

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**Das Melanokortin ACTH stimuliert direkt das
thermogenetische „*uncoupling protein-1*“ in braunen
Fettzellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– AUS DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT –

vorgelegt von
Arne Schwartz
aus Itzehoe

Lübeck, 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Sperner

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.09.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Adipositas	7
1.1.1	Regulation des Energiehaushaltes.....	7
1.1.2	Metabolisches Syndrom.....	7
1.2	Funktionen des Fettgewebes	8
1.2.1	Insulinsensitivität	9
1.2.2	Endokrine Aktivität.....	9
1.2.3	Thermogenese und braunes Fettgewebe.....	10
1.3	Melanokortine	11
1.3.1	Melanokortine - Stressachse.....	12
1.3.2	Melanokortine - Fettgewebe.....	13
1.4	Zusammenfassendes Schaubild.....	14
1.5	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Zelllinie.....	16
2.1.2	Antikörper.....	16
2.1.3	Inhibitoren	16
2.1.4	Verbrauchsartikel	16
2.1.5	Chemikalien	17
2.1.6	<i>Primer</i>	18
2.1.7	Geräte.....	18
2.1.8	Selbst hergestellte Lösungen und Puffer.....	19
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.2	Zelldifferenzierung	22
2.2.3	Zellstimulation.....	23
2.3	<i>Oil-Red-O</i> -Färbung.....	23
2.4	Gelelektrophorese und <i>Western Blot</i>	23
2.4.1	Stimulation	23
2.4.2	Zelllyse und Gewinnung der Zytosolfraktion.....	24

2.4.3	Proteintrennung.....	24
2.4.4	<i>Western Blot</i>	24
2.5	RT-PCR.....	25
2.5.1	Stimulation.....	25
2.5.2	RNA-Isolation.....	26
2.5.3	RNA-Aufreinigung.....	26
2.5.4	cDNA-Synthese.....	27
2.5.5	<i>Real-Time</i> Polymerase-Ketten -Reaktion (RT-PCR).....	27
2.6	Statistische Auswertung.....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Auswirkung von ACTH auf die Fettzellendifferenzierung.....	29
3.2	Wirkung von ACTH auf UCP-1.....	29
3.2.1	Zeitabhängige Aktivierung der UCP-1 Proteinexpression durch ACTH....	30
3.2.2	Dosisabhängige Aktivierung der UCP-1 Proteinexpression durch ACTH..	31
3.2.3	Zeitabhängige Wirkung von ACTH auf die UCP-1 Expression..... auf RNA-Ebene.....	32
3.3	Einfluss von ACTH auf die Signalelemente der intraadipozytären Signalwege..	33
3.3.1	Phosphorylierung von p38 MAPK.....	34
3.3.2	Phosphorylierung von p44/42 MAPK.....	35
3.3.3	Phosphorylierung von Akt.....	36
3.4	Signalmechanismus für die UCP-1 Aktivierung.....	37
3.4.1	Inhibition der UCP-1 Proteinexpression durch p38 MAPK..... Inhibitor SB202,190.....	38
3.4.2	Wirkung von MAPK Inhibitor PD98059 auf die UCP-1 Expression.....	39
3.4.3	Wirkung von PI 3-Kinase Inhibitor LY294002 auf die UCP-1 Expression	40
3.5	Einfluss von ACTH auf Leptin als systemischen Mediator.....	41
4	Diskussion.....	42
4.1	Direkte Aktivierung der UCP-1 Expression durch ACTH.....	43
4.2	Mechanismus der UCP-1 Aktivierung.....	44
4.3	Transiente Suppression der Leptin-Expression.....	46
4.4	Gewonnene Erkenntnisse.....	48
4.5	Abschließendes Schaubild.....	49
4.6	Ausblick.....	50

5	Zusammenfassung	52
6	Abkürzungsverzeichnis	53
7	Literaturverzeichnis	56
8	Danksagung	62
9	Curriculum Vitae.....	63

Aus dieser Dissertation sind folgende Publikationen hervorgegangen:

Originalartikel:

1. Iwen K.A.H., **Schwartz A***, Senyaman O*, Drenckhan M, Meier B, Perwitz N, Klein J: Melanocortin crosstalk with adipose functions: ACTH directly induces insulin resistance, promotes a pro-inflammatory adipokine profile, and stimulates UCP-1 in adipocytes. (in press, J Endocrinol.)
(* gleichberechtigte Autoren)

Präsentationen auf internationalen Fachkongressen:

1. Senyaman O, **Schwartz A**, Iwen K.A.H., Papenfuss K, Drenckhan M, Meier B, Perwitz N, Klein J: Melanocortin crosstalk with metabolic and endocrine adipose functions: ACTH directly induces insulin resistance, promotes a pro-inflammatory adipokine profile, and stimulates UCP-1 in adipocytes. *88th Annual Meeting of the Endocrine Society, Boston (2006).*

1 EINLEITUNG

1.1 ADIPOSITAS

Weltweit ist die Adipositasinzidenz bei Erwachsenen und Kindern in alarmierendem Umfang zunehmend und nimmt pandemische Ausmaße an.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) belegt diese Aussage mit dramatischen Hochrechnungen. So werden 2015 circa 2,3 Billionen Erwachsene übergewichtig sein und mehr als 700 Millionen Erwachsene adipös, wobei übergewichtig definiert ist als ein *Body Mass Index* (BMI) von 25-30 kg/m² und adipös als ein BMI von 30-40 kg/m² (Garrow und Webster, 1985). Im Jahre 2005 waren mindestens 20 Millionen Kinder im Alter unter 5 Jahren weltweit übergewichtig

(WHO, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>

(Tag des Zugriffs:23.11.2007)).

1.1.1 Regulation des Energiehaushaltes

Das Paradigma des Energiehaushaltes ist, dass Adipositas nur dann entstehen kann, wenn die Energieaufnahme den Energieverbrauch des Organismus übersteigt. Die überschüssige Energie wird dann in Form von Fettgewebe gespeichert. Sowohl bei den insgesamt seltenen sekundären Adipositasformen, z. B. im Rahmen endokriner Erkrankungen wie des Cushing-Syndroms, als auch bei den noch selteneren monogenetischen Ursachen, wie z.B. dem Leptin-Gendefekt, ist letztlich immer eine positive Energiebilanz Ursache der Adipositas.

Zunehmendes Überangebot an kalorienreichen, fett- und zuckerhaltigen Nahrungsmitteln bei gleichzeitig eklatantem Rückgang körperlicher Bewegung sind neben genetischen Faktoren die Hauptgründe für das Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Als Folge stehen Adipositas und Energieverwertung in untrennbarem Zusammenhang.

Der Energiegesamtumsatz setzt sich zusammen aus dem Ruhenüchternumsatz (RNU), der physischen Aktivität (PA) und der adaptiven Thermogenese (ATH), wobei der RNU 65 %, die PA 25 % und die ATH 10 % des Energiegesamtumsatzes ausmachen.

Adaptive Thermogenese beschreibt die Wärmeproduktion durch Stimuli wie Kälte oder Nahrungsaufnahme.

1.1.2 Metabolisches Syndrom

Adipositas erhöht das Risiko für das Auftreten von Stoffwechselstörungen, wie Insulinresistenz, Dyslipidämie und arteriellen Hypertonus – den klinischen Manifestationen

des Metabolischen Syndroms (Isomaa, 2003), das als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Diabetes mellitus, Atherosklerose und kardiovaskulären Krankheiten angesehen wird (DeFronzo und Ferrannini, 1991; Reaven, 1993; Laakso, 1999).

Weitere Komplikationen von Adipositas sind Hyperurikämie, respiratorische Störungen, zerebraler Insult, Fettleber, Schlaf–Apnoe-Syndrom und orthopädische Probleme.

Selbst für einige Krebserkrankungen, wie z.B. für Karzinome von Kolon, Pankreas oder Ösophagus konnte bei Adipösen ein deutlich erhöhtes Risiko nachgewiesen werden (Calle *et al.*, 2003).

Weltweit führen Adipositas und die Folgeerkrankungen zu mehr Sterbefällen als HIV-Infektionen verursachen.

Vor diesen genannten Hintergründen sind erhebliche sozioökonomische Belastungen für das Gesundheitssystem und die Gesellschaft absehbar, so dass die Adipositas aktuell eines der vordringlichsten gesundheitsbezogenen Probleme der Gesellschaft darstellt.

Die pathophysiologischen Grundlagen des Metabolischen Syndroms sind Gegenstand der aktuellen Forschung und werden auf eine Dysregulation der Energiehomöostase zurückgeführt. Zu berücksichtigen sind neben genetischen Faktoren und Umweltfaktoren auch kulturelle und psychosoziale Einflüsse (Spiegelman und Flier, 2001; Pittas *et al.*, 2004). Eine zentrale Rolle in der Dysregulation der Energiehomöostase nimmt jedoch das Fettgewebe ein, das durch Entdeckungen neuer Regelkreise und Funktionen in den Mittelpunkt intensiver Forschung gerückt ist.

1.2 FUNKTIONEN DES FETTGEWEBES

Allgemein lässt sich das Fettgewebe in weißes und braunes Fettgewebe unterscheiden.

Das weiße Fettgewebe speichert Energie in Form von Triazylglyzeriden und gibt sie bei Bedarf über die Lipolyse in Form von freien Fettsäuren wieder ab.

Das braune Fettgewebe hat eine thermogenetische Funktion und kann über die Thermogenese Energie in Form von Wärme abgeben.

Mit der Entdeckung des Fettgewebshormons Leptin (Zhang *et al.*, 1994) ist das Fettgewebe in den Fokus der Forschung getreten und wird nunmehr als das größte, endokrin aktive Organ angesehen, das eine zentrale Rolle in der Regulation der Energiehomöostase einnimmt (Rajala und Scherer, 2003).

Auf die verschiedenen Funktionen des Fettgewebes soll nun eingegangen werden.

1.2.1 Insulinsensitivität

Insulin ist ein wichtiges Hormon für die Aufrechterhaltung einer normalen Blutzuckerkonzentration. Es induziert die Glukoseaufnahme in Insulin-sensitiven Geweben wie Skelettmuskulatur und Fettzellen.

Nach Bindung an den Insulinrezeptor wird dessen intrinsische Kinaseaktivität ausgelöst und führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors (Saltiel und Kahn, 2001). Nachfolgend kommt es zur Bindung sowie Phosphorylierung weiterer Moleküle wie der Insulinrezeptorsubstrate IRS-1 und IRS-2.

Die IRS-Moleküle ermöglichen das Andocken und die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase), die ihrerseits die Aktivierung weiterer Signalmoleküle wie Akt und p70S6 vermittelt (White, 1998). Biologische Endpunkte der PI 3-Kinase sind Glukoseaufnahme, Proteinsynthese und Lipogenese. Ein anderer IRS-Molekül-Signalweg führt zur Aktivierung der *mitogen activated protein kinase* (MAPK), die Gentranskription und Zellproliferation steuert (Saltiel und Kahn, 2001).

In Experimenten zeigte sich, dass Störungen in der Insulinsignalvermittlung in braunem oder in weißem Fettgewebe von Mäusen zu systemischem Auftreten von schweren Stoffwechselstörungen und sogar Veränderungen der Lebenserwartung führten (Guerra *et al.*, 2001b; Bluher *et al.*, 2002; Bluher *et al.*, 2003; Minokoshi *et al.*, 2003).

Fettspezifische Deletion des Insulinrezeptors schützt vor Adipositas und systemischer Glukoseintoleranz (Blüher *et al.*, 2002). Selektive Veränderungen der intrazellulären Signalsysteme im Fettgewebe und somit der Insulinsensitivität des Fettgewebes haben wesentliche systemische Auswirkungen, besonders hinsichtlich der Glukosetoleranz des Organismus (Minokoshi *et al.*, 2003).

1.2.2 Endokrine Aktivität

Die Entdeckung des Fettgewebshormons Leptin stellt den Beginn der Entdeckung des Fettgewebes als endokrines Organ dar (Zhang *et al.*, 1994).

Weißes wie auch braunes Fettgewebe besitzen endokrine Aktivität. Die synthetisierten und sezernierten Substanzen werden unter dem Begriff „Adipozytokine“ zusammengefasst (Matsuzawa *et al.*, 1999).

Eine Vielzahl von weiteren vom Fettgewebe sezernierten Substanzen wurden identifiziert, die Auswirkungen haben auf die Regulation von verschiedenen physiologischen Prozessen wie z.B. Energie-/Glukosehomöostase (Leptin/Adiponectin), Inflammation (IL-6), Hämostase

(PAI-1), Blutdruckregulation (Angiotensin) und Atherosklerose (Adiponectin) (Ahima und Flier, 2000; Spiegelman und Flier, 2001; Rajala und Scherer, 2003).

Adiponectin beeinflusst die Energie- und Glukosehomöostase und die damit assoziierte Atherosklerose (Matsuda *et al.*, 2002). Bei adipösen und Diabetes-kranken Patienten ist der Adiponectin-Spiegel erniedrigt, steigt unter Gewichtsabnahme und scheint mit dem Grad der Insulinresistenz assoziiert zu sein (Berg *et al.*, 2002). Im Mausmodell erhöht Adiponectin-Gabe die Insulinsensitivität (Berg *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001) und normalisiert die durch genetischen „*Knock-out*“ des Gens erzeugte Insulinresistenz (Maeda *et al.*, 2002).

Absoluter Leptin-Mangel führt zu einer schweren Insulinresistenz (Friedman und Halaas, 1998), wobei die Gabe von Leptin bei diesen Patienten die Insulinsensitivität erhöht (Oral *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2002).

Leptin steigert über die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und β -adrenerge Rezeptoren die Lipolyse und Wärmeproduktion in Fettzellen und hemmt durch indirekte negative Rückkopplung die Leptin-Sekretion (Rayner und Trayhurn, 2001).

Die endokrine Funktion des Fettgewebes wird zudem dadurch verdeutlicht, dass ein ausgeprägter Mangel oder eine Fehlverteilung von Fettzellen wie z.B. bei der Lipodystrophie mit schweren Stoffwechselstörungen vergesellschaftet ist (O'Rahilly, 2002).

1.2.3 Thermogenese und braunes Fettgewebe

Eine weitere wichtige Funktion des Fettgewebes ist die Thermogenese.

Die zitterfreie Wärmeerzeugung ist ausschließlich dem braunen Fettgewebe vorbehalten.

Im Gegensatz zu weißem Fettgewebe ist das braune Fettgewebe sehr mitochondrienreich, hat zahlreiche kleine Fettvakuolen, ist stark vaskularisiert und von zahlreichen sympathischen Nervenfasern innerviert (Sell *et al.*, 2004). Braune Adipozyten exprimieren in den Mitochondrien das für sie spezifische „*uncoupling protein-1*“ (UCP-1) (Cannon und Nedergaard, 2004; Sell *et al.*, 2004).

UCP-1 ermöglicht die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette.

Die in dem transmitochondrialen Protonengradienten gespeicherte Energie wird nicht in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert, sondern in Form von Wärme abgegeben (Pecqueur *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus spielt für das Überleben kleiner Nagetiere in der Kälte und die Regulation des Energiehaushaltes nach Nahrungsaufnahme („Diät-induzierte Thermogenese“) eine entscheidende Rolle (Cannon und Nedergaard, 2004).

Weitere neue Isoformen des „*uncoupling protein*“ (UCP-2 bis 5) sind beim Menschen und Nagetier entdeckt worden, die aber nicht spezifisch für das braune Fettgewebe sind und deren

Funktion noch nicht gänzlich geklärt ist, jedoch thermogenetisch nicht relevant sind (Jezek *et al.*, 2004).

Die Induktion der Thermogenese wird über Schilddrüsenhormone und das sympathische Nervensystem vermittelt, wobei sich in Tierexperimenten herausgestellt hat, dass von den β -adrenergen Rezeptoren der β_3 -Rezeptor eine zentrale Rolle spielt (Lowell und Flier, 1997; Silva und Rabelo, 1997; Klein *et al.*, 2000b; Sell *et al.*, 2004).

Die Bedeutung des braunen Fettgewebes für die Energiehomöostase wird deutlich bei Mausmodellen mit „*Knock-out*“ der β -adrenergen Rezeptoren oder des Insulinrezeptors, beim Fehlen von braunem Fettgewebe oder UCP-1 Überexpression. Experimentelle Deletion aller drei Subtypen des β -Rezeptors führt zu massiver Adipositas (Bachman *et al.*, 2002). Bei selektiver Deletion des Insulinrezeptors im braunen Fettgewebe von Mäusen kommt es zu einem diabetischen Phänotyp (Guerra *et al.*, 2001a). Das Fehlen oder der Mangel an braunem Fettgewebe führt zu Insulinresistenz und Fettleibigkeit (Kozak und Harper, 2000).

UCP-1 Überexpression schützt vor Übergewicht (Collins und Surwit, 2001).

