

**Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin**

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. Klaus Michael Debatin

Sektion Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie
Leiter: Prof. Dr. Martin Wabitsch

**Untersuchungen zum Einfluss von Ghrelin
auf die Biologie der Fettzelle**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät Universität Ulm

vorgelegt von
Sulamith Hefele
Kempten

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Wabitsch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion: 13. Januar 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Material und Methoden	5
2.1 Material	5
2.1.1 Biologisches Material	5
2.1.2 Reagenzien	5
2.1.3 Radiochemikalien	6
2.1.4 Enzyme und Kits	6
2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone	6
2.1.6 Primer	7
2.1.7 Sonstige Materialien und Geräte	7
2.2 Methoden	8
2.2.1 Zellkulturmethoden	8
2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	8
2.2.1.2 Kultivierung von SGBS-Zellen	8
2.2.1.4 Adipogene Differenzierung von SGBS Zellen	9
2.2.1.4 Stimulation mit Ghrelin	10
2.2.2 Zellbiologische Methoden	11
2.2.2.1 Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl	11
2.2.2.2 ³ H-Thymidininkorporation	11
2.2.2.3 Bestimmung der Differenzierungsrate	11
2.2.2.4 Red Oil Färbung	12
2.2.3 De novo Lipogenese	12
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	13
2.2.4.1 RNA-Isolierung mittels RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	13
2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung der RNA	13
2.2.4.4 Reverse Transkription	14
2.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.2.4.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	16
2.2.4.7 Real Time quantitative PCR	16
2.2.4.8 Phospho-MAPK Protein Array intrazellulärer MAP-Kinasen	17

2.2.4.9	Westernblot	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Nachweis von Ghrelin und seinen Rezeptoren in SGBS Zellen	19
3.2	Einfluss von Ghrelin auf die Proliferation	20
3.3	Einfluss von Ghrelin auf die adipogene Differenzierung	21
3.4	Einfluss von Ghrelin auf die Lipogenese	23
3.5	Einfluss von Ghrelin auf wichtige Signalmoleküle	24
3.6	Einfluss von Ghrelin auf die endokrine Funktion der Fettzelle	26
4.	Diskussion	29
5.	Zusammenfassung	34
6	Literaturverzeichnis	35
	Danksagung	41

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Akt	Proteinkinase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cpm	counts per minute
CRP	C-reaktives Protein
Ct-Wert	Cycle Threshold / Schwellenwert-Zyklus
d	day
DTT	Dithiothreitol
D-MEM:F	Zellkulturmedium
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
F	forward
FCS	fetal calf serum
G0	Generationsphase 1
GAPDH/GPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GH	Growth Hormone / Wachstumshormon
GHS-R	Growth-Hormone-Secretagogues-Receptor
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	hour
³ H	Wasserstoff-Isotop
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
Jurkat	T-Zell-Leukämie-Zellen (Mensch)
LC	Lightcycler
MAPK	mitogen-aktivierte-Proteinkinase
Med	Medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaOH	Natriumhydroxid
0F	serumfreies Medium
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)

pH	potential Hydrogenii
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPARgamma	peroxisome proliferator-activated factor gamma
R	reverse
RNA	ribonucleic acid
RNAse	Ribonuklease
RPE	Ribulosephosphat-3-Epimerase
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Sp1	Saure Phosphatase 1
T3	Triiodthyronin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure + EDTA
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus
TBST	Tris-Buffered Saline Tween
3T3-L1	Adipozyten-Zelllinie (Maus)
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U87	Glioblastom-Zelllinie
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Zielsetzung

Ghrelin, das 1999 von Kojima et al. entdeckt wurde (20), ist ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon. Hauptsyntheseort ist die Mukosa des Magenfundus und das Pankreas. Dort wird es von sogenannten X/A-ähnlichen Zellen (X/A-like cells) produziert und in den systemischen Kreislauf sezerniert. Kleinere Mengen werden unter anderem von endokrinen Zellen des übrigen Verdauungstrakts produziert (21). Eine Besonderheit von Ghrelin ist die n-Oktanoylierung an der dritten Aminosäure. Diese Modifikation scheint für die Maximalaktivität von Ghrelin wichtig zu sein (20). Aber auch nicht-modifiziertes Ghrelin findet sich in hoher Konzentration im Kreislauf und wird mit nicht-endokrinen Effekten in Verbindung gebracht. Beim Menschen ist die normale Ghrelinkonzentration des Plasmas für Gesamtghrelin 100-150 fmol/ml und für modifiziertes Ghrelin 10-20 fmol/ml (21).

Ghrelin wirkt über einen 7-transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptor, den Growth-Hormone-Secretagogues-Rezeptor (GHS-R), von dem bisher zwei Subtypen bekannt sind. Der GHS-R 1a ist pharmakologisch aktiv und der wichtigere der beiden. Der GHS-R 1b entsteht durch alternatives Splicing, hat dadurch nur 5 transmembranäre Domänen und ist pharmakologisch inaktiv (21). Inzwischen geht man von einem weiteren, bisher unbekanntem Subtypen aus (22). Hauptexpressionsort des GHS-R ist der Hypothalamus und die Hypophyse. Er konnte jedoch auch in vielen anderen Organen, wie z.B. im Magen, im Herz, in den Nieren, im Pankreas, in Lymphozyten und im Fettgewebe nachgewiesen werden (21).

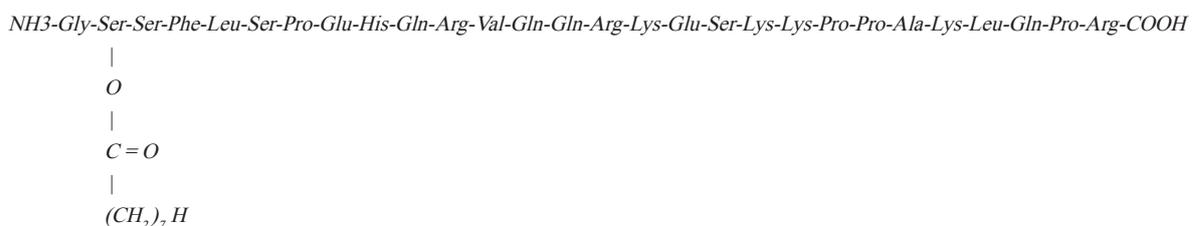


Abb. 1: Strukturformel von humanem Ghrelin

Ghrelin stimuliert die Ausschüttung von Wachstumshormon (Growth Hormon, GH) aus dem Hypophysenvorderlappen (41), das unter anderem das Wachstum und das Wasser-Elektrolyt-Gleichgewicht reguliert. Daher hat Ghrelin seinen Namen, der sich von dem protoindoeuropäischen Wort für Wachstum „ghre“ ableitet. Außerdem stimuliert Ghrelin die Freisetzung von ACTH, Prolaktin und Cortisol und die Magensäureproduktion und die Magen-Darm-Motilität (21).

Neben dem Einfluss auf das Wachstum reguliert Ghrelin die Energiehomöostase und vermittelt das Hungergefühl. Deshalb wird es auch als appetitanregendes- oder Hungerhormon

bezeichnet. Es ist das einzige appetitanregende Hormon. Beobachtungen an Nagern und Menschen zeigten eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme in Folge einer Applikation von Ghrelin (49). Der Ghrelinspiegel unterliegt ständigen Schwankungen (Abb.2). Im Menschen konnte ein präprandial um das zweifach erhöhter Plasmaghrelinspiegel gemessen werden, der nach Nahrungsaufnahme innerhalb einer Stunde wieder sank (7). Der Ghrelinspiegel ist vom aktuellen Ernährungszustand abhängig. Bei Zuständen negativer Energiebilanz (z.B. chronische Belastung, Diät, Anorexia nervosa, Anorexie bei bösartigen Tumorerkrankungen) oder beim Prader-Willi-Syndrom beobachtete man eine erhöhte (29), bei Übergewicht dagegen eine erniedrigte Ghrelinplasmakonzentration (45).

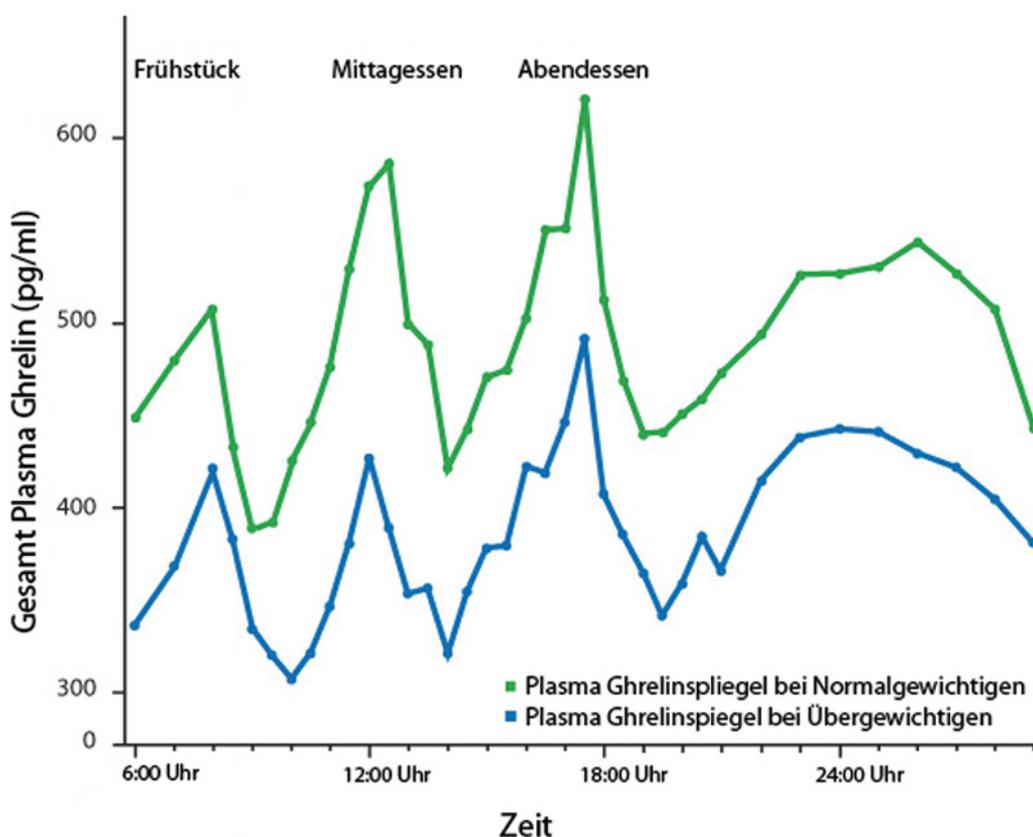


Abb. 2: Schwankungen des Ghrelinspiegels im Tagesverlauf (8)

Neuere Studien an Ratten zeigen, dass Ghrelin in einem neuroendokrinen Regelkreis den Fettzellmetabolismus reguliert. Bei diesen Untersuchungen stimulierte Ghrelin die Glukose-, die Triglyceridaufnahme und die Lipogenese und inhibierte die Lipidoxidation von weißen Fettzellen, unabhängig von seinem Einfluss auf die Nahrungsaufnahme (42). Ebenso gibt es Hinweise, dass Ghrelin direkte Effekte an Fettzellen verursachen kann. Choi et al. zeigten an primären Fettzellen der Ratte unter anderem, dass Ghrelin die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten stimuliert und die Lipolyse inhibiert (6). In einer anderen Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Ghrelin die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme von Rattenfettzellen stimuliert (35).

Ghrelinrezeptorantagonisten werden bereits als mögliche Medikamente in der Adipositas-therapie diskutiert (10). Neue Therapieansätze gewinnen an Wichtigkeit, da es durch eine weltweite Zunahme von Adipositas zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität durch zahlreiche Adipositas-assoziierte Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose oder chronische Inflammation kommt. Vor einem möglichen Einsatz in der Therapie muss die Wirkung von Ghrelin in humanem Fettgewebe besser verstanden werden, wozu diese Arbeit beitragen soll.

Die Größe des Fettgewebes wird durch das Volumen und die Anzahl enthaltener Fettzellen bestimmt. Das Volumen wird durch Lipogenese und Lipolyse reguliert. Die Anzahl an Adipozyten wird zum einen durch die Proliferation von Präadipozyten und die Differenzierung zu Adipozyten, zum anderen durch Entfettung, Dedifferenzierung und apoptotische Vorgänge beeinflusst (Abb. 3). Das Fettgewebe hat neben der Energiespeicherung und –bereitstellung auch endokrine Funktionen (12). Einige der etwa 100 bekannten, als Adipokine bezeichneten Sekretionsprodukte sind Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8), Adiponektin oder auch Steroidhormone. Bei Adipositas ist das Sekretionsmuster der Adipokine verändert. Es findet sich beispielsweise ein erhöhter Plasmaspiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 (5, 14, 34, 35), die so zu der Entstehung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen führen können. So trägt IL-6 durch Interaktion mit dem Insulinrezeptor und Veränderungen im Insulinsignalweg zur Entwicklung von Insulinresistenz bei (1, 37). Adiponektin hingegen, dessen Spiegel bei Adipositas erniedrigt ist (2, 19, 37), wirkt sich durch seine antidiabetische, antiatherogene und antiinflammatorische Wirkung (2, 19, 26, 34, 37, 52) positiv auf den Metabolismus aus. Eine Behandlung mit physiologischen Adiponektinkonzentrationen führte bei insulinresistenten Mäusen zu einer Verbesserung ihrer Insulinresistenz (50), bei Apolipoprotein E-defizienten Mäusen, die besonders anfällig für Atherosklerose sind, hatte sie eine protektive Wirkung (32).

