencing Mediator for **R**etinoid and **T**hroid Hormone Receptor (SMRT) bindet [47, 190]. Anders als z.B. TR und RAR scheint PPAR also in inaktiver Form nicht als DNA-gebundener Transkriptions-Repressor an seinen Response Elementen zu fungieren.

2.2.7.2. Co-Aktivatoren

Durch Ligand-abhängige Aktivierung rekrutiert PPAR z.B. den Steroid **R**eceptor **C**oactivator **1** (SRC1) durch Bindung an LXXLL Motive [191, 192]. Weitere beschriebene Co-Aktivatoren sind **PPAR** **B**inding **P**rotein (PBP auch TRAP220 oder DRIP230), **PPAR** **I**nteracting **P**rotein (PRIP), CREB Binding Protein (CBP/p300), **PPAR** γ **C**oactivator 1 und 2 (PGC) und das Androgen Receptor associated Protein 70 [193-200]

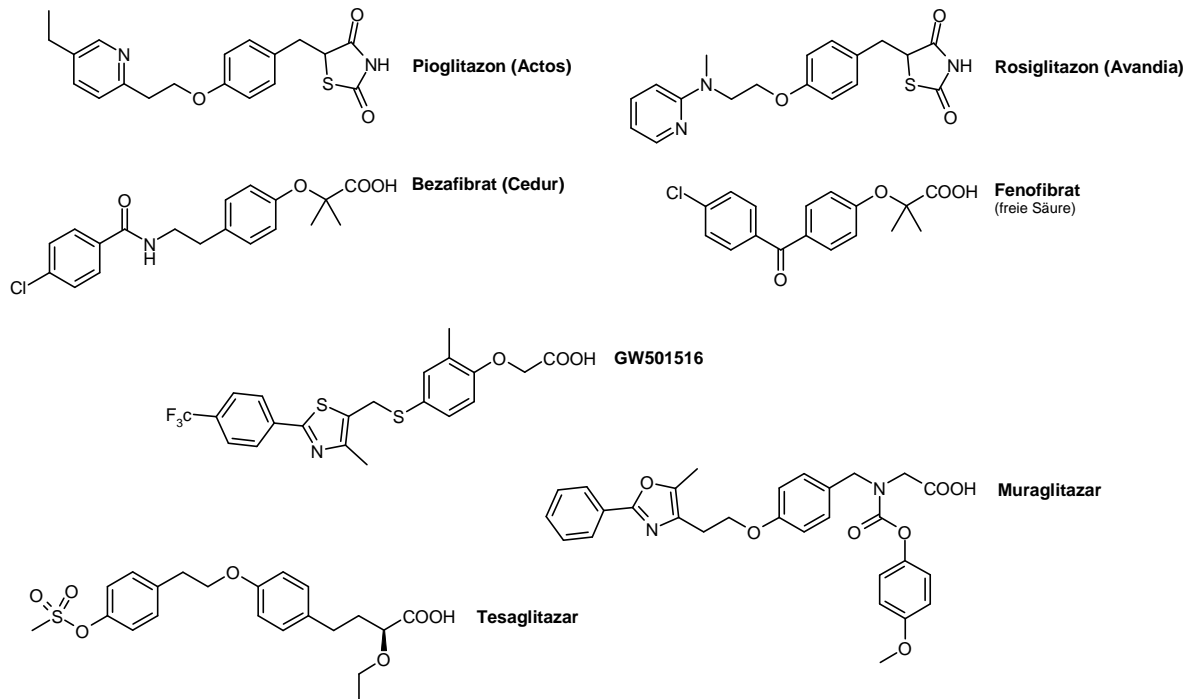
2.2.8. Liganden und klinische Wirksamkeit

Wie bereits angeführt, verhalten sich die PPARs eher promiskuitiv was ihre Liganden betrifft, was auch die Vielzahl an -in den letzten Jahren publizierten- Substanzen und verschiedenen Leitstrukturen erklärt, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Neben den als endogene Liganden angesehenen Fettsäuren und Eicosanoiden sind derzeit aufgrund ihrer pharmazeutischen Anwendung die Stoffklassen der Fibrate (als PPAR α Aktivatoren) und der Thiazolidindione (auch TZDs oder Glitazone als PPAR γ Aktivatoren) am meisten relevant. Der klinische Einsatz dieser Substanzen liefert darüber hinaus auch wichtige Daten über die *in-vivo* Effekte der PPAR Aktivierung. So bewirken Fibrate eine Senkung der Plasmaspiegel von Triglyceriden und in geringerem Umfang von LDL und bewirken darüber hinaus eine Erhöhung der HDL-Spiegel. Auch wenn aufgrund ihres langen klinischen Einsatzes hier sehr viele klinische Studien vorliegen, konnte allerdings nur bedingt eine Senkung der (kardiovaskulären-) Mortalität aufgezeigt werden.

EINLEITUNG

Etwas anders sieht dies aus bei den Glitazonen, von denen Pioglitazon in der PROactive Studie eine Senkung der Mortalität bewirkte. Bewirkt sein dürfte dies durch die PPAR γ abhängige Senkung der Spiegel an freien Fettsäuren, Glukose und glykosilierten Proteinen etwa Hämoglobin (HbA_{1c}).

Abbildung 8: Klinisch eingesetzte PPAR γ Agonisten (Rosiglitazon und Pioglitazon), das *pan*-PPAR-agonistische Bezafibrat, das PPAR α selektive (Faktor 10) Fenofibrat. GW501516 ist ein in der klinischen Entwicklung befindlicher PPAR δ Agonist, Muraglitazar und Tesaglitazar stellen zwei duale PPAR α/γ Agonisten dar, welche allerdings in der klinischen Prüfung gescheitert sind.



3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Substanzen

Der PPAR γ Agonist Pioglitazon in der Form des Hydrochlorids, der PPAR δ Agonist L165,041, der PPAR α Agonist Wy14,643 und der irreversible PPAR γ Antagonist T0070907 wurden bei Merck Biosciences GmbH (Bad Soden, Deutschland) gekauft. Der PPAR α Agonist GW7647 und die Fettsäuren Eicospentaen-, Docosahexaen-, Linol-, Linolen- und Ölsäure wurde bei Sigma Aldrich GmbH (München, Deutschland) erworben, ebenso die Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Glimepirid und das Glinid Repaglinid, sowie die Phytochemikalien Ursolsäure, Rosmarinsäure, Oleanolsäure und Apigenin. Carnosolsäure und Carnosol stammten von Axxora Deutschland GmbH (Grünberg, Deutschland). Der kommerziell erhältliche Rosmarin Extrakt CA (Art. 20000 batch 4419010) der Firma Raps GmbH & Co KG (Kulmbach/Deutschland) wurde uns von dieser Firma kostenlos zur Verfügung gestellt. Butylhydroxytoluol und DL- α -Tocopherol wurden von Supelco (Bellefonte/PA, USA) bezogen.

3.1.2. Drogenmaterial

Das Drogenmaterial wurde zum überwiegenden Teil über die Apotheke, in pharmazeutischer Qualität und als getrocknete Ware bezogen. Lieferanten waren hierbei die Firmen Caelo (Hilden, Deutschland), Klenk (Schwebheim, Deutschland) und Bombastus (Freital, Deutschland) (siehe Tabelle). Einige der Drogen wurden in Form der frisch geernteten Pflanzenteile vom Botanischen Garten Frankfurt bezogen und ebendort identifiziert. *Daucus carotae* herba stammte aus eigener Sammlung von einer Population am Riedberg bei Niederursel und wurde auch selbst identifiziert. Drogen, die aus der traditionellen chinesischen Medizin stammen, wurden als solche über die Apotheke bezogen. Einige allgemein verwendete Gewürze und Genussmittel wie Kaffee, schwarzer Tee, getrocknetes Knoblauch und Zwiebelpulver wurden in nicht pharmazeutischer Qualität im Supermarkt erworben. Rückstellmuster der Drogen sind am Institut für pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität, Gebäude N240, Raum 3.21 Marie Curie Str. 9 in 60439 Frankfurt einzusehen. Stammpflanze, Vernakular,

Pflanzenfamilie, verwendete Droge, Bezugsquelle und das Droge-Extrakte-Verhältnis (DEV; englisch *DER*) des aus dieser Droge hergestellten Extraktes sind publiziert und im Anhang dieser Arbeit zu finden [1].

3.1.3. Reagenzien

Das Transfektionsreagenz LipoTaxi wurde bei Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande) erworben, das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 bei Invitrogen GmbH (Karlsruhe Deutschland) und Dual-Glo Luciferase Assay System bei Promega GmbH (Mannheim, Deutschland). Dimethylsulfoxid stammte von Sigma Aldrich. Lösungsmittel und Kieselgel 60 wurden in laborüblicher Qualität und den jeweiligen Erfordernissen entsprechend verwendet. Für die DC wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.1.4. Hochleistungs Flüssig Chromatographie (HPLC)

Eisessig p.a. und wasserfreies Natriumacetat suprapure stammten von Merck (Darmstadt/Deutschland), gradient grade Methanol von der Firma Roth (Karlsruhe/Deutschland). Die verwendete HPLC Anlage stammte von der Firma Waters (Milford/USA) und bestand aus einem Waters 600 Controller, einem Waters 2487 UV Detektor und einem Waters 717plus Autosampler unter Verwendung der Millennium 4.00 Software. Als Säule wurde für die Analytik des Salbei Extraktes eine Nucleodur column 100-5 C18ec (125/2mm) Umkehrphasensäule der Firma Macherey-Nagel (Düren/Deutschland) verwendet. Für die Analytik des Rosmarin Extraktes wurde eine LiChrospher column 100 RP-8 5µm (125/4) der Firma Merck (Darmstadt/Germany) verwendet.

3.1.5. Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien Dulbecco's modified Eagle medium Glutamax high glucose (4,5 g/L) with phenolred (DMEM rot), sowie dasselbe Medium ohne Phenolrot (DMEM weiß), das Transfektionsmedium Optim-MEM I with Glutamax, die 100-fache Stammlösung 1 mM Natrium Pyruvate und die 100-fache Stammlösung von Penicillin und Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 mg/L Streptomycin als Endkonzentration) stammten von Invitrogen. Fetales Kälberserum (FCS) wurde bei Sigma Aldrich erworben, die 100-fache

Stammlösung von Glutamin (0,2 mol/L) bei PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich).

3.1.6. Geräte und Software

Die Lumineszenz Messungen wurden am GENios Pro Luminometer der Firma Tecan AG (Männedorf, Schweiz) durchgeführt, Berechnung der EC₅₀ Werte erfolgte mit der Software SigmaPlot2001 von SSI (Erkrath, Deutschland). Die Drogen Zerkleinerung erfolgte mit einer handelsüblichen Kaffeemühle vom Schlagmessertyp der Firma Braun (Kronberg, Deutschland). Die Extrakterstellung erfolgte mit Hilfe eines T18 basic Ultra Turrax der Firma IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland), das Einengen der Extrakte erfolgte mit Hilfe eines Rotavapors von Büchi (Zürich, Schweiz). Die Miscella wurde über 595½ Faltenfilter von Schleicher&Schuell (Dassel, Deutschland) filtriert. Die Trocknung der Frischpflanzen erfolgte mit einem Hordentrockner der Firma Ehret GmbH (Emmendingen, Deutschland). Als Inkubator für die Zellkultur wurde ein solcher der Firma Binder (Tuttlingen, Deutschland) benutzt.

3.1.7. Plasmide, DNA-Primer, sonstige DNA

Das Reporter Gen Plasmid pFR-Luc und der Expressions- und Klonierungsvektor pFA-CMV stammten von Stratagene, die Kontrollvektoren phRL-null und pRL-SV40 von Promega. Primer für die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wurden über die Firma Sigma bezogen. Das Template für die durchgeführten PCRs, cDNA aus humanen Monocyten, wurde von N. Meindl, Institut für pharmazeutische Chemie (Frankfurt, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide wurden mit Hilfe von Nucleobond AX2000 Anionentauscher-Kartuschen der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) präpariert und aufgereinigt. PCR generierte DNA wurde aus Agarose Gelen mit Hilfe des Nucleo Spin Extrakt Kits desselben Herstellers durchgeführt.

3.1.8. Enzyme

Restriktionnukleasen *Xba*I, *Sma*I und die zugehörigen Reaktionspuffer wurden von Fermentas GmbH (St.Leon-Rot Deutschland) bezogen, *Pfu* DNA Polymerase und T4-DNA-Ligase von Promega. Lysozym stammte von Sigma-Aldrich und RNase von Macherey-Nagel.

3.1.9. Bakterien- und Eukaryote Zellen

Die Fibroblasten Zelllinie Cos7 (ATCC Number CRL-1651 aus *Cercopithecus aethiops* / Niere), sowie die Epithel Zelllinie HeLa (ATCC: CCL-2 *homo sapiens sapiens* / Cervix), sowie die Bakterien-Zelllinie *Escherichia coli* SURE (ATCC: 55695) stammten aus Beständen der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt; Institut für pharmazeutische Chemie (Frankfurt, Deutschland).

3.2. Methoden

3.2.1. Klonierung

3.2.1.1. Gewinnung der DNA Fragmente von hinge Region und Liganden-Binde-Domäne der PPAR Subtypen durch Polymerase Ketten Reaktion

Zur Generierung der benötigten DNA-Fragmente wurde eine PCR auf monocytäre cDNA als Template durchgeführt. Die spezifischen Primer wurden hierbei jeweils so gewählt, dass zwischen 15 bis 20 Basenpaare der jeweiligen PPAR Sequenz entsprachen und am 5'-Ende dieser komplementären Sequenz jeweils eine Restriktionsschnittstelle enthalten war. Und zwar für die forward Primer, also diejenigen des codogenen- (anti-sense) Strangs, jeweils die Halbseite einer solchen für *SmaI* und bei den reverse Primern, also denjenigen für den sense Strang, jeweils eine Schnittstelle für *XbaI*. Zur Einhaltung des Leserahmens, welcher ja durch die 5'-seitige Fusion mit der Gal4-DBD vorgegeben war, war beim anti-sense Primer jeweils die Einfügung zweier Basen zwischen Restriktionsschnittstelle und dem ersten PPAR Triplet nötig. Durch die Auslassung der aminoterminalen PPAR-Domäne enthielt die jeweilige Sequenz kein Start-Codon, dieses war vielmehr in der Sequenz für die Gal4-DBD enthalten, das Stop-Codon hingegen wurde aus der Sequenz des jeweiligen PPAR übernommen. Weiterhin wurde auch vom RXR α , in analoger Vorgehensweise zum PPAR, die hinge Region und LBD kloniert, wobei hier als Template allerdings plasmidische DNA, welche die für RXR α kodierende Sequenz enthielt, verwendet wurde (ebenfalls zur Verfügung gestellt durch N. Meindl).

Gen	Orientierung	Primer-Sequenz	Tm / C
PPAR α	fwd	5'-gggtgtcacacaacgcgattcg-3'	73,7
PPAR α	rev	5'-agcctctagatcagtagcatgtccctg-3'	66,4
PPAR δ	fwd	5'-ggggcatgtcacacaacgctatcc-3'	73,9
PPAR δ	rev	5'-gacctctagattagtagcatgtcctttag-3'	61,4
PPAR γ	fwd	5'-gggttctcataatgccatcaggtttg-3'	71,1
PPAR γ	rev	5'-gaccttagactagtagacaagtcctttag-3'	60,9
RXR α	fwd	5'-gggtctgcgccatctgcggggac-3'	81,5
RXR α	rev	5'-acccttagactaagtcatttggtgcggcg-3'	75,8

Abbildung 9: Zur Klonierung verwendete Primer. Grau hinterlegt ist jeweils die in der jeweiligen DNA enthaltene spezifische Sequenz, bei den reverse Primern kennzeichnet das Triplet in Fettdruck das Anti-Codon zum Stop-Signal.

Die zu verwendende Sequenz wurde den jeweiligen Sequenzen, die in der GenBank des NCBI veröffentlicht sind (siehe Abschnitt 2.3.3. Chromosomale Lokalisation humaner PPARs, Genorganisation, mRNAs und resultierende Proteine) entnommen. Die jeweils angenommenen Domänen Grenzen waren vorgegeben, carboxyterminal durch das Stop-Codon, aminoterminal wurden diejenigen verwendet, welche in Übereinstimmung mit der Literatur standen [24, 201]. Aus den in den klonierten Fragmenten enthaltenen Domänen ergibt sich, dass eine Unterscheidung zwischen den Rezeptor Isoformen des jeweiligen PPAR-Subtyps, welche sich in der 5' oder aminoterminal gelegenen A/B Domäne voneinander unterscheiden, nicht möglich, aber auch unter dem vorgesehenen Verwendungszweck nicht nötig war. Ebenso wenig berücksichtigt wurden die in der LBD verkürzte, und damit wegen Fehlens der AF-2 Region in dieser Domäne nicht funktionelle, Isoform 2 des PPAR δ . Beim verwendeten PCR-Protokoll kamen jeweils 200 μ M der jeweiligen desoxy-Nukleotid-Tris-Phosphate, je 1 μ M der Primer, 1 μ l Template, 1 unit *Pfu* DNA Polymerase und zur Verminderung der Bildung von Sekundärstrukturen in der DNA 5% (V/V) Dimethylsulfoxid. Nach einem initialen Denaturierungs-Zyklus von 3 Minuten bei 94°C wurde über 38 Zyklen jeweils für 45 sec bei 94°C denaturiert, danach für ebenfalls 45 sec die Temperatur für das annealing auf die ermittelte optimale Temperatur gesenkt und danach für 200 sec bei 72°C, dem Temperaturoptimum der proof reading Polymerase, die Polymerase Reaktion durchgeführt. Nach 38 Zyklen folgte ein terminaler Elongationszyklus von 10 min Dauer bei ebenfalls 72°C. Für PPAR α und PPAR δ hat sich dabei eine annealing Temperatur von 60°C als optimal erwiesen, beim RXR α waren 55°C optimal. Beim PPAR δ wurde das gewünschte Produkt in ausreichender Ausbeute erst ab unter 50°C erhalten, mit einer maximalen Ausbeute bei 46,4°C. Die PCR Fragmente wurden über 1% Agarose Gele aufgereinigt und anhand ihrer Größe von jeweils

etwa 450 Basenpaaren (doppelsträngig), bzw. 650 Basenpaaren beim RXR α , identifiziert. Die Extraktion aus dem Agarose Gel erfolgte mit dem Nucleo-Spin Extrakt Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers, für die nachfolgenden Bearbeitungsschritte wurde mit Millipore Wasser eluiert.

3.2.1.2. Restriktions-Verdau der PCR Fragmente und des Klonierungsplasmids pFA-CMV und anschließende Ligation

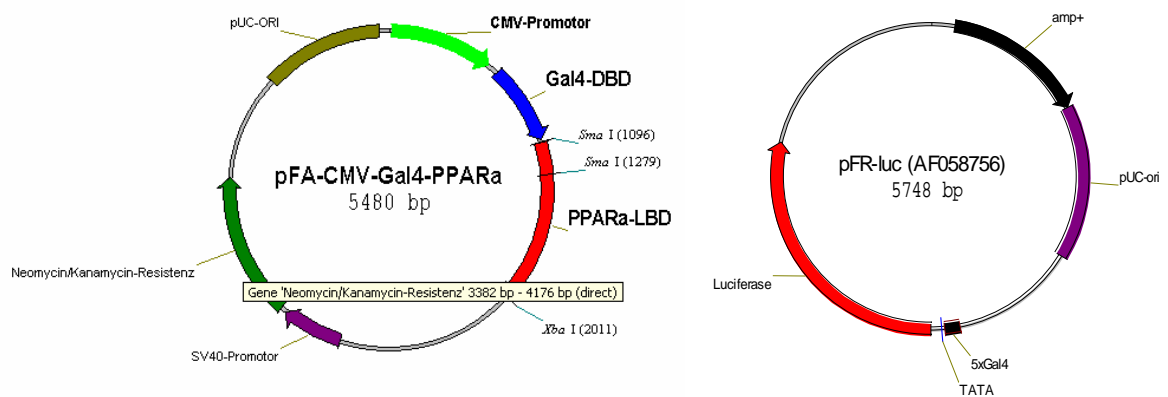
Die PCR Fragmente wurden über eine Stunde am 3'-Ende bei 37°C mit *Xba*I verdaut, so dass hier durch den Verdau ein sticky-end mit 3' Überhang entstand. Das Ausgangsplasmid für die Klonierung und anschließende eukaryontische Expression der Gal4-PPAR Fusionsrezeptoren wurde in der multiple cloning site (MCS) downstream (3'-wärts) der Gal4-DBD Sequenz mit *Xba*I und *Sma*I doppelt verdaut, so dass hier downstream der Gal4 Sequenz das blunt end (ohne Überhang) der Halbseite der verdauten *Sma*I Schnittstelle für die Ligation mit dem 5'-blunt end der PCR Fragmente zur Verfügung stand. Das 3'-Ende der mit *Xba*I verdauten PCR Fragmente hingegen war jetzt zum entsprechend verdauten Ende des Vektors kompatibel. Die verdauten DNAs wurden jeweils wiederum über 1%-ige Agarose Gele aufgereinigt und analog den PCR Fragmenten aus dem Gel extrahiert. Die Ligation erfolgte mit T4-DNA Ligase. Nach Transformation chemokompetenter *E. coli* SURE mit den erhaltenen Plasmiden, Amplifikation und Isolation derselben (siehe unten), wurde die Einhaltung des Leserahmens und die Übereinstimmung der Sequenz durch eine di-desoxy Nukleotid Sequenzierung bei der Firma SRD GmbH (Oberursel, Deutschland) verifiziert. Die Sequenz aller klonierten Vektoren stimmte mit den Referenz-Sequenzen überein, abgesehen von einer stillen Mutation des PPAR δ bei Basenpaar 489 der kodierenden Sequenz von AAC nach AAT, welche beide für Asparagin kodieren. Die erhaltenen Plasmide wurden benannt: pFA-CMV-PPAR α -LBD, pFA-CMV-PPAR δ -LBD, pFA-CMV-PPAR γ -LBD und pFA-CMV-RXR α -LBD.

3.2.1.3. Plasmid Amplifikation in *E. coli* SURE

CaCl₂ kompetente *E. coli* Sure wurden mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und nach entsprechender Inkubationszeit über Nacht auf das jeweilige Selektions-Antibiotikum (Kanamycin für die klonierten Expressionsplasmide und Ampicillin für pFR-Luc und pRL-SV40) enthaltende Agar-Platten ausgestrichen. Die erhaltenen Klone wurden am nächsten

Tag zur über Nacht Kultur auf Selektions-Antibiotikum haltiges Luria Broth Medium überführt. Je nach Größe der angesetzten Kultur und angestrebter Reinheit der erhaltenen DNA, wurden die über Nacht Kulturen nach einer CTAB-miniprep Methode für kleine Kulturen und DNA mittlerer Reinheit, mit dem NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) Chromatographie System für Sequenzierungen, oder mit Nucleobond AX2000 (Macherey-Nagel) für Maxi-Präparationen mit größerer Ausbeute an Endotoxin freier DNA für die Transfektion, zur Isolierung der amplifizierten Plasmide aufbereitet. Bei der CTAB-miniprep-Methode werden die in STET Puffer resuspendierten Bakterienzellen durch 0,05 % Lysozym aufgeschlossen, wobei die Inkubationszeit mit Lysozym so gewählt wurde, dass genomische DNA nicht freigesetzt wurde, Proteine durch Erhitzen im Wasserbad denaturiert und ausgefällt. Nach Entfernen der Proteine, wurde die DNA durch Zugabe von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ausgefällt, mitausgefällte RNA wurde durch zugegebene RNase verdaut. Die bei den Maxi-Präparationen mit Nucleobond AX2000 gemäß den Herstellerangaben erhaltene plasmidische DNA wurde durch Bestimmung der UV-Absorption quantifiziert.

Abbildung 10: Prinzipieller Aufbau der Expressionsplasmide (am Beispiel von pFA-CMV-Gal4-PPAR α) und des Reporterplasmids pFR-Luc



3.2.2. Transiente Transfektion

3.2.2.1. Grundsätzliche Erwägungen

Der zu etablierende Reporter-Gen Assay wurde konzipiert für ein (Hochdurchsatz-) Screening von in unserem Arbeitskreis synthetisierten Derivaten einer agonistischen Ausgangsverbindung, mit vollständiger Charakterisierung, der erwartungsgemäß affinen Substanzen durch die halbmaximale Aktivierungskonzentration (EC_{50} Wert).

Die zu erwartende Aktivierungskurve weist bei Auftragung der Signalstärke gegen den Logarithmus der Konzentration einen sigmoidalen Verlauf mit Sättigungskinetik auf. Um hierbei valide Werte zu erhalten, ist von einer minimalen Anzahl von fünf Datenpunkten bei verschiedenen Konzentrationen auszugehen. Und zwar eine Konzentration, bei der noch keine Aktivierung zu beobachten ist, eine Konzentration im Plateau -also bei maximaler Aktivierung-, eine Konzentration bei der das Maximum noch nicht erreicht ist, die Aktivierung aber deutlich mehr als 50% erreicht, eine Konzentration nahe bei der EC_{50} Konzentration und eine Konzentration, die bereits deutliche Aktivierung aufweist, aber auch weniger als halbmaximale Aktivität. Aus grundsätzlichen mathematischen Erwägungen stellt diese Anzahl an Datenpunkten das absolute Minimum für den gewünschten analytischen Ansatz dar. So lässt sich das Ausmaß der maximalen Aktivierung nur festlegen, wenn mindestens zwei Datenpunkte in diesem Bereich vorhanden sind, was nötig ist zur Unterscheidung von einer stetig wachsenden Funktion. Das Niveau der maximalen Aktivierung genau festzulegen aber ist für die Ermittlung der halbmaximalen Aktivierung unerlässlich. Zur Verifizierung der Parameter der erhaltenen Funktion aber ist die Absicherung durch weitere Daten-Punkte nötig, um Steigung und vor allem den Wendepunkt der Funktion, welcher ja den EC_{50} Wert darstellt, genau zu bestimmen. Weiterhin stellte sich heraus, dass viele der zu charakterisierenden Substanzen im Bereich der maximalen Aktivität bereits merklich cytotoxisch wirkten, was bei höheren Konzentrationen zu wieder fallenden Messwerten führte. Da die hierbei erhaltene reale Funktion nicht anhand eines EC_{50} Wertes zu charakterisieren gewesen wäre, war oftmals eine valide Festlegung eines cut-off-Wertes nötig, ab dessen Konzentrationen wegen überlagernder Effekte die Messwerte in die Berechnung nicht mehr einzubeziehen waren. Angesichts der bei biologischen Messsystemen üblichen Fehlerbereiche war darüber hinaus bei jedem Einzel-Experiment jeder einzelne Datenpunkt zumindest als Triplet auszulegen. Hieraus ergibt, sich unter Einbeziehung der nicht transfizierten- und der Negativ-Kontrolle, eine Anzahl von optimal 7 Datenpunkten. Multipliziert mit der

Bestimmung in triplicate ergibt sich hieraus eine Anzahl von mindestens 21 wells (voneinander abgetrennten Bereichen einer Zellkulturplatte). Zusammen mit der zu erwartenden Anzahl von zu screenenden Substanzen erschien somit die Auslegung der Versuche auf 96-well Platten, mit verhältnismäßig geringer Fläche und damit geringer Zellzahl, sinnvoll. Die geringe Zellzahl aber setzte wiederum die Verwendung einer Methode mit hoher Transfektionseffizienz und hohem Durchsatz voraus, weshalb die Wahl auf die Lipofektion fiel, welche bei Verwendung eines einzigen Reagenzes, bei nur einem Pipettierschritt und relativ geringer Belastung der Zellen, hohe Transfektionseffizienzen liefert.

3.2.2.2. Ermittlung der optimalen Zellzahl

Laut Herstellerangaben lässt sich ein Optimum der Transfektionseffizienz bei einer subkonfluenten Zelldichte von größer 80 % erzielen. Die auszusäende Zellzahl wurde dementsprechend ermittelt, indem am Vortag eine unterschiedliche Anzahl von Zellen pro well in DMEM rot substituiert mit 10% FCS ausgesät und am darauf folgenden Tag die Zelldichte ermittelt wurde. Für HeLa Zellen wurde diese optimale Zelldichte bei Aussaat von 10.000 Zellen pro well und für Cos7 bei 30.000 Zellen pro well ermittelt.

3.2.2.3. Etablierung des Transfektionsprotokolls

Das verwendete Reporter-Gen Plasmid pFR-Luc weist neben einer TATA-Box und einem Gal4-Response Element keine weiteren Promotor-Elemente auf. Bei den Vorversuchen zur Transfektionseffizienz stellte sich heraus, dass hieraus bei fehlender Aktivierung durch einen Liganden (Negativ-Kontrolle / Null-Wert) ein sehr niedriges background Signal resultierte, dieses lag nahe beim Wert für die nicht transfizierte Kontrolle. Anders formuliert, die basale Transkriptionsrate des kodierten Firefly-Luciferase Reporter-Gens war sehr niedrig. Andererseits resultierte hieraus auch ein niedriges Signal bei maximaler Aktivierung. Dies machte die Transfektion mit relativ großen Mengen an Reporter-Plasmid nötig. Das zuerst verwendete Transfektionsreagenz LipoTaxi erwies sich bei der benötigten DNA-Menge als zu wenig effizient. Die hierfür benötigten Mengen des Transfektionsreagenzes zeigten bereits merkliche Effekte auf die Überlebensfähigkeit der Zellen. Aus diesem Grunde wurde -basierend auf den Erfahrungen von A. Bock (Phenion GmbH & Co. KG) aus der Etablierung eines entsprechenden Assays (der allerdings auf dem Vollrezeptor und einem PPAR Response Element enthaltenden Reporter-Gen Plasmid

basierte) für den murinen PPAR α - bei den weiteren Versuchen Lipofectamin2000 verwendet, welches, auch bei von den Zellen tolerierten niedrigen Konzentrationen, ausreichende Transfektionseffizienzen lieferte. Als optimaler Kompromiss zwischen ansteigender Signalgröße und sinkender Überlebensfähigkeit der Zellen durch die Transfektion erwies sich die Menge von 220 ng pFR-Luc, bei Verwendung von 0,8 μ l Lipofectamin2000 in 50 μ l Optimem pro well, da noch höhere Mengen an DNA und damit Lipofectamin von den Zellen zunehmend schlechter toleriert wurden. Eine optimale Induktion wurde bei Co-Transfektion von Rezeptor zu Reporter im Verhältnis 1:20, also mit 14 ng des jeweiligen Plasmids pFA-CMV-PPAR-LBD erreicht, vom Kontroll-Plasmid wurden für eine ausreichende Signalgröße 2 ng pro well co-transfiziert.

Bei den zunächst vorgenommenen Versuchen waren HeLa Zellen transfiziert worden, welche aber nur Induktionen des Reporter-Gens von kleiner Faktor 5 lieferten, in Cos7 Zellen hingegen ließen sich Induktionen und damit Aktivierungsfaktoren von im allgemeinen größer 10 für PPAR α , größer 20 für PPAR γ und größer 5 für PPAR δ erzielen. Die unterschiedliche Induzierbarkeit der PPAR Subtypen spiegelt dabei die Erfahrungen auch aus anderen Arbeitsgruppen wieder (unter anderem persönliche Kommunikation mit Prof. Carsten Carlberg (zu dieser Zeit Karolinska Institut, Kuopio; Finnland) und in [202]). Die Inkubationszeit für die Transfektion der Zellen wurde mit vier Stunden gemäß den Herstellerangaben übernommen.

Somit wurden die Zellen nach Aussaat am Vortag zu 30.000 Zellen pro well in 96-well Zellkulturplatten für 4 Stunden mit der Transfektionsmischung inkubiert. Danach das Transfektionsmedium abgezogen und gegen die Inkubationslösungen ersetzt, welche die Testsubstanzen in Konzentrationsreihen angemessener Konzentration enthielt, gelöst in DMEM weiß ohne FCS bei jeweils 0,1 % Dimethylsulfoxid, in dem die Substanzen als Stammlösungen vorlagen. Da FCS unter anderem Fettsäuren als PPAR Aktivatoren enthält, war bei Verwendung von FCS-haltigem Inkubationsmedium eine Induktion des Reportergens durch Testsubstanz, angesichts nahezu maximaler Aktivierung bei der Negativ-Kontrolle, nicht mehr möglich. Auch die Verwendung von mit Aktivkohle gestripptem FCS, welches zumindest geringere Mengen an Lipiden und Fettsäuren enthalten sollte, lieferte keine besseren Ergebnisse. Angesichts der kurzen Inkubationszeiten war die Verwendung von FCS zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen aber auch nicht nötig. Die Transfektion fand gemäß Herstellerangaben ebenfalls in FCS freiem Medium statt.