Adipöse Erwachsene weisen eine verminderte UCP-1 Expression im intraperitonealen Fett auf (Oberkofler *et al.*, 1997).

Neueste, beeindruckende Erkenntnisse widerlegen die allgemein anerkannte Aussage, dass braunes Fett nicht oder nur in irrelevantem Ausmaß im erwachsenen Menschen vorhanden sei. Positron-Emission-Tomographie (PET) Untersuchungen in der Nuklearmedizin mit ^{18}F -2-fluoro-2-deoxyglucose (FDG) zeigen, dass braunes Fettgewebe in sehr wohl relevantem Ausmaß von mehreren zehn Prozenten beim erwachsenen Menschen vorliegt und physiologisch aktiv ist (Nedergaard *et al.*, 2007).

In Zusammenschau dieser Daten und unter Berücksichtigung der aufsehenerregenden Neuentdeckungen bezüglich des Vorkommens von braunem Fettgewebe beim erwachsenen Menschen, lässt sich eine Relevanz brauner Adipozyten in der Regulation der Energiehomöostase nicht von der Hand weisen und stellt durch fokussierte Stimulation der Thermogenese in braunen Adipozyten eine mögliche therapeutische Strategie zur Behandlung des Metabolischen Syndroms dar (Lowell und Flier, 1997; Bray und Greenway, 1999; Yanovski und Yanovski, 2002).

1.3 MELANOKORTINE

Ein weiteres System, das bedeutende Auswirkungen auf die Energiehomöostase hat, ist das Melanokortinsystem (Butler, 2006; Farooqi und O'Rahilly, 2006).

Zudem hat es eine zentrale Funktion im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System (HHN-System), der sogenannten „Stressachse“ (Pasquali *et al.*, 2006), dessen Dysfunktion assoziiert ist mit Fettleibigkeit und Insulinresistenz (Rosmond, 2003).

1.3.1 Melanokortine - Stressachse

Das Melanokortinsystem besteht aus fünf bisher bekannten G-Protein-gekoppelten Melanokortin-Rezeptorsubtypen (MC-R), verschiedenen agonistisch wirksamen Spaltprodukten des Vorläuferproteins „*proopiomelanocortin*“ (POMC) wie die Peptide „*α-melanocyte-stimulating hormone*“ (α -MSH) und „*adrenocorticotropic hormone*“ (ACTH) sowie den endogenen Antagonisten Agouti und „*agouti-related peptide*“ (AGRP) (Gantz und Fong, 2003).

Aus POMC werden durch die Prohormon-Convertasen PC1 und PC2 gewebsspezifisch unterschiedliche Spaltprodukte gebildet. In der Hypophyse entsteht durch PC1 hauptsächlich ACTH, das die adrenokortikotrope Achse reguliert. Im Hypothalamus und in der Haut spaltet PC2 ACTH in α -MSH und andere Spaltprodukte weiter auf (Gantz und Fong, 2003). Melanokortine haben zentralnervöse Effekte. α -MSH wirkt beispielsweise agonistisch auf Neurone, die den Melanokortin-Rezeptorsubtyp 4 (MC4-R) exprimieren, und hemmt die Nahrungsaufnahme, während AGRP, ein Antagonist für den MC4-R, die Nahrungsaufnahme fördert. Neben den zentralnervösen Effekten haben Melanokortine weiterhin Auswirkungen auf eine Vielzahl von physiologischen Funktionen wie Thermogenese, Steroidsynthese, Pigmentation, Inflammation, Immunmodulation, Sexualfunktion und Energiehomöostase (Boston, 1999; Yeo *et al.*, 2000; Gantz und Fong, 2003).

Von den fünf bisher bekannten MC-Rezeptoren sind es die MC2-R und MC5-R, die in weißen und braunen Adipozyten exprimiert werden (Boston und Cone, 1996; Norman *et al.*, 2003).

MC3-R und MC4-R haben eine zentrale Rolle für den Energiestoffwechsel, werden in verschiedenen Geweben exprimiert und durch ACTH und α -MSH aktiviert.

Eine Deletion für den MC3- bzw. MC4-Rezeptor führt zu Adipositas (Huszar *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 2000), wobei MC4-R defiziente Mäuse Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie zeigen.

Das Melanokortinsystem nimmt eine zentrale Stellung in der HHN-Stressachse ein. Stress, Schmerzen oder Anstrengungen führen zu einer vermehrten Freisetzung von „*cortico-releasing-factor*“ (CRF) aus dem Hypothalamus. Dies wiederum bewirkt die Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse. ACTH fördert die Ausschüttung von Kortisol aus der

Nebennierenrinde. Die erhöhte Freisetzung von Katecholaminen führt ebenfalls zur erhöhten Freisetzung von ACTH, so dass in der Stresssituation CRF und Katecholamine in der Freisetzung von Kortisol synergistisch wirken. Kortisol erhöht die Glukosekonzentration im Blut und wirkt zusammen mit den freigesetzten Katecholaminen aktivierend auf das Herz-Kreislauf-System.

Melanokortine werden vermutet, an der Stress induzierten Anorexie einen zentralen Faktor zu spielen (Vergoni und Bertolini, 2000). Eine Dysregulation innerhalb der „Stressachse“ wird mit Adipositas und Insulinresistenz in Verbindung gebracht (Vicennati und Pasquali, 2000; Pasquali *et al.*, 2006).

1.3.2 Melanokortine – Fettgewebe

Wie oben beschrieben werden im weißen und braunen Fettgewebe die MC2-R und MC5-R exprimiert (Boston und Cone, 1996; Norman *et al.*, 2003). ACTH bindet an beide, MC2-R und MC5-R, α -MSH nur an MC5-R (MacNeil *et al.*, 2002). Mutationen im Gen für den MC2-R gehen beim Menschen mit einem familiären Glukokortikoid-Mangel einher (Gantz und Fong, 2003). ACTH-Mangel infolge von Mutationen im POMC-Gen führt zu früher Adipositas mit Hyperphagie (Coll *et al.*, 2004).

Mutationen im MC5-R sind mit Adipositas assoziiert (Chagnon *et al.*, 1997).

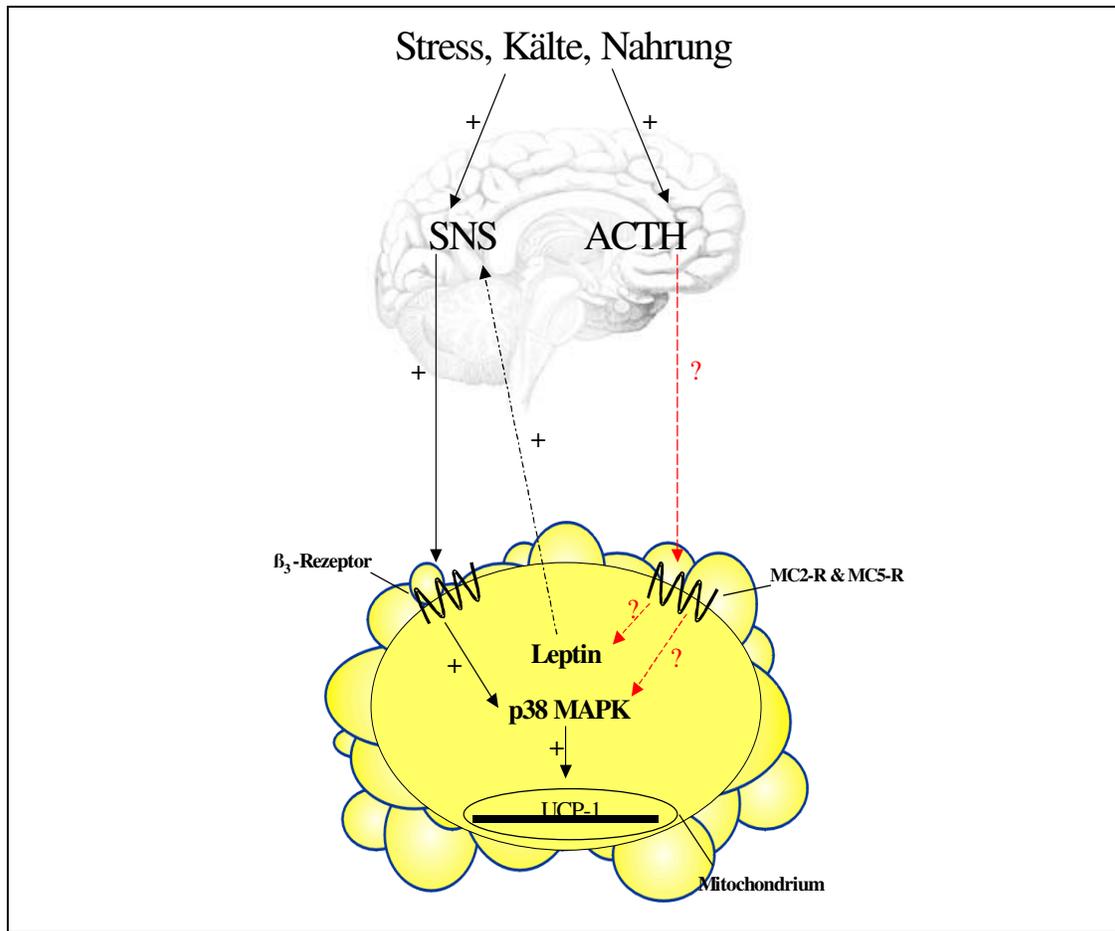
Direkte periphere Effekte von Melanokortinen auf das Fettgewebe sind nahezu unbekannt.

ACTH und α -MSH wirken transient inhibitorisch auf die Expression von Leptin (Norman *et al.*, 2003), ein Hormon mit wichtiger Bedeutung für die Energiehomöostase, und induzieren die Lipolyse (Richter und Schwandt, 1987; Kiwaki und Levine, 2003).

In vivo führt ACTH-Gabe zu Gewichtsreduktion (Fehm *et al.*, 2001). Ein weiterer Effekt von ACTH ist eine verminderte 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität im Fettgewebe (Friedberg *et al.*, 2003), was protektiven Charakter hinsichtlich Fettleibigkeit hat, da eine erhöhte 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität im Fettgewebe mit Adipositas assoziiert ist (Wolf, 2002).

In der Synopsis der oben präsentierten Fakten über wichtige regulatorische Elemente der Energiehomöostase wie dem Fettgewebe, im Speziellen dem thermogenetisch aktiven braunen Fettgewebe, und dem Melanokortinsystem, sollen in der vorliegenden Dissertation die Fragen untersucht werden, ob und welche Auswirkungen das Melanokortin ACTH auf das braune Fettgewebe und somit die Energiehomöostase hat, was das Fettgewebe als Zielgewebe einer Therapie des Metabolischen Syndroms einmal mehr attraktiv machen würde.

1.4 ZUSAMMENFASSENDES SCHAUWILD

**Abb.1**

Stimuli wie Stress, Kälte und Nahrung führen zu einer Aktivierung der adaptiven Thermogenese, was, vermittelt durch das sympathische Nervensystem und vor allem den β_3 -Rezeptor, zu einem Anstieg der UCP-1 Expression führt.

Indirekt kann die adaptive Thermogenese auch über Melanokortinrezeptor-tragende Neurone des zentralen Nervensystems aktiviert werden. Nicht belegt ist eine mögliche direkte Einflussnahme von Melanokortinen auf die UCP-1 Expression sowie deren Signaltransduktion.

Hat ACTH eine Wirkung auf die Leptin-Expression in murinem, braunem Fettgewebe, als ein wichtiges Adipokin der Energiehomöostase, im Sinne einer negativen „feedback“ Rückkopplung und Regulation?

1.5 FRAGESTELLUNG

Zur Beantwortung der Fragen, welche Auswirkungen das Melanokortin ACTH auf die braune Fettzelle hat, wurden braune Präadipozyten aus der von Prof. Dr. med. Johannes Klein etablierten FVB-Mauslinie verwendet (Klein *et al.*, 2002), die alle Charakteristika braunen Fettgewebes nach der Differenzierung zeigen: Sie sind sensitiv für Insulin, β -adrenerge Stimulation (Klein *et al.*, 1999) und exprimieren UCP-1 sowie alle wichtigen Elemente der Insulin-Signaltransduktion (Klein *et al.*, 2000a).

In der vorliegenden Dissertation wurden folgende Fragen bearbeitet:

1. Gibt es eine direkte Wirkung von ACTH auf die braune Fettzelle und hat diese Einfluss auf die thermogenetische Aktivität der braunen Fettzelle?
2. Über welchen Mechanismus wird die Thermogenese reguliert?
3. Welche Auswirkung hat ACTH auf das Adipokin Leptin als systemischen Mediator der Energiehomöostase?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Zelllinie

SV40T-immortalisierte braune Adipozyten aus der FVB-Mauslinie (Klein *et al.*, 2002).

2.1.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-UCP-1	Chemicon International (Temecula,USA)
Anti-Phospho-p70S6 (Tyr/Ser)	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Anti-Phospho-CREB	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Anti-Phospho-GSK3	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Anti-Phospho-p38	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Anti-Phospho-STAT3 (Tyr)	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Anti-Phospho-p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Anti-Phospho-Akt (Ser)	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)

2.1.3 Inhibitoren

Inhibitoren	Hersteller
LY294002	Calbiochem,Inc.
PD98059	Calbiochem,Inc.
SB202,190	Calbiochem,Inc.

2.1.4 Verbrauchsartikel

Artikel	Hersteller
Einmal-Küvetten	
➤ Proteinphotometrie (Halbmikroküvetten)	Plastibrand (Wertheim)
➤ RNA-Photometrie (Mikroküvetten UVette)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon-Röhrchen (50ml, 15ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Film (Hyperfilm)	Amersham Biosciences (Buckinghamshire,UK)
Filter (Steritop Express Plus-0,22µm)	Millipore Corporation (USA)
Klebefolie (optisch klar für 96-Well-Plate)	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply-PCR-Platte (96 Loch)	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrozellulosemembran (Protan BA 85)	Schleicher und Schuell (Dassel)
Parafilm M	American National Can. (USA)
Pasteurpipetten 150mm	Assistant
Pipettenspitzen	
➤ <i>Biosphere Filter Tips</i> (10,100,1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
➤ Pipettenspitzen (10,200,1000µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
➤ <i>Serological</i> Pipette (5,10,25,50ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Polaroid 667 (ISO3000/DIN 36)	Polaroid Corporation (UK)
Reaktionsgefäße (0,5ml,1,5ml,15ml,50ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
RNesay Kit	Qiagen (Hilden)
Zellschaber	Sarstedt (Newton,USA)
Zellkulturschalen (150x20mm,100x20mm)	Sarstedt (Newton,USA)

2.1.5 Chemikalien

Chemikalien

Acrylamid 30:0,8
 ACTH (Maus, Ratte)
 Agarose
 Aprotinin
 APS
Aqua dest.
 Bradford-Protein-Assay
 Chemolumineszenz-Kit (Maus-Kaninchen)
 Chloroform
 Chromatographiepapier
 CL316,243
 DEPC
 DNase *Stock* Lösung
 Dexamethason
 DTT (1,4-Dithiothreitol)
 Dulbeccos modifiziertes *Eagle*-Medium
 (DMEM) *high glucose* (4,5 g/l)
 EDTA
 Entwickler:G 153B
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 Fixierer: G 354 Schnellfixierer
 Fötale bovines Serum
 Formalin
 Glycerol 85 %
 Glycin
 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)
 Indomethazin
 Insulin
 Isobutylmethylxanthin (IBMX)
 Isopropanol (100%)
 Kalziumchlorid
 Leupeptin
 Magnesiumchlorid
 β -Mercaptoethanol
 Methanol
 NaCl
 Natriumfluorid
 Natriumorthovanadat
 Natriumpyrophosphat
Oil -Red -O
 Penicillin/Streptomycin
 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Primer p(DT) für cDNA Synthese
 Proteinmarker BenchMark Prestained
 RDD-Puffer
 Rinderserumalbumin (BSA)
 RLT-Puffer
 RNase-freies Wasser
 RPE-Puffer
 SDS
SuperScriptII RNase H⁻ ReverseTranskriptase
SYBR-Green
 Trijodthyronin
 Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Hersteller

Roth (Karlsruhe)
 Bachem (Bubendorf, Schweiz)
 Applichem (Darmstadt)
 Fluka Chemie (Neu-Ulm)
 Serva (Heidelberg)
 aus eigener Destillieranlage
 Bio-Rad (München)
 Roche (Mannheim)
 Merck (Darmstadt)
 Whatman (Maidstone, England)
 Sigma (Deisenhofen)
 Fluka (Steinheim, Schweiz)
 Qiagen (Hilden)
 Sigma (Deisenhofen)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 PAA (Pasching, Österreich)

 Sigma (Deisenhofen)
 Agfa-Gevaert AG (Düsseldorf)
 Merck (Darmstadt)
 Roche (Mannheim)
 Agfa-Gevaert AG (Düsseldorf)
 Sigma (Deisenhofen)
 Sigma (Deisenhofen)
 Apotheke der Universität zu Lübeck
 Biomol (Hamburg)
 Biomol (Hamburg)