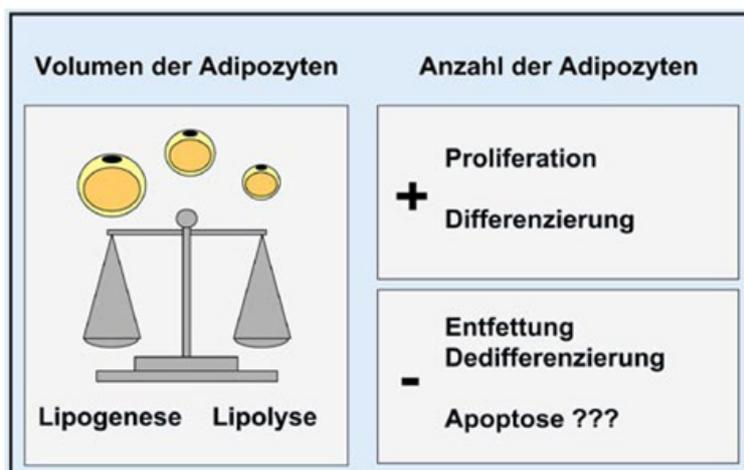


Abb. 3: Mechanismen, die die Größe des Fettgewebes regulieren (11)

In der folgenden Arbeit sollte an humanen SGBS Präadipozyten, die man *in vitro* zu reifen, lipidgefüllten Adipozyten differenzieren kann, der Einfluss von Ghrelin auf die Biologie der Fettzelle untersucht werden.

Zum einen war die Größe und metabolische Funktion, zum anderen die endokrine Funktion des Fettgewebes von Interesse.

Die Anzahl der Fettzellen sollte durch Proliferationsversuche mit humanen SGBS Präadipozyten und Differenzierungsversuche, das Volumen durch Lipogeneseversuche untersucht werden. Die endokrine Funktion von Prä- und Adipozyten sollte anhand der Expressionsmuster ausgewählter Adipokine, wie Adiponektin, IL-6 und IL-8 untersucht werden. Um Effekte von Ghrelin möglicherweise besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Einfluss von Ghrelin auf Signalwege, im speziellen auf den Akt-Signalweg untersucht.

Alle Versuche wurden unter dem Einfluss verschiedener Ghrelinkonzentrationen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Für alle Versuche wurde die etablierte und bereits im Labor verwendete Präadipozyten-Zelllinie SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) verwendet (40).

2.1.2 Reagenzien

Aqua ad injectabile	Braun, Melsungen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Biotin	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
D-MEM:F 12 (1:1) (mit L-Glutamine und 15mM HEPES)	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Ghrelin	Biozol, Eching
Isopropanol	Fluka, Neu-Ulm
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Panthothenat	Sigma, Deisenhofen
PBS Puffer	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin
Red Oil O	Sigma, Deisenhofen
Transferrin, ironpoor	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Gibco Life Tech, Karlsruhe

Trypsin/EDTA	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Radiochemikalien

³ H-Thymidin (spezifische Aktivität 25 Ci/mmol)	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK
¹⁴ C-Glucose	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK

2.1.4 Enzyme und Kits

Superscript™ II RNase H ⁻	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Reverse Transcriptase	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Quiagen, Hilden
RNeasy Lipid Tissue mini Kit	Quiagen, Hilden
Proteome Profiler Array	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt

2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone

Cortisol	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Novo Nordisk, Gentofte, DK
3, 3', 5-Triiodo-L-Thyronin	Sigma, Deisenhofen
Rosiglitazon	Glaxo Smith Kline, Worthing, UK

2.1.6 Primer

Gen	Länge	Oligonukleotidsequenz	Accessions-Nr.
Ghrelin	20	F: 5'-GGT TCA GTA CCA GCA GCA CA-3'	NM_016362
	20	R: 5'-TAT TCG CCT CCT GAG CTT GT-3'	
GHS-R 1a	20	F: 5'-ACC AGA ACC ACA AGC AAA CC-3'	NM_198407
	20	R: 5'-TGA TGG CAG CAC TGA GGT AG-3'	
GHS-R 1b	20	F: 5'-TGG TCA TCT TCG TCA TCT GG-3'	NM_004122
	20	R: 5'-AGA AGG CAC AGG GAG AGG AT-3'	
IL-6	20	F: 5'-TAC CCC CAG GAG AAG ATT CC-3'	NM_000600
	20	R: 5'-TTT TCT GCC AGT GCC TCT TT-3'	
IL-8	23	F: 5'-CTG TGT GAA GGT GCA GTT TTG CC-3'	BT 007067
	23	R: 5'-CTT CTC CAC AAC CCT CTG CAC CC-3'	
Adiponektin	19	F: 5'-CTG GGA GCT GTT CTA CTG C-3'	NM_004797
	19	R: 5'-GTC TCC AAT CCC ACA CTG A-3'	
LC-Adiponektin	18	F: 5'-GGC CGT GAT GGC AGA GAT-3'	
	17	R: 5'-CCT TCA GCC CGG GTA CT-3'	
GAPDH	19	F: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'	NM_002046
	20	R: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	
Sp1	20	F: 5'-CTA CCA GTG GAT CAT CAG GG-3'	NM_138473
	20	R: 5'-CTG ACA ATG GTG CTG CTT GG-3'	

Die verwendeten PCR-Primer (F=forward, R=reverse) wurden von Dr. Pamela Fischer-Po-sovszky, Forschungslabor Universitätskinderklinik Ulm, ermittelt und von der Firma Thermo Electron GmbH, Ulm synthetisiert.

2.1.7 Sonstige Materialien und Geräte

25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
12-, 24-, 96-Loch-Gewebekulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
1, 2, 5, 10, 25 ml Polystyrenpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
1,8 ml Cryotubes	Nunc, Wiesbaden
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Coulter Counter	Coulter, Krefeld
Digitalkamera CC-12	Olympus, Hamburg
Geldokumentation/UV-Schirm	Hama, Monheim

Gel-Gieß-Schlitten	PeqLab, Erlangen
Gelkammer Typ B2	PeqLab, Erlangen
Gelschlitten 14 x 14 cm	Peqlab, Erlangen
Lightcycler Capillaries	Roche, Mannheim
Mikroskop BX300	Leitz, Wetzlar
Szintillationsgefäße	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge PICO	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3. ORS	Heraeus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium im Brutschrank, bei 37°C, 5% CO₂-Konzentration und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

2.2.1.2 Kultivierung von SGBS-Zellen

Die SGBS-Zellen stammen ursprünglich aus dem subkutanen Fettgewebe eines Patienten mit Simpson-Golabi-Behmel Syndrom (SGBS). Das Besondere dieser Zellen ist, dass sie sich *in vitro* zu reifen Zellen differenzieren können. Da diese Zelllinie weder immortalisiert noch transformiert ist, können sie dies nur für etwa 80-90 Passagen. Ihre Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung nimmt mit zunehmender Generationenzahl ab. Aus diesem Grund wurden alle drei Monate neue Zellen aus einem Zellpool aufgetaut, der dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -192°C lagerte.

Kultiviert wurden die Zellen dann in Zellkulturmedium D-MEM:F 12 der Firma Gibco Life Tech, das mit 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenat und 100 U/l Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Um das Wachstum der Zellen nach dem Auftauen zu ermöglichen, wurde das Medium zusätzlich mit 10% FCS angereichert (= 0F + 10% FCS).

Bei Konfluenz wurden die adhären wachsenden Zellen trypsinisiert (5 min., 37°C, 0,05% Trypsin/0,02% EDTA) und anschließend wieder mit frischem Zellkulturmedium ausgesät. Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen in serumfreiem Basalmedium (0F) oder in speziellem Differenzierungsmedium kultiviert.

Tab. 1

Versuch	Zelltyp	Aussaatdichte	Gefäß	Medium
Morphologische Zellzählung	Prädipozyten	1300 Zellen/cm ²	12-well-Platten	0F
³ H-Thymidininkorporation	Prädipozyten	7500 Zellen/cm ²	24-well-Platten	0F
Differenzierung	Adipozyten	5000 Zellen/cm ²	12-well-Platten	Differenzierungsmedium
Lipogenese	Adipozyten	5000 Zellen/cm ²	12-well-Platten	0F

2.2.1.4 Adipogene Differenzierung von SGBS Zellen

SGBS Prädipozyten entwickeln sich in etwa 14 Tagen zu reifen Adipozyten. Die Differenzierung von Prädipozyten zu reifen Adipozyten kann *in vitro* durch die Zugabe eines adipogenen Differenzierungsmediums erreicht werden. Dieses enthält Hormone wie Insulin, Cortisol und Triiodthyronin, die auch *in vivo* für die Differenzierung wichtig sind. Zusätzlich benötigen die Zellen den für die Stimulation der Adipogenese wichtigen Transkriptionsfaktor PPARgamma, der durch das Thiazolidindion Rosiglitazon (BRL) aktiviert wird. Der Differenzierungsprozess wird außerdem erleichtert durch die Zugabe von Dexamethason und Isobutylmethylxanthin (IBMX).

Grundmedium: serumhaltiges Zellkulturmedium

Differenzierungsmedium I:

- 0,01 mg/ml Transferrin
- 10 nM Insulin
- 100 nM Cortisol
- 0,2 nM Triiodthyronin (T3)
- 25 nM Dexamethason
- 250 µM IBMX
- 2 µM Rosiglitazon

Differenzierungsmedium II:	0,01 mg/ml	Transferrin
	10 nM	Insulin
	100 nM	Cortisol
	0,2 nM	Triiodthyronin (T3)

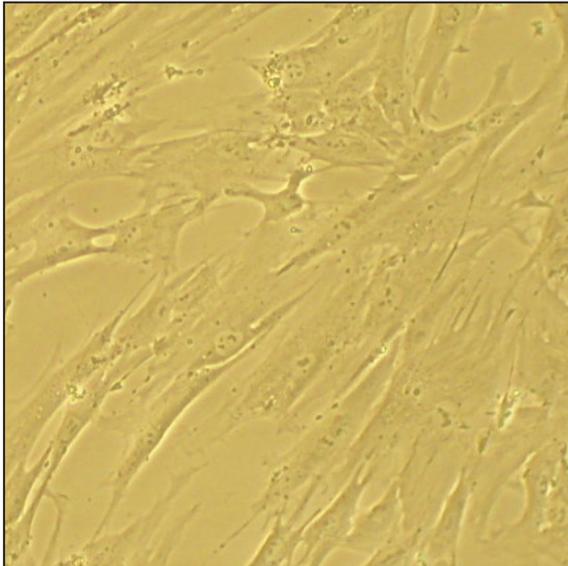


Abb. 4a: Präadipozyten

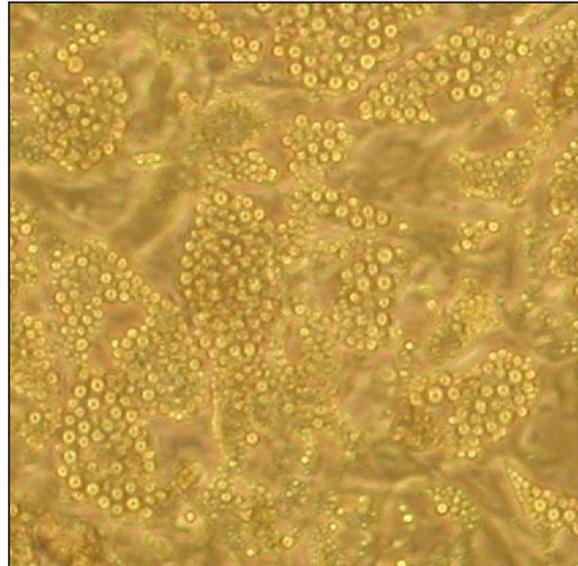


Abb. 4b: „reife Adipozyten“, Tag 10

SGBS Präadipozyten (Abb. 4a) wurden in serumhaltigem Zellkulturmedium kultiviert, bis sie zu 70-80% konfluent waren. Vor Zugabe des adipogenen Differenzierungsmediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um den negativen Einfluß von Faktoren aus dem Serum auf die Adipogenese gering zu halten. Zunächst wurden die Zellen dann von Tag 0 bis 4 in Differenzierungsmedium I inkubiert und im Anschluß daran weitere 10 Tage in Differenzierungsmedium II. Nach 14 Tagen waren sie zu reifen Adipozyten (Abb. 4b) mit großen, prall gefüllten Fettvakuolen differenziert.

2.2.1.4 Stimulation mit Ghrelin

Verwendet wurde rekombinantes, humanes, octanoyl-Ghrelin. Das in Pulverform gelieferte Ghrelin wurde in Lösungsmittel (PBS + 0,2% BSA) so aufgelöst, dass man eine Stocklösung in einer Konzentration von 0,3 mM erhielt.

