

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

---

# **Induktion einer Stressantwort durch direkte Interaktion von BNP mit Adipozyten**



Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von  
**Nina Poll**  
aus Flensburg

Lübeck 2010

## **Meinen Eltern**

Man skal være go` ved sig selv så længe man har sig!  
(Bruno L. Schmidt)

**1. Berichtstatter:**

**Prof. Dr. med. Johannes Klein**

**2. Berichtstatter:**

**Prof. Dr. med. Matthias Heringlake**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**07.12.2010**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.12.2010**

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VII

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b><u>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</u></b>                      | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Einleitung.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Adipositas, das Metabolische Syndrom und Folgeerkrankungen..... | 1         |
| 1.1.2      | Fettgewebe.....   | 3         |
| 1.1.2.1    | Fettgewebsformen und Thermogenese.....                          | 3         |
| 1.1.2.2    | Endokrine Fettgewebefunktion.....                               | 5         |
| 1.1.2.3    | Regulation der Glukosehomöostase.....                           | 9         |
| 1.1.3      | Das Natriuretische Peptidsystem und BNP.....                    | 10        |
| <b>1.2</b> | <b>Fragestellung.....</b>                                       | <b>16</b> |
| <b>2</b>   | <b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>                             | <b>17</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Material.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1.1      | Zellmodell.....   | 17        |
| 2.1.2      | Chemikalien.....  | 17        |
| 2.1.3      | Verbrauchsartikel.....  | 18        |
| 2.1.4      | Geräte.....   | 19        |
| 2.1.5      | Antikörper.....   | 20        |
| 2.1.6      | <i>Primer</i> .....   | 20        |
| 2.1.7      | Nährmedien, Puffer, Stammlösungen und Reagenzien.....           | 21        |
| 2.1.7.1    | Nährmedien.....   | 21        |
| 2.1.7.2    | Puffer und Stammlösungen.....                                   | 21        |
| 2.1.7.3    | Reagenzien.....   | 23        |
| <b>2.2</b> | <b>Methoden.....</b>  | <b>24</b> |
| 2.2.1      | Zellkultur.....   | 24        |
| 2.2.2      | Zelldifferenzierung.....  | 25        |
| 2.2.3      | Zellfärbung ( <i>Oil-Red-O</i> -Färbung).....                   | 26        |
| 2.2.4      | Hungerperiode und Zellstimulation.....                          | 26        |
| 2.2.5      | Untersuchungen auf Proteinebene.....                            | 26        |
| 2.2.5.1    | Zellyse, Gewinnung der Zytosolfraktion, Proteinbestimmung.....  | 26        |
| 2.2.5.2    | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....             | 27        |
| 2.2.5.3    | <i>Western Blot</i> .....                                       | 28        |
| 2.2.6      | Glukose-Aufnahme-Assay.....                                     | 29        |
| 2.2.7      | Untersuchungen zur Genexpression.....                           | 30        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.2.7.1    | Zellstimulation.....  | 30        |
| 2.2.7.2    | mRNA-Isolation und -Aufreinigung.....   | 30        |
| 2.2.7.3    | <i>Real time</i> - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....                               | 32        |
| 2.2.8      | Statistische Auswertung.....  | 33        |
| <b>3</b>   | <b><u>ERGEBNISSE</u></b>  | <b>34</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Adipozytendifferenzierungsverhalten und Thermogenese unter Einfluss von BNP.....</b> | <b>34</b> |
| 3.1.1      | Adipozytendifferenzierungsverhalten unter Einfluss von BNP.....                         | 34        |
| 3.1.2      | BNP und Thermogenese.....   | 35        |
| <b>3.2</b> | <b>Modifikation der endokrinen Adipozytenaktivität durch BNP.....</b>                   | <b>36</b> |
| 3.2.1      | Modifikation der Genexpression von Leptin.....  | 36        |
| 3.2.2      | Modifikation der Genexpression von Adiponectin.....                                     | 38        |
| 3.2.3      | Modifikation der Genexpression von MCP-1.....   | 38        |
| 3.2.4      | Modifikation der Genexpression von ATRAP.....   | 39        |
| <b>3.3</b> | <b>Einfluss von BNP auf die Insulinsignalkaskade und Insulinsensitivität.....</b>       | <b>40</b> |
| 3.3.1      | Effekte von BNP auf Schlüssel-moleküle der Insulinsignalkaskade.....                    | 40        |
| 3.3.1.1    | Phosphorylierung von MAP-Kinasen.....   | 40        |
| 3.3.1.2    | Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB/AKT).....                                     | 44        |
| 3.3.1.3    | Phosphorylierung des Signalmoleküls p70S6.....  | 45        |
| 3.3.2      | Einfluss von BNP auf die Insulinsensitivität.....                                       | 46        |
| <b>4</b>   | <b><u>DISKUSSION</u></b>  | <b>47</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Adipozytendifferenzierungsverhalten und Thermogenese unter Einfluss von BNP.....</b> | <b>48</b> |
| 4.1.1      | Die Adipozytendifferenzierung wird durch BNP nicht verändert...                         | 48        |
| 4.1.2      | BNP hat keinen Einfluss auf die adipozytäre Thermogenese.....                           | 49        |
| <b>4.2</b> | <b>Modifikation der endokrinen Adipozytenfunktion durch BNP.....</b>                    | <b>50</b> |
| 4.2.1      | BNP steigert die Genexpression von Leptin.....  | 50        |
| 4.2.2      | BNP beeinflusst die Genexpression von Adiponectin nicht.....                            | 52        |
| 4.2.3      | BNP steigert die Genexpression von MCP-1.....   | 53        |
| 4.2.4      | BNP steigert die Genexpression von ATRAP.....   | 55        |
| <b>4.3</b> | <b>Interaktionen von BNP mit Signalmolekülen der Insulinsignalkaskade.....</b>          | <b>57</b> |
| 4.3.1      | BNP stimuliert die MAP-Kinasen p38 und p44/42.....                                      | 58        |
| 4.3.2      | BNP stimuliert die Proteinkinase B (PKB/AKT).....                                       | 59        |
| 4.3.3      | BNP aktiviert p70S6 nicht.....  | 60        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>4.4</b> | <b>BNP zeigt keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität brauner Adipozyten.....</b>                             | <b>61</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Funktionelle Konsequenzen der BNP-Effekte für die Physiologie der Fettzelle und des Gesamtorganismus.....</b> | <b>62</b> |
| <b>5</b>   | <b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>  | <b>70</b> |
| <b>6</b>   | <b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>   | <b>72</b> |
| <b>7</b>   | <b><u>DANKSAGUNG</u></b>   | <b>81</b> |
| <b>8</b>   | <b><u>LEBENS LAUF</u></b>  | <b>82</b> |
|            | <b>Aus der Arbeit hervorgegangener wissenschaftlicher Beitrag.....</b>   | <b>84</b> |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>Abb.</b>                    | <b>Abbildung</b>   |
| <b>ABF</b>                     | <i>Albumine Bovine Fraction</i>  |
| <b>ACE</b>                     | <i>Angiotensin Converting Enzyme</i>   |
| <b>AG</b>                      | <b>Arbeitsgruppe</b>   |
| <b>AKT/PKB</b>                 | <b>AKT/Proteinkinase B</b>   |
| <b>ANP</b>                     | <b>Atriales Natriuretisches Peptid</b>   |
| <b>APS</b>                     | <b>Ammoniumpersulfat</b>   |
| <b>Aqua dest.</b>              | <i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)  |
| <b>Aqua bidest.</b>            | <i>Aqua bidestillata</i> (doppelt destilliertes Wasser)                              |
| <b>AT<sub>1</sub>-Rezeptor</b> | <b>Angiotensinrezeptor 1</b>   |
| <b>AT<sub>2</sub>-Rezeptor</b> | <b>Angiotensinrezeptor 2</b>   |
| <b>AT II</b>                   | <b>Angiotensin II</b>  |
| <b>ATP</b>                     | <b>Adenosintriphosphat</b>   |
| <b>ATRAP</b>                   | <i>Angiotensin II type I receptor-associated protein</i>                             |
| <b>BMI</b>                     | <i>Body Mass Index</i>   |
| <b>BNP</b>                     | <i>Brain Natriuretic Peptide</i> bzw. <i>B-type Natriuretic Peptide</i>              |
| <b>BSA</b>                     | <b>Bovines Serumalbumin</b>  |
| <b>bzw.</b>                    | <b>beziehungsweise</b>   |
| <b>ca.</b>                     | <b>circa</b>   |
| <b>cDNA</b>                    | <i>complementary Desoxy-ribonucleic-acid</i> (komplementäre Desoxy-Ribonukleinsäure) |
| <b>cGMP</b>                    | zyklisches <b>Guanosinmonophosphat</b>   |
| <b>cm</b>                      | <b>centimeter</b>  |
| <b>CNP</b>                     | <i>C-type Natriuretic Peptide</i>  |
| <b>CRP</b>                     | <b>C-reaktives Protein</b>   |
| <b>DEPC</b>                    | <b>Diethylcyanophosphonat</b>  |
| <b>DMEM</b>                    | <i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>  |
| <b>DNA</b>                     | <i>Desoxy-ribonucleic-acid</i> (Desoxy-Ribonukleinsäure)                             |
| <b>dNTP</b>                    | <b>Desoxynukleosidtriphosphat</b>  |
| <b>DTT</b>                     | <b>1,4-Dithiothetrol</b>   |
| <b>EDTA</b>                    | <b>Ethylendiamintetraessigsäure/-acid</b>  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>FBS</b>        | <b>F</b> etales <b>B</b> ovines <b>S</b> erum  |
| <b>FFA</b>        | <i>Free fatty acid(s)</i> (Freie Fettsäure(n))   |
| <b>GLUT4</b>      | <b>G</b> lukosetransporter 4   |
| <b>GTP</b>        | <b>G</b> uanosin <b>t</b> riphosphat   |
| °C                | Grad <b>C</b> elsius   |
| <b>h</b>          | <i>Hour(s)</i> (Stunde(n))   |
| <b>HEPES</b>      | N-2- <b>H</b> ydroxyethylpiperazin-N`-2- <b>E</b> than- <b>S</b> ulfonsäure                          |
| <b>HPRT</b>       | <b>H</b> ypoxanthin <b>P</b> hosphoribosyl <b>t</b> ransferase                                       |
| <b>HSL</b>        | <b>H</b> ormonsensitive <b>L</b> ipase   |
| <b>IBMX</b>       | <b>I</b> sobutyl <b>m</b> ethyl <b>x</b> anthin  |
| <b>IGF-1</b>      | <i>Insulin-like growth factor 1</i>  |
| <b>IL-6</b>       | <b>I</b> nterleukin-6  |
| <b>kBq</b>        | <b>K</b> ilobecquerel  |
| <b>KNPS</b>       | <b>K</b> ardiales <b>N</b> atriuretisches <b>P</b> eptid- <b>S</b> ystem                             |
| <b>KRH</b>        | <b>K</b> rebs- <b>R</b> inger- <b>H</b> EPES-Lösung  |
| <b>MAPK</b>       | <i>Mitogen activated protein kinase(s)</i> ( <b>M</b> itogen- <b>a</b> ktiviert<br>Proteinkinase(n)) |
| <b>MCP-1</b>      | <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>  |
| <b>Min.</b>       | <b>M</b> inute(n)  |
| <b>ml</b>         | <b>M</b> illiliter   |
| <b>mRNA</b>       | <i>messenger ribonucleic acid</i>  |
| <b>μCi</b>        | <b>M</b> ikro <b>C</b> urie  |
| <b>μg</b>         | <b>M</b> ikro <b>g</b> ramm  |
| <b>μl</b>         | <b>M</b> ikro <b>l</b> iter  |
| <b>μM</b>         | <b>M</b> ikro <b>m</b> olar (Molar = mol/l)  |
| <b>NC-Membran</b> | <b>N</b> itrocellulose- <b>M</b> embran  |
| <b>ng</b>         | <b>N</b> anog <b>g</b> ramm  |
| <b>nM</b>         | <b>N</b> anomolar (Molar = mol/l)  |
| <b>NP</b>         | <b>N</b> atriuretische(s) <b>P</b> eptid(e)  |
| <b>NPR</b>        | <b>N</b> atriuretischer <b>P</b> eptid <b>R</b> ezeptor  |
| <b>NT-Pro-BNP</b> | <b>N</b> -terminales <b>P</b> ro- <b>B</b> rain <b>N</b> atriuretic <b>P</b> eptide                  |
| <b>o.g.</b>       | oben genannten   |
| <b>PBS</b>        | <i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer-Salzlösung)   |
| <b>PCR</b>        | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)   |

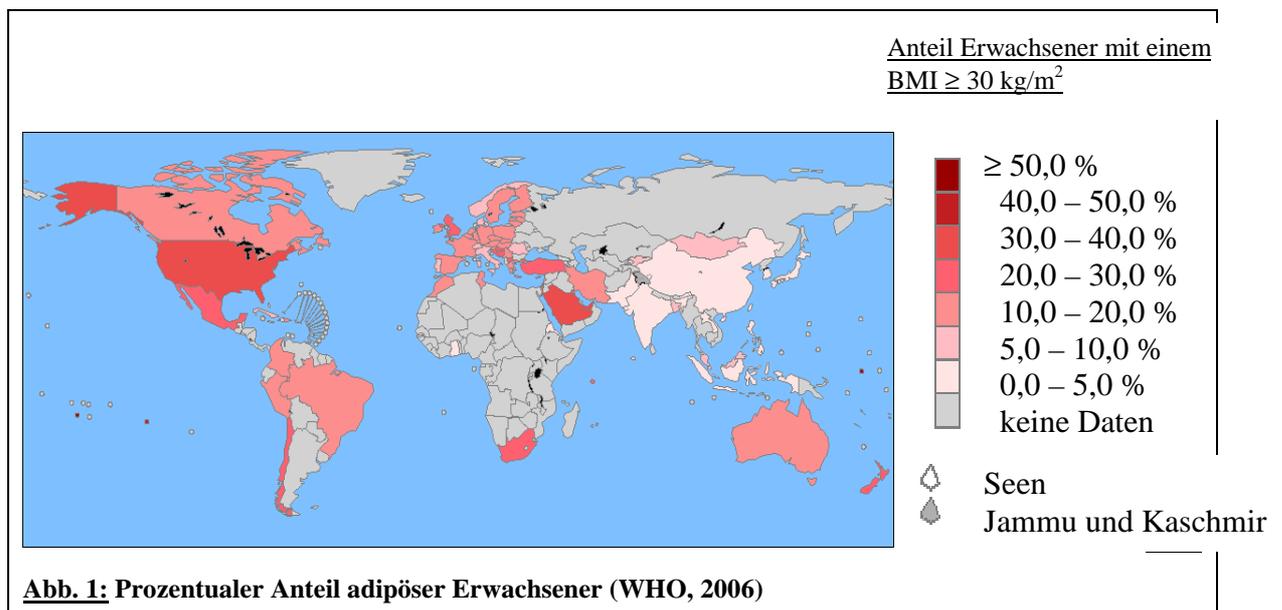
|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>PDE</b>                      | <b>Phosphodiesterase</b>   |
| <b>pg</b>                       | <b>Pikogramm</b>   |
| <b>PGC-1<math>\alpha</math></b> | <b>PPAR<math>\gamma</math> coactivator -1 <i>alpha</i></b>             |
| <b>PI-3-Kinase</b>              | <b>Phosphatidylinositol-3-Kinase</b>                                   |
| <b>PKG</b>                      | <b>Proteinkinase G</b>   |
| <b>PMSF</b>                     | <b>Phenylmethylsulfonylfluorid</b>                                     |
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b>  | <b><i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i></b>         |
| <b>p38 MAPK</b>                 | <b>p38 <i>Mitogen activated protein kinase</i></b>                     |
| <b>p70S6</b>                    | <b>p70 ribosomale Protein S6 Kinase</b>                                |
| <b>RAS</b>                      | <b>Renin-Angiotensin-System</b>  |
| <b>RNA</b>                      | <b><i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)</b>                      |
| <b>RNase</b>                    | <b>Ribonuklease</b>  |
| <b>rpm</b>                      | <b><i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)</b>               |
| <b>rRNA</b>                     | <b>ribosomale RNA</b>  |
| <b>RT-PCR</b>                   | <b><i>Real Time - Polymerase Chain Reaction</i></b>                    |
| <b>SAPK</b>                     | <b><i>Stress-activated protein kinase</i></b>                          |
| <b>SDS</b>                      | <b><i>Sodium dodecyl sulfate</i></b>                                   |
| <b>SDS-PAGE</b>                 | <b><i>Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i></b> |
| <b>Tab.</b>                     | <b>Tabelle</b>   |
| <b>TBE-Puffer</b>               | <b>TRIS-Borat-EDTA-Puffer</b>  |
| <b>TEMED</b>                    | <b>Tetramethylethylendiamin</b>  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>  | <b>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></b>                          |
| <b>TRIS</b>                     | <b>Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan</b>                                 |
| <b>T3</b>                       | <b>Trijodthyronin</b>  |
| <b>U</b>                        | <b><i>Units</i> (Einheiten)</b>  |
| <b>u.a.</b>                     | <b>unter anderem</b>   |
| <b>UCP-1</b>                    | <b><i>Uncoupling protein 1</i></b>                                     |
| <b>UV-Licht</b>                 | <b>Ultraviolettes Licht</b>  |
| <b>V</b>                        | <b>Volt</b>  |
| <b>v.a.</b>                     | <b>vor allem</b>   |
| <b>z.B.</b>                     | <b>zum Beispiel</b>  |

# 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

## 1.1 Einleitung

### 1.1.1 Adipositas, das Metabolische Syndrom und Folgeerkrankungen

Die Körpermaße des Menschen stellen im 21. Jahrhundert in den industrialisierten Ländern der Welt ein wichtiges gesellschaftliches Merkmal dar. Das Körpergewicht bzw. die Körperfettmasse nimmt dabei als eine Variable eine besondere Position ein. Normalgewichtige schlanke Personen erscheinen gemeinhin attraktiv, gelten als diszipliniert und haben im Vergleich zu Übergewichtigen bzw. Fettleibigen bessere Chancen auf dem Arbeitsmarkt. Sie tragen zudem geringere gesundheitliche Risiken und besitzen eine höhere Lebenserwartung (Fontaine *et al.*, 2003). Die Medien werden zunehmend von Berichten über extreme Formen des Unter- oder Übergewichts sowie möglichen Strategien zur Gewichtsnormalisierung beherrscht. Als Maßstab zur Körpergewichtsklassifikation ist der sogenannte *Body Mass Index* (BMI) international anerkannt. Er ist definiert als der Quotient aus Körpergewicht und Körpergröße zum Quadrat [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]. Als Normalgewicht eines Erwachsenen bezeichnet man einen BMI zwischen 18,5 und 24,9  $\text{kg}/\text{m}^2$ . Ab einem BMI  $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$  besteht per definitionem Übergewicht. Menschen gelten als fettleibig bzw. adipös, wenn ihr *Body Mass Index* den Wert von 30  $\text{kg}/\text{m}^2$  erreicht oder sogar übersteigt (Adipositas-Gesellschaft, 2007). Insbesondere die Fettleibigkeit, die *Adipositas*, hat als Ausdruck veränderter Lebensgewohnheiten in den vergangenen 20 Jahren v.a. in den westlichen Industrie- und Dienstleistungsgesellschaften enorme Ausmaße angenommen (siehe Abb. 1).



Auch in Deutschland nimmt die Prävalenz der Adipositas seit längerem kontinuierlich zu. Laut des ersten Ergebnisberichts der aktuellen Nationalen Verzehrstudie II (NVS II, 2008) sind derzeit 66,0 % der Männer und 50,6 % der Frauen zumindest übergewichtig. Jeder fünfte Bundesbürger ist mit einem BMI  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  sogar adipös. Der anhaltende Trend zur Zunahme der Körperfettmasse ließ sich in den letzten Jahren auch bei Kindern und Jugendlichen beobachten (Kromeyer-Hauschild und Wabitsch, 2009).

Adipositas prädestiniert zu einer Vielzahl von Erkrankungen und ist daher nicht zuletzt aus gesundheitsökonomischer Sicht von zunehmender Bedeutung. Adipositas ist besonders häufig mit Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels (z.B. Insulinresistenz, verminderter Glukosetoleranz bzw. manifestem Diabetes mellitus Typ II), Dyslipidämie und arteriellem Hypertonus vergesellschaftet. Die Kombination dieser Komorbiditäten ist unter dem Begriff des „Metabolischen Syndroms“ oder auch als „Syndrom X“ bekannt, wenngleich derzeit keine einheitliche Definition existiert (Isomaa, 2003). Personen mit Metabolischem Syndrom entwickeln deutlich häufiger als andere eine Arteriosklerose und leiden an damit assoziierten kardiovaskulären Folgeerkrankungen wie Myokardinfarkt und zerebralem Insult. Diese Erkrankungen führen die Mortalitätsstatistiken nicht nur der industrialisierten Länder weltweit an (WHO, 2004). Neben dem Ausmaß des Übergewichts bestimmt das Fettverteilungsmuster das metabolische und kardiovaskuläre Gesundheitsrisiko. Die viszerale und zentrale Fettmasse korreliert besonders eng mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität (Weiss, 2007). Zur Beurteilung des Gesundheitsrisikos ist daher nicht allein der BMI entscheidend, sondern auch das Verhältnis von Taillen- zu Hüftumfang (die sogenannte *waist-to-hip-ratio*) bzw. der Taillenumfang als Maß der viszeralen Fettdepots (Lean *et al.*, 1995).

Herzinsuffizienzerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie treten als Folge von Adipositas und des Metabolischen Syndroms gehäuft auf (Ingelsson *et al.*, 2006). Übergewichtige und adipöse Herzinsuffizienzpatienten weisen jedoch eine signifikant bessere Prognose gegenüber normal- oder untergewichtigen Patienten auf. Dieses Phänomen wird als „Adipositas-Paradoxon“ bezeichnet und ist trotz intensiver Forschungsbemühungen ursächlich noch nicht geklärt (Arena und Lavie, 2010). Bei Herzinsuffizienzpatienten mit Metabolischem Syndrom hingegen ist die Mortalität wiederum erhöht (Tamariz *et al.*, 2009).

Störungen der Regulation von Körpergewicht und Energieumsatz und daraus resultierendes Übergewicht und Fettleibigkeit stellen offenbar das zentrale Element des Metabolischen Syndroms dar. Durch bisher nur unzureichend bekannte Mechanismen führt

die erhöhte Körperfettmasse zu den damit assoziierten pathologischen Zuständen, die in ihrer Gesamtheit das Metabolische Syndrom ausmachen und zu schwerwiegenden Folgeerkrankungen wie der Herzinsuffizienz prädestinieren. Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge, durch die Fettgewebe den Organismus derart vielfältig beeinflussen kann, sind noch immer nicht im Detail verstanden. Die Entdeckung des Fettgewebes als endokrines Organ deutet sich diesbezüglich als wissenschaftlicher Meilenstein zum Verständnis des Metabolischen Syndroms an und könnte auch entscheidend zur Klärung der Pathogenese der Herzinsuffizienz bzw. des „Adipositas-Paradoxons“ beitragen.

## **1.1.2 Fettgewebe**

### **1.1.2.1 Fettgewebsformen und Thermogenese**

Fettgewebe übernimmt im Organismus verschiedene wichtige Aufgaben. Klassischerweise dient es als hocheffektiver Energiespeicher, sorgt für eine thermische Isolierung und fungiert außerdem als Stützorgan in Form von Baufett (Junqueira und Carneiro, 1996). Zur Ausübung seiner Energiespeicherfunktion verfügt das Fettgewebe über bestimmte Mechanismen, durch welche schnell und effektiv im Überschuss aufgenommene Nahrungsstoffe in Fett umgewandelt und gespeichert, jedoch bei Bedarf ebenso rasch wieder mobilisiert werden können. Das wichtigste Regulationselement für die Energiespeicherfunktion ist Insulin. Es bewirkt u.a. die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Fettzellen und induziert lipogenetische Enzyme. Fettgewebe besitzt daher zum einen eine große Insulinsensitivität für seine anabolen Funktionen, zum anderen reagiert es auf adrenerge Reize katabol mit dem Abbau von Fett. Neben diesen rezeptiven Fettgewebefunktionen sind in jüngerer Vergangenheit weitere wichtige Funktionen des Fettgewebes entdeckt worden, auf die im Verlauf näher eingegangen werden soll.

Bei Säugern können zwei Arten von Fettgewebe unterschieden werden: das sogenannte weiße, univakuoläre und das braune, multivakuoläre Fettgewebe. Beim Menschen macht Fettgewebe je nach Geschlecht und Alter normalerweise zwischen 15 und 40 % des Körpergewichts aus. Erwachsene besitzen hauptsächlich weißes, im Körper ubiquitär verteiltes Fettgewebe, Säuglinge und Kleinkinder hingegen auch braunes Fettgewebe in größerer Menge (Junqueira und Carneiro, 1996). In beiden Formen werden Lipide hauptsächlich in Form von Triacylglyceriden gespeichert. Diese bestehen aus einem Glycerin-Rückgrat und drei mit diesem veresterten Fettsäuren. Das Glyceringerüst

entstammt hierbei der insulinabhängigen Glukoseaufnahme und -verstoffwechslung der Fettzelle, die Fettsäuren den Plasmalipiden. Die Entspeicherung der Lipiddepots erfolgt unter anderem als Reaktion auf sympathoadrenerge Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren. Ein wichtiger weiterer Lipolysemechanismus durch Natriuretische Peptide wurde erst vor kurzem entdeckt (Sengenès *et al.*, 2000). Triacylglyceride werden zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysiert, an das Blut abgegeben und stehen so anderen Geweben als Substrat zur Deckung ihres Energiebedarfs zur Verfügung.