 Sigma (Deisenhofen)
 Boehringer (Mannheim)
 Sigma (Deisenhofen)
 Sigma (Deisenhofen)
 Merck (Darmstadt)
 Sigma (Deisenhofen)
 Merck (Darmstadt)
 Sigma (Deisenhofen)
 Merck (Darmstadt)
 Baker (Deventer, Niederlande)
 Merck (Darmstadt)
 Sigma (Deisenhofen)
 Sigma (Deisenhofen)
 Sigma (Deisenhofen)
 Sigma (Deisenhofen)
 BioWhittaker (Vervier, Belgien)
 Boehringer (Mannheim)
 Roche (Mannheim)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 Qiagen (Hilden)
 Biomed (Hamburg)
 Qiagen (Hilden)
 Qiagen (Hilden)
 Qiagen (Hilden)
 Qiagen (Hilden)
 Fluka (Steinheim, Schweiz)
 Invitrogen (Carlsbad,USA)
 Qiagen (Hilden)
 Sigma (Deisenhofen)
 Sigma (Deisenhofen)

Chemikalien

Tris
 Trizol
 Trypsin-EDTA
 Tween 20

Hersteller

Biomol (Hamburg)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 Sigma (Deisenhofen)

2.1.6 Primer**Primer**

Adiponectin
 Adipo 418F CGC GTC ACT GTT CCC AAT GTA
 Adiop 418R GAG TCC CGG AAT GTT GCA GTA

AT-II
 angiII 174F TGC TTG GTG TTC TCA AGC TCC
 angiII 174R AAG CCA CCA AGA AAC ATG CC

IL-6
 IL-6F AGC CAG AGT CCT TCA GA
 IL-6R GGT CCT TAG CCA CTC CT

Leptin
 mLep-1 GTG CCT ATC CAG AAA GTC CAG GAT G
 mLep-3 CTG GTG AGG ACC TGT TGA TAG AC

MCP-1
 MCP1-F GCC CCA CTC ACC TGC TGC TAC T
 MCP1-R CCT GCT GCT GGT GAT CCT CTT GT

VEGF
 mVEGF1 TCA GAG AGC AAC ATC ACC ATG
 mVEGF2 CGC TCT GAA CAA GGC TCA CAG

UCP-1
 mUCP1-2 GTA CTG GAA GCC TGG CCT TCA CCT TGG
 mUCP1-f ATG GTG AAC CCG ACA ACT TCC GAA GTG

36B4
 36B4S AAG CGC GTC CTG GCA TTG TCT
 36B4A CCG CAG GGG CAG CAG TGG T

Hersteller

Biometra (Göttingen)

2.1.7 Geräte**Gerät**

Analysenwaage
 Elektronische Pipettierhilfe, *Accu-Jet*
 Filmkassette, *Hypercassette*
 Gelgießvorrichtung
 Gelelektrophoresekammer, *Perfect Blue*
 Mini M
 Heizblock, Thermomixer compact
 Inkubator Typ B5060
 Kolbenhubpipette (1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl)
 Mikroskop Olympus CK2
 Netzgerät für Elektrophorese, Power Supply
 E802
 pH-Meter, 766 Calimatic
 Photometer, BioPhotometer

Hersteller

Sartorius (Göttingen)
 Brand (Wertheim)
 Amersham Biotech (UK)
 Peqlab (Erlangen)
 Peqlab (Erlangen)
 Eppendorf (Hamburg)
 Heraeus (Osterode)
 Eppendorf (Hamburg)
 Olympus (Hamburg)
 Consort (Turnhout, Belgien)
 Knick (Berlin)
 Eppendorf (Hamburg)

Rotator	Renner GmbH (Dannstadt)
Schüttelgerät, Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
<i>Thermocycler (Taqman) 7000 Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Wasserbad Typ 3044	Köttermann (Hänigsen)
Werkbank (steril), Nuair Class II	
<i>Western-Blot-Apparatur</i>	BioRad (München)
Wippe, Doumax 130	Heidolph
Zentrifuge, Minispin Plus	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge, Biofuge fresco/Rotor 3765	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge, Jouan C412	(Saint Nazaire, France)

2.1.8 Selbsthergestellte Lösungen und Puffer

Grundmedium

500 ml	DMEM
20 %	Fötale bovines Serum
100 U/ml	Penizillin
100 µg/ml	Streptomycin

Phosphate buffered saline (PBS)

8 g	NaCl
0,2 g	KCL
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	<i>cum aqua destillata ad 1 l</i>
	pH = 7,4 bei 25 °C

Induktionsmedium

	Differenzierungsmedium mit
250 µM	Indomethazin
500 µM	Isobutylmethylxanthin
2 µg/ml	Dexamethason

Differenzierungsmedium

500 ml	DMEM
20 %	Fötale bovines Serum
100 U/ml	Penizillin
100 µg/ml	Streptomycin
20 nM	Insulin
1 nM	Trijodthyronin

Laufpuffer

6,06 g Tris
 28,5 g Glycin
 0,67 g EDTA
 1 g SDS
cum aqua destillata ad 1 l

Laemmli-Puffer (5x-Konz.)

1 ml Bromphenolblau (0,1%)
 0,5 ml Na₂HPO₄/NaH₂PO₄
 (1 M, pH = 7,0)
 5 ml Glycerol
 1 g SDS
 500 nM DTT (1,4 Dithiothreitrol)
cum aqua destillata ad 10 ml

Transferpuffer

3 g Tris
 14,4 gl Glycin
 1 g SDS
cum aqua destillata ad 1 l

Waschpuffer

10 nM NaCl
 25,5 mM KCL
 200 mM HEPES
 0,05 % Igepal
 1 % BSA
 8,5 % Glycerol
 100 µM Na-Vanadat

Lysepuffer

50 mM HEPES
 1 mM MgCl₂
 137 mM NaCl
 10 mM NaF
 1 mM CaCl₂
 2 mM Na-Vanadat

2 mM EDTA
 10 mM NaPO₄
 10 % Glycerol
 0,5 % NP40
 2 mM PMSF
 10 µg/ml Leupeptin

Stock Oil-Red-O

0,5 g Oil-Red-O
 100 ml Isopropanol

Oil-Red-O-Färbelösung

60 % Stock Oil-Red-O
 40 % aqua bidest.

Primer Mix für c-DNA-Synthese
(μ l/Zielgen)

4	nM	<i>Oligo-dT Primer</i>
250	μ M	dATP
250	μ M	dUTP
250	μ M	dCTP
250	μ M	dGTP
		<i>ad aqua dest.</i>

Transkriptase Mix für
c-DNA-Synthese (μ l/Zielgen)

50	%	Puffer (5x)
25	mM	DTT
1,25	U/ μ l	RNAse Inhibitor
25	U/ μ l	<i>SuperScript II</i>
		<i>ad aqua dest.</i>

TBE (pH 8,0)

890	mM	Tris Base
890	mM	Borsäure
20	mM	EDTA

Reaktionspuffer zur quantifizierenden RT-PCR

0,9	mM	<i>Primer upstream</i>
0,9	mM	<i>Primer downstream</i>
55	% vol.	<i>SYBR Green RT-PCR</i>

Auftragspuffer

4	M	Harnstoff
10	mM	EDTA
50	%	Glycerin
0,1	%	Bromphenolblau
		<i>ad aqua dest.</i>

Zusammensetzung für Acrylamidgele

	Trenngel:			Sammelgel:
	8% Acrylamid	10% Acrylamid	12% Acrylamid	4,5% Acrylamid
Wasser	7 ml	6 ml	5 ml	3,4 ml
1,5mM Tris (pH=8,8)	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	625 μ l
Acrylamid	4 ml	5 ml	6 ml	850 μ l
10 % SDS	150 μ l	150 μ l	150 μ l	50 μ l
10 % APS	150 μ l	150 μ l	150 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	5 μ l

DEPC-Wasser

DEPC 1:1000 in *aqua dest.*
(lichtgeschützt) 30 min. rühren,
über Nacht lagern, dann autoklavieren

Agarose-Gel

2 % Agarose in 100 ml TBE, aufkochen und
kurz abkühlen lassen

2.2 METHODEN**2.2.1 Zellkultur**

Grundlage der Zellkultur sind braune Präadipozyten aus der von Prof. Dr. med. Johannes Klein etablierten Zelllinie, die aus dem interskapularen braunen Fettgewebe einer neugeborenen Maus isoliert wurden (Klein *et al.*, 2002).

Mittels Transformation mit dem retroviralen Vektor „*pBabe*“, der für das SV40 T-Antigen kodiert, wurden die gewonnenen Präadipozyten immortalisiert, was eine Kultivierung von mindestens 30 bis maximal 33 Passagen ermöglicht.

Die braunen Präadipozyten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ auf einer 150 mm Kulturschale in 25 ml Grundmedium kultiviert.

Sobald eine Konfluenz der Zellen von 70-80 % erreicht worden war, wurden sie geteilt.

Dafür wurde die Platte mit 37 °C warmen PBS zweimal gewaschen und 2,5 ml Trypsin auf der Kulturschale gut verteilt. Während der Einwirkphase von 5 min wurde die Platte bewegt und beklopft, um die Zellen vom Boden zu lösen.

Die abgelösten Zellen wurden dann mit 30,5 ml Grundmedium resuspendiert und die Zellsuspension zu gleichen Teilen (jeweils 3 ml) auf die Kulturschale und die 100 mm Tochterschalen aufgeteilt.

2.2.2 Zelldifferenzierung

Die 100 mm Tochterschalen wurden mit 7 ml Differenzierungsmedium auf insgesamt 10 ml aufgefüllt und 3-4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis die Zellen konfluent waren.

Es folgte die Induktionsphase mit Induktionsmedium für 24 h.

Danach wurden die Zellen über 6-7 Tage mit Differenzierungsmedium, das täglich gewechselt wurde, behandelt, bis der vollständig differenzierte Phänotyp mit multiokulären Fetttropfen ausgebildet war.

2.2.3 Zellstimulation

Die ausdifferenzierten Adipozyten wurden vor dem Beginn der Stimulation, je nach Experiment, für 5-24 h in serumfreiem DMEM kultiviert.

2.3 OIL-RED-O-FÄRBUNG

An den Tagen 1, 3 und 6 nach Induktion wurden die Zellplatten, die mit 100 nM ACTH behandelt wurden als auch die Kontrollplatten, die nicht mit ACTH behandelt wurden, mit *Oil-Red-O* gefärbt (s. Abb.3, S.29).

Die Platten wurden zuerst mit warmen PBS gewaschen. Dann für 15 min zur Fixierung der Zellen mit Formaldehyd beschichtet.

Im Anschluss wurden die fixierten Zellen mit dem fettspezifischen Farbstoff *Oil-Red-O* gefärbt. Dazu wurde auf jede Platte 5 ml der filtrierten *Oil-Red-O*-Lösung für eine Stunde aufgetragen und danach mit *aqua dest.* gespült.

2.4 GELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT

2.4.1 Stimulation

Vor Durchführung der Stimulationsexperimente wurden die Zellen 6 oder 7 Tage nach dem Beginn der Induktion für 5 h ausschließlich mit DMEM kultiviert, was unter mikroskopischer Kontrolle zu keinen morphologischen Veränderungen an den Zellen führte.

Abhängig von der Art des Experimentes wurde mit verschiedenen Konzentrationen stimuliert und die Stimulationszeiten gewählt:

- a.) Dosis-Wirkung ACTH 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 μ M bei 10 min
Kontrolle: CL β 3, Insulin
- b.) Zeitverlauf ACTH 100 nM bei 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min und 80 min
Kontrolle: CL β 3, Insulin
- c.) Wirkung ACTH 10 nM bzw. 100 nM bei 4 h, 8 h und 24 h auf UCP-1
Kontrolle: CL β 3
- d.) Dosis-Wirkung ACTH 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M bei 8 h auf UCP-1
Kontrolle: CL β 3

2.4.2 Zellyse und Gewinnung der Zytosolfraktion

Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium abgekippt und die Kulturschalen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, ausgeschlagen und sofort auf Eis gestellt.

Anschließend wurden in jede Schale 450 µl Lysepuffer pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und für 15 min bei 4 °C an einen Rotator gehängt.

Es folgte die Zentrifugierung des Lysates bei 4 °C und 13.000 U/min. für 10 min.

Das aufgeschwemmte Fett sowie die Zellsedimentschicht wurden verworfen. Die Proteinmenge der verbleibenden zytosolischen Fraktion wurde photometrisch nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt.

Die gemessenen Proteinkonzentrationen wurden durch Zugabe von Lysepuffer und Laemmli-Puffer aliquotiert, für 3 min bei 95 °C inkubiert und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.4.3 Proteintrennung

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels einer Polyacrylamid-Elektrophorese.

Dazu wurden Gelplatten gegossen, die aus einem Trenngel und einem Sammelgel bestanden. Je nach Größe (kDa) der zu untersuchenden Proteine wurden verschiedene Trenngele, bezogen auf den prozentualen Acrylamidanteil, gegossen; je kleiner das zu detektierende Protein, desto höher der prozentuale Acrylamidanteil.

Die Gelplatte wurde anschließend in die mit Laufpuffer gefüllte Kammer gestellt und die Proben sowie einmalig eine gefärbte Markerlösung in vorgeformte Taschen im Sammelgel pipettiert.

Die Proteinauftrennung bei 100 V wurde erst beendet, als der Marker den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte.

2.4.4 Western Blot

Die Gelplatte mit den aufgetrennten Proteinen wurde nun aus der Laufkammer entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel in eine Wanne mit Transferpuffer gegeben. Dort wurde es luftblasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran platziert und zwischen zwei Filterpapieren in die Transfervorrichtung gebracht.

Die Transfervorrichtung wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer gestellt.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte über eine Stunde bei 100 V.

Nach dem Transfer wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C in Laufpuffer mit 3 %igem bovinen Serumalbumin (BSA) inkubiert, das an freie Nitrozellulose bindet und so eine spätere, unspezifische Bindung von Primärantikörpern verhindert.

Zur Detektion der zu untersuchenden Proteine wurde die Nitrozellulosemembran zuerst dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit einem für das jeweilige Protein spezifischen Primärantikörper inkubiert.

Nach erneutem dreimaligen Waschen mit dem Waschpuffer wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert.

Abschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit Waschpuffer gewaschen, für eine Minute in Chemolumineszenz-Reagenz gelegt und gegen einen Film in einer Filmkassette belichtet.

Die Filme wurden mit einem Scanner (UMAX Astra 2200) eingelesen und die quantitative Signalintensität der Proteinbanden mit Hilfe des Programms *Quantity One* (BioRad, München) ausgewertet.

2.5 RT-PCR

2.5.1 Stimulation

Vor Durchführung der Stimulationsexperimente wurden die Zellen 6 oder 7 Tage nach dem Beginn der Induktion für 5 h ausschließlich mit DMEM kultiviert, was unter mikroskopischer Kontrolle zu keinen morphologischen Veränderungen an den Zellen führte.

Abhängig von der Art des Experimentes wurde mit verschiedenen Konzentrationen stimuliert und die Stimulationszeiten gewählt:

- a.) Wirkung ACTH 100 nM bei 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h auf UCP-1
Kontrolle: CL β 3
- b.) Wirkung ACTH 100 nM bei 8 h mit und ohne Inhibitoren SB202,190; PD 98059 und LY 294002 auf UCP-1
Kontrolle: CL β 3
- c.) Wirkung ACTH 100 nM bei 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h auf Adipokine (Adiponectin, AT-II, IL-6, Leptin, MCP-1, VEGF)
Kontrolle: CL β 3, Insulin

2.5.2 RNA-Isolation

Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium abgekippt und die Kulturschalen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, ausgeschlagen und sofort bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die RNA Isolation wurden die Kulturschalen aus dem $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kühlschrank genommen und auf Eis gelegt.

Auf jede Platte wurden 8 ml Trizol gegeben, die Zellen mit dem Zellschaber abgelöst und in ein 15 ml Falcon überführt.

In jedes Falcon wurden nun 1,6 ml Chloroform hinzugegeben, gut vermischt und anschließend für 15 min bei 4500 U/min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Die obere Phase, in der sich die RNA befand, wurde in einen zweiten Satz 15 ml Falcons überführt und 10 min stehengelassen.

Es folgte ein erneutes Zentrifugieren für 10 min bei 4500 U/min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Der Überstand wurde abgekippt, das sich am Boden befindende Pellet in 8 ml 70 %igem Ethanol gelöst, gut vermischt und schließlich für 5 Minuten bei 3500 U/min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Das 70 %ige Ethanol wurde abgekippt, das sich erneut gebildete Pellet luftgetrocknet und anschließend in 100 μl RNase freiem Wasser gelöst.