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit zur Induktion des Reporter-Gens wurden Testreihen mit Inkubationszeiten von 6, 12, 18 und 24 Stunden durchgeführt. Wie zu erwarten war nach 6 Stunden, angesichts zweier nötiger Proteinexpressionsschritte zuerst die des Fusionsrezeptors, danach die durch Ligand vermittelte Induktion des Reporter-Gens durch den aktivierten Rezeptor, noch keine maßgebliche Induktion des Reporter-Gens eingetreten. Eine maximale Ausbeute an Luciferase ergab sich nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden, wobei der 12 Stunden Wert zwar niedriger war, sich aber nicht signifikant vom 18 Stunden Wert unterschied. Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden war die Signalstärke auf weniger als 20 % des maximal Wertes gesunken, was auf Abbau der exprimierten Proteine zurückzuführen sein dürfte [203]. Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Versuche bei Inkubation über Nacht für mehr als 12 Stunden durchgeführt.

3.3. Bewertung des verwendeten *in-vitro* Assays für die geplanten Einsatzzwecke

Da die Validierungs-Parameter des verwendeten Bioassays entscheidend für die Bewertung der Aussagekraft der mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse ist, sollen an dieser Stelle die Parameter der verwendeten Methode hinsichtlich Selektivität, Spezifität und Robustheit, sowie die Eignung der Methode für die verschiedenen Anwendungen dargestellt und erörtert werden. Entscheidende Validierungs-Parameter unserer Methode sind veröffentlicht in [2].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der etablierte Assay auch für ein Hochdurchsatz Screening im industriellen Maßstab prinzipiell geeignet wäre. Die niedrige Basalaktivität in Kombination mit den hohen Aktivierungsfaktoren lässt relativ einfach aktive Testkandidaten auch unterhalb der Maximalaktivierung erkennen. Weiterhin sind die erhaltenen Messwerte noch groß genug, dass sich auch bei Verwendung zumindest von 384 well Platten (evtl. auch 1536 well Platten) noch ausreichende Meßgrößen finden lassen sollten. Dies gilt allerdings nur eingeschränkt für den PPAR δ Assay, welcher insgesamt eher mäßige Aktivierungsfaktoren und auch nur geringe Signalintensitäten lieferte, so dass hier ein Hochdurchsatz Screening mit Sicherheit bereits bei den 384 well Platten an seine Grenzen stoßen würde und bereits bei den 96 well Platten schwache „Hits“ kaum noch detektierbar sind. Angesichts der beim Hochdurchsatz Screening durchgeführten einmaligen Bestimmung wäre hier mit einer zu hohen Rate an Falsch-Negativen

Ergebnissen zu rechnen. Von Nachteil ist beim verwendeten Assay natürlich, dass alle Arbeitsschritte im Sterilbereich durchzuführen sind (auch wenn die Einhaltung von Sterilbedingungen unter Umständen bei den letzten Arbeitsschritten bei ausreichend kurzen Inkubationszeiten nicht mehr nötig zu sein bräuchte), auch ist die Inkubationszeit mit insgesamt mindestens 16 Stunden ab Transfektion für industrielle Maßstäbe eher weniger geeignet, wozu dann noch einmal ein Tag für die Aussaat der Zellen kommt. Weiterhin sind ohne das Aussäen der Zellen immerhin noch 4 Pipettierschritte notwendig, wobei zweimal das Medium vorher abgesaugt werden muss. Allerdings lassen sich beim Screening auf nukleäre Rezeptoren, anders als bei Membran Rezeptoren, hier nur schwer Vereinfachungen bewirken. Eine Möglichkeit zumindest den Transfektionsschritt entfallen zu lassen, wäre die Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie. Allerdings zeigt sich bei der Durchsicht der Literatur, dass ganz überwiegend bei Verwendung von stabil transfizierten Zelllinien, daneben auch transiente Transfektanden benutzt wurden. Dies dürfte darin begründet sein, dass bei stabilen Transfektanden oft nur geringere Aktivierungsfaktoren erhalten werden.

3.3.1. Berechnungsmethode

Zur Auswertung des Assays sind jeweils mehrere Rechenoperationen nötig. So wird bei der eigentlichen Messung eine Light Unit (LU) erhalten, welche vom Messgerät dem Luminometer in willkürlichen Einheiten (arbitrary units) ausgegeben wird, damit sind die erhaltenen Messwerte bereits nur in Relation zueinander verständlich. Zur Zusammenführung der Daten aus verschiedenen Experimenten ist darüber hinaus aber auch noch eine Prozessierung dieser Daten notwendig.

3.3.1.1. nicht transfizierte Negativ-Kontrolle (Reagenzien-Wert)

So muss im Allgemeinen von den Messwerten (LU), welche auf der jeweiligen Zellkulturplatte erhalten werden, jeweils der Wert der nicht transfizierten Kontrolle, also der Messwert für das Reagenz allein, abgezogen werden. Im Falle unseres Assays waren diese Werte allerdings sehr klein, etwa im Bereich des Grundrauschens des Luminometers (Apparatefehler), darüber hinaus waren auch die Basalaktivitäten sehr niedrig (Negativ-Kontrolle mit Transfektion aber ohne Testsubstanz), so dass die nicht transfizierte Kontrolle in der Regel nicht berücksichtigt werden musste. Dasselbe gilt für die zur Normierung der jeweiligen Messwerte durchgeführte zweite Bestimmung der jeweiligen

Testplatte, bei der ebenfalls LUs als Meßgröße erhalten werden.

3.3.1.2. Normierung

Der bei der Messung erhaltene Rohwert LU, muss sowohl für die eigentliche Meßgröße also das PPAR abhängig induzierte Reporter gen erhoben werden, als auch für das konstitutiv exprimierte Gen des Kontrollvektors. Die bei beiden Messungen erhaltenen Rohdaten (bei Bedarf abzgl. des Werts der nicht transfizierten Kontrolle) werden nun well für well dividiert (Messwert : Kontrollwert), wodurch man den normierten Messwert (Relative Light Units: RLU) erhält. Durch diese Auswertung werden Unterschiede in der Anzahl der ausgesäten Zellen pro well und unterschiedliche Expressionsraten in den einzelnen wells berücksichtigt.

Von den so erhaltenen RLUs werden jeweils die Mittelwerte für die drei inkubierten wells einer Testkonzentration gebildet. Dieser Mittelwert ist nun prinzipiell als ausgewertete Meßgröße bereits verwertbar. Der absolute Zahlenwert, der bei den RLUs erhalten wird, ist allerdings eine Größe, welche mit denen anderer Berichte nicht verglichen und nur im relativen Vergleich zu den anderen Messwerten verstanden werden kann, also etwa im Vergleich gegen die Negativ-Kontrolle. Dies ist darin begründet, dass man durch Transfektion einer geringen Menge des Normierungsvektors auch eine geringere Expression des Normierungsgens erhält, wegen des Divisionsschrittes aber dadurch einen höheren RLU Wert erhält. Umgekehrt erhält man niedrigere RLU Werte, bei Transfektion einer größeren Menge des Normierungsvektors und damit höheren Werten beim Normierungsgen. Solange der Messwert der Kontrolle aber innerhalb des linearen Bereichs der Enzymaktivität und innerhalb des Meßbereichs des Luminometers liegt, ist dies für die Genauigkeit der Messung unerheblich.

3.3.1.3. Berechnung der Aktivierungsfaktoren

Aus den Mittelwerten der RLUs kann nun durch den Vergleich gegen die Negativ-Kontrolle (transfiziert, aber ohne Testsubstanz) -also den Nullwert- der Aktivierungsfaktor bestimmt werden (Testwert : Negativ-Kontrolle). Der Aktivierungsfaktor bietet gegenüber der Darstellung als RLUs wenig Vorteile. Im Gegenteil, da man die Negativ-Kontrolle durch den Divisionsschritt standardmäßig auf eins setzt, verliert man zumindest auf dieser Ebene die Möglichkeit einer statistischen Auswertung, da man dem Nullwert eine fiktive Standardabweichung von null zuweisen muss (natürlich kann man die bei den RLUs

erhaltene relative Standardabweichung des Nullwertes entsprechend verwenden). Der Vorteil aber ist, dass man hier relativ anschauliche Werte erhält, wobei mit Einschränkungen gilt „bigger is better“, da sich bei hohen Aktivierungsfaktoren kleine Unterschiede leichter nachweisen lassen. Dies bedeutet, dass man eine geringere Anzahl von Messwiederholungen benötigt. Außerdem ist zu bedenken, dass man je nach verwendeter Testkonzentration oder bei nur geringfügiger Aktivität nicht den maximalen Aktivierungsfaktor, sondern eben nur einen Teil davon erhält. Insgesamt lässt sich sagen, dass hohe Aktivierungsfaktoren zur Bestimmung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen besser geeignet sind.

3.3.1.4. Auswertung anhand von Relativen Light Units oder Aktivierungsfaktoren?

Prinzipiell sind sowohl die RLUs, als auch die daraus erhaltenen Aktivierungsfaktoren, für eine Auswertung der Ergebnisse geeignet. Beim von uns durchgeführten Assay zeigte sich allerdings, dass diese ausgewerteten Größen wenig robust sind und großen Variationen unterliegen. So lagen übliche Aktivierungsfaktoren beim PPAR γ Assay um die 60, es gab allerdings auch Wochen, in denen die erhaltenen Aktivierungsfaktoren kleiner als 20 oder größer als 100 waren (für die RLUs gilt das analoge). Diese Werte ließen sich nicht als offensichtliche Ausreißer bewerten, weder durch statistische Tests wie Grubbs, Dixon oder Nalimov, noch anhand veränderter Parameter. Vielmehr lässt sich aufgrund der Art ihres periodischen Auftretens, einige Wochen ähnliche Aktivierungsfaktoren mit anschließendem abruptem Anstieg oder Absinken, wobei sich diese höheren oder niedrigeren Aktivierungsfaktoren wiederum für einige Zeit stabil halten ließen, vermuten, dass hier Veränderungen im Zellzyklus zum Tragen kommen. Durch diese stark unterschiedlichen Messgrößen und die daraus resultierenden Standardabweichungen, lässt sich natürlich keine vernünftige Auswertung betreiben. Auch das Wiederholen eines einzelnen Tests, solange bis man drei „vernünftige“ Werte erhält, kann hier keine Lösung sein. Zum einen aus ökonomischen Gesichtspunkten, zum anderen aber würde dies auch eine Daten-Klitterung darstellen, da man relativ willkürlich einzelne Werte aus einer Meßreihe auswählen müsste, wobei sich die Auslassung der anderen Werte oft nur schwer begründen ließe. Möglich, aber unökonomisch, wäre lediglich die ständige Wiederholung von Bestimmungen bis sich akzeptable Fehlerbereiche finden ließen. Diese Erörterungen

machen die Notwendigkeit einer Positiv-Kontrolle und einer auf dieser basierenden Relativierung der Messwerte verständlich.

3.3.1.5. Auswertung

Obige Aussagen begründen, warum zumindest in unserem Falle eine Auswertung anhand des Vergleichs zu einer Positiv-Kontrolle angebracht erscheint. Wie bei jeder Enzymkinetik stellt sich auch bei der unseres Reporter-Gens, der Firefly Luciferase, bei maximaler Aktivität ein Sättigungsniveau ein, ab welchem in der Regel eine weitere Steigerung der Aktivität nicht zu beobachten ist. Dies kann man sich bei der Auswertung zunutze machen, indem man auf jeder Testplatte eine Positiv-Kontrolle mitlaufen lässt, in der Regel eine etablierte, nach Möglichkeit selektive Substanz, welche man bei einer Konzentration einsetzt, bei der man eine maximale Aktivierung erreicht. Dieser RLU-Wert wird nun auf 100% der möglichen Aktivierung festgesetzt, die anderen Messwerte werden durch diesen Maximalwert geteilt (Relativierung) und man erhält die relative Aktivierung gegen Referenz. Es ist leicht ersichtlich, dass Änderungen bei den Aktivierungsfaktoren sich im Verhalten der Referenzsubstanz widerspiegeln und bei dieser zu den analogen Veränderungen führen. Die bei diesem Vorgehen erhaltenen Aktivierungskonstanten wiesen keine systematische Abweichung von solchen bei direkter Berechnung anhand der RLU-Werte auf, insofern erscheint diese Vorgehensweise bei der Auswertung sowohl berechtigt als auch begründet und stellt ein übliches Verfahren in der publizierten Literatur dar.

3.3.2. Verwendung eines Gal4-Fusionsproteins und des zugehörigen Response Elements anstelle des PPAR Vollrezeptors und des zugehörigen Response Elements

Wie bereits weiter oben angeführt, basiert die verwendete Methode auf dem Ersatz der DNA-Binde-Domäne des PPAR Rezeptors durch die Gal4-DBD aus *Saccharomyces cerevisiae*. Durch diesen Ersatz geht zum einen die aminoterminalen Ligand-unabhängige AF-1 Transaktivierungsdomäne des PPAR verloren, zum anderen erkennt das verwendete Fusionsprotein nun das Gal4-Response Element anstelle des PPAR-Response Elements (PPRE). Hierdurch ergeben sich entscheidende Unterschiede in der Spezifität der Methode im Vergleich zu einem Vollrezeptor-Assay.

- Jegliche Einflüsse welche die Ligand-unabhängige AF-1 Domäne des PPAR adressieren würden, etwa Phosphorylierung durch Kinasen und dadurch bedingte Veränderung der PPAR Transaktivierungsaktivität werden nicht erfasst.
- Prinzipiell ist eine Beeinflussung der Aktivität des Fusionsproteins durch Beeinflussung der Gal4-DBD möglich. Allerdings ist eine solche Beeinflussung, wenn auch nicht gänzlich auszuschließen, unwahrscheinlich, da dieses Transkriptionselement heterolog für die verwendete metazoische Cos7 Zelllinie ist [204-206]. Darüber hinaus sind DNA-Binde-Domänen an der Regulierung der Aktivität nukleärer Rezeptoren in geringerem Ausmaß beteiligt und Einflüsse, welche allgemein Einfluss auf die Proteinexpression nehmen, etwa durch Beeinflussung der Aktivität der Ribosomen, werden mithilfe des Kontrollvektors und der Normalisierung bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt. Somit basiert die ausgewertete Transaktivierungsaktivität vornehmlich auf der Beeinflussung der Liganden-Binde-Domäne des PPAR und ist damit für diese spezifisch.
- Eine weitere Erhöhung der Spezifität ergibt sich dadurch, dass auf dem Reporter-Vektor das Gal4 Response Element, anstelle eines PPAR-Response Elements, vorkommt. Dieses Response Element des Reporter Vektors wird von den endogen in Cos7 Zellen vorhandenen Transkriptionsfaktoren voraussichtlich nicht erkannt [204-206]. Allein aufgrund prinzipieller theoretischer Überlegungen ist nicht völlig auszuschließen, dass dieses für die Cos7 Zellen heterologe Response Element einen passenden Transkriptionsfaktor findet, die experimentellen Daten schließen dies jedoch aus. Zwar wurde bei den einzelnen Testungen keine Kontrolle mitgeführt, bei der der Effekt der Testsubstanz auf den Reporter-Vektor alleine, also ohne Transfektion des jeweiligen PPAR-Expressions-Vektors bestimmt wurde, allerdings ist dieser Nachweis auf indirekte Weise geführt. Da für alle Testkandidaten jeweils alle drei PPAR-Subtypen getestet wurden und für jeden Subtyp-Assay jeweils derselbe Reporter-Vektor transfiziert wurde, fungiert hier jeder PPAR-Subtyp, für den keinerlei Aktivierung gefunden wurde, als Negativ-Kontrolle. Zur Veranschaulichung: Eine Substanz welche durch eine PPAR α abhängige Transkriptionsaktivierung zur Expression des Reportergens führt, aber keine PPAR δ abhängige Transkriptionsaktivierung des Reportergens aufweist, hat bewiesenermaßen keinen Einfluss auf eine unspezifische Aktivierung des Reportergens. Dieser Nachweis ist lediglich für Substanzen nicht gegeben, die Aktivierung aller 3 PPAR-Subtypen zeigen.

Darüber hinaus ergibt sich ein weiteres Indiz daraus, dass die Negativ-Kontrollen (Basalaktivität ohne Zugabe eines Agonisten) sich nur geringfügig von den nicht transfizierten Kontrollen unterschieden und gegenüber diesen nur sehr geringe Induktionen aufwiesen ($\ll 10\%$ der maximal erreichbaren Induktion), was zeigt, dass potentiell endogen in den Cos7 vorhandene Transkriptionsfaktoren, die das Gal4-Response Element erkennen könnten, unstimuliert nicht aktiv sind.

- Weiterhin ergibt sich gegenüber dem Vollrezeptor-Assay eine Erhöhung der Spezifität dadurch, dass der Retinoid-X-Rezeptor nicht als Cofaktor benötigt wird. Beim Vollrezeptor-Assay ist die Transaktivierung des PPAR/RXR Heterodimers durch einen RXR-Agonisten allein möglich und damit können auch -in diesem Falle unerwünscht-RXR agonistische Effekte erfasst werden. Dies ist beim Fusionrezeptor-Assay nicht möglich, da RXR hier nicht als Heterodimerisierungspartner benötigt wird.
- Nicht ausgeschlossen werden können hingegen Effekte, welche durch eine indirekte Aktivierung der LBD stattfinden, etwa Substanz-induzierte metabolische Effekte, welche erst zur endogenen Freisetzung eines Agonisten führen. Dies ist jedoch eine allgemeine inhärente Eigenschaft von Reporter-Gen Assays, welche auf der Aktivierung (oder auch Inhibierung) eines Transkriptionsfaktors beruhen. Der entsprechende Nachweis einer direkten Rezeptor-Bindung und auch der Ort dieser Bindung, also allosterisch oder in der Liganden-Bindetasche, ließe sich nur durch eine entsprechende Methode etwa durch Kokristallisation eines Agonisten mit dem Rezeptor und anschließende Röntgenstrukturanalyse führen. Im Rahmen eines Screenings erscheint dies allerdings nicht angebracht bzw. ist bei fehlender Identifikation der aktiven Komponente auch gar nicht möglich, sondern erscheint eher angebracht zur genaueren Charakterisierung entsprechender Kandidaten für die weitere Entwicklung.

3.3.3. Robustheit der Methode im Hinblick auf Veränderungen der Parameter

Bei *in-vitro* Assays stellt die Reproduzierbarkeit der Methode im Hinblick auf variable Durchführungsbedingungen eine der größten Herausforderungen dar. Eine Standardisierung der Testbedingungen ist wünschenswert, da in der Praxis allerdings nicht immer einzuhalten, ist die Robustheit der Methode gegenüber äußeren Einflüssen essentiell. So lassen sich bei Verwendung von lebenden Zellen, aufgrund der Unkenntnis

komplexer molekularbiologischer Vorgänge, wie sie sich etwa aufgrund des natürlichen Zellzyklus ergeben, nicht immer standardisierte Bedingungen einhalten, weshalb der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei leicht veränderten Parametern, etwa der Inkubationszeiten, große Aufmerksamkeit zukommen muss. Im Falle des von uns verwendeten Assays ergab sich eine größere Variation der Kulturbedingungen, durch eine zeitweise ausstattungsbedingt nötige Umstellung des Kohlendioxid-Gehalts im Inkubator von 10% auf 5% CO₂. Diese Umstellung, welche ohne Kompensation des dadurch erhöhten pH-Werts im Zellkultur-Medium durchgeführt wurde, wurde von den Zellen schlecht vertragen. Während die Zellen ansonsten über mehrere Monate hinweg befriedigende Aktivierungsfaktoren aufwiesen, zeigten sie unter diesen Bedingungen bereits eine bis zwei Wochen nach Inkulturnahme nur noch sehr geringe Induktionen, auch nahmen ihre Teilungsraten rapide ab, so dass nach etwa 4 Wochen frische Zellen aufgetaut werden mussten. Trotz dieser Umstände ließen sich jedoch die unter diesen Bedingungen in Einzelmessungen erhaltenen EC₅₀-Werte in späteren Bestimmungen bei 10 % CO₂ reproduzieren. Allein die Wiederhol-Bestimmungen, welche aus diesem Grund nötig waren, stellen natürlich eine Verschwendung von Ressourcen dar und es ist davon auszugehen, dass Testkandidaten, welche nur marginale Aktivierung zeigen, unter diesen Bedingungen nicht erkannt werden.

3.3.3.1. Reproduzierbarkeit der Basal-Aktivität

Auch bei konstanten Kulturbedingungen zeigten die einzelnen Meßparameter eine größere Variabilität. So war die Basalaktivität, also die der Negativ-Kontrolle ohne Testsubstanz, teilweise von Assay zu Assay, oder doch zumindest über einige Wochen hinweg verschieden und reichte vom Wert des Reagenzes alleine (nicht transfizierte Kontrolle) bis zum mehr als 10-fachen dieses Wertes. Hieraus resultieren natürlich immense relative Fehler, welche den Nachweis einer statistischen Signifikanz natürlich erschweren und unter Umständen für diesen Nachweis eine häufigere Versuchs-Wiederholung nötig machen und damit zu erhöhten Material- und Arbeitskosten führen. Allerdings relativiert sich dieser Befund, wenn der erhaltene Testwert eine hohe Differenz zur Negativkontrolle aufweist, also bei den in unserem Assay erhaltenen hohen Induktionen und stellte lediglich bei marginalen Induktionen ein Problem dar. Darüber hinaus zeichnete sich die Tendenz ab, dass bei hohen Basalwerten auch die jeweiligen Testwerte größer waren, was darauf schließen lässt, dass in diesem Falle insgesamt die Expressionrate höher lag.

3.3.3.2. Reproduzierbarkeit von Rohdaten und ausgewerteten Daten

Wie bereits aus den Ausführungen unter 3.1.1. hervorgeht, sind die LU als Rohdaten für eine Auswertung noch nicht geeignet, da hier bereits eine Veränderung der ausgesäten Zellzahlen zu nicht Analyt-bedingten Veränderungen führen. Für eine Auswertung prinzipiell geeignet wären RLUs oder Aktivierungsfaktoren, welche an sich aber wenig reproduzierbar waren. Erst die Relativierung gegen eine Referenz Substanz, führte hier zu reproduzierbaren Ergebnissen. Für die Berechnung von EC_{50} Konstanten erwies es sich jedoch als unerheblich, ob mit der relativen Aktivierung, Aktivierungsfaktoren oder RLUs gerechnet wurde, die bei der Auswertung mit SigmaPlot erhaltenen Aktivierungskonstanten wiesen keine relevanten Unterschiede auf.

3.3.4. Validierung der Referenzsubstanzen

3.3.4.1. WY-14643 (Pyrinixinsäure) und GW7647

Pyrinixinsäure wurde zunächst als antilipidämischer Wirkstoff etabliert, welcher eine Proliferation der Peroxisomen in Nagern bewirkt. Mit der Entdeckung von $PPAR\alpha$ war dann schließlich auch die entsprechende Zielstruktur gefunden. Aufgrund der in den Medizinisch-Chemisch orientierten Dissertationsarbeiten von Y. Syha und L. Popescu gewählten Synthesestrategie, ausgehend von Pyrinixinsäure, wurde diese Substanz als Referenzsubstanz für den $PPAR\alpha$ Assay ausgewählt. Darüber hinaus ist diese Substanz aber auch als Referenz für $PPAR\alpha$ in der Literatur etabliert. Dabei ergibt sich das Bild, welches auch von einigen anderen Substanzen bekannt ist, dass Pyrinixinsäure am $PPAR\alpha$ von Nagerspezies um wenigstens eine Größenordnung aktiver ist, üblicherweise werden hier EC_{50} Werte von 0,5 bis 1 μM angegeben [207]. Für den auch von uns verwendeten humanen $PPAR\alpha$ hingegen liegen für Pyrinixinsäure Literaturangaben für den EC_{50} Wert von 5 (auch Werte von 1 μM werden angegeben) bis 10 μM vor. Der von uns für die Substanz gefundene Wert liegt mit knapp 40 μM um etwa eine Größenordnung höher. Die Diskrepanz dieser Beobachtungen ist wohl auf die unterschiedliche Art des durchgeführten Assays zurückzuführen, so werden teilweise Vollrezeptor Assays durchgeführt oder andere Zelllinien verwendet, etc. Aus diesem Grunde haben wir zur Cross-Validierung einen weiteren $PPAR\alpha$ Agonisten als Referenz eingesetzt, nämlich GW7647 für den wir mit 6 nM den Literaturwert exakt reproduzieren konnten.

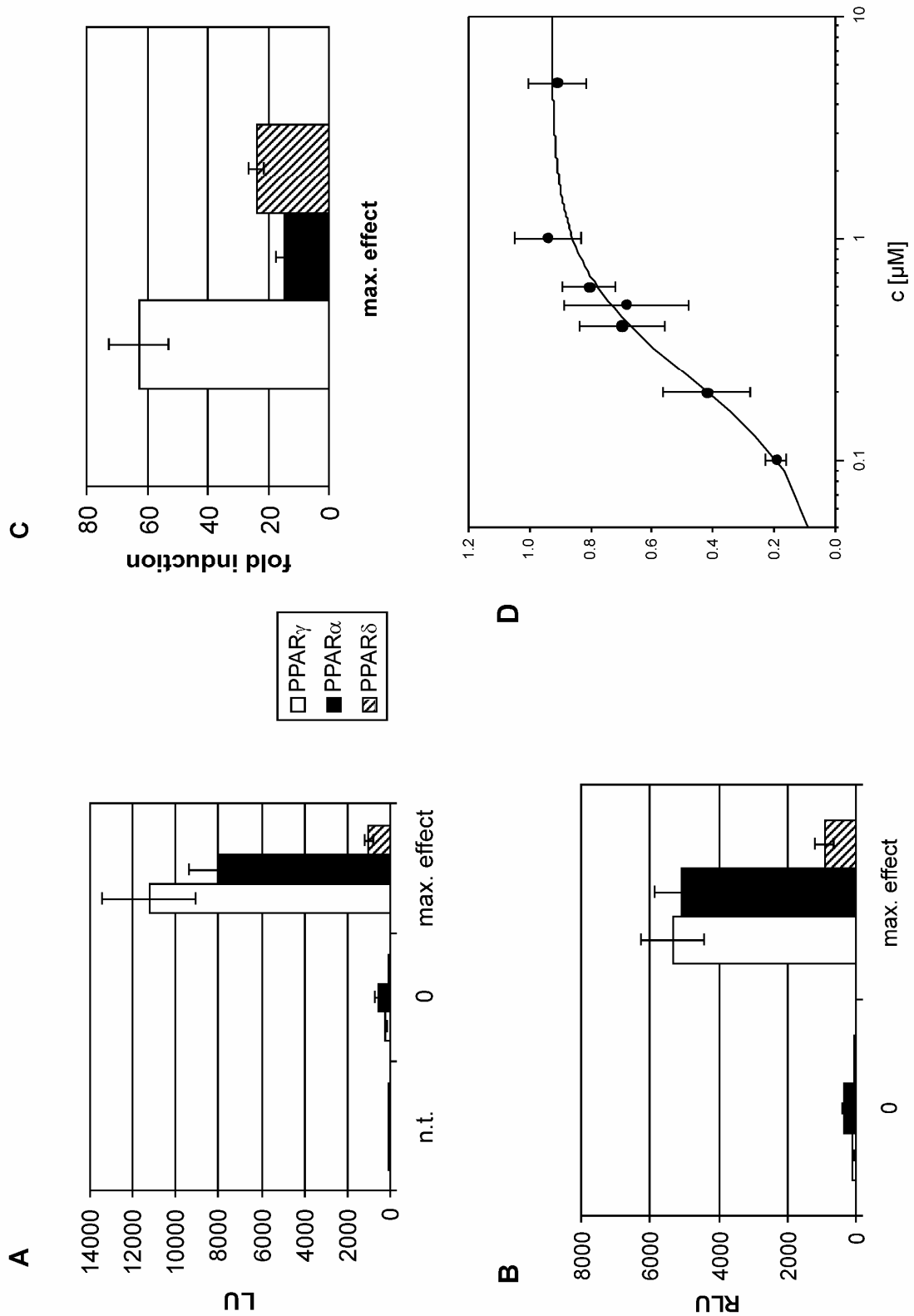


Abbildung 11: Validierungsparameter des verwendeten Assays. Dargestellt sind jeweils repräsentative Werte ($n \geq 3$) für Light Units (LU) des Firefly Luciferase Reporter Gens (nicht normalisiert) **A**; Relative Light Units (RLU) **B**; Aktivierungsfaktoren **C**; und ein EC_{50} Plot für Pioglitazon an PPAR γ **D**. Als Referenzsubstanzen wurden eingesetzt: 100 μ M WY14,643 für PPAR α ; 1 μ M L165,041 für PPAR δ und 1 μ M Pioglitazon für PPAR γ

Auf jeden Fall betont diese abweichende Beobachtung die Notwendigkeit, den Absolut Werten aus anderen Quellen nur bedingte Aussagekraft zu schenken, während der relative Vergleich zu Referenzsubstanzen hier eine höhere Aussagekraft hat.

Für unsere Untersuchungen auf Aktivierung des PPAR α hin haben wir Pyrinixinsäure als Positiv-Kontrolle in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, eine Konzentration die ausreichend zur Erreichung der Plateau Phase der PPAR α Aktivierung war.

Darüber hinaus konnten wir für die Pyrinixinsäure auch für PPAR γ einen EC₅₀ Wert bestimmen, welcher bei 53,7 μM lag und für PPAR δ ließ sich bei der höchsten Testkonzentration von 100 μM immerhin noch eine Basalaktivität feststellen.

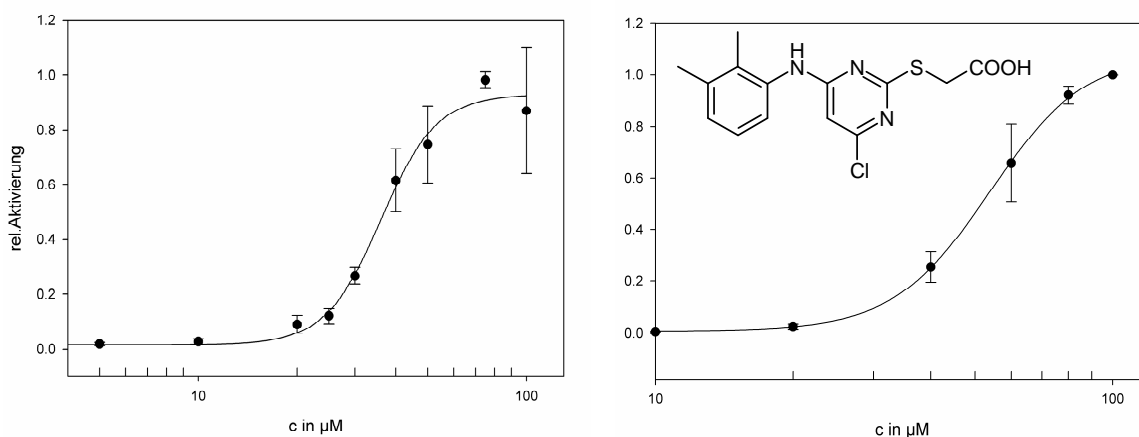


Abbildung 12: EC₅₀ Plot für die Aktivierung von PPAR α (links) und PPAR γ (rechts) durch Pyrinixinsäure.

Damit ist Pyrinixinsäure, anders als landläufig in der Literatur dargestellt, kein selektiver PPAR α Agonist, sondern vielmehr als ein dualer PPAR α/γ Agonist oder sogar als *pan*-PPAR Agonist aufzufassen. Ganz überwiegend wird die Selektivität von Pyrinixinsäure unter Verweis auf andere Literatur angeführt. Der Befund, dass sie auch PPAR γ aktiviert, ist allerdings auch literaturbekannt und der von Willson et al. gefundenen Wert von 60 μM für PPAR γ stimmt sehr gut mit unserem Wert überein [149].

3.3.4.2. Pioglitazon

Für die PPAR γ selektive Referenz-Substanz Pioglitazon erhielten wir bei unseren Bestimmungen einen EC₅₀ Wert von 0,27 μM , welcher annähernd mit üblichen

Literaturwerten von 0,58 übereinstimmt [149]. Bei der maximalen von den Cos7 Zellen vertragenen Konzentration von 10 μM haben wir auch für Pioglitazon eine basale Aktivierung von PPAR α und PPAR δ erhalten. Als Positiv-Kontrolle für den PPAR γ Assay wurde Pioglitazon jeweils bei 1 μM eingesetzt, was ebenfalls zur Erreichung der Plateau Phase ausreichend war. Für Pioglitazon ist die Validierung publiziert in Rau et al. [2] und ist im Anhang dieser Arbeit zu finden.

