Aus der Klinik für Innere Medizin II Universitätsklinikum Ulm Prof. Dr. med. Wolfgang Rottbauer

Oxytocin induziert Ghrelin und Leptin, reduziert Uncoupling Protein-1 Genexpression und moduliert die Entzündungsreaktion in braunen Fettzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Malte Gründer

geboren in Neubrandenburg

Ulm 2019

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Steffen Just
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Martin Wabitsch
Tag der Promotion:	16.01.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
2. Methoden und Materialien	5
2.1 Methoden	5
2.1.1 Zellmodell	5
2.1.2 Zellkultur	5
2.1.3 Zellinkubation	7
2.1.4 Proteinisolation, Quantifizierung und Proteintrennung	8
2.1.5 Transfer	9
2.1.6 Spezifische Proteindetektion nach dem Western Blot Verfahren	10
2.1.7 RNA-Isolation, RNA-Konzentrationsbestimmung, cDNA – Synthese qRT-PCR	e und 10
2.1.8 Oil Red O Färbung und Lipid Droplet Assay	13
2.1.9 Glukose-Aufnahme Assay	14
2.1.10 Statistische Auswertung	15
2.2 Materialien	16
2.2.1 Grundmedium	16
2.2.2 Differenzierungsmedium	16
2.2.3 Induktionsmedium	16
2.2.4 Starvingmedium	17
2.2.5 Auftragspuffer für die RNA – Elektrophorese	17
2.2.6 Blockpuffer	17
2.2.7 Elektrophoresepuffer	17
2.2.8 Laemmli – Auftragspuffer mit pH 6,8	17
2.2.9 Lysepuffer pH 7,4 bei 4°C	18
2.2.10 Transferpuffer	18
2.2.11 Waschpuffer	18
2.2.12 Oil Red O Färbelösung	18
2.2.13 Acrylamid – Sammelgele	18
2.2.14 Antikörper und Primer	19

2.2.15 Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte
3. Ergebnisse
3.1 Der OTR wird von braunen Fettzellen exprimiert und erreicht eine vergleichbare Genexpression wie der Vasopressin 1α-Rezeptor
3.2 Akute Stimulation mit OT aktiviert die p44/p42 Mitogen acivated protein Kinase in differenzierten adulten murinen braunen Adipozyten
3.3 Akute Stimulation mit OT hat keinen Effekt auf die STAT3 Signalgebung 33
3.4 Akute Stimulation mit OT induziert die Ghrelin Genexpression in adulten differenzierten murinen braunen Adipozyten, wohingegen eine chronische Inkubation mit OT zu einer erhöhten Genexpression von Leptin führt
3.5 Chronische OT Behandlung reduziert die Uncoupling Protein-1 Genexpression
3.6 Chronische OT Behandlung reduziert die Isoprenalin induzierte Glukoseaufnahme in ausdifferenzierten braunen Adipozyten, wohingegen die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme unverändert bleibt
3.7 Chronische Inkubation mit OT verändert nicht die Differenzierung, Fettspeicherung oder die Gesamtzellzahl
3.8 Die akute und chronische Stimulation mit OT führt zu verschiedenen Entzündungsprofilen in braunen Adipozyten
3.9 Die durch OT induzierte Reduktion der TNF-α mRNA Expression ist p44/p42 MAP Kinase abhängig
3.10 Die akute und chronische Stimulation mit OT führt zu keiner Modulation der Angiotensinogen mRNA Genexpression
4. Diskussion
5. Zusammenfassung
64 64 64 64
7. Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

2DG	2-Deoxy-Glukose
2DG6P	2-Deoxy-Glukose-6-Phosphat
AgRP	Agouti-related protein
AGT	Angiotensinogen
AGT II	Angiotensin II
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APS	Ammoniumpersulfat
AVP	Arginin Vasopressin
BSA	Bovines Serumalbumin
CART	Cocaine and amphetamine regulated transcript
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cidea	cell death-inducing DNA fragmentation factor $\boldsymbol{\alpha}$ subunit
	like effektor A
Cox7a1	cytochrome C oxidase subunit 7A1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FBS	Fetales Bovines Serum
Foxc2	Forkhead box C2
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
IBMX	Isobuthylmethylxantin
IL-6	Interleukin 6
Μ	mol/l
MAP Kinase	Mitogen-activated protein Kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant Protein-1
min	Minute

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NPY	Neuropeptid Y
OT	Oxytocin
Otop1	otopetrin 1
OTR	Oxytocin Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
Pgc-1α	peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1α
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	proopiomelanocortin
pRb	prepro retinoblastoma associated protein
Prdm16	pr domain containing 16
PVN	Nucleus paraventricularis
qRT-PCR	quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
SON	Nucleus supraopticus
SV	Simian virus
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Einheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UCP-1	Uncoupling Protein-1
V1α-R	Vasopressin - 1α – Rezeptor
V1β-R	Vasopressin - 1β – Rezeptor
V2R	Vasopressin 2 - Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Oxytocin und Fettgewebsphysiologie

Die Interaktion zwischen dem zentralnervösen und endokrinen System nimmt eine entscheidende Rolle in der Koordination physiologischer Prozesse ein. Jüngste Forschungsarbeiten haben das Fettgewebe als ein wichtiges endokrines Organ identifiziert (Klein, Perwitz et al. 2006), welches in Verbindung mit dem Hypothalamus und der Hypophyse, ein zentraler Regulator der Energiehomöostase darstellt (Vicennati, Garelli et al. 2014).

Das neurohypophyseale Hormon Oxytocin (OT) ist ein zyklisches Nonapeptid. Es wurde erstmalig von Sir Henry Dale im Jahre 1906 entdeckt und aufgrund dessen Uterus-kontrahierende Wirkung in schwangeren Katzen "Oxytocin" (von altgriechisch ōkys = schnell und tokos = Geburt; okytokos = schnell gebärend) genannt (Dale 1906). Im Jahre 1953 wurde Oxytocin das erste isolierte und synthetisierte Polypeptidhormon (Du Vigneaud, Ressler et al. 1953). Vincent du Vigneaud bekam für diese Leistung 1955 den Nobelpreis verliehen.

Das Oxytocin-Gen wird in Neuronen des Nucleus paraventricularis (PVN) und des Nucleus supraopticus (SON) exprimiert. In diesen Kerngebieten werden magnozelluläre und parvozelluläre Neurone voneinander unterschieden. Die magnozellulären Nervenzellen stellen den Hauptursprung des systemisch zirkulierenden OTs dar. Ihre Axone enden in der Neurohypophyse, wo die reifen Peptidprodukte, OT und sein Trägerprotein Neurophysin, gespeichert und bei neuronaler Stimulation systemisch freigesetzt werden (Renaud and Bourque 1991). Die parvozellulären Neurone des PVN projizieren demgegenüber in das zentrale Nervensystem. Zudem wird OT von den Dendriten der oxytocinergen magnozellulären Neurone des NPV und des SON direkt zentral freigesetzt. Nach Sekretion beträgt die Halbwertszeit von OT ein bis zwei Minuten im Blut (Meyer, Freund-Mercier et al. 1987). Demgegenüber beträgt die Halbwertszeit in der zerebrospinalen Flüssigkeit circa 28 Minuten (Jones and Robinson 1982). Der entsprechende Oxytocin-Rezeptor (OTR) ist demzufolge im zentralen Nervensystem (ZNS) und in einer Vielzahl von peripheren Geweben z.B. dem Reproduktionstrakt, Pankreas, Fett- und Muskelgewebe, Gastrointestinal-Trakt und Herz exprimiert (Devost, Wrzal et al. 2008). Das OT/OTR-System ist in

verschiedenste physiologische Funktionen involviert. Zu ihnen gehören die klassische Rolle zur Auslösung der Uteruskontraktion während des Geburtsprozesses, die Stimulation der Laktation und die zentrale Beteiligung im Sozialverhalten. Jüngste Forschungsarbeiten haben zudem zahlreiche Nachweise für eine relevante Beteiligung des OT/OTR-Systems in der Regulation der Energiehomöostase erbracht (Barengolts 2016).

OT Serumspiegel sind bei übergewichtigen Kindern, übergewichtigen Erwachsenen und Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen reduziert. Bei Typ-II Diabetikern korreliert zudem der OT Serumspiegel negativ mit den Nüchtern-Plasmaglukose-Spiegeln, Nüchtern-Insulin-Spiegeln, HbA1c Messwerten, Fettstoffwechselparametern und Entzündungsmarkern (Qian, Zhu et al. 2014, Binay, Paketci et al. 2017). Genomweite Assoziationsstudien ergaben seltene OTR Varianten, welche mit kindlicher Adipositas beim Menschen assoziiert sind (Wheeler, Huang et al. 2013). Randomisierte kontrollierte Studien wiesen beim Menschen darüber hinaus eine reduzierte Kalorienaufnahme beim Frühstück (Lawson, Marengi et al. 2015), eine verringerte, durch Belohnung getriebene Kalorienaufnahme im postprandialem Zustand (Ott, Finlayson et al. 2013), eine verbesserte Glukosetoleranz (Klement, Ott et al. 2017), sowie eine signifikante Abnahme des Körpergewichtes (Zhang, Wu et al. 2013) nach intranasaler OT Behandlung nach. Des Weiteren ist von Bedeutung, dass die inhibitorischen Effekte von OT in übergewichtigen Personen stärker ausgeprägt erscheinen als im normgewichtigen Kollektiv (Thienel, Fritsche et al. 2016).

In den meisten (Morton, Thatcher et al. 2012), aber nicht in allen (Zhang, Bai et al. 2011) Tiermodellen für Diabetes und Übergewicht wurden verminderte OT Serumspiegel beobachtet. Knockout-Modelle von Ratten, welche entweder OT (Camerino 2009) oder den OTR (Takayanagi, Kasahara et al. 2008) betreffen, sind mit Altersübergewicht assoziiert, ohne die Nahrungsaufnahme zu alterieren, sodass günstige metabolische Effekte auf die Energiehomöostase angenommen werden können (Kasahara, Takayanagi et al. 2007). Zentrale und periphere Applikationen von OT führten zudem zu einer verminderten Nahrungsaufnahme, zum einen bedingt durch eine reduzierte Größe der Essensportionen und zum anderen durch eine prolongierte Fastenzeit. Diese Effekte konnten durch eine Vorbehandlung mit OT- (Deblon, Veyrat-Durebex et al. 2011) oder OTR-

2

Antagonisten verhindert werden (Olson, Drutarosky et al. 1991). Darüber hinaus führte eine subcutane oder intraventrikuläre Applikation mit OT in den meisten Studien an Tiermodellen für Hypertonie zu einem günstigen kardiovaskulären Effekt einschließlich der Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks (Petersson, Alster et al. 1996, Petersson, Lundeberg et al. 1997, Petersson and Uvnas-Moberg 2008, Gutkowska, Aliou et al. 2016).

In Hinblick auf periphere Organsysteme stimuliert OT die Oxidation von Glukose im Uterusgewebe (Truchan, Taylor et al. 1987). Im isolierten epididymalen Fettgewebe induziert OT die 2-Desoxy-Glukose Aufnahme, moduliert die Akkumulation von Glykogen sowie in einer biphasischen Weise die Lipolyse (Muchmore, Little et al. 1981). In vivo zeigte sich in Übergewicht- und Diabetes-Nagetiermodellen eine Inhibierung der Lipogenese (Altirriba, Poher et al. 2014), eine erhöhte Fettverwertung und eine allgemein verminderte Fettmasse (Deblon, Veyrat-Durebex et al. 2011). Insgesamt scheinen die dargestellten Daten beträchtlich von den experimentellen Konditionen sowie vom verwendeten Tiermodell abhängig zu sein. Daten zu dem Effekt von OT auf die fettgewebsabhängige endokrine Modulation der Energiehomöostase sind aktuell nicht verfügbar.

Der Körperfettanteil wird durch den Leptin Serumspiegel dargestellt. Das durch das Fettgewebe freigesetzte Leptin führt durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor im ZNS bei dünnen Personen (Seeley, van Dijk et al. 1996) zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme und vermindertem Körpergewicht. Innerhalb des ZNS ist das OT und Leptin System im Bereich des Hypothalamus eng miteinander oxytocinerge **PVN** verknüpft. So erregt Leptin Neurone im und proopiomelanocortin (POMC)/ Cocaine- and amphetamine- regulated Transcript (CART) Neurone im Nucleus arcuatus. OT erzeugt seinerseits über agouti-related protein (AgRP)/ neuropeptid Y (NPY) eine inhibitorische Wirkung auf Neurone des Nucleus arcuatus. Darüber hinaus führt die Aktivierung durch Leptin zu einer Freisetzung von OT aus der Neurohypophyse (Altirriba, Poher et al. 2015). Nach Entdeckung der Funktionsweise von Leptin bestand erhebliche Hoffnung, die herausfordernden Schwierigkeiten von Übergewicht und den damit assoziierten metabolischen Erkrankungen zu bewältigen. Unglücklicherweise wurden die vorteilhaften Effekte von Leptin in übergewichtigen und diabetischen Personen (Halaas, Boozer et al. 1997) durch eine Reduktion der hypothalamischen Leptin-Rezeptor Expression aufgehoben, sodass insgesamt eine Leptin-Resistenz angenommen werden kann (Jung and Kim 2013). OT könnte diesbezüglich ein interessanter Ansatzpunkt sein, um die dargestellte erworbene Leptin-Resistenz zu überwinden, da, wie bereits verdeutlicht, OT in den nach Leptin geschalteten Signalwegen lokalisiert ist (Altirriba, Poher et al. 2015). Zudem könnte OT ein Modulator der Leptin-Genfunktion im Fettgewebe sein.

Ein weiterer wichtiger Regulator der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase ist das Peptidhormon Ghrelin, welches von spezialisierten Zellen des Gastrointestinaltraktes gebildet wird (Dickson, Egecioglu et al. 2011). Die Ghrelin Plasmakonzentrationen schwanken abhängig von der Energieaufnahme. Unter Hungerbedingungen steigt der Ghrelin Serumspiegel und wirkt über hypothalamische Kerngebiete zur Steigerung des Appetits. Postprandial sinken anschließend die Ghrelin Plasmakonzentrationen (Schwartz, Woods et al. 2000). Die erzeugten physiologischen Effekte werden größtenteils durch NPY/AgRP exprimierende Nervenzellen des Nucleus arcuatus vermittelt (Briggs, Enriori et al. 2010). Neben der Appetitregulation hat Ghrelin eine maßgebliche Funktion bei der Regulation von Verteilung und Geschwindigkeit der Energieverwendung (Burger and Berner 2014).

Ungeachtet der intensiven Nachforschungen konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden, ob zentrale und/ oder periphere Mechanismen für die appetithemmende Wirkung verantwortlich sind. Die Absicht dieser Forschungsarbeit ist, die Wissenslücke von OT's peripheren Wirkungen auf die endokrine Funktion von Leptin und Ghrelin, der Thermogenese und von Entzündungsmarkerexpressionen in einem etablierten Zellmodell mit braunem Fettgewebe zu schließen.

2. Methoden und Materialien

2.1 Methoden

2.1.1 Zellmodell

Für die vorliegenden Experimente ist ein anerkanntes Zellmodell brauner Fettzellen verwendet worden. Es wurde ausführlich von Klein et al. beschrieben und eignet sich ausgezeichnet zur Erforschung der Fettgewebsfunktionsanalyse in vitro (Klein, Fasshauer et al. 1999, Fasshauer, Klein et al. 2000, Klein, Fasshauer et al. 2000, Fasshauer, Klein et al. 2001, Klein, Fasshauer et al. 2002, Kraus, Fasshauer et al. 2002, Ott, Fasshauer et al. 2002, Ott, Fasshauer et al. 2002, Kuchler, Perwitz et al. 2010). Es lässt sich zusammenfassen, dass die Zelllinie aus einer neugeborenen murinen fibrostromalen Fraktion von interskapulären braunem Fettgewebe des FVB Stamm generiert wurde. Während der Kultivierung erfolgte die Infektion der Zellkultur mit dem Vektor pBabe. Nach Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle wurde durch Replikation des codierenden hexameren Proto-Onkogens SV 40 T-Antigen die Aktivierung der DNA-Polymerase A modifiziert. Durch Pertubation der Tumorsuppressoren wie z.B. von p53 und des Retinoblastoms wurde darüber hinaus die Regulation des Zellzyklus alteriert, sodass die erzeugte Zelllinie in einen permanenten Zustand der Mitose eintrat. Da ebenfalls durch die Virus-Genom-Integration eine Resistenz gegen das antibiotisch wirksame Puromycin generiert wurde, konnte im weiteren Verlauf eine Selektion der erfolgreich infizierten Zellen durch die Zugabe von Puromycin erzeugt werden. Die so aufgearbeiteten Zellen konnten nun bei -196°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden.