2.5.3 RNA-Aufreinigung

Die RNA-Aufreinigung wurde anhand des Reinigungsprotokolls *RNeasy* von Qiagen (Hilden) durchgeführt.

Dabei wurde die Probe auf eine Säule aufgetragen, wobei die Gesamt-RNA an die Membran gebunden wurde, während die übrigen Substanzen ausgewaschen und somit abgetrennt wurden. Ein eingefügter DNase-Verdau beseitigte etwaige Kontaminationen endgültig.

Die gewonnene RNA wurde schließlich mit 50 μl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt.

Parallel wurde noch eine Agarose-Gelelektrophorese (s. Abb.2, S.27) durchgeführt, die der optischen Kontrolle von Reinheit und Menge diente.

Für das Gel wurden 2 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer aufgekocht, anschließend 6 μl Ethidiumbromid hinzugegeben und in eine Gelkammer gegossen.

In jede Geltasche wurde eine Probenzubereitung, bestehend aus 2 μl der Probe und 4 μl Auftragspuffer, pipettiert und für 45 min eine Spannung von 100 V angelegt.



Abb.2

Gelelektrophoretische Kontrolle aufgereinigter RNA.

Die RNA ist durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar.

2.5.4 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurde zu einer RNA-Menge/Gen von 2,5 µg 11 µl *Primer-Mix* pipettiert und für 5 min bei 65 °C inkubiert.

Zur Probe wurden dann 44 µl Transkriptase-Mix pipettiert und für 60 min bei 45 °C, für 15 min bei 70 °C inkubiert und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.5.5 Real Time Polymerase-Ketten-Reaktion

Die hergestellte cDNA wurde nun mit Hilfe quantifizierender RT-PCR in einem *Thermocycler* (Taqman) amplifiziert.

Dafür wurde jeweils ein Reaktionspuffer zur quantifizierenden RT-PCR für das Ziel-Gen und das *Housekeeping*-Gen hergestellt.

Für das sogenannte *Housekeeping*-Gen, 36B4, kann angenommen werden, dass es zu jeder Bedingung in einer konstanten Konzentration in der Zelle vorliegt.

Daher diene das *Housekeeping*-Gen als Kontrolle und wurde ebenfalls neben der zu untersuchenden Probe amplifiziert. Für das *Housekeeping*-Gen wie auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Für jeden Wert wurden 23 µl Reaktionspuffer und 2 µl cDNA-Probe, Standard oder Wasser in ein Loch der 96 Loch *Multiply*-PCR-Platte gegeben. Danach wurden eventuelle Luftblasen durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 U/min entfernt und die Platte in den *Thermocycler* eingelegt.

Die Zeiten und Temperaturen der einzelnen Zyklen waren vom jeweiligen *Primer* abhängig:

- a.) Profil 1: Adiponectin, AT-II, Leptin, UCP-1, VEGF
- b.) Profil 2: IL-6, MCP-1

Die Amplifikationszyklen betragen 40 für Profil 1 und Profil 2. Zu Beginn gab es eine einmalige 15 minütige Aktivierungsphase bei 95 °C, in der die *Primer* aktiviert wurden.

Anschließend begannen die Zyklen, wobei jeder Zyklus aus:

- einer Denaturierung der DNA für eine halbe Minute bei 95 °C in Einzelstrang-DNA
- einer Abkühlung für eine halbe Minute auf 56 °C (Profil 1) bzw. für eine Minute auf 60 °C (Profil 2) zur Anlagerung des *Primers* an den denaturierten DNA-Einzelstrang
- einer DNA-Synthesephase in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) durch die hitzestabile DNA-Polymerase I von 30 sec (Profil 1) bzw. von 1 min (Profil 2) bei 72 °C

bestand.

Ab dem vierten Zyklus vermehrte sich die Zielsequenz exponentiell. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz bestimmt.

Die so erhaltenen Daten gaben Auskunft über die nach der Stimulation in den Zellen enthaltenen Mengen der untersuchten mRNA.

2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die ausgewerteten Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Mit dem ungepaarten Student-t-Test wurden statistische Signifikanzen berechnet. Ein p-Wert kleiner als oder gleich 0,05 galt als statistisch signifikant und wurde in den Diagrammen mit * gekennzeichnet. Ein p-Wert kleiner als oder gleich 0,01 galt als statistisch hoch signifikant und wurde im Diagramm mit ** gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 AUSWIRKUNG VON ACTH AUF DIE FETTZELLDIFFERENZIERUNG

Die chronische Stimulation von braunen Adipozyten mit 100 nM ACTH zeigte in der *Oil-Red-O*-Färbung keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Differenzierungsverhalten gegenüber der unbehandelten Kontrolle (s. Abb.3).

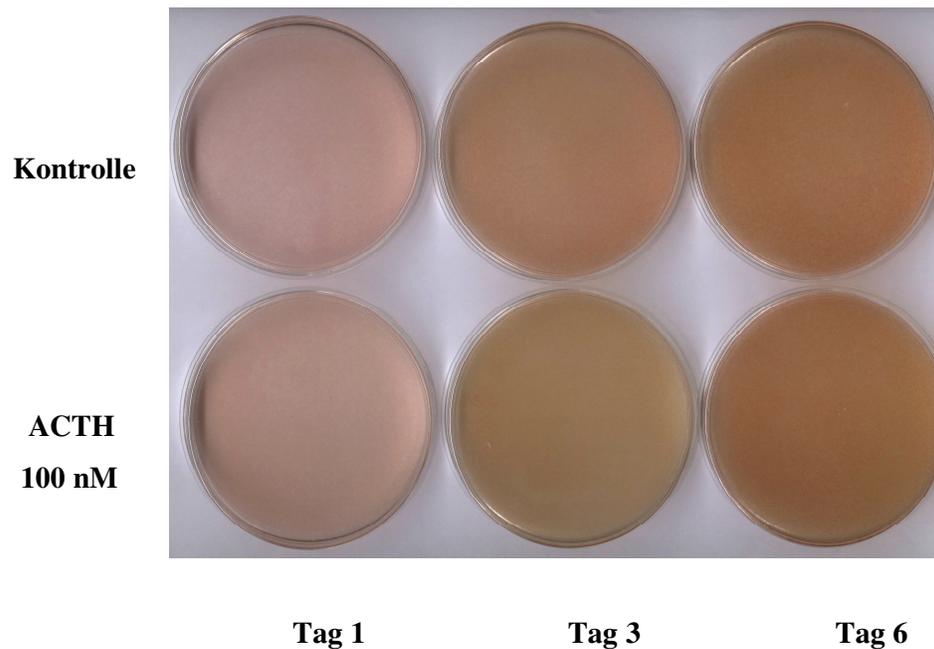


Abb.3

Oil-Red-O-Färbung an verschiedenen Tagen der Differenzierungsphase von braunen Adipozyten. Mit der roten Färbung wird der zunehmende Fettgehalt der Zellen nachgewiesen.

3.2 WIRKUNG VON ACTH AUF UCP-1

Das „*uncoupling protein-1*“ (UCP-1) findet sich ausschließlich im braunen Fettgewebe und dient der zitterfreien Wärmebildung. Somit ist UCP-1 ein wichtiger Faktor bei der Regulation des Energiehaushaltes und der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase.

3.2.1 Zeitabhängige Aktivierung der UCP-1 Proteinexpression durch ACTH

Zur Untersuchung der Auswirkung von ACTH auf die UCP-1 Expression wurden differenzierte braune Fettzellen mit 100 nM ACTH über 4 h, 8 h und 24 h inkubiert.

Gegenüber den unbehandelten Zellen zeigte sich bei allen drei Konditionen ein deutlicher zeitabhängiger Anstieg der UCP-1 Proteinexpression.

Nach 4 h zeigte sich ein Anstieg von 240 %, nach 8 h ein hoch signifikanter Anstieg von 270 % ($p < 0,01$).

Die 24 h Stimulation führte mit einem signifikanten Anstieg von 570 % ($p < 0,05$) zum stärksten Effekt auf die UCP-1 Proteinexpression (s. Abb.4).

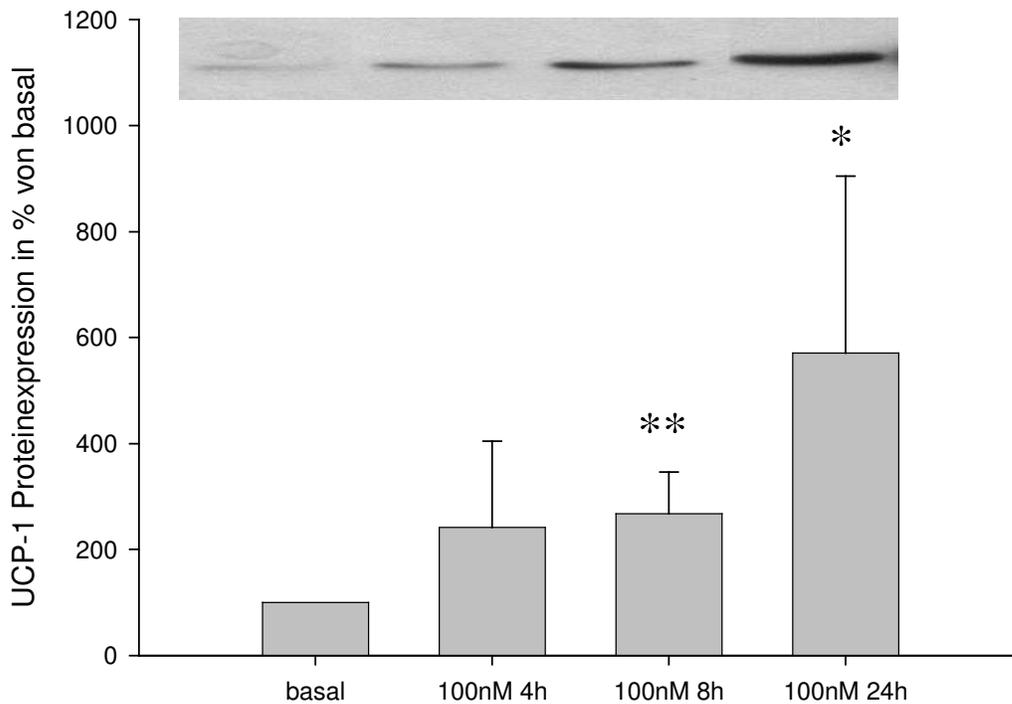


Abb.4 Stimulation mit 100 nM ACTH führt zu einem zeitabhängigen Anstieg der UCP-1 Proteinexpression

Braune differenzierte Mausadipozyten wurden mit 100 nM ACTH über 4 h, 8 h und 24 h stimuliert.

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen lysiert und nach Gelelektrophorese *Western Blot* mit UCP-1 spezifischem Antikörper durchgeführt.

Mittelwerte und Standardfehler aus 5 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$ ** bedeutet $p < 0,01$

3.2.2 Dosisabhängige Aktivierung der UCP-1 Proteinexpression durch ACTH

Nachdem sich bei der Stimulation von differenzierten braunen Fettzellen mit 100 nM ACTH ein zeitabhängiger Anstieg der UCP-1 Proteinexpression mit einem hoch signifikanten Anstieg bei 8 h gezeigt hat, wurde im nächsten Schritt untersucht, welche Auswirkungen verschiedene Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt 8 h haben.

Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung durchgeführt mit ACTH-Konzentrationen von 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 μ M.

Gegenüber den unbehandelten Zellen zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der UCP-1 Proteinexpression.

Der stärkste Effekt zeigte sich bei 1 μ M mit einem signifikanten Anstieg von 390 % ($p < 0,05$).

Bei einer Konzentration von 100 nM ACTH zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg von 370 % ($p < 0,05$) (s.Abb.5).

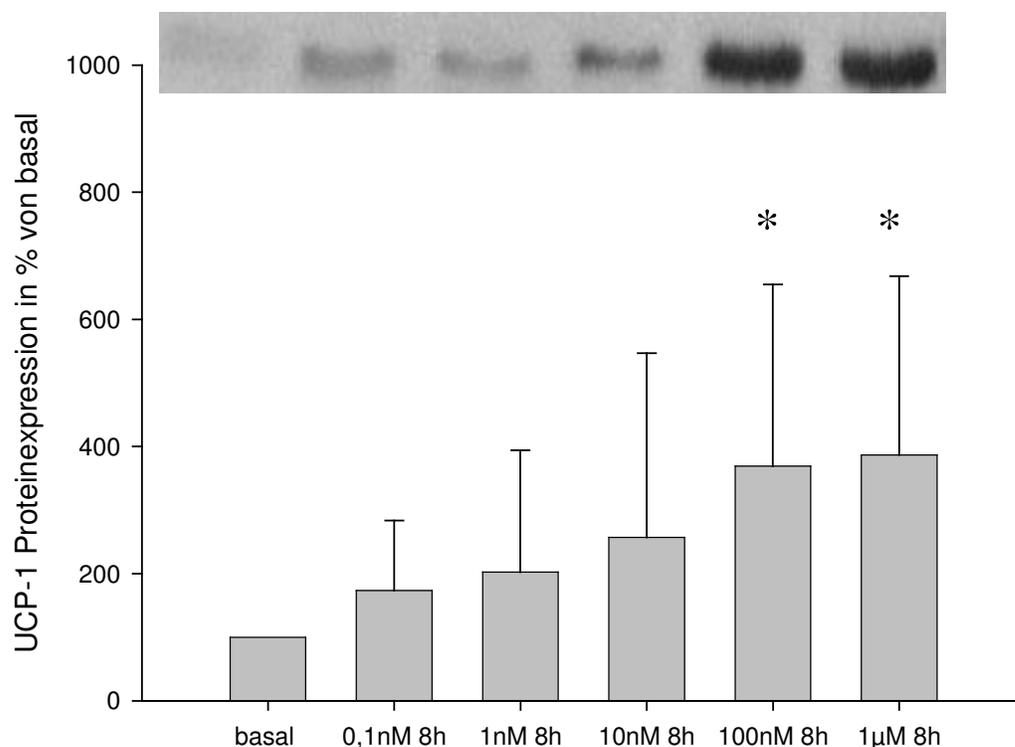


Abb.5 Die UCP-1 Proteinexpression ist dosisabhängig

Braune differenzierte Mousadipozyten wurden über 8 h mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen stimuliert.

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen lysiert und nach Gelelektrophorese *Western Blot* mit UCP-1 spezifischem Antikörper durchgeführt.

Mittelwerte und Standardfehler aus 6 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$

3.2.3 Zeitabhängige Wirkung von ACTH auf die UCP-1 Expression auf RNA-Ebene

Die Untersuchungen beweisen eine zeit- wie auch dosisabhängige Wirkung von ACTH auf die UCP-1 Expression auf Proteinebene.

Im nächsten Schritt wurde nun die Auswirkung von ACTH auf UCP-1 auf RNA-Ebene untersucht.

Dazu wurden differenzierte braune Mousadipozyten mit 100 nM ACTH inkubiert und die Auswirkung auf die UCP-1 Gentranskription im Zeitverlauf betrachtet.

Dabei zeigte sich schon nach 1 h ein hoch signifikanter Anstieg der Transkription des UCP-1 Gens von 900 % ($p < 0,01$).

Nach 8 h war noch ein hoch signifikanter Anstieg der UCP-1 Gentranskription von 680 % ($p < 0,01$) zu sehen.

Deutlich gehemmt war der Anstieg nach 24 h mit 170 %, aber immer noch doppelt so hoch gegenüber den unbehandelten Zellen (s.Abb.6).

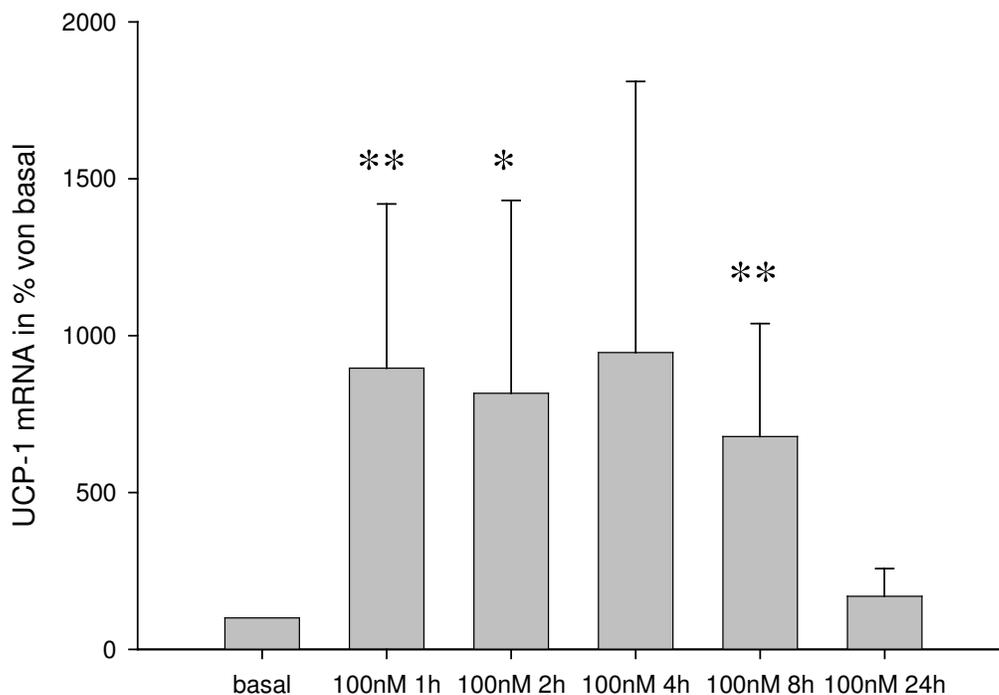


Abb.6 Schnelle Regulation der UCP-1 Gentranskription

Braune differenzierte Mousadipozyten wurden mit 100 nM ACTH über 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h stimuliert.