Weißes und insbesondere braunes Fettgewebe ist reich kapillarisiert und besitzt eine hohe Dichte an sympathoadrenergen Nervenfasern. Im Gegensatz zu weißen Fettzellen besitzen braune Adipozyten zusätzlich besonders viele Mitochondrien und exprimieren das für sie spezifische *uncoupling protein-1* (UCP-1). Genexpression und Aktivität dieses mitochondrialen Proteins werden durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation und Insulin gesteuert (Klein *et al.*, 2000). UCP-1 fungiert als Protonencarrier und kann durch Integration in die innere Mitochondrienmembran den über dieser Membran durch die Atmungskette aufgebauten Protonengradienten zum Zusammenbruch bringen und so die Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung entkoppeln. Anstelle des Energiesubstrates Adenosintriphosphat (ATP) entsteht so Wärme. Insbesondere bei kleinen Säugetieren spielt dieser als „adaptive Thermogenese“ bezeichnete Mechanismus eine bedeutende Rolle für das Überleben in Kälte und bei der Regulation des Energiehaushaltes nach Nahrungsaufnahme (Cannon und Nedergaard, 2004). Beim Menschen ist seine Bedeutung nicht völlig klar. Die mögliche therapeutische Nutzung brauner Fettgewebeeigenschaften bei Adipositas z.B. durch die Steigerung des Energieumsatzes mittels Thermogenese-induktion erscheint jedoch bereits seit langem reizvoll. Während jedoch im Säuglingsalter noch größere Depots braunen Fettgewebes abgrenzbar sind, finden sich beim Erwachsenen keine derart umschriebenen Fettdepots mehr. Dennoch konnte durch den Nachweis einer UCP-Genexpression in weißem intra- und extraperitonealen Fettgewebe eine disseminierte Verteilung brauner Adipozyten darin gezeigt werden (Oberkofler *et al.*, 1997). Eine neue Option zur Vergrößerung der therapeutisch interessanten braunen Fettmasse wurde 2003 gefunden: Humanes weißes Fettgewebe kann durch Stimulation mit dem *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (*PPAR $\gamma$* ) *coactivator 1 alpha* (*PGC-1 $\alpha$* ) in braunes Fettgewebe transdifferenziert werden (Tiraby und Langin, 2003). Die relativ junge Substanzklasse der Thiazolidindionen, welche durch Bindung an den *PPAR $\gamma$*  die Insulinsensitivität bei primär nicht insulinabhängigem Diabetes mellitus verbessert, kann auf diesem Wege ebenfalls Eigenschaften brauner in weißen Fettzellen induzieren (Digby

*et al.*, 1998). Aktuell steht braunes Fettgewebe wieder verstärkt im Fokus des wissenschaftlichen Interesses, da in mehreren Veröffentlichungen eine direkte Evidenz für das Vorkommen von metabolisch aktivem braunen Fettgewebe auch bei gesunden erwachsenen Menschen nachgewiesen werden konnte (Nedergaard *et al.*, 2007; Langin, 2009; Saito *et al.*, 2009; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2009).

Die Rekrutierung relevanter Mengen braunen Fettgewebes zur pharmakotherapeutischen Nutzung auch beim erwachsenen Menschen scheint vor diesem Hintergrund durchaus denkbar. Die mögliche Bedeutung braunen Fettgewebes auf die Energiehomöostase und die Entwicklung metabolischer Dysfunktionen beim Menschen erschließt sich auch aus einigen weiteren interessanten Beobachtungen der vergangenen Jahre: Isolierte (Clement *et al.*, 1995) oder kombinierte (Fogelholm *et al.*, 1998) Genvariationen des überwiegend in braunen Fettzellen vorkommenden  $\beta_3$ -Rezeptors und von UCP-1 sind mit systemischen Auswirkungen auf Körpergewicht und Energieumsatz assoziiert. Bei Übergewichtigen wurde eine im Vergleich zu Normalgewichtigen verminderte UCP-Genexpression in viszeralem Fettgewebe beobachtet (Oberkofler *et al.*, 1997). Des Weiteren fiel bei übergewichtigen und adipösen Probanden die durch Kälteexposition induzierbare Aktivität braunen Fettgewebes geringer aus, als bei normalgewichtigen Probanden (Saito *et al.*, 2009; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009). Untersuchungen von Yang *et al.* lassen zudem vermuten, dass zur Aufrechterhaltung einer normalen Insulinsensitivität eine basale Aktivität brauner Adipozyten essentiell ist (Yang *et al.*, 2003).

Braunes Fettgewebe spielt demnach eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel. Neue Ansatzpunkte in der Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge beim Metabolischen Syndrom ergaben sich aus der Beobachtung, dass Fettgewebe nicht nur passiv auf Reize von außen reagiert, sondern auch aktiv durch Ausschüttung von verschiedenen Substanzen Einfluss auf ganz unterschiedliche Körperfunktionen nehmen kann. Auf diese neu entdeckte endokrine Fettgewebefunktion soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### **1.1.2.2 Endokrine Fettgewebefunktion**

In den vergangenen 20 Jahren ist das Fettgewebe zunehmend in das Blickfeld der internationalen Forschung gerückt, da man neben den bekannten rezeptiven Fettgewebefunktionen der Insulinsensitivität und der adrenergen Sensitivität durch die Entdeckung des nahezu fettspezifischen Hormons Leptin die Fähigkeit des Fettgewebes zur Hormonsekretion erkannte (Zhang *et al.*, 1994). Inzwischen wird Fettgewebe als

endokrin hoch aktives Organ betrachtet (Kershaw und Flier, 2004). Neben Leptin konnte eine Vielzahl weiterer vom Fettgewebe sezernierter sogenannter *Adipokine* entdeckt werden. Dazu gehören vasoaktive Substanzen wie Angiotensinogen und Angiotensin II, Sexualhormone, das vaskuloprotektiv und antidiabetisch wirksame Adiponectin sowie proinflammatorische Zytokine (z.B. *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1), *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin 6), deren Plasmalevel bei Adipositas häufig erhöht sind und eine lokale oder generalisierte Entzündungsreaktion hervorrufen könnten (Chudek und Wiecek, 2006; Guzik *et al.*, 2006). Aktuelle Studien legen einen Zusammenhang zwischen vermehrtem Fettgewebe, den daraus freigesetzten Adipokinen und der Pathogenese des Metabolischen Syndroms nahe. Insbesondere durch Adipokine hervorgerufene entzündliche Dysfunktionen des Gefäßendothels stehen im Fokus des Interesses. Neben den viszeralen Fettdepots scheint auch perivaskuläres Fett die Pathogenese der Arteriosklerose zu fördern (Guzik *et al.*, 2007).

Der Prototyp aller Adipokine, das **Leptin**, ist inzwischen besonders gut erforscht worden. Ursprünglich als Sättigungshormon mit Beteiligung an der zentralnervösen Appetitregulation bezeichnet, gilt es inzwischen mehr als Indikator der systemischen Ernährungssituation mit niedrigen Plasmakonzentrationen bei Mangelzuständen und hohen bei Übergewicht (Wauters *et al.*, 2000). Zusätzlich zu den zentralnervösen sind in verschiedenen peripheren Geweben, so auch im Fettgewebe (Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997) selbst, Leptinrezeptoren gefunden worden. Neben seinen zentralen Effekten auf die Energiehomöostase besitzt Leptin vielfältige weitere periphere Wirkungen, so z.B. am Immunsystem, bei der Fertilität, dem Glukosemetabolismus oder auch der Hämatopoese (Kraus *et al.*, 2002; Kershaw und Flier, 2004).

Die Wirkungen von Leptin auf entscheidende Elemente des Metabolischen Syndroms sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. So gibt es Hinweise, dass hohe Plasma-Leptin-Spiegel die Entstehung arteriosklerotischer Plaques fördern. Menschen, die hingegen an einem Lipatrophiesyndrom leiden und aufgrund des fehlenden Fettgewebes kein Leptin bilden können, zeigen z.B. eine schwere Insulinresistenz. Bei anderen seltenen, durch einen Defekt am Leptin-Gen bedingten kongenitalen Leptinmangelkrankungen, kommt es zu einer massiven Adipositas (Montague *et al.*, 1997). Daneben leiden die betroffenen Menschen ebenfalls an Hyperinsulinämie und Insulinresistenz, Hyperlipidämie sowie immunologischen und neuroendokrinen Dysfunktionen. Die Gabe von Leptin korrigiert dies wieder (Farooqi *et al.*, 2002). Bei den meisten adipösen Menschen ist der Leptinspiegel im Blut jedoch erhöht (Considine *et al.*, 1996) und scheint keinen

appetithemmenden Effekt mehr hervorzurufen. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieses als „Leptinresistenz“ bezeichneten Zustandes sind noch immer weitestgehend unverstanden (Coll *et al.*, 2007). Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Johannes Klein konnte bereits anhand eines eigens entwickelten braunen Fettzellmodells zeigen, dass Leptin differenzierungsabhängig auch von braunen Adipozyten sezerniert wird und autokrin bedeutende Regulationselemente der adipozytären Energiehomöostase moduliert (Kraus *et al.*, 2002).

**Adiponectin** (u.a. auch AdipoQ oder Acrp30 genannt) ist ein Hormon, welches hauptsächlich und differenzierungsabhängig in Fettgewebe exprimiert wird (Hu *et al.*, 1996). Ihm werden antiinflammatorische, vaskuloprotektive und antidiabetische Effekte zugeschrieben (Kubota *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2009). Bei Adipositas und bei Insulinresistenz bzw. manifestem Typ II Diabetes mellitus sind die Plasmakonzentrationen von Adiponectin vermindert (Hu *et al.*, 1996; Weyer *et al.*, 2001). Unter Gewichtsreduktion steigen die Konzentrationen wieder an und scheinen kausal mit dem Grad der Insulinresistenz zusammenzuhängen (Hotta *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Im Tiermodell steigert die Gabe von Adiponectin die Genexpression des *uncoupling protein* im Fettgewebe und verringert die Gewichtszunahme (Masaki *et al.*, 2003). *Knock-out*-Mäuse mit homozygotem Adiponectinmangel leiden an Insulinresistenz und Glukoseintoleranz und zeigen eine verstärkte Tendenz zur Ausbildung einer Arteriosklerose (Kubota *et al.*, 2002).

Das Adipokin ***Monocyte Chemoattractant Protein 1*** (MCP-1) zählt zu jenen Chemokinen, welchen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose zugeschrieben wird. Es kann von den verschiedensten Zellen synthetisiert werden und ist auch in arteriosklerotischen Plaques nachweisbar (Yla-Herttuala *et al.*, 1991). Es initiiert an der Gefäßwand die Einwanderung von Monozyten, welche sich dort zu Schaumzellen umwandeln können und so die Basis einer neuen arteriosklerotische Plaque darstellen. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass MCP-1 auch von Adipozyten sezerniert wird (Gerhardt *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2005) und an der Entwicklung der adipositas-assoziierten Insulinresistenz beteiligt sein könnte (Sartipy und Loskutoff, 2003). Bei Adipositas und Insulinresistenz ist die MCP-1-Sekretion gesteigert und beeinträchtigt das Insulinsignaling in Adipozyten *in vitro* (Fasshauer *et al.*, 2004).

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein wichtiges System zur Regulation der Elektrolythomöostase und des Plasmavolumens sowie des damit verbundenen systemischen Blutdrucks (Silbernagl und Despopoulos, 1991). Dysregulationen des RAS

bei Adipositas werden als mitverantwortlich für den dabei häufig koexistenten arteriellen Hypertonus angesehen (Sarzani *et al.*, 2008b). Neben der Niere als zentralem Regulationsorgan des Elektrolyt- und Volumenhaushalts lassen sich in einer Vielzahl anderer Gewebe Komponenten des RAS nachweisen. Es wird daher angenommen, dass zusätzlich zum systemischen auch lokale RAS existieren, welche dort die physiologische Organfunktion unterstützen. Fettzellen können Angiotensinogen sezernieren, differenzierungsabhängig Angiotensin II (ATII) generieren und entsprechende Angiotensin-Rezeptoren exprimieren, so dass auch in Fettgewebe offenbar ein lokales RAS vorkommt (Cassis *et al.*, 2008). Störungen in der Physiologie lokaler RAS werden mit pathologischen Organveränderungen wie z.B. strukturellen Umbauvorgängen am Herzen in Verbindung gebracht (Mazzolai *et al.*, 1998). Protektiv wirkende antagonistische Substanzen wie ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten werden seit längerem therapeutisch eingesetzt. Das *Angiotensin II type 1 receptor-associated protein* (ATRAP) ist ein noch nicht lange bekannter Modulator der ATII-Signalvermittlung (Daviet *et al.*, 1999). Es bewirkt eine Internalisierung des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) und fungiert offenbar als negativer Regulator der ATII-Wirkungsvermittlung. So hemmt ATRAP beispielsweise an Kardiomyozyten ATII-induzierte hypertrophe Wachstumsreize und in Gefäßen die Proliferation glatter Muskelzellen (Cui *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2005). Kürzlich konnte die Expression von ATRAP auch in Adipozyten nachgewiesen werden (Westphal *et al.*, 2008).

Die große Zahl der Substanzen, die in verschiedenen Regelkreisen des Körpers wichtige Funktionen ausüben, lässt auf eine zentrale Bedeutung des Fettgewebes an der Regulation entzündlicher Vorgänge, des Salz- und Wasserhaushaltes, von Gerinnungsvorgängen, Vasotonus, Reproduktivität und Energiestoffwechsel schließen. Die Erforschung von Wechselwirkungen anderer körpereigener oder medikamentöser Substanzen mit der endokrinen Fettgewebefunktion dürfte einen entscheidenden Fortschritt in der Therapie globaler Gesundheitsprobleme wie Adipositas, des Metabolischen Syndroms und deren Komplikationen bedeuten. Des Weiteren könnten sich neue pathogenetische Erklärungsmodelle für derzeit noch weitestgehend unverstandene Phänomene wie das „Adipositas-Paradoxon“ oder auch der bei schwerer Herzinsuffizienz gehäuft auftretenden kardialen Kachexie ergeben.

Doch auch die Modifikation klassischer rezeptiver Fettgewebefunktionen wie der Insulinsensitivität und adrenergen Sensitivität könnte Entscheidendes zum Verständnis

dieser zunehmenden Gesundheitsproblematik beitragen und wichtige therapeutische Optionen für die Zukunft eröffnen.

### **1.1.2.3 Regulation der Glukosehomöostase**

Das aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas bei Glukosebelastung ausgeschüttete Insulin dient der Normalisierung des Blutzuckerspiegels durch Hemmung der hepatischen Glukoneogenese sowie Stimulation des Glukosetransports aus dem Extra- in den Intrazellulärraum (Saltiel und Kahn, 2001). Glukose wird in den Zellen als Substrat des Energiestoffwechsels benötigt. Skelettmuskulatur galt lange Zeit neben der Leber als primäres Zielorgan der Insulinwirkung. Dem Fettgewebe wurde diesbezüglich allenfalls eine marginale Rolle eingeräumt. Neueren Studien zufolge muss Fettgewebsdepots trotz anteilig insgesamt geringerer insulinvermittelter Glukoseaufnahme dennoch eine wichtige physiologische Bedeutung in der Stoffwechselregulation beigemessen werden. So besitzen Mäuse mit einem selektiven *knock-out* des Insulinrezeptors in der Muskulatur eine normale Glukosetoleranz (Bruning *et al.*, 1998) während solche mit einem *knock-out* des insulinabhängigen Glukosetransportmoleküls GLUT4 im Fettgewebe eine deutlich schlechtere Glukosetoleranz aufweisen (Abel *et al.*, 2001). Des Weiteren führen sowohl Adipositas als auch das Fehlen von Fettdepots beim Lipatrophiesyndrom zur Insulinresistenz und prädisponieren zur Entwicklung eines Typ II Diabetes mellitus (Gavrilova *et al.*, 2000).

Insulin bindet zur Ausübung seiner Funktion an einen spezifischen Insulinrezeptor, welcher anschließend eine komplexe Signaltransduktionskaskade in Gang setzt, an deren Ende verschiedene metabolische Vorgänge in der Zelle beeinflusst werden. Insulin fördert im Fettgewebe Zelldifferenzierungs- und -wachstumsvorgänge. An adulten Adipozyten steigert es die Glukoseaufnahme und erhöht daneben auch die Lipid- und Proteinbiosynthese und wirkt somit entgegengesetzt zu katabolen  $\beta$ -adrenergen Reizen. Störungen der Insulinsignaltransduktion werden für eine reduzierte Sensitivität insulinempfindlicher Gewebe bei Adipositas verantwortlich gemacht (Pessin und Saltiel, 2000; Saltiel und Kahn, 2001). So konnte gezeigt werden, dass bei krankhafter Adipositas die Aktivität diverser Moleküle der Insulinsignalkaskade in der Skelettmuskulatur reduziert ist (Goodyear *et al.*, 1995). Gleichzeitig wird eine Störung der Insulinwirkung durch die vermehrte Ausschüttung von Adipokinen wie Leptin u.a. bei Adipositas angenommen.

Insulinresistenzsituationen und Hyperinsulinämie können bei Übergewichtigen im Sinne eines *circulus vitiosus* zur Entwicklung von Adipositas beitragen bzw. diese unterhalten. Ursächlich ist die zur Hemmung der Lipolyse wesentlich geringere benötigte Insulinmenge. Auf diese Weise kann Insulin auch bei gestörtem insulinabhängigen Glukosetransport weiterhin seine antilipolytische Wirkung entfalten, wodurch eine Gewichtsreduktion beim Metabolischen Syndrom erschwert wird (Kahn und Flier, 2000).

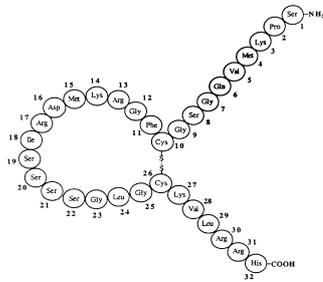
Andererseits kommt es bei Übergewicht und Insulinresistenz u.a. durch das Überwiegen sympathoadrenerger Wirkungen gegenüber der antagonistischen Insulinwirkung zu einer vermehrten Freisetzung von freien Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) aus dem Fettgewebe. Imbalancen zwischen Speicherung und Freisetzung von FFA führen zu weitreichenden metabolischen Konsequenzen und sind mit erhöhten kardiovaskulären Risiken verbunden. Chronisch erhöhte FFA-Plasmakonzentrationen verursachen Insulinresistenz an Leber und Muskulatur, stimulieren die Glukoneogenese und verschlechtern bei genetisch prädisponierten Personen die Insulinsekretion aus dem Pankreas (Lafontan *et al.*, 2005). FFA stellen daher möglicherweise ein entscheidendes Verbindungselement zwischen Adipositas und dem Auftreten von Insulinresistenz und Diabetes mellitus II dar. Das Aufdecken von Kontrollsystemen der Lipidhomöostase und Mechanismen der Freisetzung von FFA aus dem Fettgewebe ist daher von großer Bedeutung.

Neben Katecholaminen haben sich Natriuretische Peptide als lipolytisch hochwirksam erwiesen (Sengenès *et al.*, 2000). Coralie Sengenès und ihre Mitarbeiter konnten im Jahre 2000 mit ihrer Veröffentlichung zeigen, dass Natriuretische Peptide direkte Wirkungen an humanem Fettgewebe entfalten. Bereits zuvor hatten verschiedene Forschungsgruppen die Existenz von Natriuretischen-Peptid-Rezeptoren (NPR) sowohl an Adipozyten von Nagetieren (Jeandel *et al.*, 1989), als auch an humanen Fettzellen nachweisen können (Sarzani *et al.*, 1996). Der lipolytische Effekt Natriuretischer Peptide könnte sich damit als wichtiges Element einer Erklärungstheorie zur Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms und assoziierter Folgeerkrankungen erweisen.

### **1.1.3 Das Natriuretische Peptidsystem und BNP**

Das Natriuretische Peptidsystem ist seit mehr als 25 Jahren bekannt. 1981 machten Adolpho de Bold und seine Mitarbeiter eine entscheidende Entdeckung für das Verständnis der Physiologie des Herz-Kreislauf-Systems und der Charakterisierung des Herzens als endokrines Organ: Sie konnten am Rattenmodell zeigen, dass die Injektion eines Extraktes aus Herzvorhofgewebe die Natriuresis anregte und den Blutdruck senkte (de Bold *et al.*,

1981). Diese Beobachtung führte zur Entdeckung einer Familie von Peptiden, die sich in ihrer biochemischen Struktur nur wenig unterscheiden und den Elektrolyt- und Wasserhaushalt des Organismus beeinflussen. Neben dem „Prototyp“ der Natriuretischen Peptide (NP), dem damals zuerst charakterisierten *Atrialen Natriuretischen Peptid* (ANP), wurden in den folgenden Jahren weitere Peptide mit ähnlichen Eigenschaften entdeckt: 1988 das *Brain Natriuretic Peptide* (BNP, siehe Abb. 2) und *Urodilatin*, wenig später das *C-type Natriuretic Peptide* (CNP) (Sudoh *et al.*, 1988; Michels und Tarnow, 2001). BNP wurde ursprünglich aus Schweinegehirn extrahiert und daher *Brain Natriuretic Peptide* genannt. Da es später in sehr viel höheren Konzentrationen im Herzen von Mensch und Tier nachgewiesen werden konnte, wird als korrektere Bezeichnung inzwischen immer häufiger „*B-type Natriuretic Peptide*“ gewählt.



**Abb. 2:** Schematischer Aufbau des *B-type Natriuretic Peptide* (BNP) (Vogeser, 2000)

Natriuretische Peptide werden von unterschiedlichen Geweben im Körper gebildet und freigesetzt. ANP wird hauptsächlich im Vorhofmyokard synthetisiert, BNP im Ventrikelmuskel. Beide zusammen werden auch als „Kardiales Natriuretisches Peptid-System“ (KNPS) bezeichnet (Sarzani *et al.*, 2008b). CNP scheint v.a. im zentralen Nervensystem sowie am Gefäßendothel vorzukommen. Urodilatin wurde aus distalen Nierentubuli isoliert. Die beiden zuletzt genannten Peptide konnten im Blutplasma kaum detektiert werden. Ihnen wird daher eine primär parakrine Funktion zugeordnet (Michels und Tarnow, 2001).

Durch intensive Erforschung der Eigenschaften dieser neu entdeckten Faktoren konnte in den vergangenen Jahren deren weites Wirkungsspektrum aufgezeigt werden, welches sich neben den bekannten Effekten auf die Volumen- und Blutdruckhomöostase des Körpers auch auf Entzündungsvorgänge, Umbauvorgänge des Myokards bei kardialer Hypertrophie, katabole Effekte im Lipidmetabolismus und das Knochenwachstum erstreckt (Holtwick *et al.*, 2003; Molkentin, 2003; Potter *et al.*, 2006).

Die Wirkungen werden dabei über zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt: jeweils einen Guanylatcyclase-Rezeptor A (= NP-Rezeptor A; NPR-A) und -B (NPR-B). Die membran-gebundene Guanylatcyclase wandelt Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) um, welches als *second messenger* fungiert und das Rezeptorsignal in der Zelle weiterleitet. Der Abbau der Natriuretischen Peptide erfolgt im Wesentlichen über sogenannte Clearance-Rezeptoren (NPR-C), welche die Peptide über rezeptorvermittelte Endozytose internalisieren und der lysosomalen Hydrolyse zuführen (Cohen *et al.*, 1996). In deutlich geringerem Umfang werden Natriuretische Peptide auch durch neutrale Endopeptidasen v.a. bei der Lungen- und Leberpassage eliminiert. Der NPR-C scheint zudem andere modulierende Effekte ausüben zu können (Anand-Srivastava *et al.*, 1990; Potter *et al.*, 2006). Neben der unterschiedlichen Verteilung der Rezeptoren an den Zielorganen ist das Bindungsverhalten der verschiedenen Natriuretischen Peptide an die o.g. Rezeptoren (siehe Tab. 1) maßgeblich für deren Haupteffekte.