2.1.2 Zellkultur

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 in keimfreier Umgebung durchgeführt. Die Grundlagen der Zellkultur, mit Mindestanforderungen an die Zellkulturmedien, wurden erstmals 1955 dargestellt (Eagle 1955). Mittels eines 37°C warmen Wasserbades wurden die auf -196°C gelagerten Präadipozyten innerhalb weniger Minuten aufgetaut. Die Präadipozyten wurden in eine Zellkulturschale (Wachstumsfläche 176,71 cm²,

Durchmesser 15 cm; Stammplatte) überführt und mit einem Grundmedium aus Fetalem Bovinem Serum und Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) im Brutschrank bei 37°C, in einer Atmosphäre von 95% Sauerstoff (O2) und 5% Kohlendioxid (CO2) kultiviert. Als Kontaminationsprophylaxe vor Mykoplasmen spp. wurden jeweils die Grundmedien mit antibiotisch wirksamen Tetrazyklinen zugefügt. Es wurden abwechseInd Grundmedien mit unterschiedlichen Tetrazyklinen verwendet, um möglichen Resistenzen vorzubeugen. Nach drei bis vier Tagen besiedelten die Zellen circa 70% der Zellkulturschale. Um Zyklusunregelmäßigkeiten durch das Auftauen der Präadipozyten zu vermeiden, wurden die ersten Zellen nicht sofort zu experimentellen Zwecken genutzt. Es wurden 10% (ca. 2 x 10⁵ Zellen) der Zellen erneut auf die Stammplatte aufgebracht, mit Grundmedium versetzt und für weitere drei bis vier Tage kultiviert. Die übrigen Zellen wurden verworfen. Nach Ablauf des oben genannten Zeitraumes waren wiederum 70% der Zellkulturschalen mit Zellen besiedelt, welche für die weiteren Experimente genutzt werden konnten. Zur Gewinnung der Zellen wurden zunächst die extrazellulären Proteine mittels 37°Grad warmer phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und entfernt. Anschließend wurden die Adhäsionskontakte mit 2 ml 37°Grad warmem Trypsin gespalten und die Zellen von der Grundplatte gelöst. Die Einwirkzeit des Trypsins betrug bis zu 3 Minuten und wurde durch die zeitlich folgende Zugabe von Grundmedium begrenzt. Im weiteren Verlauf wurde das hergestellte Gemisch aspiriert und in 6 -Well (Wachstumsfläche 9,6 cm^2) bzw. Zellkulturplatten Kulturschalen (Wachstumsfläche 78,54 cm², Durchmesser 10cm) resuspensiert. Nach jedem Ernten der Zellen begann eine neue Passage, die das Aussäen, Kultivieren und Lösen von der Grundplatte umfasst. Die fortlaufende Nummerierung der Passagen begann zum Zeitpunkt der ersten Kultivierung. Die für die Experimente gewonnenen Zellen bedeckten nach durchschnittlich vier Tagen im Differenzierungsmedium die Zellplatten. Durch mikroskopische Beobachtung wurde dieser Zeitpunkt zur optimalen Induktion verifiziert, da zu frühe, aber auch zu späte Induktionen zu einer Differenzierungsverzögerung führen würden. Das Induktionsmedium wurde aus dem Differenzierungsmedium durch Zugabe von Dexamethason, Indomethazin und Isobutylmethylxanthin (IBMX) gewonnen, zu den Zellen hinzugegeben und somit die 24 -stündige Induktionsphase eingeleitet.

Anschließend die Zellen wurden für weitere sechs Tage mit Differenzierungsmedium im Brutschrank kultiviert. In diesem Zeitraum entwickelten die Zellen den adulten Phänotyp, welcher sich durch multilokuläre Fettvakuolen auszeichnet. Einer katabolen Stoffwechsellage der sehr stoffwechselaktiven Zellen wurde durch das zweitägige Wechseln des Differenzierungsmediums vorgebeugt. Mittels eines pH-Indikators konnten diese Bedingungen während der kompletten sechs Tage überwacht und optimale Bedingungen gewährleistet werden. Bei kataboler Stoffwechsellage mit Überschuss an freien Fettsäuren, Laktat und anderen Stoffwechselendprodukten schlägt diesbezüglich die Farbe des Mediums, durch den Indikator im Medium DMEM, von rubinrot nach gelb um. Nach Abschluss der fünf- bis sechstägigen Differenzierungszeit wurde die vollständige Differenzierung Zellen der mikroskopisch und makroskopisch überprüft..

2.1.3 Zellinkubation

Die für die akute Inkubation vollständig ausdifferenzierten Adipozyten wurden 24 Stunden vor dem Experiment auf ein insulin- und serumfreies Medium (Starving Medium) gesetzt, um die Suszeptibilität der adulten Adipozyten gegenüber den Versuchsmedien zu erhöhen. Für die akute Stimulation wurde OT in einer Konzentration von 100 nM verwendet. In diesem Zeitraum wurden die Zellen bei 37°Grad, 95% Sauerstoff (O2) und 5% Kohlendioxid (CO2) im Brutschrank kultiviert. Für die Experimente wurden Zellen aus den Passagen zwischen 10 und 30 verwendet.

Für die Experimente mit chronischer Inkubation der Adipozyten wurden nach 24stündiger Induktion der Differenzierung dem anschließend verwendeten Differenzierungsmedium Oxytocin in einer Konzentration 1 µM zugefügt. Ein Wechsel des Differenzierungsmediums mit Zugabe von Oxytocin erfolgte täglich nach 24-stündiger Inkubation. Mit Oxytocin unbehandelte Adipozyten dienten als Kontrollgruppe. Während der Differenzierungsphase von sechs Tagen wurden die Zellen bei 37°Grad, 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid im Brutschrank kultiviert. Für die Experimente wurden Zellen aus den Passagen zwischen 10 und 30 verwendet.

2.1.4 Proteinisolation, Quantifizierung und Proteintrennung

Nachdem die Stimulationszeit abgelaufen war, wurden die Zellen unmittelbar mit einer 4°C phosphatgepufferterter Salzlösung (PBS) gereinigt und somit von Rückständen der Stimulationsreagenzien befreit. Die Stimulation war nun nachhaltig abgeschlossen, woraufhin die Isolation der Proteinfraktion mittels der Zugabe von 450µl Lysepuffer begonnen werden konnte. Durch diesen Lysepuffer wurden die Zellen fraktioniert und mechanisch mit einem Zellschaber (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Die sich bildende Suspension wurde bei 95°C innerhalb 5 Minuten denaturiert, um die Ausbildung von Quartärstrukturen zu unterbinden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Das Verfahren der Elektrophorese wurde erstmals 1937 von Tiselius entwickelt (Tiselius 1937). Elf Jahre später wurde ihm für diese wissenschaftliche Errungenschaft der Nobelpreis in Chemie verliehen. Im weiteren Verlauf wurde die Methode führend durch Smithies, Raymond und Maizels verfeinert (Smithies 1955, Raymond and Weintraub 1959, Maizel 1966). Vor der größenspezifischen Fraktionierung der zu untersuchenden Proteine wurden die Proben in Reaktionsbehälter pipettiert und für zehn Minuten bei 4°C geschwenkt. Bei der anschließenden Zentrifugation mit 12.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) und 4°C wurde die zytosolische Fraktion vom Fettanteil und der Kernfraktion getrennt. Die Proteinmenge der zytosolischen Fraktion wurde, modifiziert nach Bradford, photometrisch ermittelt. Dafür wurde ein Mikroliter des entstandenen Lysats in spezielle Küvetten mit Coomassie brilliant blue G-250 überführt. Mittels dieses ionischen Farbstoffes. dessen Blaufärbung proportional zu der Proteinkonzentration ansteigt (Absorptionsmaximum 465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein), konnte die Zunahme der Absorption bei 595 nm photometrisch erstellten mit einer zusätzlich gemessen werden und Eichkurve die Proteinkonzentrationen in Relation gesetzt werden (Bradford 1976, Sapan, Lundblad et al. 1999). Durch Bestimmung von Doppelwerten wurde das Risiko von Pipettierfehlern minimiert, wobei zusätzlich Variationsbreiten bis zu 20% der Proteinmenge innerhalb eines Experimentes toleriert wurden. Die durchschnittliche Proteinmenge einer Zellkulturplatte lag bei drei bis acht Milligramm pro Milliliter (mg/ml). Proteinkonzentrationen wurden folgend mit Lysepuffer verdünnt und zueinander standardisiert. Anschließend erfolgte bei 95° über fünf Minuten die Denaturierung der Proteine. Die Reagenzien wurden bis zur weiteren Nutzung bei -80° im Gefrierschrank aufbewahrt.

Das im Rahmen der Gelelektrophorese verwendete negative Detergenz, Sodiumdodecylsulfate (SDS), lagerte sich an die hydrophoben Bereiche der Proteine an und führte damit zu einer homogenen Negativierung. Es wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidsystem nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet und in die Geltaschen zwischen 20µg und 200µg der Proteinfraktion aufgetragen. Um eine eindeutige Größenzuordnung zu gewährleisten, wurden zehn Mikroliter eines Proteinmolekularmarkers in eine gesonderte Geltasche überführt. Das verwendete Trenngel bestand aus einem Acrylamid/ Bisacrylamid- (37,5: 1) Anteil von acht bis zwölf Prozent. Dieser Anteil richtete sich nach der Molekulargröße des zu untersuchenden Proteins. Hierbei galt, je kleiner das zu untersuchende Protein war, desto größer musste der Anteil des Acrylamid/ Bisacrylamid Gels sein. Das Sammelgel hatte einen Acrylamid/ Bisacrylamidanteil von 4,5%. Die Gelelektrophorese wurde mit Laemmli – Auftragspuffer mit pH-6,8 und einer angelegten Spannung von 80V begonnen und letzteres nach 20 Minuten mit 100V fortgeführt.

2.1.5 Transfer

Um die aufgetrennten Proteine im Folgenden mit spezifischen Antikörpern zu inkubieren, müssen diese zunächst vom Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden (Southern 1975). Für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde eine Spannung von 110V im eiskalten Puffer appliziert. Transferzeiten betrugen 40 bis 80 Minuten und waren abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins. Hierbei galt, dass die Zeitdauer mit zunehmender Größe der Proteine länger wurde. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran in einem 4°C kalten Blockpuffer für mehrere Stunden inkubiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass freie Nitrocellulose unspezifisch von

Albumin gebunden wurde und die im weiteren Verlauf verwendeten Primärantikörper nicht falsch-positiv an Nitrocellulose gebunden wurden.

2.1.6 Spezifische Proteindetektion nach dem Western Blot Verfahren

Für die nun folgende Detektion des zu untersuchenden Proteins mittels Western Blot Verfahren, erstmalig 1979 beschrieben (Towbin, Staehelin et al. 1979), wurde die Nitrocellulosemembran für ein bis zwei Stunden mit einem spezifisch, hoch affin bindenden Primärantikörper inkubiert. Die nützlichste Inkubationszeit wurde im Vorfeld ausgetestet. Nach dreimaligem Waschen mit einem Waschpuffer für jeweils 5 Minuten wurde die Nitrocellulosemembran mit einem Sekundärantikörper für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Dieser band mit seiner Fab-Region spezifisch an den Primärantikörper und enthielt an seinem Fc-Teil das Enzym Peroxidase. Die vorteilhafteste Inkubationszeit wurde im Vorfeld empirisch ermittelt und anschließend nach dieser Zeit die Nitrozellulosemembran durch Waschen mit Waschpuffer von Rückständen der Antikörperlösung befreit. Die Membran wurde dann für eine Minute mit Chemilumineszenslösung (Roche, Basel, Schweiz) versetzt. Die dadurch ermöglichte Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers produziert Lumineszenz, welche in entsprechenden Filmen detektiert wurden. Die Signale wurden densitometrisch mit der Quantity One Software Version 4.5.2 (Bio-Rad, Hercules, USA) ausgewertet.

2.1.7 RNA-Isolation, RNA-Konzentrationsbestimmung, cDNA – Synthese und qRT-PCR

Mittels der Ribonukleinsäure (RNA) Isolierung lässt sich eine Momentaufnahme der intrazellulären transkribierten messenger Ribonukleinsäure (mRNA) erstellen und die zu diesem Zeitpunkt stattfindende Genexpression mit dem Verfahren der quantitative Real-time Polymerase Ketten Reaktion (qRT-PCR) analysieren.

2.1.7.1 RNA-Isolation

Die auf -80°C tiefgefrorenen Zellen tauten unter der Sicherheitswerkbank mit jeweils 500 µl Trizol in jedem Well auf. Dieses Medium verhinderte durch eine hoch effektive Bindung an eine Vielfalt von RNAsen die Spaltung der Phosphordiester-Bindungen und bewahrte die Integrität und Stabilität der RNA. Darüber hinaus lysierte Trizol die Zellmembranen und löste die Zellkomponenten auf. Anschließend wurden die Zellrasen mit Zellschaber und sterilem Aqua abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Durch Homogenisierung mit einem Schüttelgerät von Heidolph Relax wurde gewährleistet, dass bis zu diesem Zeitpunkt noch freie RNAsen inaktiviert wurden. Nach Zugabe von 160 µl Chloroform wurden die Reaktionsgefäße zunächst gevortext und daraufhin im ersten Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12.000 U/min für 15 Minuten in drei Phasen getrennt. Die wässrige obere Phase enthielt Chloroform und RNA und die unter der Interphase liegende rötliche Phase Trizol, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteine. Aus der wässrigen Phase jeder Reaktionsgefäße wurden dann jeweils 220 µl in neue Reaktionsgefäße überführt. Mit dem Zusatz von 220 µl Isopropanol (2 – Propanol) und nach einer Invertierung mit anschließender Wartezeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben im zweiten Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12.000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Da Isopropanol die RNA präzipitierte, lagerte diese sich am Boden des Gefäßes während der Zentrifugation an und war dort als weißes Pellet zu erkennen. Nach dem Abkippen des Isopropanols wurden 750 µl einer 75% tigen Ethanol und 25%tigen Diethylpyrocarbonat (DEPC) – Lösung hinzupipettiert, die zum Waschen der RNA diente. Nach der dritten Zentrifugation bei 4°C und 8.000 U/min für 15 Minuten wurde die Waschlösung abgekippt. Um alle Rückstände dieses Mediums zu entfernen, wurden die Proben erneut kurz zentrifugiert und die übrig gebliebene Flüssigkeit abpipettiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße mit offenem Deckel bei 37°C für mindestens 10 und maximal 15 Minuten erhitzt. Die letzten Rückstände des Alkohols wurden damit sicher verdampft und die nun reine RNA in 20 bis 80 µl RNAase freiem Wasser bei 55°C für 10 Minuten unter ständigem Schwenken bei 3000 rpm gelöst. Anschließend wurde die RNA im Gefrierschrank bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.1.7.2 RNA Konzentrationsbestimmung und cDNA – Synthese

Die RNA Konzentration wurde mit spektralphotometrischem Verfahren beim Absorptionsmaximum von 260 nm bestimmt und dafür ein µl der im Schüttler homogenisierter Proben eingesetzt. Bei jeder Probe wurden zur Kontrolle und besseren Ermittlung der durchschnittlichen RNA Konzentration Doppelwerte bestimmt. In der anschließenden komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) Synthese wurde zur Herstellung des komplementären Stranges der RNA das iScript cDNA Synthese Kit (BioRad) verwendet. Für den Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl entfielen 15 µl auf 1 µg RNA und RNAse freiem Wasser sowie 5 µl auf den Mastermix mit 4 µl Puffer und 1 µl reverser Transkriptase. Die auf Starlab - Platten überführten Reaktionsansätze wurden im Master Cycler (Eppendorf) im ersten Schritt für 5 Minuten auf 25°C erwärmt und dann für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach dem anschließenden dritten Schritt bei 85°C für 5 Minuten wurde der gesamte Ablauf 39-mal wiederholt. Die nun vollständig synthetisierte cDNA wurde dann im Gefrierschrank bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.7.3 Quantitative Real Time – Polymerase Chain Reaction

Die qRT-PCR, erstmals 1986 entwickelt (Mullis, Faloona et al. 1986, Saiki, Gelfand et al. 1988), ermöglicht es, während der Amplifikation der cDNA in vielen PCR Ansätzen, mittels in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes, die Menge an Produkt über die Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Dabei ist wesentlich, dass die Fluoreszenzintensität des verwendeten Farbstoffes namens SyBRGreen in doppelsträngiger DNA signifikant höher ist, als die des freien SyBrGreens. Die Messung der Fluoreszenzemission, bei einer für Amplifikate stabilen Temperatur, erfolgte nach jedem Durchlauf eines PCR - Zyklus und wurde durch einen computergestützten Algorithmus quantifiziert. Die Wendepunkte der gemessenen Fluoreszenzkurven wurden ermittelt. Solche als Threshold - Cycle (Ct – Wert) definierten Punkte korrelieren invers mit den spezifischen mRNA Ausgangsprodukten, welche als Ziel nachzuweisen sind. Darüber hinaus wurde eine Standardkurve mit Bestimmung der beta actin cDNA erstellt. Da beta actin in Adipozyten gleichmäßig und in großer Menge exprimiert wird, ermöglicht dies relative Ergebnisse auf einer Platte zu bestimmen und die so ermittelten Daten mit

12

weiteren Platten des gleichen zu untersuchenden Genes zu vergleichen. Für jedes Reaktionsgefäß wurden 10 µl der vorher erstellten cDNA verwendet und diese mit 90 µl Aqua ad injectabilis 1 zu 10 verdünnt. Diese Proben wurden nach Pipettierung der Standardkurve mit 12,5 µl SyBRGreen, 0,2 µl forward qRT - und 0,2 µl reverse qRT - Primer vervollständigt. Die Zyklen wurden im Master Cycler ep realplex (Eppendorf) durchgeführt. Nach primärer Denaturierung bei 95°C für 900 Sekunden wurden 60 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für zehn Sekunden, Annealing bei 56°C für 30 Sekunden und Elongation bei 72°C für 30 Sekunden durchgeführt.

2.1.8 Oil Red O Färbung und Lipid Droplet Assay

Der verwendete Azofarbstoff Oil Red O (Kutt and Tsaltas 1959) eignet sich auf Grund seiner fettlöslichen und rot färbenden Eigenschaft hervorragend zum Nachweis von Fettvakuolen in Adipozyten. Zum Nachweis der Triglyceride wurden zunächst die Zellkulturschalen zweimal mit PBS - Lösung gewaschen. Nachdem die Rückstände des Mediums entfernt waren, wurde der Zellrasen mit einer 10% igen Formaldehyd - Lösung innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Abkippen der Fixierungslösung wurden die Zellen für zwei Stunden mit der Lipidfärbelösung Oil Red O versetzt. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellrasen mehrmals mit Wasser gewaschen, um nicht intrazellulär akkumulierten, freien Farbstoff restlos zu entfernen. Anschließend wurde die visualisierte Anreicherung von Triglyceriden in Adipozyten mit dem Einscannen der Zellkulturplatten festgehalten.