3.3.4.3. L165,041

Für den PPAR δ Assay wurde der selektive PPAR δ Agonist L165,041 in einer Konzentration von 1 μM verwendet, auch diese ausreichend zur Erreichung der Plateau-Phase. Auch hier wurde bei einer Konzentration von 10 μM eine basale Aktivierung von PPAR α und PPAR δ gesehen, der EC₅₀ Wert für PPAR δ wurde zu 0,04 bestimmt, ein üblicher Literaturwert liegt bei 0,53 μM [149].

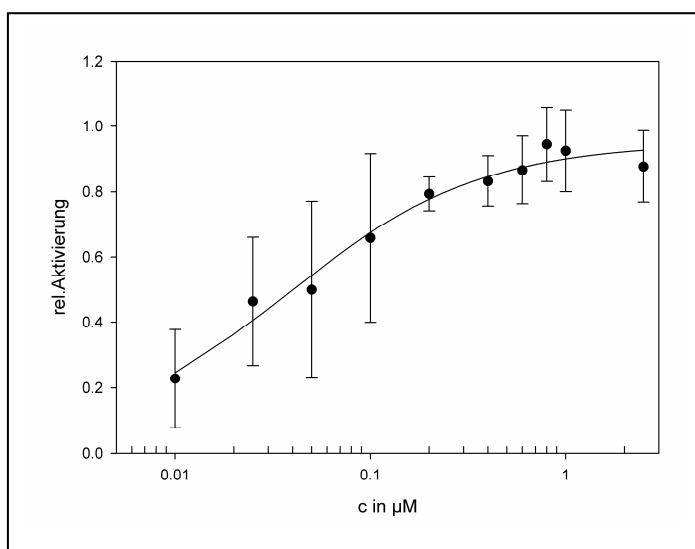
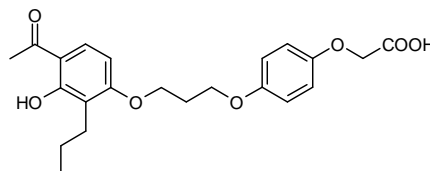


Abbildung 13:

EC₅₀ Plot für die Aktivierung des PPAR δ durch L165,041



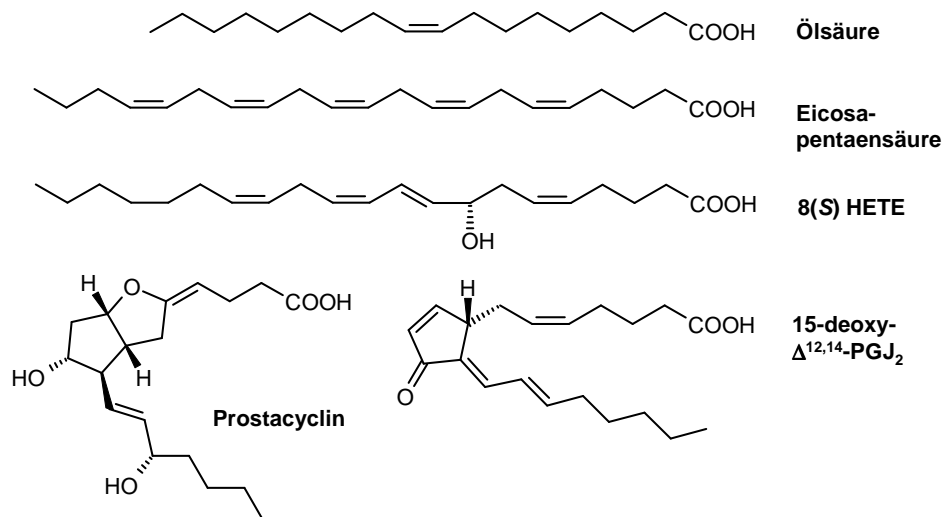
3.3.5. Validierung des Assays anhand von Fettsäuren, als endogenen PPAR Aktivatoren

Da Fettsäuren als, wenn auch nur schwach affine, endogene PPAR Agonisten eine physiologische Relevanz aufweisen, lag es nahe, deren Aktivität in unserem Assay ebenfalls zu bestimmen. Für die Reihe von der einfach ungesättigten Ölsäure bis zur Docosahexaensäure haben wir ein Aktivitätsprofil am PPAR α und PPAR γ beobachtet, wie

es nach den Angaben in der Literatur zu erwarten war [60, 61, 104, 208-211]. Und zwar sind die Fettsäuren am PPAR α bereits bei niedrigeren Konzentrationen aktiv, als am PPAR γ , mit geschätzten EC₅₀ Werten etwa um 100 μ M für PPAR α und zwischen 100 und 200 μ M (>300 μ M für Ölsäure) für PPAR γ . Außerdem ergibt sich in Übereinstimmung mit der Literatur das Bild, das PPAR γ eine höhere Anzahl an Doppelbindungen erfordert. Während PPAR α kaum zwischen den verschiedenen Fettsäuren diskriminiert, wird PPAR γ von der einfach ungesättigten Ölsäure erst jenseits von 200 μ M signifikant aktiviert und auch die zweifach ungesättigte Linolsäure ist in Relation schwächer wirksam. Für eine genauere Bestimmung sind die Fettsäuren jedoch zu schwach wirksam. Der Einsatz derart hoher Konzentrationen, machte zum einen den Einsatz von höheren DMSO Konzentrationen nötig, zum anderen dürften bei derartigen Konzentrationen auch andere Stoffwechselwege für diese physiologischen Substrate aktiviert werden, so dass hier Überlagerungseffekte auftreten. Darüber hinaus wirken die hohen Konzentrationen auch bereits toxisch auf die Cos7 Zellen. Am deutlichsten ist dies für die Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, welche bereits bei 200 μ M erkennbar toxische Effekte auf die Testzellen ausüben.

Es sei an dieser Stelle immerhin angemerkt, dass entsprechende klinische Befunde, welche eine Diabetes protektive Wirkung für langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren aufzeigen (neben anderen durch diese bedingten metabolischen Effekten etwa durch Eingriff in den Leukotrien Haushalt) PPAR vermittelt sein dürften [212-214]. Aktuell laufen mehrere klinische Studien zum Nachweis der Effektivität von n-3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei Typ 2 Diabetes und dem Metabolischen Syndrom.

Abbildung 14: Fettsäuren und Derivate als PPAR Aktivatoren



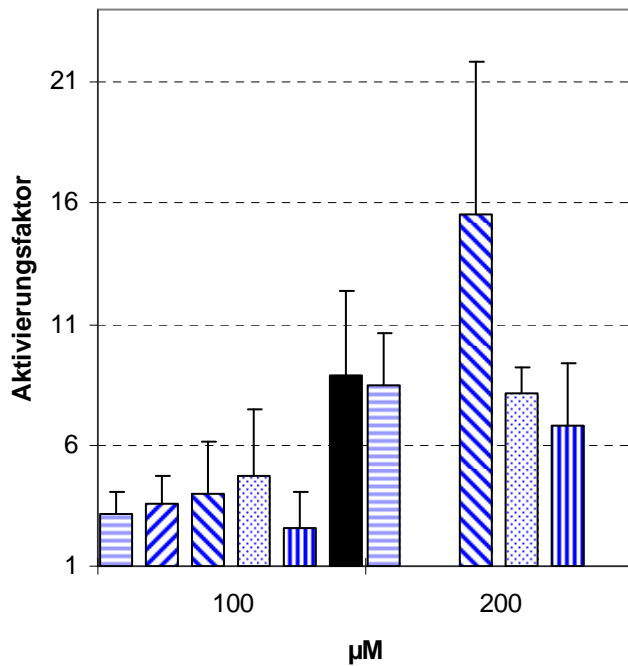


Abbildung 15: Aktivierung von PPAR α durch ungesättigte Fettsäuren. Alle Werte sind signifikant unterschiedlich von der Negativ-Kontrolle. Der 200 μ M Wert für Eicosapentaensäure wurde ausgelassen, da es hier offensichtlich zur Überlagerung mit anderen biochemischen Effekten kam, was hier zu einem signifikant von der Positiv-Kontrolle unterschiedlichen Wert von über 32 für den Aktivierungsfaktor führte. Der schwarze Balken steht für die Referenzsubstanz WY14643 (100 μ M).

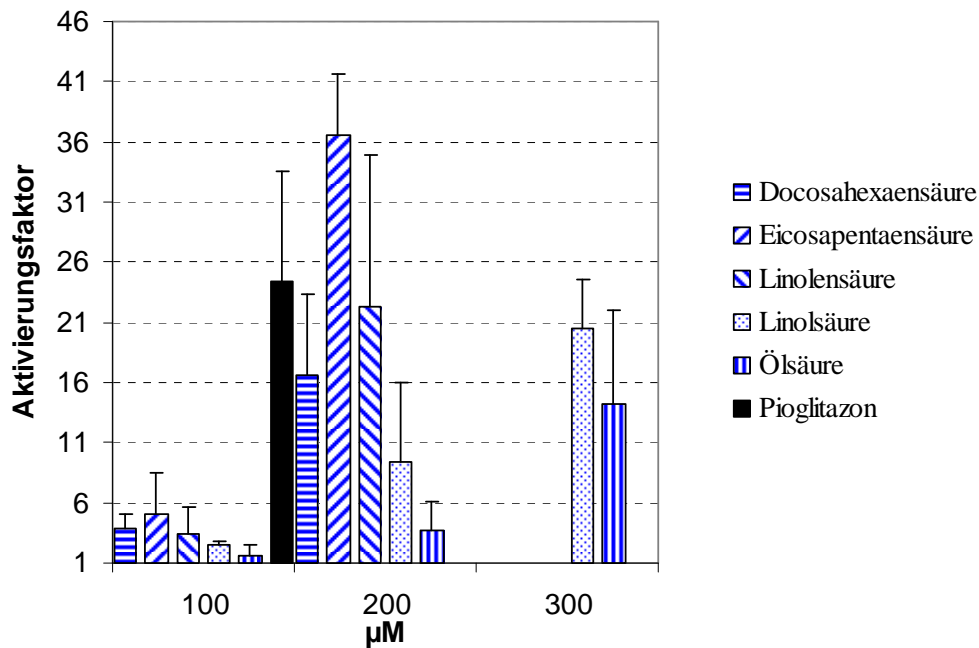


Abbildung 16: Aktivierung von PPAR γ durch ungesättigt Fettsäuren. Alle Werte sind signifikant unterschiedliche zur Negativ-Kontrolle, mit Ausnahme der 100 und 200 μ M Werte der Ölsäure, welche erst bei 300 μ M einen signifikanten Effekt aufzeigt. Auch hier zeigt sich, dass Eicosapentaensäure vermutlich noch andere Stoffwechselwege beeinflusst, welche zu einem Superagonismus führen, ersichtlich am Wert bei 200 μ M, bei welcher Konzentration der Effekt größer ist als der der Positiv-Kontrolle (auch wenn der Unterschied hier nicht signifikant ist).

3.4. Extraktherstellung

3.4.1. Wahl des Extraktionsmittels

Für ein rationales Screening pflanzlicher Drogen auf das Vorhandensein von PPAR Aktivatoren war, aufgrund des stark lipophilen Charakters bekannter PPAR-Agonisten und der PPAR Liganden Bindungstasche, die Auswahl eines stark lipophilen Extraktionsmittels unumgänglich. Trotzdem sollten, neben der Aussage über einen bestimmten erhaltenen Extrakt, auch relevante Aussagen zur Wirksamkeit der Droge selbst erhalten werden. Da nur so die Vergleichbarkeit zur volksmedizinischen Nutzung in Form der Droge gegeben erscheint. Die Auswahl eines zu lipophilen Extraktes hätte aus meiner Sicht diese Auswertbarkeit der Ergebnisse stark eingeschränkt, da zum einen immense Anreicherungsfaktoren von größer Faktor 50 erzielt werden können, welche sich bei der traditionellen Anwendung, aufgrund schwächerer Extraktionsmittel oder aufgrund vorhandener Begleitstoffe bei der intestinalen Absorption, so nicht erzielen ließen. Weiterhin weisen sehr stark lipophile Stoffe im Allgemeinen auch eine geringe Löslichkeit im wässrigen Milieu auf, was das Ausmaß ihrer Bioverfügbarkeit, also die Aufnahme aus einer wässrigen Lösung während der Magen-Darm Passage, beschränkt.

Um sowohl eine ausreichende Lipophilie der extrahierten Stoffe, als auch eine gewisse Löslichkeit im wässrigen Milieu sicherzustellen, habe ich für das durchgeführte Screening 80% Ethanol als Extraktionsmittel gewählt. Durch die Zugabe im zehnfachen Überschuss gegenüber der Droge sollte ferner ein möglichst großes Inhaltsstoffspektrum extrahiert werden. In Kauf zu nehmen war dafür, angesichts kleinerer Anreicherungsfaktoren, dass gewisse potentielle Treffer aufgrund zu geringen Gehalts nicht auszumachen sein dürften. Dafür aber schien mir diese Methode verlässlichere Aussagen über die Relevanz und Plausibilität volksmedizinischer Anwendungen zu erlauben.

3.4.2. Auswahl der Drogen

Die verwendeten Drogen wurden aus verschiedenen Kulturkreisen, vor allem aufgrund traditionell berichteter Wirksamkeit bei Diabetes mellitus ausgewählt, welche so vorhanden möglicherweise auf einem Agonismus am PPAR γ beruhen könnte. In diese

Auswahl sind auch solche Pflanzen einbezogen worden, bei denen andere Wirkmechanismen als wahrscheinlich anzusehen waren. So ist, zum Beispiel angesichts einer Diabetes Diagnostik, welche sich in tradierten Zeiträumen wohl auf das Erkennen des süßen Geschmacks des Urins der betroffenen Personen beschränkte, davon auszugehen, dass eine Anzahl traditioneller „Diabetes Mittel“ aufgrund harntreibender Wirkung, durch welche die Süße zumindest verdünnbar war, zu dieser Ehre gekommen sind. Wobei hier wiederum bereits die Überlieferung einer harntreibenden Wirkung ausreichend gewesen sein mag. Dies dürfte auch die enorm große Anzahl als bei Diabetes wirksam tradierter Drogen begründen. So ließen sich ohne eingehendere Recherche aus den verschiedenen Kulturkreisen einige Dutzend als antidiabetisch überlieferte Drogen ausmachen, wobei zumindest für einen Teil derselben auch präklinische Evidenz existiert. Die vorgenommene Auswahl beschränkte sich vornehmlich auf solche Drogen, die im Handel verfügbar waren, was die Zahl von Drogen aus dem afrikanischen, (süd-) amerikanischen, indischen und z.T. auch dem chinesischen Kulturkreis beschränkte. Mit einbezogen wurden auch Pflanzen, für welche neben der traditionell nachgesagten Wirkung keine Evidenz zur Verfügung steht und Pflanzen wie z.B. *Galega offic.*, für die bereits ein plausibler Wirkmechanismus beschrieben ist. Für die Behandlung von Fettstoffwechselstörungen, ließ sich (wohl aufgrund der mangelnden Diagnostizierbarkeit in tradierten Zeiträumen) keine überlieferte Wirksamkeit finden. Hier wurden stellvertretend einige Pflanzen aufgenommen, für die sich in neuerer Zeit Hinweise auf antilipidämische Wirksamkeit ergeben haben.

3.4.3. Herstellung der Extrakte

Im Falle der durch den botanischen Garten zur Verfügung gestellten, oder der selbst gesammelten Frischpflanzen, wurde zunächst das Frischpflanzenmaterial mit Hilfe eines Hordentrockners für zunächst eine Stunde bei 60°C vorgetrocknet, danach wurde bei 45°C bis zur Konstanz der Masse getrocknet und der Trocknungsverlust bestimmt. Die auf diese Art und Weise erhaltenen, oder bereits als solche erworbenen Drogen wurden mit einer handelsüblichen Schlagmesser Kaffeemühle zerkleinert und mit dem zehnfachen Volumen ihrer Masse an 80 % (V/V) Ethanol versetzt. Die so angesetzte Miscella wurde für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur vor Licht geschützt und in Braunglasflaschen unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Danach wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax für drei Minuten homogenisiert und extrahiert, die so erhaltene Miscella wurde über Faltenfilter vom Rückstand befreit, wobei der Filterkuchen mit 80% Ethanol nachgespült wurde. Der so erhaltene Extrakt wurde anschließend bei 40°C und vermindertem Druck

zur Trockene einrotiert. Bei solchen Extrakten, die aufgrund von Restwasser keine feste Konsistenz annahmen, wurde mit absolutem Ethanol als Schleppmittel das Restwasser entfernt.

3.5. HPLC Analytik der Rosmarin und Salbei Extrakte

Für die Analytik des Salbei Extraktes wurde eine Flußrate von 0,5 ml/min eingestellt, als Fließmittel wurde eine Mischung aus 35% Acetat-Puffer (pH 3,5) und 65% Methanol verwendet. Es wurden 10 µl des in Methanol gelösten Extraktes injiziert und bei isokratischer Elution nach einer Laufzeit von etwa 6 min (Carnosol) bzw. 26 min (Carnosolsäure) bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Für den Rosmarin Extrakt wurde eine Flußrate von 1 ml/min und das gleiche Fließmittel verwendet, wobei hier allerdings der Pufferanteil auf 30% reduziert wurde. Carnosol wies hierbei eine Retentionszeit von etwa 5 min auf, während Carnosolsäure in diesem Extrakt nicht quantifizierbar war. Für beide Extrakte wurde die Standard-Additionsmethode jeweils mit Zugabe von Carnosolsäure bzw. Carnosol als internem Standard verwendet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Screening pflanzlicher Extrakte auf PPAR Agonismus

Die in diesem Abschnitt behandelten Ergebnisse des Screenings von mehr als 50 ethanologischen Pflanzen-Extrakten sind in wesentlichen Inhalten publiziert in [1]. Allein die Diskussion dieser Ergebnisse bezüglich ihrer Relevanz und die Verknüpfung dieser Daten mit bereits publizierten Daten vor allem tierexperimenteller Art ist in dieser Publikation aus Platzgründen nicht umfänglich erörtert und soll deshalb an dieser Stelle erfolgen. Die durchgeführten Testungen sind einerseits imstande für einige traditionell bei Diabetes eingesetzte Pflanzen oder deren Zubereitungen einen möglichen Wirkmechanismus aufzuzeigen. Andererseits können die für einige Pflanzen erhaltenen Ergebnisse einen möglichen Beitrag zu einer dokumentierten oder traditionell nachgesagten antidiabetischen Wirkung durch Angriff am PPAR verneinen.

4.1.1. Pflanzenextrakte ohne oder mit überaus schwachem PPAR Agonismus

In entsprechenden Tier- oder Zellbasierten Testsystemen sind antidiabetische bzw. Blutzucker- oder Lipid senkende Effekte beschrieben für folgende Pflanzen oder entsprechende Zubereitungen oder Inhaltsstoffe: *Morinda officinalis* [215], *Allium cepa* [216-225], *Allium sativum* [216, 217, 224-227], *Allium ursinum* [228], *Camellia sinensis* [229-231], *Opuntia ficus indica* [232, 233], *Harpagophytum procumbens* [234], *Phaseolus vulgaris* [224, 235, 236]. Gleiches gilt für *Trigonella foenum-graecum*, für welches neben experimentellen Befunden [237-249] auch antidiabetische Effekte in klinischen Humanstudien aufgezeigt worden sind [250-252].

Für den Konsum von schwarzem Kaffee wurde in zahlreichen retrospektiven Kohorten-Studien eine Senkung des Risikos für Typ-2-Diabetes gezeigt [253-259], wobei dieser Befund durch Meta-Analysen erhärtet wird [213, 260].

Unsere Untersuchungen legen aufgrund der fehlenden Aktivierung des PPAR nahe, dass die beschriebenen Effekte nicht auf eventuell enthaltene PPAR-Liganden zurückzuführen sind, sondern vielmehr auf anderen, noch aufzuzeigenden Mechanismen beruhen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

deutscher Name der Stammpflanze	Botanischer Name	PPAR - Aktivierung	relevante Literatur
Artischocke	<i>Cynara scolymus</i> L.	-/-	262-264
Ba Ji Tan	<i>Morinda citrifolia</i> L.	-/-	215
Bärlauch	<i>Allium ursinum</i> L.	-/-	228
Birke	<i>Betula pendula</i> Roth.	-/-	-/-
Bocksdorn	<i>Lycium chinense</i> P. Mill	-/-	-/-
Bockshornklee	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	-/-	237-252
Bohne	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	-/-	224,235,236
Brennessel	<i>Urtica dioica</i> L.	α/γ	320,321
Chili	<i>Capsicum frutescens</i> L.	α/γ	310-314
Dang Sheng	<i>Codonopsis pilosula</i> (Franch.) Nannf.	-/-	-/-
Eberesche	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	-/-	-/-
Engelwurz	<i>Angelica archangelica</i> L.	γ	-/-
Enzian	<i>Gentiana lutea</i> L.	γ	-/-
Euphorbia	<i>Euphorbia balsamifera</i> Ait.	γ	-/-
Feigenkaktus	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) P. Mill.	-/-	232,233
Frauenhaarfarn	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	$\alpha/\gamma_{n.s.}$	-/-
Geißraute	<i>Galega officinalis</i> L.	-/-	265-266
Ginseng	<i>Panax ginseng</i> C. Meyer	$\gamma_{n.s.}$	272-294
Grasnelke	<i>Armeria maritima</i> (P. Mill.) Willd.	α/γ	-/-
Hagebutte	<i>Rosa canina</i> L.	-/-	-/-
Heidelbeere	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	γ	271
Himbeere	<i>Rubus idaeus</i> L.	α/γ	(303)
Immergrün	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	$\alpha/\gamma/\delta$	317-319
Kaffee	<i>Coffea arabica</i> L.	-/-	213,253-260
Kakao	<i>Theobroma cacao</i> L.	$\alpha/\gamma/\delta$	-/-
Kalmus	<i>Acorus calamus</i> L.	α/γ	316
Karotte	<i>Daucus carota</i> L.	-/-	-/-
Knoblauch	<i>Allium sativum</i> L.	-/-	216,217,224-227
Kreuzkraut	<i>Senecio fuchsii</i> C.C. Gmel.	-/-	-/-
Kreuzkümmel	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	γ	269,270
Kurkuma	<i>Curcuma longa</i> L.	$\gamma_{n.s.}$	299,300
Lapacho	<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Martius ex DC.) Standley	α/γ	-/-
Lavendel	<i>Lavandula angustifolia</i> P. Mill.	γ	-/-
Mais	<i>Zea mays</i> L.	α/γ	-/-
Majoran	<i>Origanum majorana</i> L.	α/γ	315
Mariendistel	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gartn.	α/γ	305-309
Mate	<i>Ilex paraguariensis</i> St.-Hil.	-/-	-/-
Odermenning	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	γ	267
Ölbaum	<i>Olea europaea</i> L.	γ	268
Orange	<i>Citrus aurantium</i> L.	-/-	-/-
Orient Froschlöffel	<i>Alisma plantago-aquatica</i> L.	α/γ	-/-
Pappel	<i>Populus nigra</i> L.	γ	-/-
Purgierstrauch	<i>Jatropha curcas</i> L.	$\alpha/\gamma/\delta$	-/-
Ringelblume	<i>Calendula officinalis</i> L.	-/-	-/-
Taigawurzel	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.)	α/γ	304
Tee	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O.Kuntze	-/-	229-231
Teufelskralle	<i>Harpagophytum procumbens</i> (Burch.)DC.	-/-	234
Walnuß	<i>Juglans regia</i> L.	-/-	-/-
Wiesenknopf	<i>Sanguisorba ancistroides</i> (Desf.)Ces.	-/-	-/-
Zaubernuß	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	-/-	-/-
Zimt	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl.	γ	295-298
Zwiebel	<i>Allium cepa</i> L.	-/-	216-225

Tabelle 4: (siehe vorherige Seite) Tabellarische Zusammenstellung der in dieser Arbeit erhaltenen Testergebnisse mit bereits publizierter relevanter Literatur. Wobei hier unter relevant zu verstehen ist: experimentelle, präklinische oder auch klinische Daten zu antidiabetischen-, antilipidämischen- oder PPAR-Effekten. Das Fehlen von Literatur bedeutet hier, dass in PubMed weder unter dem lateinischen (Gattungs-) Namen noch unter dem englischen Vernakular Literatur indiziert ist. Zur schnelleren Übersicht sind hinterlegt: grün Übereinstimmung mit bisher publizierten Befunden, türkis ein aus der Literatur nicht absehbarer PPAR Effekt, gelb für antidiabetische/antilipidämische Effekte, die vermutlich nicht PPAR vermittelt sind. Komplett in hell türkis hinterlegt sind solche Pflanzen, bei denen PPAR Aktivierung potentiell zur Erklärung bereits beobachteter antidiabetischer/antilipidämischer Effekte beizutragen vermag und in Türkis solche Pflanzen, für die oder für deren relevante Inhaltsstoffe ein PPAR Agonismus bereits publiziert wurde.

Weitere nicht oder überaus schwach PPAR wirksame Extrakte waren jene von: *Codonopsis pilosula*, *Lycium chinense*, *Rosa canina*, *Citrus aurantium*, *Juglans regia*, *Sorbus aucuparia*, *Hamamelis virginiana*, *Betula pendula* (Rinde und Blätter), *Sanguisorba ancistroides*, *Ilex paraguariensis*, *Calendula officinalis*, *Daucus carota* und *Senecio fuchsii*, für welche abgesehen von einer traditionell nachgesagten antidiabetischen oder antilipidämischen Wirkung keine weiteren Wirksamkeitshinweise existieren [261].

Für *Cynara scolymus* war ebenfalls kein PPAR-Agonismus zu beobachten, weshalb die berichteten antilipidämischen Wirkungen [262-264] auch hier auf andere Wirkmechanismen, etwa die vorgeschlagen Hemmung der Hydroxy-methyl-glutaryl CoA-Reduktase (HMG-CoA Reduktase) zurückzuführen sein dürften.

Ähnliches gilt für den Extrakt aus *Galega officinalis*, deren isolierte Guanidin-Derivate aufgrund ihrer antidiabetischen Wirkung Ausgangspunkt für die Entwicklung der Biguanid-Derivate waren, von denen Metformin heute als einziges beim Typ-2-Diabetes angewandt wird [265, 266]. Auch hier konnte kein PPAR agonistisches Wirkprinzip aufgezeigt werden.

Für eine eventuelle oder auch tatsächlich vorhandene antidiabetische oder antilipidämische Wirkung der hier genannten Extrakte scheint also ein PPAR-Agonismus nicht relevant zu sein. Zwar ist nicht auszuschließen, dass auch in diesen Extrakten PPAR agonistische Prinzipien vorhanden sind, welche nicht oder zumindest nicht in ausreichendem Maße extrahiert wurden, aufgrund der verwendeten Extraktionsmethode mit ihrem zehnfachem Überschuss an Extraktionsmittel von mittlerer Lipophilie, ist allerdings davon auszugehen,

dass eventuell vorhandene PPAR Aktivatoren allenfalls in so geringen Mengen vorhanden sind, dass unter Ernährungs- oder auch pharmazeutischen Gesichtspunkten eine entsprechende Wirksamkeit nicht durch einen direkten PPAR Agonismus vermittelt sein kann.

Für die Extrakte von *Cynara s.*, *Ilex p.*, *Betula p.* (Rinde), *Calendula offic.* und *Galega offic.* muss diese Aussage, wegen der - bedingt durch deren zelluläre - Toxizität niedrigeren verwendeten Testkonzentration von maximal 30 mg/L, zwar eingeschränkt werden, aber auch hier dürfte eine eventuelle Aktivierung des PPAR bei höheren Konzentrationen letztlich nicht relevant sein.

Letztendlich aber erlaubt das verwendete Testsystem keinerlei Aussage über möglicherweise in den Extrakten vorhandene allosterische PPAR Aktivatoren, welche etwa über Phosphorylierung der Ligand unabhängigen Aktivierungsdomäne AF-1 zu einer PPAR Aktivierung führen.

4.1.2. Pflanzenextrakte mit geringem, aber überwiegend signifikanten PPAR Agonismus

Eine weitere Gruppe von sechzehn der insgesamt 55 getesteten Pflanzenextrakte zeigte zwar sehr wohl eine signifikante Aktivierung mindestens eines der PPAR Subtypen. Allerdings war diese Aktivierung nur bei der höchsten getesteten Konzentration von in der Regel 100 mg/L nachweisbar, so dass eine Dosisabhängigkeit der Wirkung hier nicht aufgezeigt werden konnte.

Die Relevanz des zu beobachtenden Effekts, für eventuelle antidiabetische- oder Lipid-senkende Effekte, wäre somit im Hinblick auf die hohe benötigte Konzentration nur bei optimalen Parametern hinsichtlich Bioverfügbarkeit und Verteilungsvolumen gegeben. Eine Weiterverfolgung dieser Ergebnisse im Sinne einer Anreicherung des aktiven Prinzips erschien uns deshalb wenig sinnvoll und unwirtschaftlich. Der entsprechende Zusatzaufwand würde sich natürlich auch auf die Kosten entsprechender Produkte auswirken, wodurch die zu erwartenden Kosten schnell Ausmaße annehmen würden, die angesichts bereits vorhandener synthetischer, in Relation günstigerer PPAR Agonisten, nicht zu rechtfertigen wären.

Immerhin ist aber nicht auszuschließen, dass der beobachtete PPAR Agonismus zumindest einen Beitrag zu bereits beschriebenen biologischen Effekten leistet.

Eine signifikante Aktivierung ausschließlich des PPAR γ wurde gefunden für die Extrakte aus: *Agrimonia eupatoria*, *Vaccinium myrtillus* (Blätter), *Tabebuia impetiginosa*, *Gentiana lutea*, *Angelica archangelica*, *Lavandula angustifolia*, *Cinnamomum ceylanicum*, *Syzygium cumini*, *Olea europea*, *Curcuma longa* und *Panax ginseng*. Der beobachtete Effekt mag seinen Beitrag leisten zu Blutzucker senkenden Effekten von *Agrimonia e.* [267], *Olea e.* [268], *Syzygium c.* [269, 270] und *Vaccinium m.* [271], wobei in denselben Arbeiten für *Vaccinium*, *Syzygium* und *Olea* außerdem Lipid-senkende Effekte beschrieben sind.

Für *Panax ginseng* existiert eine ganze Reihe von Publikationen, welche hypoglykämische und hypolipidämische Effekte, sowohl in experimentellen, als auch klinischen Studien, aufzeigen [272-293]. Als Wirkmechanismen werden hierbei vorgeschlagen: Sulfonylharnstoff-artige Wirkung [282], Induktion metabolischer Proteine wie der Lipoproteinlipase und der PPARs [281], sowie eine verringerte Glukose Aufnahme, etwa durch Hemmung intestinaler Transport-Proteine [293].

Interessanterweise wurde für einen 1-Butanol Extrakt aus Ginseng eine Hemmung des PPAR α vorgeschlagen [294], was sich allerdings durch unsere Untersuchungen weder bestätigen noch verneinen lässt. Insgesamt mag der von uns beobachtete PPAR γ Agonismus einen Teil seiner antidiabetischen Wirkungen erklären, auch wenn mit der Sulfonylharnstoff-artigen Wirkung bereits ein nachvollziehbarer Wirkmechanismus vorgeschlagen wurde.

Ebenfalls angeführt sein soll an dieser Stelle der Extrakt aus *Cinnamomum c.*, welcher einen signifikanten PPAR γ Agonismus bei Konzentrationen ab 30 mg/L aufweist, zugleich treten bei diesen Konzentrationen aber auch deutliche cyto-depressive Effekte auf, welche zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen führten. Immerhin aber mag der beobachtete PPAR γ Agonismus zu der kürzlich publizierte Blutzucker-, Triglycerid-, und Cholesterolsenkenden Wirkung in einer klinischen Studie an Diabetikern [295] und in weiteren experimentellen Studien [296, 297] beitragen. Allerdings wurden in dieser klinischen Studie die erwähnten Effekte bereits ab Dosierungen von einem Gramm Zimtpulver beobachtet, was angesichts des relativ hohen Droge-Extrakt-Verhältnisses von 18,7 beim Zimt-Extrakt gerade einmal gut 50 mg des Extraktes als Tagesdosis entspräche. Angesichts erster PPAR agonistischer Effekte ab 30 mg/L, erscheint der PPAR γ Agonismus zumindest

als einziges Wirkprinzip unwahrscheinlich. Darüber hinaus wurde in [298] mit der Hemmung der Insulin-Rezeptor Inaktivierung auch hier bereits ein möglicher Wirkmechanismus aufgezeigt.