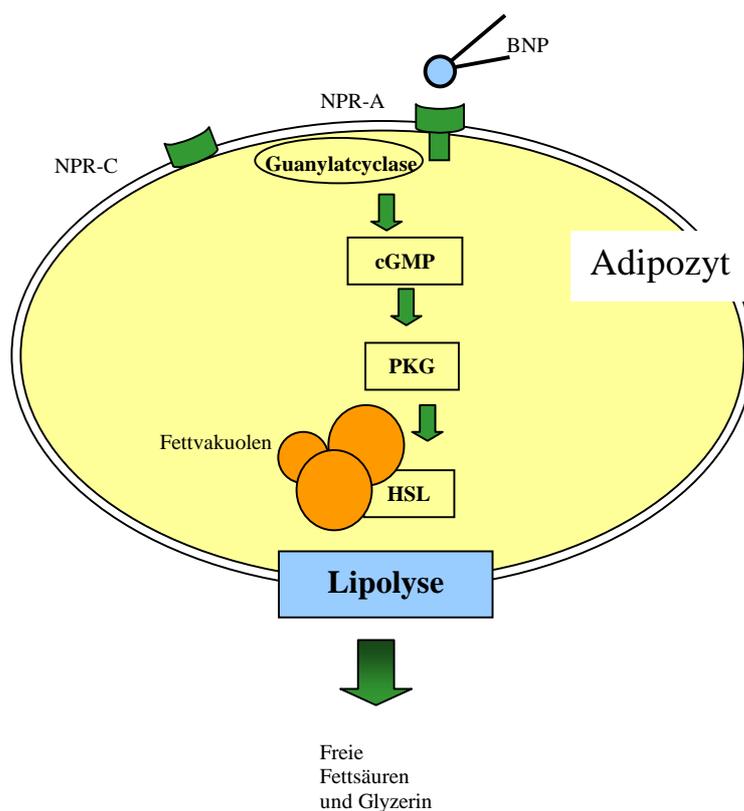
| Natriuretische Peptide | Rezeptoren |       |       |
|------------------------|------------|-------|-------|
|                        | NPR-A      | NPR-B | NPR-C |
| ANP                    | +++++      |       | +++++ |
| BNP                    | ++++       |       | +++   |
| CNP                    |            | +++++ | ++++  |

**Tab. 1:** Relative Bindungsaffinität einiger Natriuretischer Peptide an den *Natriuretic Peptide Receptor* (NPR). ANP und BNP stimulieren NPR-A mit ähnlicher Affinität, CNP hat auf diesen Rezeptor keinen Effekt. NPR-B wird hingegen ausschließlich durch CNP stimuliert. An den Clearance-Rezeptor NPR-C binden alle Natriuretischen Peptide, BNP jedoch am wenigsten (Tabelle modifiziert nach (Koller und Goeddel, 1992)).

(+ = Affinitätsgrad)

Die kardialen Natriuretischen Peptide ANP und BNP bewirken an der Niere eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate und die bekannte Natriuresis. Das Renin-Angiotensin-System wird gehemmt. Sie führen zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und reduzieren den peripheren Widerstand durch ihren funktionellen Antagonismus auf vasokonstriktorisches Reize. Die Senkung des Sympathikotonus an der Gefäßmuskulatur führt zur Dämpfung von Barorezeptoren und konsekutiv geringerer Freisetzung von Katecholaminen. Auf diese Weise wird einer Reflextachykardie und Vasokonstriktion, welche durch die Blutvolumenreduktion auftreten würden, entgegengewirkt (Michels und Tarnow, 2001). Das KNPS ist somit maßgeblich an der Blutdruck- und Volumenregulation des Körpers beteiligt.

Der Nachweis von NP-Rezeptoren u.a. an humanen Adipozyten regte weitere Studien zur Wirkung der Natriuretischen Peptide an (Sarzani *et al.*, 1996). Im Jahr 2000 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass ANP und BNP in hohem Maße lipolytisch wirken (Sengenès *et al.*, 2000). Ihre lipolytische Potenz ist dabei vergleichbar mit derjenigen von  $\beta$ -Sympathomimetika, wird jedoch über einen separaten, mit  $\beta$ -Blockern nicht zu hemmenden cGMP-Signalweg vermittelt (siehe Abb. 3) und unterliegt nicht der Kontrolle durch das anabol wirkende Insulin (Sengenès *et al.*, 2003; Moro *et al.*, 2004; Lafontan *et al.*, 2005).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Lipolysewirkung von BNP am Adipozyten

Natriuretische Peptide wie BNP wirken an Adipozyten durch Bindung an den Natriuretischen-Peptid-Rezeptor A (NPR-A) lipolytisch. Unabhängig vom adrenergen Signaltransduktionsweg wird durch Aktivierung der Guanylatcyclase cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gebildet und die Proteinkinase G (PKG) aktiviert. Dies führt wiederum zur Stimulation der Hormonsensitiven Lipase (HSL) und zur Freisetzung von freien Fettsäuren und Glycerin.

Adäquater Reiz zur Freisetzung der kardial synthetisierten Natriuretischen Peptide ANP und BNP ist eine Erhöhung der Wandspannung von Vorhof- bzw. Kammermuskulatur z.B. durch Anstieg der Füllungsdrücke bei arteriellem Hypertonus oder zentralvenöser Volumenzunahme. Beide Peptide besitzen bei ähnlichen Rezeptoraffinitäten und Plasmakonzentrationen dementsprechend vergleichbare Wirkungen. Unter physiologischen Bedingungen liegt der ANP-Plasmalevel jedoch etwa zehnmal höher als derjenige von BNP (Mukoyama *et al.*, 1991). Dessen Hauptfunktion besteht bei kardiovaskulär

Gesunden am ehesten in einer parakrinen Regulation der kardialen Muskelmasse und Hemmung fibrotischer Umbauvorgänge am Herzen (Tamura *et al.*, 2000; Rademaker und Richards, 2005), während ANP vorwiegend als Regulator der oben beschriebenen Blutdruck- und Volumenhomöostase fungiert.

Als Normwerte für BNP gelten Plasmalevel  $< 20$  pg/ml, welche jedoch in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, genetischen und nutritiven Faktoren variieren können (Mukoyama *et al.*, 1991). Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. bei einer Herzinsuffizienz nimmt die BNP-Sekretion aus dem Ventrikelmyokard indessen stark zu und erreicht ähnliche oder sogar höhere Plasmawerte als ANP (Yasue *et al.*, 1994; Rademaker und Richards, 2005). Im Gegensatz zu ANP wird BNP dabei ausschließlich vom Ventrikelmyokard freigesetzt und kann als spezifisch dafür betrachtet werden (Yasue *et al.*, 1994). Primäres Sekretionsprodukt ist das Prohormon Pro-BNP. Es zerfällt nach seiner Freisetzung in zwei Bruchstücke: das biologisch aktive Hormon BNP und das inaktive NT-proBNP. BNP besitzt eine deutlich höhere Plasmahalbwertszeit und eine größere Stabilität als ANP (Mukoyama *et al.*, 1991; Buckley *et al.*, 1999). Zudem wird BNP deutlich schneller freigesetzt, welches seine mögliche Rolle als „Akute-Phase-Peptid“ bei drohender ventrikulärer „Überfüllung“ unterstreicht (Nakagawa *et al.*, 1995). Die Plasmakonzentrationen von BNP und NT-proBNP sind bei einer Reihe unmittelbar kardialer (z.B. Herzinsuffizienz, diastolische Dysfunktion, Herzklappenerkrankungen), aber auch einigen nur indirekt das Herz betreffenden Erkrankungen (Lungenarterienembolie, pulmonalem Hypertonus, Sepsis) signifikant erhöht (Felker *et al.*, 2006). Verschiedene Studien über BNP haben dessen großes Potential als diagnostischer Marker für linksventrikuläre Funktionsstörungen bestätigt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Höhe der BNP- bzw. NT-proBNP-Plasmapiegel mit der Schwere der kardialen Dysfunktion korreliert und als prognostisch relevant gilt (Luchner *et al.*, 2003). Das NT-proBNP, welches *in vivo* eine noch höhere Halbwertszeit als BNP besitzt, hat sich inzwischen sogar als besserer Biomarker für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität als das bekannte C-reaktive Protein (CRP) erwiesen (Kistorp *et al.*, 2005). Die Bestimmung der BNP- oder NT-proBNP- Blutwerte eignet sich unter Berücksichtigung der jeweiligen klinischen Untersuchungsbefunde insbesondere zur Diagnose, Therapiekontrolle und Prognose der akuten oder chronischen Herzinsuffizienz. Bei Patienten mit akuter Dyspnoe hat sich beispielsweise als oberer Normwert eine BNP-Plasmakonzentration von 100 pg/ml zur Diagnose einer Herzinsuffizienz etabliert.

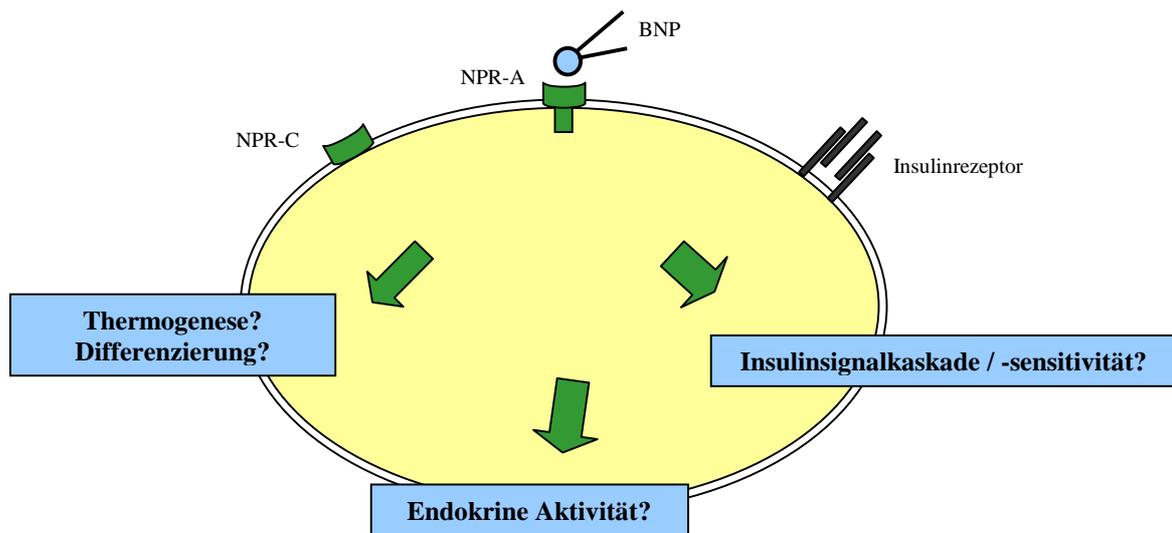
Die beschriebenen positiven Eigenschaften kardialer Natriuretischer Peptide auf das kardiovaskuläre System werden inzwischen auch therapeutisch genutzt. *Nesiritide* (Natrecor®), eine rekombinante Form des humanen BNP, wird z.B. in der Behandlung der akuten dekompensierten Herzinsuffizienz erfolgreich eingesetzt (SciosInc., 2009). Zustände, welche die normalen Plasmakonzentrationen an kardialen Natriuretischen Peptiden erniedrigen, führen hingegen möglicherweise zu negativen kardiovaskulären Folgeerscheinungen. Wang *et al.* konnten zeigen, dass sich die Plasmakonzentration von BNP und NT-proBNP im Prinzip umgekehrt proportional zum BMI verhält (Wang *et al.*, 2004). Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei hypertensiven als auch normotensiven Individuen mit steigendem BMI. Das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage war ebenfalls mit niedrigen Plasmakonzentrationen Natriuretischer Peptide assoziiert. Adipöse Diabetiker wiesen die niedrigsten Natriopeptid-Werte auf. In vorangegangenen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen der Reduktion der Natriopeptid-Sekretion und salzsensitivem arteriellen Hypertonus eine positive Korrelation besteht (John *et al.*, 1995). Da das Natriuretische Peptidsystem eine Schlüsselrolle in der Volumen- und Blutdruckregulation spielt, könnten diese Beobachtungen einen Beitrag zur Erklärung der Anfälligkeit adipöser Menschen für die Entwicklung arterieller Hypertonie als einer Komponente des Metabolischen Syndroms leisten. Des Weiteren wird in den erniedrigten BNP-Plasmakonzentrationen bei übergewichtigen und adipösen Herzinsuffizienzpatienten eine mögliche Erklärung des „Adipositas-Paradoxons“ gesehen, da sich diese Patienten aufgrund ihres erhöhten Blutvolumens bereits bei geringgradiger Herzinsuffizienz mit Symptomen einer kardialen Dyspnoe in ärztliche Diagnostik und Therapie begeben könnten (Arena und Lavie, 2010).

Für Natriuretische Peptide wurden auch direkte Effekte am Fettgewebe beschrieben und mit dem Metabolischen Syndrom in Verbindung gebracht. Die schon erwähnte lipolytische Wirkung und die Freisetzung von FFA ist möglicherweise lediglich eine von noch weiteren bislang unbekanntem direkten Fettgewebswirkungen mit Relevanz für die systemische Glukose- und Lipidhomöostase. Vor diesem Hintergrund erscheint die Erforschung möglicher weiterer direkter Effekte Natriuretischer Peptide an Fettgewebe und deren Auswirkungen auf entscheidende pathogenetische Elemente des Metabolischen Syndroms von besonderer Bedeutung. BNP eignet sich dazu aufgrund seiner oben genannten Eigenschaften als Markersubstanz wichtiger Folgeerkrankungen des Metabolischen Syndroms sowie seiner im Vergleich zu ANP längeren Plasmahalbwertszeit und höheren Stabilität in besonderem Maße.

## 1.2 Fragestellung

Aufgrund der genannten Eigenschaften von BNP sollten in dieser Dissertation folgende Fragen zu dessen Wirkung auf adipozytäre Schlüsselfunktionen geklärt werden (siehe Abb. 4):

1. Zeigt die Gabe von BNP Auswirkungen auf das Differenzierungsverhalten oder die thermogenetische Potenz brauner Adipozyten?
2. Beeinflusst BNP die endokrine Adipozytenaktivität durch Veränderung der Genexpression wichtiger Adipokine?
3. Werden Elemente der Insulinsignalkaskade durch BNP modifiziert und ist dies für die zelluläre Insulinsensitivität relevant?



**Abb. 4: Schematische Darstellung potentieller Effekte von BNP auf die Fettzellphysiologie**

Besitzt BNP neben seiner lipolytischen Wirkung weitere direkte Effekte an Fettzellen? Kann BNP adipozytäre Schlüsselfunktionen wie die Thermogenese, die endokrine Aktivität oder die Insulinsensitivität modifizieren?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellmodell

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an einer vom Laborleiter entwickelten Zelllinie murinen braunen Fettgewebes durchgeführt. Es handelt sich dabei um braune Präadipozyten, welche aus dem interskapulären braunen Fettgewebe einer neugeborenen Wildtyp-Maus gewonnen wurden. Durch Infektion dieser Zellen mit dem retroviralen Vektor *pBabe* wurde das *Simian-virus-40 T-Antigen* übertragen, wodurch die Präadipozyten immortalisiert wurden. Durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff können die so gewonnenen Zellen bis zu ihrem Gebrauch gelagert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Präadipozyten nach dem Auftauen und Differenzieren zu adulten Adipozyten alle wichtigen Charakteristika des Fettgewebes zeigen und sich ohne Verlust ihrer Eigenschaften über mehr als 30 Passagen kultivieren lassen (Klein *et al.*, 2002). Das beschriebene Zellmodell hat sich daher zur Erforschung der Fettzellfunktion unter dem Einfluss verschiedener Substanzen als sehr geeignet erwiesen (Klein *et al.*, 2000; Kraus *et al.*, 2002; Westphal, 2005).

#### 2.1.2 Chemikalien

| <u>Chemikalie</u>  | <u>Hersteller</u>                     |
|--|---------------------------------------|
| Acrylamid „Rotiphorese Gel 30“   | Roth (Karlsruhe)                      |
| Agarose MP   | AppliChem (Darmstadt)                 |
| Ammoniumpersulfat (APS)  | Serva (Heidelberg)                    |
| Amphotericin   | Invitrogen (Karlsruhe)                |
| Aprotinin  | Sigma (Deisenhofen)                   |
| Aqua dest.   | eigene Destillieranlage               |
| BM1/2-Cyclin   | Roche (Mannheim)                      |
| Bovines Serumalbumin (BSA) =<br>Albumine Bovine Fraction (ABF)                       | Biomol (Hamburg)                      |
| Brain Natriuretic Peptide 32 (BNP, Ratte)  | Sigma (Steinheim)                     |
| Chloroform   | Merck (Darmstadt)                     |
| Clß3 (CL 316, 243)   | Sigma (Deisenhofen)                   |
| 1,4-Dithiothetrol (DTT)  | Invitrogen (Karlsruhe)                |
| 2-Deoxy-[ <sup>3</sup> H]Glukose   | NEN Life Sciences Products (Dreieich) |
| Diethylcyanophosphonat (DEPC)  | Fluka (Steinheim)                     |
| Dexamethason   | Sigma (Deisenhofen)                   |
| dNTP`s   | PeqLab                                |
| Dulbecco`s modifiziertes Eagle-Medium<br>(DMEM) mit Glucose, Pyridoxin und Glutamax® | Invitrogen (Karlsruhe)                |

| <b><u>Chemikalie</u></b>                                     | <b><u>Hersteller</u></b>           |
|--|------------------------------------|
| EDTA (Titriplex II)  | Sigma (Deisenhofen)                |
| Entwickler G153  | AGFA (Belgien)                     |
| Ethanol  | Merck (Darmstadt)                  |
| Ethidiumbromid   | Roche (Mannheim)                   |
| 5x First Strand Buffer                                       | Invitrogen (Karlsruhe)             |
| Fetales bovines Serum (FBS)                                  | Sigma (Taufkirchen)                |
| Fixierer G354  | AGFA (Belgien)                     |
| Formalinlösung „Accustain“ (10 %)                            | Sigma Diagnostics (USA)            |
| Glukose  | Merck (Darmstadt)                  |
| Glycerol (85%)   | Apotheke der Universität zu Lübeck |
| Igepal   | Sigma (Deisenhofen)                |
| Indomethazin   | Sigma (Deisenhofen)                |
| Insulin (bovin)  | Sigma (Deisenhofen)                |
| Isobutylmethylxanthin (IBMX)                                 | Sigma (Deisenhofen)                |
| Isopropanol für RNA-Versuche                                 | Roth (Karlsruhe)                   |
| Isopropanol für Oil-Red-O-Färbungen                          | Sigma (Steinheim)                  |
| Isoproterenol  | Sigma (Deisenhofen)                |
| Leupeptin  | Sigma (Deisenhofen)                |
| 2-Mercaptoethanol  | Sigma (Steinheim)                  |
| Methanol   | Baker (Niederlande)                |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-<br>Sulfonsäure (HEPES) | Biomol (Hamburg)                   |
| Natriumchlorid   | Merck (Darmstadt)                  |
| Natriumorthovanadat  | Sigma (Deisenhofen)                |
| Oil-Red-O-Farbstoff  | Sigma (Steinheim)                  |
| Oligo dt-Primer  | Roche (Mannheim)                   |
| 2-Propanol   | Merck (Darmstadt)                  |
| PBS-Tabletten  | ICN Biomedicals Inc. (USA)         |
| Penicillin/Streptomycin                                      | BioWhittaker (Belgien)             |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)                           | Fluka (Neu-Ulm)                    |
| RNase-Inhibitor  | Roche (USA)                        |
| SDS  | Fluka (Steinheim)                  |
| SuperScript II Reverse Transkriptase                         | Invitrogen (Karlsruhe)             |
| SYBR Green Mix   | Qiagen (Hilden)                    |
| Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300 plus                  | ICN Biomedicals (Meckenheim)       |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED)                               | Sigma (Steinheim)                  |
| Trijodthyronin (T3)  | Sigma (Deisenhofen)                |
| TRIS   | Biomol (Hamburg)                   |
| Trizol Reagenz   | Invitrogen (Karlsruhe)             |
| Trypsin-EDTA   | Invitrogen (Karlsruhe)             |
| Tween 20   | Sigma (Deisenhofen)                |

### 2.1.3 Verbrauchsartikel

| <b><u>Verbrauchsartikel</u></b>       | <b><u>Hersteller</u></b>                 |
|---------------------------------------|--|
| Bradford-Protein-Assay                | Bio-Rad (München)                        |
| Chemolumineszenz-Kit (Maus/Kaninchen) | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)        |
| Chemilumineszenz-Filme                | Amersham Pharmacia Biotech<br>(Freiburg) |

| <b><u>Verbrauchsartikel</u></b>                   | <b><u>Hersteller</u></b>                       |
|---|--|
| Falcon-Röhrchen                                   | Sarstedt (Nümbrecht)                           |
| Filter „Steritop Express plus“(Porengröße 0,22µm) | Millipore Corporation (USA)                    |
| Filterpapier                                      | Whatman International Ltd. (England)           |
| 15cm + 10cm Kulturschalen                         | Sarstedt (Nümbrecht)                           |
| 5,5cm Kulturschalen                               | Nalge Nunc International (Dänemark)            |
| 12-Bucht-Kulturschalen für                        |  |
| Glukose-Aufnahme-Assays                           | Corning Inc. (USA)                             |
| Küvetten zur Protein-Photometrie                  | Brand (Wertheim)                               |
| Küvetten zur RNA-Photometrie                      | Eppendorf (Hamburg)                            |
| Mikrotiterplatten MikroAmp. (96 Buchten)          | Applied Biosystems (USA)                       |
| Nitrozellulosemembranen Protan BA 85              | Schleicher und Schuell (Dassel)                |
| Parafilm „M“                                      | American National Can. (USA)                   |
| Pipettenspitzen „Biospere Filter Tips“            | Eppendorf (Hamburg)                            |
| Pipettenspitzen (normal)                          | Sarstedt (Nümbrecht)                           |
| Proteinmarker BenchMark Prestained                | Invitrogen (Karlsruhe)                         |
| Optical Caps für die Mikrotiterplatten            | Applied Biosystems (USA)                       |
| QuantiTect™ SYBR-Green PCR Kit                    | Qiagen (USA)                                   |
| Reagiergefäße („Eppis“)                           | Sarstedt (Nümbrecht)                           |
| RNeasy Mini Kit                                   | Qiagen (USA)                                   |
| Stabpipetten                                      | Sarstedt (Nümbrecht)                           |
| Szintillationsröhrchen                            | Sigma (Deisenhofen)                            |
| Wattestäbchen (steril)                            | NOBA Verbandmittel Danz GmbH + Co. KG (Wetter) |
| Zellschaber                                       | Sarstedt (USA)                                 |

## 2.1.4 Geräte

| <b><u>Gerät</u></b>                       | <b><u>Hersteller</u></b>              |
|---|---------------------------------------|
| Analysenwaage                             | Sartorius (Göttingen)                 |
| β-Zähler 1409                             | Wallac (Turku, Finnland)              |
| Bench „Nuairé“                            | Zapf Instruments (Sarstedt)           |
| Begasungs-Brutschrank Typ B5060, EK CO2   | Heraeus (Osterode)                    |
| Bio-Photometer                            | Eppendorf (Hamburg)                   |
| Elektronikrührer Typ M23                  | Internat. Laborat. App. (Dottingen)   |
| Elektrophorese-Kammer zur RNA-Auftrennung | Peqlab Biotechnologie GmbH            |
| Elektrophorese-Netzgerät „Consort E802“   | VWR (Belgien)                         |
| Elektrophorese-Netzgerät „Power Pac 300“  | BioRad (München)                      |
| Filmkassetten „Hypercassette™“            | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) |
| Gelgießvorrichtung                        | BioRad (München)                      |
| Gelelektrophoresekammer „Mini-Protean 3“  | BioRad (München)                      |
| „Karussell“ /“Rotiergerät“                | Renner GmbH (Dannstadt)               |
| Mikroskop Olympus CK2                     | Olympus (Hamburg)                     |
| Multifuge 3 S-R                           | Heraeus (Osterode)                    |
| Multistepper „Multipette plus“            | Eppendorf (Hamburg)                   |
| PCR-Gerät “Abi Prism 7000”                | Applied Biosystems (USA)              |
| Pipettboy “Accu-Jet”                      | Brand (Wertheim)                      |
| Pipetten „Eppendorf research“             | Eppendorf (Hamburg)                   |
| Polaroid MR4 Land Camera (für RNA)        | Polaroid                              |

| <b>Gerät</b>                           | <b>Hersteller</b>                    |
|--|--------------------------------------|
| Schüttelgerät "Vortex-Genie 2"         | Scientific Industries (Bohemia, USA) |
| Schwenker                              | Hassa (Lübeck)                       |
| Thermomixer compact                    | Eppendorf (Hamburg)                  |
| Transfervorrichtung                    | Biorad (München)                     |
| UV-Lampe                               | Vilbert Lourmat (Frankreich)         |
| Wasserbad Typ 3044                     | Köttermann (Hänigsen)                |
| Wippe "Duomax 1030"                    | Heidolph Instruments                 |
| Zentrifuge "Biofuge fresco/Rotor 3765" | Heraeus (Osterode)                   |
| Zentrifuge "miniSpin plus"             | Eppendorf (Hamburg)                  |

### 2.1.5 Antikörper

#### **Antikörper von Cell Signaling Technology Inc. (USA):**

Anti-Phospho-AKT, Anti-Phospho-p38-MAPK, Anti-Phospho-44/42-MAPK, Anti-Phospho-p70S6