Zur objektiven Ermittlung von potentiellen morphologischen Differenzen einer chronischen OT Inkubation wurde die Größe und Anzahl der Lipidvakuolen, sowie die Morphologie in ausdifferenzierten braunen Adipozyten erfasst. Hierfür wurden braune Adipozyten während der Differenzierung täglich mit OT in einer Konzentration von 100nM inkubiert. Am sechsten Tag nach Differenzierungsinduktion hochauflösende Bildaufnahmen wurden von ausdifferenzierten braunen Adipozyten mittels Durchlicht-Polarisationsmikroskop angefertigt. Anschließend wurde ein Softwarealgorithmus verwendet, welcher das Zentrum sowie die Größenausdehnung von rundlichen Strukturen erfasst. Die so in absoluter Anzahl registrierten Lipidvakuolen wurden folgend in Größenkategorien aufgetrennt. Unbehandelte ausdifferenzierte Adipozyten wurden als Kontrollgruppe verwendet.

2.1.9 Glukose-Aufnahme Assay

Die Bestimmung der basalen, Isoprenalin- und Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme erfolgte durch Einsatz von markierter 2-Deoxy-Glukose (2DG) und Detektion einer durch 2-Deoxy-Glukose-6-Phosphat (2DG6P) entstehenden homogenen Biolumineszens. Hierfür wurde das Glucose Uptake-Glo[™] Assay der Firma Promega verwendet.

Die für den Versuch vollständig ausdifferenzierten Adipozyten wurden während der Differenzierung eines mit Oxytocin zugesetzten Differenzierungsmediums in einer Konzentration von 100nM behandelt. Oxytocin unbehandelte Adipozyten dienten als Kontrollgruppe. Die diesbezüglich vorbereiteten Adipozyten wurden an Tag 7 nach erfolgter Induktion, 24 Stunden vor dem Experiment, mit einem insulinund serumfreien Medium (Starving Medium) inkubiert. Anschließend wurden die Adipozyten auf Grund des glukosehaltigen Starving Mediums mit PBS gewaschen und mit 2DG 1mM für 10 Minuten inkubiert. Entsprechend dem jeweiligen Versuchsaufbau wurden ein Teil der unbehandelten und ein Teil der mit Oxytocin vorbehandelten Adipozyten zusätzlich mit Isoprenalin in einer Konzentration von 500 nM oder Insulin in einer Konzentration von 20 nM inkubiert. 2DG wird in gleichem Verhalten wie Glukose von den Adipozyten aufgenommen und rasch zu 2DG6P phosphoryliert. Da eine weitere enzymatische Metabolisierung durch die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) nicht erbracht werden kann, akkumuliert 2DG6P intrazellulär. Mittels saurer Waschmittellösung (Stop Buffer) wurden die Adipozyten lysiert, die weitere Aufnahme von 2DG beendet und intrazellulär vorliegendes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) zu NADP+ oxidiert. Durch Verwendung des alkalischen Puffers (Neutralization Buffer) wurde im Anschluss der pH angehoben. Folgend wurde das Zelllysat mit 2DG6P-Nachweis-Agens, bestehend aus Reduktase, Reduktase-Substrat, G6PDH, NADP+, Proluciferin und rekombinanter Luciferase, für 1 Stunde bei 25°C inkubiert. Die anschließend durch G6PDH vermittelte Redoxreaktion erzeugt

14

NADPH aus NADP durch Oxidation von 2DG6P zu 6-Phosphodeoxygkuconat (6PDG). Das so entstandene NADPH wird von Reduktasen verwendet, um Proluciferin in Luciferin zu überführen. Die weitere Oxidation von Luciferin wird anschließend durch die Ultra Glo™ Luciferase katalysiert. Das entstehende biolumineszente Signal ist proportional zur 2DG6P Konzentration und wurde durch einen Luminometer (Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer, Berthold Technologies) als relative Lichteinheiten (RLU) erfasst. Die so erfassten Datensätze wurden als Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) bezogen auf einen gemittelten Basalwert von unbehandelten, nicht stimulierten Adipozyten angegeben.

2.1.10 Statistische Auswertung

Braune Präadipozyten wurden in Zellkulturschalen ausgesät und kultiviert. Gemäß den zu untersuchenden Bedingungen wurden anschließend die Zellkulturschalen zu Versuchsgruppen zusammengefasst und je nach Versuchsaufbau im Folgenden behandelt. Veränderte Bedingungen betrafen Zeitverläufe (verschiedene Inkubationszeiten bei gleicher Konzentration), Dosisverläufe (verschiedene Konzentrationen bei gleicher Inkubationszeit der Testsubstanz) sowie Stimulationsweisen (akute Stimulation nach vollendeter Differenzierung sowie tägliche Stimulierung während der Differenzierung). Potentiell regulatorische Effekte wurden nach Relativierung zu unbehandelten Kontrolladipozyten erkennbar. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der Chemilumineszenz des Sekundärantikörpers bei den Westernblotverfahren bzw. durch die Ermittlung der Fluoreszenz bei der gRT-PCR. Die so auf dem Skalenniveau der Verhältnisskala ermittelten Rohdaten wurden zur weiteren statistischen Auswertung verwendet.

Diesbezüglich wurde das Computerprogramm Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) für die statistische Auswertung verwendet. Zur Evaluation der Differenzen zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen wurden Einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) gefolgt von geeigneten Post-hoc-Tests durchgeführt. Der entsprechende nachträgliche Post-hoc-Test war diesbezüglich von den charakteristischen Eigenschaften der Rohdaten abhängig. Falls die zu untersuchenden Versuchsgruppen die gleiche Anzahl an Rohdaten beinhalteten, wurde der Tukey und/oder der Holm Sidak Test verwendet. Falls die zu untersuchenden Versuchsgruppen eine ungleiche Anzahl an Rohdaten enthielten, wurde die Dunn's Post-hoc-Analyse verwendet. Die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten eines gleichen Versuchsaufbaus ermittelten Datensätze wurden als MW mit Standabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant und p-Werte < 0,01 als statistisch hoch signifikant gewertet.

2.2 Materialien

2.2.1 Grundmedium

Das Grundmedium besteht aus 400 ml DMEM, dem 100 ml fetales bovines Serum (FBS) hinzugefügt werden. Darüber hinaus enthält das Grundmedium Amphotericin mit der Endkonzentration von 1 µg/ml, Penicillin mit Endkonzentration von 100U/I und Streptomycin mit der Endkonzentration von 10 µg/ml. Um Zellkulturinfektionen mit Mycoplasmen spp. entgegenzuwirken, enthielt das Grundmedium zudem entweder das Tetrazyklin BM 1 oder das Tetrazyklin BM 2.

2.2.2 Differenzierungsmedium

Das Differenzierungsmedium wurde aus DMEM mit 20%igem FBS Anteil und den folgenden Substanzen in Endkonzentrationen hergestellt: Insulin 20 nM, Penicillin 100 U/I, Streptomycin 100 µg/ml und Trijodthyronin 1 nM.

2.2.3 Induktionsmedium

Dem Differenzierungsmedium wird zur Herstellung des Induktionsmediums Dexamethason mit der Endkonzentration von 2 μ g/ml, Indomethacin mit der Endkonzentration von 250 μ M und Isobuthylmethylxanthin (IBMX) mit der Endkonzentration von 500 μ M zugefügt.

2.2.4 Starvingmedium

Das Starvingmedium besteht schlichtweg nur aus purem DMEM.

2.2.5 Auftragspuffer für die RNA – Elektrophorese

Der Auftragspuffer enthielt Aqua destillata versetzt mit Sucrose und einer Endkonzentration von 0,073 M, Bromphenolblau mit 0,1%iger Endkonzentration sowie Di – Natrium – EDTA mit 0,12 Molarer – und Urea mit 4 Molarer Endkonzentration.

2.2.6 Blockpuffer

Waschpulver wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) versetzt, sodass eine BSA - Endkonzentration von 3% entstand.

2.2.7 Elektrophoresepuffer

Der Elektrophoresepuffer wird aus Aqua destillata mit folgend aufgeführten Substanzen mit Angaben in Endkonzentrationen gewonnen: Glycin 0,38 M, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 2,3 mM, Natriumdodecylsulfat (SDS) 3,5 mM und Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) 0,05 M.

2.2.8 Laemmli – Auftragspuffer mit pH 6,8

Für die Herstellung des Laemmli – Auftragspuffers wurde Aqua destillata mit folgenden Substanzen unter Angabe der Endkonzentration versetzt: Bromphenolblau 0,2 g/ml, Dithiothreitol (DTT) 100mM, Glycerol 0,2 g/ml, SDS 4% und TRIS 50 mM.

2.2.9 Lysepuffer pH 7,4 bei 4°C

Für den Lysepuffer werden zu Aqua destillata folgende Stoffe unter Angabe der Endkonzentration zugefügt: Aprotinin 10 μg/ml, EDTA 2 mM, Glycerol 10%, HEPES 50 mM, Octylphenoxypolyethoxyethanol (IGEPAL CA-630, Sigma Aldrich) 1%, Kalziumchlorid 1mM, Leupeptin 10 μg/ml, Magnesiumchlorid 1 mM, Natriumchlorid 137 mM, Natriumflorid 10mM, Natriumorthovanadat 2 mM, Natriumpyrophosphat 10 Mm und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 2 mM.

2.2.10 Transferpuffer

Zur Herstellung des Transferpuffers wurde Aqua destillata mit folgenden Stoffen unter Angabe der jeweiligen Endkonzentration versetzt: Glycin 0,19 mM, Methanol 20%, SDS 3,5 mM und TRIS 0,025 mM.

2.2.11 Waschpuffer

Der Waschpuffer enthält Aqua destillata zu dem Natriumchlorid mit der Endkonzentration von 0,15 M, TRIS mit der Endkonzentration von 0,01 M sowie Tween mit der Endkonzentration von 0,01% zugefügt wurde.

2.2.12 Oil Red O Färbelösung

Für die Oil Red O Färbelösung wurde in 100 ml Isoproterenol die entsprechende Menge Oil Red O Reagenz aufgelöst, um die gewünschte Endkonzentration von 0,5 g/ 100 ml zu erhalten. Die Lösung wurde kurz vor Verwendung filtriert, um nicht gelöstes Oil Red O zu entfernen.

2.2.13 Acrylamid – Sammelgele

Für die Herstellung der Acrylamidgele wurden folgende Substanzen verwendet: Acrylamid, 10%iges Ammoniumpersulfat (APS), Aqua destillata, SDS, Tetramethylethylendiamin (TEMED) und TRIS 0,5 M pH 8,8. Für den spezifischen Nachweis von Zellproteinen wurden in der Gelelektrophorese Gele mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration verwendet. Das 8%ige Gel wurde mit 18 4ml Acrylamid, 150 µl APS 10%, 7 ml Aqua destillata, 150 µl SDS 10%, 10 µl TEMED und 3,75 ml TRIS 0,5 M hergestellt. Für die Herstellung des 10%igen Gels wurde die Zusammensetzung nur bei den Komponenten Acrylamid mit 5 ml und Aqua destillata mit 6 ml verändert. Für die Herstellung des 12%igen Gels wurden wiederum nur die Komponenten Acrylamid mit 6 ml und Aqua destillata mit 5 ml verwendet. Bei Bedarf wurden die Gele auch mit TRIS 1,5 M pH 8,8 hergestellt.

2.2.14 Antikörper und Primer

Die p44/p42 MAP-Kinasen (phospho-Thr202/Tyr204) Antikörper sowie der pharmakologische MEK1/2-Inhibitor PD98059 wurden bei den New England Biolabs erworben (Ipswich, MA, USA).

Primer für die Genexpressionsanalysen wurden bei MWG Eurofins Genomics bestellt (Ebersberg, Deutschland). Die Folgende Tabelle fasst alle für die Dissertation verwendeten sense und antisense Primer für die erfolgten qRT-PCRs zusammen. Dargelegt sind die entsprechenden Gennamen mit den zugehörigen NCBI Accession Nummern.

Tabelle 1			
Gene	NCBI accession	Sense	Antisense
	number		
Beta actin	NM_007393	AGA GGG AAA TCG	CAA TAG TGA TGA
		TGC GTG AC	CCT GGC CGT
Cidea, cell death-	NM_007702.2	TGC TCT TCT GTA	GCC GTG TTA AGG
inducing DNA		TCG CCC AGT	AAT CTG CTG
fragmentation factor			
alpha-like effector A			
Cox7a1 cytochrome	NM 009944 3	CCG ACA ATG ACC	TGT TTG TCC AAG
C oxidase subunit 7A1		TCC CAG TA	TCC TCC AA
Elovl3, elongation of	NM_007703.2	TCC GCG TTC TCA	GGA CCT GAT GCA
very long chain fatty		TGT AGG TCT	ACC CTA TGA

acids			
Foxc2. Forkhead box	NM_013519.2	ACG AGT GCG GAT	CAG TTT GGG GAG
C2		TTG TAA CC	GGA CCT AT
Ghrelin	NM_021488	CCA TCT GCA GTT	GCT TGT CCT CTG
		TGC TGC TA	TCC TCT GG
Leptin	NM_008493	TGA CAC CAA AAC	TCA TTG GCT ATC
		CCT CAT CA	TGC AGC AC
MCP-1, chemokine	NM_011333	GCC CCA CTC ACC	CCT GCT GCT GGT
(C-C-motif) ligand 2		TGC TGC TAC T	GAT CCT CCT GT
(Ccl2) alias monocyte			
chemoattractant			
protein-1			
Otop1, otopetrin 1	NM_172709.3	GGA CCT GAT GCA	ACC ATG CTC TAC
		ACC CTA TGA	GTG CTG TG
Ppargc1a, peroxisome	NM 008904 2	GGA CGG AAG CAA	GAG TCT TGG GAA
proliferator-activated			
receptor gamma			
coactivator 1 alpha			
Prb, prepro-	NM_009029.3	TAA ACA TCT CCC	ACA ACC ATG AGC
retinoblastoma-		AGC GGA GT	CAG GAG TC
associated protein			
Prdm16, pr domain 16	NM_027504.3	CTG TTA GCT TTG	GAC GAG GGT CCT
		GAG CCG AC	GTG ATG TT
II-6, interleukin-6	NM_031168	AGC CAG AGT CCT	GGT CCT TAG CCA
		TCA GA	СТС СТ
TNFalpha, tumor	NM_013693	TCG TAG CAA ACC	AGA TAG CAA ATC
necrosis factor alpha		ACC AAG TG	GGC TGA CG
UCP-1, uncoupling	NM_009463	TCT CTG CCA GGA	AGA AGC CCA ATG
protein-1		CAG TAC CC	ATG TTC AG
OTR, OT receptor	NM_001081147.2	ATT GTA CCG GTC	TCT TCA CTG TGC
		ATC GTG CT	GGA TTT TG
V1αR, vasopressin 1	NM 016847.2	GGG CTG AGT TTC	GCC ATA GCA GGT
, p	_		

alpha receptor		GTT CTG AG	ACC CAA GA
V1βR, vasopressin 1	NM_011924.2	GCC GGG CTG TCA	CAG GGA GCA GCA
beta receptor		AAT ATC TA	ATA AGA GG
V2R, vasopressin 2	NM_019404.2	CCT AGC TCT CCC	GCA CTT GAA ACA
receptor		AGC AAC AG	GAG CCA CA

2.2.15 Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte

Die folgende Tabelle fasst alle für die Dissertation verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte zusammen.