Ein weiterer hier aufgeführter Extrakt, ist der des *Curcuma*, bei dem bereits bei der als eher niedrig anzusehenden Konzentration von 10 mg/L eine Aktivierung zu beobachten war. Man muss hier zwar einschränken, dass der Effekt aufgrund einer hohen Varianz statistisch noch nicht signifikant ist, dies hat jedoch dieselbe Ursache, wie die niedrige verwendete Test-Konzentration, nämlich ein stark ausgeprägter zelltoxischer Effekt des Extrakts, welcher die Verwendung höherer Konzentrationen nicht erlaubte. Immerhin aber erscheint der Effekt doch so bemerkenswert, dass er an dieser Stelle mit erwähnt werden soll. Für Zubereitungen aus *Curcuma* wurden sowohl Blutzucker- [299, 300], als auch Lipidsenkende [301, 302] Effekte im Tiermodell aufgezeigt. Die Blutzucker-senkenden Effekte scheinen hierbei zumindest teilweise mit einer ebenfalls aufgezeigten Aktivierung des PPAR γ durch Curcuminoide erklärbar zu sein [299, 300]. Da hier bereits ein plausibles PPAR γ aktives Wirkprinzip in *Curcuma* aufgezeigt worden war, erschien eine weitere Aufklärung der Effekte des von uns untersuchten *Curcuma*-Extraktes unnötig.

Ein weiterer Extrakt, welcher aufgrund seiner hohen Zell-Toxizität nur bei der sehr geringen Konzentration von 10 mg/L getestet werden konnte, war der aus den Knospen (*gemmae*) der Pappel. Aus bereits publizierter Literatur, ließ sich für *Populus* kein plausibler Hinweis, auf eine mögliche Aktivierung des PPAR γ finden. Aufgrund der relativ niedrigen Konzentration, bei der der PPAR γ Agonismus bereits auftritt, ist dieser Befund natürlich interessant. Allein, aufgrund der ebenfalls vorhandenen geringen Verträglichkeit in Cos7, würde eine weitere Erforschung dieses Befundes und wohl auch eine mögliche Anwendung die Isolierung des aktiven Prinzips vonnöten machen.

Eine weitere Gruppe von Extrakten aktivierte neben dem PPAR γ auch den PPAR α , wenn auch zumeist in geringerem Ausmaß, in Bezug auf die maximal erreichbare Aktivierung. Hierzu gehören die Extrakte aus *Armeria maritima*, *Adiantum capillus-veneris*, *Eleutherococcus senticosus*, *Theobroma cacao*, *Silybium marianum* und *Rubus idaeus*.

Für *Armeria* und *Adiantum* existieren keinerlei Publikationen, welche möglicherweise vorhandene Blutzucker- oder Lipid-senkende Effekte, welche durch den dualen PPAR α und PPAR γ Agonismus bewirkt sein könnten, aufzeigen.

Bei der Himbeere (*Rubus idaeus*) sind solche Effekte nur für die verwandte Brombeere (*Rubus fruticosus*) beschrieben [303].

Für den oftmals als möglichen Ersatz für *Panax g.* propagierten *Eleutherococcus s.* wurden in einer kleineren human Studie sowohl Blutzucker- als auch Lipid-senkende Effekte aufgezeigt [304].

Silybium m. wurde naheliegenderweise auf die Beeinflussung von Lipoproteinen hin untersucht, es zeigten sich zumindest im Tierversuch antihyperlipidämische aber auch anti-hyperglykämische Effekte [305-309].

Für die Samenschalen des Kakaos sind ebenfalls keine relevanten Publikationen verfügbar. Allerdings liegt hier bereits ein plausibles Wirkprinzip vor. Zwar haben wir im Rahmen dieser Arbeit hierzu keine genaueren Untersuchungen angestellt, es ist allerdings davon auszugehen, dass in den Samenschalen, allein schon aufgrund der räumlichen und entwicklungsgeschichtlichen Nähe zum Gewebe des Samens selbst, ebenfalls in nicht unerheblichem Maße Fette oder freie Fettsäuren vorhanden sind. Da das Kakao-Fett zum großen Teil aus Ölsäure besteht, welche bekanntermaßen einen unselektiven PPAR Aktivator darstellt, liegt der Schluss nahe, dass die Ölsäure hier als aktives Prinzip angesehen werden kann. Hierzu passt auch die Beobachtung, dass der Kakaoschalen-Extrakt am PPAR α eher stärker wirksam war, als am PPAR γ , während alle anderen Extrakte, so sie überhaupt PPAR α aktiv waren, hier geringere Effekte zeigten als am PPAR γ . Auch ist der Kakaoschalen-Extrakte einer der wenigen Extrakte, welcher eine, wenn auch nur sehr geringe, Aktivierung des PPAR δ aufwies. Der Kakaoschalen-Extrakt entspricht damit in seinem Aktivitätsprofil dem, wie es von der Ölsäure berichtet ist [60, 61, 104, 210].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

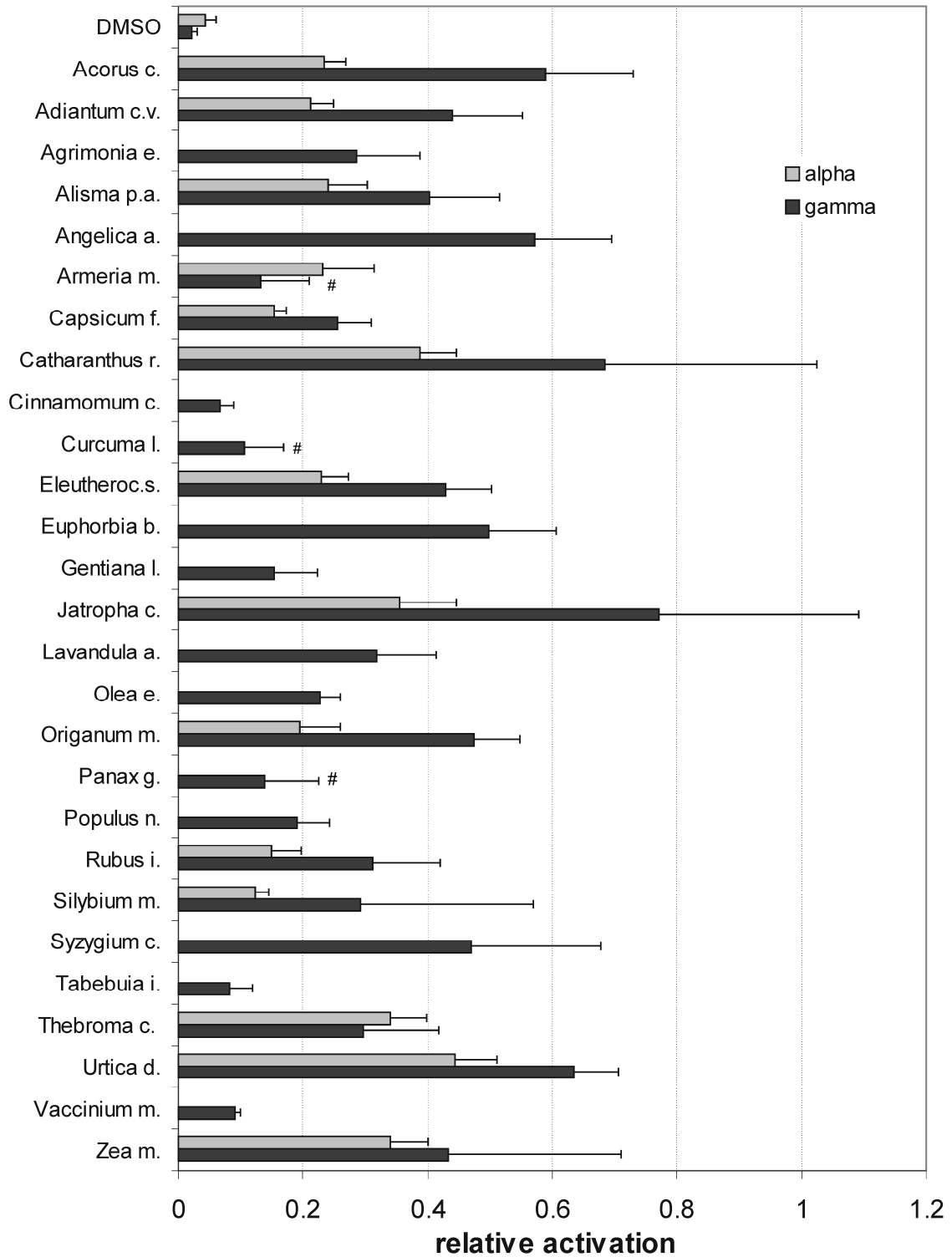


Abbildung 17: Aktivierung von PPAR α und PPAR γ durch pflanzliche Extrakte. Relative Aktivierung gegen Referenz (1 μ M Pioglitazon für PPAR γ und 100 μ M WY14,643 für PPAR α). Alle Werte sind statistisch signifikant verschieden von der DMSO Negativ-Kontrolle mit P>95 % außer #; n \geq 3. (nach [1])

4.1.3. Aktivatoren des PPAR γ , für welche eine konzentrationsabhängige Steigerung des agonistischen Effektes aufzeigbar ist

Für die in diesem Kapitel aufgeführte Gruppe von neun der insgesamt getesteten 55 Extrakte konnte neben des prinzipiellen Nachweises einer signifikanten Aktivierung des PPAR γ auch die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes gezeigt werden. Wobei der Grund hierfür regelmäßig in einer höheren Aktivität dieser Extrakte, gegenüber den anderen getesteten Extrakten, zu finden ist. Die Aktivität der hier behandelten Extrakte war in der Regel ausreichend stark, um bereits bei niedrigeren Konzentrationen als signifikant nachgewiesen zu werden.

Ausschließlich konzentrationsabhängige Aktivierung des PPAR γ konnte gezeigt werden für den Extrakt aus den Zweigen der Euphorbiaceae *E. balsamifera*. Für diese Euphorbiaceae existieren neben der tradierten Anwendung als Antidiabetikum keine publizierten Daten hinsichtlich einer möglichen antidiabetischen oder lipidsenkenden Anwendung.

Für die Gruppe, bestehend aus den fünf Extrakten aus *Acorus*, *Alisma*, *Capsicum*, *Origanum* und *Zea*, konnte der konzentrationsabhängigen Aktivierung des PPAR γ , bei der höchsten Testkonzentration auch eine signifikante Aktivierung des PPAR α aufgezeigt werden.

Für *Capsicum* wurde ein Blutzucker senkende Wirkung auch am Menschen bereits gezeigt [310], und mit dem Capsaicin wurde bereits ein Inhaltsstoff als hypoglykämisch wirksam identifiziert, wobei allerdings aufgrund des hier beobachteten Zeitrahmens von lediglich 2,5 Stunden und der einhergehenden Steigerung der Insulin-Plasmaspiegel, für diese Studien eine Vermittlung der antihyperglykämischen Wirkung über einen PPAR γ Agonismus nicht nahe liegt [311, 312]. Auch eine hypolipidämische Wirkung ist für *Capsicum* beschrieben [313, 314].

Ebenso wurde für eine wässrigen Extrakt aus *Origanum m.* eine hypoglykämische Wirkung beschrieben [315].

Für *Acorus* wurde eine lipidsenkende Wirkung bei Ratten aufgezeigt [316].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für *Alisma* und *Zea* ist keine Literatur mit entsprechenden Wirksamkeitsbelegen vorhanden.

Die letzte Gruppe, bestehend aus den drei Extrakten aus *Catharanthus*, *Jatropha* und *Urtica*, zeigte eine konzentrationsabhängige Aktivierung sowohl des PPAR γ als auch des PPAR α und -mit Ausnahme von *Urtica*- auch eine Aktivierung des PPAR δ bei einer Konzentration von 100 ppm (m/V).

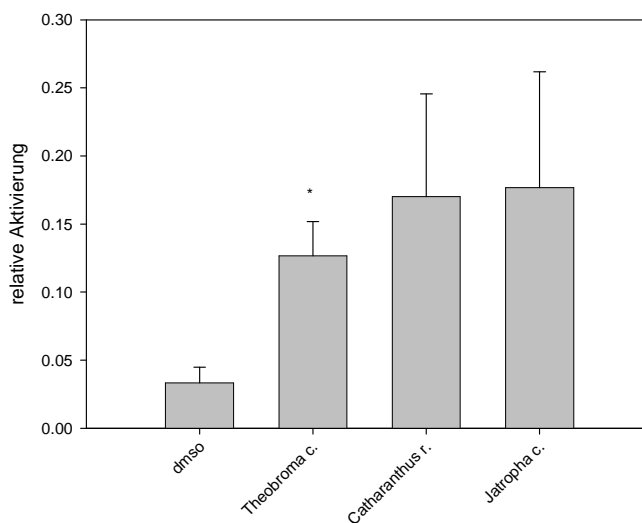


Abbildung 18: Extrakte, die PPAR δ aktivieren. Aufgetragen ist die relative Aktivierung im Vergleich zum Effekt von 1 μ M L165,041. Alle Extrakte wurden getestet bei einer Konzentration von 100 mg/L. Alle Werte statistisch signifikant mit $P > 95\%$, außer * $P > 99\%$.

In dieser Gruppe stellt der *Jatropha*-Extrakt den stärksten PPAR γ Aktivator dar, für welchen sich einigermaßen plausibel ein EC_{50} Wert zumindest abschätzen lässt. So zeigte dieser Extrakt bei der höchsten Testkonzentration von 100 mg/L annähernd den mit Referenz-Substanz maximal erreichbaren Effekt, während der Extrakt bei 30 mg/L regelmäßig weniger als die Hälfte des Maximal-Effektes aufwies, weshalb man für diesen Extrakt eine halbmaximale Aktivierung bei Konzentrationen zwischen 30 und 100 mg/L erwarten darf. Für *Jatropha* ließen sich wiederum keine relevanten Publikationen bezüglich antidiabetischer oder lipidsenkender Wirksamkeit finden.

Sehr wohl aber existieren solche Befunde, und zwar sowohl hinsichtlich Glukose- als auch Lipid-senkender Effekte, für *Catharanthus* [317-319], allerdings muss man einschränken,

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

dass Extrakt-Zubereitungen aus *Catharanthus* aufgrund des potentiellen Vorhandenseins der Vinca-Alkaloide als Mitosegifte für eine Therapie des Diabetes nicht in Frage kommen.

Günstiger stehen hier die Chancen für entsprechende Zubereitungen aus der Brennnessel, auch wenn die bereits publizierten Daten bezüglich Glukose senkender Wirkungen auch hier nicht PPAR γ vermittelt sein dürften [320, 321].

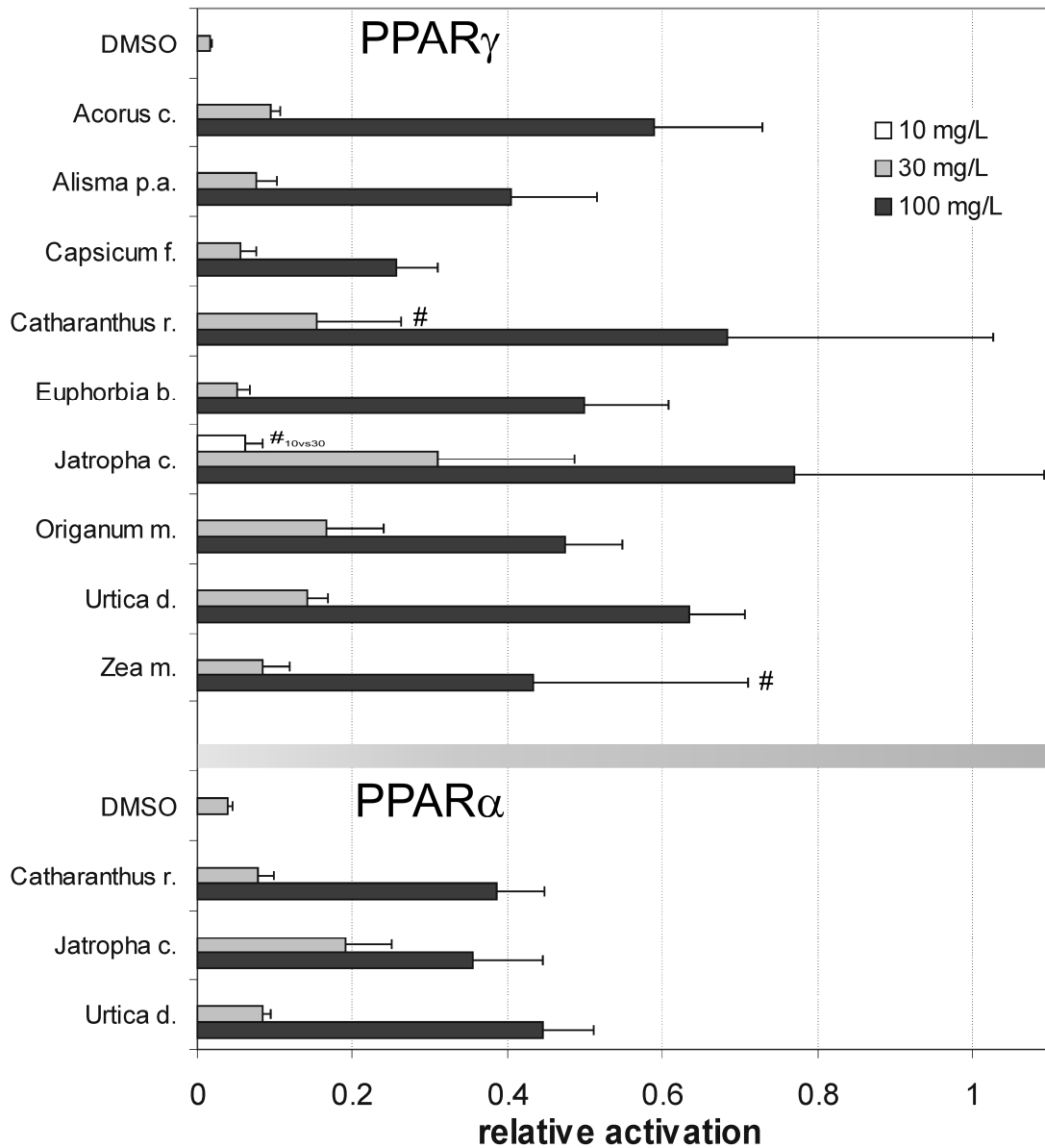


Abbildung 19: Extrakte mit nachgewiesener konzentrationsabhängiger Aktivierung von PPAR α oder PPAR γ . Relative Aktivierung gegen 100 μ M WY14,643 für PPAR α bzw. 1 μ M Pioglitazon für PPAR γ . Alle Werte sind statistisch signifikant ($P \geq 95\%$) verschieden von der Negativ-Kontrolle, außer #. Auch die Werte für die verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes sind signifikant ($P \geq 95\%$) verschieden, außer #_{10 vs 30}, 10 μ M Wert nicht signifikant unterschiedlich zum 30 μ M Wert.

4.2. Ethanolisch-wässrige Extrakte aus *Rosmarinus offic.* und *Salvia offic.* als selektive Aktivatoren des PPAR γ

Die in diesem und dem folgenden Abschnitt geschilderten Ergebnisse wurden in wesentlichen Inhalten publiziert in [2] (die geringfügigen Abweichungen der hier aufgeführten EC₅₀ Werte zu denen der Publikation ergeben sich durch eine dort verwendete unterschiedliche Berechnungsmethode mit Relativierung der erhaltenen Aktivierungsfaktoren gegen Pioglitazon, anstatt gegen den maximal Effekt der jeweiligen Substanz selbst).

Unter den mehr als 50, im Rahmen dieser Dissertation, gescreenten Extrakte erwiesen sich die Extrakte aus den Lamiaceen Rosmarin und Salbei, als bei weitem am stärksten wirksam. Da sich mit beiden Extrakten der mit der Referenz-Substanz Pioglitazon maximal erreichbare Effekt, bei Verwendung entsprechender Konzentrationen, reproduzieren ließ, konnte für diese Extrakte zwanglos eine EC₅₀ Konstante erhalten werden. Diese wurden bestimmt für den Extrakt aus Rosmarin zu $22,8 \pm 8,4$ und für den aus Salbei zu $33,7 \pm 7,3$ mg/L, maximale Aktivierung wurde erreicht bei Konzentrationen von 40 bzw. 50 mg/L.

Im Vergleich zum EC₅₀ Wert der Referenz-Substanz Pioglitazon, welcher mit 270 nM ermittelt wurde, was einer Massenkonzentration von 0,11 mg/L entspricht, ist der Rosmarin Extrakt somit um den Faktor 200 und der Salbei Extrakt um den Faktor 300 schwächer wirksam, als die Reinsubstanz Pioglitazon.

Dieser von uns beobachtete PPAR γ Agonismus eines Rosmarin und eines Salbei Extraktes könnte eine mögliche Begründung sowohl für die volksmedizinische Anwendung der beiden Kräuter bei Diabetes, als auch für die hypoglykämischen Effekte, welche bei Mäusen beschrieben sind [322, 323], wobei im Falle des Salbeis allerdings maximal 4 Stunden nach intraperitonealer Gabe der Blutzucker gemessen wurde, was zumindest für diesen Befund einen PPAR γ vermittelten Effekt eher ausschließt.

Um zu testen, ob der beobachtete Effekt sich mit auf gleiche Art und Weise hergestellten Extrakten einer anderen Drogen-Charge reproduzieren ließ, wurde jeweils ein weiterer Extrakt angefertigt. Diese Extrakte wurden ebenfalls getestet und ihre EC₅₀ Konstanten zu $34,1 \pm 5,7$ mg/L für Rosmarin und $35,0 \pm 2,4$ mg/L für Salbei bestimmt. Die Differenzen

zwischen jeweils den beiden Rosmarin- und Salbei-Extrakten wurden statistisch auf signifikante Differenzen hin untersucht, der zu beobachtende Unterschied sowohl der EC_{50} Konstanten als auch der DEVs erwies sich als nicht signifikant. Die nachfolgende Fraktionierung der Extrakte zeigte, dass das aktive Prinzip in der lipophilen Ethylacetat-Fraktion enthalten war.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass der PPAR γ Agonismus der beiden Extrakte bei Koinkubation mit dem PPAR γ Antagonisten T0070907 teilweise hemmbar war. So wurde der PPAR γ Agonismus der Extrakte bei niedrigen Konzentrationen von 1 μ M des Antagonisten vollständig gehemmt, bei mittleren Konzentrationen nur noch teilweise, während bei hohen Extrakt-Konzentrationen überhaupt keine Hemmung des Effekts mehr zu beobachten war. Dies könnte ein Hinweis sein darauf, dass das aktive Prinzip der Extrakte an anderer Stelle in der recht großen Liganden-Bindetaschen des PPAR γ bindet, als der, als mit einer Molmasse von 278 g eher klein anzusehende, Antagonist. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die doch recht hohe Konzentration des Extraktes, bzw. des in ihm enthaltenen aktiven Prinzips, den Rezeptor kompetitiv gegen den Antagonisten abschirmt, zumal beim verwendeten Protokoll beide Substanzen zeitgleich zugegeben wurden und nicht zuerst mit dem Antagonisten vorinkubiert wurde.

Keiner der beiden Extrakte aktivierte einen der beiden anderen PPAR-Subtypen bei einer Konzentration von 30 mg/L. Beide Extrakte erwiesen sich bei höheren Konzentrationen von jenseits 60 mg/L bei Rosmarin, bzw. 90 mg/L bei Salbei, als stark cytotoxisch.

4.2.1. Potentiell aktive Prinzipien der Extrakte aus *Rosmarinus offic.* und *Salvia offic.*

Nach den vorliegenden Befunden wurden Untersuchungen zur Identifikation des aktiven Prinzips in den beiden Extrakten angestellt. So wurden zunächst einmal Vertreter typischer, in den beiden Lamiaceen enthaltener, Substanzenklassen auf einen möglichen PPAR γ Agonismus hin untersucht, wobei die untersuchten Substanzen literaturbekannt genuin, zumindest in den nativen Pflanzen enthalten sind. So wurde für die Flavon-Derivate das Apigenin untersucht, welches einerseits als Inhaltsstoff aus Rosmarin [324] und Salbei [325] bekannt ist, andererseits aber auch bereits auch Aktivator des murinen PPAR γ publiziert ist [326].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

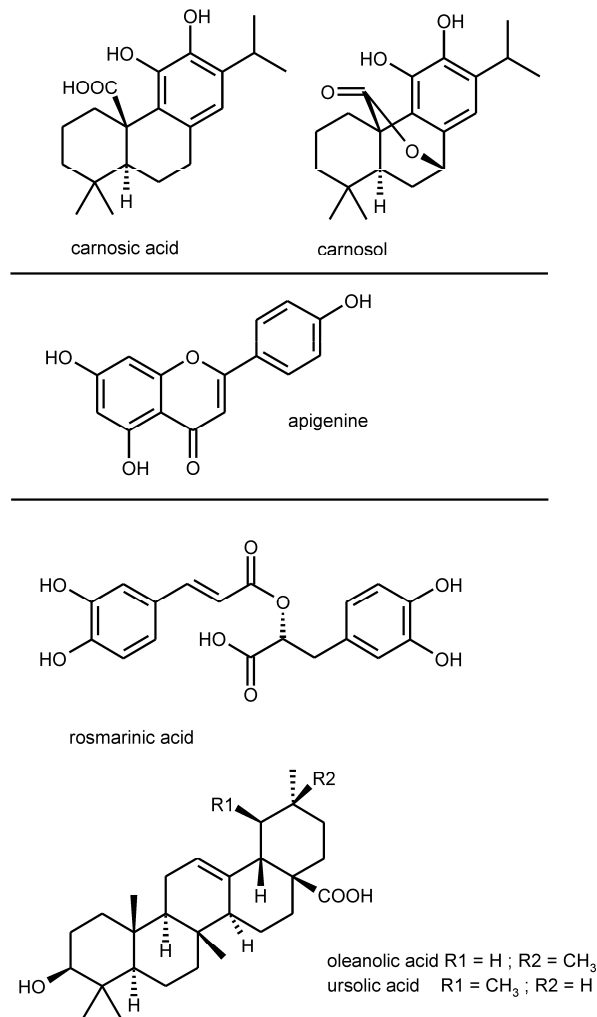


Abbildung 20: relevante Inhaltsstoffe aus Rosmarin und Salbei, nach [2]

Es zeigte sich jedoch, dass Apigenin im Gegensatz zum murinen PPAR γ , an welchem es einen EC₅₀ Wert von etwa 5 μ M aufwies, keinen der humanen PPAR-Subtypen, bis zu Konzentrationen von 30 μ M aktivierte (die höhere Konzentration von 100 μ M wurde von den Cos7 Zellen nicht toleriert).

Gleiches zeigte sich für das Depsid Rosmarinsäure, welches sowohl in Rosmarin als auch in Salbei in relevanten Mengen vorkommt [324, 325], sich aber an allen PPAR-Subtypen bis 30 μ M als völlig unwirksam herausstellte (auch hier wurde die 100 μ M Konzentration von den Testzellen nicht toleriert).

Auch die Triterpensäuren Oleanol- und Ursolsäure wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wobei diese Inhaltsstoffe aus Rosmarin und Salbei [327-330] sich aufgrund publizierter anti-inflammatorischer Wirkungen, welche vom Wirkmechanismus prinzipiell PPAR γ bedingt sein könnten, für eine entsprechende Untersuchung empfohlen [328, 331, 332].

Darüber hinaus wurde für Oleanolsäure eine Aktivierung des murinen PPAR α aufgezeigt [333], bei der relativ hohen Konzentration von 100 μ M auch eine Aktivierung des humanen PPAR α [334], während für semisynthetische Triterpen-Derivate ebenfalls ein PPAR γ Agonismus gezeigt wurde [335, 336].

In unseren Untersuchungen konnten wir allerdings für Oleanol- und Ursolsäure lediglich eine zwar signifikante, allerdings mit weniger als 50 % des maximal Effektes nur schwach ausgeprägte, Aktivierung des PPAR γ bei 100 μ M aufzeigen, während bei 30 μ M (bzw. 20 μ M) eine signifikante Aktivität nicht zu beobachten war (gleiches wurde für PPAR α beobachtet). Dies stimmt mit dem publizierten humanPPAR α Agonismus der Oleanolsäure bei 100 μ M überein.

Zur Relevanz dieser Konzentration zur Erklärung des für Salbei und Rosmarin beobachteten PPAR γ Agonismus sei hierbei angemerkt, dass 30 μ M Ursolsäure einer Massenkonzentration von etwa 47 mg/L entsprechen, so dass bei einer signifikanten Aktivität der Testextrakte, welche bei Konzentrationen ab etwa 10 mg/L gegeben war, eine Reinsubstanz zu mehr als 100 % im Extrakt enthalten sein müsste, um ein oder das aktive Prinzip des Extraktes zu sein.

4.2.2. Carnosolsäure und Carnosol

Eine weitere Verbindungsklasse, welche in Rosmarin und Salbei in relevanten Mengen vorkommt, sind die von der Carnosolsäure abgeleiteten Diterpene [337-339].

Die Stammsubstanz dieser, das Strukturelement eines *ortho*-di-Phenols enthaltenden Diterpene, stellt die Carnosolsäure dar, aus welcher durch aufeinander folgende Oxidationsschritte durch Eintritt von Sauerstoff in das Molekül oder im Sinne einer Dehydrierung, die abgeleiteten Verbindungen entstehen.

Von diesen Verbindungen wurden die Carnosolsäure selbst und das im ersten Oxidationsschritt erhaltene Carnosol auf Aktivierung des PPAR γ hin untersucht. Beide Substanzen aktivierten weder den PPAR α noch den PPAR δ bei einer Konzentration von 30 μ M. Hingegen erwiesen sich beide Substanzen bei Konzentrationen ab 10 μ M als Aktivatoren des PPAR γ . Die für Carnosolsäure bestimmte EC₅₀ Konzentration für die Aktivierung des PPAR γ wurde hierbei zu $19,6 \pm 2,0$ μ M bestimmt, die für Carnosol zu $41,2 \pm 5,9$ μ M. Die potentere Carnosolsäure ist hiermit um etwa den Faktor 70 weniger potent, als das in Dosierungen von 15 bis 45 mg pro Tag eingesetzte Antidiabetikum Pioglitazon (Actos®).

Auf diesen Befund hin untersuchten wir die getesteten Extrakte aus Rosmarin und Salbei HPLC-analytisch auf das Vorhandensein und den Gehalt an diesen beiden Diterpenen. Es zeigte sich, dass der stärker PPAR wirksame Rosmarin-Extrakt mit 2,9 % Carnosol und nicht quantifizierbarem Gehalt an Carnosolsäure, im Vergleich zum Salbei-Extrakt mit 6,7 % Carnosol und 1,9 % Carnosolsäure, den geringeren Gehalt an diesen beiden Diterpenen aufwies.