#### **Antikörper von Chemicon International (USA):**

Anti-UCP-1

### 2.1.6 Primer

#### **Primer von Biometra (Göttingen):**

|             |                   |                                     |
|-------------|-------------------|-------------------------------------|
| HPRT        | <i>Sense:</i>     | GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GT      |
|             | <i>Antisense:</i> | CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC          |
| Adiponectin | <i>Sense:</i>     | CTT AAT CCT GCC CAG TCA TGC         |
|             | <i>Antisense:</i> | CCA TCC AAC CTG CAC AAG TTC         |
| ATRAP       | <i>Sense:</i>     | TGC TTG GTG TTC TCA AGC TCC         |
|             | <i>Antisense:</i> | AAG CCA CCA AGA AAC ATG CC          |
| Leptin      | <i>Sense:</i>     | ACA CAC AGC TGG AAA CTC CCA         |
|             | <i>Antisense:</i> | GAT TGA AAG CAG CAC CCC A           |
| MCP-1       | <i>Sense:</i>     | GCC CCA CTC ACC TGC TGC TAC T       |
|             | <i>Antisense:</i> | CCT GCT GCT GGT GAT CCT CTT GT      |
| UCP-1       | <i>Sense:</i>     | ATG GTG AAC CCG ACA ACT TCC GAA GTG |
|             | <i>Antisense:</i> | GTA CTG GAA GCC TGG CCT TCA CCT TGG |

## 2.1.7 Nährmedien, Puffer, Stammlösungen und Reagenzien

### 2.1.7.1 Nährmedien

|                                       | <u>Konzentration/Menge</u> | <u>Substanz</u>   |
|---------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <b><u>Basalmedium:</u></b>            |                            |                   |
| DMEM                                  | + 20 %                     | FBS               |
|                                       | + 10 mM                    | BM-Cyclin1 oder 2 |
|                                       | + 1 µg/ml                  | Amphotericin      |
|                                       | + 100 U/ml                 | Penicillin        |
|                                       | + 100 µg/ml                | Streptomycin      |
| <b><u>Differenzierungsmedium:</u></b> |                            |                   |
| DMEM                                  | + 20 %                     | FBS               |
|                                       | + 20 nM                    | Insulin           |
|                                       | + 1 nM                     | T3                |
|                                       | + 100 U/ml                 | Penicillin        |
|                                       | + 100 µg/ml                | Streptomycin      |
| <b><u>Induktionsmedium:</u></b>       |                            |                   |
| Differenzierungsmedium                | + 2 µg/ml                  | Dexamethason      |
|                                       | + 500 µM                   | IBMX              |
|                                       | + 250 µM                   | Indomethazin      |
| <b><u>Starvingmedium</u></b>          |                            |                   |
| <b><u>(Hungermedium):</u></b>         | =                          | DMEM              |

### 2.1.7.2 Puffer und Stammlösungen

|                                       | <u>Konzentration/Menge</u> | <u>Substanz</u>   |
|---------------------------------------|----------------------------|---|
| <b><u>Blockierpuffer:</u></b>         |                            |   |
|                                       | 3 %                        | BSA in Waschpuffer  |
| <b><u>Laemmli-Puffer</u></b>          |                            |   |
| <b><u>(5-fach konzentriert):</u></b>  |                            |   |
|                                       | 1 ml                       | Bromphenolblau (0,1 %)  |
|                                       | 0,5 ml                     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(1 M, pH 7,0) |
|                                       | 5 ml                       | Glycerol  |
|                                       | 1 g                        | SDS   |
|                                       | 500 mM                     | DTT   |
|                                       |                            | cum Aqua dest. ad 10 ml   |
| <b><u>Elektrophoresepuffer</u></b>    |                            |   |
| <b><u>(10-fach konzentriert):</u></b> |                            |   |
|                                       | 60,6 g                     | TRIS  |
|                                       | 285 g                      | Glycin  |
|                                       | 6,7 g                      | EDTA (= Titriplex)  |
|                                       | 20 g                       | SDS   |
|                                       |                            | cum Aqua dest. ad 2000 ml   |

|  | <u>Konzentration/Menge</u> | <u>Substanz</u>                                     |
|--|----------------------------|---|
| <b><u>Lysepuffer-Stammlösung:</u></b>                  |                            |   |
|  | 50 mM                      | HEPES   |
|  | 137 mM                     | NaCl  |
|  | 1 mM                       | MgCl <sub>2</sub>                                   |
|  | 1 mM                       | CaCl <sub>2</sub>                                   |
|  | 10 mM                      | Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>       |
|  | 10 mM                      | NaF   |
|  | 2 mM                       | EDTA = Titriplex II                                 |
|  | 10 %                       | Glycerol  |
|  | 0,5 %                      | NP40 = Igepal                                       |
|  |                            | cum Aqua dest. ad 1000 ml                           |
|  |                            | Lagerung bei + 4 °C; pH 7,4                         |
| <b><u>Lysepuffer-Gebrauchslösung:</u></b>              |                            |   |
| Lysepuffer-Stammlösung                                 | + 10 µg/ml                 | Aprotinin   |
|  | + 10 µg/ml                 | Leupeptin   |
|  | + 2 mM                     | Natriumorthovanadat                                 |
|  | + 2 mM                     | PMSF  |
| <b><u>Phosphatpuffer (PBS)</u></b>                     |                            |   |
| <b><u>(einfach):</u></b>                               |                            |   |
|  | 0,2 g                      | KCl   |
|  | 0,2 g                      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     |
|  | 8 g                        | NaCl  |
|  | 1,44 g                     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O |
|  |                            | cum Aqua dest. ad 1000 ml                           |
|  |                            | pH 7,4 bei Raumtemperatur                           |
|  |                            | (~ 25 °C)   |
| <b><u>Phosphatpuffer (PBS) für die Zellkultur:</u></b> |                            |   |
|  |                            | 1 PBS-Tablette                                      |
|  |                            | cum Aqua dest. ad 100 ml                            |
| <b><u>TBE-Puffer:</u></b>                              |                            |   |
|  | 890 mM                     | Borsäure  |
|  | 20 mM                      | EDTA  |
|  | 890 mM                     | TRIS-Base   |
|  |                            | cum Aqua dest. ad 500 ml,                           |
|  |                            | pH 8,0  |
| <b><u>Transferpuffer-Stammlösung</u></b>               |                            |   |
| <b><u>(10-fach konzentriert):</u></b>                  |                            |   |
|  | 144 g                      | Glycin  |
|  | 30 g                       | TRIS  |
|  |                            | cum Aqua dest. ad 1000 ml                           |
|  |                            | Lagerung bei + 4 °C                                 |
| <b><u>Transferpuffer-Gebrauchslösung</u></b>           |                            |   |
| <b><u>(einfach):</u></b>                               |                            |   |
|  | 100 ml                     |   |
| Transferpufferstammlösung                              |                            |   |
| + 200 ml   |                            | Methanol  |
|  |                            | cum Aqua dest. ad 1000 ml                           |
|  |                            | Lagerung bei + 4 °C                                 |

|                            | <u>Konzentration/Menge</u> | <u>Substanz</u>   |
|----------------------------|----------------------------|---|
| <b><u>Waschpuffer:</u></b> | 150 mM                     | NaCl  |
|                            | 10 mM                      | TRIS  |
|                            | 0,05 %                     | Tween   |
|                            |                            | cum Aqua dest. ad 2000 ml,<br>Lagerung bei + 4 °C, pH 7,2 |

### 2.1.7.3 Reagenzien

|  | <u>Konzentration/Menge</u> | <u>Substanz</u>                     |
|--|----------------------------|-------------------------------------|
| <b><u>DEPC-Wasser:</u></b>                               | 500 ml                     | Aqua dest.                          |
|  | 500 µl                     | DEPC                                |
| <b><u>Krebs-Ringer-HEPES-Lösung:</u></b>                 | 1,25 mM                    | CaCl <sub>2</sub>                   |
|  | 20 mM                      | HEPES (pH 7,4)                      |
|  | 4,7 mM                     | KCl                                 |
|  | 1,25 mM                    | MgSO <sub>4</sub>                   |
|  | 136 mM                     | NaCl                                |
|  |                            | cum Aqua dest. ad 1000 ml<br>pH 7,4 |
| <b><u>Mastermix I zur cDNA-Synthese:</u></b>             |                            |                                     |
| 5 µg RNA   | + 4 nM                     | Oligo-dT-Primer                     |
|  | + 2,5 mM                   | dNTP-Mix                            |
|  |                            | ad Aqua dest.                       |
| <b><u>Mastermix II zur cDNA-Synthese:</u></b>            |                            |                                     |
|  | 50 % Vol.                  | 5x Puffer                           |
|  | 25 mM                      | DTT                                 |
|  | 1,25 U/µl                  | RNase Inhibitor                     |
|  | 25 U/µl                    | Super Script II                     |
|  |                            | ad Aqua dest.                       |
| <b><u>Reaktionsmix für die quantifizierende PCR:</u></b> |                            |                                     |
|  | 55 % Vol.                  | SYBR Green Mix                      |
|  | 0,9 mM                     | Primer upstream                     |
|  | 0,9 mM                     | Primer downstream                   |
|  |                            | ad Aqua dest.                       |
|  | + 2 µl cDNA                |                                     |
|  |                            | (Gesamtreaktionsansatz 25 µl)       |

|                                   | <u>Konzentration/Menge</u> | <u>Substanz</u>  |
|-----------------------------------|----------------------------|--|
| <u>Oil-Red-O-Stammlösung:</u>     |                            |  |
|                                   | 0,5 g                      | <i>Oil-Red-O</i> Farbstoff                                 |
| +                                 | 100 ml                     | Isopropanol  |
| <u>Oil-Red-O-Gebrauchslösung:</u> |                            |  |
|                                   | 60 % vol.                  | Stammlösung  |
|                                   | 40 % vol.                  | Aqua bidest.<br>filtrern durch ein<br>Whatman-Filterpapier |

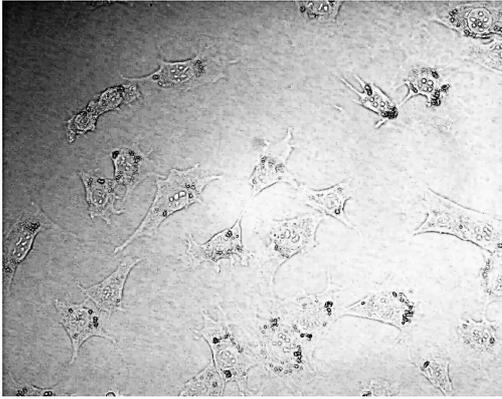
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Braune murine Präadipozyten (siehe Abb. 5, S. 25) der von Prof. Dr. Johannes Klein etablierten FVB-Zelllinie (Klein *et al.*, 2002) wurden nach dem Auftauen auf einer im Durchmesser 15 cm messenden Kulturschale bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt der Umgebungsluft in 25 ml antibiotikahaltigem Basalmedium kultiviert. Bei einer Zelldichte von 70-80 % wurden die Präadipozyten unter möglichst keimarmen Kautelen nach zweimaligem Waschen mit auf 37 °C erwärmter PBS-Lösung durch Zugabe von 2,5 ml Trypsin-EDTA (ebenfalls 37 °C) von ihrer Unterlage gelöst. Nach maximal 5 Min. Einwirkzeit wurden die Zellen in 30,5 ml Grundmedium aufgenommen. Mit der so gewonnenen Zellsuspension konnten nun Tochterschalen beimpft werden. Je nach Größe der zu beimpfenden Tochterschale wurde in diese eine entsprechende Menge Differenzierungsmedium vorgelegt und Zellsuspension hinzugegeben:

|                        |  |
|------------------------|--|
| 10 cm-Kulturschale:    | 7 ml Diff.-Med. + 3 ml Zellsuspension      |
| 12-Bucht-Kulturschale: | 2 ml Diff.-Med. + 7 Tropfen Zellsuspension |
| 5,5 cm-Kulturschale:   | 4 ml Diff.-Med. + 1,5 ml Zellsuspension    |

Zur Kultivierung weiterer Zellpassagen wurden 3 ml der Zellsuspension auf die Mutterplatte zurückgegeben und mit 25 ml Grundmedium aufgefüllt.

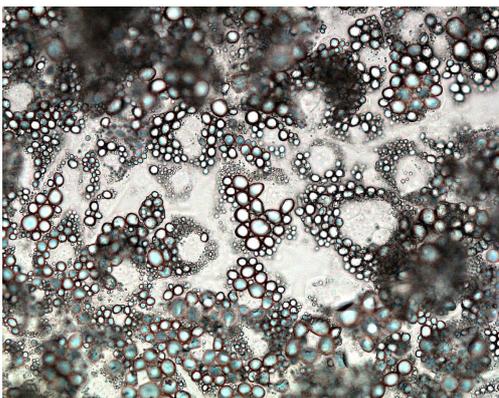


**Abb. 5: Murine braune Präadipozyten**

Native murine Präadipozyten der FVB-Zelllinie einen Tag nach Aussaat in eine 5,5 cm-Kulturschale (nativ, 200-fache Vergrößerung)

### 2.2.2 Zelldifferenzierung

In den Tochterschalen wurden die Zellen nun bis zu ihrer vollen Ausdifferenzierung zu adulten braunen Fettzellen kultiviert. Nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz der Zellen innerhalb von 3-5 Tagen wurde die Ausdifferenzierung durch Inkubation in 10 ml Induktionsmedium über 20-24 h angeregt. Im Folgenden wurden die Zellen alle 1-2 Tage mit je 10 ml frischem Differenzierungsmedium pro Schale versorgt. Der Differenzierungsfortschritt wurde dabei täglich mikroskopisch kontrolliert. 5-7 Tage nach der Induktion waren die Adipozyten vollständig ausdifferenziert und zeigten die typischen multivakuolären Fettansammlungen (siehe Abb.6).



**Abb. 6: Adulte murine braune Adipozyten**

Adulte Adipozyten mit typischen perinukleären multivakuolären Fettansammlungen nach 9-tägiger Kultivierung in Differenzierungsmedium (nativ, 200-fache Vergrößerung)

### **2.2.3 Zellfärbung (*Oil-Red-O*-Färbung)**

Um Auswirkungen der Stimulationsexperimente auf die Fettzellendifferenzierung zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem fettspezifischen Farbstoff *Oil-Red-O* nach zweimaligem Waschen mit PBS und mindestens 15-minütiger Fixierung mit 10-prozentiger, neutral gepufferter Formalinlösung für 1 h bei Raumtemperatur gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend mit Aqua dest. abgespült. Die so angefärbten Zellen wurden mit Hilfe eines Scanners der Firma *Hewlett Packard* in einen Computer eingelezen sowie mikroskopisch vergrößert fotografiert.

### **2.2.4 Hungerperiode und Zellstimulation**

Vor der Durchführung der Stimulationsexperimente wurden die adulten Adipozyten für 24 h in Starving-Medium inkubiert. Anschließend wurde nach Versuchsschema entweder mit BNP oder zur Positivkontrolle mit Insulin bzw. dem synthetischen  $\beta$ 3-Rezeptor-Agonisten ClB3 stimuliert. Für die Dauer der Einwirkzeit wurden die Kulturschalen mit den Zellen weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt der Umgebungsluft im Wärmeschrank inkubiert.

### **2.2.5 Untersuchungen auf Proteinebene**

#### **2.2.5.1 Zellyse, Gewinnung der Zytosolfraktion, Proteinbestimmung**

Zum Beenden der Versuche wurden die Zellen zweimal mit 4 °C kalter einfach konzentrierter PBS-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden mit 450  $\mu$ l Lysispuffer pro 10 cm-Kulturschale versehen, mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst, 10 Min. bei 4 °C in Eppendorfgefäßen unter Rotation lysiert und schließlich bei 4 °C und 13.000 rpm für weitere 10 Min. zentrifugiert. Das nun aufschwimmende Fett sowie das Zellsediment wurden verworfen und die Zytosolfraktion photometrisch auf ihren Proteingehalt untersucht. Zur Standardisierung der Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit Lysispuffer so verdünnt, dass im Folgenden bei der elektrophoretischen Auftrennung der Proteinfractionen stets 100  $\mu$ g Protein verwendet wurden. Durch abschließendes Hinzufügen von Laemmli-Puffer und zweiminütige Rüttelinkubation bei 95 °C wurden die enthaltenen Proteine denaturiert. Die Proben wurden danach bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C eingefroren.

### 2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der in den Proben vorhandenen Proteinfractionen gelang mit Hilfe der sogenannten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Als Probenträger dient dabei ein Polyacrylamidgel, dessen Porengröße durch Variation des Vernetzungsgrades so eingestellt wird, dass sich eine optimale Auftrennung der Proteine ergibt. Durch das im Laufpuffer enthaltene SDS werden Wechselwirkungen der Probenproteine mit anderen Proteinen oder Lipiden aufgehoben. Die Proteine erhalten eine negative Ladung, so dass sie im elektrischen Feld durch das Polyacrylamidgel zur Anode wandern. Da kleine Proteine schneller durch das Gel wandern als große, werden die in den Proben enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es ergibt sich ein spezifisches Bandenmuster. Zur Identifikation der einzelnen Proteinbanden diente ein spezieller farbiger Marker aus einem Gemisch von Proteinen mit bekannten Molekulargewichten, welcher parallel mitlaufen gelassen wurde (Löffler und Petrides, 1997).

Für die hier beschriebenen Versuche wurden Acrylamidgele nach folgender Rezeptur hergestellt (Tab. 2):

|                     | <b>Trenngel<br/>(8/10/12 % Acrylamid)</b> | <b>Sammelgel</b> |
|---------------------|---|------------------|
| Aqua dest.          | 7/6/5 ml                                  | 3,4 ml           |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 3,75 ml                                   | -                |
| 0,5 M Tris (pH 6,8) | -   | 625 µl           |
| Acrylamid           | 4/5/6 ml                                  | 850 µl           |
| 10 % SDS            | 150 µl                                    | 50 µl            |
| 10 % APS            | 150 µl                                    | 50 µl            |
| TEMED               | 10 µl                                     | 5 µl             |

**Tab. 2: Zusammensetzung der Acrylamidgele**

Durch den Einsatz von Gelkämmerchen vor der Polymerisation der Gele wurden Taschen für die Proben geformt. Die mit den bezüglich ihres Proteingehaltes standardisierten Proben (100 µg pro Geltasche) und einem farbigen Proteinmarker beladenen Gele wurden in Elektrophoresepuffer (1:10 verdünnt) so lange unter 70-100 V Spannung gesetzt, bis eine optimale Auftrennung der Proteine anhand des Markers angenommen werden durfte.

### 2.2.5.3 *Western Blot*

Durch die Immuno- bzw. *Western-Blot*-Technik können sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über einzelne Proteine aus einem Gemisch gemacht werden. Dazu wird nach der elektrophoretischen Proteinauftrennung ein Abklatsch (*Blot*) der auf dem Gel separierten Proteine auf Nitrozellulosepapier gemacht. Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster der Proteinmoleküle bleibt dabei unverändert erhalten. Derartige Blots können anschließend mit einer spezifischen Lösung getränkt werden, welche geeignete markierte Antikörper enthält. Auf diese Weise kann das von dem jeweiligen Antikörper erkannte Protein identifiziert werden und ist auch einer quantitativen Analyse zugänglich (Löffler und Petrides, 1997).

Zum Transfer der aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (NC-Membran) wurde das entsprechende Gel seiner Haltevorrichtung entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mit den darin enthaltenen Proteinfractionen auf einer Transfervorrichtung platziert. Diese bestand aus einer Kunststoffkassette, auf welche ein mit Transferpuffer getränktes Transfer-Schwämmchen sowie ein in Gelgröße zurechtgeschnittenes, ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtetes Whatman-Filterpapier aufgelegt wurden. Auf das Gel wurde nun luftblasenfrei eine NC-Membran entsprechender Größe aufgebracht, welche wiederum mit einem befeuchteten Filterpapier und einem Transferschwämmchen bedeckt wurde. Anschließend wurde die Transferkassette verschlossen und in einer speziellen Transferapparatur gehalten. Der Transfer erfolgte unter Kühlung mit Hilfe eines Kühlakkus in Transferpuffer bei 100 V für eine Zeitdauer von 1-2 h (je nach Molekulargewicht des gewünschten Proteins). Nach Beendigung des Transfervorgangs wurden die NC-Membranen (Blots) der Apparatur entnommen und über Nacht bei +4 °C in Blockierpuffer inkubiert, um eine unspezifische Bindung der im Folgenden verwendeten Primärantikörper an freie Nitrozellulose zu verhindern.

Vor Beginn der Proteindetektion wurden die Blots dreimal für jeweils 5 Min. mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion selbst erfolgte bei Raumtemperatur für 1-2 h mit im Verhältnis 1:1000 mit Blockierpuffer verdünnten Primärantikörperlösungen. Durch Zerschneiden der NC-Membranen anhand der Markerlinien konnten für verschiedene zu untersuchende Proteine spezifische Antikörper auf einer Membran eingesetzt werden. Nach Waschen der Blots mit Waschpuffer für erneut 3 x 5 Min., wurden die NC-Membranen in einer Sekundärantikörperlösung für ½ - 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Blots einem letzten Waschschrift unterzogen und danach für je 1

Min. in eine Detektionslösung eingelegt. Durch Peroxidaseaktivität der Sekundärantikörper wurde die in der Detektionslösung enthaltene Substanz *Luminol* zur Fluoreszenz angeregt. Die Stärke der Lichtemission korreliert dabei positiv mit der auf der NC-Membran gebundenen Menge an Protein. Durch Belichtung eines speziellen Chemilumineszenz-filmes in einer Filmkassette wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht und konnten dann densitometrisch mit Hilfe des Programms *Quantity One* (BioRad, München) ausgewertet werden.

### **2.2.6 Glukose-Aufnahme-Assay**

Um mögliche Auswirkungen der Stimulationsversuche auf die Insulinsensitivität der Adipozyten darzustellen, wurde nach unterschiedlicher Vorstimulation der Zellen die insulinvermittelte Glukoseaufnahme mit Hilfe eines Glukose-Aufnahme-Assays untersucht. Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche folgten einem im Labor der AG Prof. Dr. J. Klein etablierten Protokoll. Die verwandte radioaktiv markierte 2-Deoxyglukose besitzt die Eigenschaft, von den Zellen aufgenommen, jedoch nicht weiter verstoffwechselt werden zu können und eignet sich daher besonders gut für die o.g. Fragestellung.

Dazu wurden die Zellen in 12-Bucht-Kulturschalen ausgesät. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit standen für jede Versuchsbedingung drei Vertiefungen zur Verfügung. Vor Durchführung des Assays wurden die adulten Adipozyten 4 Tage nach Induktion für 24 h in Starvingmedium kultiviert. Danach wurden sie zunächst zweimal mit je 1 ml erwärmter KRH-Lösung gewaschen. Es wurden dann je well 450 µl KRH vorgelegt und die Zellen nach Versuchsschema stimuliert:

Inkubation mit 100 nM Insulin für 30 Min.

Inkubation mit BNP

Prästimulation mit BNP, anschließend mit 100 nM Insulin für 30 Min.

Nach Ablauf der Stimulationszeiten wurden je 50 µl radioaktiv markierter 1 mM 2-Deoxy-<sup>3</sup>H]Glukose mit einer Aktivität von 5 µCi/ml (entspricht 185 kBq/ml) zu den Proben pipettiert. Die resultierende Aktivität betrug entsprechend 500 nCi/ml bzw. 18,5 kBq/ml. Nach vier Minuten wurde die Glukoseaufnahme der Proben durch Waschen mit kalter PBS-Lösung beendet und die Zellen mit 500 µl SDS unter Rütteln lysiert. 400 µl Zell-

Lysat wurden mit 2 ml Szintillationslösung in einem Szintillationsröhrchen vermengt und die Radioaktivität anschließend im  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen. Für jede Versuchsbedingung wurde der Mittelwert einer Triplettmessung angegeben.

## 2.2.7 Untersuchungen zur Genexpression

### 2.2.7.1 Zellstimulation

Die Zellen wurden nach dem folgenden Versuchsschema stimuliert:

|   |   |                  |
|---|---|------------------|
| Inkubation mit BNP                          | } | Positivkontrolle |
| Inkubation mit 100 nM Insulin für 2 h       |   |                  |
| Inkubation mit 100 nM Cl $\beta$ 3 für 2 h  |   |                  |
| Inkubation mit 100 nM Isoproterenol für 2 h |   |                  |

Zum Beenden der Versuche wurde das die Stimulationssubstanz enthaltene Medium verworfen, die Zellen zweimal mit auf +4 °C temperiertem PBS gewaschen und dann sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -180 °C bis zur mRNA-Isolation gelagert.