Im Anschluss an die Stimulation wurde die mRNA der Zellen isoliert, aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR ausgewertet.

Mittelwerte und Standardfehler aus 5 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$ ** bedeutet $p < 0,01$

3.3 EINFLUSS VON ACTH AUF DIE SIGNALELEMENTE DER INTRAADIPOZYTÄREN SIGNALWEGE

Die Ergebnisse der ACTH-Stimulation zeigten eine signifikante dosis- wie auch konzentrationsabhängige Aktivierung von UCP-1 auf Protein- und RNA-Ebene.

Der nächste Schritt war die Untersuchung der Auswirkungen von ACTH auf zentrale intraadipozytären Signalwege (MAPK, Akt) und im besonderen auf die Signalelemente des UCP-1 Signalweges (p38 MAPK).

Dazu wurde an braunen differenzierten Mausadipozyten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit ACTH Konzentrationen von 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 µM bei einer Stimulationszeit von 10 min durchgeführt.

In den Abbildungen 7 bis 9 sind nur die Daten für 100 nM gezeigt.

3.3.1 Phosphorylierung von p38 MAPK

Die Phosphorylierung von p38 MAPK zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg. Nach 10 minütiger ACTH-Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg von 1785 % ($p < 0,01$) bei einer ACTH-Konzentration von 100 nM gegenüber den unbehandelten Zellen beobachtet werden (s.Abb.7).

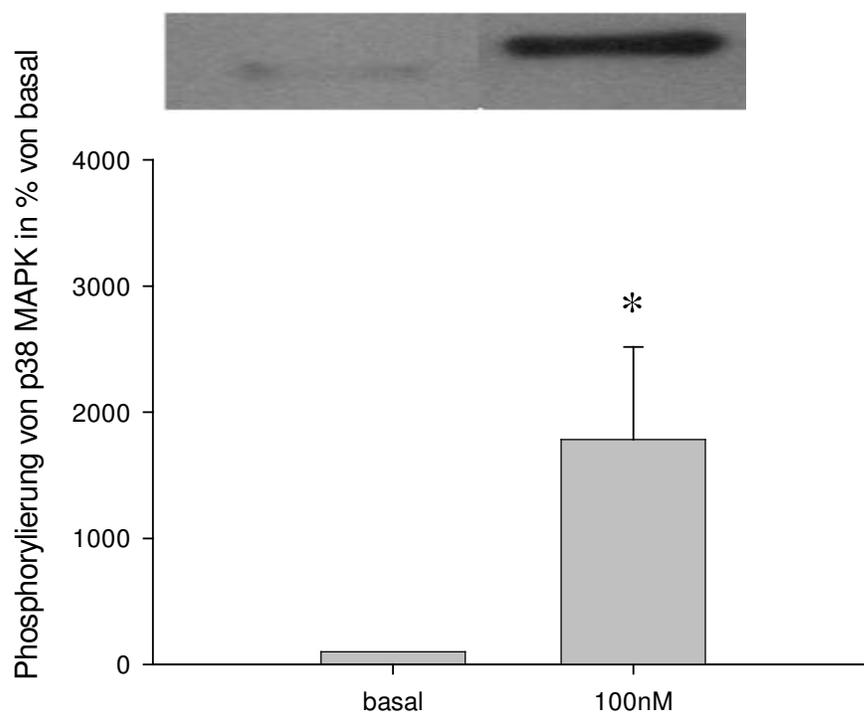


Abb.7 ACTH erhöht konzentrationsabhängig signifikant die Aktivität des Signalmoleküls p38 MAPK

Braune differenzierte Mousadipozyten wurden über 10 min mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen stimuliert.

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen lysiert und nach Gelelektrophorese *Western Blot* mit p38 MAPK spezifischem Antikörper durchgeführt.

Mittelwerte und Standardfehler aus 8 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$

3.3.2 Phosphorylierung von p44/42 MAPK

Verglichen mit den unbehandelten Zellen zeigte sich nach 10 minütiger ACTH-Stimulation ein konzentrationsabhängiger Anstieg der p44/42 MAP-Kinase-Phosphorylierung bis auf 170 % bei einer Konzentration von 100 nM ACTH, der jedoch im Gegensatz zu p38 MAPK keine Signifikanz erkennen ließ (s.Abb.8).

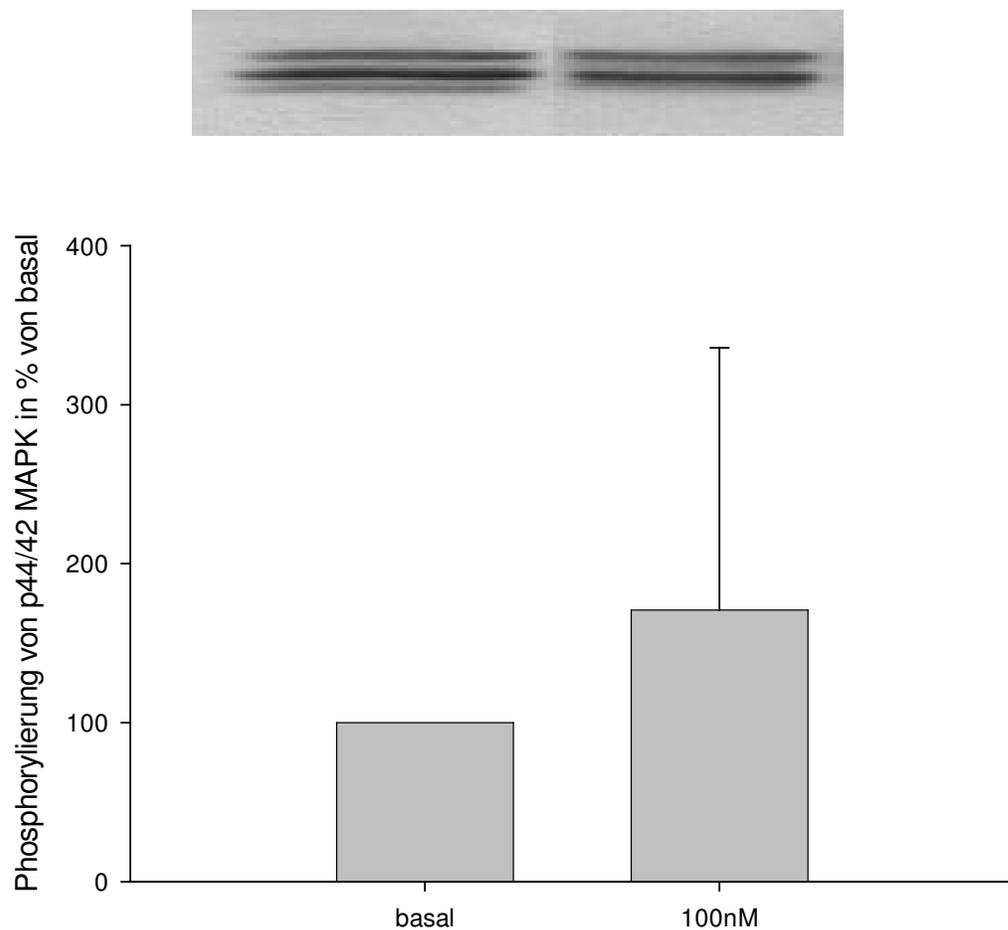


Abb.8 ACTH stimuliert nicht signifikant die Phosphorylierung von p44/42 MAPK

Braune differenzierte Mousadipozyten wurden über 10 min mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen stimuliert.

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen lysiert und nach Gelelektrophorese *Western Blot* mit p44/42 MAPK spezifischem Antikörper durchgeführt.

Mittelwerte und Standardfehler aus 8 unabhängigen Messwerten.

3.3.3 Phosphorylierung von Akt

Bei der Phosphorylierung von Akt zeigte sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Anstieg. Bei einer ACTH-Konzentration von 100 nM konnte ein signifikanter Anstieg bis 185% ($p < 0,01$) nach 10 min gegenüber den unbehandelten Zellen beobachtet werden (s.Abb.9).

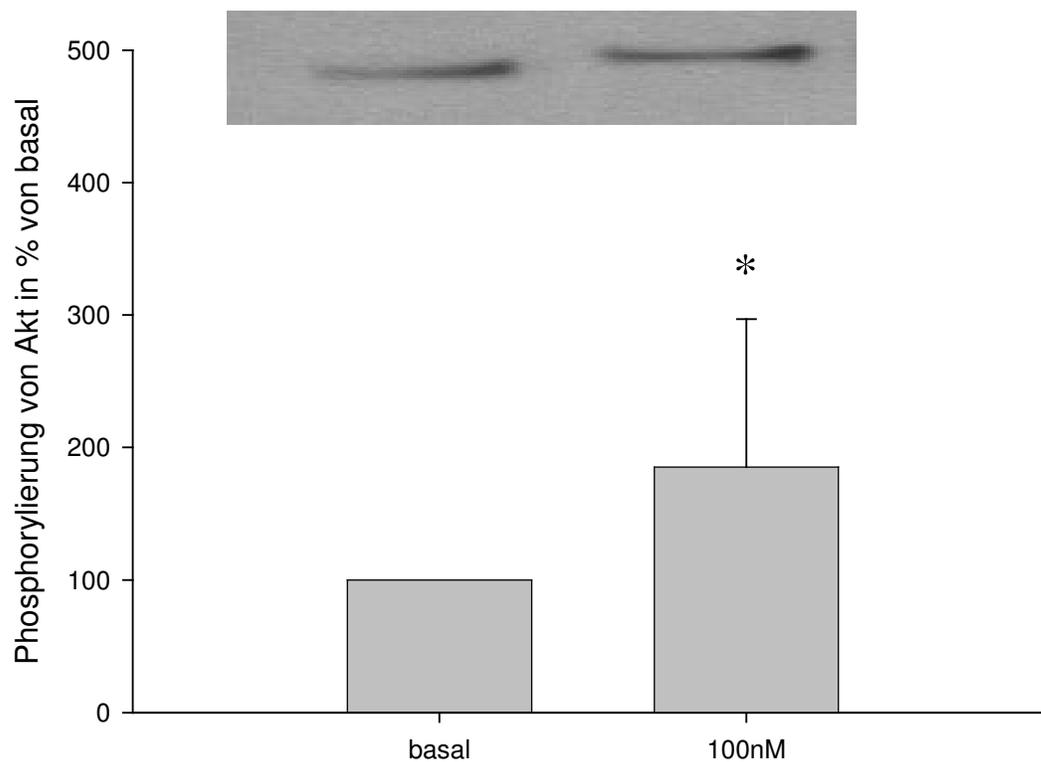


Abb.9 ACTH stimuliert signifikant die Phosphorylierung von Akt

Braune differenzierte Mousadipozyten wurden mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen über 10 min stimuliert.

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen lysiert und nach Gelelektrophorese *Western Blot* mit Akt spezifischem Antikörper durchgeführt.

Mittelwerte und Standardfehler aus 8 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$

3.4 SIGNALMECHANISMUS FÜR DIE UCP-1 AKTIVIERUNG

Die Ergebnisse der Stimulation der braunen Fettzellen mit ACTH zeigten einen dosis- und konzentrationsabhängigen Anstieg der UCP-1 Expression.

Hinsichtlich der Auswirkung auf die intraadipozytären Signalmoleküle zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg, der vor allem bei der p38 MAP-Kinase signifikant war, die eine zentrale Komponente im Signalweg der UCP-1 Expression ist.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Regulation der UCP-1 Expression durch ACTH-Stimulierung über die p38 MAP-Kinase erfolgt, wurde p38 MAPK mit dem spezifischen p38 MAPK Inhibitor SB202,190 blockiert.

Weiterhin wurden Versuchsreihen mit dem spezifischen MAPK Inhibitor PD98059 und dem spezifischen PI 3-Kinase Inhibitor LY294002 durchgeführt, um eine mögliche Regulation durch die wichtigen intraadipozytären Signalmoleküle p44/42 MAPK und PI 3-Kinase zu untersuchen.

3.4.1 Inhibition der UCP-1 Proteinexpression durch p38 MAPK Inhibitor SB202,190

Die Stimulation mit 100 nM ACTH über 24 h ohne Hinzunahme des spezifischen p38 MAPK Inhibitors SB202,190 führte zu einem Anstieg der UCP-1 Proteinexpression um 180 % gegenüber den unbehandelten Zellen.

Nach Hinzunahme des spezifischen p38 MAPK Inhibitors SB202,190 zeigte sich eine hoch signifikante Reduktion der UCP-1 Proteinexpression um 110 % gegenüber der Versuchsreihe ohne Inhibitor, was die Aussage konsolidiert, dass p38 MAPK die UCP-1 Expression vermittelt (s.Abb.10).

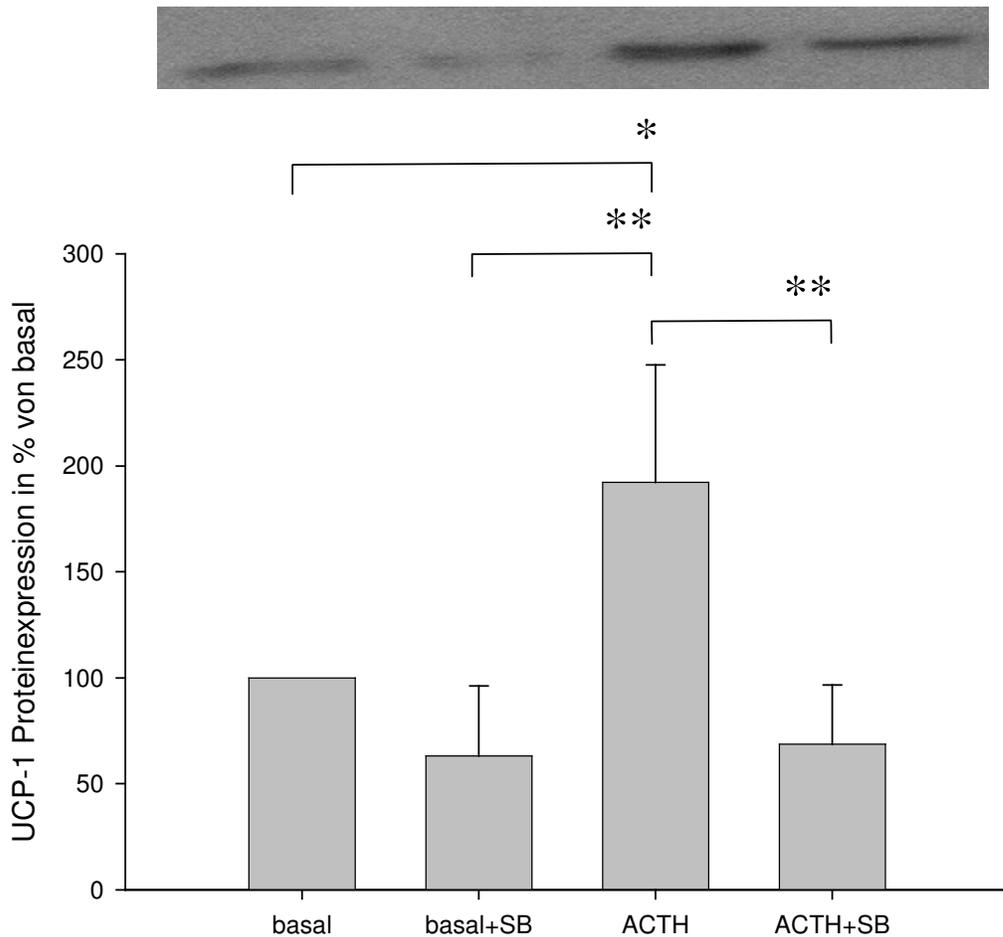


Abb.10 Signifikante Reduktion der UCP-1 Proteinexpression bei Zugabe von p38 MAPK Inhibitor SB202,190

Braune differenzierte Mausadipozyten wurden über 24 h mit 100 nM ACTH stimuliert, wobei in einer Versuchsreihe der spezifische p38 MAPK Inhibitor SB202,190 1 h vor ACTH-Gabe hinzugegeben wurde.