Tabelle 2			
Reagenzien und Chemikalien	Hersteller	Produktnummer	
Acrylamid-Bis 30% (37,5:1)	Merck, Darmstadt, Deutschland	100639	
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A9539	
Albuminstandard zu Biorad Protein Assay	Biomol, Hamburg, Deutschland	500-0007	
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A3678	
Amphothericin B	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	15290-026	
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A1153	
Aquastabil; N,N-Dimethyl-2- hydroxypropylammoniumchlorid- polymer Lösung < 5 %	Julabo, Seelbach, Deutschland	N-22484	
Benchmark Protein Ladder	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	10748-016	
BM1 und BM2 Cyclin	Roche, Basel, Schweiz	10799050001	
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	B6768	
Bovines Serum Albumin	Biomol, Hamburg, Deutschland	01400	
Bradford Protein Assay	BioRad	500-0006	
Bromphenolblau	Biomol, Hamburg, Deutschland	50206	

Calziumchlorid	Caelo, Hilden, Deutschland	2120
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	C2432
Diethylphosphorylcyanide	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	472565
Developer	AGFA, Mortsel, Belgien	G-150
Dexamethasone	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	D4902
Diethylpyrocarbonate	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	D5758
Dimethylsulfoxide	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	D2650
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	D9779
DMEM High Glucose (4.5g/l) with L- Glutamine	PAA, Pasching, Österreich	E15-810
dNTP Mix 2,5mM (10mM) (Desoxynucleotid-Mischung)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	R725-01
Ethylendiamintetraacetat Titriplex II	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.08417.0250
Ethylendiamintetraacetat-Di-Natrium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	E5513
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland	100983
Ethidiumbromide	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	E1385
Fetales Bovines Serum	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	10270-106
Fixierer	AGFA, Mortsel, Belgien	601084
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	HT501128-4 L
Glucose Uptake-Glo ™ Assay	Promega, Fitchburg, WI, USA	J1342
Glycerol 85%	Apotheke Bundeswehrkrankenhaus Ulm, Ulm, Deutschland	
Glycine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	G8898
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-	Biomol, Hamburg, Deutschland	05288

Ethanesulphonic Acid		
Igepal CA 630	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	13021
Indomethacine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	17378
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	11882
Isobuthylmethylxanthine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	15879
Isopropanol 99,9%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	19516
Isopropanol 70%	Apotheke Bundeswehrkrankenhaus Ulm, Ulm, Deutschland	
Kaliumchlorid	Caelo, Hilden, Deutschland	2316
Kaliumdihydrogenphosphat	Caelo, Hilden, Deutschland	2306
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	L2884
Magnesiumchlorid	Caelo, Hilden, Deutschland	2392
Magnesiumsulfat Heptahyrat	Caelo, Hilden, Deutschland	2404
Methanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.06008.2500
Natriumchlorid	Caelo, Hilden, Deutschland	2438
Natriumfluorid	Caelo, Hilden, Deutschland	2447
Natriummonohydrogenphosphat Dodecahydrat	Caelo, Hilden, Deutschland	2464
Natriumpyrophosphat Tetranatriumdiphosphatdecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.065.91.0500
DiNatriumhydrogenphosphat (wasserfrei) Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.065.66.0500
DiNatriumhydrogenphosphat Dihydrat Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.065.80.0500
DiNatriumhydrogenphosphat Heptahydrat Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.065.75.1000
DiNatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.065.79.0500

Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O		
Natronlauge	Fluka, Buchs, Schweiz	72068
dNTP Mix 2,5mM (10mM) (Desoxynucleotid-Mischung)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	R725-01
Nucleo-Spin RNA II RNA-Aufreinigungs-Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740955.50
Nucleasefreies Wasser	Ambion, Austin, Texas, USA	9935 G
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	O0625
Oligo dt15 Primer	Roche, Basel, Schweiz	10108677001
Oxytocin	Sigma-Adrich, Steinheim, Deutschland	O6379
Penicillin-Streptomycin	Cambrex, Rockland, USA	DE17-602E
Phenylmethylsulfonylfluoride	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	P7626
Propanol 99,9%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	19516
RNAse Inhibitor	Ambion, Austin, Texas, USA	2690 2.500 U 2692 10.000 U
RNAse freies Wasser	Ambion, Austin, Texas, USA	AM9935
RNA-Aufreinigungs-Kit (Nucleo-Spin RNA II)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740955.50
Salzsäure konz. ≥25%	Riedel de Haen, Hannover, Deutschland	30723
Sodiumdodecylsulfate	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	L3771
SodiumOrthovanadate Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	S6508
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	S2395
SuperScript II reverse Transscriptase	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	18064-014
NNN-Tetramethylethylendiamin	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.10732.0100
Tetranatriumdiphosphat-Decahydrat Natriumpyrophosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland	106.591.0500

Triiodthyronine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	T5516	
Tris Ultra Pure	Biomol, Hamburg, Deutschland	08003	
I ris(nydroxymetnyi)-aminometnan			
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	15596-026	
Trypsin-EDTA 0,05%	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	25300-054	
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim,	P1379	
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate	Deutschland		
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	U6504	
Western Blot Kit mit Sekundärantikörper und Chemilumineszenzlösung A und B	Roche, Basel, Schweiz	11520709001	

Tabelle 3				
Material	Hersteller	Artikelnummer		
Filterpapier	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA	1703932		
Küvetten für RNA-Bestimmung	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	6.249.345		
Küvetten für Protein-Bestimmung	Brand, Wertheim, Deutschland	759150		
Mediumfilter	Millipore, Billerica, USA	SCGPT05RE		
Nitrocellulose Protean BA85	Whatman, Bottmingen, Schweiz	10401196		
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt, Deutschland	747715		
Pipetten 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1253.001		
Pipetten 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1254.001		
Pipetten 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1685.001		
Pipetten 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1689.001		
Pipettenspitzen für PCR 2-10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030077040		
Pipettenspitzen für PCR 10-200µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030077555		
Pipettenspitzen für PCR 50-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030077571		
Pipettenspitzen standard 2-10µl	Brand, Wertheim, Deutschland	702504		

Pipettenspitzen standard 10-200µl	Brand, Wertheim, Deutschland 702516				
Pipettenspitzen standard 50-1000µl	Brand, Wertheim, Deutschland 712521				
Plastikbeutel	Brand, Wertheim, Deutschland	759705			
Plastikröhrchen 15 ml	Falcon, San Jose, Kalifornien, USA	352096			
Plastikröhrchen 50 ml	Falcon, San Jose, Kalifornien, USA	352070			
Racks für Stickstoff N ₂ Behälter	OmniLab, Bremen, Deutschland	2387501510			
Reaktionsgefäße 1,5 ml PCR Clean	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030 123.301			
Reaktionsgefäße 1,5 ml RNAse DNAse frei	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030121-589			
Reaktionsgefäße 1,5 ml Standard	VWR, Darmstadt, Deutschland	780500			
Reaktionsgefäße 0,5 ml PCR Clean	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030 123.328			
Reaktionsgefäße 0,5 ml RNAse DNAse frei	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030121-570			
Zellkulturplatten 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.1802			
Zellkulturplatten 15 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.1803			
Zellkulturplatten 24-Loch	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.1836			

Tabelle 4:			
Gerät	Hersteller		
Agarose Gel Elektrophoreses System	BioRad, Hercules USA		
Analysenwaage Kern ABS/ ABJ	Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland		
Autoklav Automat AV/ Labor mit Druckkühlung	Webeco, Lübeck, Deutschland		
Beta- Zähler 1409	Wallac, Turku, Finnland		
BioPhotometer mit Thermodrucker	Eppendorf, Hamburg, Deutschland		
Brutschrank Heracell 150	Heraeus, Kendro, Deutschland		

Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland			
Froster 250- CR	Kirsch, Offenburg, Deutschland			
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Gerlingen- Schillerhöhe, Deutschland			
Gefrierschrank -80°C Deep Freezer 8514	ilShin Europe, Niederlande			
Gelgießvorrichtung Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, USA			
Gelelektrophorese Mini-Protean 3	BioRad, Hercules, USA			
Magnetrührer Ikamag KMO 2 basic	IKA, Staufen, Deutschland			
MasterCycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland			
MasterCycler ep realplex für qRT-PCR	Eppendorf, Hamburg, Deutschland			
Mikroskop Fluovert	Leitz, Wetzlar, Deutschland			
Netzgerät für Elektrophorese E-802	Consort, Tunrhout, Belgien			
pH-Meter Seven Easy	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz			
Pipetten diverse Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland			
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland			
Schüttelgerät ReaxTop	Heidolph, Schwabach, Deutschland			
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland			
Stickstoffbehälter GT11	Nunc, Langenselbold, Deutschland			
Stickstoffbehälter LD50	Taylor-Wharton, Theodore, USA			
UV-Lampe	Vilber Lourmat, Marne, Frankreich			
Wasserbad WB/OB 14	Memmert, Schwabach, Deutschland			
Zentrifuge Fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland			
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus, Hanau, Deutschland			

Zentrifuge miniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland			
Zentrifuge Universal 320R	Hettich Deutschla	Lab Ind	Technology,	Tuttlingen,

3. Ergebnisse

3.1 Der OTR wird von braunen Fettzellen exprimiert und erreicht eine vergleichbare Genexpression wie der Vasopressin 1α-Rezeptor

Wir erfassten die quantitative mRNA Expression des OTR und verglichen diese mit der Expression der Vasopressin Rezeptoren, Vasopressin-1a-Rezeptor (V1a-R), Vasopressin 1 β -Rezeptor (V1 β -R) und Vasopressin 2-Rezeptor (V2-R) in isolierten murinen braunen Fettzellen. Die mRNA Expression wurde während der Differenzierungsphase an Tag zwei und vier sowie nach Vollendung der Differenzierung an Tag sechs bestimmt. Das verwendete Differenzierungsmedium wurde zweitägig gewechselt. Die folgende Abbildung 1 zeigt die Mittelwerte ± SEM von jeweils 6 unabhängigen Experimenten bezogen auf einen gemittelten Basalwert des OTR an Tag zwei. Der OTR wurde während der Differenzierungsphase hochreguliert, erreichte die maximale Expression an Tag vier (Abbildung 1, A) und erreichte nahezu das Expressionsniveau des V1α-R (Abbildung 1, B). Die V1ß-R Expression war zehnfach geringer verglichen zum V1a-R und erreichte das Maximum an Tag sechs. Im Einklang mit der weithin bekannten physiologischen Rolle in der Niere wurde der V2-R in unserem Zellmodel nahezu nicht exprimiert (Abbildung 1, B).



Abbildung 1, A und B: Exprimierung des Oxytocin-Rezeptors (A) und der Vasopressin-Rezeptoren (B) während der Differenzierung von murinen braunen Präadipozyten und in ausdifferenzierten adulten murinen braunen Adipozyten.

Während der oben dargestellten Differenzierungsphase wurden braune Präadipozyten an Tag 2 und 4 und adulte ausdifferenzierte braune Adipozyten an Tag 6 lysiert. Oxytocin-Rezeptor (OTR), Vasopressin 1 α -Rezeptor (V1a-R), Vasopressin 1 β -Rezeptor (V1 β -R) und Vasopressin 2-Rezeptor (V2-R) Genexpressionslevel wurden mittels qRT-PCR wie in Methoden und Materialien beschrieben bestimmt. Der OTR wird während der Differenzierung der Präadipozyten und in adulten differenzierten Adipozyten exprimiert (A) und erreicht eine vergleichbare Genexpression wie der V1a-R. Demgegenüber ist der V1 β -R und der V2-R nahezu abwesend im vorliegenden Zellmodel (B). *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. SYBR, SYBR Green I; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.
3.2 Akute Stimulation mit OT aktiviert die p44/p42 Mitogen acivated protein Kinase in differenzierten adulten murinen braunen Adipozyten

Mitogen activated protein Kinasen (MAP-Kinasen) modulieren intrazelluläre Signalwege, welche entscheidende Rollen in vielen essenziellen zellulären Prozessen wie der Proliferation und Differenzierung, der Genregulation, der Insulinwirkung und der für braunes Fettgewebe spezifischen Thermogenese aufweisen. Im Folgenden wurde der dosis- und zeitabhängige Einfluss von OT auf die p44/p42 MAP Kinase ermittelt.

Differenzierte adulte murine braune Adipozyten wurden in aufsteigender Dosierung mit bis zu 100 nM OT für 5 Minuten inkubiert. Die Behandlung mit einer Konzentration von 100nM induzierte eine hochsignifikante Phosphorylierung der p44/p42 MAP Kinase auf 188% bezogen auf den gemittelten Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe. Niedrigere Konzentrationen hatten keine signifikante Wirkung auf die Phosphorylierung der p44/p42 MAP Kinase (Abbildung 2). Da niedrigere OT Konzentrationen zu keiner Phosphoylierung der p44/p42 MAP Kinase führten, ist eine schwellenwertabhängige Phosphorylierung der p44/p42 MAP Kinase in adulten, ausdifferenzierten braunen Adipozyten durch OT anzunehmen

Die Inkubation von adulten differenzierten braunen Adipozyten mit OT in einer Konzentration von 100nM resultierte in einer zeitabhängigen hochsignifikanten Stimulation der p44/p42 MAP Kinase. Die induzierte Aktivierung von OT zeigte einen schnellen Beginn und war zwischen der zweiten und zehnten Minute mit einer maximalen Phosphorylierung von 203% bezogen auf den gemittelten Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe am stärksten ausgeprägt. (Abbildung 3)



Abbildung 2: Phosphorylierung der p44/p42 Mitogen acivated protein Kinase (MAP Kinase) unter dosisabhängiger Stimulation mit Oxytocin (OT) in adulten ausdifferenzierten murinen braunen Adipozyten

Adulte ausdifferenzierte braune Adipozyten wurden für 5 Minuten mit OT in den dargestellten Konzentrationen inkubiert, indem es Starving Medium hinzugefügt wurde. Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der p44/p42 MAP Kinase Phosphorylierung mit zugehöriger ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Zusätzlich ist ein repräsentativer Immunoblot abgebildet. OT führt in einer Konzentration von 100 nM zu einer hochsignifikanten Phosphorylierung der p44/p42 MAP Kinase verglichen mit einem gemittelten Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe. **p<0,01 wird als hoch signifikant betrachtet. nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.



Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der p44/p42 Mitogen acivated protein Kinase (MAP Kinase) Phosphorylierung unter Stimulation mit Oxytocin (OT) in ausdifferenzierten murinen adulten braunen Adipozyten

Adulte ausdifferenzierte braune Adipozyten wurden für die Inkubationszeit von 2, 5, 10, 20 und 40 Minuten (Min) mit OT in einer Konzentration von 100 nM behandelt, indem es Starving Medium hinzugefügt wurde. Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der p44/p42 MAP Kinase Phosphorylierung mit zugehöriger ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Zusätzlich ist ein repräsentativer Immunoblot abgebildet. OT führt in einer Konzentration von 100 nM zu einer zeitabhängigen hochsignifikanten Phosphorylierung der p44/p42 MAP Kinase verglichen mit einem gemittelten Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe.. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. **p<0,01 wird als hoch signifikant betrachtet. nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

3.3 Akute Stimulation mit OT hat keinen Effekt auf die STAT3 Signalgebung

Signaltransducer and aktivator der transcription (STAT) sind kritische Komponenten von Zytokin-Rezeptor-Systemen, Wachstum, Differenzierung und Pathogenresistenz. Untersucht wurde STAT3 an der Phosphorylierungsstelle Tyr701.

Adulte, ausdifferenzierte braune Adipozyten wurden über einen Zeitraum von 2, 5, 10, 20 und 40 Minuten mit OT in einer Konzentration von 100 nM inkubiert, indem es Starving Medium hinzugefügt wurde. Aus der unbehandelten adipozytären Kontrollgruppe wurden die Basalwerte bestimmt. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine

OT vermittelte Regulation der STAT3 Phosphorylierungsstelle in adulten ausdifferenzierten braunen Adipozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4).



Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) Phosphorylierung unter Stimulation mit Oxytocin (OT) in ausdifferenzierten murinen adulten braunen Adipozyten

Adulte murine ausdifferenzierte braune Adipozyten wurden mit OT in einer Konzentration von 100 nM für 2, 5, 10, 20 und 40 Minuten (Min) behandelt, indem es Starving Medium hinzugefügt wurde. Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der STAT3(Tyr701) Phosphorylierung mit zugehöriger ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Zusätzlich ist ein repräsentativer Immunoblot abgebildet. OT führt in einer Konzentration von 100 nM nicht zur Phosphorylierung von STAT3 verglichen mit dem gemittelten Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe. nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

3.4 Akute Stimulation mit OT induziert die Ghrelin Genexpression in adulten differenzierten murinen braunen Adipozyten, wohingegen eine chronische Inkubation mit OT zu einer erhöhten Genexpression von Leptin führt

Die vorliegende Arbeit untersuchte den direkten Einfluss von OT auf wichtige Regulatoren der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase. Hierfür wurde die mRNA Genexpression des Peptidhormons Ghrelin sowie des Proteohormons Leptin nach akuter sowie nach chronischer Stimulation bestimmt.

Um die akute Wirkung von OT auf die Ghrelin und Leptin Genexpression zu ermitteln, wurden adulte ausdifferenzierte murine braune Adipozyten mit OT in einer Konzentration von 100nM für 1, 2 und 8 Stunden inkubiert. Unbehandelte Adipozyten wurden als Kontrollgruppe verwendet. Ein signifikanter Anstieg der Ghrelin Genexpression konnte auf 220% nach einer Stunde im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 5, A). Eine Regulation der Leptin Genexpression konnte unter akuter Stimulation nicht nachgewiesen werden (Abbildung 5, B).

Nachfolgend wurden braune Präadipozyten täglich mit 1µM OT während ihrer sechstägigen Differenzierungsphase behandelt. Eine chronische Inkubation mit OT führte zu einer signifikanten Hochregulation der Leptin Genexpression auf 322% verglichen zum Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 6, A). Eine Modulation der Ghrelin Genexpression konnte unter chronischen Stimulationsbedingungen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 6, B).



Abbildung 5, A und B: Zeitlicher Verlauf der Ghrelin und Leptin Genexpression unter akuter Stimulation mit Oxytocin (OT) in ausdifferenzierten murinen adulten braunen Adipozyten

Adulte murine ausdifferenzierte braune Adipozyten wurden mit OT in einer Konzentration von 100 nM für 1, 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden (nur 2 und 8 Stunden dargestellt) behandelt, indem es Starving Medium hinzugefügt wurde. Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der Ghrelin und Leptin mRNA Genexpression mit zugehöriger ± SEM aus 8-18 (A) und 5-10 (B) unabhängigen Experimenten. OT induziert die Ghrelin mRNA Expression in adulten, ausdifferenzierten braunen Adipozyten verglichen mit dem gemittelten Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure, nM, Nanomolar; h, Stunden; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.



Abbildung 6, A und B: Ghrelin und Leptin Genexpression nach chronischer Inkubation mit Oxytocin (OT) während der Differenzierung von murinen braunen Präadipozyten zu ausdifferenzierten adulten braunen Adipozyten

Murine braune Präadipozyten wurden während der Differenzierungsphase alle 24 Stunden mit OT in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert, indem es Differenzierungsmedium hinzugefügt wurde. Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der Ghrelin und Leptin mRNA Genexpression mit zugehöriger ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. Chronische OT Behandlung von braunen Adipozyten induziert die Leptin mRNA Expression verglichen zum gemittelten Basalwert der unbehandelten adipozytären Kontrollgruppe. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure; nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

3.5 Chronische OT Behandlung reduziert die Uncoupling Protein-1 Genexpression

Braunes Fettgewebe ist weitgehend für die zitterfreie Wärmeproduktion bekannt. Die funktionelle Kopplung zwischen dem mitochondrialen Protonengradienten und der ATP-Synthese wird durch das Transmembranprotein UCP-1 aufgehoben. Im Folgenden wurde der Einfluss von OT auf die UCP-1 Genexpression ermittelt.