### 2.2.7.2 mRNA-Isolation und -Aufreinigung

Um aus den Adipozytenkulturen mRNA isolieren zu können, wurden die tiefgefrorenen Zellen zunächst auf Eis aufgetaut, mit je 8 ml Trizol pro Kulturschale versehen und nach 5-minütiger Wartezeit vom Schalenboden in Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 1,6 ml Chloroform gut vermischt und nach einer kurzen Wartezeit für 15 Min. bei 12.000 g (4500 rpm) und +4 °C zentrifugiert. Dadurch konnte das Gemisch in 3 Phasen separiert werden. Die obere wässrige Phase enthielt die gesuchte mRNA und wurde zur weiteren Aufreinigung in ein neues Falconröhrchen mit 4 ml kaltem Isopropanol überführt. Die RNA-Fraktion wurde kurz mit dem Isopropanol vermischt und 10 Min. bei Raumtemperatur ruhengelassen. Anschließend wurde für 10 Min. bei 12.000 g und +4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das am Boden befindliche Pellet mit 8 ml Ethanol 70 % (in DEPC-Wasser verdünnt) vermischt. Es wurde ein weiteres Mal bei +4 °C und diesmal 7.500 g (3500 rpm) für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das präzipitierte RNA-Pellet am Boden des Röhrchens für einige Minuten

luftgetrocknet. Nachdem mit einem sterilen Wattestäbchen eventuelle Ethanolrückstände entfernt worden waren, wurde das Pellet in 100  $\mu$ l RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Proben konnten nun bis zur weiteren Aufreinigung bei  $-80$  °C eingefroren werden.

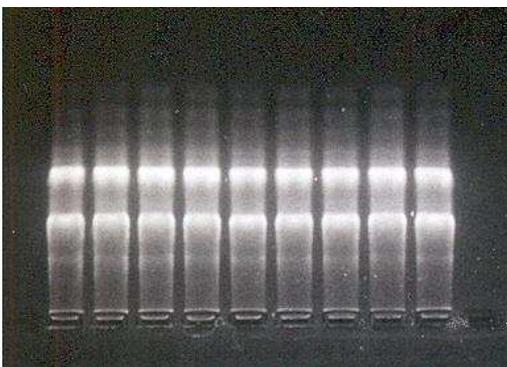
Die weiteren Aufreinigungsschritte wurden nach Anleitung mit dem *RNeasy Mini Kit* durchgeführt. Um Aussagen über die Qualität der isolierten RNA machen zu können, wurden je 2  $\mu$ l der jeweiligen RNA-Probe mit 4  $\mu$ l Auftragspuffer versehen und mit diesem Gemisch ein nach folgender Rezeptur hergestelltes, mit Ethidiumbromid versetztes 2-prozentiges Agarose-Gel beladen:

**Agarose-Gel 2 %:**

2 g Agarose cum TBE-Puffer ad 100 ml

+ 5  $\mu$ l Ethidiumbromid

Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff, der in RNA-Moleküle interkaliert. Durch UV-Licht (254-366 nm Wellenlänge) kann er zur Fluoreszenz angeregt werden. Nach etwa 30-45 Min. Laufzeit bei 90 V in TBE-Puffer waren die Proben ausreichend gut aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die Banden der beiden am häufigsten in der Zelle vorkommenden RNA-Formen (18s und 28s rRNA) dargestellt werden (siehe Abb. 7). Anhand der Klarheit der beiden Banden und des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten der 28s zur 18s rRNA (sollte ca. 2:1 betragen) konnte die Qualität der isolierten RNA beurteilt werden.



**Abb. 7: Beispiel eines Bandenmusters der 28s und 18s rRNA**

Das Verhältnis der beiden Banden beträgt ca. 2:1 und zeigt eine ausreichende Qualität der isolierten rRNA an. Obere dicke Banden = 28s rRNA; untere dicke Banden = 18s rRNA

Die in den Proben vorhandene mRNA-Menge und deren Reinheit wurde auch photometrisch bestimmt. Dazu wurden jeweils 100  $\mu$ l RNase-freies Wasser in RNA-Küvetten vorgelegt und je 1  $\mu$ l Probe hinzupipettiert. Die gemessenen Werte wurden anschließend dazu verwandt, die RNA-Mengen der einzelnen Proben auf 5  $\mu$ g RNA pro Probe anzugleichen.

### **2.2.7.3 Real time - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Mit der von Kary B. Mullis 1983 entwickelten *in vitro*-Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*,) ist es möglich, gezielt bestimmte DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, zu vervielfältigen. Benötigt werden dazu kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die sogenannten (Oligonukleotid-) *Primer*, welche komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind. Nach Auftrennung der Ursprungs-DNA in ihre Einzelstränge durch Hitzebehandlung und nachfolgende Abkühlung, kann eine thermostabile DNA-Polymerase unter entsprechenden Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP`s) die *Primer* entlang der einzelsträngigen DNA-Matrize verlängern. Es entstehen auf diese Weise zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle, welche in einem erneuten Reaktionszyklus wiederum als Matrizen für die *Primer* dienen können. Ab dem vierten Zyklus wird die Zielsequenz exponentiell vermehrt.

Um Aussagen über die Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene treffen zu können, wurde hier die quantitative PCR angewandt. Das Prinzip besteht in der Zugabe eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (in diesem Falle *SYBR Green*) zum jeweiligen Reaktionsansatz. Nach jedem PCR-Zyklus, d.h. nach jeder Verdopplung der Menge an doppelsträngiger DNA, wurde die aus den jeweiligen Proben emittierte Fluoreszenz gemessen. Ab einer bestimmten Zyklusanzahl kann das Fluoreszenzsignal vom PCR-Gerät erfasst werden und steigt dann exponentiell und direkt proportional zur Menge an neusynthetisierter doppelsträngiger DNA bis zum Erreichen eines Plateaus an. Durch Korrelation des logarithmischen Anstiegs mit dem entsprechenden Zyklus und Vergleich mit Standards ist eine direkte quantitative Aussage bezüglich der in der Probe vorhandenen, das gesuchte Zielgen betreffenden DNA-Menge möglich.

Bei der in dieser Arbeit angewandten Methode der quantitativen *real-time* Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) wurde isolierte mRNA als Ausgangsmaterial verwendet.

Sie wurde zunächst mit einer reversen Transkriptase unter Verwendung eines sequenzunspezifischen *Primers* in cDNA umgeschrieben, die dann als Ausgangsmaterial für die Amplifikation diente. Um die Expression von 2 Zielgenen bestimmen zu können, wurden je Probe 5 µg RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser mit je 2 µl des Mastermixes I versehen und für 5 Min. bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Probe 8 µl des Mastermixes II hinzugefügt und das ganze zunächst für 1 h bei 45 °C und danach 15 Min. bei 70 °C inkubiert.

Die auf diese Weise synthetisierte cDNA war nun unter Einsatz sequenzspezifischer *Primer* der quantitativen Bestimmung mit Hilfe der PCR zugänglich. Dazu wurde als nächstes für jedes Zielgen ein Reaktionsmix mit den jeweiligen *Sense-* und *Antisense-Zielgen-Primern* hergestellt und in 96-well-Mikrotiterplatten vorgelegt. Dann wurden je 2 µl cDNA-Probe dazupipettiert. Als *Housekeeping* Gen wurde HPRT verwendet und für die Zielgene jeweils Doppelwerte bestimmt. Bei der anschließenden Genamplifikation im PCR-Gerät wurden stets 40 PCR-Zyklen unter folgenden Temperatur- und Zeitbedingungen in Abhängigkeit des jeweiligen Zielgens durchgeführt:

**Adiponectin, ATRAP, Leptin, UCP-1:**

95 °C für 15 Minuten (1 Zyklus)  
 95 °C für 30 Sekunden  
 56 °C für 30 Sekunden  
 72 °C für 30 Sekunden

**MCP-1:**

95 °C für 15 Minuten (1 Zyklus)  
 95 °C für 30 Sekunden  
 60 °C für 1 Minute  
 72 °C für 1 Minute

Softwaregestützt konnten nun anhand der erfassten cDNA-Mengen Aussagen über die Expression des jeweiligen Zielgens sowie mögliche Änderungen des Expressionsmusters unter Versuchsbedingungen getroffen werden.

### 2.2.8 Statistische Auswertung

Die Daten stellen Mittelwerte mit Standardfehler dar. Mit Hilfe des ungepaarten *students t-test* wurden statistische Signifikanzen berechnet. Als statistisch signifikant und in dieser Arbeit hervorgehoben durch den einfachen Asteriskus (\*), gilt ein p-Wert kleiner als oder gleich 0,05. Ein p-Wert kleiner als oder gleich 0,01 gilt als statistisch hoch signifikant und ist mit dem doppelten Asteriskus (\*\*) gekennzeichnet.

### **3 ERGEBNISSE**

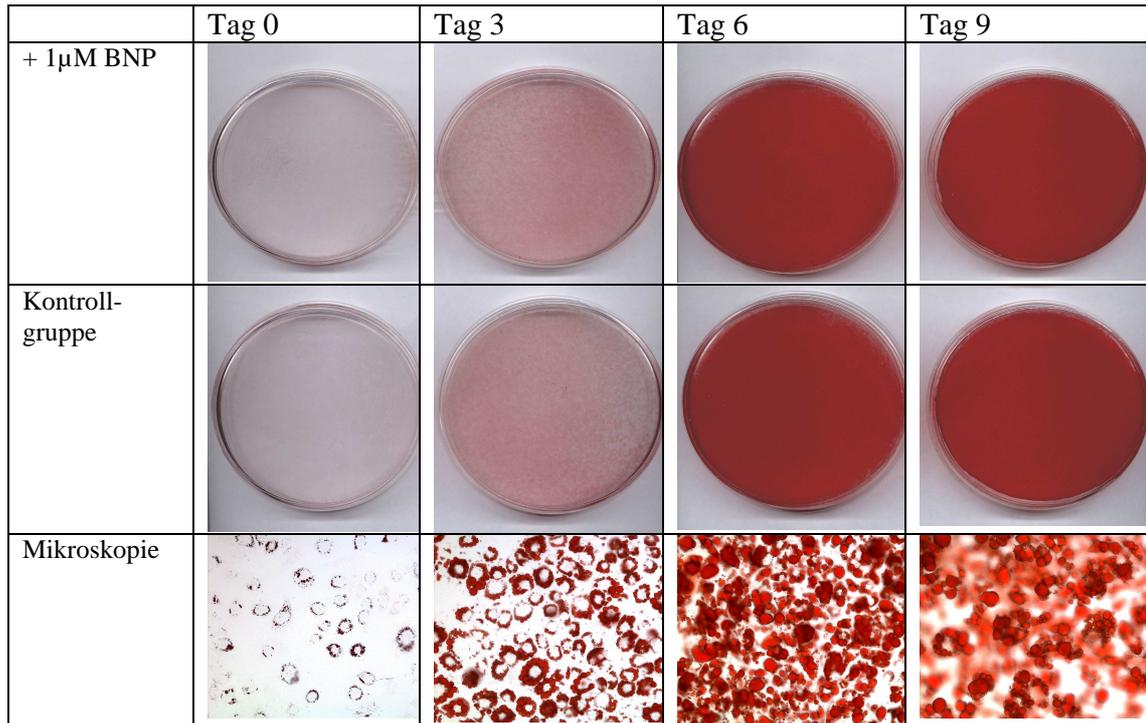
#### **3.1 Adipozytendifferenzierungsverhalten und Thermogenese unter Einfluss von BNP**

##### **3.1.1 Adipozytendifferenzierungsverhalten unter Einfluss von BNP**

Verschiedene Substanzen, darunter die im Folgenden untersuchten Adipokine Leptin und Adiponectin sowie auch UCP-1 werden differenzierungsabhängig generiert und sezerniert. Es war daher wichtig herauszufinden, ob die Zugabe von BNP Auswirkungen auf die Adipozytendifferenzierung zeigt und auf diese Weise die Ergebnisse dieser Arbeit verfälscht haben könnte.

Braune Präadipozyten wurden dazu in Tochterschalen ausgesät. Nach der 24-stündigen Induktionsphase wurden die Schalen in zwei Gruppen unterteilt: Beide Gruppen erhielten fortan jeden Tag frisches Differenzierungsmedium, eine wurde zusätzlich jeden Tag mit 100 nM bzw. 1  $\mu$ M BNP bis zum nächsten Medienwechsel stimuliert. Nach Induktionsende (Tag 0), sowie an Tag 3, 6 und 9 nach Induktion wurden die Zellen nach der in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Methode mit dem fettspezifischen Farbstoff *Oil-Red-O* angefärbt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulation der Zellen mit 100 nM (Daten nicht dargestellt) als auch mit 1  $\mu$ M BNP keinerlei optisch erfassbarer Auswirkungen auf die Fettakkumulation und Adipozytendifferenzierung hat (siehe Abb. 8, S. 35).

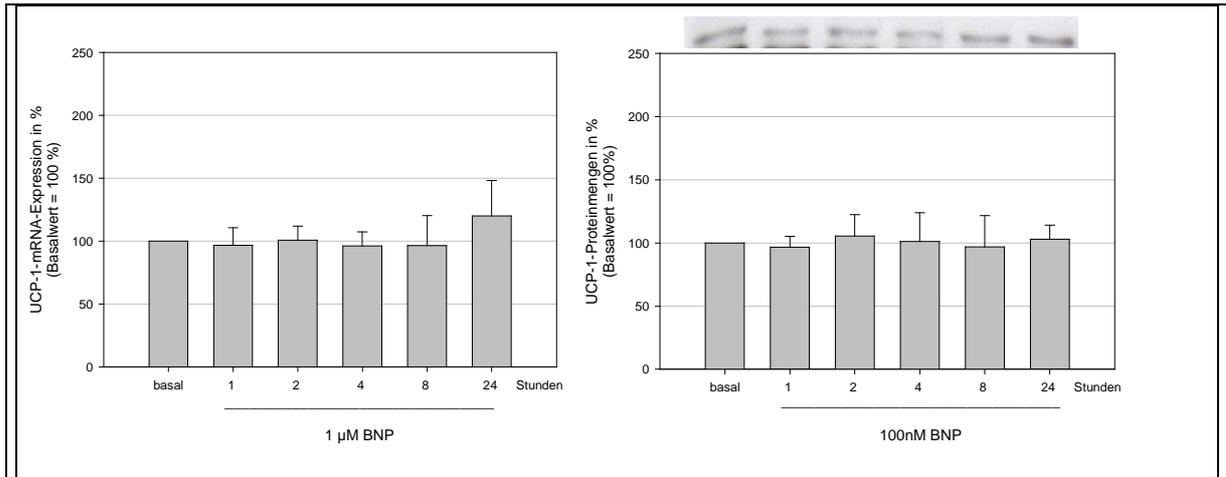


**Abb. 8: Adipozytenkulturen nach Oil-Red-O-Färbung an verschiedenen Tagen der Differenzierungsphase.** Deutlich zu erkennen ist die zunehmende makroskopische Rotfärbung der Adipozyten in den Zellkulturschalen, je länger die Zellen in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. In 200-facher mikroskopischer Vergrößerung (Darstellung der Kontrollgruppe) gelingt der Nachweis zunehmender multivakuolärer perinukleärer Fettakkumulation in den Adipozyten, welche die fortschreitende Ausdifferenzierung zu adulten braunen Fettzellen von Tag 0 bis Tag 9 nach der Induktionsphase kennzeichnet. Bei einer Stimulation der Zellen mit täglich 1 µM BNP lassen sich zur Kontrollgruppe keine Unterschiede im Differenzierungsverhalten ausmachen.

### 3.1.2 BNP und Thermogenese

Die Energieabgabe in Form von Wärme, die sogenannte Thermogenese, wird in braunem Fettgewebe durch das *uncoupling protein-1* (UCP-1) vermittelt. Die Thermogeneseinduktion wird als eine aussichtsreiche therapeutische Option bei Adipositas diskutiert. Der Einfluss von BNP auf die UCP-1-Expression wurde daher untersucht.

Die Stimulation brauner Adipozyten mit BNP blieb über Zeiträume von einer bis 24 h bezüglich der UCP-1-mRNA-Expression und -Proteinmengensekretion ohne signifikante Auswirkungen (Abb. 9, S. 36).



**Abb. 9: Keine nachweisbaren BNP-Effekte auf UCP-1**

Adipozytenkulturen wurden über die Dauer von einer bis zu 24 h mit 1 µM bzw. 100 nM BNP inkubiert. Anschließend wurden die UCP-1-mRNA-Expression sowie die UCP-1-Proteinmengen gemessen. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte und Standardfehler aus 5 bzw. 4 unabhängigen Experimenten. Die Abbildung oberhalb des rechten Balkendiagramms zeigt exemplarisch ein Westernblot-Bandenmuster aus der Versuchsreihe.

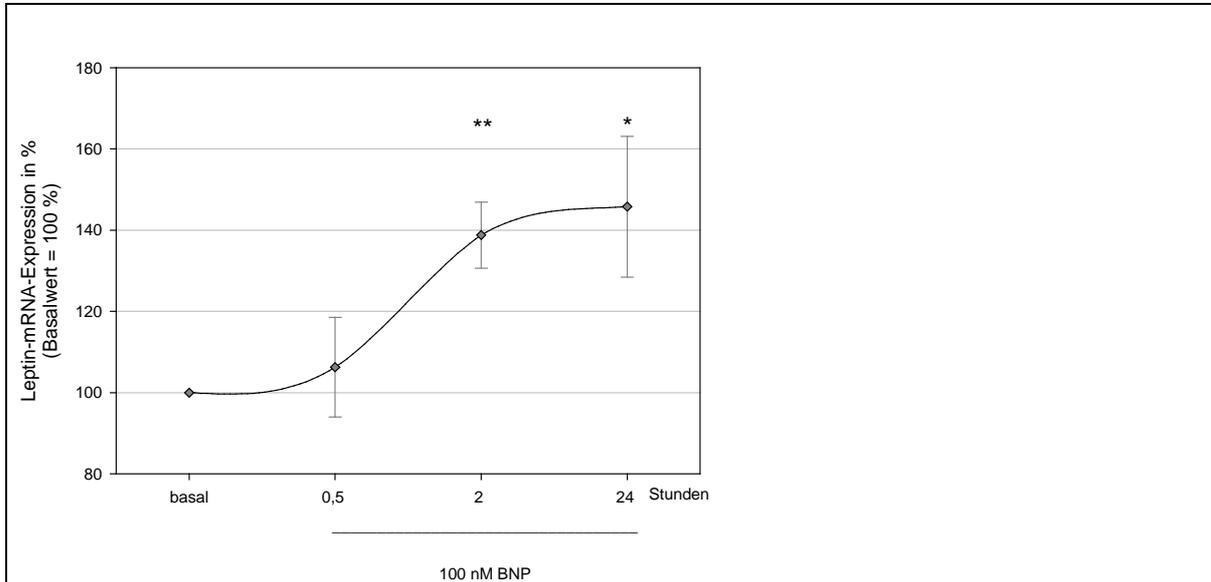
## 3.2 Modifikation der endokrinen Adipozytenaktivität durch BNP

Mit der Entdeckung des ersten Fettgewebshormons „Leptin“ begann 1994 ein neues Verständnis des Fettgewebes auch als endokrines Organ (Zhang *et al.*, 1994). Die Identifikation immer neuer sogenannter „Adipokine“ wirft seitdem ständig neue interessante wissenschaftliche Fragestellungen auf und trägt zum zunehmenden Verständnis der komplexen Energiestoffwechselfvorgänge bei. Die erst relativ kurz bekannte endokrine Fettzellfunktion spielt möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Metabolischen Syndroms und assoziierter Erkrankungen. Ihre Modifikation durch BNP wurde daher anhand einiger wichtiger Adipokine untersucht.

### 3.2.1 Modifikation der Genexpression von Leptin

Leptin ist ein Protein, welches hauptsächlich vom Fettgewebe sezerniert wird. Auch braune Adipozyten sezernieren differenzierungsabhängig Leptin (Kraus *et al.*, 2002). Als Anorexigen mindert es zentral das Hungergefühl und steigert den Energieverbrauch (Wauters *et al.*, 2000). Direkte autokrine Effekte auf braune Adipozyten u.a. im Sinne einer Induktion zellulärer Insulinresistenz konnten von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Johannes Klein bereits nachgewiesen werden (Kraus *et al.*, 2002). Mit Leptin und seinen Wirkungen wurde sich inzwischen weiter intensiv wissenschaftlich beschäftigt.

Da es von allen Adipokinen als am besten erforscht gilt und weitreichende metabolische Wirkungen besitzt, wurde es in dieser Arbeit als erstes Adipokin hinsichtlich seiner Modifikation durch BNP untersucht.



**Abb. 10: Effekte von BNP auf die Leptin – Expression**

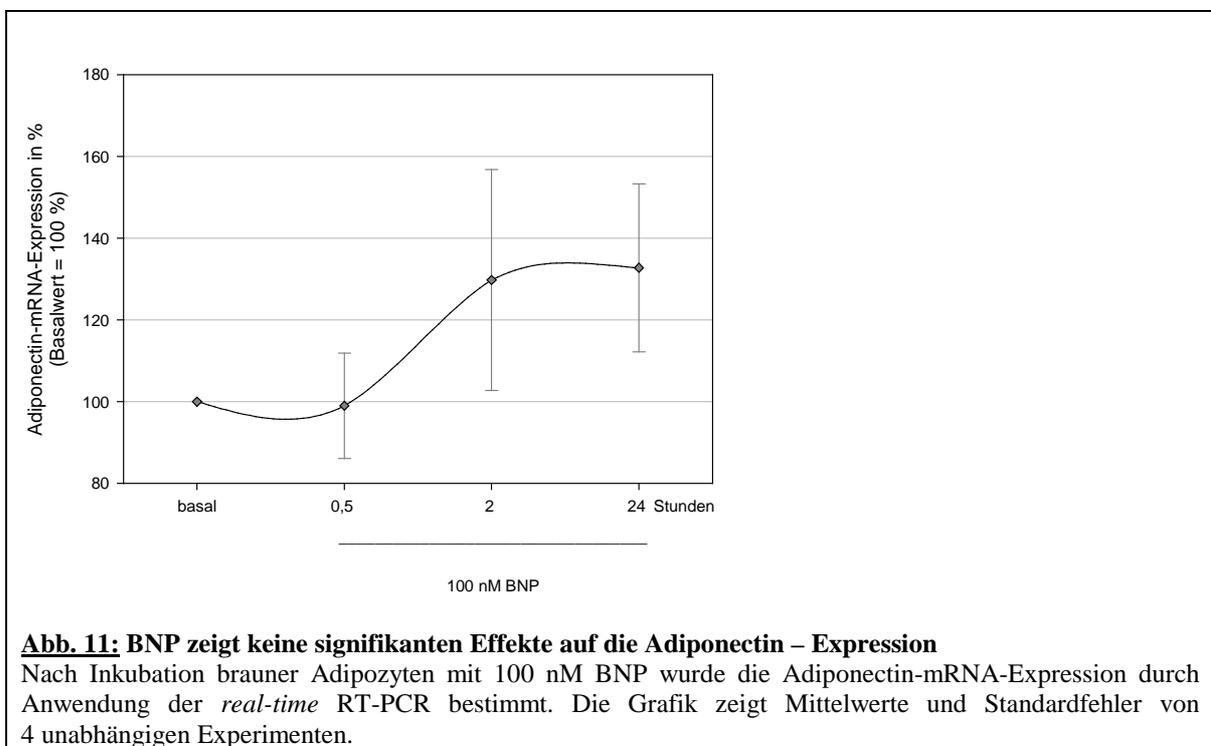
Braune Adipozyten wurden für die Dauer von einer halben bis 24 h mit 100 nM BNP stimuliert. Durch *real-time* RT-PCR wurde im Folgenden die Leptin-mRNA-Expression bestimmt. Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardfehler von 4 unabhängigen Experimenten. Der einfache Asterikus (\*) kennzeichnet signifikante, der doppelte Asterikus (\*\*) hochsignifikante Ergebnisse im Vergleich zur basalen Leptin-mRNA-Expression.

Es zeigte sich, dass BNP die Genexpression von Leptin in den braunen Adipozytenkulturen zeitabhängig steigert. Bereits nach 2 h ließ sich eine hochsignifikante Expressionssteigerung um etwa 40 % nachweisen. Nach 24 h war die Leptin-Genexpression durch BNP-Stimulation signifikant um weitere 5 % hochreguliert worden (Abb. 10).

### 3.2.2 Modifikation der Genexpression von Adiponectin

Adiponectin ist ein weitestgehend fettspezifisches Hormon, dessen Plasmakonzentrationen bei Adipositas und Insulinresistenzsituationen vermindert sind. Adiponectin scheint an der Regulation des Glukose- und Lipidstoffwechsels beteiligt zu sein und soll vor Arteriosklerose schützen. Vor diesem Hintergrund erschien die Frage interessant, ob BNP auch die Adiponectinexpression in braunen Fettzellen beeinflusst.