Je nach Versuchsaufbau wurden aus dieser Stocklösung durch weitere Verdünnung mit dem Lösungsmittel Ghrelinlösungen in den Konzentrationen 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM, 100 mM hergestellt. Für die Versuche wurden diese Ghrelinlösungen dann mit dem jeweiligen Medium im Verhältnis 1:100 verdünnt. So erhielt man Medium mit Ghrelinkonzentrationen von 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM, mit dem die

Zellen dann entsprechend dem Versuchsaufbau inkubiert wurden. Um einen Lösungsmittel-abhängigen Effekt auszuschließen, wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle mit der gleichen Menge an PBS + 0,2% BSA mitgeführt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl

Die mikroskopische Zellzählung der in Monolayer-Kulturen wachsenden adhärenen Zellen wurde mit Hilfe eines Netzmikrometers bei 100-facher Vergrößerung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 12-Loch-Platten mit einer Dichte von etwa 1300 Zellen pro cm² (5000 Zellen pro Loch) ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie in serumfreiem Medium mit aufsteigenden Ghrelinkonzentrationen stimuliert und an Tag 0, 1, 2, 3 und 4 gezählt. Pro Konzentration wurden mindestens neun zufällig ausgesuchte Areale gezählt. Aus den einzelnen Werten wurden dann jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung bestimmt.

2.2.2.2 ³H-Thymidininkorporation

Mit dieser Methode bestimmt man den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin (³H-Thymidin) in die zelluläre DNA. Da nur sich teilende Zellen DNA synthetisieren, kann man mit dieser Methode die Proliferation von Zellen untersuchen.

SGBS-Prädipozyten wurden in 24-Loch-Platten mit einer Dichte von 7500 Zellen pro cm² (15000 Zellen pro Loch) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend neues, serumfreies Medium zugegeben, das die zu untersuchenden Faktoren enthielt. Die verschiedenen Ghrelinkonzentrationen und die Lösungsmittelkontrolle wurden mindestens in Triplikaten angesetzt. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen zusätzlich für 12 Stunden mit 2,5 µCi ³H-markiertem Thymidin (Methyl-³H-Thymidin, spezifische Aktivität 25 Ci/mmol) pro Loch inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und mit einem dafür vorgesehenen Gerät (Cell Harvester, Inotech) auf Filter gesaugt. Die getrockneten Filter wurden mit Szintillationsflüssigkeit überzogen. Die Inkorporation von radioaktivem Thymidin in die DNA wurde als „counts per minute (cpm)“ an einem Szintillationszähler (NXT™, Top Count) gemessen. Die cpm korrelieren mit der Teilungsrate der Zellen. Aus den erhaltenen Werten wurden die Mittelwerte bestimmt.

2.2.2.3 Bestimmung der Differenzierungsrate

SGBS-Prädipozyten wurden in 12-Loch-Platten mit einer Dichte von ca. 5000 Zellen pro cm² (20000 Zellen pro Loch) ausgesät. Nach drei Tagen Inkubationszeit in serumhaltigem Medium waren die Prädipozyten subkonfluent und konnten in Differenzierungsmedium inkubiert werden. Nach Kultivierung mit adipogenem Medium konnte die Differenzierungsrate durch mikroskopisches Auszählen der Monolayer-Kulturen bei 100-facher Vergrößerung

ermittelt werden. Dazu wurden jeweils in 3 Ansätzen je 3 Zählungen durchgeführt. Unter dem Netzmikrometer wurde die Anzahl der Präadipozyten und Adipozyten ermittelt. Die Adipozyten mussten mindestens fünf deutlich erkennbare Fettvakuolen enthalten. Um den Einfluss bestimmter Faktoren auf die Differenzierung zu ermitteln, wurden auch jeweils 3 Ansätze pro Faktor gemacht. Aus den ermittelten Zellzahlen wurden die Mittelwerte gebildet und die Differenzierungsrate berechnet.

2.2.2.4 Red Oil Färbung

Mit der Red Oil Färbung können bei reifen Adipozyten die intrazellulären Fettvakuolen dargestellt werden. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellkulturen dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Formalinlösung (10% Formalin in PBS) fixiert. Anschließend wurde frisches Formalin zugegeben und nochmal für 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entfernung der Formalinlösung und Waschen mit 60%-igem Isopropanol, wurden die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur in Red Oil Lösung inkubiert. Zur Herstellung der Red Oil Lösung wurden 500 mg Red Oil O in 100 ml Isopropanol aufgelöst. Dieser Stock wurde vor der Färbung im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser verdünnt und filtriert. Nach Inkubation mit der Färbelösung wurde die Red Oil Lösung direkt unter fließendem Wasser vorsichtig entfernt und die Zellkulturplatten mindestens drei Mal gewaschen.

2.2.3 De novo Lipogenese

Für die Lipogeneseversuche wurden Präadipozyten wie beschrieben 14 Tage zu reifen Adipozyten ausdifferenziert. Vor Verwendung wurde erst die Differenzierungsrate bestimmt, die mindestens 80% betragen sollte. Die differenzierten Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Vorinkubation wurde mit Insulin (10 nM), ansteigenden Ghrelinkonzentrationen (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM) und den Kombinationen aus beiden stimuliert. Anschließend wurde 0,1 µCi ¹⁴C-Glucose zugegeben und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die adhären Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 2 ml einer 0,1 M NaOH-Lösung abgelöst. Die abgeernteten Zellen wurden in Gefäße mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben, so dass anschließend der Einbau von ¹⁴C-Glucose in die Zellen als „counts per minute“ (cpm) mittels eines β-Counters gemessen werden konnte (Messung: 3x10 min pro Gefäß). Die verschiedenen Konditionen und die Lösungsmittelkontrolle wurden jeweils mindestens in Triplikaten angesetzt, die dann wiederum je dreimal gemessen wurden, so dass sich pro Kondition mindestens 9 Werte ergaben. Aus diesen Werten wurden dann die Mittelwerte gebildet.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung mittels RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Monolayer-Zellkulturen wurden mit 1 ml Quiazol lysiert, mehrmals resuspendiert und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Das Homogenisat wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Quiazol wurde das Reaktionsgefäß 15 Sekunden geschüttelt, noch einmal 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute („rounds per minute (rpm)“) und 4°C zentrifugiert. Dadurch wurde die Emulsion in eine organische und eine wässrige Phase aufgetrennt. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen 75%iges Ethanol zugefügt. In zwei Schritten wurde nun das gesamte Volumen in ein RNeasy Mini Spin Column (in 2 ml Sammelgefäß) überführt und jeweils 15 Sekunden bei 10000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde 700 µl RW1-Puffer zugefügt und wieder 15 Sekunden bei 10000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde 500 µl RPE-Puffer zugegeben und 15 Sekunden bei 10000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nach jedem Zentrifugations-Schritt wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurde das RNeasy spin column in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben, 30 µl RNase-freies Wasser zugefügt und 1 Minute bei 10000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand enthielt die RNA, woraus nun die RNA-Konzentration bestimmt werden konnte.

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 4 µl der RNA-Lösung in 96 µl Wasser gegeben. Hieraus wurde mit einem Biophotometer (Eppendorf) photometrisch die Menge an RNA durch die Bestimmung der Absorption bei 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD 260) von 1,0 entspricht 40 µg/ml RNA und damit ergibt sich die Formel zur Konzentrationsberechnung wie folgt:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Zusätzlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD 280) bestimmt, um die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen zu beurteilen. Die Reinheit wurde als Quotient aus OD 260 nm/OD 280 nm berechnet. Bei einem Quotienten von 1,8-2,0 wurde die Nukleinsäurelösung als rein betrachtet und weiterverarbeitet.

2.2.4.4 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die RNA mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA (complementary-DNA) umgeschrieben. Für die Transkription wurde die Reverse Transkriptase SUPERSCRIPT™ II (Invitrogen) verwendet. Zunächst wurde 1 µg RNA mit Wasser auf 11 µl aufgefüllt und mit 1 µl Random Primer 3 Minuten bei 85°C denaturiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Die Random Primer sind Zufallshexamere, die mit der RNA an vielen Stellen Hybride bilden und so statistisch jedes RNA-Molekül mit gleicher Frequenz in cDNA umschreiben. Außerdem enthielt der Ansatz („Mastermix“) die für die Umschreibung nötigen Nukleotide (dNTPs) und Dithiothreitol (DTT) zur Stabilisierung der gelösten Enzyme.

Mastermix:	5 µl	5x 1st Strand Buffer
	2,5 µl	DTT (0,1 M)
	1 µl	dNTPs (10mM)
	1 µl	Superscript RT (200 U)
	1,5 µl	H ₂ O

Der denaturierten und mit den gewünschten Primern versetzten RNA wurden 11 µl Mastermix zugegeben. So ergab sich pro Ansatz ein Gesamtvolumen von 23 µl. Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler (MJ Research) unter folgenden Bedingungen: 15 Minuten bei 37°C, 30 Minuten bei 45°C, 15 Minuten bei 50°C. Durch die darauffolgende Denaturierung bei 95°C für 2 Minuten wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert, da diese sonst durch Bindung an die cDNA eine Amplifizierung verhindern würde. Das Reaktionsprodukt wurde mit 177 µl Wasser auf 200 µl aufgefüllt und konnte weiterverwendet werden.

2.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, die der Vervielfältigung genau definierter Teile eines DNA-Stranges dient.

In jedem Versuch wurde parallel ein Ansatz mit einem Primerpaar gemacht, das spezifisch für den Transkriptionsfaktor Sp1 ist. Dieser wird ubiquitär exprimiert, ist notwendig für die Transkription vieler Housekeeping Gene und kann als interne Kontrolle verwendet werden.

Die Primer waren so gewählt worden, dass für alle PCRs dieselbe Annealingtemperatur galt, die optimale Magnesiumkonzentration war bekannt. Die Zyklenzahl war so gewählt worden, dass sich die Amplifikation der Gene im exponentiellen Bereich befand und somit quantitative Aussagen über die Expression des untersuchten Gens möglich war. Um eine eventuelle Kontamination der verwendeten Lösungen auszuschließen, wurde immer auch ein Ansatz

mit H₂O anstelle der cDNA pipettiert. Bei dieser Negativkontrolle sollten keine Banden auftreten.

Mastermix (Sp1) :	5 µl	10x Reaktionspuffer (Mg-frei)
	5 µl	Q-Solution
	0,5 µl	MgCl ₂ (0,25 mM)
	0,5 µl	dNTPs (10 mM)
	0,2 µl	Sp1-Primerpaar (je 50 pM/µl)
	33,5 µl	H ₂ O
	0,3 µl	Taq-Polymerase

Mastermix :	5 µl	10x Reaktionspuffer (Mg-frei)
	5 µl	Q-Solution
	0,5 µl	MgCl ₂ (0,25 mM)
	0,5 µl	dNTPs (10 mM)
	0,5 µl	Primerpaar (je 50 pM/µl)
	33,2 µl	H ₂ O
	0,3 µl	Taq-Polymerase

Zu 5 µl der cDNA-Lösung wurden 45 µl dieses Ansatzes (Mastermix) gegeben. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler unter folgenden Konditionen: 1 Minute bei 95°C (Denaturierung), dann 30 Zyklen mit 1 Minute 94°C, 1 Minute bei einer Temperatur zwischen 50 und 60°C und 1 Minute 72°C, abschließend noch einmal 5 Minuten 72°C.

2.2.4.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die PCR-Produkte wurden auf 2%iges Agarosegel aufgetragen und entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld gelelektrophoretisch aufgetrennt.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris-HCL
	20 mM	Essigsäure
	1 mM	EDTA (pH 0,8)

2 g Agarose wurden in 100 ml TAE aufgekocht und nach dem Abkühlen in eine Gelkammer (14 x 14 cm) ausgegossen.

DNA-Probenpuffer	30%	Glycerol
	0,25%	Bromphenolblau

Dem DNA-Probenpuffer wurde im Verhältnis 1:100 SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Roche) zugegeben. Die PCR-Produkte (25 µl) wurden mit 5 µl DNA-Probenpuffer versetzt. Dann wurden 30 µl der DNA-Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 10 µl Marker (100 bp (Basenpaare)) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 130 Volt für etwa 40 Minuten. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.2.4.7 Real Time quantitative PCR

Dies ist eine Methode, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, bei der jedoch die gewonnene DNA zusätzlich quantifiziert wird. Dies geschieht mittels Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus (aus diesem Grund der Name „Real time“). Hier wurde SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet und mit dem Kit der Firma Roche gearbeitet.

In einem Ansatz wurde immer nur ein Primerpaar verwendet, wobei als interne Kontrolle das Primerpaar für GAPDH (ein Enzym der Glykolyse) hergenommen wurde, das ubiquitär exprimiert wird.

Mastermix:	1,35 µl	LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)
	0,55 µl	Magnesium
	8,8 µl	H ₂ O

Diesem Ansatz wurden 1,3 µl Primerpaar-Mix (je 5 pM/µl) zugegeben. Zu 1,3 µl cDNA-Lösung wurden 12 µl von diesem Master-Primer-Mix pipettiert. Die PCR wurde am Light-cycler unter folgenden Konditionen durchgeführt: 1 Minute bei 95°C (Denaturierung), dann 30 Zyklen mit 1 Minute 94°C, 1 Minute bei einer Temperatur zwischen 50 und 60°C und 1 Minute 72°C, abschließend noch einmal 5 Minuten 72°C.