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen lysiert und nach Gelelektrophorese *Western Blot* mit UCP-1 spezifischem Antikörper durchgeführt.

Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$ ** bedeutet $p < 0,01$

3.4.2 Wirkung von MAPK Inhibitor PD98059 auf die UCP-1 Expression

Um eine Regulation der UCP-1 Expression via MAPK auszuschließen, wurde eine Versuchsreihe mit dem spezifischen MAPK Inhibitor PD98059 durchgeführt.

Auch hier zeigte sich bei der Versuchsreihe mit einer Stimulation von 100 nM ACTH über 8 h ohne Inhibitor ein hoch signifikanter Anstieg der UCP-1 Expression um 460 % zum Basalwert.

Bei Hinzugabe des spezifischen MAPK Inhibitor PD98059 konnte keine Suppression der UCP-1 Expression, wie bei Zugabe vom spezifischen p38 MAPK Inhibitors SB202,190, festgestellt werden, so dass hier nicht von einer Regulation der UCP-1 Expression via MAPK auszugehen ist (s.Abb.11).

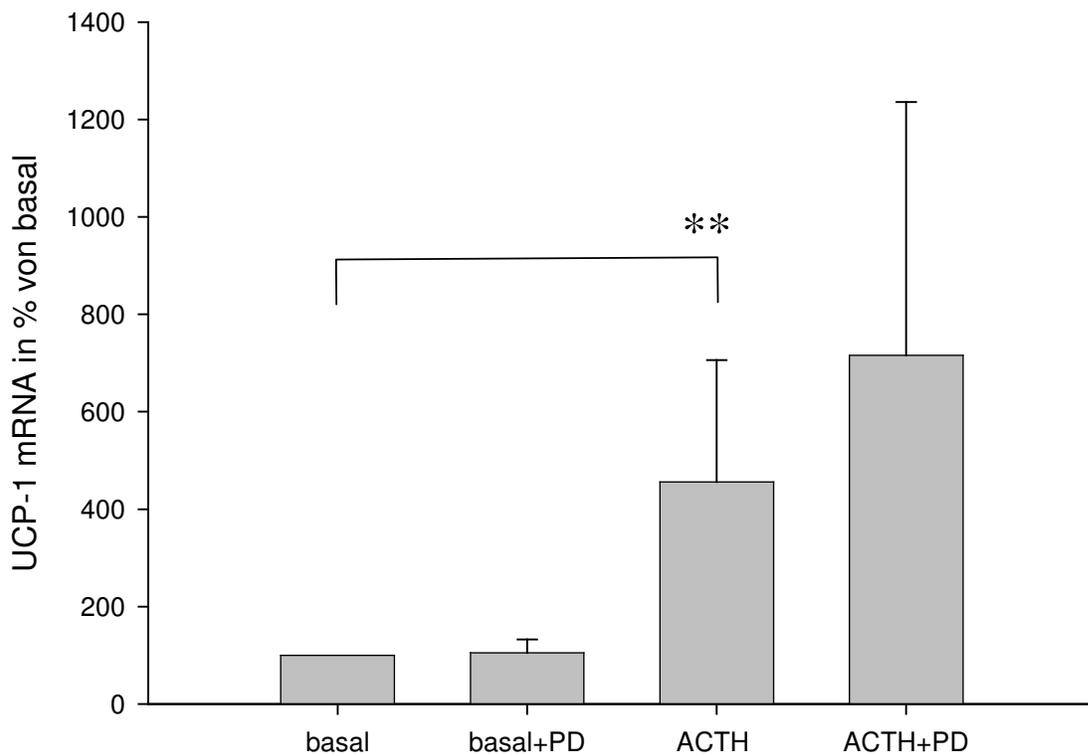


Abb.11 Keine Reduktion der UCP-1 mRNA Expression bei Zugabe von MAPK Inhibitor PD98059

Braune differenzierte Mausadipozyten wurden über 8 h mit 100 nM ACTH stimuliert, wobei in einer Versuchsreihe der spezifische MAPK Inhibitor PD98059 1 h vor ACTH-Gabe hinzugegeben wurde.

Im Anschluss an die Stimulation wurde die mRNA der Zellen isoliert, aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR ausgewertet.

Mittelwerte und Standardfehler aus 3 unabhängigen Messwerten.

** bedeutet $p < 0,01$

3.4.3 Wirkung von PI 3-Kinase Inhibitor LY294002 auf die UCP-1 Expression

Um zuletzt eine Regulation der UCP-1 Expression via PI 3-Kinase auszuschließen, wurde eine Versuchsreihe mit dem spezifischen PI 3-Kinase Inhibitor LY 294002 durchgeführt.

Die Stimulation mit 100 nM ACTH über 8 h ohne Inhibitor erbrachte einen signifikanten Anstieg der UCP-1 Expression um 360 % zum Basalwert, analog zu den vorherigen Ergebnissen.

Nach Hinzugabe des spezifischen PI 3-Kinase Inhibitor LY294002 konnte keine Suppression der UCP-1 Expression beschrieben werden.

Es kam sogar zu einem hoch signifikanten Anstieg der UCP-1 Expression um 400 % zum Basalwert, so dass auch hier definitiv nicht von einer Regulation der UCP-1 Expression via PI 3-Kinase auszugehen ist (s.Abb.12).

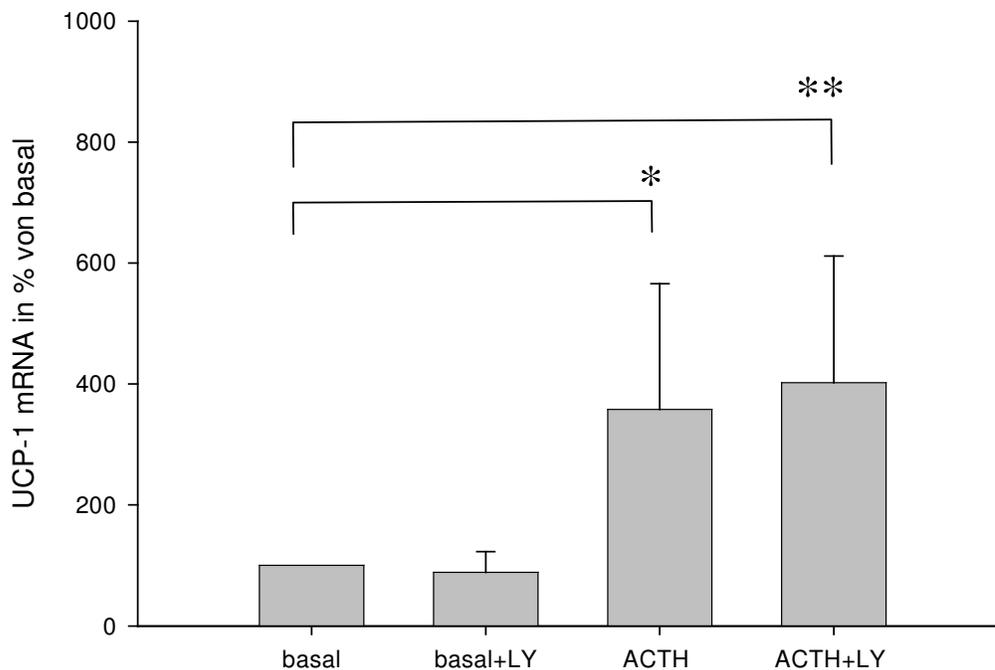


Abb.12 Keine Reduktion der UCP-1 mRNA Expression bei Zugabe von PI 3-Kinase Inhibitor LY294002

Braune differenzierte Mousadipozyten wurden über 8 h mit 100 nM ACTH stimuliert, wobei in einer Versuchsreihe der spezifische PI 3-Kinase Inhibitor LY294002 1 h vor ACTH-Gabe hinzugegeben wurde. Im Anschluss an die Stimulation wurde die mRNA der Zellen isoliert, aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR ausgewertet.

Mittelwerte und Standardfehler aus 6 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$

3.5 EINFLUSS VON ACTH AUF LEPTIN ALS SYSTEMISCHEN MEDIATOR

Eine Koexpression von Leptinrezeptoren bei POMC-Neuronen ist beschrieben worden (Thornton *et al.*, 1997), so dass abschließend noch der Einfluss von ACTH auf das Adipokin Leptin untersucht wurde hinsichtlich einer potentiellen Bedeutung als ein systemischer Mediator im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus zwischen ZNS und Peripherie.

Dazu wurden braune Mausadipozyten mit 100 nM ACTH über 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h stimuliert.

Es zeigte sich eine transiente Suppression der Leptin-Expression mit einer signifikanten Reduktion nach 1 h um 40 % und einer hoch signifikanten, maximalen Reduktion um 70 % gegenüber den unbehandelten Adipozyten nach 2 h.

Nach 24 h war keine Suppression der Leptin-Expression mehr nachweisbar (s.Abb.13).

Das Ergebnis der Suppression stimmt mit anderen in der Literatur beschriebenen Daten überein (Norman *et al.*, 2003).

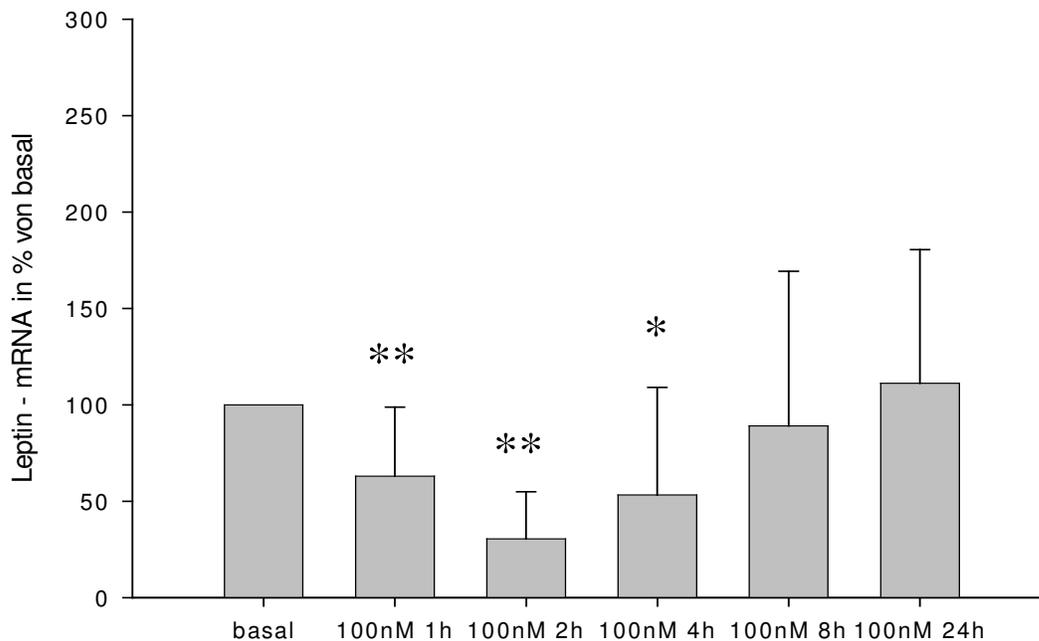


Abb.13 Hoch signifikante, transiente Suppression der Leptin-Expression

Braune differenzierte Mausadipozyten wurden mit 100 nM ACTH über 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurde die mRNA der Zellen isoliert, aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR ausgewertet.

Mittelwerte und Standardfehler aus 8 unabhängigen Messwerten.

* bedeutet $p < 0,05$ ** bedeutet $p < 0,01$

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt einen konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der UCP-1 Expression in braunen Mousadipozyten nach Stimulation mit dem Melanokortin ACTH.

Dieser Effekt ist p38 MAPK vermittelt.

Hiermit wird erstmals ein direkter peripherer Effekt von Melanokortinen auf die thermogenetische Funktion von braunem Fettgewebe beschrieben.

Weiterhin führt ACTH zu einer Suppression der Leptin-Expression.

Diese Ergebnisse lassen direkte, funktionell relevante neuropeptiderge Interaktionen vermuten und legen deren Bedeutung für die Regulation der Energiehomöostase nahe.

Das Fettgewebe mit seiner endokrinen und thermogenetischen Aktivität ist ein essentielles Element in der Regulation von Glukose- und Energiehomöostase und kann nicht mehr als ein passives Speicherorgan für Energie angesehen werden (Klaus, 2004).

Adipositas ist eine zentrale Komponente des Metabolischen Syndroms, das mit Insulinresistenz, Dyslipidämie und arterieller Hypertonie einen Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität darstellt.

Studien zeigen, dass das braune Fettgewebe ein wichtiges regulatorisches Element für die Gesamtkörperfettmasse ist (Cannon und Nedergaard, 2004).

Verschiedene Hormone und Rezeptoren sind an der Steuerung von Adipozyteninteraktion und dem Gleichgewicht zwischen Lipogenese und Lipolyse beteiligt.

Braunes Fett exprimiert von den fünf bekannten Melanokortinrezeptoren den MC2-R und MC5-R (Norman *et al.*, 2003).

Dem Melanokortinsystem wird eine besondere Funktion in der Regulation des Fettzellstoffwechsels und der Energiehomöostase zugeschrieben (Butler, 2006).

Zudem stellt es die zentrale Komponente der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse dar, wobei ACTH das wichtigste Melanokortin in der Regulation dieser sogenannten „Stressachse“ ist (Ellacott und Cone, 2006).

Die Bedeutung des Melanokortins ACTH für die thermogenetische Funktion braunen Fettgewebes war bislang allerdings kaum erforscht. Die vorliegende Dissertation untersuchte deshalb die Auswirkungen von ACTH auf braune Mousadipozyten in einem etablierten

braunen Adipozytenmodell, das alle Merkmale ausdifferenzierter brauner Adipozyten wiedergibt.

4.1 DIREKTE AKTIVIERUNG DER UCP-1 EXPRESSION DURCH ACTH

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Expression von den Melanokortinrezeptoren MC2-R und MC5-R in murinen Adipozyten beschrieben (Boston und Cone, 1996).

ACTH bindet an beide Rezeptoren.

ACTH ist ein Bestandteil des Melanokortinsystems und ein zentrales regulatorisches Element in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, der sogenannten „Stressachse“.

Stress führt zu einer Sympathikusstimulation und somit zu einer vermehrten Freisetzung von ACTH. ACTH zirkuliert im Kreislauf, bindet an die Melanokortinrezeptoren, die im Fettgewebe gefunden worden sind, inhibiert die Aufnahme von freien Fettsäuren und induziert die Lipolyse (Richter und Schwandt, 1987).

In dieser Arbeit wurden nun die Auswirkungen von ACTH auf das braune Fettgewebe und dessen Hauptfunktion, die Thermogenese, vermittelt durch UCP-1, untersucht.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Stimulation des braunen Fettgewebes mit dem Melanokortin ACTH zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Erhöhung der UCP-1 Expression und somit zu einer direkten Aktivierung der Thermogenese.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse lassen erstmals eine direkte Aktivierung der Thermogenese durch das Melanokortinsystem vermuten und weisen auf eine Rolle des Melanokortinsystems auch für die periphere Regulation des Energiestoffwechsels hin.

Indirekte Bestätigung erhält das Ergebnis von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich der Effekte von Melanokortinen auf die Energiehomöostase.

Vorbeschrieben ist, dass peripher verabreichte MC4-R Agonisten zu Gewichtsverlust in POMC-defizienten Mäusen führen (Yaswen *et al.*, 1999), wobei nicht eindeutig war, ob der Gewichtsverlust der verminderten Nahrungsaufnahme oder einem erhöhten Energieverbrauch zuzuschreiben war.

Hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse ist der Effekt am ehesten mit einem erhöhten Energieverbrauch im Rahmen einer erhöhten UCP-1 Expression zu erklären.

Die Expression von MC2-R und MC5-R im Fettgewebe ist, wie oben erwähnt, schon beschrieben worden. Deren Funktion hingegen war unkonkret.

Mutationen im MC5-R sind mit Adipositas assoziiert (Chagnon *et al.*, 1997).

Zentral nimmt das Melanokortinsystem durch MC4-R exprimierende Neurone des zentralen Nervensystems (ZNS) regulierenden Einfluss auf sympathische Efferenzen, die die thermogenetische Aktivität des braunen Fettgewebes modulieren (Voss-Andreae *et al.*, 2007). Im Tiermodell zeigen MC4-R defiziente Mäuse keine nahrungsinduzierte Erhöhung der UCP-1 Expression und der thermogenetischen Aktivität im braunen Fettgewebe (Butler und Cone, 2002).

Genauso fehlt die kälteinduzierte Erhöhung von UCP-1 bei MC4-R defizienten Mäusen (Voss-Andreae *et al.*, 2007).

MC4-R defiziente Mäuse präsentieren schwerste Fettleibigkeit, Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie (Farooqi *et al.*, 2003).