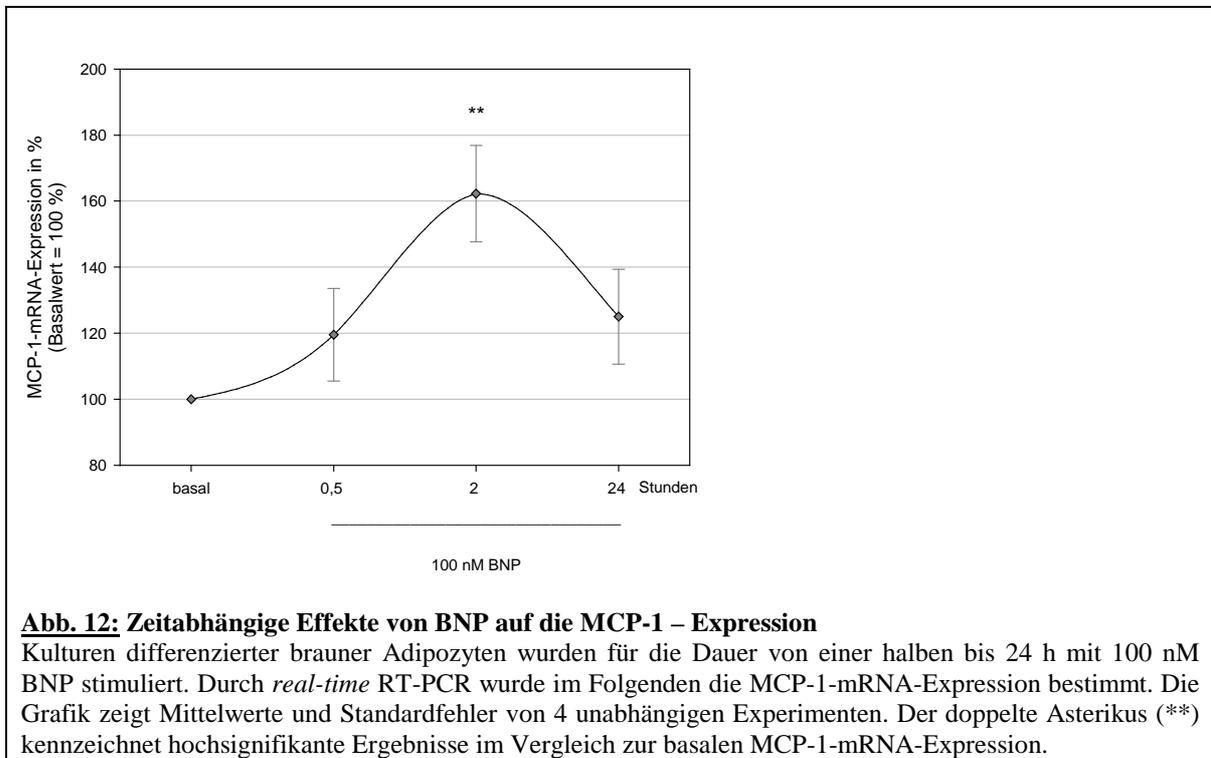
Es hat sich gezeigt, dass die Gabe von 100 nM BNP über eine halbe bis 24 h bei der in dieser Arbeit verwendeten Versuchsanordnung keine signifikanten Effekte an den braunen Adipozyten bezüglich der Adiponectinexpression auslösen konnte (Abb. 11).



### 3.2.3 Modifikation der Genexpression von MCP-1

Das *Monocyte Chemoattractant Protein 1* soll eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose spielen. Es wird u.a. vom Fettgewebe sezerniert (Gerhardt *et al.*, 2001) und ist dort an der Entwicklung der adipositas-assoziierten Insulinresistenz beteiligt (Sartipy und Loskutoff, 2003). Zur Klärung der Frage, ob BNP die mRNA-Expression dieses Zytokins beeinflussen könnte, wurden braune Adipozyten nach einem Zeitschema mit BNP stimuliert.

Die Stimulation mit 100 nM BNP zeigte eine hochsignifikante Zunahme der Genexpression von MCP-1 mit einem Maximum von + 60 % nach 2 h. Längere Inkubationszeiten waren wieder mit einem Abfall verbunden (siehe Abb. 12).



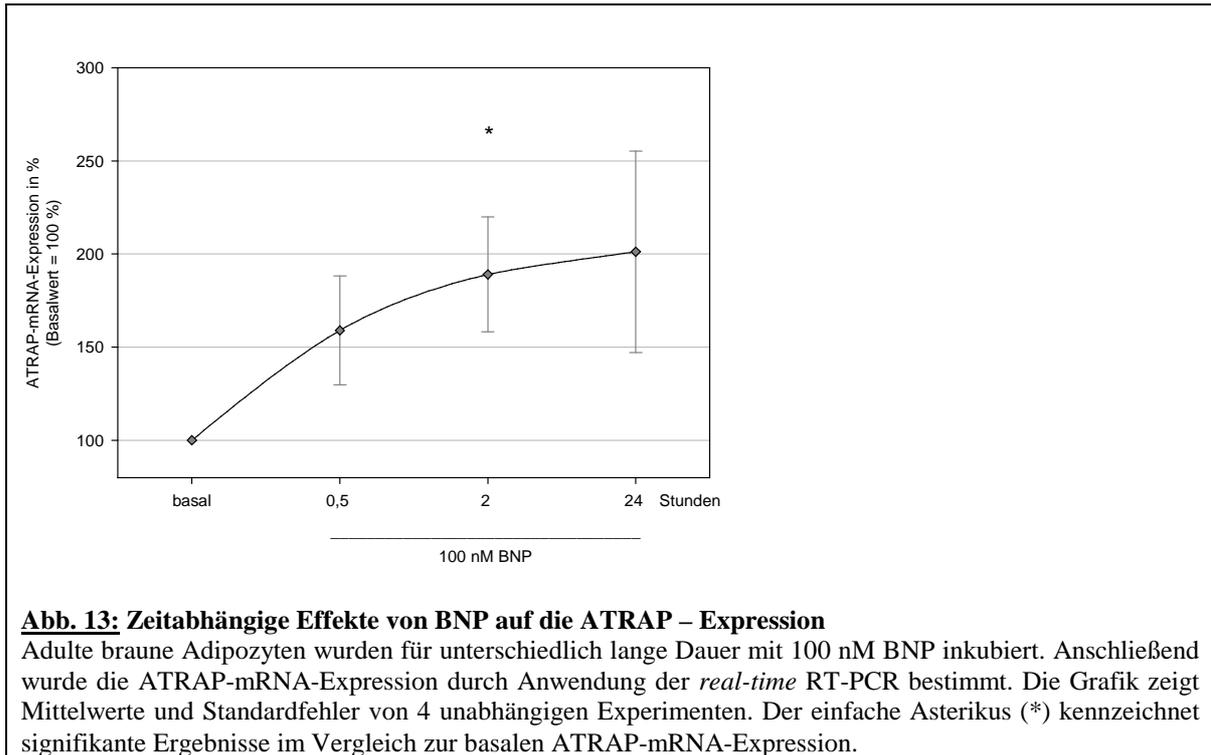
**Abb. 12: Zeitabhängige Effekte von BNP auf die MCP-1 – Expression**

Kulturen differenzierter brauner Adipozyten wurden für die Dauer von einer halben bis 24 h mit 100 nM BNP stimuliert. Durch *real-time* RT-PCR wurde im Folgenden die MCP-1-mRNA-Expression bestimmt. Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardfehler von 4 unabhängigen Experimenten. Der doppelte Asteriskus (\*\*) kennzeichnet hochsignifikante Ergebnisse im Vergleich zur basalen MCP-1-mRNA-Expression.

### 3.2.4 Modifikation der Genexpression von ATRAP

ATRAP wird als ein negativer Regulator der Signalvermittlung von Angiotensin II betrachtet. Es kann auf diese Weise vermutlich das im Fettgewebe vorkommende lokale RAS modulieren und somit Einfluss auf die physiologische Organfunktion des Fettgewebes nehmen. Störungen der Fettgewebsphysiologie werden mit Veränderungen im Adipokinsekretionsmuster und der Morbidität bei Adipositas in Verbindung gebracht. Kürzlich konnte die Expression und Regulation von ATRAP auch in Adipozyten nachgewiesen werden (Westphal *et al.*, 2008).

Die mRNA-Expression von ATRAP wird durch Stimulation mit 100 nM BNP zeitabhängig hochreguliert. Der Anstieg erreicht nach 2 h mit einer um etwa 85 % gesteigerten Genexpression statistische Signifikanz. Nach 24-stündiger BNP-Stimulation ist die ATRAP-Genexpression um dann allerdings nicht mehr signifikante 100 % gegenüber dem Basalwert erhöht worden (Abb. 13, S. 40).



### 3.3 Einfluss von BNP auf die Insulinsignalkaskade und Insulinsensitivität

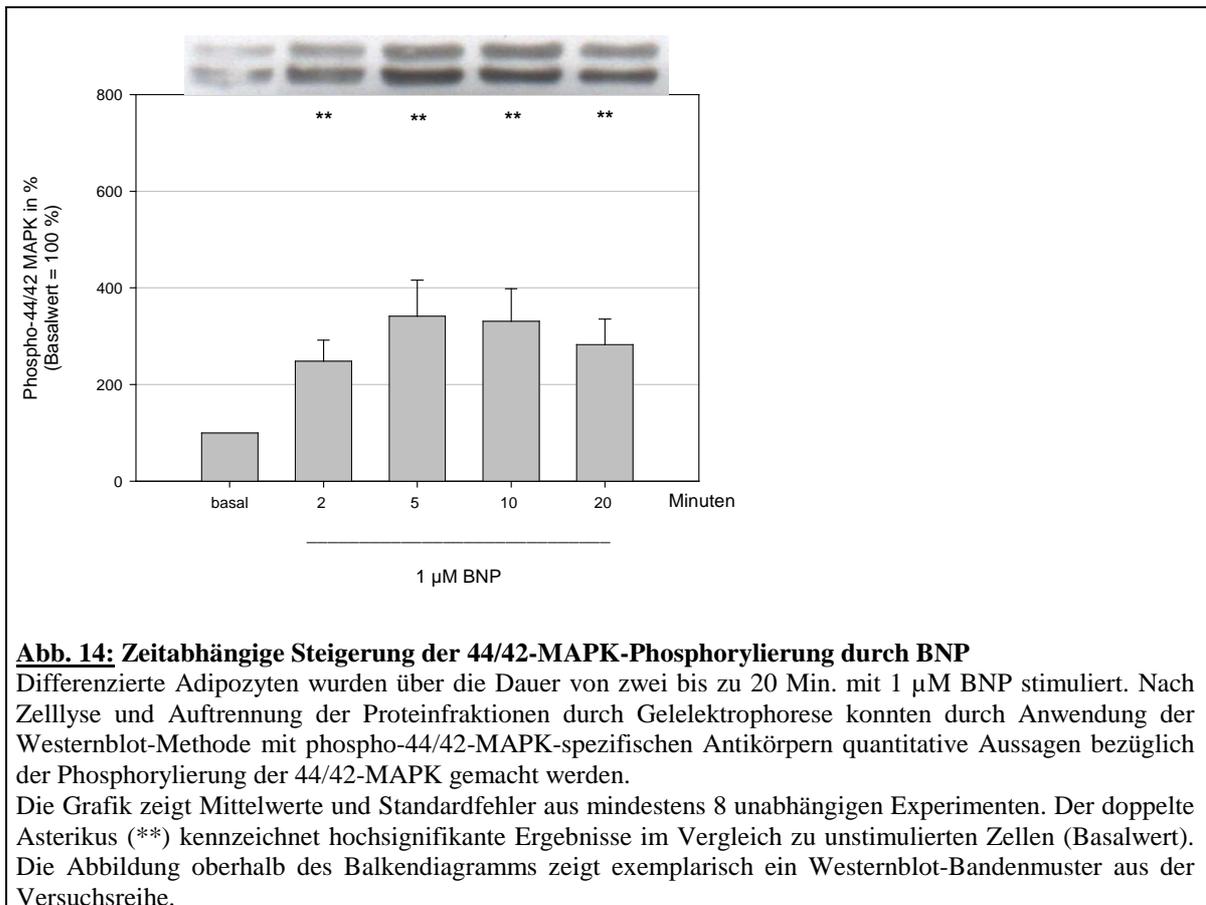
#### 3.3.1 Effekte von BNP auf Schlüsselmoleküle der Insulinsignalkaskade

Störungen in der Insulinsignaltransduktion werden als Ursache einer reduzierten Insulinsensitivität bei Adipositas diskutiert. Direkte Effekte von BNP auf Schlüsselmoleküle der Insulinsignalkaskade waren bislang nicht bekannt und wurden im Folgenden untersucht.

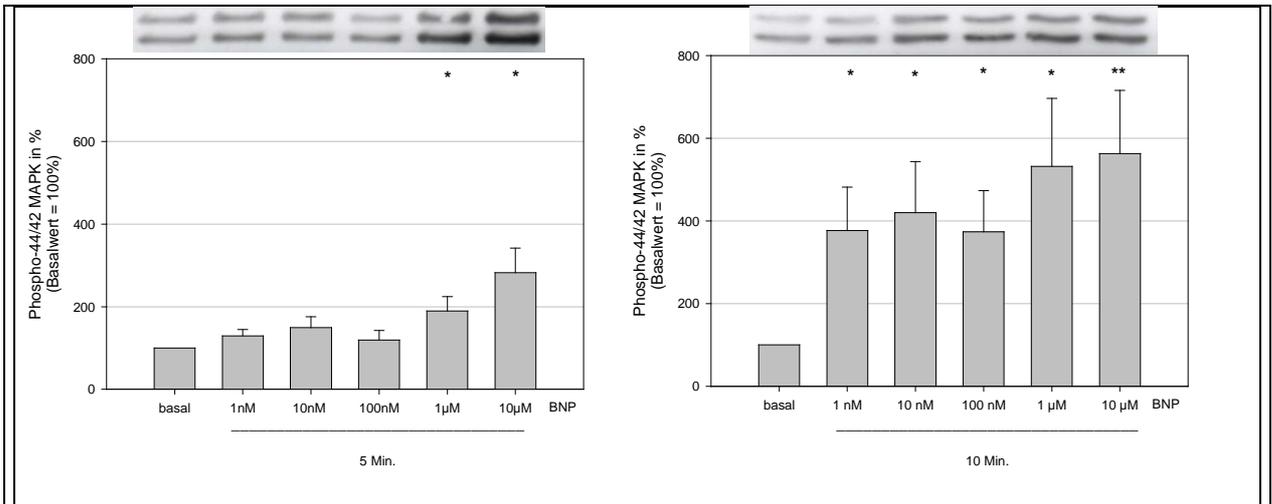
##### 3.3.1.1 Phosphorylierung von MAP-Kinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) stellen in eukaryontischen Zellen eine Gruppe zytoplasmatischer Proteine dar, welche als Signalübermittler von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen dienen und so die Zellproliferation und -differenzierung fördern (Seeger und Krebs, 1995). Die durch Phosphorylierung aktivierte Form der **44/42- MAPK (p44/42 MAPK)** vermittelt vor allem Signale von Wachstumsfaktoren wie Insulin. Sie besitzt eine zentrale Bedeutung in der Regulation zahlreicher Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren und beeinflusst so die Genexpression und das Zellwachstum (Saltiel und Kahn, 2001). Auch hemmende Effekte auf die Insulinsignaltransduktion konnten nachgewiesen werden.

Die 44/42-MAP-Kinase wird durch Stimulation mit BNP akut aktiviert. Der beobachtete Effekt zeigte eine zeit- und dosisabhängige Charakteristik. Die Behandlung der Adipozyten mit 1  $\mu$ M BNP resultierte bereits nach 2 Min. in einem hochsignifikanten 2,5-fachen Anstieg der MAPK-Phosphorylierung. Die Aktivierung zeigte nach 5 Min. ihr Maximum und erreichte die etwa 3,5-fache Stärke verglichen mit der Ausgangssituation – hier dargestellt als Basalwert. Längere Stimulationsdauern minderten den beobachteten Effekt wieder (siehe Abb. 14).



Steigende BNP-Konzentrationen über einen Zeitraum von 5 und 10 Min. verstärkten die Aktivierung der 44/42-MAPK. Bereits mit 1 nM BNP ließ sich nach 10 Min. eine Steigerung der Phosphorylierung um mehr als 300 % erreichen. Die höchste in diesen Versuchen eingesetzte Konzentration von 10  $\mu$ M BNP führte zu einem maximalen und hochsignifikanten Anstieg um mehr als das 5-fache nach 10 Min (Abb. 15).



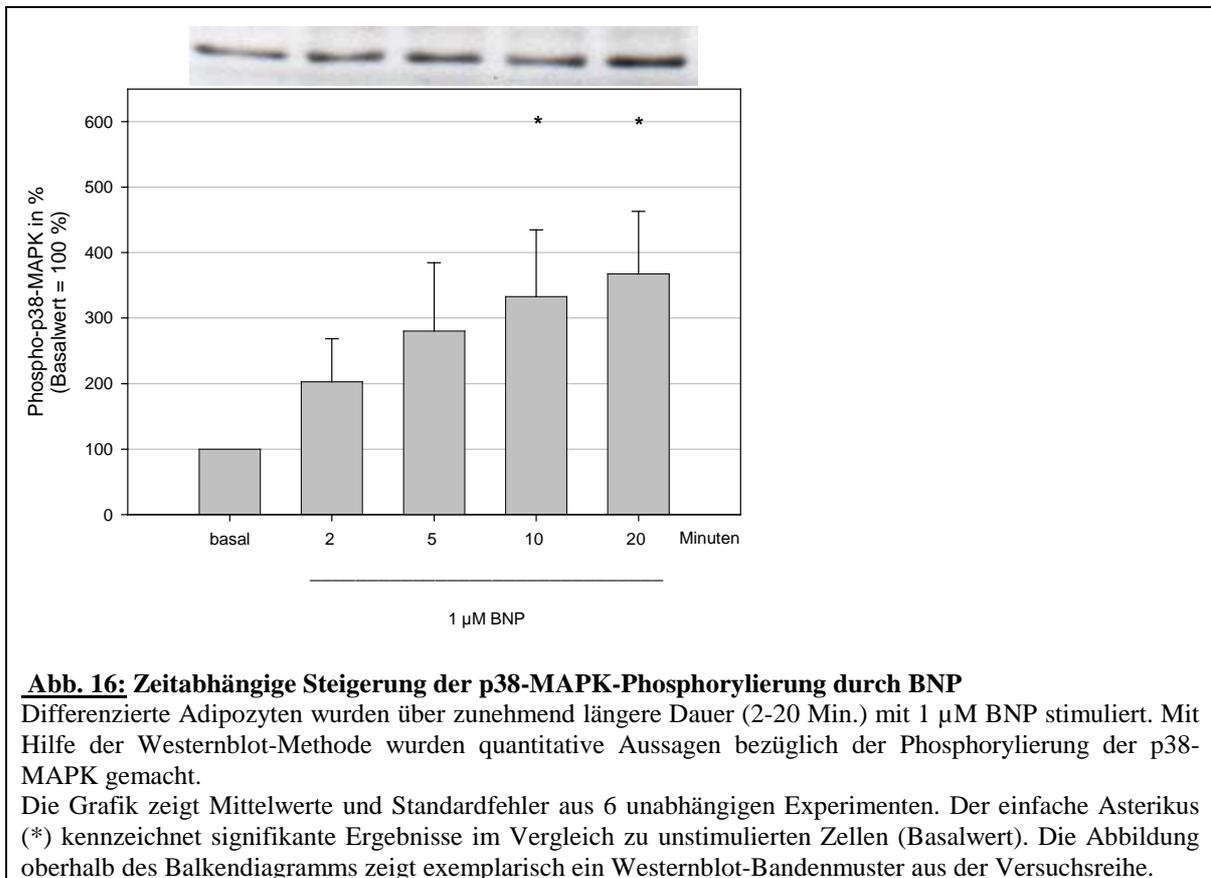
**Abb. 15:** Dosisabhängige Steigerung der 44/42-MAPK-Phosphorylierung durch BNP

Differenzierte Adipozyten wurden für 5 bzw. 10 Min. mit steigenden Dosen BNP stimuliert. Durch Anwendung der Westernblot-Methode konnten quantitative Aussagen bezüglich der Phosphorylierung der 44/42-MAPK gemacht werden.

Die Grafiken zeigen Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Der einfache Asteriskus (\*) kennzeichnet signifikante, der doppelte Asteriskus (\*\*) hochsignifikante Ergebnisse im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Basalwert). Die Abbildungen oberhalb der Balkendiagramme zeigen exemplarisch Westernblot-Bandenmuster aus den Versuchsreihen.

Die **p38-MAPK** reagiert dagegen am meisten auf Stressfaktoren wie UV-Licht, Hitze, osmotische Reize oder proinflammatorische Zytokine und wird daher auch als Stresskinase (*stress-activated protein kinase, SAPK*) bezeichnet (Zarubin und Han, 2005).

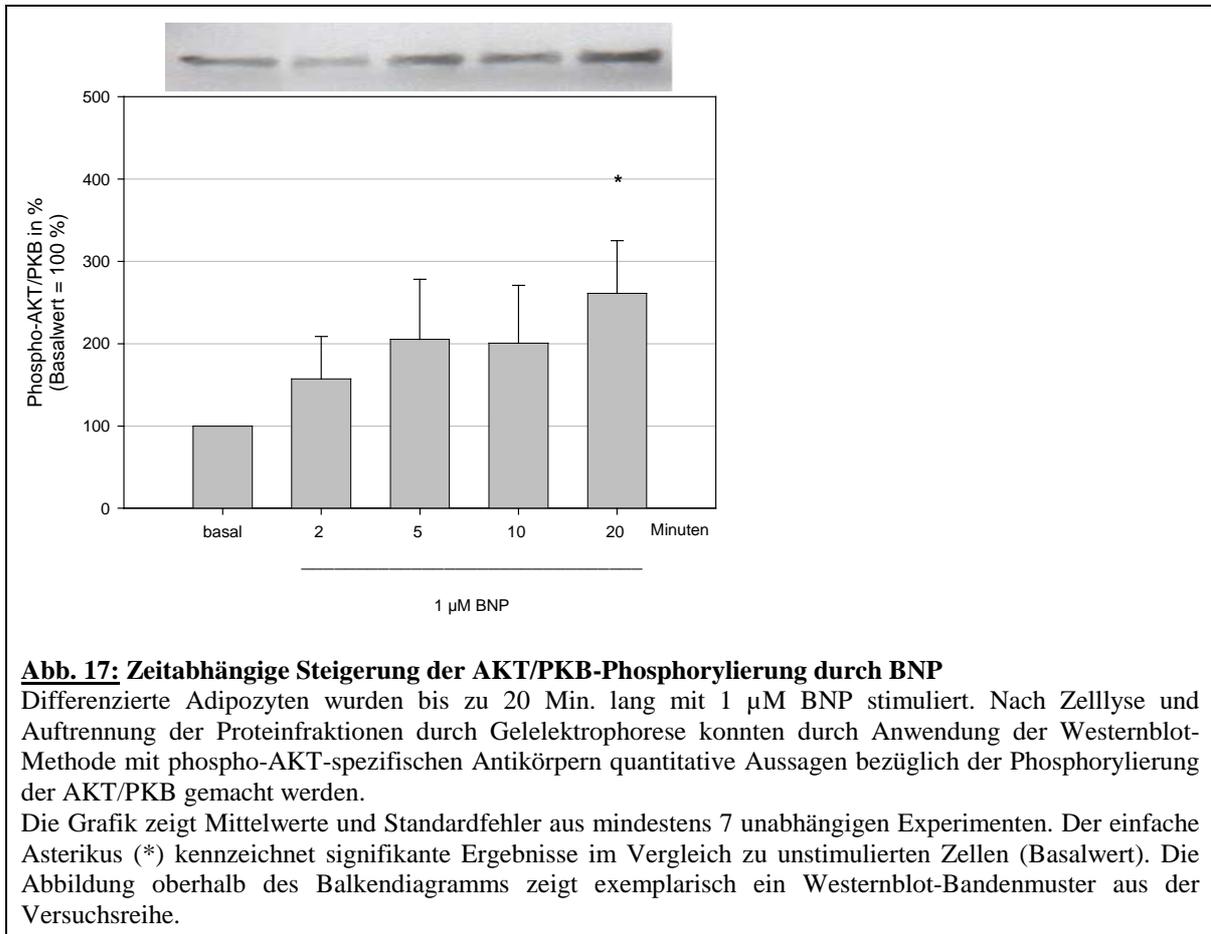
Die Stimulation brauner Adipozyten mit BNP zeigte einen kontinuierlichen zeitabhängigen Anstieg der p38-MAPK-Phosphorylierung. Nach 20 Min. wurde das Maximum mit einem etwa 3,6-fach höheren Nachweis der Phospho-p38-MAPK gemessen. Sowohl dieser höchste, als auch die zuvor erhobenen Daten nach 10 Min. erwiesen sich als statistisch signifikant (Abb. 16).



### 3.3.1.2 Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB/AKT)

Die Proteinkinase B (PKB, auch AKT genannt) gilt als Schlüsselement des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges, eines wichtigen Signalweges der Insulin-signal-kaskade. Die phosphorylierte und damit aktivierte Form von AKT ist u.a. an der insulinvermittelten Glukoseaufnahme durch Translokation des Glukosetransporters GLUT 4 in die Zellmembran beteiligt (Hernandez *et al.*, 2001). Des Weiteren hemmt AKT den kontrollierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, nimmt Einfluss auf den Fettsäure- und Glykogenmetabolismus und stimuliert die Zellproliferation (Lawlor und Alessi, 2001).