Zur Auswertung wurde ein spezielles Rechenmodell angewandt. Zur Berechnung wird der Ct-Wert (Cycle Threshold/ Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Dieser beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes angegeben. Hier wird eine relative Quantifizierung durchgeführt, also auf ein Referenzgen bezogen (hier GAPDH). Dazu werden erst die einzelnen Ct-Werte von den Ct-Werten des Referenzgens (GAPDH) abgezogen (ΔCt). Um die Werte auf die Medienkontrolle zu beziehen, werden von den ΔCt -Werten der ΔCt -Wert der Mediumkontrolle abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte werden dann in die Gleichung n-fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt. Die Angaben der hier berechneten Werte erfolgen in Prozent.

2.2.4.8 Phospho-MAPK Protein Array intrazellulärer MAP-Kinasen

Für diesen Versuch wurden reife Adipozyten zunächst 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit den vier folgenden Konditionen 10 Minuten stimuliert: serumfreies Medium + BSA, Ghrelin 100 nM, Insulin 100 nM + BSA, Insulin 100 nM + Ghrelin 100 nM.

Nach Abstoppen der Reaktion auf Eis und Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS, wurden die Zellen mit Lysepuffer lysiert, in sterile Reaktionsgefäße überführt und anschließend 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die anschließend verwendeten Proteine.

Im Weiteren wurden mittels „Human Phospho-MAPK Array Kit“ (R&D Systems) wichtige Signalmoleküle, wie MAPKs (mitogen-activated protein kinases), ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), JNK1-3 (c-Jun N-terminal kinases), verschiedene p38-Isoformen und andere intrazelluläre Kinasen, wie Akt und GSK-3 untersucht. Dieses Nachweisverfahren basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion.

Im Kit enthalten sind Nitrozellulose-Membranen, an die 21 verschiedene Anti-Kinase-Antikörper und 7 verschiedene Kontrollen in Duplikaten gebunden sind, da man sich zum Nachweis der Proteine Antigen-Antikörper-Reaktionen zu Nutze macht. Diese Membranen wurden mit den zuvor aus den Zellen gewonnenen Proteinen (Antigene) inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift blieben nur die Antikörper-gebundenen Antigene zurück. Weitere biotinmarkierte Antikörper wurden zugefügt, an die nun Streptavidin-HRP band, das eine hohe Affinität für Biotin hat. Anschließend wurde ein Chromogen zugefügt

und es kam zu einer Farbreaktion. Dann wurde von den Membranen ein Film belichtet und entwickelt, auf dem dann unterschiedlich intensive schwarze Farbpunkte zu sehen waren. Die Intensität der Farbpunkte gibt einen Rückschluss auf die Menge an phosphoryliertem Protein. Die Filme wurden eingescannt und anschließend die Dichte am Computer mittels ImageJ ermittelt. Daraus wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

2.2.4.9 Westernblot

In diesem Versuch wurde die Phosphorylierung der intrazellulären Kinasen Akt und GSK3 näher untersucht. Die Proteine für diesen Versuch wurden wie bei dem Phospho-MAPK-Protein-Array gewonnen. Stimuliert wurde wieder für 10 Minuten mit serumfreiem Medium + BSA, Ghrelin 100 nM, Insulin 100 nM + BSA und Insulin 100 nM + Ghrelin 100 nM.

Die Proteine wurden dann in einem ersten Schritt mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend wurde senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern vom Gel auf eine Membran, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Das Muster ihrer elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten und sie sind für weitere Schritte zugänglich. Die gewünschten Proteinbanden wurden anschließend mittels spezifischer phospho-Akt- und phospho-GSK3 α/β -Antikörper identifiziert. Dazu wurden die Membranen nach einigen Waschschritten mit TBST über Nacht bei 4°C mit den Antikörpern inkubiert. Durch anschließende Waschschriffe mit TBST werden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Wie oben macht man sich auch hier eine enzymatische Farbreaktion zunutze, um die Banden sichtbar zu machen. Dazu wurde ein passender HRP-konjugierter Antikörper zugegeben. Die Reaktion erfolgte wie oben beschrieben. Dann wurde ein Film von der Membran belichtet und anschließend entwickelt. Er zeigte unterschiedlich dicke schwarze Banden. Die Größe der Banden gibt einen Rückschluss auf die Menge an phosphoryliertem Protein. Die Filme können dann eingescannt werden und die Dichte kann anschließend am Computer mit Hilfe von ImageJ ermittelt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von Ghrelin und seinen Rezeptoren in SGBS Zellen

Ghrelin vermittelt seine Wirkung auf Zellen über seinen spezifischen Rezeptor, den GHSR. In ersten Experimenten wurde die Expression der SGBS-Zellen für Ghrelin, GHSR-1a und GHSR-1b mRNA bestimmt. Als Positivkontrolle für Ghrelin diente Magengewebe, für den GHSR-1a U87-Zellen (Glioblastom-Zelllinie) und für den GHSR-1b Jurkat-Zellen (T-Zell-Leukämie-Zellen). Ghrelin wird von den SGBS-Zellen erwartungsgemäß in geringerem Maße, als von Magengewebe exprimiert. Sowohl die Expression von GHSR-1a, als auch von GHSR-1b nimmt während der Differenzierung bis zum 10. Tag zu (Abb. 5).

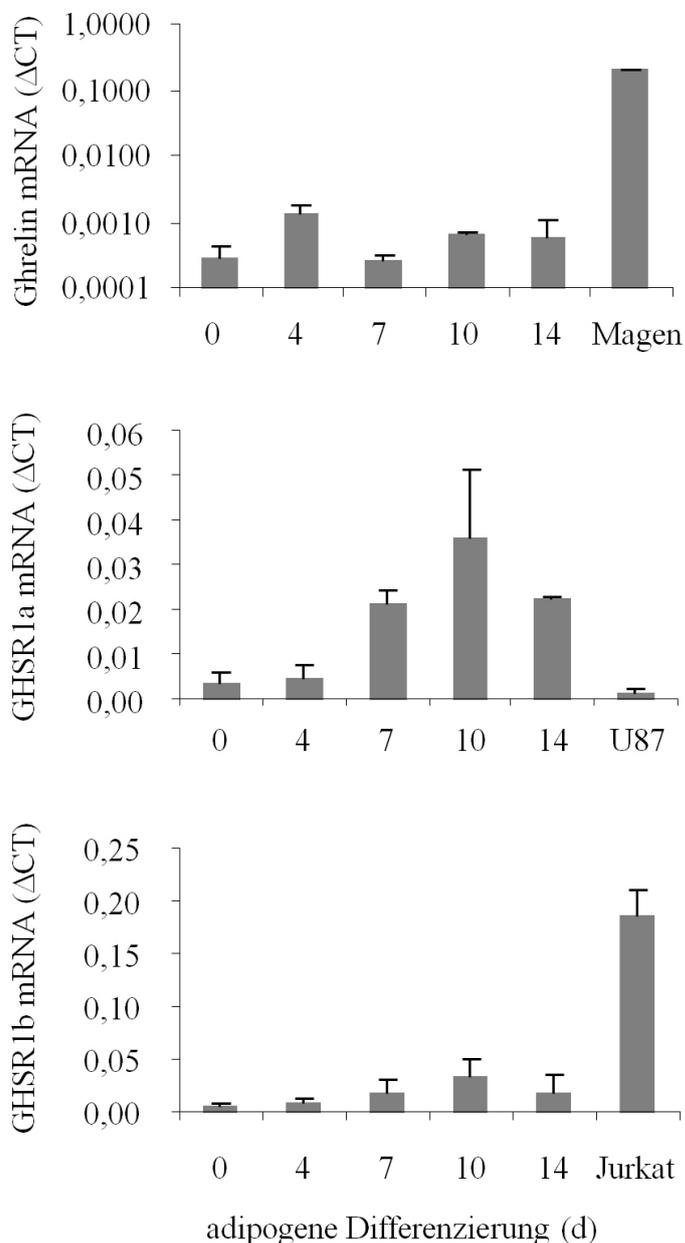


Abb. 5: Nachweis von Ghrelin und den Rezeptoren (GHS-R 1a und 1b, Growth-Hormone-Secretagogues-Rezeptor) SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung an den Tagen 0, 4, 7, 10 und 14 abgeerntet. Aus den Zellen wurde RNA (ribonucleic acid) gewonnen und mittels Real Time PCR (Polymerase Kettenreaktion) die Expression von Ghrelin, GHS-R 1a und GHS-R 1b untersucht. Als Positivkontrollen dienten Magengewebe, U87- (Glioblastom-Zelllinie) und Jurkat-Zellen (T-Zell-Leukämie-Zellen).

3.2 Einfluss von Ghrelin auf die Proliferation

Die Fettgewebsmasse wird durch das Volumen und die Anzahl von Adipozyten reguliert. Die Adipozytenzahl kann zunehmen durch Proliferation und Differenzierung und abnehmen durch Entfettung, Dedifferenzierung und apoptotische Vorgänge.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ghrelin auf die Proliferation an humanen SGBS Präadipozyten untersucht. Reife Adipozyten sind terminal differenziert und proliferieren nicht mehr. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden genutzt: mikroskopische Zellzählung und die Inkorporation von radioaktivem ^3H -Thymidin in die DNA.

Sowohl bei der Zellzählung, als auch bei der ^3H -Thymidin Inkorporation konnte man eine konzentrationsabhängige Stimulation der Proliferation beobachten.

Bei der mikroskopischen Zellzählung (Abb. 6) war die Zahl der adhärennten Präadipozyten an Tag 4 bei 1000 nM Ghrelin um ca. 30%, bei 10 nM um ca. 10% im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Bei allen durchgeführten Versuchen konnte man bei 1000 nM Ghrelin immer eine Stimulation um ca. 20% im Vergleich zur Medien- oder Lösungsmittelkontrolle feststellen.

Bei der ^3H -Thymidininkorporation (Abb. 7) sah man im Vergleich zur Kontrolle eine konzentrationsabhängige Zunahme bei 100 nM um ca. 25%, bei 1000 nM um ca. 35%.

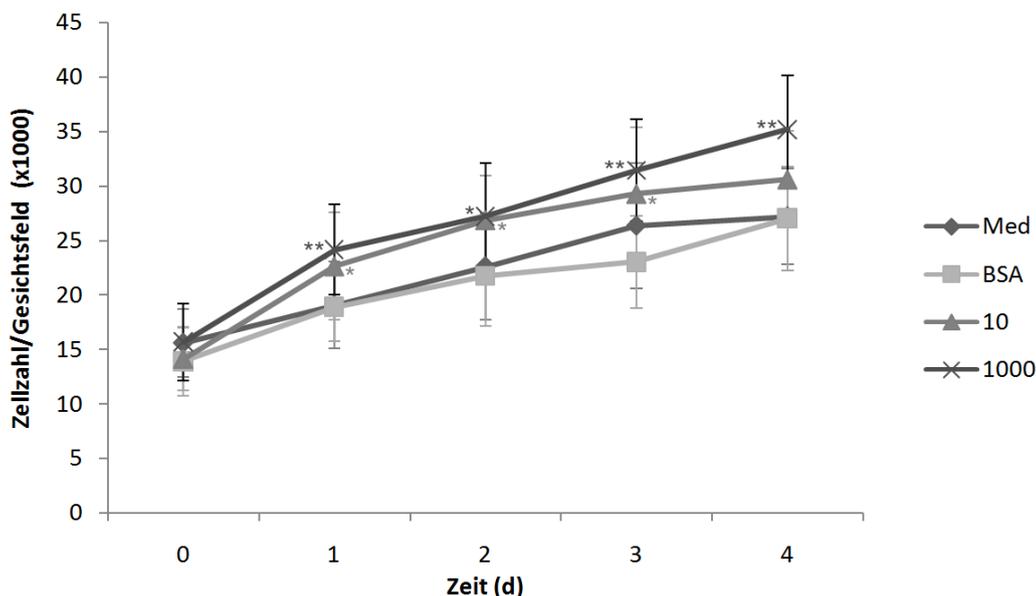


Abb. 6: Einfluss von Ghrelin auf die Proliferation von Präadipozyten

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumfreiem Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ghrelin (10 nM, 1000 nM) beziehungsweise mit Lösungsmittel (0 nM) BSA (Bovines Serumalbumin) inkubiert. Nach 0, 1, 2, 3 und 4 Tagen wurde durch mikroskopische Zellzählung die Anzahl an adhärennten Präadipozyten ermittelt. Pro Konzentration wurden mindestens 9 zufällige Areale gezählt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ (Ghrelin vs. BSA)