Dieses Ergebnis stand natürlich im direkten Widerspruch zur Hypothese, dass die beiden Diterpene die wirksamkeitsbestimmenden Agenzien in beiden Extrakten seien, da der weniger potente Salbei-Extrakt die höheren Gehalte an den beiden Diterpenen aufwies. Darüber hinaus reichte in beiden Extrakten der nominelle Gehalt an den Diterpenen allein nicht aus, den PPAR γ Agonismus zu erklären.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

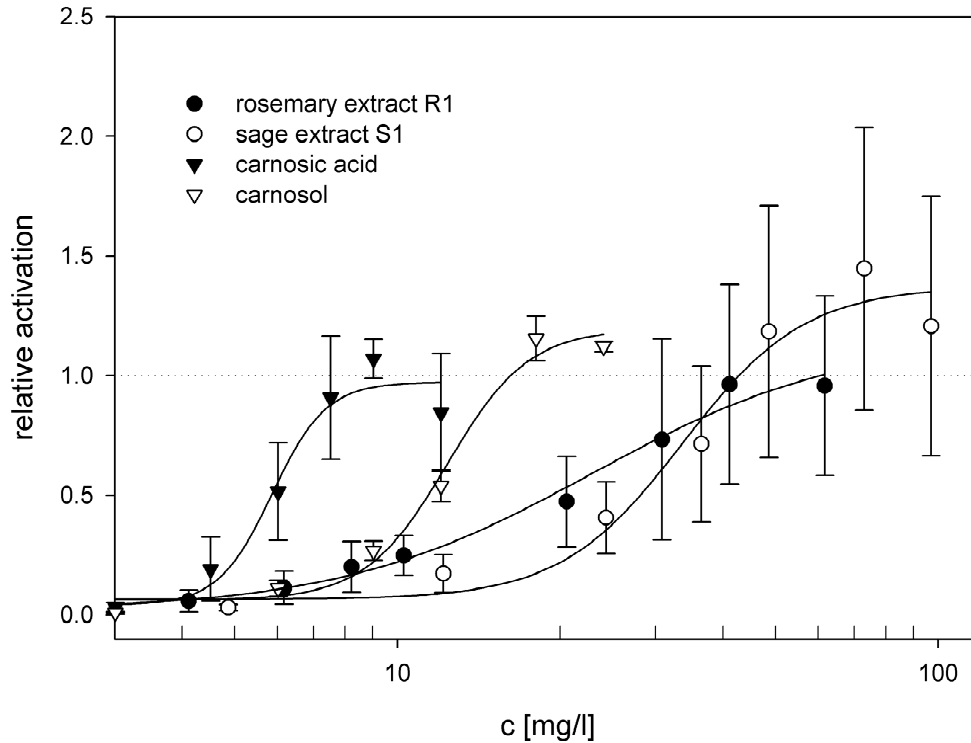


Abbildung 21: Aktivierung von PPAR γ durch Extrakte aus Rosmarin und Salbei und die beiden Reinsubstanzen Carnosolsäure und Carnosol (aus [2])

Vielmehr hätte der Gehalt rein rechnerisch im Salbei-Extrakt etwa um den Faktor drei und im Rosmarin-Extrakt um mehr als den Faktor zehn höher sein müssen.

Die erste mögliche Erklärung hierfür wäre, eine höhere Wirksamkeit des jeweiligen Diterpens in der Matrix des Extraktes im Vergleich zur Reinsubstanz, wobei hier als Begründung zuallererst an eine erhöhte Stabilität gegenüber oxidativem Abbau zu denken wäre (während eine Verbesserung der Permeation durch die Zellmembran prinzipiell möglich ist, angesichts der hohen Lipophilie der Stoffe aber wohl nicht relevant ist). Ein entsprechender Versuch, bei dem der Extrakt zu $\frac{1}{3}$ bzw. zu $\frac{2}{3}$ verdünnt und nur die dadurch fehlende Menge an Carnosolsäure durch zuspiken supplementiert wurde, ergab allerdings, dass die zugespikte Carnosolsäure nicht stärker wirksam war, als von der Reinsubstanz zu erwarten. Dieser Befund würde dafür sprechen, dass neben Carnosolsäure und Carnosol noch weiter aktive und möglicherweise verwandte Substanzen in unseren Extrakten enthalten waren.

Eine Hypothese, die sich allerdings aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit dieser Substanzen und aufgrund ihrer mangelnden Stabilität wohl nicht verifizieren lassen wird.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

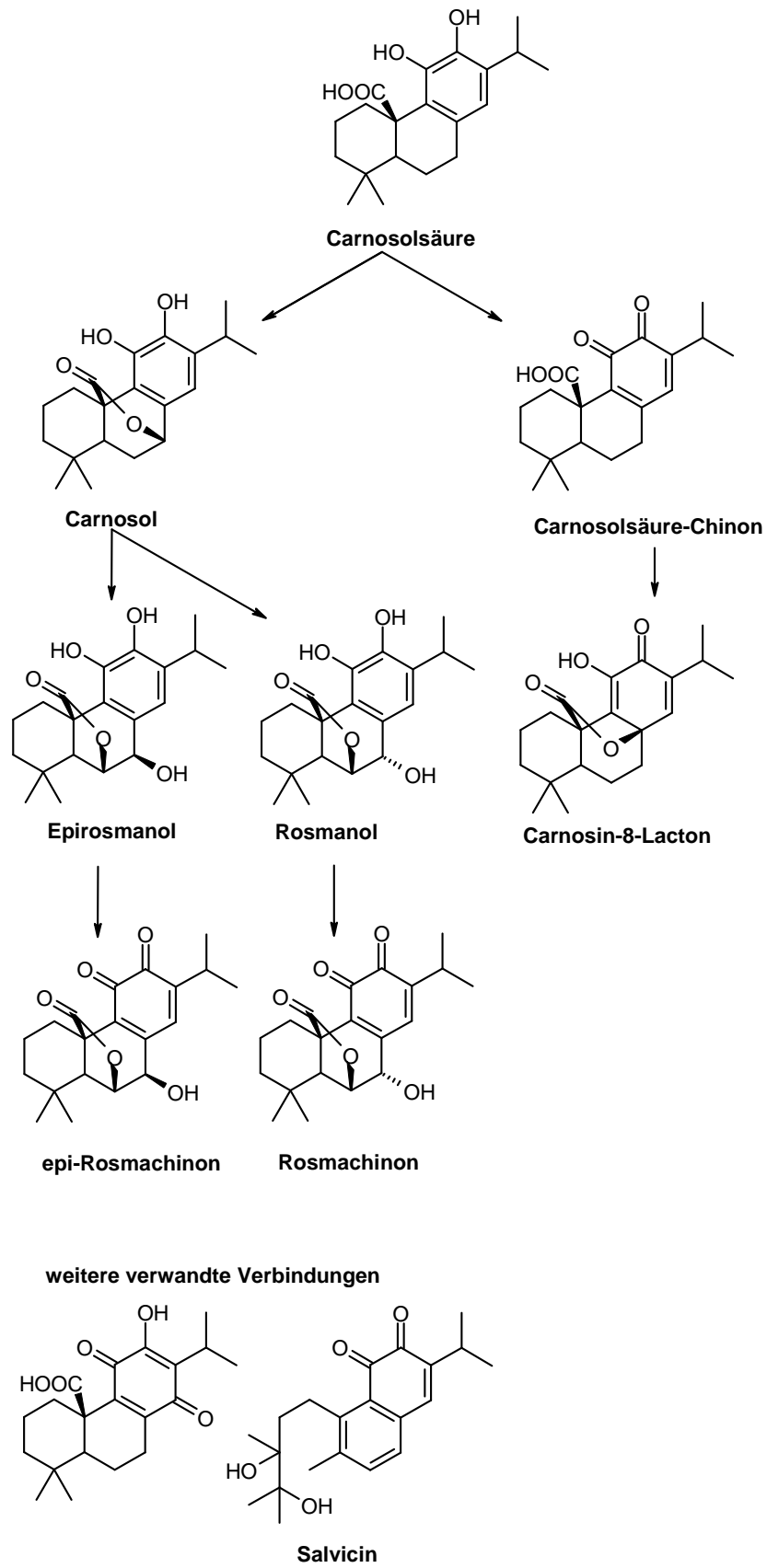


Abbildung 22: Oxidativ von Carnosolsäure abgeleitete Abietan- Diterpenoide [337-343].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Immerhin konnten wir bei der HPLC-analytischen Untersuchung der Stabilität von Carnosol feststellen, dass die Substanz in unserem Salbei-Extrakt unter den Inkubationsbedingungen, also in DMEM bei 38° C und 10 % CO₂ für mindestens sechs Stunden stabil war (für Carnosolsäure war dieser Nachweis nicht möglich, da es bei der entsprechenden Verdünnung des Extraktes, entsprechend der höchsten eingesetzten Testkonzentration, nur unterhalb der Quantifizierungsgrenze vorhanden war), der Extrakt somit Begleitstoffe enthalten muss, welche Carnosol vor oxidativem Verbrauch schützen.

Die Reinsubstanzen aber, und zwar vornehmlich Carnosol, weniger die Carnosolsäure, waren unter den Inkubationsbedingungen wesentlich instabiler und nach acht Stunden unterhalb der Quantifizierungsgrenze.

Dies wiederum würde nun eher darauf hindeuten, dass der apparente, von uns gemessene, EC₅₀ Wert der PPAR γ -Aktivierung der beiden Substanzen höher ist, als der tatsächliche Wert, da ein Teil der Substanzen einem oxidativen Verbrauch unterliegt. Dieser tatsächliche Wert wäre allerdings nur unter oxidativer Stabilisierung zu ermitteln, also durch Zugabe eines Antioxidantiums, wie etwa Butylhydroxytoluol (BHT), in ausreichender antioxidativer Kapazität, was wiederum von den Testzellen nicht toleriert würde (so wirkte BHT bei einer Konzentration von 100 μ M bereits merklich toxisch auf die Zellen, wäre aber bei dieser Konzentration maximal in einem 10-fachen molaren Überschuss zur niedrigsten verwendeten Testkonzentration der beiden Diterpene vorhanden).

Ein weiterer Versuch wurde nun unternommen, um die Robustheit unseres Testes nachzuweisen, dafür wurden die beiden Reinsubstanzen unter den Inkubationsbedingungen, also bei 37° C und 10 % CO₂ für sechs Stunden vorinkubiert und erst danach im Assay eingesetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Aktivität der Testlösung nicht abgenommen hatte, was den Verlust der Aktivität durch Oxidation als Erklärung ausschloss und wiederum eher auf mögliche aktive oxidative Derivate schließen lässt.

Man muss nun einschränken, dass bei diesen HPLC-Untersuchungen jeweils nur der zelluläre Überstand vermessen wurde, die intrazellulären Konzentrationen jedoch weiterhin unbekannt sind, so dass hier auch an eine mögliche Anreicherung der sehr lipophilen Testsubstanzen in lipophilen Kompartimenten zu denken ist.

Es bleibt somit die Feststellung, dass die von uns untersuchten Extrakte aus Rosmarin und Salbei stärker PPAR γ agonistisch wirksam sind, als ihr Gehalt an den PPAR γ -Agonisten Carnosolsäure bzw. Carnosol erwarten lässt. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass weitere PPAR γ agonistische Prinzipien in den beiden Extrakten enthalten sind, welche ihrer Natur nach von Carnosolsäure abgeleitet sein mögen. Immerhin aber ist nicht ganz auszuschließen, dass sowohl Carnosolsäure als auch Carnosol ohne oxidativen Verbrauch wesentlich stärker aktiv wären.

Durch Untersuchung eines weiteren Rosmarin-Extraktes, nämlich Rosemary Extrakt CA® der Firma Raps, war es uns immerhin möglich, einen Extrakt zu testen, bei welchem der Gehalt an Carnosolsäure sehr gut mit seiner Aktivität am PPAR γ korreliert. Und zwar wurde für diesen Extrakt eine EC₅₀ Konstante für die Aktivierung des PPAR γ von $10,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ gefunden, wobei der Gehalt an Carnosolsäure in diesem Extrakt laut Hersteller bei 40,51 % lag. Der PPAR γ agonistische Effekt kann für diesen Extrakt also zu annähernd 70 % allein mit seinem Gehalt an Carnosolsäure erklärt werden, wobei dieser Extrakt darüber hinaus in geringeren Anteilen noch Carnosol enthält.

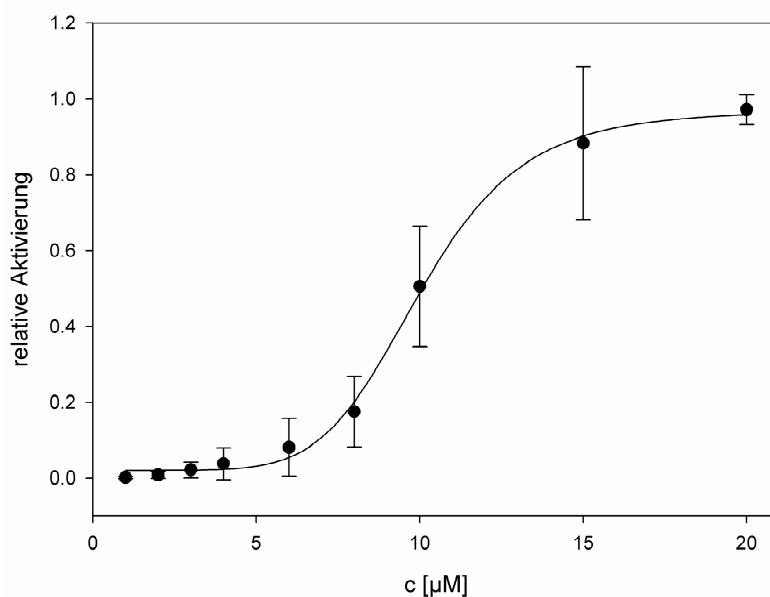


Abbildung 23: Aktivierung von PPAR γ durch den Rosmarin Extrakt CA der Firma Raps mit einem Gehalt von 40 % Carnosolsäure (n=3)

Zur Untersuchung eines möglichen Bindemodus von Carnosolsäure in der Liganden-Bindetasche von PPAR γ wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Schneider von Yusuf Tanrikulu Docking-Studien für Carnosolsäure in der PPAR γ -Kristallstruktur 2F4B durchgeführt [186]. Bei diesem Docking mit der Software Gold wird ein Bindemodus vorgeschlagen, der dem anderer PPAR γ Agonisten ähnelt. So werden Wasserstoffbrücken-Interaktionen zu den Aminosäuren Serin289 (Helix 3), Histidin323 und Tyrosin327 (Helix 5) und Tyrosin473 (Helix 10) vorgeschlagen. Zwar kann aus diesem Modell eine Interaktion zum Tyrosin473 der Helix 12 nicht abgeleitet werden, allerdings ist der Abstand einer der phenolischen Hydroxy-Gruppen der Carnosolsäure zu diesem Tyrosin mit 4 Å nicht sehr viel größer, als die optimale Entfernung zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke. So dass man sich vorstellen kann, dass in einer weniger rigiden Konformation des Rezeptors, also in Lösung anstatt im Kristall, hier eine Interaktion durchaus möglich wäre.

Interessanterweise werden bei diesem Docking Wasserstoffbrücken Interaktionen nicht nur zur Carboxyl-Gruppe von Carnosolsäure, sondern auch zu den phenolischen Hydroxy-Gruppen vorgeschlagen.

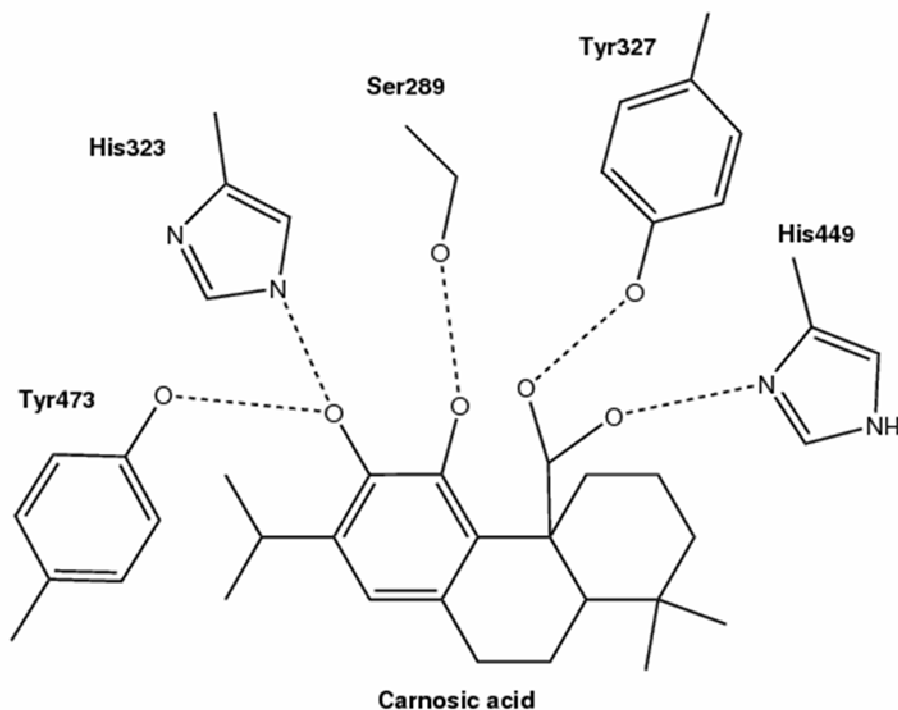


Abbildung 24: Von Gold vorgeschlagene Wasserstoffbrücken-Interaktionen von Carnosolsäure zu spezifischen Aminosäuren des PPAR γ .

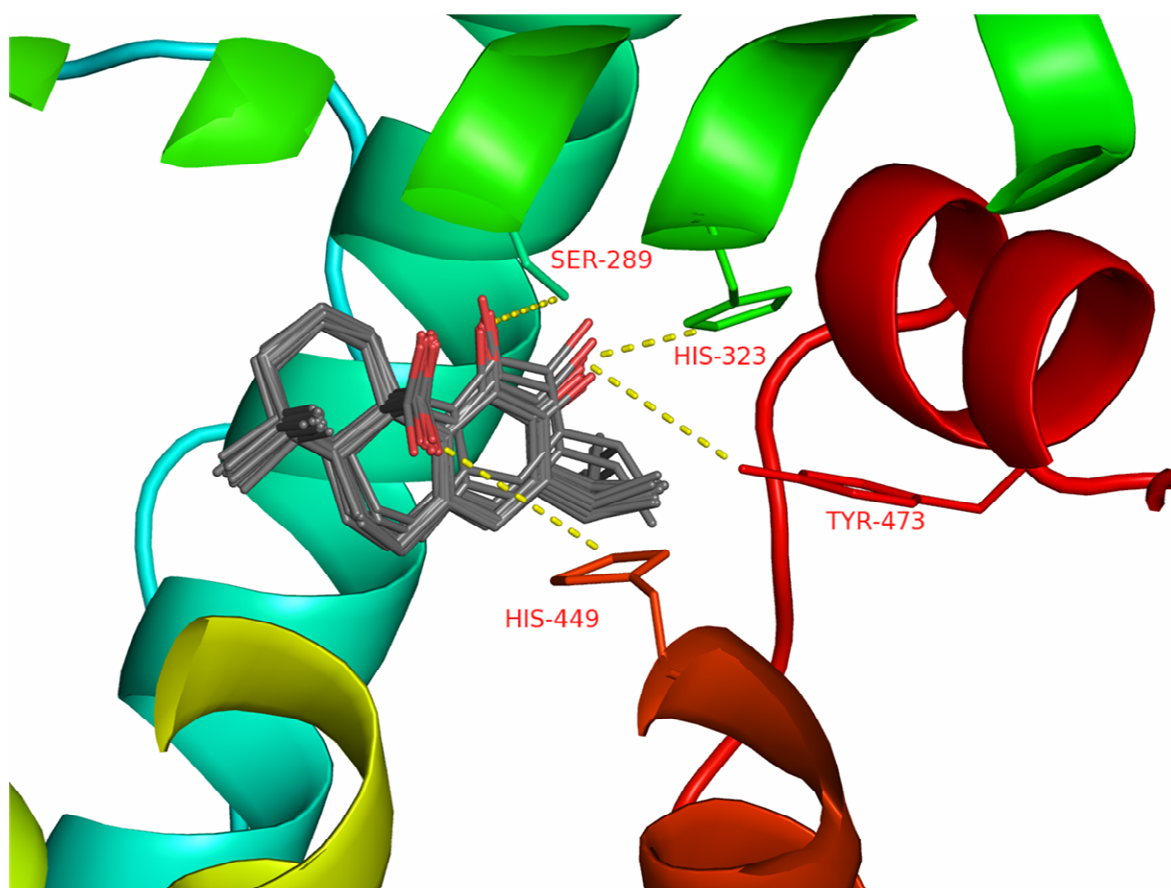


Abbildung 25: Docking von Carnosolsäure in die PPAR γ -Kristallstruktur 2F4B. Mögliche Wasserstoffbrücken Interaktionen mit den entsprechenden Aminosäuren des PPAR γ sind mit gelb gepunkteten Linien veranschaulicht.

Zur genaueren Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus von Carnosolsäure und Carnosol wurden weiterhin beide Reinsubstanzen, in Analogie zur entsprechenden Untersuchung der Extrakte, auf die Hemmbarkeit des Effektes durch Koinkubation mit dem kompetitiven Antagonisten T0070907 hin untersucht (bei höheren Konzentrationen wurde auch eine irreversible Hemmung durch Ausbildung einer kovalenten Bindung für T0070907 aufgezeigt) [344]. Es zeigte sich dasselbe Bild, wie bei den Extrakten. Während die Pioglitazon induzierte Aktivierung des PPAR γ durch den Antagonisten T0070907 fast vollständig hemmbar war und sich erst bei einem fünffachen molaren Überschuss an Pioglitazon eine signifikante Restaktivität nachweisen ließ, war bei den beiden Diterpenen der PPAR γ Agonismus nur bei niedrigen Konzentrationen signifikant hemmbar, während er bei höheren Konzentrationen die Wirkung des Antagonisten zunehmend überkam. Dies könnte durch einen Bindemodus von Carnosolsäure und Carnosol in der Liganden-

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bindetasche des PPAR γ bedingt sein, welcher zu einem geringeren Maße eine Überlappung mit der, für die Interaktion mit dem Antagonisten T0070907, essentiellen Aminosäure Cystein285 bzw. mit dem an dieser Stelle gebundenen Agonisten selbst aufweist. Eine weitere mögliche, angesichts der hohen Affinität von T0070907 allerdings eher wenig plausible, Erklärung wäre, dass die beiden Diterpene in so hohen Konzentrationen vorhanden waren, dass der Antagonist, welcher ja nicht vorinkubiert, sondern gleichzeitig zugegeben wurde diese nicht kompetitiv verdrängen konnte. Dies könnte dann auch auf eine höhere Affinität von Carnosolsäure bzw. Carnosol in Relation zu ihrer Aktivität hinweisen. Mit anderen Worten, beide Substanzen binden möglicherweise bereits bei niedrigen Konzentrationen, benötigen zur Aktivierung allerdings höhere Konzentrationen.

Letztlich kann hier aber nur spekuliert werden, solange eine entsprechende Kristallstruktur nicht vorliegt.

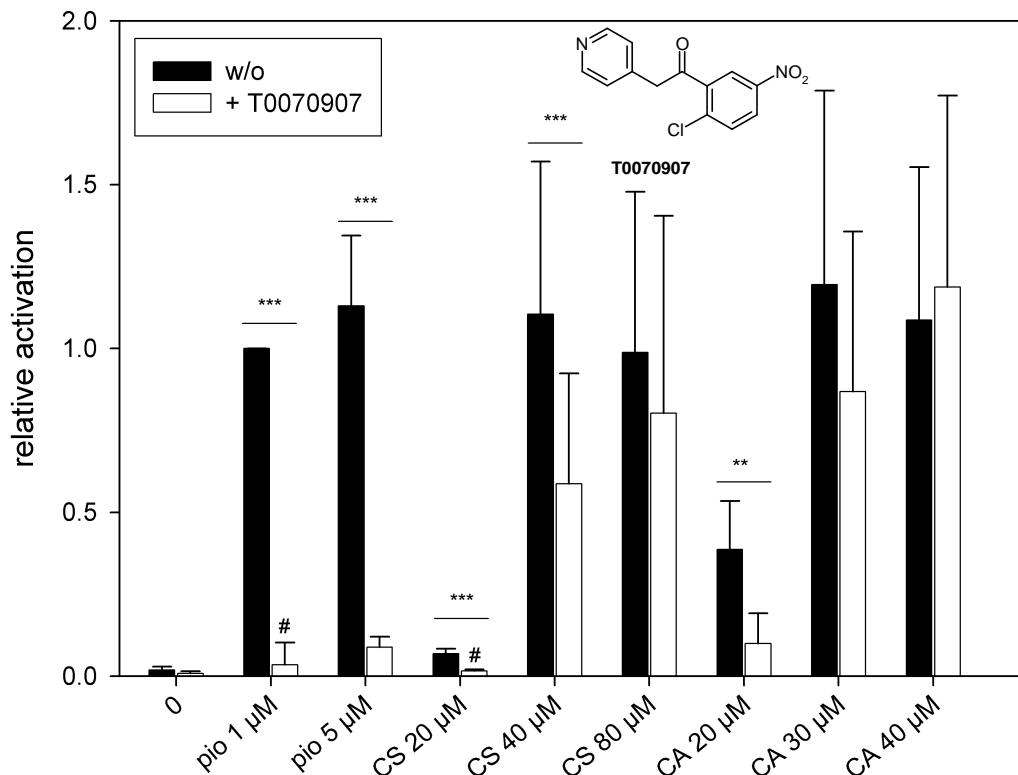


Abbildung 26: Inhibition des PPAR γ Agonismus von Pioglitazon (pio), Carnosol (CS) und Carnosolsäure (CA) bei den angegebenen Konzentrationen ohne und mit 1 μ M des PPAR γ Antagonisten T0070907. Alle Werte sind signifikant unterschiedlich zur Negativ-Kontrolle außer #, signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation mit und ohne T0070907 sind angegeben oberhalb der Linien, wobei * (P>95 %), ** (P>99 %) und *** (P>99,9 %) mit (n=7).

Zusammenfassend kann man sagen, dass wir ausreichende Hinweise dafür gefunden haben, dass Carnosolsäure und Carnosol zumindest unter den PPAR γ aktiven Prinzipien in Rosmarin und Salbei sind.

Unsere Befunde könnten einen Zusammenhang aufzeigen, zu bereits publizierten hypoglykämischen Effekten von Carnosolsäure, Rosmarin bzw. Salbei.

In einer russische Publikation, welche uns aufgrund der Sprache allerdings nur im Abstract vorliegt wurden ausgeprägte hypoglykämische Effekt von Salvin (Synonym für Carnosolsäure) sowohl in normoglykämischen, als auch in Alloxan induziert diabetischen Mäusen gefunden. Die Gabe erfolgte hierbei peroral. Die Dosis lag in dieser Untersuchung mit 50 mg/kg durchaus in einem Bereich, der im Hinblick auf unsere Ergebnisse relevant sein könnte. Allerdings war der Beobachtungszeitraum bei dieser Studie mit zwei Stunden zu kurz [345].

In einer anderen Arbeit wurde für die intraperitoneale Gabe eines methanolischen Salbei-Extraktes ab 250 mg/kg eine Senkung der Glukose-Spiegel innerhalb 5 Stunden beschrieben, allerdings ist hier aufgrund der hohen Dosis, des Administrationsweges und des kurzen Beobachtungszeitraumes eine geringere Relevanz für unsere Beobachtungen zu sehen [346].

Für einen wässrigen Infus aus Rosmarin existiert allerdings eine kleinere Tierstudie, bei der bei einem Beobachtungszeitraum von einem Monat eine Abnahme der Plasma-Glukosespiegel gezeigt wurde. Auch wenn hier keine Aussage über die applizierte Menge an Infus getroffen wird und die Extraktion von Carnosolsäure in einen wässrigen Aufguss fraglich ist, existiert hier doch die Möglichkeit eines funktionellen Zusammenhanges [323].

4.2.3. Fußnote: Derzeitige Verwendung Carnosolsäure-haltiger Produkte

Die Verbindungsklasse der von Carnosolsäure abgeleiteten Abietan-Diterpene erregt allein schon aufgrund ihrer ausgesprochenen Wirksamkeit als Antioxidans Interesse. So wurden die Carnosolsäure und ihre weiterhin antioxidativ wirksamen Derivate, als wirksames Prinzip in Rosmarin- bzw. Salbei-Extrakten erkannt, welche in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel für Nahrungsfette und Fleischprodukte verwendet werden [347]. Aufgrund ihrer hohen antioxidativen Kapazität verhindern diese Diterpene den oxidativen

Verderb also das ranzig werden dieser Lebensmittel und werden als stärker wirksame Alternative zu synthetischen Antioxidantien wie BHT (Butylhydroxytoluol) eingesetzt. Wegen der langjährigen, um nicht zu sagen Jahrhunderte währenden Erfahrung der Menschheit mit Rosmarin und Salbei als Zusatzstoffe zur Konservierung der Nahrung, haben entsprechende Zubereitungen auch den Status der Unbedenklichkeit als Lebensmittelzusätze, etwa den GRAS Status (**g**enerally **r**ecognised **a**s **s**afe) der FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration: US-Behörde zuständig für Nahrungs- und Arzneimittel (<http://www.fda.gov/>)). Entsprechende Zubereitungen aus Rosmarin oder Salbei werden ab 0,1 Promille angewandt, das synthetische Antioxidans BHT bis zu Konzentrationen von 0,2 Promille [348], während für das synthetische BHT in der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZzulV) und der EU-Richtlinie 92/2/EG ein Grenzwert von maximal 0,4 Promille festgelegt wurde, hat der Gesetzgeber die Festlegung eines solchen Grenzwertes für die pflanzlichen Antioxidantien nicht für nötig gehalten. Für die Festlegung des Grenzwertes und einer Tageshöchstdosis (ADI) hat sicherlich die Kontroverse um die toxikologische Bedenklichkeit dieser Klasse von Antioxidantien beigetragen [349].

4.3. Ausblick: PPAR γ - ein Phosphoprotein? *In-silico* Analyse zur Vorhersage möglicher Phosphorylierungsstellen der LBD des PPAR γ

Zur weiteren Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus von Carnosolsäure und Carnosol stellten wir weiter Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Aktivierung durch Phosphorylierung der LBD des PPAR γ an.

Sowohl PPAR α als auch PPAR γ sind hinreichend als Phosphoproteine publiziert. Während allerdings für den PPAR α über alle Domänen verteilt mehrere Phosphorylierungs-Positionen beschrieben sind, welche auch bei der Regulation der Aktivität beteiligt sind, ist beim PPAR γ lediglich das in der AF-1 Domäne gelegenen Serin 112 (bei Zählweise der Sequenz des PPAR γ_2), bzw. das diesem Serin entsprechende Serin 82 des PPAR γ_1 , als Phosphorylierungs-Site und als Regulator der Transaktivierungsaktivität beschrieben. Diese Domäne des PPAR γ ist allerdings in unserem Assay nicht enthalten und würde von

diesem nicht erfasst werden. In Analogie zu PPAR α könnte man jedoch vermuten, dass auch PPAR γ durch vielfältigere Phosphorylierungen reguliert wird.

Die *in-silico* Analyse der PPAR γ Sequenz über gängige Internet-Software etwa NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) [350] oder über den PhosphoMotif Finder der Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org/>) ergab die Vorhersage von mehr als 20 potentiellen Phosphorylierungs-Positionen, mit Sequenz-Übereinstimmung zu bekannten Protein-Kinase Erkennungs-Sequenzen., allein für die AF2-Domäne des PPAR γ (NetPhosK).

Aminosäure	Position der PPAR γ_1 Sequenz	NetPhos2.0 Score	NetPhos2.0 Prediction	NetPhosK1.0 Score	Consensus	Kinase
Ser	206	0.005		0.52	9 / 10	CKII
	219	0.932	*S*	0.8	10 / 10	PKC
Tyr	220	0.09		0.55	10 / 10	INSR
Ser	223	0.09		0.76	10 / 10	PKC
	227	0.45		0.84	10 / 10	PKC
Thr	236	0.928	*T*	0.83	9 / 10	PKC
	239	0.348		0.64	10 / 10	PKC
	240	0.59	*T*	0.62	9 / 10	PKC
Ser	243	0.899	*S*	0.56	9 / 10	cdk5
	252	0.57	*S*	-/-	-/-	-/-
Thr	300	0.273		0.51	7 / 10	cdc2
	314	0.022		0.58	10 / 10	PKC
Ser	330	0.023		0.52	10 / 10	PKA
	340	0.181		0.51	9 / 10	CKI
	353	0.954	*S*	0.87	10 / 10	PKC
	380	0.056		0.51	9 / 10	CKII
	392	0.091		0.77	10 / 10	PKC
	427	0.068		0.59	10 / 10	DNAPK
Ser				0.52	9 / 10	cdc2
	462	0.754	*S*	0.55	9 / 10	PKA
Tyr	471	0.808	*Y*	-/-	-/-	-/-
	475	0.913	*Y*	0.55	10 / 10	INSR

Tabelle 5: *In-silico* Analyse der Protein Sequenz der LBD von PPAR γ mit NetPhos und NetPhosK. Positionen, welche sowohl von NetPhos als auch NetPhosK vorhergesagt werden, sind grün hinterlegt [350]. Der Score ist eine Funktion des jeweils verwendeten Algorithmus und kann von von 0 bis 1 reichen, wobei 1 für die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Phosphorylierung steht. Der Cut-off für eine positive Vorhersage ist hierbei bei NetPhos mit 0,5 willkürlich festgelegt. NetPhosK gibt neben dem Score, welchem hier, abgesehen von einem relativen Vergleich, keine weitere Bedeutung beigemessen wird, die in Frage kommende Kinase an und ob die entsprechende Erkennungssequenz bei anderen Proteinen tatsächlich phosphoryliert wird (als x von 10). Zwischen den Aminosäuren Ser219 und Ser240 liegen insgesamt sechs potentielle Sites für die PKC geclustert vor, welche sich auf den Helices 1 und 2 der LBD von PPAR γ_1 befinden. Zum Vergleich die experimentell verifizierte Phosphorylierung von Serin 82 (PPAR γ_1 entsprechend Ser112 PPAR γ_2) hat einen Score von 0,861 (NetPhos) und von 0,52 (NetPhosK).