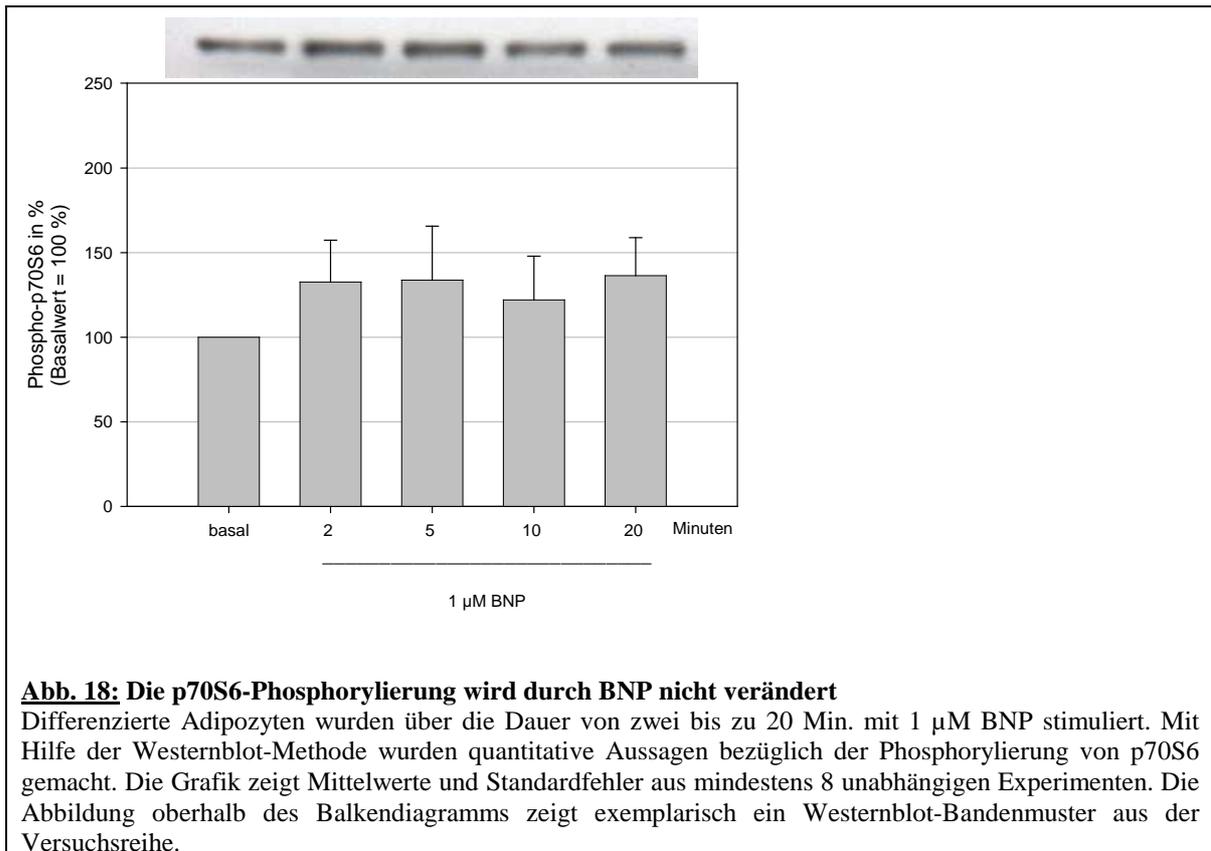
BNP aktiviert in ausdifferenzierten braunen Adipozyten die Phosphorylierung von AKT. Der Effekt wies dabei einen zeitabhängigen Anstieg bis auf etwa das 2,6-fache des Ausgangswertes nach 20 Min. auf und erreichte statistische Signifikanz (Abb. 17).



### 3.3.1.3 Phosphorylierung des Signalmoleküls p70S6

Die 70-kDa ribosomale Protein S6 Kinase (p70S6) ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Substrat das S6 ribosomale Protein ist. Die Phosphorylierung an S6 führt zur Proteinsynthese am Ribosom und induziert die Zellproliferation.

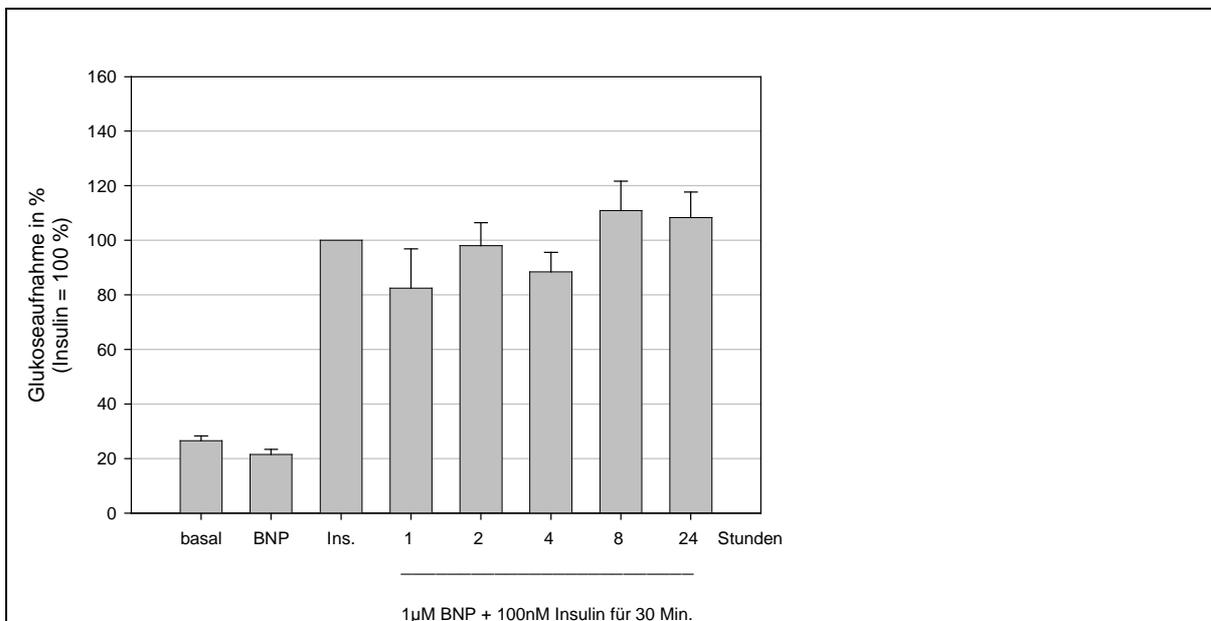
Die Stimulation brauner Adipozyten mit 1  $\mu\text{M}$  BNP zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf die Phosphorylierung des Signalmoleküls p70S6 (Abb. 18).



### 3.3.2 Einfluss von BNP auf die Insulinsensitivität

Adipozyten reagieren sensibel auf eine Stimulation mit Insulin. Als ein essentieller insulinvermittelter Vorgang gilt die Glukoseaufnahme in die Adipozyten. Störungen des physiologischen Ablaufes z.B. in Form einer Insulinresistenz können den gesamten Organismus beeinträchtigen. Daher sind mögliche Interaktionen zwischen BNP und Insulin von besonderem Interesse und wurden mit Hilfe insulininduzierter Glukose-Aufnahme-Assays untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Prästimulation von braunen Adipozyten mit BNP in einer Konzentration von 10 nM, 100 nM (Daten nicht gezeigt) und 1  $\mu$ M über Zeiträume zwischen einer und 24 h keinen signifikanten Einfluss auf die insulininduzierte Glukoseaufnahme hat (Abb. 19).



**Abb. 19: BNP ändert die Glukoseaufnahme brauner Adipozyten nicht**

Glukoseaufnahme brauner Adipozyten nach alleiniger Stimulation mit 1  $\mu$ M BNP für 24 h und 100 nM Insulin für 30 Min. sowie über einen Zeitraum von einer bis zu 24 h nach Prästimulation mit 1  $\mu$ M BNP und anschließender Gabe von 100 nM Insulin über 30 Min. Dargestellt ist das Ergebnis aus 6 unabhängigen Versuchen.

## **4 DISKUSSION**

Das Metabolische Syndrom mit seinen zentralen Elementen Adipositas, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und arterieller Hypertonie stellt ein wesentliches gesundheitliches Problem dieses Jahrhunderts dar. Folgeerkrankungen des Metabolischen Syndroms führen die Mortalitätsstatistiken der westlichen Industrienationen an und verursachen immense Kosten im Gesundheitswesen. Die Erforschung kausaler pathogenetischer Zusammenhänge zur Prävention oder Therapie dieser Erkrankungen ist daher von großer Wichtigkeit. Dem Element Adipositas, dessen Inzidenz und Prävalenz in der westlichen Welt weiterhin stark ansteigen, kommt in letzter Zeit besondere wissenschaftliche Aufmerksamkeit zu. Adipositas eignet sich in besonderem Maße für primärpräventive Therapieansätze wie diätetische Ernährungsumstellung oder vermehrte körperliche Betätigung, wodurch bereits beachtliche Erfolge zur Reduktion adipositasassoziierter Erkrankungen erreicht werden können.

Auf welche Weise vergrößerte Fettgewebsdepots jedoch im Detail zu den häufig damit verbundenen gesundheitlichen Beeinträchtigungen wie Insulinresistenz oder arterieller Hypertonie führen, ist bislang weitestgehend unverstanden. Das gleiche gilt für Phänomene wie das „Adipositas-Paradoxon“. Die Entdeckung des Fettgewebes als endokrines Organ führte in jüngerer Vergangenheit zu einer Fülle neuer Erkenntnisse, von denen sich in der Zukunft eine Aufklärung der Pathogenese des Metabolischen Syndroms und weiterer Erkrankungen erhofft wird. Insbesondere braunes Fettgewebe könnte durch seine Fähigkeit zur Thermogenese neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

Die erst relativ kurz bekannte Gruppe der Natriuretischen Peptide stellt eines der Hauptregulationssysteme des Volumenhaushalts und der Blutdrucksteuerung des menschlichen Körpers dar. Fehlregulationen des Kardialen Natriuretischen Peptidsystems (KNPS) und des im Prinzip antagonistisch wirkenden Renin-Angiotensin-Systems (RAS) werden als pathophysiologisches Erklärungsmodell des gehäuft auftretenden arteriellen Hypertonus und gewisser metabolischer Veränderungen bei Adipositas diskutiert (Engeli und Sharma, 2001; Lafontan *et al.*, 2005). Natriuretische Peptide entfalten zudem direkte Effekte an humanem Fettgewebe (Sengenès *et al.*, 2000) und werden als Reaktion auf einen erhöhten BMI und insbesondere eine gleichzeitige diabetische Stoffwechsellage systemisch herunterreguliert.

Natriuretische Peptide stellen somit eine interessante Stoffgruppe mit möglicherweise großem Potential hinsichtlich der Klärung pathogenetischer Wechselwirkungen zwischen

dem Fettgewebe einerseits und systemischen negativen gesundheitlichen Folgen andererseits dar. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich daher mit der Grundlagenerforschung einer möglichen Einflussnahme des Natriuretischen Peptids BNP auf zentrale Elemente des Fettzellstoffwechsels unter Verwendung eines braunen Adipozytenmodells.

## **4.1 Adipozytendifferenzierungsverhalten und Thermogenese unter Einfluss von BNP**

### **4.1.1 Die Adipozytendifferenzierung wird durch BNP nicht verändert**

Im Rahmen der Fettzellendifferenzierung vom Präadipozyten zum vollständig ausgereiften adulten Adipozyten vollzieht eine Fettzelle einen erstaunlichen morphologischen Wandel, in dessen Verlauf sie vermehrt Lipidtröpfchen im Zytoplasma einlagert. Damit einhergehend verändern sich auch die rezeptiven und sekretorischen Fähigkeiten der Zelle. Adipozyten sezernieren in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades in unterschiedlichem Maße verschiedene endokrin wirksame Substanzen, so auch einige der in dieser Arbeit untersuchten wie z.B. Leptin (Kraus *et al.*, 2002) und Adiponectin sowie UCP-1. Der Differenzierungsgrad ist ebenfalls wichtig im Zusammenhang mit der Genexpression verschiedener Entzündungsmediatoren und der Insulinsensitivität. Je besser eine Fettzelle ausdifferenziert ist, um so weniger proinflammatorische Moleküle werden von ihr aktiviert bzw. freigesetzt und um so größer ist ihre Insulinsensitivität (Gustafson *et al.*, 2007). In einer früheren Arbeit unserer Forschungsgruppe (Westphal, 2005), konnte gezeigt werden, dass die färbereiche Darstellung der adipozytären Fettakkumulation und deren morphologische Kontrolle mit Hilfe eines Mikroskops sehr gut mit der Expression früher und später Differenzierungsmarker korreliert.

Durch Anwendung einer fettspezifischen Zellfärbemethode wurde daher zunächst eine Beeinflussung der Fettakkumulation und damit des Differenzierungsverhaltens der braunen Adipozyten und eine damit möglicherweise verbundene Verfälschung der Ergebnisse der folgenden Stimulationsexperimente durch übliche in dieser Arbeit verwendete BNP-Mengen ausgeschlossen. Gleichzeitig wurde die mikroskopische Zellmorphologie zwischen der Kontroll- und Verumgruppe täglich beobachtet. Unterschiede im Differenzierungsverhalten ließen sich auch hier nicht feststellen.

Effekte Natriuretischer Peptide auf das Differenzierungsverhalten von Adipozyten wurden bislang nur wenig untersucht. Sarzani *et al.* konnten zeigen, dass ANP die Proliferation von weißen Adipozyten und Präadipozyten aus humanem viszeralen Fettgewebe hemmen

kann (Sarzani *et al.*, 2008a). Über dessen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten wurden dort keine Aussagen getroffen. In einer erst kürzlich veröffentlichten *in vitro* - Studie an Rattenadipozyten wirkte sich die Zugabe von ANP wiederum positiv auf das Differenzierungsverhalten aus (Nishikimi *et al.*, 2009). Unserem Kenntnisstand nach wurden bislang keine Daten über Wechselwirkungen zwischen BNP und dem Differenzierungsverhalten brauner Adipozyten veröffentlicht. Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen fehlenden Beeinflussung der adipozytären Fettakkumulation ist hier jedoch davon auszugehen, dass eine relevante Änderung des Differenzierungsverhaltens durch BNP in den hier verwendeten Konzentrationen nicht stattfindet. Geringe Abweichungen des Differenzierungsverhaltens lassen sich aufgrund der rein visuell erfolgten Beurteilung der Zellanfärbung und -morphologie jedoch nicht vollständig ausschließen.

#### **4.1.2 BNP hat keinen Einfluss auf die adipozytäre Thermogenese**

Eine Möglichkeit des Energieverbrauchs ist die Energieabgabe in Form von Wärme. Braunes Fettgewebe ist durch das spezifische *uncoupling protein-1* (UCP-1) dazu befähigt, diese sogenannte Thermogenese zu betreiben. Metabolisch aktives braunes Fettgewebe kommt aktuellen Studien zufolge auch beim Erwachsenen vor. Es kann durch Kälteexposition zur Expansion angeregt und durch Transdifferenzierung aus weißem Fettgewebe generiert werden. Die Thermogeneseinduktion in braunem Fettgewebe wird daher als therapeutische Option bei Adipositas diskutiert (Tiraby und Langin, 2003; Nedergaard *et al.*, 2007; Langin, 2009; Virtanen *et al.*, 2009).

Kardiale Natriuretische Peptide gelten im kardiovaskulären System allgemein als protektiv wirksam und BNP wird in seiner rekombinanten Form auch therapeutisch eingesetzt (SciosInc., 2009). Bei Adipositas ist die Plasmakonzentration Natriuretischer Peptide erniedrigt (Wang *et al.*, 2004). Als ursächlich werden ein gesteigerter Abbau im Fettgewebe oder eine geringere Sekretion aus dem Herzen angesehen (Rubattu *et al.*, 2008). Aufgrund der niedrigeren NP-Plasmawerte sind negative Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System zu erwarten. Daten zur Thermogenese oder Beeinflussung des Körpergewichts durch Natriuretische Peptide existieren derzeit nicht. Es war daher Gegenstand dieser Untersuchungen, herauszufinden, ob BNP die Fähigkeit besitzt die UCP-1-Genexpression und damit die Thermogenese in braunen Adipozyten zu beeinflussen.

Bei Stimulation der Fettzellen mit BNP über Zeiträume von einer bis 24 h konnten weder auf mRNA- noch auf Proteinebene signifikante Auswirkungen auf UCP-1 beobachtet werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass BNP nicht an einer Änderung der Energieabgabe durch Thermogenese beteiligt ist.

## **4.2 Modifikation der endokrinen Adipozytenfunktion durch BNP**

Die Fähigkeit des Fettgewebes, verschiedenste endokrine Substanzen freizusetzen, ist inzwischen gut erforscht. Neben seiner altbekannten Funktion bei der Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes spielt Fettgewebe daher auch eine wichtige Rolle als endokrines Organ. Bei Adipositas vergrößerte viszerale aber auch perivaskuläre Fettgewebsdepots stehen im Verdacht, durch vermehrtes Freisetzen bestimmter Adipokine an der Entwicklung adipositasassoziiierter Morbidität beteiligt zu sein (Chudek und Wiecek, 2006; Guzik *et al.*, 2007). Man vermutet, dass Adipositas u.a. zu einer unterschwellig chronischen Entzündungsreaktion des Körpers führt, welche wiederum für Folgeerkrankungen wie Arteriosklerose und Insulinresistenz verantwortlich gemacht wird. In dieser Arbeit konnte die Modifikation der Genexpression einiger wichtiger Adipokine, für welche offensichtlich ein Zusammenhang mit der Pathogenese des Metabolischen Syndroms besteht, durch BNP nachgewiesen werden.

### **4.2.1 BNP steigert die Genexpression von Leptin**

Das Adipokin Leptin steigert den Energieverbrauch und spielt eine Rolle als Anorexigen (Wauters *et al.*, 2000). An braunen Adipozyten scheint es autokrin zelluläre Insulinresistenz auslösen zu können (Kraus *et al.*, 2002). Daneben könnte Leptin auch eine wichtige Rolle als Regulator des koronaren Vasotonus spielen (Schindler *et al.*, 2006).

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BNP die Genexpression von Leptin in braunen Adipozytenkulturen zeitabhängig steigern kann. Dies ist der erste Nachweis einer gesteigerten Leptin-Genexpression durch ein Natriuretisches Peptid an braunen Adipozyten. Es steht im Einklang mit dem Ergebnis einer aktuellen Studie an weißen Rattenadipozyten: Nikishimi *et al.* konnten nach Stimulation mit ANP ebenfalls eine Steigerung der mRNA-Level von Leptin feststellen (Nishikimi *et al.*, 2009). Insgesamt gibt es jedoch nur wenige Daten zum Einfluss Natriuretischer Peptide auf Leptin.

BNP könnte durch die Stimulation der Leptin-Genexpression einen direkten Einfluss auf den Energiestoffwechsel nehmen. Dies wäre neben seinen bekannten lipolytischen Eigenschaften (Sengenès *et al.*, 2000) eine mögliche Erklärung für die in einigen Fällen

vorkommende kardiale Kachexie bei schwerer chronischer Herzinsuffizienz. Hierbei sind die Plasma-BNP-Level als Ausdruck der starken Beeinträchtigung der Herzfunktion erhöht (Rademaker und Richards, 2005). Die kardiale Kachexie gilt als schwerwiegende Spätkomplikation der chronischen Herzinsuffizienz und ist mit einer schlechten Prognose und erhöhten Mortalität behaftet (Anker *et al.*, 1997). Die Ursachen des zugrundeliegenden Gewichtsverlustes konnten bislang nicht hinreichend geklärt werden. Leyva *et al.* konnten bereits 1998 zeigen, dass die Plasmaleptinspiegel bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöht sind (Leyva *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Steigerung der Leptin-Genexpression durch BNP zeigt ein neues Erklärungsmodell zur Pathogenese der kardialen Kachexie auf. Demnach wäre der ungewollte Gewichtsverlust bei schwerer chronischer Herzinsuffizienz auch durch einen BNP-induzierten erhöhten Plasmaleptinspiegel erklärbar. Verglichen mit Herzgesunden fanden Doehner *et al.* erhöhte Plasmaleptinwerte sowohl bei Herzinsuffizienzpatienten mit als auch ohne kardiale Kachexie (Doehner *et al.*, 2001). Kachektische Patienten hatten gegenüber den normgewichtigen Patienten jedoch niedrigere Leptinwerte. Auch eine neuere Studie weist darauf hin, dass bei Herzinsuffizienzpatienten mit bereits ausgeprägter kardialer Kachexie die Plasmaleptinspiegel (Paulo Araujo *et al.*, 2009) eher niedriger liegen als bei normgewichtigen Patienten, so dass Leptin zumindest im fortgeschrittenen Stadium der kardialen Kachexie, wenn nur noch geringe leptinproduzierende Fettgewebsdepots existieren, keine weiteren gewichtsverringenden Auswirkungen mehr haben dürfte (Doehner *et al.*, 2001).

Eine chronische Herzinsuffizienz ist daneben auch häufig mit einer Hyperinsulinämie und Insulinresistenz vergesellschaftet (Swan *et al.*, 1997). Chronisch erhöhte Insulinspiegel sind für ihre stimulierende Wirkung auf die Leptinsekretion bekannt (Fruhbeck *et al.*, 1998). Die hier nachgewiesene Steigerung der Leptin-Genexpression durch BNP-Gabe könnte die bei Herzinsuffizienz häufig zu beobachtende Insulinresistenz mitbegründen, da Leptin zumindest an braunen Adipozyten der Maus zelluläre Insulinresistenz zu induzieren vermag (Kraus *et al.*, 2002). Es könnte sich hier also um einen Verstärkungsmechanismus im Sinne eines *circulus vitiosus* handeln. Weitere Untersuchungen bezüglich der Klärung eines kausalen Zusammenhangs erscheinen jedoch notwendig. Die Frage nach einer generellen Beeinflussbarkeit der zellulären Insulinsensitivität brauner Adipozyten durch BNP wird im weiteren Verlauf erörtert.

An humanen weißen Adipozyten aus subkutanem Fettgewebe wurde nach Stimulation mit ANP kürzlich ein hemmender Effekt auf die Freisetzung von Leptin beobachtet (Fain *et*

*al.*, 2003; Moro *et al.*, 2007). Die Hemmung der Leptinfreisetzung scheint dabei zwingend an den lipolytischen Effekt von ANP gebunden zu sein. Ob auch die Genexpression von Leptin in Abhängigkeit von Lipolyse in den Fettzellen gehemmt wird, wurde in den genannten Studien nicht untersucht. An Nagetieradipozyten konnte im Gegensatz zu Human- oder Primatenadipozyten bislang keine nennenswerte durch Natriuretische Peptide induzierte Lipolyse festgestellt werden (Sengenès *et al.*, 2002). Dies wurde hauptsächlich auf ein geringeres Vorkommen des aktiven Rezeptors NPR-A an Nagetierfettzellen im Verhältnis zum sogenannten Clearance-Rezeptor NPR-C zurückgeführt. Trotzdem kann nach Stimulation dieser Fettzellen eine Zunahme des *second messengers* cGMP gemessen werden (Jeandel *et al.*, 1989), welcher in der folgenden Signaltransduktionskaskade zur Lipolyse führen müsste. Erklärbar wird das Ausbleiben der Lipolyse an Nagetieradipozyten durch das Fehlen einer speziellen cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG), welche für die Vermittlung der lipolytischen Funktion der Natriuretischen Peptide durch cGMP essentiell zu sein scheint (Fain *et al.*, 2003). Eine jüngst veröffentlichte Studie widerspricht dieser These, da dort neben gesteigerten cGMP-Leveln auch eine Lipolyse durch Stimulation von Rattenadipozyten mit ANP hervorgerufen werden konnte (Nishikimi *et al.*, 2009). Wie bereits erwähnt, wurde in der genannten Studie auch eine Steigerung der Leptin-Genexpression festgestellt. Zur Klärung der offenbaren Diskrepanz einer durch Natriuretische Peptide gesteigerten Leptin-Genexpression und verminderten Leptinsekretion bedarf es weiterer Studien. Daneben gilt es zu bedenken, dass eine gesteigerte Leptin-Genexpression nicht automatisch mit einer erhöhten Leptinsekretion einhergehen muss, da über die relativen Halbwertszeiten und Translationseffizienz der Leptin-mRNA wenig bekannt ist.