Akute Exponierung von differenzierten adulten braunen Adipozyten mit OT in einer Konzentration von 100 nM ergab innerhalb von 24 Stunden keinen signifikanten Einfluss auf die Uncoupling Protein-1 (UCP-1) mRNA Regulation (Abbildung 7, A). Demgegenüber erbrachte die tägliche Inkubation mit OT in einer Konzentration von 1 μ M während einer sechstägigen Differenzierungsphase eine signifikante Dämpfung der UCP-1 Genexpression auf 79% bezogen auf den gemittelten Basalwert der unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 7, B).



Abbildung 7, A und B: Uncoupling Protein-1 (UCP-1) Genexpression nach akuter Stimulation mit Oxytocin in ausdifferenzierten murinen adulten braunen Adipozyten (A) und UCP-1 Genexpression nach chronischer Inkubation mit Oxytocin (OT) während der Differenzierung von murinen braunen Präadipozyten zu ausdifferenzierten adulten braunen Adipozyten (B)

Differenzierte adulte braune Adipozyten wurden für 1, 2, 4, 8, 16 oder 24 Stunden (nur 2 und 8 Stunden dargestellt) mit OT in einer Konzentration von 100 nM inkubiert, indem es Starving Medium hinzugefügt wurde (A). Nachfolgend wurden braune Adipozyten während der sechstägigen Differenzierungsphase alle 24 Stunden mit OT in einer Konzentration von 1 µM behandelt (B). Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der Ghrelin mRNA Genexpression mit zugehöriger ± SEM aus 12-20 unabhängigen Experimenten (A) und aus 3 unabhängigen Experimenten (B). Bei chronischer Inkubation mit OT konnte eine signifikante Reduktion der UCP-1 Genexpression im Vergleich zum gemittelten Basalwert der unbehandelten adipozytären Kontrollgruppe nachgewiesen werden (B). *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure; nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

3.6 Chronische OT Behandlung reduziert die Isoprenalin induzierte Glukoseaufnahme in ausdifferenzierten braunen Adipozyten, wohingegen die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme unverändert bleibt

Nach dem Nachweis einer verminderten UCP-1 Expression unter chronischer OT Inkubation, führten wir einen Glukoseaufnahme-Assay unter Insulin- und ßadrenerger Stimulation durch. Hierfür wurden braune Präadipozyten während der Differenzierungsphase mit 1 µM OT inkubiert. Unbehandelte Adipozyten dienten als Kontrollgruppe. Die Stimulation mit Isoprenalin führte in unbehandelten Adipozyten zu einer signifikanten Induktion der Glukoseaufnahme auf 131% bezogen auf eine nicht stimulierte unbehandelte Kontrollgruppe. Die Stimulation mit Isoprenalin führte in OT behandelten Adipozyten zu einer signifikant verminderten Steigerung der Glukoseaufnahme auf 104% bezogen auf eine nicht stimulierte unbehandelte Kontrollgruppe (Abbildung 8, A). Demgegenüber konnten keine signifikanten Differenzen in der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme identifiziert werden (Abbildung 8, B).



Abbildung 8, A und B: Glukoseaufnahme von unbehandelten und während der Differenzierungsperiode chronisch mit Oxytocin (OT) behandelten murinen Adipozyten mit anschließender akuter Stimulation mit Isoprenalin (A) oder Insulin (B)

Braune Präadipozyten wurden während der Differenzierungsphase alle 24 Stunden mit OT in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert, indem es Differenzierungsmedium hinzugefügt wurde. Die Glukoseaufnahme wurde bei OT behandelten und unbehandelten ausdifferenzierten Adipozyten mit Isoprenalin (Abbildung A) und mit Insulin (Abbildung B) stimuliert. Die im weiteren Versuchsablauf entstehende Biolumineszens wurde als relative Lichteinheiten detektiert. Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der Glukoseaufnahme mit zugehöriger ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Stimulation mit Isoprenalin (Iso) führt in Oxytocin (OT) behandelten Adipozyten zu einer hochsignifikant verminderten Glukoseaufnahme im Vergleich zur nicht mit OT behandelten und mit Isoprenalin stimulierten Kontrollgruppe. Signifikante Differenzen in der Insulin (Ins) induzierten Glukoseaufnahme konnten nicht ermittelt werden **p<0,01 wird als hoch signifikant betrachtet. nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

3.7 Chronische Inkubation mit OT verändert nicht die Differenzierung, Fettspeicherung oder die Gesamtzellzahl

In der Folge analysierten wir den molekularen Phänotyp von chronisch mit OT behandelten – und von unbehandelten ausdifferenzierten murinen braunen Adipozyten nach einer sechstägigen Differenzierungsperiode durch Quantifizierung etablierter Expressionsmarker des braunen Fettgewebes. Ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Fettzellen konnte für determinierende Transkriptionsfaktoren des braunen Fettgewebes pr domain containing 16 (prdm16) und peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1 alpha (pgc-1a), dem mitochondrialen Protein der Atmungskette cytochrome C oxidase subunit 7A1 (cox7a1), dem Fetttröpfchen und Apoptose regulierenden Protein cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha subunit-like effector A (cidea), dem Zellwachstum limitierenden und braunes Fettgewebe determinierenden prepro-retinoblastoma-associated protein (pRb), dem im Fettgewebe entzündungshemmenden Gen otopetrin 1 (otop1) sowie dem Differenzierungsmarker für weißes Fettgewebe forkhead box C2 (foxc2) nicht nachgewiesen werden (Abbildung 9, A). Um zusätzlich eine signifikante Zellzahldifferenz auszuschließen, wurde die beta actin Genexpression zwischen unbehandelten und mit OT behandelten ausdifferenzierten adulten braunen Adipozyten bestimmt (Abbildung 9, B).

Abschließend wurden zur objektiven Ermittlung von potentiellen morphologischen Differenzen einer chronischen OT Inkubation die Morphologie, die Fettspeicherung und –akkumulation während und am Ende der Differenzierungsphase durch eine Oil Red O Färbungen (Abbildung 10) sowie mikroskopisch mittels Lipid Droplet Assay (Abbildung 11, Abbildung 12, A und B) analysiert. Eine chronische Behandlung mit OT über eine neuntägige Differenzierungsperiode führte nicht zu einer veränderten Speicherung von intrazellulären Triglyceriden. Insgesamt konnte abschließend kein Hinweis für ein Defizit der Reifung oder Differenzierung der chronisch mit OT behandelten braunen Adipozyten festgestellt werden.



Abbildung 9, A und B:Genexpressionsanalyse von Differenzierung und Fettspeicherung regulierenden - (A) und Gesamtzellzahl abhängigen Genen (B) nach chronischer Inkubation mit Oxytocin während der Differenzierungsperiode von murinen braunen Adipozyten

Murine braune Präadipozyten wurden täglich mit OT in einer Konzentration von 1 µM für eine Differenzierungsperiode von 6 Tagen behandelt, indem OT dem verwendeten Differenzierungsmedium alle 24 Stunden zugefügt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der mRNA Genexpression der untersuchten Differenzierungsmarker aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum gemittelten Basalwert der unbehandelten adipozytären Kontrollgruppe konnte nicht nachgewiesen werden. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure; nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean; gRT-PCR, guantitative Real-time Polymerase Chain Reaction.



Abbildung 10: Makroskopischer Einfluss von Oxytocin (OT) auf die Lipidanreicherung und Zellmorphologie brauner Präadipozyten während der Differenzierung zu adulten braunen Adipozyten

Während dem neuntägigen Differenzierungszeitraum zu adulten murinen braunen Adipozyten wurden Präadipozyten täglich mit Differenzierungsmedium und der Zugabe von OT in einer Endkonzentration von 1 μ M inkubiert (obere Bildreihe). OT unbehandelte Präadipozyten wurden als Kontrollgruppe definiert (untere Bildreihe). Die intrazelluläre Trigylceridanreicherung wurde mit der fettspezifischen Oil Red O Färbung an den Tagen 0, 6 und 9 visualisiert. Repräsentative eingescannte Zellkulturplatten der an den Tagen 0, 6 und 9 durchgeführten Experimente sind abgebildet. Eine makroskopische Veränderung der Lipidspeicherung und -anreicherung konnte während des Differenzierungsprozesses nicht festgestellt werden. nM, Nanomolar.



Abbildung 11: Mikroskopische Auswertung der Lipidakkumulation nach chronischer Inkubation mit Oxytocin (OT) während der Differenzierungsperiode von murinen braunen Adipozyten

Murine braune Präadipozyten wurden während der Differenzierung täglich mit OT in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert. Am 6 Tag nach Differenzierungsinduktion wurden hochauflösende Bildaufnahmen von ausdifferenzierten braunen Adipozyten mittels Durchlicht-Polarisationsmikroskop angefertigt. Die registrierten Lipidvakuolen wurden in Größenkategorien jeweils in Abständen von 50 μ m² aufgetrennt. Die dargestellte Grafik zeigt Balkendiagramme der einzelnen Größenkategorien aus 3 unabhängigen mikroskopischen Bildern mit den zugehörigen Mittelwerten ± SEM. Unbehandelte ausdifferenzierte Adipozyten wurden als Kontrollgruppe verwendet. Eine signifikante Veränderung der Lipidakkumulation in adulten murinen braunen Adipozyten konnte nicht nachgewiesen werden. SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.



Abbildung 12, A und B: Mikroskopische Auswertung der Lipidakkumulation nach chronischer Inkubation mit Oxytocin (OT) während der Differenzierungsperiode von murinen braunen Adipozyten

Murine braune Präadipozyten wurden während der Differenzierung täglich mit OT in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert. Am sechsten Tag nach Differenzierungsinduktion wurden hochauflösende Bildaufnahmen von ausdifferenzierten braunen Adipozyten mittels Durchlicht-Polarisationsmikroskop angefertigt. Die registrierten Lipidvakuolen wurden in Größenkategorien jeweils in Abständen von 50 μ m² aufgetrennt (siehe Abbildung 11). Die nun dargestellte Grafik zeigt Balkendiagramme der Lipidvakuolen, aufgeteilt in Gesamtzahl, mittlerer Größe und der Standardabweichung der mittleren Größe aus 3 unabhängigen mikroskopischen Bildern mit den zugehörigen Mittelwerten ± SEM (Abbildung 12 A). Die Größe von 0,87 μ m² wurde hierbei jeweils als Pixel erfasst (Abbildung 12 A). Abbildung 12 B zeigt ein beispielhaftes Bild nach 40-facher mikroskopischer Registrierung und Analyse der Lipidvakuolen. Unbehandelte ausdifferenzierte Adipozyten wurden als Kontrollgruppe verwendet. Eine signifikante Veränderung der Lipidvakumulation in braunen adulten Adipozyten konnte nicht nachgewiesen werden. SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean; px, Pixel; um2, μ m².

3.8 Die akute und chronische Stimulation mit OT führt zu verschiedenen Entzündungsprofilen in braunen Adipozyten

Die vorliegende Arbeit untersuchte zudem den direkten Einfluss von OT auf Entzündungsmediatoren in adulten differenzierten murinen braunen Adipozyten. Die Behandlung von OT in einer Konzentration von 100 nM führte zu einer signifikanten Hochregulation der monocyte chemoattractand protein-1 (MCP-1) und Interleukin-6 (IL-6) Genexpression. Für MCP-1 konnte eine maximale Erhöhung der mRNA Expression auf 174% nach 0,5 Stunden und für IL-6 eine maximale Steigerung der mRNA Expression auf 223% nach 2 Stunden Inkubation mit OT nachgewiesen werden (Abbildung 13, A und B). Interessanterweise führte OT bei MCP-1 zu einem bidirektionalen Verlauf mit signifikanter Reduktion auf 84% nach 8 Stunden (Abbildung 13, B). Darüber hinaus konnte für tumor necrosis factor α (TNF- α), einem weiteren zentralen Zytokin der Entzündungsreaktion, eine signifikante Reduktion auf 52% nach zweistündiger Inkubation mit OT in differenzierten braunen adulten Adipozyten nachgewiesen werden (Abbildung 13, C).

Nach Erfassung der akuten Effekte von OT auf die lokale Entzündungsreaktion wurden braune Präadipozyten während ihrer Differenzierung täglich mit OT in einer Konzentration von 1 μ M behandelt. Nach chronischer Stimulation mit OT konnte keine Regulation der MCP-1 und IL-6 mRNA Expression observiert werden (Daten nicht abgebildet). Allerdings zeigte sich eine signifikante Reduktion der TNF- α mRNA Expression auf 72% bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe (Abbildung 14)



Abbildung 13, A, B und C: Genexpression von Entzündungsmediatoren nach akuter Stimulation mit Oxytocin in ausdifferenzierten murinen adulten braunen Adipozyten

Adulte, ausdifferenzierte murine braune Adipozyten wurden mit OT in einer Konzentration von 100 nM für 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden (h) inkubiert (nur 2 und 8 Stunden Wert abgebildet). Dargestellt sind die prozentualen Anstiege der Interleukin-6 (IL-6) (A), der Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (B) und der akuten Tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA Genexpressionen mit zugehöriger ± SEM aus 5 (A, C) und 5-10 (B) unabhängigen Experimenten. Eine akute Regulation von IL-6, MCP-1 und TNF- α konnte im vorliegenden Zellmodel nachgewiesen werden. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure; nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean; qRT-PCR, quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction.



Abbildung 14: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) Genexpression nach chronischer Inkubation mit Oxytocin (OT) während der Differenzierung von murinen braunen Präadipozyten zu ausdifferenzierten adulten braunen Adipozyten

Präadipozyten wurden während der Differenzierungsphase zu adulten braunen Adipozyten über einen Zeitraum von 6 Tagen chronisch mit OT in einer Konzentration von 1 µM inkubiert. Hierfür wurde das täglich erneuerte Differenzierungsmedium OT beigefügt. Die dargestellte Grafik zeigt ein Balkendiagramm aus 3 unabhängigen Experimenten mit den zugehörigen Mittelwerten ± SEM der Tumor necrosis factor- α (TNF- α) Genexpression bezogen auf einen gemittelten Basalwert aus der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine signifikante Reduktion der TNF- α Genexpression konnte unter chronischer Behandlung mit OT nachgewiesen werden. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure; nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

3.9 Die durch OT induzierte Reduktion der TNF-α mRNA Expression ist p44/p42 MAP Kinase abhängig

Da die vorliegende Studie zum Einen die Aktivierung der p44/p42 MAP Kinase und zum Anderen die Regulation von Hauptmediatoren der Entzündungsreaktion durch OT nachweisen konnte, wurde im Weiteren die mögliche Vermittlung durch die p44/p42 MAP Kinase auf die TNF-α mRNA Reduktion und die IL-6 mRNA Hochregulation untersucht. Hierfür wurden ausdifferenzierte murine adulte braune Adipozyten jeweils mit (+) oder ohne (-) OT in einer Konzentration von 100 nM für 2 Stunden behandelt. Zusätzlich wurden die Adipozyten entweder mit (+) oder ohne (-) den spezifischen MEK 1/2-Kinase-Inhibitor PD98059 in einer Konzentration von 50 µM eine Stunde vor der OT Gabe inkubiert Die pharmakologische Hemmung der p44/p42 MAP Kinase durch den MEK 1/2 Hemmer PD98059 hob die durch OT vermittelte Reduktion der TNF-a mRNA Expression auf (Abbildung 15, A), wohingegen die OT abhängige Aktivierung von IL-6 nicht durch Vorbehandlung mit PD98059 verhindert werden konnte (Abbildung 15, B). Die alleinige Inkubation von differenzierten adulten braunen Adipozyten mit PD98059 ergab keinen signifikanten Einfluss auf die basale Genexpression. Diese Daten beweisen, dass die OT zurechenbare Hemmung von TNF-α durch die p44/p42 MAP Kinase vermittelt wird, während die Aktivierung von IL-6 nicht mit der p44/p42 MAP Kinase assoziiert ist.



Abbildung 15, A und B: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) - (A) und Interleukin-6 (IL-6) mRNA Expression (B) nach akuter Stimulation mit Oxytocin (OT) mit und ohne Vorbehandlung des spezifischen MEK 1/2-Kinase-Inhibitor PD098059 in ausdifferenzierten murinen braunen adulten Adipozyten

Differenzierte adulte braune Adipozyten wurden jeweils mit (+) oder ohne (-) OT in einer Konzentration von 100 nM für 2 Stunden behandelt. Zusätzlich wurden die Adipozyten entweder mit (+) oder ohne (-) den spezifischen MEK 1/2-Kinase-Inhibitor PD98059 in einer Konzentration von 50 μ M eine Stunde vor der OT Gabe inkubiert. Die dargestellte Grafik zeigt ein Balkendiagramm aus 5 unabhängigen Experimenten mit den zugehörigen Mittelwerten ± SEM. Aus der unbehandelten adipozytären Kontrollgruppe wurden die Basalwerte bestimmt. Die OT induzierte Reduktion der TNF- α Genexpression wird durch PD098059 aufgehoben. Unter PD098059 konnte weiterhin ein signifikanter Anstieg der II-6 Genexpression nachgewiesen werden. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. *p<0,01 wird als hochsignifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure; μ M, Mikromolar; nM, Nanomolar; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

3.10 Die akute und chronische Stimulation mit OT führt zu keiner Modulation der Angiotensinogen mRNA Genexpression

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist von zentraler Bedeutung für die Regulierung des Blutdrucks und der Homöostase von Wasser und Natrium. Angiotensinogen (AGT) ist die einzige Vorstufe aller Angiotensin-Peptide.

Akute Exponierung von differenzierten adulten braunen Adipozyten mit OT in einer Konzentration von 100nM ergab innerhalb von 24 Stunden keinen signifikanten Einfluss auf die Angiotensinogen mRNA Regulation bezogen auf eine unbehandelte Kontrollgruppe (Abbildung 16, A). Ebenfalls erbrachte die tägliche Inkubation mit OT in einer Konzentration von 1 µM während einer sechstägigen Differenzierungsphase keine signifikante Modulation der Angiotensinogen mRNA Genexpression bezogen auf eine unbehandelte Kontrollgruppe (Abbildung 16, B).