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte die Effekte von Melanokortinen bei akuter oder chronischer intrazerebroventrikulärer Applikation. Es zeigte sich dabei eine Erhöhung der Expression von UCP-1 und konsekutiv eine erhöhte thermogenetische Aktivität (Li *et al.*, 2004), was die Bedeutung von Melanokortinen in der Regulation der Energiehomöostase erneut unterstreicht.

Eine intraventrikuläre Applikation von Melanokortin Antagonisten ergab die zu erwartenden gegensätzlichen Effekte. Sie führte zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme, einer immensen Gewichtszunahme und zu einer verminderten Körpertemperatur, was auf eine reduzierte thermogenetische Aktivität schließen lässt infolge einer verminderten UCP-1 mRNA-Expression (Adage *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun, dass über die MC-R ACTH bindet und die thermogenetische Aktivität der braunen Fettzelle direkt modulieren kann, so dass den Melanokortinrezeptoren im Fettgewebe eine neue Rolle für die Regulation der Energiehomöostase zugeschrieben werden muss.

Somit haben Melanokortine nicht nur zentralnervöse Effekte, sondern haben mit den MC-R auch in der Peripherie direkte Wirkung auf die Regulation der Energiehomöostase und könnten ein interessanter Angriffspunkt für eine Pharmakotherapie des Metabolischen Syndroms werden.

4.2 MECHANISMUS DER UCP-1 AKTIVIERUNG

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt die Stimulation des braunen Fettgewebes mit dem Melanokortin ACTH zu einer Erhöhung der UCP-1 Expression und somit zu einer direkten, konzentrations- und zeitabhängigen Aktivierung der Thermogenese.

Im Anschluss an den Nachweis der direkten Aktivierung der Thermogenese durch ACTH wurde die Frage bearbeitet, über welches intrazelluläre Signalmolekül die Aktivierung von UCP-1 vermittelt wird.

Es ist bekannt, dass ACTH an die G-Protein-gekoppelten Melanokortin-Rezeptorsubtypen MC2-R und MC5-R bindet und zu einer Aktivierung eines cAMP-PKA-Signalweges führt (Kapas *et al.*, 1995; Winnay und Hammer, 2006).

Analog funktioniert die Signaltransduktion bei Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren.

Die beteiligten Signalelemente, die bei der Erhöhung der UCP-1 Expression nach Stimulation des β_3 -Rezeptors aktiviert werden, sind von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert und beschrieben worden. Nach Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors erfolgt die Signaltransduktion über die Stimulation des cAMP-PKA-Signalweges und weiter über die Aktivierung der p38 MAP-Kinase. Nachfolgend kommt es zu einer Erhöhung der UCP-1 Expression.

Dabei ist die Phosphorylierung von p38 MAPK konzentrations- wie auch dosisabhängig (Cao *et al.*, 2001).

Somit konnte p38 MAPK als ein wichtiges Element bei der Aktivierung von UCP-1 im distalen Abschnitt der Signaltransduktion des β_3 -Rezeptor-Signalweges identifiziert werden.

Analog zum β_3 -Rezeptor-Signalweg wurde die Relevanz von p38 MAPK bei der Signaltransduktion für die Expression von UCP-1 beim MC-R-Signalweg, im braunen Fettgewebe die MC2-R und MC5-R, untersucht.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Stimulation brauner Fettzellen mit ACTH eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung von p38 MAPK induziert.

Bestätigt wird diese Aussage durch Versuche mit dem spezifischen Inhibitor SB202,190 für p38 MAPK, die in dieser Arbeit durchgeführt worden sind.

Bei Stimulation der braunen Fettzellen mit ACTH und Hinzugabe des p38 MAPK spezifischen Inhibitors SB202,190 konnte die vorbeschriebene Erhöhung der UCP-1 Expression auf Proteinebene hochsignifikant reduziert werden.

Auch diese Inhibitionsergebnisse stimmen überein mit den analogen Studien beim β_3 -Rezeptor-Signalweg und manifestieren den Standpunkt, dass die Induktion der UCP-1 Expression p38 MAPK vermittelt ist, und p38 MAPK somit ein notwendiges Signalelement in der Signaltransduktion beim β_3 -Rezeptor-Signalweg (Cao *et al.*, 2004) wie auch beim MC-R-Signalweg darstellt.

Andere wichtige intraadipozytäre Signalelemente wie die PI 3-Kinase und p44/42 MAPK wurden hinsichtlich einer zentralen Relevanz bei der UCP-1 Signaltransduktion untersucht, zeigten jedoch bei pharmakologischer Inhibition keine Auswirkungen auf den ACTH induzierten Anstieg der UCP-1 Expression.

4.3 TRANSIENTE SUPPRESSION DER LEPTIN-EXPRESSION

Leptin steigert über die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und β -adrenerge Rezeptoren mittelbar die Lipolyse und Wärmeproduktion in Fettzellen und hemmt durch indirekte negative Rückkopplung die Leptinsekretion (Rayner und Trayhurn, 2001).

Leptin ist wegen seiner Stimulation bzw. Hemmung unterschiedlicher zentralnervöser Neuronengruppen ein sehr wichtiges Adipokin in der Regulation der Energiehomöostase.

POMC-Neurone koexprimieren Leptinrezeptoren, was zu einer direkten Beeinflussung der POMC-Genexpression im Hypothalamus durch Leptin führt (Cheung *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997).

Melanokortine als Produkte der POMC-Neurone sind somit unmittelbar eingebunden in die Vermittlung von Leptineffekten ans ZNS, was die bedeutende Rolle der Melanokortine in der neuroendokrinen Regulation der Energiehomöostase verdeutlicht (Thornton *et al.*, 1997).

Um einen in sich geschlossenen Regelkreis für eine Melanokortin-Leptin-Achse aufzuzeigen, wurde der Effekt von ACTH auf die Leptin-Expression in braunen Mausadipozyten untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mittels ACTH die Leptin-Expression transient inhibiert.

Andere Studien zeigen kongruente Ergebnisse. Eine Stimulation über 24 h mit dem Melanokortin α -MSH führte bei Rattenadipozyten zu einer Abnahme der Leptin-Expression und -Sekretion (Hoggard *et al.*, 2004). Die Stimulation mit dem Melanokortin Antagonisten Agouti demonstrierte den zu erwartenden gegensätzlichen Effekt, einen Anstieg der Leptin-Expression.

Der Mechanismus der Leptin-Suppression wird noch kontrovers diskutiert, wobei die Suppression entweder durch eine direkte Einflussnahme auf transkriptionaler Ebene zu erklären sein könnte oder das Ergebnis der lipolytischen Potenz von Melanokortinen auf Fettgewebe ist (Forbes *et al.*, 2001).

Festzuhalten ist aber eine regulatorische Einflussnahme von Melanokortinen auf die Expression des Adipokins Leptin, was durch andere Arbeitsgruppen und hier für braune murine Adipozyten belegt worden ist.

Mit dieser funktionellen Vernetzung zwischen zentralem Nervensystem und Peripherie ist ein Regelkreis geschlossen worden.

Melanokortine führen über eine Erhöhung der UCP-1 Expression zu einer Aktivierung der Wärmeproduktion in braunen Adipozyten und hemmen durch indirekt negative Rückkopplung infolge Abnahme der Leptin-Expression die UCP-1 Expression.

4.4 GEWONNENE ERKENNTNISSE

Die in der vorliegenden Dissertation zu Beginn gestellten Fragen konnten wie folgt beantwortet werden:

1. *Gibt es eine direkte Wirkung von ACTH auf die braune Fettzelle und hat diese Einfluss auf die thermogenetische Aktivität der braunen Fettzelle?*

Die Stimulation des braunen Fettgewebes mit dem Melanokortin ACTH führt zu einem direkten, konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der UCP-1 Expression.

Keinen Einfluss nimmt ACTH auf das Differenzierungsverhalten brauner Fettzellen.

2. *Über welchen Mechanismus wird die Thermogenese reguliert?*

Die Induktion der UCP-1 Expression ist p38 MAPK vermittelt.

Die intraadipozytären Signalelemente PI 3-Kinase und p44/42 MAPK haben keinen Einfluss auf die Induktion der UCP-1 Expression.

3. *Welche Auswirkung hat ACTH auf das Adipokin Leptin als systemischen Mediator der Energiehomöostase?*

ACTH führt zu einer transienten Suppression der Leptin-Expression in braunen Adipozyten im Sinne einer negativen *feedback* Rückkopplung.

4.5 ABSCHLIEBENDES SCHAUBILD

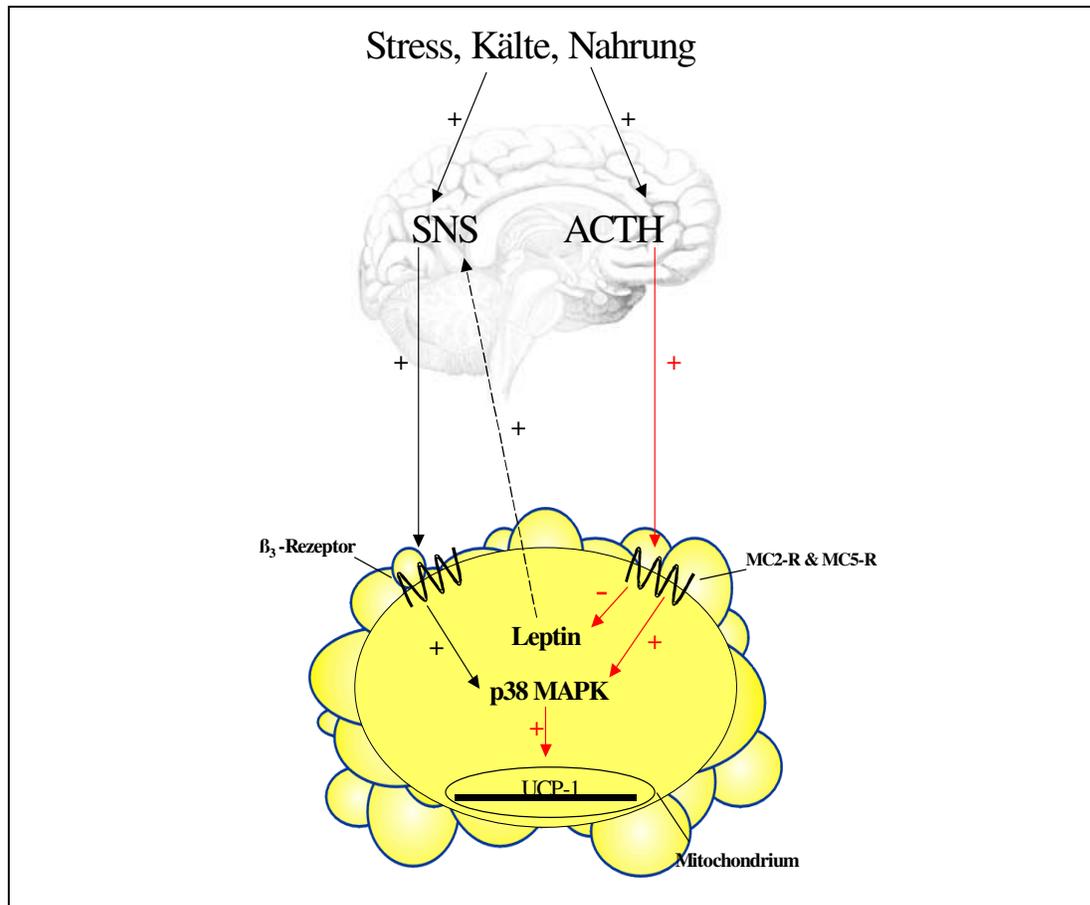


Abb.14

Nahrungsaufnahme induziert die Lipogenese im Fettgewebe, was zu einer gesteigerten Sekretion von Leptin führt. Leptin wirkt auf das zentrale Nervensystem (ZNS) und synthesessteigernd auf ACTH, wodurch es modulierend über die Regulation der Neuropeptide und des sympathischen Nervensystems auf eine Reihe von Effektoren der Energiehomöostase Einfluss nimmt.

Neben einer zentralnervösen Stimulation von Melanokortinrezeptor-tragenden Neuronen kommt es, wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, zu einer direkten Einflussnahme von Melanokortinen auf die Fettgewebefunktion. Dieser „*crosstalk*“ führt zu einer gesteigerten UCP-1 Expression und somit zu einer Aktivierung der adaptiven Thermogenese die über die MC-R, höchstwahrscheinlich die MC2-R und MC5-R, p38 MAPK vermittelt abläuft.

Im Sinne eines negativen *feedback* Mechanismus inhibiert ACTH transient die Leptin-Expression.

4.6 AUSBLICK

Ein Paradigmenwechsel bezüglich der Bewertung der Fettgewebefunktion und seiner Implikation an Stoffwechselstörungen im Rahmen des Metabolischen Syndroms und anderen kardiovaskulären Erkrankungen hat in den letzten Jahren stattgefunden.

Neue Forschungsergebnisse beschreiben das Fettgewebe als das größte endokrin aktive Organ, das mit seinen pleiotropen Fettzellfunktionen wichtige physiologische Vorgänge beeinflusst und reguliert.

Daraus leiten sich mögliche therapeutische Optionen ab, die hinsichtlich einer selektiven Modulation des Fettgewebes und seiner Funktion untersucht werden.

Die Hemmung der proximalen Insulinsignalweiterleitung schützt vor Adipositas und vor einer altersabhängigen Glukosetoleranzstörung (Bluher *et al.*, 2002). Eine vollständige Abwesenheit von Insulinrezeptoren im Fettgewebe geht sogar mit einer Verlängerung der Lebenserwartung einher (Bluher *et al.*, 2003).

Eine Konversion humaner weißer in braune Fettzellen ist beschrieben worden (Tiraby *et al.*, 2003).

Der therapeutische Einsatz von Adipokinen ist Gegenstand aktueller Forschung. Leptin beispielsweise wird bei schwerer kindlicher Fettsucht und Lipodystrophie verabreicht und führt zu einer Verbesserung der Fettstoffwechselstörung (Farooqi *et al.*, 1999; Oral *et al.*, 2002). Im Mausmodell führt Adiponectin-Gabe zu einer Besserung von Dyslipidämie und Insulinresistenz (Yamauchi *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Fettgewebemodulation besteht in einer Steigerung des Energieverbrauchs über die Beeinflussung der adaptiven Thermogenese.

Verschiedene Pharmaka und Substanzen wie β_3 -Rezeptoragonisten, CNTF, Thiazolidindione und Trijodthyronin führen direkt oder indirekt zur Aktivierung der Thermogenese (Hamann *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulation des braunen Fettgewebes mit dem Melanokortin ACTH zu einem direkten, konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der UCP-1 Expression führt, das Thermogenese vermittelt.

Dieser Effekt ist p38 MAPK vermittelt.

Unter Berücksichtigung der neuesten Erkenntnisse über die regulatorische Funktion des Fettgewebes hinsichtlich der Energiehomöostase, hat eine selektive Aktivierung der Thermogenese durch Entwicklung peripherer MC-R-Agonisten potentielle Bedeutung für die Therapie des Metabolischen Syndroms.

Bestärkt wird diese potentielle therapeutische Option durch den Aufsehen erregenden Beweis von aktivem braunen Fettgewebe in einem quantitativ relevanten Ausmaß von mehreren zehn Prozenten, das bei PET-Untersuchungen gefunden wurde (Christensen *et al.*, 2006; Nedergaard *et al.*, 2007).

Den drei postulierten Schlüsselfunktionen von Adipozyten, Insulinsensitivität, endokrine Aktivität und adrenerge Sensitivität, ist nun eine vierte Schlüsselfunktion hinzuzufügen: die melanokortine Sensitivität.

Die Erkenntnis der melanokortinen Sensitivität des Fettgewebes und der damit verbundenen Möglichkeit einer selektiven Beeinflussung der Fettgewebefunktion, vor allem der thermogenetischen Aktivität, durch Melanokortine, lässt das Melanokortinsystem als eine innovative, selektive Therapieoption bei der Behandlung des Metabolischen Syndroms attraktiv erscheinen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Adipositas nimmt in der industrialisierten Welt hinsichtlich Prävalenz und Inzidenz pandemische Ausmaße an. Fettleibigkeit, Insulinresistenz, Dyslipidämie, arterieller Hypertonus, Hyperurikämie sind wesentliche Komponenten des Metabolischen Syndroms und führen zu einer Dysregulation des Energie- und Stoffwechselhaushaltes.

Für die Entwicklung wirkungsvoller, innovativer Therapieansätze beim Metabolischen Syndrom nimmt die Erforschung der Pathomechanismen dieser Störungen und die Aufdeckung neuer Regelkreise eine Schlüsselstellung ein.

In den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses ist dabei das Fettgewebe gerückt, das nach neuesten Erkenntnissen eine zentrale Rolle in der Regulation der Energie und Glukosehomöostase spielt und als das größte endokrine Organ anzusehen ist.