Hiebei werden die jeweiligen Sequenzen als Homologe bei einem hohen Anteil der bisher beschriebenen Proteine auch als Phospho-Akzeptor Positionen genutzt und könnten damit möglicherweise als Consensus-Sequenzen definiert werden.

Unter diesen Sequenzen befinden sich sieben, welche bei Verwendung eines anderen Algorithmus (NetPhos) ebenfalls mit einem hohen score bewertet werden, darunter vier, welche von der Proteinkinase C (PKC) bedient werden.

Darüber hinaus liegen viele der erkannten potentiellen Phosphorylierungs-Positionen zumindest der PKC geclustert vor, was die Vermutung nahe legt, dass durch diesen Mechanismus sichergestellt wird, dass die PKC in der entsprechenden Domäne auch tatsächlich ein passendes Substrat vorfindet.

Dieser Befund motivierte einen Versuch, bei dem der Effekt von 100 nM des PKC-Aktivators Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) auf die Aktivierung des PPAR γ in unserem Assay untersucht wurde. Für die Koinkubation von Carnosolsäure und Carnosol mit PMA ließen sich hier keine statistisch eindeutigen Aussagen treffen. Allerdings zeigte sich, dass PMA alleine zu einer signifikanten Aktivierung von PPAR γ führte, als auch die maximale Aktivität bei Koinkubation mit 1 und 5 μ M Pioglitazon um etwa 100% erhöhte. Unglücklicherweise ließ sich eine Hemmung dieses Effekts, aufgrund der Induktion von Apoptose durch diese Substanzen bei den benötigten langen Inkubationszeiten, aber weder durch ATP-kompetitive noch durch Diacylglycerol kompetitive Inhibitoren der PKC, nachweisen. Der bei Koinkubation mit PMA zu beobachtende Super-Agonismus ließ sich hingegen mit dem kompetitiven Antagonisten T0070907 signifikant hemmen, allerdings war diese Hemmung wiederum signifikant verschieden, von der ohne Koinkubation mit PMA.

Nun wirkt PMA nicht ausschließlich als selektiver PKC Aktivator. Weiterhin ist die Überlagerung der Effekte bei Koinkubation dreier Substanzen relativ schwer gegeneinander abzuschätzen, so dass die Relevanz dieses Befundes vorsichtig zu bewerten ist.

Insgesamt aber erscheint die Untersuchung von PPAR γ auf mögliche Phosphorylierung durch diese Befunde ausreichend Erfolg versprechend.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

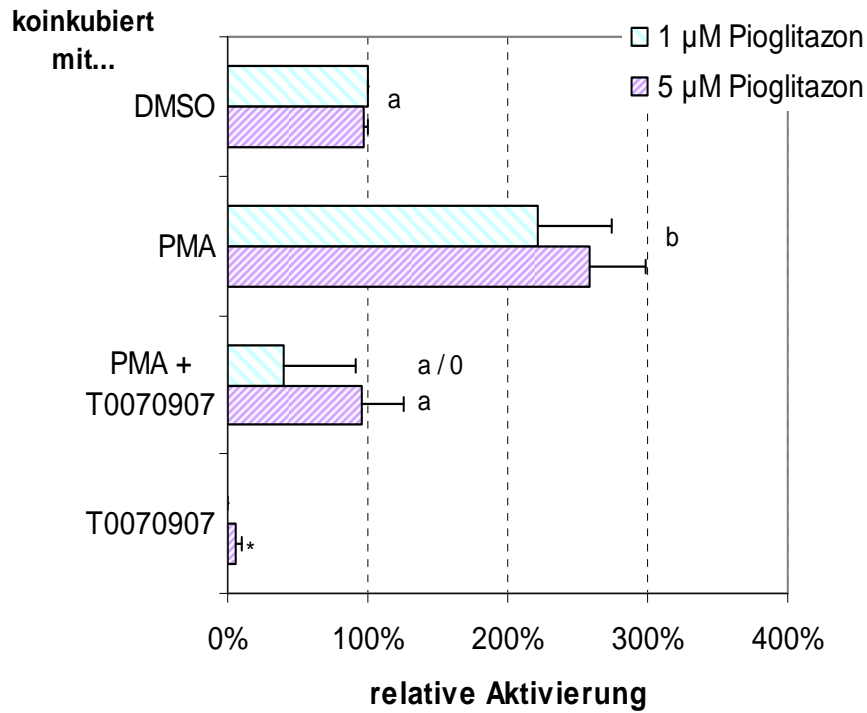
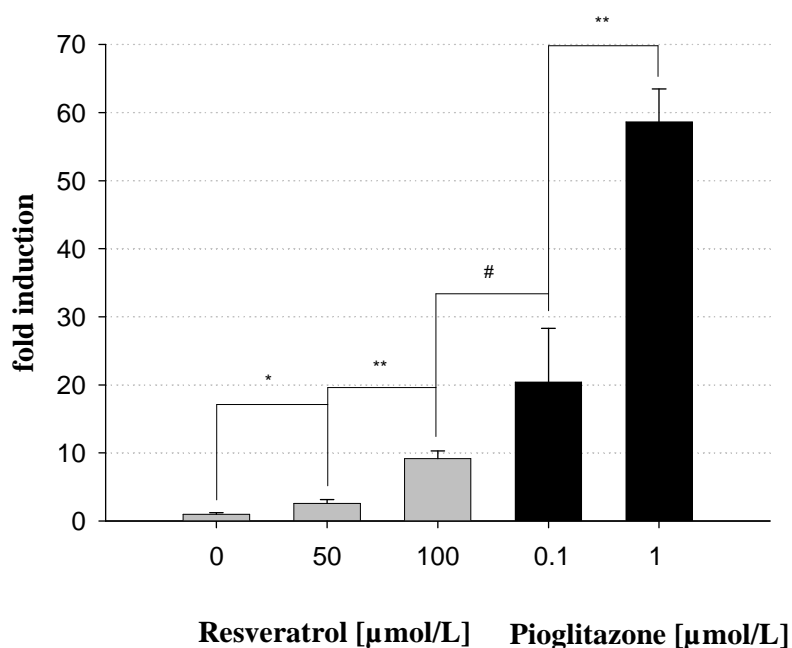


Abbildung 27: Effekt der Koinkubation von Pioglitazon mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) auf die Aktivierung von PPAR γ . Gegeben ist die relative Aktivierung im Vergleich zum Effekt bei 1 μ M Pioglitazon allein. Die Rubriken DMSO und PMA sind mit mindestens $P > 95\%$ statistisch voneinander verschieden, ebenso die Rubrik PMA versus PMA+T0070907, nicht aber DMSO vs. PMA+T0070907, wobei innerhalb dieser Rubrik der Wert für die 1 μ M Konzentration an Pioglitazon auch von der Negativ-Kontrolle (kein Pioglitazon, kein PMA) verschieden ist. Bei Koinkubation von Pioglitazon mit T0070907 allein ergibt sich nur die die 5 μ M Konzentration an Pioglitazon eine signifikante Restaktivität.

4.4. Testung von Resveratrol auf Agonismus am humanen PPAR

Die in diesem Abschnitt geschilderten Ergebnisse, welche in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Stein am Universitäts-Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität durchgeführt wurden, sind publiziert in Ulrich et al. [3]. Ziel der unternommenen Untersuchungen war die Aufklärung des Wirkmechanismus von Resveratrol bei der Zellwachstumshemmung von Kolon Carcinom Zellen. Es zeigte sich, anhand von Untersuchungen in einer PPAR γ dominant negativ transformierten Caco-2 Zelllinie, dass die Resveratrol vermittelten Effekte zumindest teilweise PPAR γ vermittelt sind. Allerdings legt die eher schwach ausgeprägte Aktivierung der Ligand-abhängigen-Transaktivierungsdomäne des PPAR γ durch Resveratrol (schwach signifikant bei 50 μ M, hoch signifikant, aber weniger als 20% des maximal Effektes bei 100 μ M) nahe, dass die Beeinflussung von PPAR γ nur teilweise über die Ligand-abhängige-Transaktivierungsdomäne stattfindet. Dazu passt, dass zumindest einige der Resveratrol vermittelten Effekte sich durch einen Inhibitor der p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) hemmen ließen. Auch diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass auch PPAR γ ein Phosphoprotein darstellt.

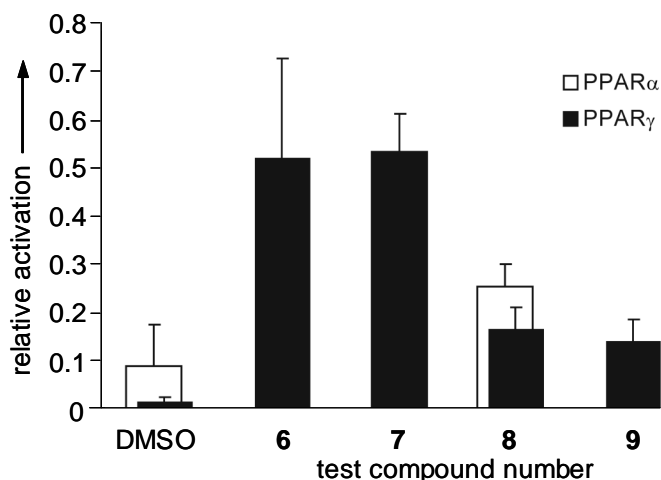
Abbildung 28: Transaktivierung der PPAR γ Liganden-Binde-Domäne durch Resveratrol bei 50 und 100 μ M im Vergleich zur Referenzsubstanz Pioglitazon (nach [3]).



4.5. Verwendung eines probabilistischen neuronalen Netzwerks zur Identifizierung möglicher PPAR Aktivatoren aus einer Substanzdatenbank

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Schneider am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität durchgeführt und in Derksen et al. publiziert [4]. Aus einer Substanz-Datenbank von über 200.000 kommerziell erhältlichen Substanzen wurden mithilfe eines probabilistischen neuronalen Netzwerkes (PNN) neun Substanzen als mögliche PPAR α oder PPAR γ Agonisten ausgewählt und auf ihre Aktivität hin untersucht. Von den untersuchten Substanzen wurden bei der verwendeten Testkonzentration von 100 μ M immerhin vier Substanzen identifiziert, welche eine zwar schwache aber doch signifikante Aktivierung von PPAR γ zeigten, wobei eine dieser Substanzen darüber hinaus auch PPAR α aktivierte. Die gefundenen hits waren erwartungsgemäß nicht so stark, dass sie per se schon für eine weitere Betrachtung in Frage kämen, mögen aber immerhin als Leitstrukturen dienen und zeigen die Möglichkeit auf mögliche Kandidaten für ein Screening bereits *in-silico* auszuwählen.

Abbildung 29: in-vitro Charakterisierung der positiven hits gegen den Effekt von 1 μ M Pioglitazon (PPAR γ) bzw. 100 μ M WY14,643 (PPAR α) (nach [4])



4.6. Substanztestung von Pyrinixinsäure abgeleiteter PPAR Agonisten

Die Ergebnisse, welche bei der Testung chemisch-synthetischer Derivate der Pyrinixinsäure, welche von den Diplom-Chemikerinnen Laura Popescu und Yvonne Syha, synthetisiert wurden, sind in die Dissertationen der jeweiligen Kolleginnen und ein entsprechendes Patent der Firma Phenion GmbH & Co. KG eingeflossen [351].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch eine α -Substitution mit einer aliphatischen Seitenkette des Grundgerüsts der Pyrinixinsäure, eines der ersten beschriebenen PPAR α Agonisten mit mäßiger Subtyp-Selektivität, eine mehr als zehnfache Aktivitätssteigerung erzielen lässt. Darüber hinaus wird der bereits bei der Pyrinixinsäure vorhandene PPAR γ Agonismus verstärkt, so dass hierbei duale PPAR α und PPAR γ Agonisten erhalten werden.

Darüber hinaus ist unter anderem diese α -Substitution für die Einführung neuer pharmakologisch interessanter anti-inflammatorischer Wirkqualitäten in die Pyrinixinsäure Grundstruktur verantwortlich. So konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Derivate in stimulierten PMNL Leukocyten imstande sind, die Synthese pro-inflammatorischer Leukotriene durch die 5-Lipoxygenase zu hemmen. Darüber hinaus waren sie auch imstande, gereinigte rekombinante 5-Lipoxygenase, den Calcium Einstrom und die Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) in PMNL und die Elastase Sekretion aus stimulierten PMNL zu hemmen [352].

Duale PPAR α und PPAR γ Agonisten, vom Typ der Glitazare befinden sich in der klinischen Prüfung zur Anwendung beim Typ-2-Diabetes, wobei man sich durch den gleichzeitigen PPAR α Agonismus einen günstigen Einfluss, wenn nicht gar den Ersatz entsprechender Ko-Medikation, etwa vom Typ der Fibrate, erhofft. Muraglitazar, im speziellen, steht hierbei unter dem Markennamen Pargluva, kurz vor einer entsprechenden Zulassung durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA), da es in den Markteinführungsstudien und einer weiteren publizierten Studie sich als effektiv bei der Senkung erhöhter HbA_{1c} Spiegel erwiesen hat [353, 354].

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit der Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors eine Rationale und ein möglicher Wirkmechanismus für die traditionelle Anwendung von Gewürz- und Arzneipflanzen bei der Therapie des Typ 2 Diabetes aufgezeigt werden.

Vor diesem Hintergrund wurden über fünfzig traditionell bei Diabetes angewandte Pflanzen ausgewählt und mit Ethanol extrahiert. Die erhaltenen Trockenextrakte wurden daraufhin in einem von mir etablierten Reporter-Gen Assay auf eine mögliche Aktivierung der drei Subtypen des PPAR hin untersucht.

Von den getesteten Extrakten wurde für fünfundzwanzig, also annähernd die Hälfte, eine signifikante Aktivierung des PPAR γ nachgewiesen. Von diesen zeigten wiederum vierzehn außerdem eine signifikante Aktivierung des PPAR α , lediglich drei dieser Extrakte zeigten auch eine signifikante Aktivierung des PPAR δ .

Somit konnte ich eine mögliche Rationale und einen potentiellen Wirkmechanismus für die volksmedizinische Anwendung dieser Pflanzen bei Diabetes aufzeigen.

Von den wirksamen Extrakten wiesen am PPAR γ sieben eine ausreichend hohe Aktivität auf, dass wir auch bei niedrigeren Testkonzentrationen noch einen signifikanten Effekt und somit eine Konzentrationsabhängigkeit des aufzeigen konnten. Für PPAR α konnten wir lediglich für drei der Extrakte eine Konzentrationsabhängigkeit aufzeigen, bei PPAR δ für keinen der Extrakte.

Die beiden am stärksten aktiven Extrakte aus *Rosmarinus offic.* und *Salvia offic.* zeigten bereits ab etwa 10 mg/L signifikante Aktivität am PPAR γ , so dass wir für diese beiden Extrakte mit 20 bzw. 40 mg/L EC₅₀-Konstanten bestimmen konnten. Diese halbmaximale Aktivierungskonstante liegt damit für den potenteren Rosmarin-Extrakt lediglich um den Faktor 200 höher als die des bei Diabetes eingesetzten Arzneistoffs Pioglitazon (Actos[®]).

Die weitere Untersuchung dieser beiden Extrakte ergab, dass in beiden Carnosolsäure bzw. Carnosol enthalten waren, welche bei der Untersuchung im Reporter-Gen Assay EC₅₀-Konzentrationen von 20 bzw. 40 μ M für die Aktivierung des PPAR γ aufwiesen.

ZUSAMMENFASSUNG

Damit sind diese Reinsubstanzen bereits nur noch um den Faktor sieben schwächer wirksam als Pioglitazon. Vergleicht man hingegen mit Bezafibrat (Cedur[®]), einem als Lipidsenker eingesetzten Arzneistoff, welcher aufgrund seiner *pan*-PPAR-agonistischen Wirkung mit EC₅₀-Konzentrationen von je etwa 50 µM von besonderem Interesse ist, so sind die beiden Diterpene Carnosolsäure und Carnosol im Hinblick auf PPAR γ äquipotent oder eher stärker aktiv.

Der Gehalt an diesen beiden Diterpenen in den von mir hergestellten Extrakten war nun zwar mit in Summe drei bzw. neun Prozent um den Faktor zehn bzw. drei zu niedrig, als dass sich der PPAR γ Agonismus der beiden Extrakte hierdurch hinreichend erklären ließe. Allerdings konnten wir für einen kommerziell erhältlichen und auf 40% Carnosolsäure angereicherten Rosmarin-Extrakt einen EC₅₀-Wert von 10 mg/L bestimmen für die Aktivierung von PPAR γ bestimmen. Eine Aktivität, welche sich zu 70% allein auf den Gehalt an Carnosolsäure zurückführen lässt.

Neben dem Nachweis der PPAR γ Aktivität von Carnosolsäure und Carnosol einerseits und der von ethanolischen Rosmarin- und Salbei-Extrakten andererseits, konnte ich somit einen hinreichenden Beweis führen, dass Carnosolsäure zumindest für Rosmarin, vermutlich auch für Salbei, als eines der aktiven Prinzipien anzusehen ist.

Meine Befunde liefern damit eine mögliche Erklärung und Wirkmechanismus für die in Tiermodellen gefundene hypoglykämische Wirksamkeit von Rosmarin, Salbei und Carnosolsäure.

Darüber hinaus legen meine Untersuchungen nahe, dass in beiden Pflanzen weitere PPAR γ Aktivatoren enthalten sind. Da Carnosol selbst bereits ein Oxidationsprodukt der Carnosolsäure darstellt, kämen hier weitere auch bereits beschriebene Oxidationsprodukte sicherlich in Frage. Diese Oxidationsprodukte stellen allerdings zumeist nur labile Übergangsprodukte dar und sind aus diesem Grunde auch als nicht Reinstoffe erhältlich. Der Nachweis einer PPAR Aktivität könnte somit angesichts der benötigten Inkubationsdauer im Reporter-Gen Assay so nicht geführt werden.

Neben den bereits angeführten Ergebnissen ist die hohe Rate von positiven Treffern in meinem Screening selbst einer der interessantesten Befunde. Die signifikante Aktivierung von PPAR γ durch nahezu die Hälfte der getesteten Extrakte lässt die Vermutung zu, dass PPAR agonistische Substanzen im Pflanzenreich sehr weit verbreitet sein könnten.

ZUSAMMENFASSUNG

Zwar bestehen zu Recht Vorbehalte gegenüber der Testung von Vielstoff-Gemischen bzw. den hierbei erhaltenen Ergebnissen. Viele pflanzliche Inhaltsstoffe z.B. Gerbstoffe können zu einer unspezifischen *Hemmung* der Aktivität von Enzyme führen. Das verwendete Testsystem setzt allerdings neben Membrangängigkeit der aktiven Prinzipien die spezifische *Aktivierung* der Expression eines Gens, dessen Aktivität anschließend bestimmt wird, voraus. Die Art des verwendeten Assay macht damit die Erfassung unspezifischer Effekte eher unwahrscheinlich.

Darüberhinaus mag für die Güte der Ergebnisse meines Screenings sprechen, dass unabhängig von uns für einige der gescreenten Pflanzen z.B. Kurkuma und Chili mit den Kurkuminoiden und Capsaicin kürzlich PPAR aktive Prinzipien beschrieben wurden.

Vielmehr lässt sich die Hypothese formulieren, dass eine ganze Reihe sekundärer pflanzlicher Inhaltsstoffe zumindest mäßig aktive PPAR Agonisten darstellen. An prominenter Stelle wäre hier die Substanzklasse der Terpene zu nennen, von denen eine ganze Reihe sowohl linearer etwa Farnesol und Phytansäure, als auch cyclischer z.B. Tumeron, Abietansäure, Oleanolsäure und Ursolsäure bereits als PPAR-Aktivatoren beschrieben wurden. Angesichts der hohen Lipophilie dieser Substanz-Klasse und einer relativ großen und wenig selektierenden Bindungstasche des PPAR lässt sich auch für andere Terpene ein PPAR Agonismus erwarten.

Der positive Effekt, den eine überwiegend pflanzliche Ernährung nach epidemiologischen Erkenntnissen auf die Gesundheit bewirkt, mag deshalb in Teilen auf PPAR-agonistische Prinzipien zurückzuführen sein. Neben dem höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu tierischer Nahrung könnten enthaltene Terpene hier durchaus einen relevanten Beitrag leisten.

In einem weiteren in Kooperation durchgeführten Projekt konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die schwache Aktivität des phenolischen Stilben-Derivats Resveratrol am PPAR γ einen Beitrag leistet zur Beeinflussung des Polyamin-Stoffwechsels und der hierdurch bedingten Regulation der Zell-Proliferation.

Weiterhin konnte mit Hilfe der in unserem Reporter-Gen Assay erhaltenen Ergebnisse gezeigt werden, dass ein virtuelles Computer-basiertes Screening einer Substanzbibliothek effektiv ist, bei der Findung von PPAR Leitstrukturen.

6. Literatur

1. O. Rau, M. Wurglics, T. Dingermann, M. Abdel-Tawab, et al., *Pharmazie*, Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor, **2006** 61, 11, 952-956.
2. O. Rau, M. Wurglics, A. Paulke, J. Zitzkowski, et al., *Planta Med*, Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, **2006** 72, 881-887.
3. S. Ulrich, S.M. Loitsch, O. Rau, A. von Knethen, et al., *Cancer Res*, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} as a Molecular Target of Resveratrol-Induced Modulation of Polyamine Metabolism, **2006** 66, 14, 7348-7354.
4. S. Derksen, O. Rau, P. Schneider, M. Schubert-Zsilavec, et al., *ChemMedChem*, Virtual screening for PPAR modulators using a probabilistic neural network, **2006** 1, 12, 1346-1350.
5. E. Caldenhoven, J. Liden, S. Wissink, A. Van de Stolpe, et al., *Mol Endocrinol*, Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids, **1995** 9, 4, 401-412.
6. H. Garside, A. Stevens, S. Farrow, C. Normand, et al., *J Biol Chem*, Glucocorticoid ligands specify different interactions with NF-kappaB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain, **2004** 279, 48, 50050-50059.
7. L.I. McKay and J.A. Cidlowski, *Mol Endocrinol*, Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism, **1998** 12, 1, 45-56.
8. A. Ray and K.E. Prefontaine, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor, **1994** 91, 2, 752-756.
9. R.I. Scheinman, A. Gualberto, C.M. Jewell, J.A. Cidlowski, et al., *Mol Cell Biol*, Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors, **1995** 15, 2, 943-953.
10. N. Auphan, J.A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmborg, et al., *Science*, Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis, **1995** 270, 5234, 286-290.
11. H. Escriva, F. Delaunay, and V. Laudet, *Bioessays*, Ligand binding and nuclear receptor evolution, **2000** 22, 8, 717-727.
12. *Cell*, A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily, **1999** 97, 2, 161-163.
13. P. Walter, S. Green, G. Greene, A. Krust, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Cloning of the human estrogen receptor cDNA, **1985** 82, 23, 7889-7893.
14. C. Weinberger, S.M. Hollenberg, E.S. Ong, J.M. Harmon, et al., *Science*, Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection, **1985** 228, 4700, 740-742.
15. S.A. Kliewer, J.M. Lehmann, and T.M. Willson, *Science*, Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse, **1999** 284, 5415, 757-760.
16. V. Giguere, N. Yang, P. Segui, and R.M. Evans, *Nature*, Identification of a new class of steroid hormone receptors, **1988** 331, 6151, 91-94.
17. I. Issemann and S. Green, *Nature*, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, **1990** 347, 6294, 645-650.
18. H. Gronemeyer, J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Nat Rev Drug Discov*, Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily, **2004** 3, 11, 950-964.
19. R.M. Evans, *Science*, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, **1988** 240, 4854, 889-895.
20. S. Kato, H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, et al., *Science*, Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase, **1995** 270, 5241, 1491-1494.
21. G. Bunone, P.A. Briand, R.J. Miksicek, and D. Picard, *Embo J*, Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation, **1996** 15, 9, 2174-2183.
22. B. Zhang, J. Berger, G. Zhou, A. Elbrecht, et al., *J Biol Chem*, Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, **1996** 271, 50, 31771-31774.
23. E. Hu, J.B. Kim, P. Sarraf, and B.M. Spiegelman, *Science*, Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma, **1996** 274, 5295, 2100-2103.
24. B. Desvergne and W. Wahli, *Endocr Rev*, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, **1999** 20, 5, 649-688.

LITERATUR

25. D.J. Mangelsdorf and R.M. Evans, *Cell*, The RXR heterodimers and orphan receptors, **1995** 83, 6, 841-850.
26. K. Umesonono and R.M. Evans, *Cell*, Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors, **1989** 57, 7, 1139-1146.
27. T. Perlmann, P.N. Rangarajan, K. Umesonono, and R.M. Evans, *Genes Dev*, Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs, **1993** 7, 7B, 1411-1422.
28. C. Zechel, X.Q. Shen, J.Y. Chen, Z.P. Chen, et al., *Embo J*, The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats, **1994** 13, 6, 1425-1433.
29. F. Rastinejad, T. Perlmann, R.M. Evans, and P.B. Sigler, *Nature*, Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats, **1995** 375, 6528, 203-211.
30. T. Perlmann, K. Umesonono, P.N. Rangarajan, B.M. Forman, et al., *Mol Endocrinol*, Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors, **1996** 10, 8, 958-966.
31. M.S. Lee, S.A. Kliewer, J. Provencal, P.E. Wright, et al., *Science*, Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding, **1993** 260, 5111, 1117-1121.
32. L.D. McBroom, G. Flock, and V. Giguere, *Mol Cell Biol*, The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions, **1995** 15, 2, 796-808.
33. T.E. Wilson, T.J. Fahrner, and J. Milbrandt, *Mol Cell Biol*, The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction, **1993** 13, 9, 5794-5804.
34. P.J. Godowski, S. Rusconi, R. Miesfeld, and K.R. Yamamoto, *Nature*, Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement, **1987** 325, 6102, 365-368.
35. S.M. Hollenberg, V. Giguere, P. Segui, and R.M. Evans, *Cell*, Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor, **1987** 49, 1, 39-46.
36. B.M. Forman, I. Tzamelis, H.S. Choi, J. Chen, et al., *Nature*, Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta, **1998** 395, 6702, 612-615.
37. T. Kawamoto, T. Sueyoshi, I. Zelko, R. Moore, et al., *Mol Cell Biol*, Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene, **1999** 19, 9, 6318-6322.
38. T. Sueyoshi, T. Kawamoto, I. Zelko, P. Honkakoski, et al., *J Biol Chem*, The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene, **1999** 274, 10, 6043-6046.
39. I. Zelko, T. Sueyoshi, T. Kawamoto, R. Moore, et al., *Mol Cell Biol*, The peptide near the C terminus regulates receptor CAR nuclear translocation induced by xenochemicals in mouse liver, **2001** 21, 8, 2838-2846.
40. W. Bourguet, P. Germain, and H. Gronemeyer, *Trends Pharmacol Sci*, Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications, **2000** 21, 10, 381-388.
41. D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, et al., *Cell*, The nuclear receptor superfamily: the second decade, **1995** 83, 6, 835-839.
42. D.J. Mangelsdorf, K. Umesonono, S.A. Kliewer, U. Borgmeyer, et al., *Cell*, A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR, **1991** 66, 3, 555-561.
43. B.M. Forman, K. Umesonono, J. Chen, and R.M. Evans, *Cell*, Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors, **1995** 81, 4, 541-550.
44. R. Kurokawa, V.C. Yu, A. Naar, S. Kyakumoto, et al., *Genes Dev*, Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers, **1993** 7, 7B, 1423-1435.
45. R. Kurokawa, J. DiRenzo, M. Boehm, J. Sugarman, et al., *Nature*, Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding, **1994** 371, 6497, 528-531.
46. I.J. A. E. Jeannin, W. Wahli, and B. Desvergne, *J Biol Chem*, Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element, **1997** 272, 32, 20108-20117.
47. J. DiRenzo, M. Soderstrom, R. Kurokawa, M.H. Ogliastro, et al., *Mol Cell Biol*, Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors, **1997** 17, 4, 2166-2176.

LITERATUR

48. D.E. Moody and J.K. Reddy, *J Cell Biol*, Morphometric analysis of the ultrastructural changes in rat liver induced by the peroxisome proliferator SaH 42-348, **1976** 71, 3, 768-780.
49. J.K. Reddy, T.P. Krishnakantha, D.L. Azarnoff, and D.E. Moody, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1-methyl-4piperidyl-bis (P-chlorophenoxy) acetate: a new hypolipidemic peroxisome proliferator, **1975** 10, 3, 589-592.
50. N.D. Lalwani, M.K. Reddy, S.A. Qureshi, C.R. Sirtori, et al., *Hum Toxicol*, Evaluation of selected hypolipidemic agents for the induction of peroxisomal enzymes and peroxisome proliferation in the rat liver, **1983** 2, 1, 27-48.
51. J.K. Reddy and S.A. Qureshi, *Br J Cancer*, Tumorigenicity of the hypolipidaemic peroxisome proliferator ethyl-alpha-p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats, **1979** 40, 3, 476-482.
52. J.K. Reddy and M.S. Rao, *J Natl Cancer Inst*, Malignant tumors in rats fed nafenopin, a hepatic peroxisome proliferator, **1977** 59, 6, 1645-1650.
53. J.K. Reddy, M.S. Rao, D.L. Azarnoff, and S. Sell, *Cancer Res*, Mitogenic and carcinogenic effects of a hypolipidemic peroxisome proliferator, [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14, 643), in rat and mouse liver, **1979** 39, 1, 152-161.
54. J.K. Reddy, D.E. Moody, D.L. Azarnoff, and M.S. Rao, *Life Sci*, Di-(2-ethylhexyl)phthalate: an industrial plasticizer induces hypolipidemia and enhances hepatic catalase and carnitine acetyltransferase activities in rat and mice, **1976** 18, 9, 941-945.
55. D.J. Svoboda and D.L. Azarnoff, *J Cell Biol*, Response of hepatic microbodies to a hypolipidemic agent, ethyl chlorophenoxyisobutyrate (CPIB), **1966** 30, 2, 442-450.
56. L. Hellman, B. Zumoff, G. Kessler, E. Kara, et al., *J Atheroscler Res*, Reduction Of Serum Cholesterol And Lipids By Ethyl Chlorophenoxyisobutyrate, **1963** 12, 454-466.
57. L. Hellman, B. Zumoff, G. Kessler, E. Kara, et al., *Ann Intern Med*, Reduction Of Cholesterol And Lipids In Man By Ethyl P-Chlorophenoxyisobutyrate, **1963** 59, 477-494.
58. C. Dreyer, G. Krey, H. Keller, F. Givel, et al., *Cell*, Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors, **1992** 68, 5, 879-887.
59. A. Schmidt, N. Endo, S.J. Rutledge, R. Vogel, et al., *Mol Endocrinol*, Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids, **1992** 6, 10, 1634-1641.
60. M. Gottlicher, E. Widmark, Q. Li, and J.A. Gustafsson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor, **1992** 89, 10, 4653-4657.
61. H. Keller, C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers, **1993** 90, 6, 2160-2164.
62. I. Issemann, R.A. Prince, J.D. Tugwood, and S. Green, *J Mol Endocrinol*, The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs, **1993** 11, 1, 37-47.
63. T. Fujita, Y. Sugiyama, S. Taketomi, T. Sohda, et al., *Diabetes*, Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent, **1983** 32, 9, 804-810.
64. T. Sohda, K. Mizuno, E. Imamiya, H. Tawada, et al., *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, Studies on antidiabetic agents. III. 5-Arylthiazolidine-2,4-diones as potent aldose reductase inhibitors, **1982** 30, 10, 3601-3616.
65. T. Sohda, K. Mizuno, H. Tawada, Y. Sugiyama, et al., *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, Studies on antidiabetic agents. I. Synthesis of 5-[4-(2-methyl-2-phenylpropoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (AL-321) and related compounds, **1982** 30, 10, 3563-3573.
66. J.M. Lehmann, L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, et al., *J Biol Chem*, An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), **1995** 270, 22, 12953-12956.
67. C. Hofmann, K. Lorenz, D. Williams, B.J. Palazuk, et al., *Metabolism*, Insulin sensitization in diabetic rat liver by an antihyperglycemic agent, **1995** 44, 3, 384-389.
68. D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, and H. Roth, *Medizinische Chemie - Targets und Arzneistoffe*, **2005**, 1-660.
69. T. Sher, H.F. Yi, O.W. McBride, and F.J. Gonzalez, *Biochemistry*, cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor, **1993** 32, 21, 5598-5604.
70. T. Yoshikawa, Z. Brkanac, B.R. Dupont, G.Q. Xing, et al., *Genomics*, Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2, **1996** 35, 3, 637-638.