Abbildung 16, A und B: Angiotensinogen (AGT) Genexpression nach akuter Stimulation mit Oxytocin in ausdifferenzierten murinen adulten braunen Adipozyten (A) und AGT Genexpression nach chronischer Inkubation mit Oxytocin (OT) während der Differenzierung von murinen braunen Präadipozyten zu ausdifferenzierten adulten braunen Adipozyten (B)

Adulte ausdifferenzierte braune Adipozyten wurden mit OT in einer Konzentration von 100 nM für 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden behandelt, indem es Starving Medium hinzugefügt wurde. Die dargestellte Grafik zeigt die prozentuale Veränderung der Angiotensinogen mRNA Expression aus 5 unabhängigen Experimenten mit zugehöriger \pm SEM (A). Braune Präadipozyten wurden während der Differenzierungsphase alle 24 Stunden mit OT in einer Konzentration von 1 µM inkubiert, indem es Differenzierungsmedium hinzugefügt wurde. Die dargestellte Grafik zeigt die prozentuale Veränderung der Angiotensinogen mRNA Expression aus 3 unabhängigen Experimenten mit den zugehörigen \pm SEM (B). Weder die akute noch die chronische Behandlung mit OT führt in braunen Adipozyten im Vergleich zur unbehandelten adipozytären Kontrollgruppe zu einer Modulation der Angiotensinogen mRNA-Genexpression. *p<0,05 wird als signifikant betrachtet. mRNA, messenger Ribonukleinsäure, nM, Nanomolar; h, Stunden; SEM, Standardabweichung/ standard error of the mean.

4. Diskussion

In der vorliegenden Forschungsarbeit wird der Einfluss des appetithemmenden Peptidhormons OT auf die intrazelluläre Signalkaskade gezeigt, der OTR Status analysiert und schließlich die Wirkung von OT auf die endokrine und entzündungsmodulierende Genexpression in braunen Adipozyten erforscht.

Wie bereits dargestellt, führt OT in einer Konzentration von 100 nM bis 1 µM zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der p44/p42 MAP Kinase. Die so ermittelten und im weiteren Verlauf verwendeten Konzentrationen betragen 100,76 1007.6 (OT Summenformel: pg/ml und pg/ml $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2;$ Stoffmengenkonzentration 1007,1604 g/mol; SI-Einheit mol/m³) und entsprechen in etwa der physiologisch vorkommenden Konzentration in postpartalen weiblichen Mäusen (Lopatina, Inzhutova et al. 2011) und circa der Konzentration in Mäusen und Ratten nach nasaler und peripherer Applikation von OT (Neumann, Maloumby et al. 2013). Bekannt ist, dass die p44/p42 MAP Kinase ein wichtiges intrazelluläres Signalmolekül im Endometrium des Uterus (Strakova, Copland et al. 1998) und im Hypothalamus (van den Burg and Neumann 2011) ist. Darüber hinaus verbessert die systemische Gabe von OT die Regenerationsfähigkeit der Muskulatur, indem gealterte Muskelstammzellen verstärkt zur Proliferation durch den MAP Kinasen Signalweg aktiviert werden (Elabd, Cousin et al. 2014). Im Gegensatz dazu zeigte sich keine signifikante Modulation der p44/p42 MAP Kinase im linken Ventrikel von OT behandelten Ratten (Ondrejcakova, Barancik et al. 2012). Gemäß den mir aktuell vorliegenden Fachkenntnissen ist dies die erste Forschungsarbeit, die eine Stimulation des wachstumsfördernden Signalmoleküls p44/p42 MAP Kinase durch OT in Adipozyten nachweist. MAP Kinasen modulieren intrazelluläre Signalwege, welche entscheidende Rollen in vielen essenziellen zellulären Prozessen wie der Proliferation und Differenzierung, der Genregulation, der Insulinwirkung und der für braunes Fettgewebe spezifischen Thermogenese aufweisen (Gehart, Kumpf et al. 2010). Daher scheint es plausibel, eine wichtige funktionelle Konsequenz der OT induzierten Aktivierung der p44/p42 MAP Kinase in Adipozyten anzunehmen. Zu beachten ist darüber hinaus, dass die Stimulation der p44/p42 MAP Kinase akut erfolgte, sodass ein Rezeptorvermittelter Mechanismus durch OT in braunen Adipozyten angenommen werden kann.

STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) ist ein Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren. Es wird von vielen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, einschließlich IL-6 (Zhong, Wen et al. 1994), MCP-1 (Mellado, Rodriguez-Frade et al. 1998), TNF- α (Miscia, Marchisio et al. 2002), epidermalem Wachstumsfaktor, Plättchen-Wachstumsfaktor (Vignais, Sadowski et al. 1996) und von onkogenen Proteinen (Nagpal, Mishra et al. 2002, Ahsan, Aziz et al. 2005), aktiviert. Die Aktivierung wird hierbei durch Phosphorylierung von Tyrosin 701 durch Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen reguliert (Aggarwal, Kunnumakkara et al. 2009) und führt zu dessen Dimerisierung, Translokation in den Zellkern und DNA-Bindung. Als Ergebnis werden Gene, die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren, exprimiert. STAT3 ist damit ein entscheidendes intrazelluläres Signalmolekül in einer Vielzahl von verschiedenen Zielgeweben (Akira, Nishio et al. 1994, Yoshida, Hanada et al. 2002, Pfitzner, Kliem et al. 2004). Es wurde zudem in viszeralem Fettgewebe als wichtiger Mediator der Entzündungsregulation mit assoziierter Glukosetoleranzstörung und verminderter Insulinsensitivität identifiziert (Priceman, Kujawski et al. 2013). Jüngste Forschungsergebnisse ergaben, dass in einem isolierten Rattenherzmodell die kardioprotektiven Effekte von OT mit Abnahme des Apoptose-Index während der frühen Reperfusionsphase nach Myokardinfarkt durch die Aktivierung des SAFE-Signalweges durch die JAK/ STAT3-Signalkaskade vermittelt wird. Die kardioprotektive Wirkung konnte zudem durch Tyrphostin AG490, einem JAK/STAT3-Inhibitor, aufgehoben werden (Polshekan, Khori et al. 2018). In der aktuellen Forschungsarbeit sollte deshalb der Einfluss von OT auf den STAT3 Signalweg in braunen Adipozyten ermittelt werden. Hinweise auf eine Aktivierung des STAT3 Signalweges mit Phosphorylierung von Tyrosin701 ergaben sich jedoch nicht. Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse sind daher nicht auf die STAT3 Signalkaskade zurückzuführen.

Der OTR ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Seine Bindungseigenschaften und sein struktureller Aufbau wurden in isolierten epididymalen Adipozyten

(Boland and Goren 1987) und in gewöhnlichen Adipozyten von Ratten erforscht (Bonne and Cohen 1975). In 3T3-L1 Zellen stieg die mRNA Expression des OTR während der Differenzierungsphase an. In vivo weitet sich die OTR Genexpression während der Adoleszenz auf subkutanes und epididymales Fettgewebe in Mäusen aus. Diese Entwicklung ist vor allem bei Tieren mit fettreicher Ernährung ausgeprägt (Yi, So et al. 2015). Bis zum heutigen Zeitpunkt war nicht bekannt, ob der OTR von braunen Adipozyten exprimiert wird. Daher sollte zunächst das Ausmaß der OTR mRNA Genexpression im verwendeten Zellmodel für braune Adipozyten untersucht werden. Es konnte eine OTR Expression während der Differenzierungsphase in braunen Präadipozyten und in ausdifferenzierten adulten braunen Adipozyten nachgewiesen werden. Um die physiologische Wertigkeit und Signifikanz des Ergebnisses zu gewährleisten, wurde die guantitative mRNA Expression des OTR mit der guantitativen mRNA Expression des V1a-R verglichen. Die biologische Relevanz von Arginin-Vasopressin (AVP) und seines entsprechenden V1-a Rezeptors wurde bereits vor kurzem im verwendeten Zellmodel ermittelt (Kuchler, Perwitz et al. 2010). Im Einklang mit der bekannten Physiologie erreichte die mRNA Expression des V1a-R die gleiche Größe wie die des OTR, wohingegen der V1ß-R und der V2R nahezu fehlend im verwendeten Zellmodel waren.

Nachdem die Relevanz der OTR Expression nahegelegt wurde und OT Applikationen in einigen Studien beim Menschen zu einer signifikanten Reduktion der Körpermasse, gemessen am Body-Mass-Index, geführt haben, sollte der Einfluss von OT auf die Leptin Genexpression analysiert werden (Zhang, Wu et al. 2013). Das Proteohormon Leptin spiegelt als Stellgröße den Körperfettgehalt des Körpers wider und wird hauptsächlich von Adipozyten endokrin sezerniert. OT induzierte Veränderungen des Leptin Signals zum Hypothalamus könnten daher die appetithemmende und gewichtsreduzierende Wirkung von OT erklären. Zu diesem Zweck wurden braune Adipozyten entweder in akuter oder chronischer Art und Weise mit OT behandelt. Es konnte eine signifikante Steigerung der Leptin Genexpression unter chronischer, nicht jedoch unter akuter Stimulation nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer in vivo Forschungsarbeit an Ratten, in welcher eine zweiwöchige subkutane Applikation mit OT zu einer erhöhten Leptin Genexpression sowie einem verminderten Durchmesser von epididymalen Adipozyten führten ohne die absolute Menge des

56

Fettgewebes 2011). zu alterieren (Eckertova, Ondrejcakova et al. Zusammenfassend kann demnach angenommen werden. dass die appetithemmende Wirkung von OT teilweise durch die Steigerung der Leptin Genexpression und Leptin Generierung im Fettgewebe vermittelt wird, da bekannterweise OT zu einer Hemmung von appetitsteigernden NPY/AgRP Nervenzellen im Nucleus arcuatus und zu einer Stimulation von appetithemmenden POMC/CART Nervenzellen im Nucleus paraventrikularis führt.

In den jüngsten Veröffentlichungen konnte eine Verbindung von OT mit der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase dargelegt werden (Klockars, Levine et al. 2015). Folglich wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit die Wirkung von OT auf das appetitregulierende Peptidhormon Ghrelin in braunen Adipozyten untersucht. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die akute Stimulation mit OT zu einer Steigerung der Ghrelin mRNA Expression in braunen Adipozyten führt und dass braunes Fettgewebe einen weiteren Ursprung der Interessanterweise Ghrelinproduktion darstellt. konnte eine weitere Forschungsarbeit eine Steigerung der c-Fos Immunreaktivität in oxytocinergen Nervenzellen des Nucleus paraventrikularis durch intraventrikuläre Applikation von Ghrelin nachweisen (Olszewski, Bomberg et al. 2007). Unser Resultat stimmt zudem mit einer weiteren Veröffentlichung überein, in welcher eine OT abhängige Steigerung der Ghrelin Sekretion in einer Ghrelin produzierenden Zelllinie gefunden wurde (Iwakura, Ariyasu et al. 2011). Darüber hinaus führte die Gabe von OT in vivo zu einer erhöhten Ghrelin mRNA Expression im Magen-Darm-Trakt von Schweinen (Rault, Ferrari et al. 2015). Ein widersprüchliches Ergebnis erbrachte eine in vivo Studie am Menschen. Hier führte die systemische Gabe von OT in gesunden Probanden zu verminderten Ghrelin Serumspiegeln (Vila, Riedl et al. 2009). In diesem Kontext muss jedoch erwähnt werden, dass die Funktion von Ghrelin grundlegend vom Ernährungszustand abhängig ist und dass die Studie im nüchternen Zustand durchgeführt wurde, sodass dies eine potentielle Erklärung für das widersprüchliche Ergebnis darstellt. Zusammenfassend liefert die vorliegende Forschungsarbeit Hinweise für ein durch OT und Ghrelin vermitteltes Feedbacksystem an das ZNS durch das braune Fettgewebe.

Dieses ist weithin für seine besondere Fähigkeit zur zitterfreien Thermogenese bekannt und trägt daher zur Energiehomöostase im Menschen bei (Cypess, Lehman et al. 2009). Da eine Aktivierung der Thermogenese teilweise die gewichtsreduzierende Wirkung von OT erklären würde, wurde im Folgenden der Einfluss von OT auf die UCP-1 Genexpression untersucht. Frühere in vivo Studien an Mäusen konnten zum Einen bereits bei OT Defizienz einen verminderten sympathischen Grundtonus bei gleichzeitig vorliegendem adipösen Phänotyp (Camerino 2009) und zum Anderen bei OTR Defizienz eine gestörte Thermoregulation unter Kälteexposition nachweisen (Kasahara, Takayanagi et al. 2007). Die rostralen Kerngebiete der Raphekerne (RMR) modulieren die sympathisch induzierte Aktivität des braunen Fettgewebes, indem sympathische prämotorische Nervenzellen stimuliert werden (Morrison and Nakamura 2011). Interessanterweise genügte eine Wiederherstellung des OTR in OTR defizienten Mäusen aus, um eine normale thermoregulatorische Funktion zu erzeugen (Kasahara, Sato et al. 2013) und liefert somit Hinweise dafür, dass periphere Gewebe, wie auch das braune Fettgewebe, an der OT-vermittelten Gewichtsreduktion gänzlich unbeteiligt sind. Die UCP-1 mRNA Expression nach Behandlung mit OT wurde bisher jedoch weder in vitro noch in vivo geprüft. Folglich wurden braune Adipozyten entweder in akuter oder chronischer Art und Weise mit OT behandelt. Im Rahmen der akuten Behandlung mit OT konnte keine Regulation der UCP-1 Genexpression nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich erstmalig unter chronischer OT Inkubation eine signifikante Reduktion der UCP-1 mRNA Expression in isolierten braunen Adipozyten. Eine Beteiligung dieser im braunen Fettgewebe nachgewiesenen Prozesse an der OT-vermittelten Modulation der Energiehomöostase ist daher anzunehmen. Hier wäre für zukünftige Forschungen eine funktionelle Analyse der Beeinflussung der thermogenetischen Aktivität (Sauerstoffverbrauch in der Respirometrie) durch OT sinnvoll.

Es ist eine verbreitete Meinung, dass die Wärmeproduktion in braunem Fettgewebe aus der Lipidverbrennung resultiert. Die respiratorischen Quotientenwerte von Tieren in der Kälte weisen jedoch auf eine gemischte Kohlenhydrat- und Fettverbrennung hin. Angesichts der Tatsache, dass fast die

gesamte zusätzliche Hitze in der Kälte von braunem Fettgewebe stammt, muss impliziert werden, dass braunes Fettgewebe auch Kohlenhydrate mit einer hohen Rate verbrennt. In der Tat sind Mitochondrien in braunen Adipozyten in keiner Weise für die Fettsäureverbrennung spezialisiert. Vielmehr ist ihre Fähigkeit, Pyruvat zu verbrennen, mindestens so gut, wenn nicht sogar besser, als ihre Fähigkeit, Fettsäuren zu verbrennen (Shabalina, Jacobsson et al. 2004). Ein Anstieg des freien Fettsäurespiegels im Zytosol ist wahrscheinlich ein notwendiger Schritt für die Aktivierung von UCP1, wenn die Zellen nach der Aktivierung sowohl Kohlenhydrate als auch Lipide verbrennen (Cannon, Shabalina et al. 2006). Dies bedeutet eine hohe Aufnahme von Glukose aus dem Blutkreislauf, wenn braunes Fettgewebe aktiviert wird und dies ist tatsächlich das, was bei Mäusen in der Kälte beobachtet wird (Vallerand, Perusse et al. 1990). Ebenfalls ist dies die Basis für die Identifizierung von braunem Fettgewebe bei erwachsenen Menschen (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007). Die Glukoseaufnahme ist an die Thermogenese gekoppelt, was sich aus der Tatsache ergibt, dass der Noradrenalin-induzierte Anstieg der Glukoseaufnahme bei UCP-1-defizienten Mäusen nicht beobachtet wird (Inokuma, Ogura-Okamatsu et al. 2005). Dies geht mit der Studie von isolierten braunen Adipozyten einher, bei der die Glukoseaufnahme der Thermogenese folgte (Marette and Bukowiecki 1989). Nach dem Nachweis einer verminderten UCP-1 Genexpression unter chronischer OT Inkubation in braunen Adipozyten wurde daher der Einfluss von OT auf die Glukoseaufnahme geprüft. Erstmalig konnte gezeigt werden, dass die ßadrenerge Stimulation mit Isoprenalin in OT behandelten adulten braunen Adipozyten zu einer hochsignifikanten verminderten Glukoseaufnahme im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe führt. Folglich ist dies der erste Hinweis, dass die sympathisch stimulierte thermogenetische Kapazität unter chronischem OT Einfluss in braunen adulten Adipozyten vermindert ist. Signifikante Differenzen in der Insulin induzierten Glukoseaufnahme konnten nicht ermittelt werden. Es ist daher anzunehmen, dass die Insulin vermittelte Lipogenese nicht affektiert wird.

Da Schwankungen der Zelldifferenzierung im chronischen Setting zwischen unbehandelten und mit OT behandelten braunen Adipozyten die bereits dargestellten Ergebnisse mit Reduktion der UCP-1 mRNA - und Steigerung der Leptin mRNA Expression erklären könnten, wurden zum Ausschluss dieser Hypothese der molekulare Phänotyp, die Lipidakkumulation und die Morphologie der am Versuchsende ausgereiften braunen Adipozyten ausführlich bestimmt. Nach Auswertung der Ergebnisse konnte schlussendlich keine Differenz der von braunen Adipozyten spezifischen Differenzierungsmarker, der Lipidakkumulation oder der Morphologie nachgewiesen werden. Das so ermittelte Ergebnis stimmt mit der aktuellen Fachliteratur überein, da bisher keine Hinweise für eine veränderte Differenzierung von weißen oder braunen Adipozyten bekannt sind. Insgesamt sind daher weitere Untersuchungen, vorzugsweise in vivo Studien, über die thermogenetische Kapazität des braunen Fettgewebes und detaillierte Analysen der Leptin Serumspiegel mit Einfluss auf zentral modulierende Kerngebiete im ZNS nach chronischer Behandlung mit OT nötig, um die dargestellten in vitro Ergebnisse weiter zu validieren.