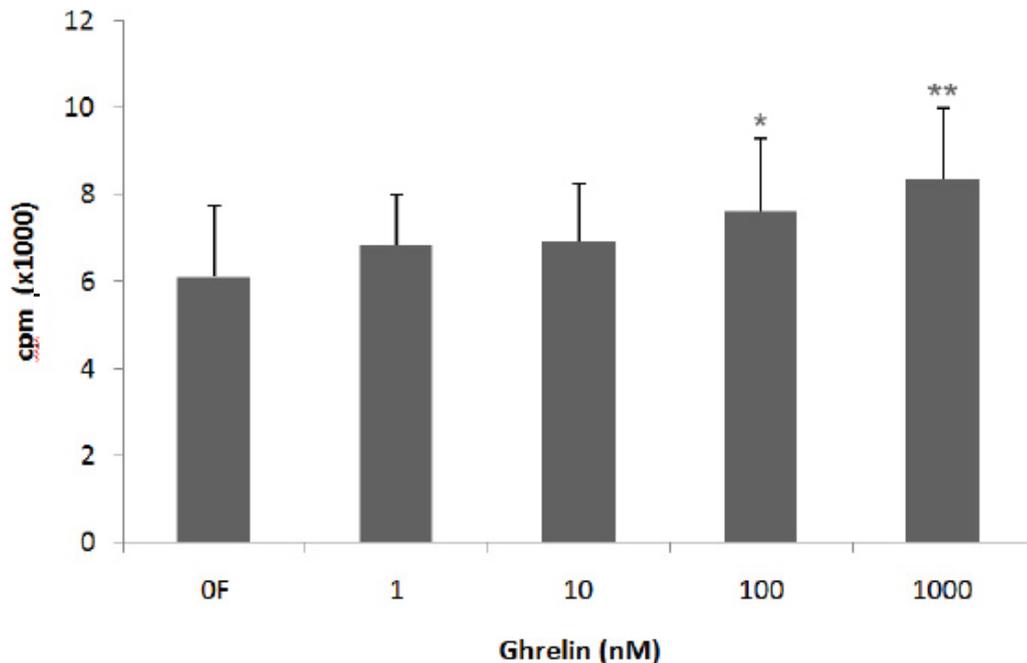


Abb. 7: Einfluss von Ghrelin auf die Proliferation von Präadipozyten

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumfreiem Zellkulturmedium (OF) mit aufsteigenden Konzentrationen von Ghrelin beziehungsweise mit Lösungsmittel (0 nM) inkubiert. Die verschiedenen Ghrelinkonzentrationen und die Lösungsmittelkontrolle wurden mindestens in Triplikaten angesetzt. Nach 72 Stunden wurde die ^3H -Thymidininkorporation in die DNA als „counts per minute“ (cpm) ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen. * $p < 0,03$, ** $p < 0,002$ (Ghrelin vs. OF)

3.3 Einfluss von Ghrelin auf die adipogene Differenzierung

Um den Einfluss von Ghrelin auf die adipogene Differenzierung zu untersuchen, wurden SGBS Zellen während des Differenzierungsprozesses mit Ghrelin behandelt. Die Differenzierungsrate wurde durch mikroskopische Zählung der adhärenz differenzierten und undifferenzierten Zellen ermittelt. Zusätzlich wurden die Zellen angefärbt und deren Morphologie fotografisch dokumentiert.

Präadipozyten wurden während des ganzen Differenzierungsprozesses (Tag 1-14) mit aufsteigenden Ghrelinkonzentrationen und Lösungsmittelkontrolle inkubiert. An Tag 10 und 14 wurde jeweils die Differenzierungsrate bestimmt (Abb. 8c), wobei sich hier an beiden Tagen kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle zeigte. An Tag 14 sind die Zellen im Differenzierungsprozess weit fortgeschritten und zeigen einen Anstieg und eine Größenzunahme der Fettvakuolen. Mittels einer Red Oil-Färbung (Abb. 8a) wurden die intrazellulär eingelagerten Lipide angefärbt. Auch hierbei war kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen

Ghrelinkonzentrationen und der Kontrolle zu sehen. Der bei der Färbung in die Fettvakuolen eingelagerte Farbstoff wurde anschließend mit 100%igem Isopropanol ausgelöst und dessen optische Dichte am ELISA-Reader gemessen (Abb. 8b). Dadurch ist es möglich nicht nur die Zahl der differenzierten Zellen, sondern auch die Menge an eingelagerten Lipidtropfen zu quantifizieren. Es ergab sich kein Unterschied zwischen Ghrelin und der Medienkontrolle.

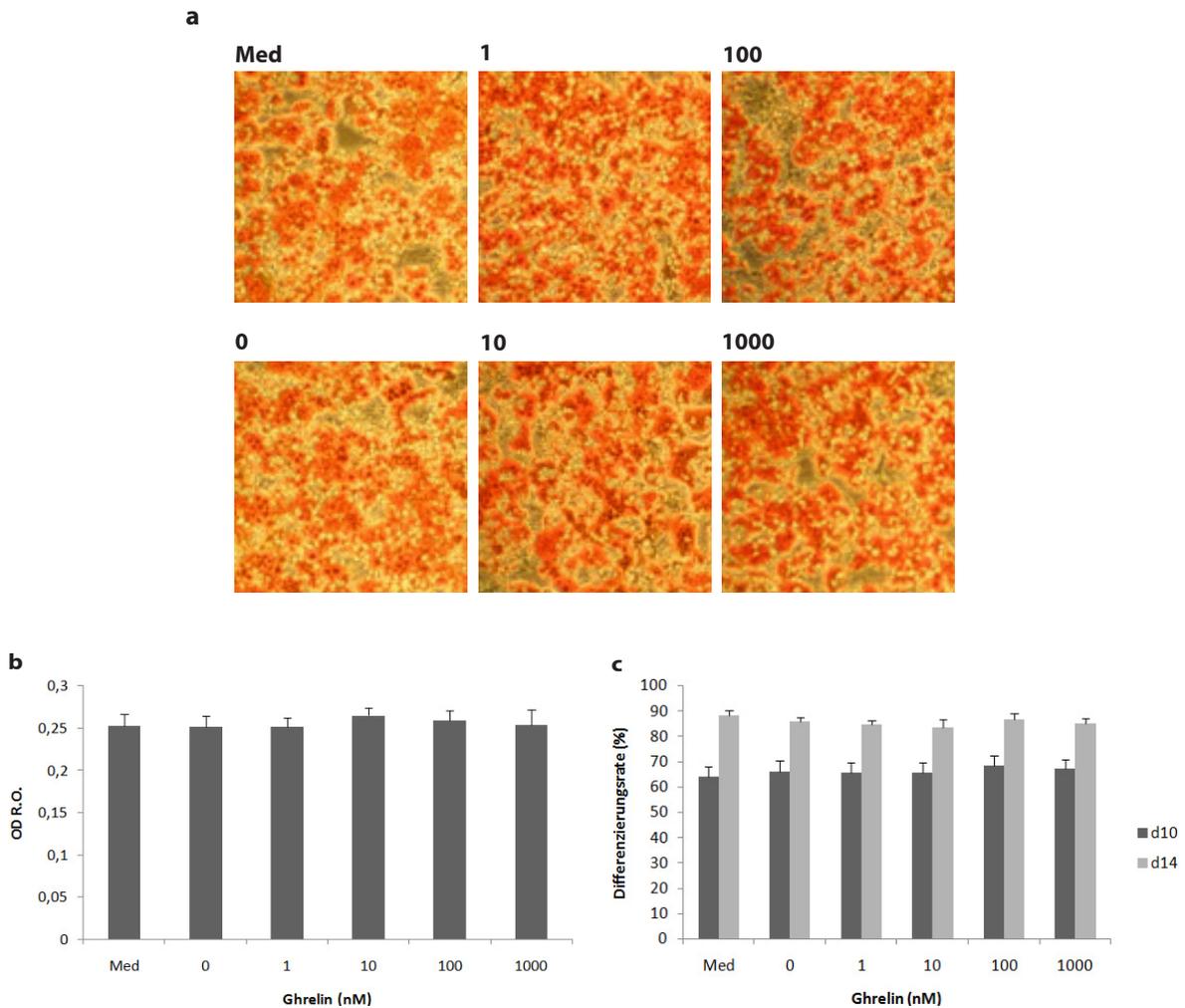


Abb. 8: Einfluss von Ghrelin auf die Differenzierung von Präadipozyten

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden von Tag 1-14 in Differenzierungsmedium mit aufsteigenden Konzentrationen von Ghrelin beziehungsweise mit Lösungsmittel (0 nM) inkubiert. a Morphologie der Zellen an Tag 14, Red Oil Färbung. b Nach der Färbung wurde der Farbstoff mit 100%igem Isopropanol aus den Zellen ausgelöst und dessen optische Dichte am ELISA- (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Reader gemessen. c Differenzierungsrate, mikroskopisch ermittelt durch Zählung der adhärenen Präadipozyten und Adipozyten an Tag 10 und 14. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen.

3.4 Einfluss von Ghrelin auf die Lipogenese

Die Synthese und Speicherung von Triglyceriden nennt man Lipogenese. Dieser Vorgang ist Insulin-abhängig.

In diesem Experiment wurde der Einfluss von Ghrelin zum einen auf die basale (Abb. 9a) und zum anderen auf die insulinstimulierte Lipogenese (Abb. 9b) untersucht.

Um die Wirkung auf die basale Lipogenese zu untersuchen, wurden Adipozyten in serumfreiem Medium mit ansteigenden Ghrelinkonzentrationen stimuliert. Im Vergleich zur Medienkontrolle konnte man einen konzentrationsabhängigen stimulatorischen Effekt beobachten. Zusätzlich wurden Adipozyten mit einer Insulinkonzentration (10 nM) und aufsteigenden Ghrelinkonzentrationen kostimuliert, um den Einfluss auf die insulinstimulierte Lipogenese zu untersuchen. Im Vergleich zur Insulinkontrolle zeigte sich eine abfallende Lipogeneserate. In beiden Fällen konnte man keinen Unterschied zwischen Lösungsmittel- und Medienkontrolle beobachten.

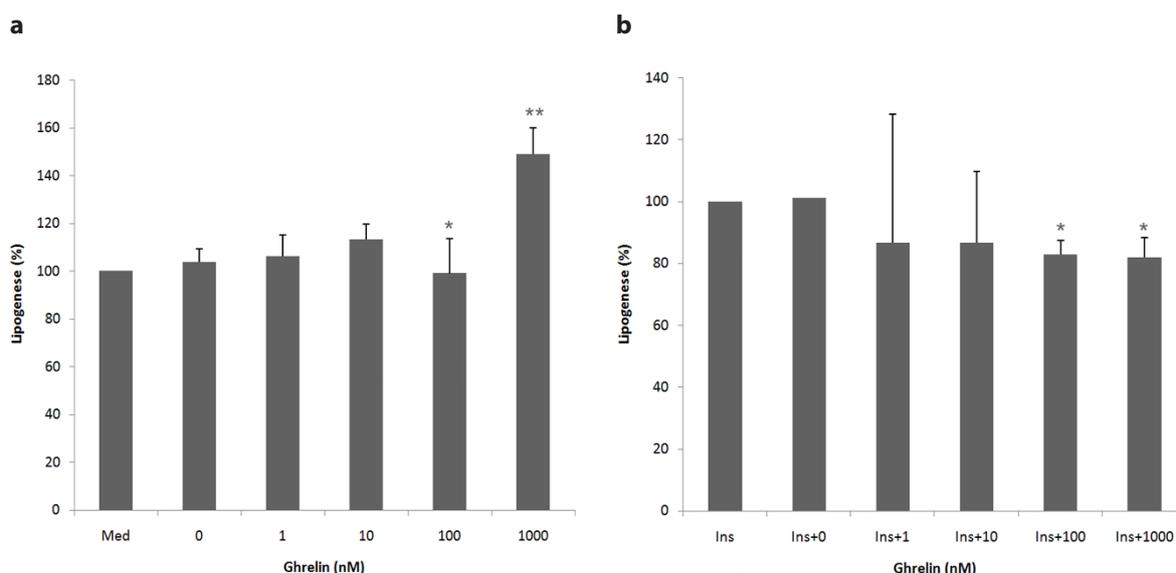


Abb. 9: Einfluss von Ghrelin auf die Lipogenese von Adipozyten

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Adipozyten wurden nach 24-stündiger Hungerphase in serumfreiem Zellkulturmedium mit aufsteigenden Konzentrationen von Ghrelin beziehungsweise Lösungsmittel (0 nM) BSA (Bovines Serumalbumin), ohne Insulin (basale Lipogenese; a) und mit Insulin (10 nM) (insulinstimulierte Lipogenese; b) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die ^{14}C -Glukoseakkumulation in den Zellen als „counts per minute“ (cpm) ermittelt. Die verschiedenen Konditionen und die Lösungsmittelkontrolle wurden jeweils mindestens in Triplikaten angesetzt, die dann wiederum je dreimal gemessen wurden, so dass sich pro Kondition mindestens 9 Werte ergaben. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung als % von der Kontrolle (Medium bzw. Insulin). Gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ (a: Ghrelin vs. BSA, b: Insulin + Ghrelin vs. Insulin+BSA)

3.5 Einfluss von Ghrelin auf wichtige Signalmoleküle

An der Regulation von Vorgängen in der Zelle, wie z.B. Zellwachstum oder Lipogenese sind zahlreiche Signalmoleküle beteiligt. Diese sogenannten Kinasen sind meist Teil von mehrstufigen Signaltransduktionswegen und werden nacheinander durch Phosphorylierung aktiviert. Um zu untersuchen welche Kinasen durch Ghrelin phosphoryliert werden, wurden Adipozyten 10 Minuten mit Insulin, Ghrelin und der Kombination aus beiden inkubiert. Anschließend wurde ein Phospho-MAPK-Protein-Array durchgeführt (Abb. 10a). Bei diesem kann man den Phosphorylierungsstatus von 21 verschiedenen Kinasen gleichzeitig analysieren.

Deutliche Effekte waren bei Akt 1/2- und GSK-3 zu sehen (Abb. 10b/c). Im Vergleich zur Medienkontrolle konnte man bei Akt und GSK-3 eine leichte Zunahme der Phosphorylierung durch Ghrelin beobachten. Insulin hat einen starken stimulatorischen Effekt, was sich hier bestätigt. Interessanterweise konnte man sowohl bei Akt, als auch bei GSK-3 sehen, dass Ghrelin den stimulatorischen Effekt von Insulin inhibierte.