LITERATUR

71. M.E. Greene, B. Blumberg, K. Kwan, L. Hsieh, et al., *Adv Exp Med Biol*, Isolation and cloning of human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA, **1997** 400A, 253-260.
72. L. Fajas, J.C. Fruchart, and J. Auwerx, *FEBS Lett*, PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter, **1998** 438, 1-2, 55-60.
73. M.H. Hsu, C.N. Palmer, W. Song, K.J. Griffin, et al., *J Biol Chem*, A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding, **1998** 273, 43, 27988-27997.
74. S. Osada, T. Tsukamoto, M. Takiguchi, M. Mori, et al., *Genes Cells*, Identification of an extended half-site motif required for the function of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, **1997** 2, 5, 315-327.
75. C.N. Palmer, M.H. Hsu, H.J. Griffin, and E.F. Johnson, *J Biol Chem*, Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling, **1995** 270, 27, 16114-16121.
76. C. Juge-Aubry, A. Pernin, T. Favez, A.G. Burger, et al., *J Biol Chem*, DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region, **1997** 272, 40, 25252-25259.
77. M. Ricote, A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, et al., *Nature*, The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, **1998** 391, 6662, 79-82.
78. C. Jiang, A.T. Ting, and B. Seed, *Nature*, PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, **1998** 391, 6662, 82-86.
79. B. Staels, W. Koenig, A. Habib, R. Merval, et al., *Nature*, Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators, **1998** 393, 6687, 790-793.
80. A. Castrillo and P. Tontonoz, *Annu Rev Cell Dev Biol*, Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation, **2004** 20, 455-480.
81. S. Kippenberger, S.M. Loitsch, M. Grundmann-Kollmann, S. Simon, et al., *J Invest Dermatol*, Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation, **2001** 117, 6, 1430-1436.
82. D. Hornung, L.L. Waite, E.A. Ricke, F. Bentzien, et al., *J Clin Endocrinol Metab*, Nuclear peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma have opposing effects on monocyte chemotaxis in endometriosis, **2001** 86, 7, 3108-3114.
83. S. Kuenzli and J.H. Saurat, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, Peroxisome proliferator-activated receptors as new molecular targets in psoriasis, **2004** 3, 2, 205-211.
84. J. Youssef and M. Badr, *J Biomed Biotechnol*, Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control, **2004** 2004, 3, 156-166.
85. M.Y. Sheu, A.J. Fowler, J. Kao, M. Schmuth, et al., *J Invest Dermatol*, Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models, **2002** 118, 1, 94-101.
86. M.B. Crosby, J. Svenson, G.S. Gilkeson, and T.K. Nowling, *Mol Immunol*, A novel PPAR response element in the murine iNOS promoter, **2005** 42, 11, 1303-1310.
87. M. Ricote, A.F. Villedor, and C.K. Glass, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis, **2004** 24, 2, 230-239.
88. R. Genoet, W. Wahli, and L. Michalik, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, PPARs as drug targets to modulate inflammatory responses? **2004** 3, 4, 361-375.
89. G. Chinetti, S. Griglio, M. Antonucci, I.P. Torra, et al., *J Biol Chem*, Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages, **1998** 273, 40, 25573-25580.
90. Q. Zhang, M.D. Southall, S.M. Mezsick, C. Johnson, et al., *J Biol Chem*, Epidermal peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a target for ultraviolet B radiation, **2005** 280, 1, 73-79.
91. S. Kuenzli and J.H. Saurat, *Br J Dermatol*, Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology, **2003** 149, 2, 229-236.
92. J.P. Despres, I. Lemieux, and S.J. Robins, *Drugs*, Role of fibric acid derivatives in the management of risk factors for coronary heart disease, **2004** 64, 19, 2177-2198.
93. M. Mao-Qiang, A.J. Fowler, M. Schmuth, P. Lau, et al., *J Invest Dermatol*, Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activation stimulates keratinocyte differentiation, **2004** 123, 2, 305-312.
94. B. Staels and J.C. Fruchart, *Diabetes*, Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists, **2005** 54, 8, 2460-2470.
95. R. Grau, C. Punzon, M. Fresno, and M.A. Iniguez, *Biochem J*, Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor

LITERATUR

- transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1, **2006** 395, 1, 81-88.
96. Y. Liu, Y. Zhang, K. Schmelzer, T.S. Lee, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, The antiinflammatory effect of laminar flow: the role of PPARgamma, epoxyeicosatrienoic acids, and soluble epoxide hydrolase, **2005** 102, 46, 16747-16752.
 97. M. Lehrke and M.A. Lazar, *Nat Med*, Inflamed about obesity, **2004** 10, 2, 126-127.
 98. J. Lo Verme, J. Fu, G. Astarita, G. La Rana, et al., *Mol Pharmacol*, The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide, **2005** 67, 1, 15-19.
 99. C.W. Park, H.W. Kim, S.H. Ko, H.W. Chung, et al., *Diabetes*, Accelerated diabetic nephropathy in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, **2006** 55, 4, 885-893.
 100. P.F. Sterchele, H. Sun, R.E. Peterson, and J.P. Vanden Heuvel, *Arch Biochem Biophys*, Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mRNA in rat liver, **1996** 326, 2, 281-289.
 101. Y.T. Zhou, M. Shimabukuro, M.Y. Wang, Y. Lee, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in disease of pancreatic beta cells, **1998** 95, 15, 8898-8903.
 102. J.L. Su, D.A. Winegar, G.B. Wisely, C.S. Sigel, et al., *Hybridoma*, Use of a PPAR gamma-specific monoclonal antibody to demonstrate thiazolidinediones induce PPAR gamma receptor expression in vitro, **1999** 18, 3, 273-280.
 103. O. Braissant, F. Fougere, C. Scotto, M. Dauca, et al., *Endocrinology*, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat, **1996** 137, 1, 354-366.
 104. S.A. Kliewer, B.M. Forman, B. Blumberg, E.S. Ong, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors, **1994** 91, 15, 7355-7359.
 105. T. Lemberger, O. Braissant, C. Juge-Aubry, H. Keller, et al., *Ann N Y Acad Sci*, PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways, **1996** 804, 231-251.
 106. C.N. Palmer, M.H. Hsu, K.J. Griffin, J.L. Raucy, et al., *Mol Pharmacol*, Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver, **1998** 53, 1, 14-22.
 107. L. Michalik, B. Desvergne, C. Dreyer, M. Gavillet, et al., *Int J Dev Biol*, PPAR expression and function during vertebrate development, **2002** 46, 1, 105-114.
 108. D. Auboeuf, J. Rieusset, L. Fajas, P. Vallier, et al., *Diabetes*, Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients, **1997** 46, 8, 1319-1327.
 109. L. Michalik, J.N. Feige, L. Gelman, T. Pedrazzini, et al., *Mol Endocrinol*, Selective expression of a dominant-negative form of peroxisome proliferator-activated receptor in keratinocytes leads to impaired epidermal healing, **2005** 19, 9, 2335-2348.
 110. R. Mukherjee, L. Jow, G.E. Croston, and J.R. Paterniti, Jr., *J Biol Chem*, Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists, **1997** 272, 12, 8071-8076.
 111. M. Rivier, I. Castiel, I. Safonova, G. Ailhaud, et al., *J Invest Dermatol*, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha enhances lipid metabolism in a skin equivalent model, **2000** 114, 4, 681-687.
 112. M. Rivier, I. Safonova, P. Lebrun, C.E. Griffiths, et al., *J Invest Dermatol*, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes, **1998** 111, 6, 1116-1121.
 113. A. Chawla, E.J. Schwarz, D.D. Dimaculangan, and M.A. Lazar, *Endocrinology*, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation, **1994** 135, 2, 798-800.
 114. P. Tontonoz, E. Hu, R.A. Graves, A.I. Budavari, et al., *Genes Dev*, mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer, **1994** 8, 10, 1224-1234.
 115. P. Tontonoz, E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Cell*, Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor, **1994** 79, 7, 1147-1156.
 116. T. Kawai, I. Takei, Y. Oguma, N. Ohashi, et al., *Metabolism*, Effects of troglitazone on fat distribution in the treatment of male type 2 diabetes, **1999** 48, 9, 1102-1107.
 117. M. Laplante, H. Sell, K.L. MacNaul, D. Richard, et al., *Diabetes*, PPAR-gamma activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion, **2003** 52, 2, 291-299.

LITERATUR

118. Y. Miyazaki, A. Mahankali, M. Matsuda, S. Mahankali, et al., *J Clin Endocrinol Metab*, Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients, **2002** 87, 6, 2784-2791.
119. Y. Miyazaki, A. Mahankali, E. Wajcberg, M. Bajaj, et al., *J Clin Endocrinol Metab*, Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients, **2004** 89, 9, 4312-4319.
120. H. Kim, M. Haluzik, O. Gavrilova, S. Yakar, et al., *Diabetologia*, Thiazolidinediones improve insulin sensitivity in adipose tissue and reduce the hyperlipidaemia without affecting the hyperglycaemia in a transgenic model of type 2 diabetes, **2004** 47, 12, 2215-2225.
121. Z. Wu, Y. Xie, R.F. Morrison, N.L. Bucher, et al., *J Clin Invest*, PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes, **1998** 101, 1, 22-32.
122. P.W. Young, M.A. Cawthorne, P.J. Coyle, J.C. Holder, et al., *Diabetes*, Repeat treatment of obese mice with BRL 49653, a new potent insulin sensitizer, enhances insulin action in white adipocytes. Association with increased insulin binding and cell-surface GLUT4 as measured by photoaffinity labeling, **1995** 44, 9, 1087-1092.
123. S.S. Im, J.W. Kim, T.H. Kim, X.L. Song, et al., *Exp Mol Med*, Identification and characterization of peroxisome proliferator response element in the mouse GLUT2 promoter, **2005** 37, 2, 101-110.
124. O. Gavrilova, B. Marcus-Samuels, D. Graham, J.K. Kim, et al., *J Clin Invest*, Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice, **2000** 105, 3, 271-278.
125. J. Moitra, M.M. Mason, M. Olive, D. Krylov, et al., *Genes Dev*, Life without white fat: a transgenic mouse, **1998** 12, 20, 3168-3181.
126. W. He, Y. Barak, A. Hevener, P. Olson, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle, **2003** 100, 26, 15712-15717.
127. U. Kintscher and R.E. Law, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle, **2005** 288, 2, E287-291.
128. A.L. Hevener, W. He, Y. Barak, J. Le, et al., *Nat Med*, Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance, **2003** 9, 12, 1491-1497.
129. N.K. Verma, J. Singh, and C.S. Dey, *Br J Pharmacol*, PPAR-gamma expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells, **2004** 143, 8, 1006-1013.
130. A.W. Norris, L. Chen, S.J. Fisher, I. Szanto, et al., *J Clin Invest*, Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones, **2003** 112, 4, 608-618.
131. M. Loviscach, N. Rehman, L. Carter, S. Mudaliar, et al., *Diabetologia*, Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action, **2000** 43, 3, 304-311.
132. G.S. Hotamisligil, P. Arner, J.F. Caro, R.L. Atkinson, et al., *J Clin Invest*, Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance, **1995** 95, 5, 2409-2415.
133. G.S. Hotamisligil, D.L. Murray, L.N. Choy, and B.M. Spiegelman, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor, **1994** 91, 11, 4854-4858.
134. G.S. Hotamisligil and B.M. Spiegelman, *Diabetes*, Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link, **1994** 43, 11, 1271-1278.
135. F. Hube and H. Hauner, *Endocrinology*, The two tumor necrosis factor receptors mediate opposite effects on differentiation and glucose metabolism in human adipocytes in primary culture, **2000** 141, 7, 2582-2588.
136. P. Plomgaard, K. Bouzakri, R. Krogh-Madsen, B. Mittendorfer, et al., *Diabetes*, Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation, **2005** 54, 10, 2939-2945.
137. M. Birgel, H. Gottschling-Zeller, K. Rohrig, and H. Hauner, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes, **2000** 20, 6, 1682-1687.
138. A. Katsuki, Y. Sumida, K. Murata, M. Furuta, et al., *Diabetes Obes Metab*, Troglitazone reduces plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in obese patients with type 2 diabetes, **2000** 2, 3, 189-191.
139. J. Ohsumi, S. Sakakibara, J. Yamaguchi, K. Miyadai, et al., *Endocrinology*, Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, **1994** 135, 5, 2279-2282.

LITERATUR

140. P. Peraldi, M. Xu, and B.M. Spiegelman, *J Clin Invest*, Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling, **1997** 100, 7, 1863-1869.
141. S.C. Souza, M.T. Yamamoto, M.D. Franciosa, P. Lien, et al., *Diabetes*, BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- α : a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones, **1998** 47, 4, 691-695.
142. D. Szalkowski, S. White-Carrington, J. Berger, and B. Zhang, *Endocrinology*, Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor- α on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells, **1995** 136, 4, 1474-1481.
143. A. Tsuchida, T. Yamauchi, and T. Kadowaki, *J Pharmacol Sci*, Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin, **2005** 97, 2, 164-170.
144. T. Yamauchi, J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, et al., *Nat Med*, The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity, **2001** 7, 8, 941-946.
145. N. Maeda, I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, et al., *Nat Med*, Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30, **2002** 8, 7, 731-737.
146. N. Maeda, M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, et al., *Diabetes*, PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein, **2001** 50, 9, 2094-2099.
147. R.V. Considine, *Rev Endocr Metab Disord*, Regulation of leptin production, **2001** 2, 4, 357-363.
148. H. Hauner, *Diabetes Metab Res Rev*, The mode of action of thiazolidinediones, **2002** 18 Suppl 2, S10-15.
149. T.M. Willson, P.J. Brown, D.D. Sternbach, and B.R. Henke, *J Med Chem*, The PPARs: from orphan receptors to drug discovery, **2000** 43, 4, 527-550.
150. M. Bouskila, U.B. Pajvani, and P.E. Scherer, *Int J Obes (Lond)*, Adiponectin: a relevant player in PPARgamma-agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity? **2005** 29 Suppl 1, S17-23.
151. G.F. Lewis, A. Carpentier, K. Adeli, and A. Giacca, *Endocr Rev*, Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes, **2002** 23, 2, 201-229.
152. J.P. Berger, T.E. Akiyama, and P.T. Meinke, *Trends Pharmacol Sci*, PPARs: therapeutic targets for metabolic disease, **2005** 26, 5, 244-251.
153. S.E. Inzucchi, *Jama*, Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review, **2002** 287, 3, 360-372.
154. B. Pirard, *J Comput Aided Mol Des*, Peroxisome proliferator-activated receptors target family landscape: a chemometrical approach to ligand selectivity based on protein binding site analysis, **2003** 17, 11, 785-796.
155. H.S. Camp and S.R. Tafuri, *J Biol Chem*, Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase, **1997** 272, 16, 10811-10816.
156. H.S. Camp, S.R. Tafuri, and T. Leff, *Endocrinology*, c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity, **1999** 140, 1, 392-397.
157. C.E. Juge-Aubry, E. Hammar, C. Siegrist-Kaiser, A. Pernin, et al., *J Biol Chem*, Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain, **1999** 274, 15, 10505-10510.
158. D. Shao, S.M. Rangwala, S.T. Bailey, S.L. Krakow, et al., *Nature*, Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma, **1998** 396, 6709, 377-380.
159. C. Diradourian, J. Girard, and J.P. Pegorier, *Biochimie*, Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance, **2005** 87, 1, 33-38.
160. R.A. Gabbay, C. Sutherland, L. Gnudi, B.B. Kahn, et al., *J Biol Chem*, Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression does not require activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway, **1996** 271, 4, 1890-1897.
161. M.J. Reginato, S.L. Krakow, S.T. Bailey, and M.A. Lazar, *J Biol Chem*, Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma, **1998** 273, 4, 1855-1858.
162. Y.C. Zhou and D.J. Waxman, *J Biol Chem*, Cross-talk between janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) signaling pathways. Growth hormone inhibition of pparalpha transcriptional activity mediated by stat5b, **1999** 274, 5, 2672-2681.
163. K.L. Gearing, M. Gottlicher, M. Teboul, E. Widmark, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor, **1993** 90, 4, 1440-1444.

LITERATUR

164. R. Mukherjee, J. Strasser, L. Jow, P. Hoener, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, RXR agonists activate PPARalpha-inducible genes, lower triglycerides, and raise HDL levels in vivo, **1998** 18, 2, 272-276.
165. H. Poirier, O. Braissant, I. Niot, W. Wahli, et al., *FEBS Lett*, 9-cis-retinoic acid enhances fatty acid-induced expression of the liver fatty acid-binding protein gene, **1997** 412, 3, 480-484.
166. N. Vu-Dac, K. Schoonjans, V. Kosykh, J. Dallongeville, et al., *Mol Cell Biol*, Retinoids increase human apolipoprotein A-11 expression through activation of the retinoid X receptor but not the retinoic acid receptor, **1996** 16, 7, 3350-3360.
167. S.A. Kliewer, K. Umesono, D.J. Noonan, R.A. Heyman, et al., *Nature*, Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors, **1992** 358, 6389, 771-774.
168. P. Cronet, J.F. Petersen, R. Folmer, N. Blomberg, et al., *Structure (Camb)*, Structure of the PPARalpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family, **2001** 9, 8, 699-706.
169. H.E. Xu, T.B. Stanley, V.G. Montana, M.H. Lambert, et al., *Nature*, Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha, **2002** 415, 6873, 813-817.
170. H.E. Xu, M.H. Lambert, V.G. Montana, K.D. Plunket, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors, **2001** 98, 24, 13919-13924.
171. R. Epple, M. Azimioara, R. Russo, Y. Xie, et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 3,4,5-Trisubstituted isoxazoles as novel PPARdelta agonists. Part 2, **2006** 16, 21, 5488-5492.
172. S.A. Fyffe, M.S. Alphey, L. Buetow, T.K. Smith, et al., *J Mol Biol*, Recombinant human PPAR-beta/delta ligand-binding domain is locked in an activated conformation by endogenous fatty acids, **2006** 356, 4, 1005-1013.
173. S.A. Fyffe, M.S. Alphey, L. Buetow, T.K. Smith, et al., *Mol Cell*, Reevaluation of the PPAR-beta/delta ligand binding domain model reveals why it exhibits the activated form, **2006** 21, 1, 1-2.
174. I. Takada, R.T. Yu, H.E. Xu, M.H. Lambert, et al., *Mol Endocrinol*, Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype, **2000** 14, 5, 733-740.
175. H.E. Xu, M.H. Lambert, V.G. Montana, D.J. Parks, et al., *Mol Cell*, Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors, **1999** 3, 3, 397-403.
176. S. Ebdrup, I. Pettersson, H.B. Rasmussen, H.J. Deussen, et al., *J Med Chem*, Synthesis and biological and structural characterization of the dual-acting peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma agonist ragaglitazar, **2003** 46, 8, 1306-1317.
177. P. Sauerberg, I. Pettersson, L. Jeppesen, P.S. Bury, et al., *J Med Chem*, Novel tricyclic-alpha-alkyloxyphenylpropionic acids: dual PPARalpha/gamma agonists with hypolipidemic and antidiabetic activity, **2002** 45, 4, 789-804.
178. R.T. Nolte, G.B. Wisely, S. Westin, J.E. Cobb, et al., *Nature*, Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, **1998** 395, 6698, 137-143.
179. J.L. Oberfield, J.L. Collins, C.P. Holmes, D.M. Goreham, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation, **1999** 96, 11, 6102-6106.
180. C.R. Hopkins, V. O'Neil S, M.C. Laufersweiler, Y. Wang, et al., *Bioorg Med Chem Lett*, Design and synthesis of novel N-sulfonyl-2-indole carboxamides as potent PPAR-gamma binding agents with potential application to the treatment of osteoporosis, **2006** 16, 21, 5659-5663.
181. B. Kuhn, H. Hilpert, J. Benz, A. Binggeli, et al., *Bioorg Med Chem Lett*, Structure-based design of indole propionic acids as novel PPARalpha/gamma co-agonists, **2006** 16, 15, 4016-4020.
182. N. Mahindroo, C.F. Huang, Y.H. Peng, C.C. Wang, et al., *J Med Chem*, Novel indole-based peroxisome proliferator-activated receptor agonists: design, SAR, structural biology, and biological activities, **2005** 48, 26, 8194-8208.
183. I.L. Lu, C.F. Huang, Y.H. Peng, Y.T. Lin, et al., *J Med Chem*, Structure-based drug design of a novel family of PPARgamma partial agonists: virtual screening, X-ray crystallography, and in vitro/in vivo biological activities, **2006** 49, 9, 2703-2712.
184. E. Burgermeister, A. Schnoebelen, A. Flament, J. Benz, et al., *Mol Endocrinol*, A novel partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) recruits PPARgamma-coactivator-1alpha, prevents triglyceride accumulation, and potentiates insulin signaling in vitro, **2006** 20, 4, 809-830.
185. G.Q. Shi, J.F. Dropinski, B.M. McKeever, S. Xu, et al., *J Med Chem*, Design and synthesis of alpha-aryloxyphenylacetic acid derivatives: a novel class of PPARalpha/gamma dual agonists with potent antihyperglycemic and lipid modulating activity, **2005** 48, 13, 4457-4468.

LITERATUR

186. N. Mahindroo, C.C. Wang, C.C. Liao, C.F. Huang, et al., *J Med Chem*, Indol-1-yl acetic acids as peroxisome proliferator-activated receptor agonists: design, synthesis, structural biology, and molecular docking studies, **2006** 49, 3, 1212-1216.
187. C.D. Haffner, J.M. Lenhard, A.B. Miller, D.L. McDougald, et al., *J Med Chem*, Structure-based design of potent retinoid X receptor alpha agonists, **2004** 47, 8, 2010-2029.
188. T. Ostberg, S. Svensson, G. Selen, J. Uppenberg, et al., *J Biol Chem*, A new class of peroxisome proliferator-activated receptor agonists with a novel binding epitope shows antidiabetic effects, **2004** 279, 39, 41124-41130.
189. R.T. Gampe, Jr., V.G. Montana, M.H. Lambert, A.B. Miller, et al., *Mol Cell*, Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors, **2000** 5, 3, 545-555.
190. I. Zamir, J. Zhang, and M.A. Lazar, *Genes Dev*, Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors, **1997** 11, 7, 835-846.
191. D.M. Heery, E. Kalkhoven, S. Hoare, and M.G. Parker, *Nature*, A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors, **1997** 387, 6634, 733-736.
192. Y. Zhu, C. Qi, C. Calandra, M.S. Rao, et al., *Gene Expr*, Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, **1996** 6, 3, 185-195.
193. Y. Zhu, L. Kan, C. Qi, Y.S. Kanwar, et al., *J Biol Chem*, Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR, **2000** 275, 18, 13510-13516.
194. Y. Zhu, C. Qi, S. Jain, M.S. Rao, et al., *J Biol Chem*, Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor, **1997** 272, 41, 25500-25506.
195. P. Dowell, J.E. Ishmael, D. Avram, V.J. Peterson, et al., *J Biol Chem*, p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, **1997** 272, 52, 33435-33443.
196. J. Mizukami and T. Taniguchi, *Biochem Biophys Res Commun*, The antidiabetic agent thiazolidinedione stimulates the interaction between PPAR gamma and CBP, **1997** 240, 1, 61-64.
197. I.G. Schulman, G. Shao, and R.A. Heyman, *Mol Cell Biol*, Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function, **1998** 18, 6, 3483-3494.
198. P. Puigserver, Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, et al., *Cell*, A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis, **1998** 92, 6, 829-839.
199. G. Castillo, R.P. Brun, J.K. Rosenfield, S. Hauser, et al., *Embo J*, An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPARgamma, **1999** 18, 13, 3676-3687.
200. C.A. Heinlein, H.J. Ting, S. Yeh, and C. Chang, *J Biol Chem*, Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma, **1999** 274, 23, 16147-16152.
201. J. Fu, S. Gaetani, F. Oveisi, J. Lo Verme, et al., *Nature*, Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha, **2003** 425, 6953, 90-93.
202. H. Kojo, M. Fukagawa, K. Tajima, A. Suzuki, et al., *J Pharmacol Sci*, Evaluation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtype selectivity of a variety of anti-inflammatory drugs based on a novel assay for PPAR delta(beta), **2003** 93, 3, 347-355.
203. M. Hirotani, T. Tsukamoto, J. Bourdeaux, H. Sadano, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by the ligand, **2001** 288, 1, 106-110.
204. C.A. Stanway, *Bioessays*, The transactivator GAL4: co-activators, adaptors and chromatin, **1991** 13, 5, 241-242.
205. I. Sadowski, B. Bell, P. Broad, and M. Hollis, *Gene*, GAL4 fusion vectors for expression in yeast or mammalian cells, **1992** 118, 1, 137-141.
206. G. Gill, I. Sadowski, and M. Ptashne, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mutations that increase the activity of a transcriptional activator in yeast and mammalian cells, **1990** 87, 6, 2127-2131.
207. H. Keller, P.R. Devchand, M. Perroud, and W. Wahli, *Biol Chem*, PPAR alpha structure-function relationships derived from species-specific differences in responsiveness to hypolipidemic agents, **1997** 378, 7, 651-655.
208. B.M. Forman, J. Chen, and R.M. Evans, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta, **1997** 94, 9, 4312-4317.
209. S.A. Kliewer, S.S. Sundseth, S.A. Jones, P.J. Brown, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma, **1997** 94, 9, 4318-4323.

LITERATUR

210. G. Krey, O. Braissant, F. L'Horsset, E. Kalkhoven, et al., *Mol Endocrinol*, Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay, **1997** 11, 6, 779-791.
211. K. Schoonjans, B. Staels, and J. Auwerx, *J Lipid Res*, Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression, **1996** 37, 5, 907-925.
212. R.J. Deckelbaum, T.S. Worgall, and T. Seo, *Am J Clin Nutr*, n-3 fatty acids and gene expression, **2006** 83, 6 Suppl, 1520S-1525S.
213. K. Murakami, H. Okubo, and S. Sasaki, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, Effect of dietary factors on incidence of type 2 diabetes: a systematic review of cohort studies, **2005** 51, 4, 292-310.
214. J.A. Nettleton and R. Katz, *J Am Diet Assoc*, n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review, **2005** 105, 3, 428-440.
215. Y.Y. Soon and B.K. Tan, *Singapore Med J*, Evaluation of the hypoglycemic and anti-oxidant activities of *Morinda officinalis* in streptozotocin-induced diabetic rats, **2002** 43, 2, 077-085.
216. C.T. Liu, H. Hse, C.K. Lii, P.S. Chen, et al., *Eur J Pharmacol*, Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats, **2005** 516, 2, 165-173.
217. F.M. El-Demerdash, M.I. Yousef, and N.I. El-Naga, *Food Chem Toxicol*, Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats, **2005** 43, 1, 57-63.
218. K.E. Campos, Y.S. Diniz, A.C. Cataneo, L.A. Faine, et al., *Int J Food Sci Nutr*, Hypoglycaemic and antioxidant effects of onion, *Allium cepa*: dietary onion addition, antioxidant activity and hypoglycaemic effects on diabetic rats, **2003** 54, 3, 241-246.
219. K. Kumari and K.T. Augusti, *Indian J Exp Biol*, Antidiabetic and antioxidant effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from onions (*Allium cepa* Linn) as compared to standard drugs in alloxan diabetic rats, **2002** 40, 9, 1005-1009.
220. K. Kumari and K.T. Augusti, *Planta Med*, Antidiabetic effects of S-methylcysteine sulphoxide on alloxan diabetes, **1995** 61, 1, 72-74.
221. K. Kumari, B.C. Mathew, and K.T. Augusti, *Indian J Biochem Biophys*, Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium cepa* Linn, **1995** 32, 1, 49-54.
222. S.M. Kelkar, G.S. Kaklij, and V.A. Bapat, *Indian J Biochem Biophys*, Determination of antidiabetic activity in *Allium cepa* (onion) tissue cultures, **2001** 38, 4, 277-279.
223. P.S. Babu and K. Srinivasan, *Mol Cell Biochem*, Influence of dietary capsaicin and onion on the metabolic abnormalities associated with streptozotocin induced diabetes mellitus, **1997** 175, 1-2, 49-57.
224. R. Roman-Ramos, J.L. Flores-Saenz, and F.J. Alarcon-Aguilar, *J Ethnopharmacol*, Anti-hyperglycemic effect of some edible plants, **1995** 48, 1, 25-32.
225. C.G. Sheela, K. Kumud, and K.T. Augusti, *Planta Med*, Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats, **1995** 61, 4, 356-357.
226. G.A. Jelodar, M. Maleki, M.H. Motadayen, and S. Sirius, *Indian J Med Sci*, Effect of fenugreek, onion and garlic on blood glucose and histopathology of pancreas of alloxan-induced diabetic rats, **2005** 59, 2, 64-69.
227. C.G. Sheela and K.T. Augusti, *Indian J Exp Biol*, Antidiabetic effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from garlic *Allium sativum* Linn, **1992** 30, 6, 523-526.
228. H.G. Preuss, D. Clouatre, A. Mohamadi, and S.T. Jarrell, *Int Urol Nephrol*, Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats, **2001** 32, 4, 525-530.
229. A. Gomes, J.R. Vedasiromoni, M. Das, R.M. Sharma, et al., *J Ethnopharmacol*, Anti-hyperglycemic effect of black tea (*Camellia sinensis*) in rat, **1995** 45, 3, 223-226.
230. H. Tsuneki, M. Ishizuka, M. Terasawa, J.B. Wu, et al., *BMC Pharmacol*, Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans, **2004** 4, 18.
231. K.L. Kuo, M.S. Weng, C.T. Chiang, Y.J. Tsai, et al., *J Agric Food Chem*, Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats, **2005** 53, 2, 480-489.
232. F.J. Alarcon-Aguilar, A. Valdes-Arzate, S. Xolalpa-Molina, T. Banderas-Dorantes, et al., *Proc West Pharmacol Soc*, Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*, **2003** 46, 139-142.
233. A.C. Frati Munari, O. Vera Lastra, and C.R. Ariza Andraca, *Gac Med Mex*, [Evaluation of nopal capsules in diabetes mellitus] -Abstrac-, **1992** 128, 4, 431-436.