Metabolische Erkrankungen wie Übergewicht und Diabetes werden heutzutage weithin mit einer chronischen Entzündungsreaktion in Verbindung gebracht (Osborn and Olefsky 2012). OT ist diesbezüglich in zahlreiche periphere und zentrale Signalwege involviert (Matsuura, Kawasaki et al. 2015) und moduliert in einem großen Umfang die Entzündungsreaktion in einer großen Vielfalt von Geweben. So konnte nach OT Behandlung zum einen bei der obese Maus (ob/ob Maus), einem etablierten Tiermodel für Diabetes Typ II, eine reduzierte Infiltration des Fettgewebes durch Makrophagen und zum anderen in der Diabetes-Maus (db/db Maus), einem etablierten Tiermodel für vererbte Fettleibigkeit, eine Reduktion der Entzündungsmediatoren bei Kardiomyopathie nachgewiesen werden (Plante, Menaouar et al. 2015). Untersuchungen von ex vivo mit OT behandelten viszeralem Fettgewebe wiesen eine verminderte IL-6 Sekretion im Vergleich zu unbehandeltem viszeralem Fettgewebe nach (Nation, Szeto et al. 2010). Andererseits ist jedoch bekannt, dass OT den NF-kappa beta Signalweg in Amnionzellen und im Myometrium während der Schwangerschaft aktiviert und infolgedessen zu einer Hochregulation von Interleukin-8 und IL-6 führt (Kim, MacIntyre et al. 2015). Bis heute ist aber die durch OT vermittelte Wirkung auf Entzündungsmarker des braunen Fettgewebes unbekannt. Die vorliegende Forschungsarbeit konnte eine durch OT induzierte Stimulation der IL-6

Genexpression, eine Reduktion der TNF-α Genexpression und eine biphasische Modulation der MCP-1 Genexpression nachweisen. Zusammenfassend müssen jedoch weitere Forschungsarbeiten durchgeführt werden, um die Einzelheiten und Umstände der OT vermittelten Wirkung auf die Entzündungsreaktion und die begleitenden metabolischen Implikationen aufzuklären.

Hypertonie ist mit Adipositas und Insulinresistenz assoziiert und ein Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre-Erkrankungen. Epidemiologische Studien berichteten über eine signifikante positive Korrelation zwischen Blutdruck und zirkulierenden Angiotensinogenwerten. Angiotensinogen (AGT) ist das proximale Agens des vasoaktiven Peptids Angiotensin II (AGT II), welches eine Hauptrolle bei der Blutdruckregulation einnimmt. Es ist allgemein anerkannt, dass Hepatozyten die primäre Quelle für systemische AGT-Konzentrationen darstellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Fettgewebe eine wichtige extrahepatische Quelle von AGT ist (Cassis, Lynch et al. 1988, Frederich, Kahn et al. 1992) und jede Komponente besitzt, die für die Produktion von ANG II aus AGT erforderlich ist (Karlsson, Lindell et al. 1998, Pinterova, Krizanova et al. 2000). Somit ist es naheliegend, dass von Adipozyten stammendes AGT die AGT Plasma Konzentration und die Blutdruckkontrolle beeinflussen könnte. Folgend konnte bei übergewichtigen Personen eine positive Korrelation der adipozytären AGT Sekretion mit dem Body-Mass-Index und dem Blutdruck erfasst werden (Yasue, Masuzaki et al. 2010). Zudem konnte ein verminderter systolischer Blutdruck bei Mäusen mit AGT defizienten Adipozyten nachgewiesen werden (Yiannikouris, Karounos et al. 2012). Bis heute ist aber die durch OT vermittelte Wirkung auf die AGT mRNA Expression des braunen Fettgewebes unbekannt. Hinweise auf eine Modulation der AGT Genexpression konnten in der vorliegenden Forschungsarbeit weder unter akuter noch unter chronischer Stimulation nachgewiesen werden. Das so ermittelte Ergebnis stimmt mit der aktuellen Fachliteratur überein, da bisher keine Hinweise für eine veränderte RAAS-Aktivität in OT defizienten Mäusen nachgewiesen wurde (Rigatto, Puryear et al. 2003).

5. Zusammenfassung

Die funktionelle Wechselwirkung zwischen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und peripheren Geweben ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase. Erst jüngst wurde Fettgewebe als wichtige Quelle für endokrine Hormone identifiziert. So spiegelt die adipozytäre Leptin-Freisetzung die Höhe der Körperlipidmasse wider und führt zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und einem reduzierten Körpergewicht durch Bindung an seinen Rezeptor im Hypothalamus. Dieser Mechanismus ist im diabetischen und/ oder fettleibigen Zustand gestört und wird als Leptinresistenz bezeichnet. Es gibt vermehrt wissenschaftliche Belege dafür, dass Oxytocin (OT) sogar ein negatives Energieungleichgewicht induziert, wenn eine Leptinresistenz vorliegt. Bisher ist nicht ausreichend geklärt, ob zentrale und/ oder periphere OT Mechanismen primär bei der Vermittlung dieser anorexigenen Effekte verantwortlich sind. Mit dem Nachweis einer signifikanten OT-Rezeptor-Expression in murinen braunen Adipozyten untersuchten wir im Folgenden die direkten Effekte von OT auf die intrazelluläre Signalkaskade, Differenzierung sowie endokrine und metabolische Funktion im vorliegenden murinen Zellmodel. Die akute Stimulation mit OT führte in ausdifferenzierten Adipozyten zu einer dosis- [max. 1,7-fach, 100 nM, P <0,05] und zeitabhängigen [max. 2-fach, 5 min, 100nM, P <0,01] Phosphorylierung der p44 / p42 Mitogen-activated Protein Kinase (MAP Kinase) während die Phosphorylierung von anderen wichtigen Zwischenprodukten der Januskinase / Signaltransducer and aktivator der transcription (JAK/STAT) -Signalkaskade nicht nachgewiesen werden konnte. Anschließend wurde die Leptin- und Ghrelin-Genexpression nach akuter und chronischer OT-Inkubation gemessen. Hierbei konnte ein Anstieg der Leptin-mRNA-Expression nach chronischer OT-Stimulation [max. 3-fach, 1µM, p <0,01] ermittelt werden. Folglich kann angenommen werden, dass die appetithemmende Wirkung von OT teilweise durch die Steigerung der Leptin Genexpression und Leptin Generierung im Fettgewebe vermittelt wird, da bekannterweise OT zu einer Hemmung von appetitsteigernden Nervenzellen im Nucleus arcuatus und zu einer Stimulation von appetithemmenden Nervenzellen im Nucleus paraventrikularis führt. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die akute Stimulation mit OT zu einer Steigerung der Ghrelin mRNA Expression [max. 1,5-fach, 1 Stunde, 100nM p <0,05] in braunen Adipozyten führt und dass braunes Fettgewebe einen 62

Ghrelinproduktion weiteren Ursprung der darstellt. Die vorliegende Forschungsarbeit liefert demnach Hinweise für ein durch OT, Leptin und Ghrelin vermitteltes Feedbacksystem an das ZNS durch das braune Fettgewebe. Braunes Fettgewebe ist weithin für seine besondere Fähigkeit zur zitterfreien Thermogenese bekannt und trägt daher zur Energiehomöostase im Menschen bei. Infolgedessen wurde der Einfluss von OT auf die Uncoupling Protein 1 (UCP-1) Genexpression erfasst. Unter chronischer OT-Inkubation konnte eine signifikante Hemmung der UCP-1 Genexpression [0,79-fach, 1µM, p <0,05] nachgewiesen werden, während eine akute Stimulation keine modulierenden Effekte erbrachte. Darüber hinaus zeigte sich in OT behandelten adulten braunen Adipozyten eine hochsignifikant verminderte Glukoseaufnahme unter ß-adrengerger Stimulation Isoprenalin. Signifikante Differenzen der Insulin mit in induzierten Glukoseaufnahme konnten diesbezüglich jedoch nicht ermittelt werden, sodass anzunehmen ist, dass die Insulin vermittelte Lipogenese nicht affektiert wird. Da diese Erkenntnisse durch eine OT vermittelte Veränderung der Adipozyten-Differenzierung zu erklären wären, wurde im Folgenden der molekulare Phänotyp, die Lipidakkumulation und die Morphologie der am Versuchsende ausgereiften Adipozyten ausführlich bestimmt. Eine Differenz zu braunen mit OT unbehandelten Adipozyten konnte nicht ermittelt werden. Da Diabetes und Übergewicht mit einer chronischen Entzündungsreaktion assoziiert sind, wurden folglich die durch OT vermittelten Effekte auf bedeutende Entzündungsmediatoren ermittelt. Akute Stimulation mit OT führte zu einer Erhöhung der Interleukin-6-[max. 2.2-fach, 2 Stunden, 100 nM, p <0,01], zu einer biphasischen Monocyte chemoattractant Protein-1-[max. 1,5-fach, 0,5 Stunden, 100nM, p <0,01; min. 0,85-fach, 8 Stunden, p <0,01] und zu einer signifikanten Inhibierung der Tumornekrosefaktor alpha (TNFalpha)-mRNA-Expression [min. 0,52, 2 Stunden, 100 nM, p <0,01] in der Akutphase. Unter chronischer Inkubation konnte ebenfalls eine Reduktion der TNFalpha-Genexpression nachgewiesen werden [0.72- fach, 1µM, p <0,01]. Letzteres scheint hierbei durch die p44 / p42 MAP-Kinaseabhängig zu sein, da eine Inhibierung dieser Signalkaskade die inhibitorische stellt Wirkung von OT aufhob. Zusammengefasst die beschriebene Forschungsarbeit wichtige neue Erkenntnisse zum Verständnis der OT vermittelten Funktion in murinen braunen Adipozyten dar und fördert das Verständnis für die vorteilhafte metabolische Funktion.

6. Literaturverzeichnis:

- Aggarwal, B. B., A. B. Kunnumakkara, K. B. Harikumar, S. R. Gupta, S. T. Tharakan, C. Koca, S. Dey and B. Sung (2009). "Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?" <u>Ann N Y Acad Sci</u> **1171**: 59-76.
- Ahsan, H., M. H. Aziz and N. Ahmad (2005). "Ultraviolet B exposure activates Stat3 signaling via phosphorylation at tyrosine705 in skin of SKH1 hairless mouse: a target for the management of skin cancer?" <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> 333: 241-246.
- Akira, S., Y. Nishio, M. Inoue, X. J. Wang, S. Wei, T. Matsusaka, K. Yoshida, T. Sudo, M. Naruto and T. Kishimoto (1994). "Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway." <u>Cell</u> 77: 63-71.
- Altirriba, J., A. L. Poher, A. Caillon, D. Arsenijevic, C. Veyrat-Durebex, J. Lyautey, A. Dulloo and F. Rohner-Jeanrenaud (2014). "Divergent effects of oxytocin treatment of obese diabetic mice on adiposity and diabetes." <u>Endocrinology</u> 155: 4189-4201.
- Altirriba, J., A. L. Poher and F. Rohner-Jeanrenaud (2015). "Chronic Oxytocin Administration as a Treatment Against Impaired Leptin Signaling or Leptin Resistance in Obesity." <u>Front Endocrinol (Lausanne)</u> 6: 1-7.
- Barengolts, E. (2016). "Oxytocin An emerging treatment for obesity and dysglycemia: Review of randomized controlled trials and cohort studies." <u>Endocr Pract</u> 22: 885-894.
- Binay, C., C. Paketci, S. Guzel and N. Samanci (2017). "Serum Irisin and Oxytocin Levels as Predictors of Metabolic Parameters in Obese Children." J <u>Clin Res Pediatr Endocrinol</u> 9: 124-131.
- Boland, D. and H. J. Goren (1987). "Binding and structural properties of oxytocin receptors in isolated rat epididymal adipocytes." <u>Regul Pept</u> 18: 7-18.

- Bonne, D. and P. Cohen (1975). "Characterization of oxytocin receptors on isolated rat fat cells." <u>Eur J Biochem</u> 56: 295-303.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." <u>Anal Biochem</u> 72: 248-254.
- Briggs, D. I., P. J. Enriori, M. B. Lemus, M. A. Cowley and Z. B. Andrews (2010). "Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons." <u>Endocrinology</u> 151: 4745-4755.
- Burger, K. S. and L. A. Berner (2014). "A functional neuroimaging review of obesity, appetitive hormones and ingestive behavior." <u>Physiol Behav</u> 136: 121-127.
- Camerino, C. (2009). "Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocindeficient mice." <u>Obesity (Silver Spring)</u> 17: 980-984.
- Cannon, B., I. G. Shabalina, T. V. Kramarova, N. Petrovic and J. Nedergaard (2006). "Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not?" <u>Biochim Biophys Acta</u> **1757**: 449-458.
- Cassis, L. A., K. R. Lynch and M. J. Peach (1988). "Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta." <u>Circ Res</u> 62: 1259-1262.
- 16. Cypess, A. M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A. B. Goldfine, F. C. Kuo, E. L. Palmer, Y. H. Tseng, A. Doria, G. M. Kolodny and C. R. Kahn (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." <u>N Engl J Med</u> **360**: 1509-1517.
- Dale, H. H. (1906). "On some physiological actions of ergot." <u>J Physiol</u> 34: 163-206.
- Deblon, N., C. Veyrat-Durebex, L. Bourgoin, A. Caillon, A. L. Bussier, S. Petrosino, F. Piscitelli, J. J. Legros, V. Geenen, M. Foti, W. Wahli, V. Di Marzo and F. Rohner-Jeanrenaud (2011). "Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats." <u>PLoS One</u> 6: 1-13.

- Devost, D., P. Wrzal and H. H. Zingg (2008). "Oxytocin receptor signalling." <u>Prog Brain Res</u> 170: 167-176.
- 20. Dickson, S. L., E. Egecioglu, S. Landgren, K. P. Skibicka, J. A. Engel and E. Jerlhag (2011). "The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs." <u>Mol Cell Endocrinol</u> **340**: 80-87.
- 21. Du Vigneaud, V., C. Ressler and S. Trippett (1953). "The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin." <u>J Biol Chem</u>
 205: 949-957.
- 22. Eagle, H. (1955). "Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture." <u>Science</u> **122**: 501-514.
- 23. Eckertova, M., M. Ondrejcakova, K. Krskova, S. Zorad and D. Jezova (2011). "Subchronic treatment of rats with oxytocin results in improved adipocyte differentiation and increased gene expression of factors involved in adipogenesis." <u>Br J Pharmacol</u> **162**: 452-463.
- 24. Elabd, C., W. Cousin, P. Upadhyayula, R. Y. Chen, M. S. Chooljian, J. Li, S. Kung, K. P. Jiang and I. M. Conboy (2014). "Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration." <u>Nat Commun</u> **5**: 1-11.
- Fasshauer, M., J. Klein, K. M. Kriauciunas, K. Ueki, M. Benito and C. R. Kahn (2001). "Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes." <u>Mol Cell Biol</u> **21**: 319-329.
- 26. Fasshauer, M., J. Klein, K. Ueki, K. M. Kriauciunas, M. Benito, M. F. White and C. R. Kahn (2000). "Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes." J <u>Biol Chem</u> 275: 25494-25501.
- 27. Frederich, R. C., Jr., B. B. Kahn, M. J. Peach and J. S. Flier (1992). "Tissuespecific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue." <u>Hypertension</u> **19**: 339-344.
- 28. Gehart, H., S. Kumpf, A. Ittner and R. Ricci (2010). "MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness?" <u>EMBO Rep</u> 11: 834-840.
- 29. Gutkowska, J., Y. Aliou, J. L. Lavoie, K. Gaab, M. Jankowski and T. L. Broderick (2016). "Oxytocin decreases diurnal and nocturnal arterial blood pressure in the conscious unrestrained spontaneously hypertensive rat." <u>Pathophysiology</u> 23: 111-121.
- 30. Halaas, J. L., C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein, D. A. Denton and J. M. Friedman (1997). "Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 94: 8878-8883.
- 31. Inokuma, K., Y. Ogura-Okamatsu, C. Toda, K. Kimura, H. Yamashita and M. Saito (2005). "Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue." <u>Diabetes</u> 54: 1385-1391.
- Iwakura, H., H. Ariyasu, H. Hosoda, G. Yamada, K. Hosoda, K. Nakao, K. Kangawa and T. Akamizu (2011). "Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 in vitro." <u>Endocrinology</u> 152: 2619-2625.
- 33. Jones, P. M. and I. C. Robinson (1982). "Differential clearance of neurophysin and neurohypophysial peptides from the cerebrospinal fluid in conscious guinea pigs." <u>Neuroendocrinology</u> 34: 297-302.
- 34. Jung, C. H. and M. S. Kim (2013). "Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity." <u>Arch Pharm Res</u> 36: 201-207.
- 35. Karlsson, C., K. Lindell, M. Ottosson, L. Sjostrom, B. Carlsson and L. M. Carlsson (1998). "Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II." <u>J Clin Endocrinol Metab</u> 83: 3925-3929.
- 36. Kasahara, Y., K. Sato, Y. Takayanagi, H. Mizukami, K. Ozawa, S. Hidema, K. H. So, T. Kawada, N. Inoue, I. Ikeda, S. G. Roh, K. Itoi and K. Nishimori (2013). "Oxytocin receptor in the hypothalamus is sufficient to rescue normal

thermoregulatory function in male oxytocin receptor knockout mice." Endocrinology **154**: 4305-4315.