In weiteren Versuchen wurden mit den gleichen Proteinen Westernblots durchgeführt. Man konnte auch hier sehen, dass Ghrelin die insulinstimulierte Phosphorylierung von Akt inhibiert (Abb. 10d). Somit bestätigte sich das Ergebnis des davor durchgeführten Arrays.

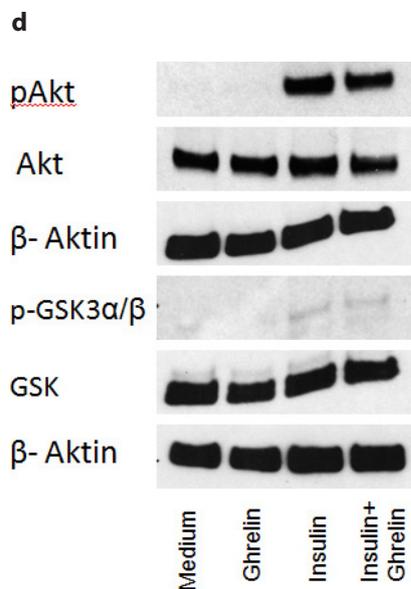
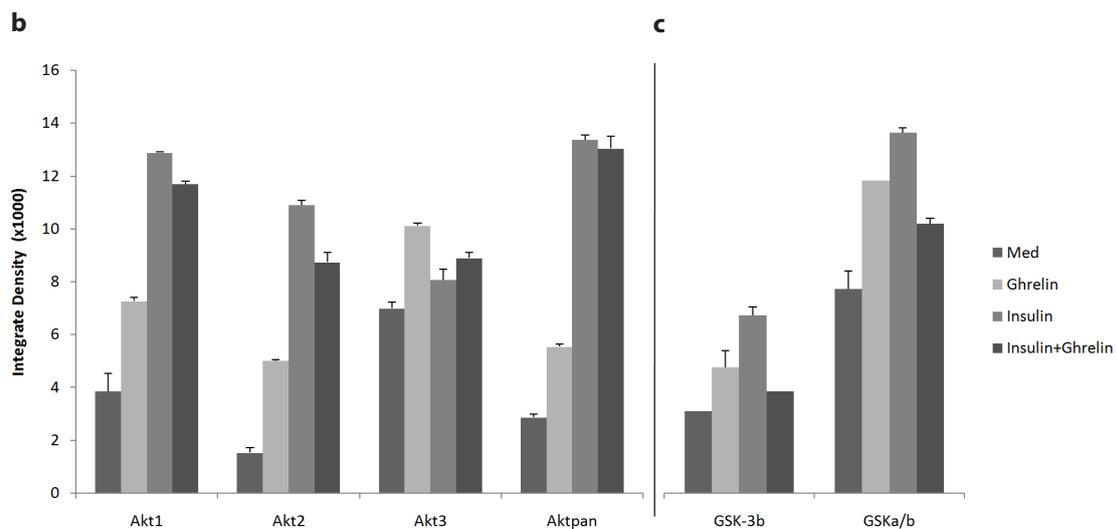
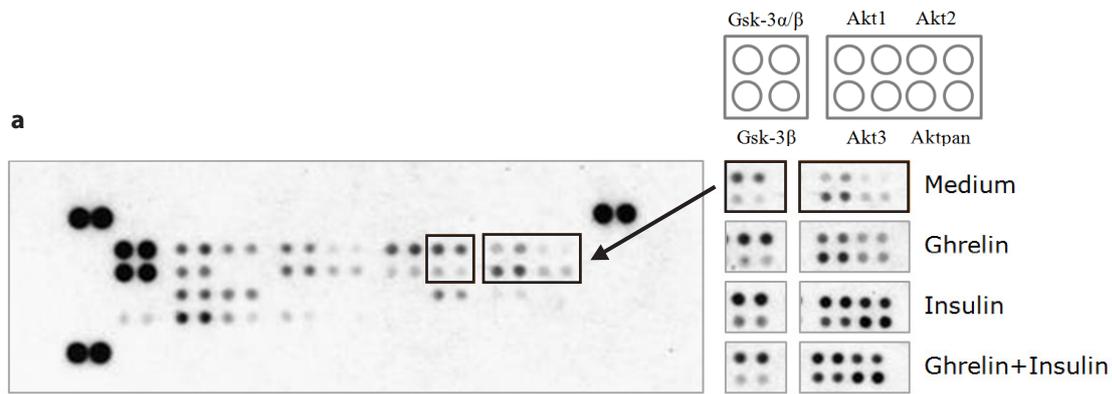


Abb. 10: Einfluss von Ghrelin auf die Phosphorylierung von Akt (Proteinkinase) und GSK-3 (Glykogen Synthase Kinase 3)

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Adipozyten wurden nach 24-stündiger Hungerphase in serumfreiem Zellkulturmedium mit folgenden Konditionen für 10 Minuten stimuliert: Ghrelin (100 nM), Insulin (100 nM), Insulin (100 nM) + Ghrelin (100 nM) beziehungsweise Lösungsmittelkontrolle (0 nM). Da bei den vorher durchgeführten Experimenten bereits bei einer Ghrelin-Konzentration von 100 nM ein Effekt zu sehen war, wurde diese Konzentration verwendet. Anschließend gewonnenes Protein wurde zum einen in einen Phospho-MAPK- (mitogen-aktivierte-Proteinkinase) Protein-Array-Kit eingesetzt (a-c) und zum anderen für Westernblot verwendet (d). a zeigt die Nitrozellulosemembran mit den angefärbten gebundenen phosphorylierten Kinasen. b und c zeigen die Auswertungen für Akt und GSK-3.

3.6 Einfluss von Ghrelin auf die endokrine Funktion der Fettzelle

Das Fettgewebe ist nicht mehr nur als Speicherorgan bekannt, sondern auch als endokrines Organ, das eine große Anzahl unterschiedlicher Adipokine sezerniert. Deshalb wurde der Einfluss von Ghrelin auf die mRNA-Expression folgender Adipokine genauer untersucht:

- **IL-6**
- **IL-8**
- **Adiponektin**

IL-6 und IL-8 mRNA wird ausschließlich in Präadipozyten exprimiert, nimmt während der Differenzierung ab und kann in Adipozyten nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 11). Aus diesem Grund wurden Versuche zum Einfluss von Ghrelin auf die Expression der genannten Adipokine an Präadipozyten durchgeführt.

Im Gegensatz dazu kann die Expression von Adiponektin in Präadipozyten noch nicht nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression ist ab Tag 4 der adipogenen Differenzierung nachweisbar und steigt mit dem Differenzierungsgrad der Zellen. Deshalb wurden Untersuchungen zum Einfluss von Ghrelin auf die Adiponektinexpression an reifen Adipozyten durchgeführt.

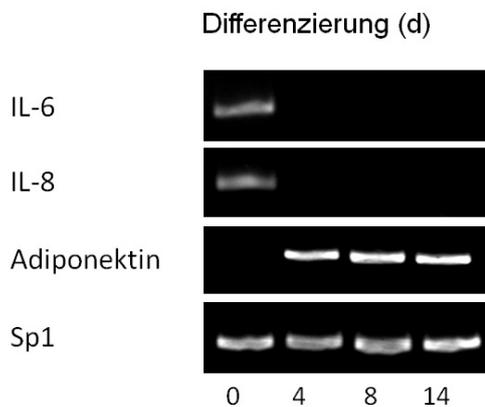


Abb. 11: mRNA- (messenger ribonucleic acid) Expression der Adipokine während der Differenzierung

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung an den Tagen 0, 4, 8 und 14 abgeerntet. Aus den Zellen wurde RNA (ribonucleic acid) gewonnen und mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) wurde die Expression von IL-6, IL-8 (Interleukin 6, 8) und Adiponektin untersucht. Sp1 (Saure Phosphatase 1) diente als interne Kontrolle.

IL-6 und IL-8

Zur Untersuchung der Wirkung von Ghrelin auf die mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 wurden SGBS Präadipozyten 24 Stunden mit aufsteigenden Ghrelinkonzentrationen (1-1000 nM) und Lösungsmittelkontrolle inkubiert, anschließend abgeerntet und die RNA präpariert.

Die IL-6 mRNA-Expression nimmt bei höheren Ghrelinkonzentrationen im Vergleich zur Medienkontrolle zu. Bei der höchsten Ghrelinkonzentration (1000 nM) ist ein Anstieg um ca. das 4,5-fache gegenüber der Medien- und Lösungsmittelkontrolle zu beobachten (Abb. 12).

Auch bei der IL-8 mRNA-Expression ist bei höheren Ghrelinkonzentrationen ein starker Anstieg zu beobachten. Bei der höchsten Ghrelinkonzentration (1000 nM) ist eine Zunahme um ca. das 4-fache im Vergleich zur Medienkontrolle zu sehen (Abb. 13).

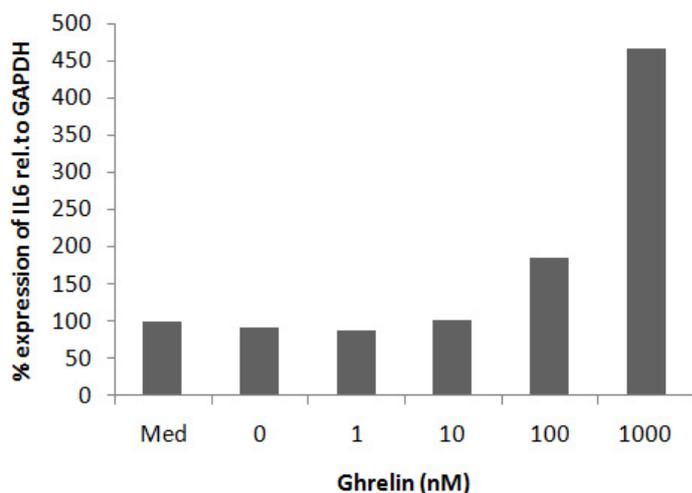


Abb. 12: Einfluss von Ghrelin auf die Expression von Interleukin 6 (IL-6)

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumfreiem Zellkulturmedium und aufsteigenden Konzentrationen von Ghrelin beziehungsweise Lösungsmittel (0 nM) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA (ribonucleic acid) präpariert. Mittels Real Time PCR (Polymerase Kettenreaktion) am Lightcycler wurde die Expression von IL-6-mRNA (messenger ribonucleic acid) untersucht. Die Werte wurden auf die Kontrollwerte (GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bezogen. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen.

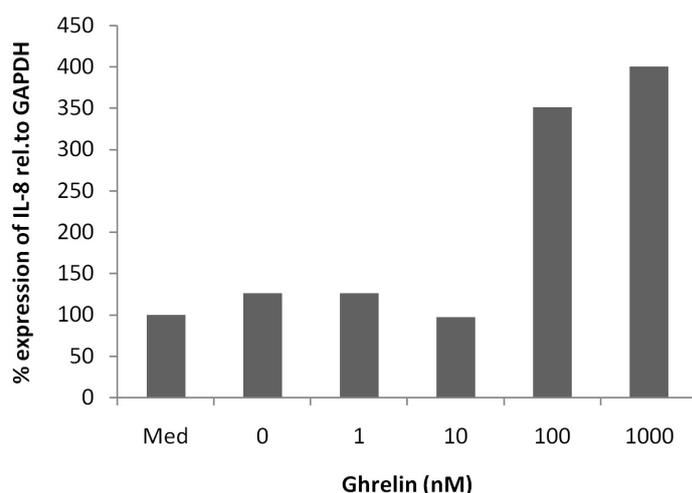


Abb. 13: Einfluss von Ghrelin auf die Expression von Interleukin 8 (IL-8)

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumfreiem Zellkulturmedium und aufsteigenden Konzentrationen von Ghrelin beziehungsweise Lösungsmittel (0 nM) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA (ribonucleic acid) präpariert. Mittels Real Time PCR (Polymerase Kettenreaktion) am Lightcycler wurde die Expression von IL-8-mRNA (messenger ribonucleic acid) untersucht. Die Werte wurden auf die Kontrollwerte (GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bezogen. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen.

Adiponektin

Nach Stimulation der Adipozyten mit aufsteigenden Ghrelinkonzentrationen (0,1-1000 nM) und der Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen nach 24 Stunden abgeerntet und RNA präpariert.

Es zeigte sich keine nennenswerte Veränderung der mRNA-Expression von Adiponektin im Vergleich zur Medien- und Lösungsmittelkontrolle (Abb. 14).