Eine spezialisierte Form des Fettgewebes, das so genannte braune Fett, hat wegen seiner thermogenetischen Potenz eine zentrale Bedeutung für die Energiehomöostase. Hinsichtlich der Beeinflussung der thermogenetischen Aktivität ist vor allem das sympathische Nervensystem via β_3 -Rezeptor-Signalweg untersucht.

Eine direkte Beeinflussung der Thermogenese durch im Blut zirkulierende Melanokortine ist bisher unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden braune Mausadipozyten mit dem Melanokortin ACTH stimuliert.

Bezüglich des Differenzierungsverhaltens wurde gegenüber der unbehandelten Kontrolle kein Unterschied festgestellt.

Es zeigte sich jedoch ein konzentrations- und zeitabhängiger Anstieg der UCP-1 Expression. So kann in dieser Arbeit erstmals eine direkte Aktivierung der Thermogenese durch ein Melanokortin über die MC-R im braunen Fettgewebe beschrieben werden.

In weiteren Experimenten konnte demonstriert werden, dass dieser Effekt p38 MAPK vermittelt ist.

Ferner führt ACTH-Stimulation zu einer passageren Inhibition der Leptin-Expression, einem wichtigen Adipokin in der Regulation der Energiehomöostase, im Sinne eines negativen *feedback* Regelkreises.

Mit der Beschreibung dieser direkten Aktivierung der Thermogenese durch das Melanokortin ACTH wird eine neue Ebene der Regulation der Fettzellfunktion und Energiehomöostase aufgezeigt. Dies ermöglicht neue Therapieansätze und trägt zum weiteren Verständnis des Metabolischen Syndroms bei.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erläuterung
ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
AGRP	<i>agouti-related peptide</i>
AKT	Serin-/Threonin-Protein-Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATH	adaptiven Thermogenese
AT-II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CL β 3	CL316,243 – selektiver β_3 -Rezeptoragonist
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRF	<i>cortico-releasing-factor</i>
dATP	<i>2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate</i>
dCTP	<i>2'-deoxycytidine 5'-triphosphate</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	<i>2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate</i>
DMEM	Dulbeccos modifiziertes <i>Eaglesches</i> Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dUTP	<i>2'-deoxyuridine 5'-triphosphate</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötales bovines Serum
FDG	¹⁸ F-2-fluoro-2-deoxyglucose
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure
IL-6	In terleukin-6

IRS	Insulinrezeptorsubstrat
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MC-R	Melanokortinrezeptor
μM	Mikromolar
α-MSH	<i>α-melanocyte-stimulating hormone</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaPO ₄	Natriumpyrophosphat
nM	Nanomolar
PA	physischen Aktivität
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-
PBS	Phosphatpuffer-Salzlösung
PC	Prohormon-Convertase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positron-Emission-Tomographie
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	<i>proopiomelanocortin</i>
P70S6	Protein-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
RNU	Ruheüchternumsatz
RT-PCR	<i>real-time-PCR</i>
SDS	Natriumdodezylsulfat
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UCP	<i>uncoupling protein</i>

VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adage T, Scheurink AJ, de Boer SF, de Vries K, Konsman JP, Kuipers F, Adan RA, Baskin DG, Schwartz MW, van Dijk G:** Hypothalamic, metabolic, and behavioral responses to pharmacological inhibition of CNS melanocortin signaling in rats. *J Neurosci* 21:3639-3645 (2001).
2. **Ahima RS, Flier JS:** Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11:327-332 (2000).
3. **Bachman ES, Dhillon H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB:** β -AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297:843-845 (2002).
4. **Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE:** The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947-953 (2001).
5. **Berg AH, Combs TP, Scherer PE:** ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:84-89 (2002).
6. **Bluher M, Kahn BB, Kahn CR:** Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572-574 (2003).
7. **Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR:** Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25-38 (2002).
8. **Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR:** Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25-38 (2002).
9. **Boston BA:** The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 885:75-84 (1999).
10. **Boston BA, Cone RD:** Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 137:2043-2050 (1996).
11. **Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254 (1976).
12. **Bray GA, Greenway FL:** Current and potential drugs for treatment of obesity. *Endocr Rev* 20:805-875 (1999).
13. **Butler AA:** The melanocortin system and energy balance. *Peptides* 27:281-290 (2006).
14. **Butler AA, Cone RD:** The melanocortin receptors: lessons from knockout models. *Neuropeptides* 36:77-84 (2002).
15. **Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD:** A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141:3518-3521 (2000).
16. **Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ:** Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348:1625-1638 (2003).
17. **Cannon B, Nedergaard J:** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359 (2004).
18. **Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S:** p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* 24:3057-3067 (2004).

19. **Cao W, Medvedev AV, Daniel KW, Collins S:** beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 276:27077-27082 (2001).
20. **Chagnon YC, Chen WJ, Perusse L, Chagnon M, Nadeau A, Wilkison WO, Bouchard C:** Linkage and association studies between the melanocortin receptors 4 and 5 genes and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Mol Med* 3:663-673 (1997).
21. **Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA:** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-4492 (1997).
22. **Christensen CR, Clark PB, Morton KA:** Reversal of hypermetabolic brown adipose tissue in F-18 FDG PET imaging. *Clin Nucl Med* 31:193-196 (2006).
23. **Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahilly S:** Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2557-2562 (2004).
24. **Collins S, Surwit RS:** The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Prog Horm Res* 56:309-328 (2001).
25. **DeFronzo RA, Ferrannini E:** Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194 (1991).
26. **Ellacott KL, Cone RD:** The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1265-1274 (2006).
27. **Fan W, Voss-Andreae A, Cao WH, Morrison SF:** Regulation of thermogenesis by the central melanocortin system. *Peptides* 26:1800-1813 (2005).
28. **Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S:** Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341:879-884 (1999).
29. **Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S:** Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 348:1085-1095 (2003).
30. **Farooqi S, O'Rahilly S:** Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev* 27:710-718 (2006).
31. **Fehm HL, Smolnik R, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Born J:** The melanocortin melanocyte-stimulating hormone/adrenocorticotropin(4-10) decreases body fat in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1144-1148 (2001).
32. **Forbes S, Bui S, Robinson BR, Hochgeschwender U, Brennan MB:** Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin-proopiomelanocortin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4233-4237 (2001).
33. **Friedberg M, Zoumakis E, Hiroi N, Bader T, Chrousos GP, Hochberg Z:** Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in mature human subcutaneous adipocytes by hypothalamic messengers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:385-393 (2003).
34. **Friedman JM, Halaas JL:** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770 (1998).
35. **Gantz I, Fong TM:** The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E468-474 (2003).
36. **Garrow JS, Webster J:** Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *Int J Obes* 9:147-153 (1985).
37. **Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Bruning J, Kozak LP, Kahn CR, Benito M:** Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows

- diabetic phenotype without insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 108:1205-1213 (2001a).
38. **Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Bruning J, Kozak LP, Kahn CR, Benito M:** Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108:1205-1213 (2001b).
39. **Hamann A, Munzberg H, Tafel J, Ziegler R:** [Some may feel hot: significance of thermogenesis for energy metabolism and the treatment of obesity]. *Dtsch Med Wochenschr* 126:241-246 (2001).
40. **Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Rayner DV:** Regulation of adipose tissue leptin secretion by alpha-melanocyte-stimulating hormone and agouti-related protein: further evidence of an interaction between leptin and the melanocortin signalling system. *J Mol Endocrinol* 32:145-153 (2004).
41. **Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F:** Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131-141 (1997).
42. **Isomaa B:** A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 73:2395-2411 (2003).
43. **Jezeq P, Zackova M, Ruzicka M, Skobisova E, Jaburek M:** Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. *Physiol Res* 53 Suppl 1:S199-211 (2004).
44. **Kapas S, Purbrick A, Hinson JP:** Role of tyrosine kinase and protein kinase C in the steroidogenic actions of angiotensin II, alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin in the rat adrenal cortex. *Biochem J* 305 (Pt 2):433-438 (1995).
45. **Kiwaki K, Levine JA:** Differential effects of adrenocorticotrophic hormone on human and mouse adipose tissue. *J Comp Physiol [B]* 173:675-678 (2003).
46. **Klaus S:** Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets* 5:241-250 (2004).
47. **Klein J, Fasshauer M, Benito M, Kahn CR:** Insulin and the beta3-adrenoceptor differentially regulate uncoupling protein-1 expression. *Molecular Endocrinology* 14:764-773 (2000a).
48. **Klein J, Fasshauer M, Benito M, Kahn CR:** Insulin and the beta3-adrenoceptor differentially regulate uncoupling protein-1 expression. *Mol Endocrinol* 14:764-773 (2000b).
49. **Klein J, Fasshauer M, Ito M, Lowell BB, Benito M, Kahn CR:** beta(3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 274:34795-34802 (1999).
50. **Klein J, Fasshauer M, Klein HH, Benito M, Kahn CR:** Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays* 24:382-388 (2002).
51. **Kozak LP, Harper ME:** Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr* 20:339-363 (2000).
52. **Laakso M:** Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48:937-942 (1999).
53. **Li G, Zhang Y, Wilsey JT, Scarpace PJ:** Unabated anorexic and enhanced thermogenic responses to melanotan II in diet-induced obese rats despite reduced melanocortin 3 and 4 receptor expression. *J Endocrinol* 182:123-132 (2004).
54. **Lowell BB, Flier JS:** Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med* 48:307-316 (1997).
55. **MacNeil DJ, Howard AD, Guan X, Fong TM, Nargund RP, Bednarek MA, Goulet MT, Weinberg DH, Strack AM, Marsh DJ, Chen HY, Shen CP, Chen AS,**

- Rosenblum CI, MacNeil T, Tota M, MacIntyre ED, Van der Ploeg LH:** The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 450:93-109 (2002).
56. **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, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737 (2002).
57. **Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, Kumada M, Okamoto Y, Nagaretani H, Nishizawa H, Kishida K, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Nagai R, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 277:37487-37491 (2002).
58. **Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T:** Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* 892:146-154 (1999).
59. **Minokoshi Y, Kahn CR, Kahn BB:** Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem* 278:33609-33612 (2003).
60. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B:** Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444-452 (2007).
61. **Norman D, Isidori AM, Frajese V, Caprio M, Chew SL, Grossman AB, Clark AJ, Michael Besser G, Fabbri A:** ACTH and alpha-MSH inhibit leptin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway. *Mol Cell Endocrinol* 200:99-109 (2003).
62. **Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F, Patsch W:** Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38:2125-2133 (1997).
63. **O'Rahilly S:** Insights into obesity and insulin resistance from the study of extreme human phenotypes. *Eur J Endocrinol* 147:435-441 (2002).
64. **Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A:** Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 346:570-578 (2002).
65. **Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M, Pagotto U:** The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1083:111-128 (2006).
66. **Pecqueur C, Couplan E, Bouillaud F, Ricquier D:** Genetic and physiological analysis of the role of uncoupling proteins in human energy homeostasis. *Journal of Molecular Medicine* 79:48-56 (2001).
67. **Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI:** Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* 109:1345-1350 (2002).
68. **Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS:** Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89:447-452 (2004).
69. **Rajala MW, Scherer PE:** Minireview: The adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773 (2003).
70. **Rayner DV, Trayhurn P:** Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *Journal of Molecular Medicine* 79:8-20 (2001).

71. **Reaven GM:** Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44:121-131 (1993).
72. **Richter WO, Schwandt P:** Lipolytic potency of proopiomelanocortin peptides in vitro. *Neuropeptides* 9:59-74 (1987).
73. **Rosmond R:** Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to Type 2 diabetes? *Med Sci Monit* 9:RA35-39 (2003).
74. **Saltiel AR, Kahn CR:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806 (2001).
75. **Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG:** Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46:2119-2123 (1997).
76. **Sell H, Deshaies Y, Richard D:** The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2098-2104 (2004).
77. **Silva JE, Rabelo R:** Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 136:251-264 (1997).
78. **Spiegelman BM, Flier JS:** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543 (2001).
79. **Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA:** Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 138:5063-5066 (1997).
80. **Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D:** Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278:33370-33376 (2003).
81. **Vergoni AV, Bertolini A:** Role of melanocortins in the central control of feeding. *Eur J Pharmacol* 405:25-32 (2000).
82. **Vicennati V, Pasquali R:** Abnormalities of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in nondepressed women with abdominal obesity and relations with insulin resistance: evidence for a central and a peripheral alteration. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4093-4098 (2000).
83. **Voss-Andreae A, Murphy JG, Ellacott KL, Stuart RC, Nillni EA, Cone RD, Fan W:** Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology* 148:1550-1560 (2007).
84. **White MF:** The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 182:3-11 (1998).
85. **WHO:** (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>) (Tag des Zugriffs:23.11.2007)).
86. **Winnay JN, Hammer GD:** Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 20:147-166 (2006).
87. **Wolf G:** Glucocorticoids in adipocytes stimulate visceral obesity. *Nutr Rev* 60:148-151 (2002).
88. **Xu A, Yin S, Wong L, Chan KW, Lam KS:** Adiponectin ameliorates dyslipidemia induced by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir in mice. *Endocrinology* 145:487-494 (2004).
89. **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:** The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946 (2001).
90. **Yanovski SZ, Yanovski JA:** Obesity. *N Engl J Med* 346:591-602 (2002).

91. **Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U:** Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5:1066-1070 (1999).
92. **Yeo GS, Farooqi IS, Challis BG, Jackson RS, O'Rahilly S:** The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models. *QJM* 93:7-14 (2000).
93. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM:** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432 (1994).

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas der Dissertation sowie für die optimale und umfassende Betreuung wie auch wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

Ohne sein persönliches Engagement, seine Hilfestellungen und die Bereitschaft zur Diskussion und konstruktiver Kritik, wäre die Arbeit nicht in dieser Form zustande gekommen.

Ganz besonders möchte ich mich für die einmalige Gelegenheit bedanken, dass ich meine Ergebnisse als Teilergebnisse der Laborgruppe zusammen mit Dr. med. K. Alexander Iwen und Özge Senyaman im Rahmen eines internationalen Kongresses präsentieren durfte.

Für das außerordentliche gute und anregende Arbeitsklima wie auch für die Unterstützung im Laboralltag und bei den Experimenten möchte ich mich bei Britta Meier, Nina Perwitz und Dr. med. K. Alexander Iwen bedanken.

Großer Dank gilt Dr. med. Daniel Kraus, der mir bei allen Fragen immer, auch derzeit in Amerika, hilfreich zur Seite stand, im Speziellen beim Verstehen und Beheben meiner Computerunkenntnisse.

Özge Senyaman danke ich für das hilfreiche Einspringen bei der Zellpflege an den Tagen, wo ich nicht ins Labor kommen konnte.

Meiner Freundin Sarah Kapischke danke ich für die Durchsicht des Manuskripts und kreative Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank geht zuletzt an meine Eltern Margret und Dr. med. Helmut Schwartz für deren konstruktive Kritik und Unterstützung während der gesamten Zeit.

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name: Arne Schwartz
 Geburtsdatum: 31. August 1979
 Geburtsort: Itzehoe
 Familienstand: ledig
 Nationalität: deutsch
 Adresse: Percevalstrasse 8, 23564 Lübeck



Ausbildung

1990 – 1999 **Elsa-Brändström-Schule Elmshorn**
 • Abitur in Geschichte, Biologie, Französisch, Mathematik

1999 – 2000 **Med-Ecole Kiel**
 • Ausbildung zum Rettungssanitäter

2001 – 2003 **Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald**
 • Sept. 2003: Physikum

2003 – 2008 **Medizinische Universität zu Lübeck**
 • April 2008: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2006 – 2007 **Praktisches Jahr**
 • Innere: Asklepios Klinik Bad Oldesloe
 • Chirurgie: Downtown Hospital New York, NY, USA
 • Chirurgie: Gentofte Hospital Kopenhagen, DK
 • Anästhesie: Sana Kliniken Ostholstein, Klinik Eutin

Ehrenamtliche Tätigkeiten

Seit 2000 Rettungssanitäter ASB/Rettungsdienst der Hansestadt Lübeck

Wissenschaftlicher Werdegang

2004 – 2006 Forschung für die Dissertation im Labor von Prof. Dr. med. Johannes Klein, Medizinische Klinik I, Universität zu Lübeck

Publikationen in chronologischer Reihenfolge

- 2006 Senyaman O, **Schwartz A**, Iwen K.A.H., Papenfuss K, Drenckhan M, Meier B, Perwitz N, Klein J: Melanocortin crosstalk with metabolic and endocrine adipose functions: ACTH directly induces insulin resistance, promotes a pro-inflammatory adipokine profile, and stimulates UCP-1 in adipocytes. *88th Annual Meeting of the Endocrine Society, Boston.*
- 2007 Iwen K.A.H., **Schwartz A***, Senyaman O*, Drenckhan M, Meier B, Perwitz N, Klein J: Melanocortin crosstalk with adipose functions: ACTH directly induces insulin resistance, promotes a pro-inflammatory adipokine profile, and stimulates UCP-1 in adipocytes. (in press, J Endocrinol.)
(* gleichberechtigte Autoren)