- 37. Kasahara, Y., Y. Takayanagi, T. Kawada, K. Itoi and K. Nishimori (2007).
 "Impaired thermoregulatory ability of oxytocin-deficient mice during coldexposure." <u>Biosci Biotechnol Biochem</u> **71**: 3122-3126.
- 38. Kim, S. H., D. A. MacIntyre, M. Firmino Da Silva, A. M. Blanks, Y. S. Lee, S. Thornton, P. R. Bennett and V. Terzidou (2015). "Oxytocin activates NF-kappaB-mediated inflammatory pathways in human gestational tissues." <u>Mol Cell Endocrinol</u> 403: 64-77.
- 39. Klein, J., M. Fasshauer, M. Benito and C. R. Kahn (2000). "Insulin and the beta3-adrenoceptor differentially regulate uncoupling protein-1 expression." <u>Mol Endocrinol</u> 14: 764-773.
- 40. Klein, J., M. Fasshauer, M. Ito, B. B. Lowell, M. Benito and C. R. Kahn (1999).
 "beta(3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes." <u>J Biol Chem</u> 274: 34795-34802.
- 41. Klein, J., M. Fasshauer, H. H. Klein, M. Benito and C. R. Kahn (2002). "Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action." <u>Bioessays</u> 24: 382-388.
- 42. Klein, J., N. Perwitz, D. Kraus and M. Fasshauer (2006). "Adipose tissue as source and target for novel therapies." <u>Trends Endocrinol Metab</u> **17**: 26-32.
- 43. Klement, J., V. Ott, K. Rapp, S. Brede, F. Piccinini, C. Cobelli, H. Lehnert and M. Hallschmid (2017). "Oxytocin Improves beta-Cell Responsivity and Glucose Tolerance in Healthy Men." <u>Diabetes</u> 66: 264-271.
- 44. Klockars, A., A. S. Levine and P. K. Olszewski (2015). "Central oxytocin and food intake: focus on macronutrient-driven reward." <u>Front Endocrinol</u> (Lausanne) 6: 1-8.

- 45. Kraus, D., M. Fasshauer, V. Ott, B. Meier, M. Jost, H. H. Klein and J. Klein (2002). "Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes." <u>J Endocrinol</u> **175**: 185-191.
- 46. Kuchler, S., N. Perwitz, R. R. Schick, J. Klein and S. Westphal (2010).
 "Arginine-vasopressin directly promotes a thermogenic and pro-inflammatory adipokine expression profile in brown adipocytes." <u>Regul Pept</u> 164: 126-132.
- 47. Kutt, H. and T. T. Tsaltas (1959). "Staining properties of oil red O and a method of partial purification of the commercial product." <u>Clin Chem</u> **5**: 149-160.
- 48. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**: 680-685.
- 49. Lawson, E. A., D. A. Marengi, R. L. DeSanti, T. M. Holmes, D. A. Schoenfeld and C. J. Tolley (2015). "Oxytocin reduces caloric intake in men." <u>Obesity</u> (<u>Silver Spring</u>) 23: 950-956.
- 50. Lopatina, O., A. Inzhutova, Y. A. Pichugina, H. Okamoto, A. B. Salmina and H. Higashida (2011). "Reproductive experience affects parental retrieval behaviour associated with increased plasma oxytocin levels in wild-type and CD38-knockout mice." J Neuroendocrinol 23: 1125-1133.
- 51. Maizel, J. V., Jr. (1966). "Acrylamide-gel electrophorograms by mechanical fractionation: radioactive adenovirus proteins." <u>Science</u> **151**: 988-990.
- 52. Marette, A. and L. J. Bukowiecki (1989). "Stimulation of glucose transport by insulin and norepinephrine in isolated rat brown adipocytes." <u>Am J Physiol</u> 257: 714-721.
- 53. Matsuura, T., M. Kawasaki, H. Hashimoto, T. Ishikura, M. Yoshimura, J. I. Ohkubo, T. Maruyama, Y. Motojima, K. Sabanai, T. Mori, H. Ohnishi, A. Sakai and Y. Ueta (2015). "Fluorescent Visualisation of Oxytocin in the Hypothalamoneurohypophysial/-spinal Pathways After Chronic Inflammation in Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Transgenic Rats." <u>J Neuroendocrinol</u> 27: 636-646.

- 54. Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. Aragay, G. del Real, A. M. Martin, A. J. Vila-Coro, A. Serrano, F. Mayor, Jr. and A. C. Martinez (1998). "The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor." <u>J Immunol</u> 161: 805-813.
- 55. Meyer, C., M. J. Freund-Mercier, Y. Guerne and P. Richard (1987).
 "Relationship between oxytocin release and amplitude of oxytocin cell neurosecretory bursts during suckling in the rat." <u>J Endocrinol</u> **114**: 263-270.
- 56. Miscia, S., M. Marchisio, A. Grilli, V. Di Valerio, L. Centurione, G. Sabatino, F. Garaci, G. Zauli, E. Bonvini and A. Di Baldassarre (2002). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells." Cell Growth Differ **13**: 13-18.
- 57. Morrison, S. F. and K. Nakamura (2011). "Central neural pathways for thermoregulation." <u>Front Biosci (Landmark Ed)</u> **16**: 74-104.
- 58. Morton, G. J., B. S. Thatcher, R. D. Reidelberger, K. Ogimoto, T. Wolden-Hanson, D. G. Baskin, M. W. Schwartz and J. E. Blevins (2012). "Peripheral oxytocin suppresses food intake and causes weight loss in diet-induced obese rats." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **302**: 134-144.
- 59. Muchmore, D. B., S. A. Little and C. de Haen (1981). "A dual mechanism of action of ocytocin in rat epididymal fat cells." <u>J Biol Chem</u> **256**: 365-372.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986).
 "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." <u>Cold Spring Harb Symp Quant Biol</u> **51**: 263-273.
- 61. Nagpal, J. K., R. Mishra and B. R. Das (2002). "Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis." <u>Cancer</u> 94: 2393-2400.
- 62. Nation, D. A., A. Szeto, A. J. Mendez, L. G. Brooks, J. Zaias, E. E. Herderick, J. Gonzales, C. M. Noller, N. Schneiderman and P. M. McCabe (2010).

"Oxytocin attenuates atherosclerosis and adipose tissue inflammation in socially isolated ApoE-/- mice." <u>Psychosom Med</u> **72**: 376-382.

- 63. Nedergaard, J., T. Bengtsson and B. Cannon (2007). "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans." <u>Am J Physiol Endocrinol</u> <u>Metab</u> 293: 444-452.
- Neumann, I. D., R. Maloumby, D. I. Beiderbeck, M. Lukas and R. Landgraf (2013). "Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice." <u>Psychoneuroendocrinology</u> 38: 1985-1993.
- Olson, B. R., M. D. Drutarosky, M. S. Chow, V. J. Hruby, E. M. Stricker and J. G. Verbalis (1991). "Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats." <u>Peptides</u> **12**: 113-118.
- 66. Olszewski, P. K., E. M. Bomberg, A. Martell, M. K. Grace and A. S. Levine (2007). "Intraventricular ghrelin activates oxytocin neurons: implications in feeding behavior." <u>Neuroreport</u> **18**: 499-503.
- Ondrejcakova, M., M. Barancik, M. Bartekova, T. Ravingerova and D. Jezova (2012). "Prolonged oxytocin treatment in rats affects intracellular signaling and induces myocardial protection against infarction." <u>Gen Physiol Biophys</u> 31: 261-270.
- 68. Osborn, O. and J. M. Olefsky (2012). "The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease." <u>Nat Med</u> 18: 363-374.
- 69. Ott, V., M. Fasshauer, A. Dalski, H. H. Klein and J. Klein (2002). "Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis." <u>J Endocrinol</u> **173**: 1-8.
- 70. Ott, V., M. Fasshauer, A. Dalski, B. Meier, N. Perwitz, H. H. Klein, M. Tschop and J. Klein (2002). "Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression." <u>Horm Metab Res</u> 34: 640-645.
- 71. Ott, V., G. Finlayson, H. Lehnert, B. Heitmann, M. Heinrichs, J. Born and M. Hallschmid (2013). "Oxytocin reduces reward-driven food intake in humans." <u>Diabetes</u> 62: 3418-3425.

- 72. Petersson, M., P. Alster, T. Lundeberg and K. Uvnas-Moberg (1996). "Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats." <u>Physiol Behav</u> 60: 1311-1315.
- 73. Petersson, M., T. Lundeberg and K. Uvnas-Moberg (1997). "Oxytocin decreases blood pressure in male but not in female spontaneously hypertensive rats." <u>J Auton Nerv Syst</u> 66: 15-18.
- 74. Petersson, M. and K. Uvnas-Moberg (2008). "Postnatal oxytocin treatment of spontaneously hypertensive male rats decreases blood pressure and body weight in adulthood." <u>Neurosci Lett</u> 440: 166-169.
- 75. Pfitzner, E., S. Kliem, D. Baus and C. M. Litterst (2004). "The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases." <u>Curr Pharm Des</u> **10**: 2839-2850.
- 76. Pinterova, L., O. Krizanova and S. Zorad (2000). "Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system." <u>Gen Physiol Biophys</u> **19**: 329-334.
- 77. Plante, E., A. Menaouar, B. A. Danalache, D. Yip, T. L. Broderick, J. L. Chiasson, M. Jankowski and J. Gutkowska (2015). "Oxytocin treatment prevents the cardiomyopathy observed in obese diabetic male db/db mice." <u>Endocrinology</u> **156**: 1416-1428.
- 78. Polshekan, M., V. Khori, A. M. Alizadeh, M. Ghayour-Mobarhan, M. Saeidi, Y. Jand, M. Rajaei, G. Farnoosh and K. Jamialahmadi (2018). "The SAFE pathway is involved in the postconditioning mechanism of oxytocin in isolated rat heart." <u>Peptides</u>: 1-29.
- 79. Priceman, S. J., M. Kujawski, S. Shen, G. A. Cherryholmes, H. Lee, C. Zhang, L. Kruper, J. Mortimer, R. Jove, A. D. Riggs and H. Yu (2013). "Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **110**: 13079-13084.
- 80. Qian, W., T. Zhu, B. Tang, S. Yu, H. Hu, W. Sun, R. Pan, J. Wang, D. Wang, L. Yang, C. Mao, L. Zhou and G. Yuan (2014). "Decreased circulating levels of

oxytocin in obesity and newly diagnosed type 2 diabetic patients." <u>J Clin</u> <u>Endocrinol Metab</u> **99**: 4683-4689.

- 81. Rault, J. L., J. Ferrari, J. R. Pluske and F. R. Dunshea (2015). "Neonatal oxytocin administration and supplemental milk ameliorate the weaning transition and alter hormonal expression in the gastrointestinal tract in pigs." <u>Domest Anim Endocrinol</u> **51**: 19-26.
- 82. Raymond, S. and L. Weintraub (1959). "Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis." <u>Science</u> **130**: 711.
- 83. Renaud, L. P. and C. W. Bourque (1991). "Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin." <u>Prog Neurobiol</u> **36**: 131-169.
- 84. Rigatto, K., R. Puryear, I. Bernatova and M. Morris (2003). "Salt appetite and the renin-angiotensin system: effect of oxytocin deficiency." <u>Hypertension</u> 42: 793-797.
- 85. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." <u>Science</u> 239: 487-491.
- 86. Sapan, C. V., R. L. Lundblad and N. C. Price (1999). "Colorimetric protein assay techniques." <u>Biotechnol Appl Biochem</u> **29**: 99-108.
- 87. Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." <u>Nature</u> **404**: 661-671.
- 88. Seeley, R. J., G. van Dijk, L. A. Campfield, F. J. Smith, P. Burn, J. A. Nelligan, S. M. Bell, D. G. Baskin, S. C. Woods and M. W. Schwartz (1996).
 "Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats." <u>Horm Metab Res</u> 28: 664-668.
- 89. Shabalina, I. G., A. Jacobsson, B. Cannon and J. Nedergaard (2004). "Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids." <u>J Biol Chem</u> 279: 38236-38248.

- 90. Smithies, O. (1955). "Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults." <u>Biochem J</u> **61**: 629-641.
- 91. Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." <u>J Mol Biol</u> **98**: 503-517.
- 92. Strakova, Z., J. A. Copland, S. J. Lolait and M. S. Soloff (1998). "ERK2 mediates oxytocin-stimulated PGE2 synthesis." <u>Am J Physiol</u> 274: 634-641.
- 93. Takayanagi, Y., Y. Kasahara, T. Onaka, N. Takahashi, T. Kawada and K. Nishimori (2008). "Oxytocin receptor-deficient mice developed late-onset obesity." <u>Neuroreport</u> 19: 951-955.
- 94. Thienel, M., A. Fritsche, M. Heinrichs, A. Peter, M. Ewers, H. Lehnert, J. Born and M. Hallschmid (2016). "Oxytocin's inhibitory effect on food intake is stronger in obese than normal-weight men." <u>Int J Obes (Lond)</u> 40: 1707-1714.
- 95. Tiselius, A. (1937). "A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures." <u>Transactions of the Faraday Society</u> **33**: 524-531.
- 96. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 76: 4350-4354.
- 97. Truchan, B., P. Taylor, H. J. Goren, K. Lederis, M. D. Hollenberg and T. Okabe (1987). "Basal, oxytocin-, and insulin-stimulated glucose oxidation in human endometrium." <u>Can J Physiol Pharmacol</u> 65: 323-327.
- 98. Vallerand, A. L., F. Perusse and L. J. Bukowiecki (1990). "Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues." <u>Am J Physiol</u> 259(5): 1043-1049.
- 99. van den Burg, E. H. and I. D. Neumann (2011). "Bridging the gap between GPCR activation and behaviour: oxytocin and prolactin signalling in the hypothalamus." <u>J Mol Neurosci</u> **43**: 200-208.
- 100. Vicennati, V., S. Garelli, E. Rinaldi, G. Di Dalmazi, U. Pagotto and R. Pasquali (2014). "Cross-talk between adipose tissue and the HPA axis in

obesity and overt hypercortisolemic states." <u>Horm Mol Biol Clin Investig</u> **17**: 63-77.

- Vignais, M. L., H. B. Sadowski, D. Watling, N. C. Rogers and M. Gilman (1996). "Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins." <u>Mol Cell Biol</u> **16**: 1759-1769.
- 102. Vila, G., M. Riedl, M. Resl, A. J. van der Lely, L. J. Hofland, M. Clodi and A. Luger (2009). "Systemic administration of oxytocin reduces basal and lipopolysaccharide-induced ghrelin levels in healthy men." <u>J Endocrinol</u> 203: 175-179.
- 103. Wheeler, E., N. Huang, E. G. Bochukova, J. M. Keogh, S. Lindsay, S. Garg, E. Henning, H. Blackburn, R. J. Loos, N. J. Wareham, S. O'Rahilly, M. E. Hurles, I. Barroso and I. S. Farooqi (2013). "Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity." <u>Nat Genet</u> **45**: 513-517.
- 104. Yasue, S., H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, T. Tanaka, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki and K. Nakao (2010). "Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy." <u>Am J Hypertens</u> 23: 425-431.
- 105. Yi, K. J., K. H. So, Y. Hata, Y. Suzuki, D. Kato, K. Watanabe, H. Aso, Y. Kasahara, K. Nishimori, C. Chen, K. Katoh and S. G. Roh (2015). "The regulation of oxytocin receptor gene expression during adipogenesis." <u>J</u> <u>Neuroendocrinol</u> 27: 335-342.
- 106. Yiannikouris, F., M. Karounos, R. Charnigo, V. L. English, D. L. Rateri, A. Daugherty and L. A. Cassis (2012). "Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice." <u>Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol</u> **302**: 244-251.

- Yoshida, T., T. Hanada, T. Tokuhisa, K. Kosai, M. Sata, M. Kohara and A. Yoshimura (2002). "Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation." <u>J Exp Med</u> **196**: 641-653.
- 108. Zhang, G., H. Bai, H. Zhang, C. Dean, Q. Wu, J. Li, S. Guariglia, Q. Meng and D. Cai (2011). "Neuropeptide exocytosis involving synaptotagmin-4 and oxytocin in hypothalamic programming of body weight and energy balance." <u>Neuron</u> 69: 523-535.
- 109. Zhang, H., C. Wu, Q. Chen, X. Chen, Z. Xu, J. Wu and D. Cai (2013).
 "Treatment of obesity and diabetes using oxytocin or analogs in patients and mouse models." <u>PLoS One</u> 8: 1-11.
- 110. Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6." <u>Science</u> 264: 95-98.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Just für die Möglichkeit dieser interessanten und spannenden wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. Sören Westphal, welcher mich in die Laborarbeit, das wissenschaftliche Arbeiten und Recherchieren mit endloser Geduld eingearbeitet hat. Die konstruktiven Gespräche und Ratschläge haben zum Gelingen dieser Dissertation in hohem Maße beigetragen.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein und seiner Lübecker Arbeitsgruppe für die Nutzung des Zellmodells bedanken.

Zum Schluss möchte ich bei dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner Ehefrau Diana Gründer, bedanken, die mich in allen Lebensphasen jederzeit uneingeschränkt unterstützt hat und mir im richtigen Moment immer wieder Mut zugesprochen hat. Ich danke dir von ganzem Herzen dafür. Erklärung: Teile dieser Dissertation wurden bereits als Abstract veröffentlicht: Gründer M, Küchler S, Gründer D, Westphal S. Oxytocin exhibits Proinflammatory Properties and induces Ghrelin Expression via a mitogen-activated protein Kinase signaling pathway in brown adipocytes. 76th American Diabetes Association (ADA) Scientific Sessions, 2016, New Orleans, USA.