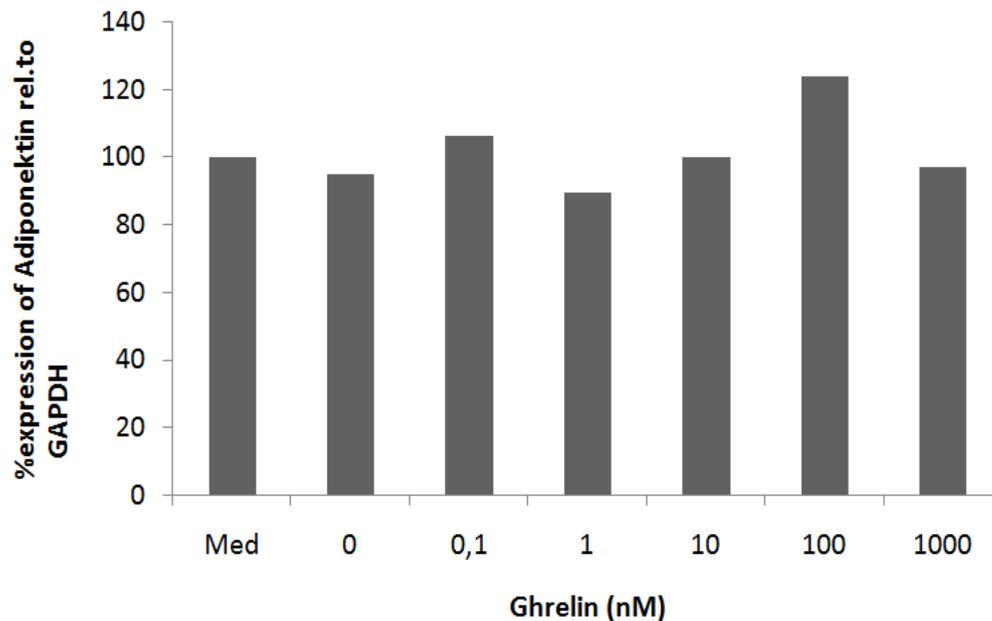


Abb. 14: Einfluss von Ghrelin auf die Expression von Adiponektin

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Adipozyten wurden in serumfreiem Zellkulturmedium und aufsteigenden Konzentrationen von Ghrelin beziehungsweise Lösungsmittel (0 nM) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA (ribonucleic acid) präpariert. Mittels Real Time PCR (Polymerase Kettenreaktion) am Lightcycler wurde die Expression von Adiponektin-mRNA (messenger ribonucleic acid) untersucht. Die Werte wurden auf die Kontrollwerte (GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bezogen. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen.

4. Diskussion

Beim Menschen wird das Nahrungsverhalten durch verschiedene Peptidhormone beeinflusst. Das bisher einzige bekannte Appetit anregende Hormon Ghrelin reguliert über einen zentralnervösen Mechanismus nicht nur die Nahrungsaufnahme (7), sondern auch das Körpergewicht (42). Dabei spielen die appetitstimulierenden Peptide Neuropeptid Y und Agouti-related Peptide im Nucleus arcuatus eine wichtige Rolle. Gene, die für Neuropeptid Y und Agouti-related Peptide kodieren werden von Ghrelin induziert (21).

Die normale Plasmakonzentration von n-oktanoyliertem Ghrelin beim Menschen beträgt 10-20 fmol/ml. Die Gesamtkonzentration, die auch nicht-modifiziertes Ghrelin enthält, beträgt 100-150 fmol/ml (21). Sie unterliegt tageszeitlichen Schwankungen, denn es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Ghrelinspiegel und dem Hungergefühl (7). Bei der Probengewinnung und Messung der Ghrelinkonzentration im Plasma und auch im Gewebe entsteht das Problem, dass das Peptid Ghrelin durch Proteasen verdaut und die acyl-Modifikation abgespalten werden kann. Aus diesem Grund müssen diese Proteasen inaktiviert werden, um modifiziertes Ghrelin intakt zu halten und korrekt messen zu können (21).

In menschlichem Gewebe wie Knochen konnte man bereits eine Dosis-Wirkungsbeziehung von Ghrelin nachweisen. Experimente mit humanen Osteoblasten zeigten eine dosisabhängige Stimulation der Proliferation (9). Bei Untersuchungen mit einem synthetischen Ghrelinaagonisten am Menschen kam es sowohl bei der oralen als auch bei der intraduodenalen Gabe zu einem schnellen, dosisabhängigen Anstieg seiner Plasmakonzentration, außerdem zu einem dosisabhängigen Konzentrationsanstieg von Wachstumshormon (36). Bereits durchgeführte Studien mit intravenöser Ghrelingabe zeigten eine Stimulation der Magenentleerung (25), außerdem eine Stimulation des Appetits und der Nahrungsaufnahme sowohl bei Gesunden als auch bei Tumorpatienten mit Appetitlosigkeit (48, 31). Ein stimulierender Effekt auf Wachstumshormon zeigte sich nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Versuchen mit Kälbern (43). Ghrelin kann auch oral verabreicht werden und ist somit von klinischem Interesse. Die Verfügbarkeit von oralem Ghrelin und seine zahlreichen Wirkungen auf den Organismus zeigen die Bedeutung von Ghrelin für die klinische Anwendung.

Interessant ist hierbei die Erkenntnis, dass Ghrelin direkt auf periphere Gewebe, wie z.B. das Fettgewebe wirkt (6, 13, 17, 33, 35, 44, 51). Im Fettgewebe werden die beiden bisher bekannten Rezeptoren für Ghrelin, GHS-R 1a und 1b exprimiert. Außerdem bilden Fettzellen das Hormon Ghrelin selbst (14, 20). Unsere Untersuchungen zum Einfluss von Ghrelin auf die Biologie der Fettzelle wurden im Gegensatz zu den bisherigen Arbeiten an einem humanen Zellsystem durchgeführt.

Humane SGBS Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen, nämlich Präadipozyten, differenzierende und auch „reife“ Adipozyten bilden sowohl Ghrelin, als auch die Rezeptoren GHS-R1a und 1b. Ghrelin könnte also lokal in einem auto-/parakrinen Mechanismus wirken. Die Frage, inwiefern die Größe des Fettgewebes möglicherweise durch Ghrelin beeinflusst werden kann, ist von wissenschaftlicher Bedeutung.

Die Größe des Fettgewebes wird zum einen durch das Volumen und zum anderen durch die Anzahl der Fettzellen bestimmt. Beides kann sich lebenslang ändern, da man im Fettgewebe während der gesamten Lebensspanne Vorläuferzellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen findet, die sich teilen und in reife Adipozyten differenzieren können (53). Zudem unterliegt das Volumen der Fettzellen Veränderungen durch Lipogenese und Lipolyse. Inwiefern das Peptidhormon Ghrelin diese Vorgänge beeinflusst war Gegenstand unserer Untersuchungen. Ghrelin stimulierte die Proliferation von SGBS Präadipozyten konzentrations- und zeitabhängig. Die mikroskopische Zellzählung zeigte unter dem Einfluss von Ghrelin (10 nM und 1000 nM) eine gesteigerte Proliferation. Analog findet sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der ³H-Thymidininkorporation in die DNA bei Ghrelinkonzentrationen von 1-1000 nM als Zeichen vermehrter Zellteilungsaktivität.

Ghrelin bewirkt auch in allen anderen bisher untersuchten Zellsystemen, wie zum Beispiel in murinen 3T3-L1 Zellen (17), Ghrelin überexprimierenden transfizierten 3T3-L1 Zellen (51), humanen Tumorzellen (16, 30) und in humanen Osteoblasten (9) eine Zunahme der Proliferation.

Neben der Proliferation spielt die Fettgewebsdifferenzierung und damit Speicherung von Fett in den Adipozyten eine wichtige Rolle zur Beurteilung der Adipogenität von Ghrelin. Ghrelin beeinflusste jedoch in unseren Experimenten die Differenzierungsrate nicht. Sie war weder mikroskopisch noch in der Menge der gespeicherten Lipidtropfen verändert. Ebenso verhalten sich murine braune Adipozyten unter dem Einfluss von Ghrelin (33). Untersuchungen an weißem Fettgewebe von Ratten zeigen jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Ghrelin bewirkt dort eine Stimulation der Differenzierung. Choi et al. fanden neben einer gesteigerten Differenzierungsrate auch eine Erhöhung der GPDH Aktivität als Zeichen vermehrter Differenzierung (6). Ebenso findet sich bei murinen 3T3-L1 Zellen eine gesteigerte Differenzierung (17) und auch in vivo Untersuchungen zeigen, dass Ghrelin über einen direkten peripheren Mechanismus die Adipogenese stimuliert (44).

Andererseits findet Zhang et al. in mit Ghrelin-Plasmid transfizierten 3T3-L1 Zellen eine hemmende Wirkung von Ghrelin auf die Differenzierung (51). Die Diskrepanz der Ergebnisse können letztlich sowohl auf unterschiedliche Zellsysteme und Ghrelinkonzentrationen, wie auch unterschiedliche Methodik zum Nachweis der Differenzierung zurückgeführt werden. So ist die GPDH Aktivitätsmessung kein direkter Nachweis vermehrter Differenzierung.

Unsere Untersuchungen in humanen SGBS Fettzellen deuten darauf hin, dass Ghrelin die Anzahl der Vorläuferzellen erhöht, aber keinen direkten Einfluss auf den Differenzierungsprozess hat.

Außerdem stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob sich das Volumen der Fettzellen durch gesteigerte Lipogenese verändert. SGBS Adipozyten verhalten sich biochemisch und funktionell wie humane, primäre Fettzellen (46). Sie sind zur de novo Lipogenese fähig, also der Synthese von Triglyceriden aus Glukose. Ghrelin bewirkte in unseren Experimenten eine Zunahme der basalen Lipogenese, jedoch eine Abnahme der insulinstimulierten Lipogenese.

Bisher wurde der Einfluss von Ghrelin auf die Lipogenese noch nicht untersucht. Andere Arbeiten an Maus- oder Ratten-Zellmodellen beschäftigen sich mit dem Einfluss von Ghrelin auf die Glukoseaufnahme. Hier zeigen sich je nach verwendetem Zellsystem jedoch gegensätzliche Ergebnisse. Ott et al. konnten weder einen Effekt auf die basale, noch auf die insulinstimulierte Glukose-Aufnahme brauner Fettzellen feststellen (33). Bei murinen 3T3-L1 Zellen kam es hingegen in Gegenwart von Ghrelin zu einer Erhöhung sowohl des basalen, als auch des insulinstimulierten Glukosetransportes, wobei diese Effekte über den PI3K/Akt Signalweg vermittelt wurden (17). Versuche an epididymalem Fettgewebe von Ratten zeigten auch eine signifikante Erhöhung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme. Während Ghrelin allein jedoch keinen Einfluss hatte, wurde ein synergistischer Effekt in Gegenwart von Insulin vermutet (35). Unsere Beobachtungen legen jedoch nahe, dass Ghrelin in Gegenwart von Insulin einen gegensätzlichen Effekt hat. Bekräftigt wird dies durch den Einfluss von Ghrelin auf den Akt/GSK-3-Signalweg. Dieser Signalweg ist unter anderem an der Regulation der Lipogenese beteiligt. Insulin bewirkte die zu erwartende Phosphorylierung von Akt und GSK-3. Ghrelin zeigte im Vergleich zu Insulin eine etwas weniger starke Phosphorylierung und in Gegenwart von Insulin eine Verminderung. Ebenso wird die Akt-Kinase Aktivität in humanen Lebertumorzellen sowohl durch Ghrelin allein, als auch in Gegenwart von Insulin gehemmt. Dagegen kommt es durch Insulin allein zu einer gesteigerten Aktivität (30).

Ghrelin wirkt jedoch auch über andere Signalwege und stimuliert zum Beispiel die p42/p44 MAP-Kinase in murinen braunen Fettzellen ohne weiteren Einfluss auf den JAK/STAT-, p38 Stresskinase-, Proteinkinase A- und Phosphatidylinositol 3-Kinase-Signalweg (33). Der MAP-Kinase Signalweg wird auch in 3T3-L1 Adipozyten durch Phosphorylierung aktiviert (51). Außerdem wird durch Ghrelin der Glukosetransport über den PI3k/Akt Signalweg stimuliert (17).

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass Ghrelin die Lipogenese in humanen Fettzellen möglicherweise über den Akt/GSK-3 Signalweg reguliert.

Für die Entstehung der Adipositas-assoziierten Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2 oder auch Atherosklerose spielt das Fettgewebe als endokrines Organ eine wichtige Rolle (19, 47). Mittlerweile kennt man etwa 100 verschiedene Sekretionsprodukte des Fettgewebes, die sogenannten Adipokine. Von großem Interesse sind mögliche Einflüsse von Ghrelin auf die Adipokinexpression. In dieser Arbeit wurden speziell die Adipokine Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Adiponektin untersucht.

Etwa 15-30% des Gesamtanteils von IL-6 im Serum stammen vom Fettgewebe (1, 15, 37). Der Hauptanteil des vom Fettgewebe sezernierten IL-6 stammt nicht nur von Präadipozyten, sondern auch von Makrophagen, die das Fettgewebe infiltrieren. Bei Adipositas ist der Plasmaspiegel von IL-6 im Vergleich zu Normalgewichtigen um das Zehnfache erhöht (15). Diese chronische Entzündung scheint eine Rolle, bei der Entstehung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen zu spielen. So findet sich bei Adipositas eine erhöhte IL-6 Produktion des weißen Fettgewebes die zu einer vermehrten Produktion von C-reaktivem Protein (CRP) in der Leber führt. CRP wiederum ist ein Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Veränderungen (1, 24). Somit besteht eine Assoziation zwischen der chronischen Inflammation und der Adipositas-assoziierten Atherosklerose. Interessanterweise findet sich unter dem Einfluss von Ghrelin dosisabhängig eine Zunahme der mRNA-Expression von IL-6 in SGBS Zellen.