LITERATUR

234. I.M. Mahomed and J.A. Ojewole, *Phytother Res*, Analgesic, antiinflammatory and antidiabetic properties of Harpagophytum procumbens DC (Pedaliaceae) secondary root aqueous extract, **2004** 18, 12, 982-989.
235. L. Pari and S. Venkateswaran, *Pharmazie*, Effect of an aqueous extract of Phaseolus vulgaris on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucose metabolism in experimental diabetes, **2003** 58, 12, 916-919.
236. L. Pari and S. Venkateswaran, *J Med Food*, Protective role of Phaseolus vulgaris on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes, **2004** 7, 2, 204-209.
237. M.A. Ajabnoor and A.K. Tilmisany, *J Ethnopharmacol*, Effect of Trigonella foenum graecum on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic mice, **1988** 22, 1, 45-49.
238. F.J. Alarcon-Aguilara, R. Roman-Ramos, S. Perez-Gutierrez, A. Aguilar-Contreras, et al., *J Ethnopharmacol*, Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics, **1998** 61, 2, 101-110.
239. M. Al-Habori, A. Raman, M.J. Lawrence, and P. Skett, *Int J Exp Diabetes Res*, In vitro effect of fenugreek extracts on intestinal sodium-dependent glucose uptake and hepatic glycogen phosphorylase A, **2001** 2, 2, 91-99.
240. L. Ali, A.K. Azad Khan, Z. Hassan, M. Mosihuzzaman, et al., *Planta Med*, Characterization of the hypoglycemic effects of Trigonella foenum graecum seed, **1995** 61, 4, 358-360.
241. J.K. Grover, S. Yadav, and V. Vats, *J Ethnopharmacol*, Medicinal plants of India with anti-diabetic potential, **2002** 81, 1, 81-100.
242. J.M. Hannan, B. Rokeya, O. Faruque, N. Nahar, et al., *J Ethnopharmacol*, Effect of soluble dietary fibre fraction of Trigonella foenum graecum on glycemic, insulinemic, lipidemic and platelet aggregation status of Type 2 diabetic model rats, **2003** 88, 1, 73-77.
243. Z. Madar and A.H. Stark, *Br J Nutr*, New legume sources as therapeutic agents, **2002** 88 Suppl 3, S287-292.
244. S. Mohammad, A. Taha, R.N. Bamezai, and N.Z. Baquer, *Life Sci*, Modulation of glucose transporter (GLUT4) by vanadate and Trigonella in alloxan-diabetic rats, **2005**.
245. D.K. Mondal, B.M. Yousuf, L.A. Banu, R. Ferdousi, et al., *Mymensingh Med J*, Effect of fenugreek seeds on the fasting blood glucose level in the streptozotocin induced diabetic rats, **2004** 13, 2, 161-164.
246. P.R. Petit, Y.D. Sauvaire, D.M. Hillaire-Buys, O.M. Leconte, et al., *Steroids*, Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol, **1995** 60, 10, 674-680.
247. D. Puri, K.M. Prabhu, and P.S. Murthy, *Indian J Physiol Pharmacol*, Mechanism of action of a hypoglycemic principle isolated from fenugreek seeds, **2002** 46, 4, 457-462.
248. M.R. Siddiqui, A. Taha, K. Moorthy, M.E. Hussain, et al., *J Biosci*, Amelioration of altered antioxidant status and membrane linked functions by vanadium and Trigonella in alloxan diabetic rat brains, **2005** 30, 4, 483-490.
249. V. Vats, J.K. Grover, and S.S. Rathi, *J Ethnopharmacol*, Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of Trigonella foenum-graecum Linn, Ocimum sanctum Linn and Pterocarpus marsupium Linn in normal and alloxanized diabetic rats, **2002** 79, 1, 95-100.
250. A. Bordia, S.K. Verma, and K.C. Srivastava, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, Effect of ginger (Zingiber officinale Rosc.) and fenugreek (Trigonella foenumgraecum L.) on blood lipids, blood sugar and platelet aggregation in patients with coronary artery disease, **1997** 56, 5, 379-384.
251. A. Gupta, R. Gupta, and B. Lal, *J Assoc Physicians India*, Effect of Trigonella foenum-graecum (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study, **2001** 49, 1057-1061.
252. R.D. Sharma, T.C. Raghuram, and N.S. Rao, *Eur J Clin Nutr*, Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes, **1990** 44, 4, 301-306.
253. E.E. Agardh, S. Carlsson, A. Ahlbom, S. Efendic, et al., *J Intern Med*, Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women, **2004** 255, 6, 645-652.
254. A. Rosengren, A. Dotevall, L. Wilhelmsen, D. Thelle, et al., *J Intern Med*, Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study, **2004** 255, 1, 89-95.
255. E. Salazar-Martinez, W.C. Willett, A. Ascherio, J.E. Manson, et al., *Ann Intern Med*, Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus, **2004** 140, 1, 1-8.
256. J. Tuomilehto, G. Hu, S. Bidel, J. Lindstrom, et al., *Jama*, Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women, **2004** 291, 10, 1213-1219.
257. R.M. van Dam, J.M. Dekker, G. Nijpels, C.D. Stehouwer, et al., *Diabetologia*, Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study, **2004** 47, 12, 2152-2159.

LITERATUR

258. R.M. van Dam and E.J. Feskens, *Lancet*, Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus, **2002** 360, 9344, 1477-1478.
259. T. Yamaji, T. Mizoue, S. Tabata, S. Ogawa, et al., *Diabetologia*, Coffee consumption and glucose tolerance status in middle-aged Japanese men, **2004** 47, 12, 2145-2151.
260. R.M. van Dam and F.B. Hu, *Jama*, Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review, **2005** 294, 1, 97-104.
261. K. Hiller and M. Melzig, *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen*. 2003: Spektrum Verlag; Heidelberg (Germany).
262. G. Lupattelli, S. Marchesi, R. Lombardini, A.R. Roscini, et al., *Life Sci*, Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia, **2004** 76, 7, 775-782.
263. R. Gebhardt, *Phytother Res*, Inhibition of cholesterol biosynthesis in HepG2 cells by artichoke extracts is reinforced by glucosidase pretreatment, **2002** 16, 4, 368-372.
264. R. Gebhardt, *J Pharmacol Exp Ther*, Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts, **1998** 286, 3, 1122-1128.
265. C.K. Watanabe, *J Biol Chem*, Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases Influence of injected guanidine hydrochloride upon blood sugar content, **1918** 33, 2, 253-265.
266. A.Y. Oubre, T.J. Carlson, S.R. King, and G.M. Reaven, *Diabetologia*, From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM, **1997** 40, 5, 614-617.
267. S.K. Swanston-Flatt, C. Day, C.J. Bailey, and P.R. Flatt, *Diabetologia*, Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice, **1990** 33, 8, 462-464.
268. N. Bennani-Kabchi, H. Fdhil, Y. Cherrah, L. Kehel, et al., *Therapie*, Effects of *Olea europea* var. *oleaster* leaves in hypercholesterolemic insulin-resistant sand rats, **1999** 54, 6, 717-723.
269. P.S. Prince, N. Kamalakkannan, and V.P. Menon, *J Ethnopharmacol*, Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of alcoholic *Syzygium cumini* seeds in alloxan induced diabetic albino rats, **2004** 91, 2-3, 209-213.
270. P.S. Prince, V.P. Menon, and L. Pari, *J Ethnopharmacol*, Hypoglycaemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats, **1998** 61, 1, 1-7.
271. A. Cignarella, M. Nastasi, E. Cavalli, and L. Puglisi, *Thromb Res*, Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate, **1996** 84, 5, 311-322.
272. L. Dey, J.T. Xie, A. Wang, J. Wu, et al., *Phytomedicine*, Anti-hyperglycemic effects of ginseng: comparison between root and berry, **2003** 10, 6-7, 600-605.
273. C.H. Jung, H.M. Seog, I.W. Choi, H.D. Choi, et al., *J Ethnopharmacol*, Effects of wild ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats, **2005** 98, 3, 245-250.
274. M. Kimura, I. Waki, T. Chujo, T. Kikuchi, et al., *J Pharmacobiodyn*, Effects of hypoglycemic components in ginseng radix on blood insulin level in alloxan diabetic mice and on insulin release from perfused rat pancreas, **1981** 4, 6, 410-417.
275. M. Kimura, I. Waki, O. Tanaka, Y. Nagai, et al., *J Pharmacobiodyn*, Pharmacological sequential trials for the fractionation of components with hypoglycemic activity in alloxan diabetic mice from ginseng radix, **1981** 4, 6, 402-409.
276. C. Konno, M. Murakami, Y. Oshima, and H. Hikino, *J Ethnopharmacol*, Isolation and hypoglycemic activity of panaxans Q, R, S, T and U, glycans of *Panax ginseng* roots, **1985** 14, 1, 69-74.
277. T.B. Ng and H.W. Yeung, *Gen Pharmacol*, Hypoglycemic constituents of *Panax ginseng*, **1985** 16, 6, 549-552.
278. Y.C. Ong and E.L. Yong, *Ann Acad Med Singapore*, *Panax* (ginseng)--panacea or placebo? Molecular and cellular basis of its pharmacological activity, **2000** 29, 1, 42-46.
279. Y. Oshima, C. Konno, and H. Hikino, *J Ethnopharmacol*, Isolation and hypoglycemic activity of panaxans I, J, K and L, glycans of *Panax ginseng* roots, **1985** 14, 2-3, 255-259.
280. Y. Oshima, K. Sato, and H. Hikino, *J Nat Prod*, Isolation and hypoglycemic activity of quinquefolans A, B, and C, glycans of *Panax quinquefolium* roots, **1987** 50, 2, 188-190.
281. M.Y. Park, K.S. Lee, and M.K. Sung, *Life Sci*, Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LPL mRNA expressions, **2005** 77, 26, 3344-3354.
282. Y. Rotshteyn and S.W. Zito, *J Ethnopharmacol*, Application of modified in vitro screening procedure for identifying herbals possessing sulfonyleurea-like activity, **2004** 93, 2-3, 337-344.
283. E.A. Sotaniemi, E. Haapakoski, and A. Rautio, *Diabetes Care*, Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients, **1995** 18, 10, 1373-1375.

LITERATUR

284. B.K. Vogler, M.H. Pittler, and E. Ernst, *Eur J Clin Pharmacol*, The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials, **1999** 55, 8, 567-575.
285. V. Vuksan and J.L. Sievenpiper, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, Herbal remedies in the management of diabetes: lessons learned from the study of ginseng, **2005** 15, 3, 149-160.
286. V. Vuksan, J.L. Sievenpiper, J. Wong, Z. Xu, et al., *Am J Clin Nutr*, American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) attenuates postprandial glycemia in a time-dependent but not dose-dependent manner in healthy individuals, **2001** 73, 4, 753-758.
287. V. Vuksan, J.L. Sievenpiper, Z. Xu, E.Y. Wong, et al., *J Am Coll Nutr*, Konjac-Mannan and American ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus, **2001** 20, 5 Suppl, 370S-380S; discussion 381S-383S.
288. V. Vuksan, M.P. Stavro, J.L. Sievenpiper, U. Beljan-Zdravkovic, et al., *Diabetes Care*, Similar postprandial glycemic reductions with escalation of dose and administration time of American ginseng in type 2 diabetes, **2000** 23, 9, 1221-1226.
289. V. Vuksan, M.P. Stavro, J.L. Sievenpiper, V.Y. Koo, et al., *J Am Coll Nutr*, American ginseng improves glycemia in individuals with normal glucose tolerance: effect of dose and time escalation, **2000** 19, 6, 738-744.
290. I. Waki, H. Kyo, M. Yasuda, and M. Kimura, *J Pharmacobiodyn*, Effects of a hypoglycemic component of ginseng radix on insulin biosynthesis in normal and diabetic animals, **1982** 5, 8, 547-554.
291. J.T. Xie, C.Z. Wang, A.B. Wang, J. Wu, et al., *Acta Pharmacol Sin*, Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of *Panax ginseng*, **2005** 26, 9, 1104-1110.
292. S.N. Yun, S.J. Moon, S.K. Ko, B.O. Im, et al., *Arch Pharm Res*, Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice, **2004** 27, 7, 790-796.
293. S.H. Chung, C.G. Choi, and S.H. Park, *Arch Pharm Res*, Comparisons between white ginseng radix and rootlet for antidiabetic activity and mechanism in KKAY mice, **2001** 24, 3, 214-218.
294. M. Yoon, H. Lee, S. Jeong, J.J. Kim, et al., *Br J Pharmacol*, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in the regulation of lipid metabolism by ginseng, **2003** 138, 7, 1295-1302.
295. A. Khan, M. Safdar, M.M. Ali Khan, K.N. Khattak, et al., *Diabetes Care*, Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes, **2003** 26, 12, 3215-3218.
296. R.A. Anderson, C.L. Broadhurst, M.M. Polansky, W.F. Schmidt, et al., *J Agric Food Chem*, Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity, **2004** 52, 1, 65-70.
297. E.J. Verspohl, K. Bauer, and E. Neddermann, *Phytother Res*, Antidiabetic effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* in vivo and in vitro, **2005** 19, 3, 203-206.
298. J. Imparl-Radosevich, S. Deas, M.M. Polansky, D.A. Baedke, et al., *Horm Res*, Regulation of PTP-1 and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon: implications for cinnamon regulation of insulin signalling, **1998** 50, 3, 177-182.
299. M. Kuroda, Y. Mimaki, T. Nishiyama, T. Mae, et al., *Biol Pharm Bull*, Hypoglycemic effects of turmeric (*Curcuma longa* L. rhizomes) on genetically diabetic KK-Ay mice, **2005** 28, 5, 937-939.
300. T. Nishiyama, T. Mae, H. Kishida, M. Tsukagawa, et al., *J Agric Food Chem*, Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice, **2005** 53, 4, 959-963.
301. P.S. Babu and K. Srinivasan, *Mol Cell Biochem*, Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats, **1997** 166, 1-2, 169-175.
302. J.L. Quiles, M.D. Mesa, C.L. Ramirez-Tortosa, C.M. Aguilera, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *Curcuma longa* extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits, **2002** 22, 7, 1225-1231.
303. H. Jouad, M. Maghrani, and M. Eddouks, *J Ethnopharmacol*, Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, **2002** 81, 3, 351-356.
304. J. Szolomicki, L. Samochowiec, J. Wojcicki, and M. Drozdziak, *Phytother Res*, The influence of active components of *Eleutherococcus senticosus* on cellular defence and physical fitness in man, **2000** 14, 1, 30-35.
305. V. Krecman, N. Skottova, D. Walterova, J. Ulrichova, et al., *Planta Med*, Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats, **1998** 64, 2, 138-142.
306. N. Skottova, L. Kazdova, O. Oliyarnyk, R. Vecera, et al., *Pharmacol Res*, Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats, **2004** 50, 2, 123-130.
307. N. Skottova and V. Krecman, *Physiol Res*, Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug, **1998** 47, 1, 1-7.

LITERATUR

308. N. Skottova, R. Vecera, K. Urbanek, P. Vana, et al., *Pharmacol Res*, Effects of polyphenolic fraction of silymarin on lipoprotein profile in rats fed cholesterol-rich diets, **2003** 47, 1, 17-26.
309. M. Maghrani, N.A. Zeggwagh, A. Lemhadri, M. El Amraoui, et al., *J Ethnopharmacol*, Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus, **2004** 91, 2-3, 309-316.
310. P. Chaiyaya, S. Puttadechakum, and S. Komindr, *J Med Assoc Thai*, Effect of chili pepper (*Capsicum frutescens*) ingestion on plasma glucose response and metabolic rate in Thai women, **2003** 86, 9, 854-860.
311. I. Tolan, D. Ragoobirsingh, and E.Y. Morrison, *Phytother Res*, The effect of capsaicin on blood glucose, plasma insulin levels and insulin binding in dog models, **2001** 15, 5, 391-394.
312. I. Tolan, D. Ragoobirsingh, and E.Y. Morrison, *Phytother Res*, Isolation and purification of the hypoglycaemic principle present in *Capsicum frutescens*, **2004** 18, 1, 95-96.
313. R.S. Gupta, V.P. Dixit, and M.P. Dobhal, *Phytother Res*, Hypocholesterolaemic effect of the oleoresin of *Capsicum annum* L. in gerbils (*Meriones hurrianae* Jerdon), **2002** 16, 3, 273-275.
314. C.Y. Lee, M. Kim, S.W. Yoon, and C.H. Lee, *Phytother Res*, Short-term control of capsaicin on blood and oxidative stress of rats in vivo, **2003** 17, 5, 454-458.
315. A. Lemhadri, N.A. Zeggwagh, M. Maghrani, H. Jouad, et al., *J Ethnopharmacol*, Anti-hyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region, **2004** 92, 2-3, 251-256.
316. R.S. Parab and S.A. Mengi, *Fitoterapia*, Hypolipidemic activity of *Acorus calamus* L. in rats, **2002** 73, 6, 451-455.
317. M. Kaleem, Sheema, H. Sarmad, and B. Bano, *Indian J Physiol Pharmacol*, Protective effects of *Piper nigrum* and *Vinca rosea* in alloxan induced diabetic rats, **2005** 49, 1, 65-71.
318. S. Nammi, M.K. Boini, S.D. Lodagala, and R.B. Behara, *BMC Complement Altern Med*, The juice of fresh leaves of *Catharanthus roseus* Linn. reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits, **2003** 3, 4.
319. S.N. Singh, P. Vats, S. Suri, R. Shyam, et al., *J Ethnopharmacol*, Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats, **2001** 76, 3, 269-277.
320. M. Bnouham, F.Z. Merhfour, A. Ziyat, H. Mekhfi, et al., *Fitoterapia*, Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*, **2003** 74, 7-8, 677-681.
321. B. Farzami, D. Ahmadvand, S. Vardasbi, F.J. Majin, et al., *J Ethnopharmacol*, Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats, **2003** 89, 1, 47-53.
322. F.J. Alarcon-Aguilar, R. Roman-Ramos, J.L. Flores-Saenz, and F. Aguirre-Garcia, *Phytother Res*, Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice, **2002** 16, 4, 383-386.
323. A. Erenmemisoglu, R. Saraymen, and S. Ustun, *Pharmazie*, Effect of a *Rosmarinus officinalis* leave extract on plasma glucose levels in normoglycaemic and diabetic mice, **1997** 52, 8, 645-646.
324. Y. Peng, J. Yuan, F. Liu, and J. Ye, *J Pharm Biomed Anal*, Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection, **2005** 39, 3-4, 431-437.
325. Y. Lu and L.Y. Foo, *Phytochemistry*, Polyphenolics of *Salvia*--a review, **2002** 59, 2, 117-140.
326. Y.C. Liang, S.H. Tsai, D.C. Tsai, S.Y. Lin-Shiau, et al., *FEBS Lett*, Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages, **2001** 496, 1, 12-18.
327. F. Abe, T. Yamauchi, T. Nagao, J. Kinjo, et al., *Biol Pharm Bull*, Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary, **2002** 25, 11, 1485-1487.
328. D. Baricevic, S. Sosa, R. Della Loggia, A. Tubaro, et al., *J Ethnopharmacol*, Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid, **2001** 75, 2-3, 125-132.
329. K. Ninomiya, H. Matsuda, H. Shimoda, N. Nishida, et al., *Bioorg Med Chem Lett*, Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage, **2004** 14, 8, 1943-1946.
330. M.T. Huang, C.T. Ho, Z.Y. Wang, T. Ferraro, et al., *Cancer Res*, Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid, **1994** 54, 3, 701-708.
331. J. Liu, *J Ethnopharmacol*, Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, **1995** 49, 2, 57-68.
332. H. Tokuda, H. Ohigashi, K. Koshimizu, and Y. Ito, *Cancer Lett*, Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, **1986** 33, 3, 279-285.
333. H.K. Lee, G.W. Nam, S.H. Kim, and S.H. Lee, *Exp Dermatol*, Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid, regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR-alpha pathway, **2006** 15, 1, 66-73.

LITERATUR

334. T.H. Huang, Q. Yang, M. Harada, G.Q. Li, et al., *J Cardiovasc Pharmacol*, Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways, **2005** 46, 6, 856-862.
335. A.E. Place, N. Suh, C.R. Williams, R. Risingsong, et al., *Clin Cancer Res*, The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo, **2003** 9, 7, 2798-2806.
336. C. Zhang, X. Ni, M. Konopleva, M. Andreeff, et al., *J Invest Dermatol*, The novel synthetic oleanane triterpenoid CDDO (2-cyano-3, 12-dioxoolean-1, 9-dien-28-oic acid) induces apoptosis in Mycosis fungoides/Sezary syndrome cells, **2004** 123, 2, 380-387.
337. K. Schwarz and W. Ternes, *Z Lebensm Unters Forsch*, Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes, **1992** 195, 2, 99-103.
338. K. Schwarz and W. Ternes, *Z Lebensm Unters Forsch*, Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC, **1992** 195, 2, 95-98.
339. K. Schwarz, W. Ternes, and E. Schmauderer, *Z Lebensm Unters Forsch*, Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes, **1992** 195, 2, 104-107.
340. J.G. Marrero, L.S. Andres, and J.G. Luis, *J Nat Prod*, Semisynthesis of rosmanol and its derivatives. Easy access to abietatriene diterpenes isolated from the genus Salvia with biological activities, **2002** 65, 7, 986-989.
341. T. Masuda, Y. Inaba, T. Maekawa, Y. Takeda, et al., *J Agric Food Chem*, Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant, **2002** 50, 21, 5863-5869.
342. T. Masuda, Y. Inaba, and Y. Takeda, *J Agric Food Chem*, Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products, **2001** 49, 11, 5560-5565.
343. T. Masuda, T. Kirikihira, and Y. Takeda, *J Agric Food Chem*, Recovery of antioxidant activity from carnosol quinone: antioxidants obtained from a water-promoted conversion of carnosol quinone, **2005** 53, 17, 6831-6834.
344. G. Lee, F. Elwood, J. McNally, J. Weiszmann, et al., *J Biol Chem*, T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities, **2002** 277, 22, 19649-19657.
345. M.A. Tashmukhamedova, O.A. Mukhina, V.N. Syrov, Z.A. Khushbaktova, et al., *Probl Endokrinol (Mosk)*, [Hypoglycemic activity of bicyclic diterpenoids of the clerodane series as compared to adebit and maninil], **1992** 38, 1, 48-50.
346. M. Eidi, A. Eidi, and H. Zamanizadeh, *J Ethnopharmacol*, Effect of Salvia officinalis L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats, **2005** 100, 3, 310-313.
347. C.R. Wellwood and R.A. Cole, *J Agric Food Chem*, Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, Rosmarinus officinalis (L.), accessions for optimization of antioxidant yield, **2004** 52, 20, 6101-6107.
348. A. Allameh, *Cancer Lett*, Comparison of the effect of low- and high-dose dietary butylated hydroxytoluene on microsome-mediated aflatoxin B1-DNA binding, **1997** 114, 1-2, 217-220.
349. R.S. Lanigan and T.A. Yamarik, *Int J Toxicol*, Final report on the safety assessment of BHT(1), **2002** 21 Suppl 2, 19-94.
350. N. Blom, T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, et al., *Proteomics*, Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence, **2004** 4, 6, 1633-1649.
351. L.S. Popescu, Y.; Bock, A.; Kippenberger, S.; Kock, M.; Rau, O.; Schubert-Zsilavec, M.; Steinhilber, D., Derivate des Pyrimidins und Triazins und deren Verwendung Patentanmeldung H06746, **2005**.
352. D. Poeckel, L. Popescu, O. Rau, C. Hörnig, et al., *DPHG Jahrestagung 2005, Mainz, Poster C85, Programm und Abstractband, ISBN 3-00-016844-3*, Novel synthetic derivatives of piroxicam: Potent ligands of PPARs with a broad spectrum of anti-inflammatory properties, **2005**, 121.
353. B.-F.w.s. Advisory committee briefing document: Pargluva (muraglitazar), http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005-4169B2_01_01-BMS-Pargluva.pdf, and E.a.M.D.A.C.M. 9.9.2005.
354. J.B. Buse, C.J. Rubin, R. Frederich, K. Viraswami-Appanna, et al., *Clin Ther*, Muraglitazar, a dual (alpha/gamma) PPAR activator: A randomized, double-blind, placebo-controlled, 24-week monotherapy trial in adult patients with type 2 diabetes, **2005** 27, 8, 1181-1195.

Danksagung

Da kaum eine Arbeit, ob wissenschaftlicher oder anderer Art, allein zu bewältigen ist, möchte ich an dieser Stelle dank sagen, all denen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Schubert-Zsilavec: Manfred Schubert-Zsilavec für die Unterstützung, für die zielführenden Vorschläge ausgezeichnete Arbeitsbedingungen und für die manchmal notwendige Beschränkung auf das essentielle, Mario Wurglics für Unterstützung und anregende Diskussionen, Alexander Paulke und Jessica Zitzkowski für die Durchführung der HPLC-Analytik und den anderen Mitgliedern des Arbeitskreises Yvonne Syha, Laura Popescu, Heiko Zettl, Michaela Mader, Laura Rangel, Stefan Bihler und Sarah Munde für ein angenehmes Arbeitsklima.

Den Mitgliedern des Zentrallaboratoriums deutscher Apotheker, Mona Tawab für die freundliche Korrektur unzähliger Seiten an Druckware, Konny und Philipp.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Steinhilber: Dieter Steinhilber für die großzügige Einräumung von Arbeitsmöglichkeit in seinem Arbeitskreis, Nadine Meindl für die nette und essentielle Einweisung in die zugrunde liegenden Labortätigkeiten, ohne ihre Unterstützung und die für mich geopfert Zeit hätte diese Arbeit um einiges länger benötigt, Oliver Werz, Nicole Schnur, Michael und Tina Hörnig, Adriane Lechtken, Lars Tausch, Michael Ermisch, Angela Michel, Beate Firla, Bernd Sorg, Astrid Brüggerhoff, Brigitte Welter, Sven George, Kirsten Stoffers, Irinia Tretiakova, Sabine Lindner, Careen Katryniok, Marika Hoffmann und Anna-Maria Engin für Diskussionen, Hilfestellungen Unterstützung, angenehmes Arbeitsklima und Kooperation, welche zu zwei, drei weiteren Manuskripten beitragen könnte.

Den Mitarbeitern des Botanischen Gartens Frankfurt soweit mir namentlich bekannt, Manfred Wessel, Hubert Meyer, Gerald Kirchner, Holger Schranz und ungenannten, welche mir sehr hilfsbereit und zuvorkommend Proben von zahlreichen Pflanzen zur Verfügung gestellt haben.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Dingermann: Theodor Dingermann, für die Kooperation und zur Verfügung Stellung von Laborraum bei den meisten Projekten, ebenso Rolf Marschalek und Ilse Zündorf sowie Sebastian Scharf und Jürgen Zech für das Teilen von Laborraum und Arbeitszeit.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Karas: Björn Meyer, Walter Eckhard, Tabiwang Arrey, Tri Hoang, Markus Persike, Ute Bahr und Markus Weidlich für Diskussion und Anwesenheit im Labor zu später Tageszeit.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Schneider: Gisbert Schneider, Swetlana Derksen und Yusuf Tanrikulu für angenehme Kooperationen, welche bereits zu einer Publikation geführt hat und hoffentlich weitere erbringen wird.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Stein: Jürgen Stein und Sandra Ulrich für eine erfolgreiche Kooperation.

Mathias Müller, Andrea Sinz und Volker Dötsch für die Zusammenarbeit bei einem gemeinsamen Projekt. Mathias und Andrea darüber hinaus für die mehr als einmal erwiesene Gastfreundschaft in Leipzig.

Den Mitarbeitern der Firma Phenion für die Kooperation im gemeinsamen Projekt, die persönliche und finanzielle Unterstützung desselben und für gemeinsames Arbeiten, Andreas Bock, Michael Kock, Andrea Sättler, Karsten Mewes, Rüdiger Graf, Alexandra Priebner, Martina Raus, Andrea Wilke, Werner Bartmann, Heike Smollina.

Schließlich meiner Familie dafür, dass ich manchmal weniger Zeit für sie aufwenden konnte, als möglich oder nötig und für familiären Rückhalt, meinen Eltern, nicht nur für die finanzielle Unterstützung, meiner Schwester, Nichte, Neffe, meinem Schwager.

und andere....

Publikationsliste

Peer Reviewed

- O. Rau, M. Wurglics, T. Dingermann, M. Abdel-Tawab, et al.: Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor. *Pharmazie*, **2006**, 61, 952-956.
- O. Rau, M. Wurglics, A. Paulke, J. Zitzkowski, et al.: Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med*, **2006**, 72, 881-887.
- S. Derksen, O. Rau, P. Schneider, M. Schubert-Zsilavecz, et al.: Virtual screening for PPAR modulators using a probabilistic neural network. *ChemMedChem*, **2006**, 1, 1346-1350.
- S. Ulrich, S.M. Loitsch, O. Rau, A. von Knethen, et al.: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} as a Molecular Target of Resveratrol-Induced Modulation of Polyamine Metabolism. *Cancer Res*, **2006**, 66, 7348-7354.

In Progress

- O. Rau, Y. Syha, J. Böttcher, M. Kock, et al.: Alpha-alkyl substituted pirinixic acid derivatives are potent dual PPARalpha/gamma-Agonists. **2006 in Revision**.
- L. Popescu, O. Rau, Y. Syha, M. Schubert-Zsilavecz et al.: Novel derivatives of pirinixic acid as potent dual PPAR α/γ agonists. **2006 in press**
- D. Pöckel, L. Popescu, O. Rau, M. Schubert-Zsilavecz, et al.: Immediate anti-inflammatory effects of novel pirinixic acid derivatives. **manuscript in preparation**

Deutschsprachig

- O. Rau, H. Zettl, L. Popescu, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz: Arzneistoffe in der Pipeline – Neue Targets und Wirkstoffe zur Behandlung von Lipidstoffwechselstörungen. *Pharm Unserer Zeit*, **2007**, 36(2)

Poster-Abstracts

- S. Derksen, O. Rau, L. Popescu, M. Schubert-Zsilavecz, et al.: Quest for Novel Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) Using Probabilistic Neural Networks
GdCh Annual Meeting: "Frontiers in Medicinal Chemistry" Frankfurt/Main 2006.
2006.
- M. Müller, O. Rau, M. Schubert-Zsilavecz, A. Sinz: Expression and Purification of the Ligand Binding Domain of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR α)
DPhG Joint Meeting Marburg **2006**, Poster C042, Abstractband page 114

- Böttcher, J., Rau, O. Syha, Y. Schubert-Zsilavec M., Klebe G.: Optimization of α -substituted pirinixic acid derivatives as dual PPAR α/γ agonists
DPHG Joint Meeting Marburg **2006**, Short Lecture C03, Abstractband page 80
- D. Poeckel, L. Popescu, O. Rau, C. Hörnig, et al.: Novel synthetic derivatives of pirinixic acid: Potent ligands of PPARs with a broad spectrum of anti-inflammatory properties. *DPHG Jahrestagung 2005, Mainz, Poster C85, Programm und Abstractband, ISBN 3-00-016844-3, 2005*, 121.
- L.R. Popescu, O.; Syha, Y.; Schubert-Zsilavec, M.: Novel synthetic derivatives of pirinixic acid as potent dual PPAR α/γ agonists. *Drugs Future*, **2006**, 31, 180.
- L.R. Popescu, O.; Syha, Y.; Schubert-Zsilavec, M.: Novel synthetic derivatives of pirinixic acid as potent dual PPAR α/γ agonists
Poster Beitrag GdCh Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry"
Frankfurt/Main 2006. **2006**.
- O. Rau, A. Paulke, J. Zitzkowski, M. Wurglics, et al.: Activation of the human PPAR γ by herbal extracts. *DPHG Jahrestagung 2005, Mainz, Poster B19 Programm und Abstractband, ISBN 3-00-016844-3, 2005*, 101.
- O. Rau, D. Poeckel, C. Hörnig, M. Wurglics, et al.: Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpenes of *Salvia offic.* and *Rosmarinus offic.* are multiple target compounds, being activators of PPAR γ as well as inhibitors of lipoxygenase and show additional antiinflammatory properties. *Drugs Future*, **2006**, 31, 165-166.
- O. Rau, D. Poeckel, A. Paulke, J. Zitzkowski, et al.: Carnosic acid and Carnosol, phenolic diterpene compounds of *Salvia offic.* and *Rosmarinus offic.* are activators of the human PPAR γ
Poster Beitrag GdCh Annual Meeting: "Frontiers in Medicinal Chemistry"
Frankfurt/Main 2006. **2006**.
- Y. Syha, L. Popescu, O. Rau, and M. Schubert-Zsilavec: PPAR: Ligands, Three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications
Poster-Präsentation ZAFES Kick-off Symposium "Lipid Signalling", Frankfurt/Main 2004. **2004**.
- Y. Syha, O. Rau, and M. Schubert-Zsilavec: α -Substituted Pirinixic acid derivatives are Potent Dual PPAR α/γ agonists
Poster Präsentation GdCh Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry"
Frankfurt/Main 2006. **2006**.
- S. Ulrich, S.M. Loitsch, O. Rau, and J. Stein: PPAR γ fungiert als molekulares Target in der Resveratrol-vermittelten Modulation des Polyaminstoffwechsels. *Z Gastroenterol*, **2005**, 5, Poster Abstract P442 - 460. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Oliver Rau, geb. 14.10.1974 in Erbach (Odw.)



Laufbahn

- Seit Januar 2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie - Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt.
Dissertation mit dem Thema „Screening pflanzlicher Extrakte auf Aktivierung des humanen Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptors und seiner Subtypen“.
- Dezember 2003 Approbation als Apotheker
- Nov. 2002 - Nov. 2003 Pharmazeutisches Praktikum in der Hirsch-Apotheke Michelstadt und bei Merck KGaA Darmstadt.
- Apr. 1998 - Okt. 2002 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt
- Apr. 1997 - Apr. 1998 Ausbildung als Physiotherapeut
- Nov. 1994 - Jan. 1996 Zivildienst beim Diakonischen Werk
- Mai 1994 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
- 1987 - 1994 Gymnasium Michelstadt
- 1981 - 1987 Grundschule und Förderstufe in Bad König

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.



Frankfurt am Main, den 21.2.2007

Oliver Rau

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„ Screening pflanzlicher Extrakte auf Aktivierung des humanen Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors und seiner Subtypen“

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.



Frankfurt am Main, den 21.2.2007

Oliver Rau