Auch bei der mRNA Expression eines weiteren proinflammatorischen Zytokins, dem IL-8 (4), bewirkt Ghrelin einen dosisabhängigen Anstieg. Das Fettgewebe sezerniert kontrolliert Zytokine. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl kultiviertes Fettgewebe als auch isolierte Adipozyten IL-8 produzieren und sezernieren. Die IL-8-Sekretion wird durch die proinflammatorischen Zytokine TNFalpha und IL-1beta stimuliert und durch das antiinflammatorische Glukokortikoid Dexamethason inhibiert (4). Der Plasmaspiegel von IL-8 ist wie IL-6 bei adipösen Patienten im Vergleich zu Normalgewichtigen erhöht (5, 39) und ist möglicherweise an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt. Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-8 die endotheliale Monozytenadhäsion, die Zellmigration von glatten Muskelzellen, die Schaumzellbildung aus Makrophagen und die Instabilität atherosklerotischer Plaques fördert und so in die Entwicklung von Atherosklerose involviert ist (39). Wie bei IL-6 sind die Hauptproduzenten von IL-8 eigentlich Monozyten, Makrophagen und auch Endothelzellen (38, 39). Interessanterweise ist die IL-8-Sekretion in Präadipozyten am höchsten und nimmt im Laufe der Differenzierung stark ab (3).

Unsere Ergebnisse zeigen eine gesteigerte mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 durch Ghrelin. Bei Adipositas ist der Plasma-Ghrelinspiegel erniedrigt (8). Die lokale Ghrelinexpression im Fettgewebe von übergewichtigen Personen ist jedoch vergleichbar mit der von Normalgewichtigen und es besteht keine Korrelation zwischen der Ghrelinexpression im Fettgewebe und seiner Serumkonzentration (18).

Welche tatsächliche Bedeutung Ghrelin in vivo für die Expression inflammatorischer Zytokine im Fettgewebe hat bleibt offen.

Neben IL-6 und IL-8 wurde die Expression von Adiponektin untersucht. Es ist wegen seiner antidiabetischen, antiatherogenen und antiinflammatorischen Wirkung für die Adipositas-therapie von Bedeutung (2, 19, 26, 34, 37, 52). Präadipozyten exprimieren kein Adiponektin, die Expression und Sekretion nimmt jedoch während der adipogenen Differenzierung zu und erreicht ein Maximum bei reifen Adipozyten (2, 19, 37). Im humanen Serum liegt es in einer Konzentration von etwa 10 µg/ml vor und macht mit 0,01% einen relativ hohen Anteil am Gesamtserumprotein aus. Ein konstanter Adiponektinspiegel ist für den Metabolismus wichtig, was sich an den Folgen von Adipositas zeigt. Obwohl Adiponektin ausschließlich von reifen Adipozyten exprimiert und sezerniert wird, findet sich bei Adipositas überraschenderweise eine Hypoadiponektinämie (2, 19, 37). Dabei scheint vor allem die Menge des viszeralen Fettgewebes ausschlaggebend zu sein, da Adiponektin dort im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe in geringeren Konzentrationen vorliegt (27). Niedrige Adiponektin-Plasmaspiegel könnten bei Adipositas unter anderem für die Entstehung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen verantwortlich sein. Adiponektin-knockout-Mäuse zeigen unter einer Glukose- und Fett-reichen Diät eine gestörte Glukosetoleranz und entwickeln eine Insulinresistenz, die sich unter Adiponektinsupplementation deutlich verbessert (26). Adiponektin wirkt außerdem antiatherogen, denn Patienten mit einer Hypoadiponektinämie haben ein höheres Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit als Patienten mit normalen Adiponektinspiegeln (23).

In unseren Versuchen beeinflusste Ghrelin die mRNA-Expression von Adiponektin nicht, während Ghrelin bei murinen braunen Fettzellen die mRNA-Expression von Adiponektin jedoch um etwa 50% inhibiert (33). Obwohl braunes Fettgewebe ähnliche Eigenschaften wie weißes Fettgewebe aufweist besitzt es eine grundsätzlich andere Funktion, indem es nicht als Fettspeicher dient, sondern für Thermogenese zuständig ist. Ghrelin zeigte keinen Einfluss auf die Thermogenese (33).

5. Zusammenfassung

Ghrelin ist ein Peptidhormon, dessen Hauptsyntheseort die Mukosa des Magenfundus und des Pankreas ist. Diese Arbeit untersuchte den Einfluss von Ghrelin auf die Biologie humaner Fettzellen. Verwendet wurden humane SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten, die man *in vitro* zu reifen, lipidgefüllten Adipozyten differenzieren kann. Von Interesse war der Einfluss sowohl auf die Größe und metabolische Funktion als auch auf wichtige Signalmoleküle und die endokrine Funktion des Fettgewebes.

Der Einfluss von Ghrelin auf die Proliferation und Differenzierung wurde mittels mikroskopischer Bestimmung der Zellzahl und ³H-Thymidininkorporation sowie durch mikroskopische Bestimmung der Differenzierungsrate und Red Oil Färbung untersucht.

Die Lipogenese wurde an reifen Adipozyten beobachtet, an denen nach Inkubation mit ¹⁴C-Glucose der Glukose-Einbau mit Hilfe eines β -Counters gemessen wurde.

Um die Wirkung auf wichtige Signalmoleküle, wie Proteinkinase (Akt) und Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) zu untersuchen, wurden ein Phospho-MAPK (mitogen-aktivierte-Proteinkinase)-Protein-Array sowie anschließend Westernblots durchgeführt.

Der Einfluss auf die endokrine Funktion der Fettzelle wurde an Präadipozyten bzw. an Adipozyten untersucht, indem die Expression von Interleukin 6 und 8 bzw. Adiponektin mittels Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) am Lightcycler getestet wurde.

Ghrelin stimulierte die Proliferation von Präadipozyten, hatte jedoch keinen Einfluss auf die adipogene Differenzierung. Desweiteren kam es unter Ghrelin zu einer Zunahme der basalen Lipogenese und zu einer Hemmung der insulinstimulierten Lipogenese. Ghrelin beeinflusste die Lipogenese über den Akt/GSK3-Signalweg. Somit zeigen diese *in vitro* Studien, dass Ghrelin sowohl auf die Größe, als auch den Metabolismus humaner SGBS Fettzellen Einfluss nimmt. Interessanterweise wurde auch die endokrine Funktion der Fettzellen durch Ghrelin beeinflusst, indem es die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 stimulierte. Die Expression von Adiponektin wurde durch Ghrelin nicht verändert.

Aufgrund der hier aufgezeigten Wirkungsweise von Ghrelin mit direkten Effekten an humanen Fettzellen selbst erscheint der Einsatz von Ghrelinrezeptorantagonisten in der Adipositastherapie sinnvoll. Neben einem positiven Effekt auf die Appetitregulation ergeben sich möglicherweise auch periphere Effekte, wie eine Verminderung der Fettgewebszahl und der Expression inflammatorischer Zytokine. Weiterführende Untersuchungen an *in vivo* Modellen sind notwendig, um bisherige Ergebnisse zu bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B** 2006 Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17:4-12
2. **Böttner A, Kratzsch J, Müller G, Kapellen TM, Blüher S, Keller E, Blüher M, Kiess W** 2004 Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4053-4061
3. **Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, Pedersen SB, Schiott KM, Fain JN, Richelsen B** 2004 Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E8-13
4. **Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B** 2001 Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1267-1273
5. **Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B** 2003 Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. *Eur J Endocrinol* 148:535-542
6. **Choi K, Roh S, Hong y, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S** 2003 The Role of ghrelin and Growth Hormone Secretagogues Receptor on Rat Adipogenesis. *Endocrinology* 44:754-759
7. **Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS** 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719
8. **Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen P, Marina K, Dellinger EP, Purnell JQ** 2002 Plasma Ghrelin levels After Diet-Induced Weight Loss or Gastric Bypass Surgery. *N Engl J Med* 346:1623-1630
9. **Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van der Velde M, Gauna C, Pols HAP, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JPTM** 2006 Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK) / phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol* 188:37-47

10. **Esler WP, Rudolph J, Claus TH, Tang W, Barucci N, Brown SE, Bullock W, Daly M, DeCarr L, Li Y, Milardo L, Molstad D, Zhu J, Gardell SJ, Livingston JN, Sweet LJ** 2007 Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148:5175-5185
11. **Fischer-Posovszky P, Wabitsch M** 2004 Entwicklung und Funktion des Fettgewebes. *Monatsschrift Kinderheilkd* 152:834-842
12. **Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z** 2007 Endocrinology of Adipose Tissue – An Update. *Horm Metab Res* 39:1-8
13. **Giovambattista A, Piermaria J, Suescun MO, Calandra RS, Gaillard RC, Spinedi E** 2006 Direct Effect of Ghrelin on Leptin Production by Cultured Rat White Adipocytes. *Obesity* 14:19-27
14. **Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M** 2002 The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2988
15. **Greenberg AS, Obin MS** 2006 Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 83:461S-465S
16. **Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK** 2002 Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol* 172:R7-11
17. **Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park Jy, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS** 2004 The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2291-2301
18. **Knerr I, Herzog D, Rauh M, Rascher W, Horbach T** 2006 Leptin and ghrelin expression in adipose tissues and serum levels in gastric banding patients. *Eur J Clin Invest* 36:389-394
19. **Koerner A, Kratsch J, Kiess W** 2005 Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:525-546

20. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K** 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660
21. **Kojima M, Kangawa K** 2005 Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85:495-522
22. **Kos K, Harte AL, O'Hare PJ, Kumar S, McTerman PG** 2008 Ghrelin and the differential regulation of des-acyl and oct-anoyl ghrelin in human adipose tissue. *Clin Endocrinol* 70:383-389
23. **Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2003 Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:85-89
24. **Langenberg C, Bergstrom J, Scheidt-Nave C, Pfeilschifter J, Barrett-Connor E** 2006 Cardiovascular death and the metabolic syndrome: role of adiposity-signaling hormones and inflammatory markers. *Diabetes Care* 29:1363-1369
25. **Levin F, Edholm T, Schmidt PT, Gryback P, Jacobsson H, Degerblad M, Hoybye C, Holst JJ, Rehfeld JF, Hellstrom PM, Naslund E** 2006 Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3296-3302
26. **Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okumoti K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2002 Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ARCP30. *Nat Med* 8:731-737
27. **Matsuzawa Y** 2006 Therapie Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3:35-42
28. **Muccioli G, Baragli A, Granata R, Papotti M, Ghigo E** 2007 Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. *Neuroendocrinology* 86:147-164
29. **Muccioli G, Tschöp M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E** 2002 Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 440:235-254

30. **Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K** 2002 Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277:5667-5674
31. **Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, Bloom SR** 2004 Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2832-2836
32. **Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2002 Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106:2767-2770
33. **Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Perwitz N, Klein HH, Tschöp M, Klein J** 2002 Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 34:640-645
34. **Ouchi N, Shibata R, Walsh K** 2006 Targeting adiponectin for cardioprotection. *Expert Opin Ther Targets* 10:573-581
35. **Patel AD, Stanley SA, Murphy KG, Frost GS, Gardiner JV, Kent AS, White NE, Ghatei MA, Bloom SR** 2006 Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regulatory peptides* 134:17-22
36. **Piccoli F, Degen L, MacLean C, Peter S, Baselgia L, Larsen F, Beglinger C, Drewe J** 2007 Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of an oral ghrelin agonist in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1814-1820
37. **Rondinone CM** 2006 Adipocyte-derived hormones, cytokines and mediators. *Endocrine* 29:81-90
38. **Strackowski M, Dzienis-Strackowska S, Stepień A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I** 2002 Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- α system. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4602-4606
39. **Strackowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Strackowska S, Szelachowska M, Kinalska I** 2003 Plasma interleukin-8 concentrations in obese subjects with impaired glucose tolerance. *Cardiovasc Diabetol* 2:5

40. **Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG** 2008 Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology* 149:843-850
41. **Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2000 Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908-4911
42. **Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Castaneda TR, Muzzin P, Schürmann A, Szanto I, Tschöp MH, Rohner-Jeanrenaud F** 2006 Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 116:1983-1993
43. **ThidarMyint H, Yoshida H, Ito T, Kuwayama H** 2006 Dose-dependent response of plasma ghrelin and growth hormone concentrations to bovine ghrelin in Holstein heifers. *J Endocrinol* 189:655-664
44. **Thompson NM, Gill DAS, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson ICAF, Wells T** 2004 Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 145:234-242
45. **Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML** 2001 Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707-709
46. **Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin K-M, Hauner H** 2001 Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *International Journal of Obesity* 25:8-15
47. **Wang B, Trayhurn P** 2006 Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflugers Arch* 452:418-427
48. **Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5992

49. **Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DGA, Ghatei MA, Bloom SR** 2000 The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinol* 141:4325-4328
50. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T** 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946
51. **Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, Mulholland MW** 2004 Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* 15:2484-2491
52. **Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno G; Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Buemi M, Nicocia G, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2002 Adiponectin, metabolic risk factors and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13:134-141
53. **Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH** 2002 Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-429

Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht an meinen Doktorvater Professor Dr. Martin Wabitsch. Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Carsten Posovszky und an Dr. Pamela Fischer-Posovszky, die mir immer mit viel Geduld und ihren Erfahrungen zur Seite standen. Auch möchte ich mich für die wichtige Unterstützung innerhalb meiner Arbeitsgruppe bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären. Mein Dank geht auch an meinem Freund, der mich unterstützt und immer wieder aufgebaut hat.