#### **4.2.2 BNP beeinflusst die Genexpression von Adiponectin nicht**

Adiponectin gilt als ein kardiovaskulär protektiv wirkendes Adipokin. Bei adipösen Menschen und Mäusen findet sich trotz erhöhter Körperfettmasse eine als genetische Dysregulation verstandene deutlich verminderte Genexpression von Adiponectin (Hu *et al.*, 1996). Der daraus resultierende fehlende kardiovaskuläre Schutz deutete sich bereits durch eine verstärkte Intimaproliferation nach experimenteller Gefäßschädigung adiponectin-defizienter Mäuse an (Kubota *et al.*, 2002). Tatsächlich steigern niedrige Plasmawerte für Adiponectin das Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden (Pischon *et al.*, 2004). Eine weitere Wirkung von Adiponectin betrifft die Energiehomöostase. Im Tiermodell verringert die periphere Gabe von Adiponectin die viszerale Fettmasse und

behindert eine Gewichtszunahme (Masaki *et al.*, 2003) bzw. führt zu Gewichtsverlust (Fruebis *et al.*, 2001). In zwei aktuellen Studien wurde eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Adiponectin-Plasmawerte, des Gewichtsverlusts bei schwerer Herzinsuffizienz und der Höhe der BNP-Plasmakonzentration *in vivo* nachgewiesen (McEntegart *et al.*, 2007; Paulo Araujo *et al.*, 2009). Erhöhte Adiponectinlevel werden daher trotz ihrer allgemein protektiven Eigenschaften inzwischen als unabhängige Risikomarker einer gesteigerten Mortalität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz angesehen (Tamura *et al.*, 2007). Es wird vermutet, dass BNP möglicherweise direkt die Adiponectinsekretion aus Fettgewebe fördern und so zur kardialen Kachexie beitragen könnte (McEntegart *et al.*, 2007).

*In vitro* konnte in dieser Arbeit jedoch kein signifikanter Effekt von BNP auf die Genexpression von Adiponectin in braunen Adipozyten festgestellt werden. Weitere Expressionsstudien mit BNP zur Stützung dieses Ergebnisses existieren bislang nicht. Im Einklang mit dem Ergebnis dieser Arbeit konnten bei einer *in vitro*-Studie an humanem subkutanen Fettgewebe bei Stimulation mit physiologischen ANP-Konzentrationen ebenfalls keine Auswirkungen auf Adiponectin festgestellt werden (Moro *et al.*, 2007). Da ANP und BNP weitestgehend die gleichen Rezeptoren in ähnlicher Affinität besetzen, ist davon auszugehen, dass BNP in diesem Fall ebenfalls keinen Effekt hervorrufen sollte. Hierbei muss einschränkend jedoch erwähnt werden, dass es sich in der genannten Studie um humanes weißes Fettgewebe handelte und die Proteinsekretion und nicht die Genexpression von Adiponectin untersucht wurde. Es müssten weitere Experimente unternommen werden, um die Frage einer möglichen Einflussnahme von BNP auf die Adiponectinsekretion bei braunen Adipozyten zu klären.

### **4.2.3 BNP steigert die Genexpression von MCP-1**

Die Hypertrophie der Fettzellen bei Adipositas führt über eine metabolische und endokrine Dysregulation im Fettgewebe mit gesteigerter Freisetzung von u.a. FFA und proinflammatorischen Zytokinen zu einem entzündlichen Zustand, welcher für die adipositas-assoziierte Morbidität verantwortlich sein soll. Die Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$  und IL-6 entstammen dabei größtenteils Makrophagen, die aus Monozyten hervorgegangen sind und bei Adipositas in gesteigerter Anzahl im Fettgewebe vorkommen (Weisberg *et al.*, 2003). Man nimmt an, dass die Migration von Monozyten ins Fettgewebe durch das Chemokin MCP-1 vermittelt wird. Dieses spielt auch bei der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle. Da auch Fettzellen die Fähigkeit besitzen, MCP-1 zu

sezernieren (Gerhardt *et al.*, 2001), kann bei vergrößerten Fettgewebsdepots eine vermehrte Freisetzung dieses proinflammatorischen Chemokins in die Blutbahn erfolgen und dort die Bildung arteriosklerotischer Plaques gefördert werden (Yla-Herttuala *et al.*, 1991; Christiansen *et al.*, 2005). MCP-1 ist offenbar auch an der Entstehung von Insulinresistenz in Muskulatur und Fettgewebe beteiligt (Sartipy und Loskutoff, 2003). So wird die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in weißen Fettzellen durch die Inkubation mit MCP-1 nachhaltig gestört. Das MCP-1-Gen hingegen wird bei allgemeiner Insulinresistenz mit systemischer Hyperinsulinämie weiterhin durch Insulin hochreguliert, so dass sich MCP-1 und Insulinresistenz im Sinne eines *circulus vitiosus* gegenseitig verstärken können (Sartipy und Loskutoff, 2003).

Die Invasion des Fettgewebes mit Makrophagen weist auf das neue Verständnis der Adipositas als Ursprung eines systemisch-entzündlichen Gesamtzustandes hin. Welche Signale beeinflussen jedoch diese Entwicklung?

In der Literatur finden sich Hinweise auf immunmodulatorische Wirkungen der kardialen Natriuretischen Peptide ANP und BNP. Am Herzen von Nagetieren wirken ANP und BNP über ihren Rezeptor NPR-A offenbar antiinflammatorisch, denn die Ausschaltung des NPR-A-Gens bei Mäusen führt zu einer deutlichen Erhöhung der kardialen Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 (Vellaichamy *et al.*, 2007). An humanen subkutanen Fettgewebsproben führen physiologische ANP-Konzentrationen zu einer verminderten Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-6 (Moro *et al.*, 2007). Für BNP konnte an Makrophagen der Nachweis einer Modulation der Produktion diverser Entzündungsmediatoren geführt werden (Chiurchiu *et al.*, 2008). Ebenfalls an Makrophagen zeigte ANP eine direkte hemmende Wirkung auf die Sekretion von MCP-1 (Moro *et al.*, 2007). Im Hinblick auf die Beteiligung dieses Entzündungsmediators an der Pathogenese der Arteriosklerose weiß man, dass ANP und BNP sowie entsprechende Rezeptoren auch an arteriosklerotischen Läsionen in humanen Koronararterien exprimiert werden. Man vermutet dort ein autokrin bzw. parakrin wirkendes Natriuretisches Peptidsystem, welches in die Pathobiologie der intimalen Plaqueformation und des vaskulären *Remodelings* involviert ist und dort eine schützende Funktion innehat (Casco *et al.*, 2002). Durch Hemmung der neutralen Endopeptidase, eines Enzyms, das in geringem Umfang auch Natriuretische Peptide abbaut, konnte in einer anderen Studie eine Proliferationshemmung der glatten Gefäßmuskulatur durch BNP, sowie eine verminderte Bildung arteriosklerotischer Gefäßplaques nachgewiesen werden (Schirger *et al.*, 2000). BNP besitzt also offenbar eine generell vasoprotektive Wirkung. Es ist denkbar, dass BNP als

kardiales Natriuretisches Peptid die Genexpression chemokiner Botenstoffe wie MCP-1 auch in Fettzellen senkt und so seine schützende Funktion ausübt. Für weißes oder braunes Fettgewebe existierten diesbezüglich bisher allerdings keine Studien.

In dieser Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass BNP an braunen Adipozyten möglicherweise eine proinflammatorische Wirkung entfalten kann. So wurde die Genexpression von MCP-1 in braunen Adipozyten durch BNP hochsignifikant um 60 % hochreguliert. In der Literatur finden sich bis auf eine Studie, in der eine Stimulation der Neutrophilenmigration durch ANP gezeigt werden konnte (Elferink und De Koster, 1995) derzeit keine weiteren direkten Hinweise auf eine proinflammatorische Wirkung von BNP oder ANP. Bisher wurden fast ausschließlich die oben beschriebenen antiinflammatorischen und vasoprotektiven Wirkungen der Natriuretischen Peptide festgestellt. Allenfalls für supraphysiologische Konzentrationen an ANP konnten negative vaskuläre Effekte nachgewiesen werden, die möglicherweise auch auf eine entzündliche Ursache zurückzuführen sind. Wo physiologische ANP-Konzentrationen nämlich die endotheliale Regeneration fördern, hemmen höhere Konzentrationen die Regenerationsfähigkeit des Endothels wiederum (Rubattu *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit durch BNP hervorgerufene Steigerung der Genexpression von MCP-1 in braunen Adipozyten zeigt also erstmals, dass ein Natriuretisches Peptid auch proinflammatorisch wirksam werden könnte. Bei entsprechender Translationseffizienz ist anzunehmen, dass BNP z. B. fähig ist, die Einwanderung von Monozyten ins Fettgewebe zu bewirken und so einen inflammatorischen Stimulus setzen kann. Systemische proinflammatorische und destruktive Effekte wären ebenfalls denkbar. Diese Überlegung gewinnt besonders in Anbetracht neuerer Daten zur Anwendungssicherheit des rekombinanten humanen BNP-Derivates *Nesiritide* (Natreacor®) Bedeutung, da es nach Gabe dieses Medikamentes bei Herzinsuffizienzpatienten offenbar zu vermehrten Todesfällen im Vergleich mit anderen Standardtherapien gekommen ist (SciosInc., 2009). Durch eine Stimulation der MCP-1-Genexpression ist BNP möglicherweise auch in der Lage, Insulinresistenz an Adipozyten zu initiieren. Dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit durch Glukose-Aufnahme-Experimente untersucht und wird im weiteren Verlauf diskutiert.

#### **4.2.4 BNP steigert die Genexpression von ATRAP**

Eine Hauptfunktion des Kardialen Natriuretischen Peptidsystems (KNPS) ist die Regulation von Blutvolumen und peripherem Gefäßwiderstand. Auch beim dazu antagonistisch wirkenden systemischen Renin-Angiotensin-System (RAS) besteht die

Funktion primär in der Regulation des Plasmavolumens und des damit verbundenen systemischen Blutdrucks sowie in der Sicherung der Elektrolythomöostase des menschlichen Körpers (Silbernagl und Despopoulos, 1991).

Neben dem systemischen RAS existieren offenbar bestimmten Organen zugehörige lokale RAS. Störungen in der Physiologie lokaler RAS werden mit pathologischen Organveränderungen wie z.B. hypertrophen Wachstumsreizen am Herzen in Verbindung gebracht (Mazzolai *et al.*, 1998). Auch Fettgewebe scheint ein solches lokales RAS zu besitzen, da Adipozyten differenzierungsabhängig sowohl Angiotensinogen exprimieren als auch Angiotensin II generieren können und die entsprechenden Angiotensin II-Rezeptoren (AT<sub>1</sub>-Rezeptor und AT<sub>2</sub>-Rezeptor) besitzen (Engeli *et al.*, 2000; Cassis *et al.*, 2008). Das die Funktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors modulierende ATRAP wird von Adipozyten ebenfalls exprimiert (Westphal *et al.*, 2008). ATRAP ist ein noch nicht sehr lange bekanntes transmembranöses Molekül, welches eine Internalisierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors bewirkt und als negativer Regulator von Angiotensin II gilt (Daviet *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2000).

Angiotensin II entsteht enzymatisch mit Hilfe von Renin und des *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) aus Angiotensinogen und spielt eine entscheidende Rolle im RAS (Silbernagl und Despopoulos, 1991). Es stimuliert systemisch die Ausschüttung von Aldosteron aus den Nebennieren, wirkt vasokonstriktorisch und gilt als Wachstumsfaktor für eine Vielzahl von Geweben und Zellen. Angiotensin II stimuliert über den Angiotensinrezeptor AT<sub>1</sub> auch die Proliferation und Differenzierung von Adipozyten und hemmt die Lipolyse (Sarzani *et al.*, 2008a). Möglicherweise ist adipozytäres Angiotensin II auf diese Weise in der Lage, im Falle von Übergewicht endo- bzw. autokrin eine weitere Zunahme der Körperfettmasse zu fördern und einer Fettreduktion entgegenzuwirken. Seine genauen Wirkungen hinsichtlich einer Beteiligung an der Körpergewichtsregulation sind jedoch noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen (Engeli *et al.*, 2000; Sarzani *et al.*, 2008b).

Kardiale Natriuretische Peptide wie BNP oder ANP hemmen die genannten Wirkungen von Angiotensin II. So konnten Sarzani *et al.* vor kurzem zeigen, dass ANP das Wachstum humaner viszeraler Adipozyten *in vitro* signifikant hemmen kann, während Angiotensin II als potenter Wachstumsfaktor wirkte (Sarzani *et al.*, 2008a). Auch auf systemischer Ebene ist das KNPS für seine hemmende Wirkung auf das RAS bekannt. Richards *et al.* fanden bereits 1988, dass physiologische Konzentrationen von ANP die Plasmakonzentrationen von Renin und Aldosteron senken (Richards *et al.*, 1988). In den Nebennieren

hemmt ANP über den NPR-A direkt die Produktion von Aldosteron (Potter *et al.*, 2006). Außerdem sind Natriuretische Peptide in der Lage, die Wirkung von Angiotensin II und Aldosteron an deren Zielgeweben zu antagonisieren (Sarzani *et al.*, 2008b). Genaue Vorstellungen zur zellulären Wirkungsvermittlung an Adipozyten sind in der aktuellen Literatur bislang nicht beschrieben worden. Es wurde in dieser Arbeit daher die Hypothese untersucht, ob BNP seine hemmende Wirkung auf das RAS über die Stimulation von ATRAP erzielen könnte.

Es hat sich gezeigt, dass BNP die Genexpression von ATRAP in braunen Adipozyten tatsächlich signifikant steigern kann. Da bislang noch keine Daten zu einer Beeinflussung von ATRAP durch Natriuretische Peptide veröffentlicht wurden, ist dies der erste Nachweis einer Modulation der ATRAP-Genexpression durch kardiale Natriuretische Peptide überhaupt. Das Ergebnis steht im Einklang mit der zu erwartenden Hemmfunktion kardialer Natriuretischer Peptide auf das RAS und bietet bei entsprechender Translationseffizienz ein neues Erklärungsmodell zur genauen zellulären Vermittlung dieses hemmenden Effektes auch an Adipozyten.

### **4.3 Interaktionen von BNP mit Signalmolekülen der Insulinsignalkaskade**

BNP vermittelt seine physiologischen Wirkungen über einen membranständigen Guanylatcyklasezeptor, nach dessen Aktivierung ein klassischer intrazellulärer *second messenger*, das cGMP, gebildet wird. Dieses wiederum bindet an cGMP-bindende Proteine, von denen aktuell drei verschiedene bekannt sind: cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG), cGMP-bindende Phosphodiesterasen (PDE) und cGMP-abhängige Ionenkanäle. Am besten untersucht ist die Signalweiterleitung über PKG. Die Aktivierung einer spezifischen PKG bewirkt beispielsweise den lipolytischen Effekt von ANP.

Interaktionen der NP-Signalweiterleitung mit der Insulinsignalkaskade sind bislang weitestgehend unerforscht. Dass beide Signalwege miteinander interagieren können, zeigt eine Untersuchung von Bergandi *et al.* aus dem Jahr 2003: In Kulturen humaner glatter Gefäßmuskelzellen besitzt Insulin *in vitro* die Fähigkeit, über einen cGMP- und PKG-abhängigen Signalweg die zelluläre Glukoseaufnahme zu stimulieren (Bergandi *et al.*, 2003). Möglicherweise existieren ähnliche Verbindungen auch im Fettgewebe. Natriuretische Peptide könnten dann modulierend auf Insulinsignalwege einwirken, diese fördern oder hemmen. Störungen der Insulinsignalkaskade in Fettgewebe oder Muskulatur können aber ursächlich für die Entstehung zellulärer Insulinresistenz bei Adipositas sein

(Pessin und Saltiel, 2000; Saltiel und Kahn, 2001). Um Interaktionen zu überprüfen, wurden deshalb insgesamt vier unterschiedliche Schlüssel-moleküle der Insulinsignalkaskade auf ihre Aktivierung oder Suppression durch BNP hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass BNP an braunen Fettzellen eine Modulation einiger wichtiger Signalmoleküle der Insulinsignalkaskade bewirkt.

### **4.3.1 BNP stimuliert die MAP-Kinasen p38 und p44/42**

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) dienen als Signalübermittler von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen und fördern u.a. die Zellproliferation und -differenzierung durch Steuerung der Gentranskription (Seeger und Krebs, 1995).

Die p38 MAPK wird durch verschiedene Stressfaktoren aktiviert und daher auch als Stresskinase (*stress-activated protein kinase, SAPK*) bezeichnet (Zarubin und Han, 2005). Die p44/p42 MAPK (auch ERK 1/2 genannt) wird durch Insulin und eine Vielzahl anderer Wachstumsfaktoren aktiviert. Durch Interaktion mit dem PI3-Kinase-Signalweg können Änderungen der p44/p42 MAPK-Aktivität metabolische Zellfunktionen wie den Glukose- und Lipidmetabolismus beeinflussen.

In dieser Arbeit konnten direkte Effekte von BNP sowohl auf die p38-MAPK als auch auf die p44/42-MAPK nachgewiesen werden. Es wurde ein kontinuierlicher, zeitabhängiger und signifikanter Anstieg der p38-MAPK-Phosphorylierung festgestellt. Die p44/p42 MAPK wurde durch Stimulation mit BNP ebenfalls akut zeit- und dosisabhängig aktiviert. In der höchsten eingesetzten BNP-Dosierung wurde eine maximale und hochsignifikante Steigerung um mehr als das fünffache gegenüber des Ausgangswertes beobachtet.

Komalavilas *et al.* beschrieben 1999 in ihrer Studie an glatten Gefäßmuskelzellen bereits eine Aktivierung von MAPK über einen cGMP- und PKG-abhängigen Signalweg (Komalavilas *et al.*, 1999). Obwohl es sich in der genannten Studie um ein anderes Zellmodell und primär den Stickoxid-(NO-)Signalweg handelt, werden ähnliche Signaltransduktionsstudien in der Literatur aufgrund der gleichen Signalmoleküle wiederholt mit der Signalvermittlung Natriuretischer Peptide in Verbindung gebracht und zeigen mögliche Interaktionswege der verschiedenen Substanzen auf (Sosa *et al.*, 2007).

Die starke Steigerung der MAPK-Aktivität durch Stimulation der Adipozyten mit BNP kann in jedem Falle als Indiz einer ausgeprägten transkriptionsfördernden Wirkung dieses Natriuretischen Peptids interpretiert werden. Das Ergebnis passt zu der gezeigten Steigerung der Genexpression von Leptin und MCP-1 und unterstreicht die erst seit

kurzem gewonnene Erkenntnis, dass Natriuretische Peptide wichtige Fettgewebefunktionen modulieren können.

### 4.3.2 BNP stimuliert die Proteinkinase B (PKB/AKT)

Die Proteinkinase B (PKB = AKT) ist ein wichtiges Element der Insulinsignalkaskade. Nach der Rezeptorbindung von Insulin mit Aktivierung von Insulinrezeptorsubstraten und Bildung von Inositoltriphosphat durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) wird AKT innerhalb der Insulinsignalkaskade vergleichsweise proximal aktiviert. Es gilt als ein Schlüsselement der insulinvermittelten Glukoseaufnahme (Hernandez *et al.*, 2001), wobei seine Rolle dabei noch nicht abschließend geklärt ist (Saltiel und Kahn, 2001). In seiner phosphorylierten und damit aktivierten Form soll es die Aufnahme von Glukose in das Zellinnere durch Translokation des Transporters GLUT4 aus zytosolischen Vesikeln in die Zellmembran fördern. Durch das Vorkommen verschiedener Isoformen von AKT lassen sich auch andere Funktionen dieses Moleküls erklären (Bae *et al.*, 2003). So stimuliert es u.a. die Zellproliferation und hemmt die Apoptose, wodurch ihm auch eine wichtige Funktion in der Onkogenese gewisser maligner Tumore zugeschrieben wird (Lawlor und Alessi, 2001).

BNP aktiviert AKT in adulten braunen Adipozyten bereits in sehr niedrigen Konzentrationen akut. Es könnte dadurch die Apoptose von Adipozyten hemmen. Dieses Ergebnis geht konform mit den Daten aus einer Studie von Kato *et al.*, in welcher ANP in Kardiomyozyten über einen cGMP-abhängigen Signalweg zu einer Aktivierung und nukleären Akkumulation von AKT führt und auf diese Weise vermutlich antiapoptotisch wirksam werden kann (Kato *et al.*, 2005). Auch eine weitere Studie konnte an Rattenlebern *in vivo* eine antiapoptotische Wirkung von ANP über Aktivierung des PI-3-Kinase-Signalwegs mit nachfolgender Aktivierung von AKT nachweisen (Grutzner *et al.*, 2006). Für BNP konnte ebenfalls eine hemmende Eigenschaft auf die Apoptose gezeigt werden (Wu *et al.*, 2009).

Die Aktivierung von AKT könnte aber auch auf eine verbesserte zelluläre Glukoseaufnahme durch BNP hindeuten. An Fettzellen ist ein solcher Effekt bislang nicht bekannt. Parakrine Funktionen Natriuretischer Peptide an Kardiomyozyten sind hingegen schon beschrieben worden und beinhalten auch die Regulation der zellulären Glukoseaufnahme und des Glukosemetabolismus. So erhöht ANP an Kardiomyozyten unter Oxygenation und Hypoxie die Glukoseaufnahme (Kudoh *et al.*, 2002; Sosa *et al.*, 2007). Die Funktion des Signalmoleküls cGMP distal des Natriuretischen Peptidrezeptors

wird dabei kontrovers diskutiert. Manche Autoren vermuten eine hemmende Wirkung auf die Glukoseaufnahme, andere eine fördernde (Bergemann *et al.*, 2001; Vandecasteele *et al.*, 2001). Zumindest in einer Studie von Bergandi *et al.* führte gerade ein cGMP- und PKG-abhängiger Signalweg nach Stimulation von Gefäßmuskelzellen mit Insulin *in vitro* zu einer Zunahme der zellulären Glukoseaufnahme (Bergandi *et al.*, 2003). Gegensätzliche Effekte der cGMP werden mit den drei verschiedenen Zielmolekülen distal dieses *second messengers* erklärt, auf welche cGMP unter unterschiedlichen Umständen auch verschiedenen Auswirkungen haben kann (Lohmann *et al.*, 1991). Insgesamt ist die Wissenslage diesbezüglich jedoch noch unzureichend. Zu Fettzellen existieren in der aktuellen Literatur keine weiterführenden Daten.

Die hier gefundene Hochregulation von AKT zeigt jedoch, dass den Effekten Natriuretischer Peptide im Hinblick auf die Apoptose und den Glukosemetabolismus im Fettgewebe und darüber hinaus eine größere wissenschaftliche Aufmerksamkeit gebührt und weiterführende Studien unternommen werden sollten, um neue Wechselwirkungen des Natriuretischen Peptid-Signalwegs und des PI-3-Kinasesignalwegs aufzudecken.

#### **4.3.3 BNP aktiviert p70S6 nicht**

Das Molekül p70S6 ist ebenfalls ein wichtiges Signalelement innerhalb der Insulinsignalkaskade. Es gilt auch bei Fettzellen als ein Schlüsselregulator der Zellproliferation. Tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen mit einem *knock-out* für das p70S6-Gen haben zudem gezeigt, dass p70S6 wichtig für die Insulinsensitivität ist und das Fehlen von p70S6 vor diätinduzierter oder genetisch bedingter Adipositas schützt. Die Fettgewebsdepots solcher Mäuse waren gegenüber denjenigen der Wildtyp-Mäuse deutlich kleiner. Zusätzlich nahm weißes Fettgewebe der *knock-out*-Mäuse morphologisch und durch Expression von UCP-1 Eigenschaften braunen Fettgewebes an. Als Hintergrund wurde ein fehlender negativer Rückkopplungsmechanismus von p70S6 auf den Signalweg von Insulin und den *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) angenommen (Hansen und Kristiansen, 2006).

Die Stimulation brauner Adipozyten mit BNP zeigte in dieser Arbeit keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung von p70S6. In der Literatur wurde bislang nur ein hemmender Effekt von ANP auf die Proliferation von weißen Adipozyten und Präadipozyten aus humanem viszeralen Fettgewebe beschrieben (Sarzani *et al.*, 2008a). Daten zu BNP oder braunen Fettzellen existieren derzeit nicht. Die Beobachtungen in dieser Arbeit deuten aber darauf hin, dass BNP die Fettzellproliferation nicht beeinflusst

und - wie im Folgenden erörtert wird - auch keine Effekte auf die zelluläre Insulinsensitivität hat.

#### **4.4 BNP zeigt keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität brauner Adipozyten**

Zur Klärung der Frage, ob BNP die Insulinsensitivität an braunen Adipozyten verändern kann, wurde die insulininduzierte zelluläre Glukoseaufnahme nach BNP-Stimulation untersucht. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Prästimulation der Fettzellkulturen mit BNP in verschiedenen Konzentrationen über unterschiedliche Zeiträume keinen signifikanten Einfluss auf die insulininduzierte Glukoseaufnahme hat. Auch die oben beschriebene Aktivierung von AKT zeigt hier keine die Glukoseaufnahme fördernde Wirkung. AKT könnte allerdings einen von Insulin unabhängigen, direkten, fördernden Effekt auf die Glukoseaufnahme haben. Daneben werden möglicherweise auch andere Zellfunktionen, wie die Proteinbiosynthese, das Zellwachstum und die Regulation der Apoptose durch die Stimulation von AKT beeinflusst.

In der Literatur finden sich derzeit nur wenige Hinweise auf bzw. Daten zu Interaktionen von Natriuretischen Peptiden mit der zellulären Glukoseaufnahme. In humanen glatten Gefäßmuskelzellen besitzt Insulin *in vitro* die Fähigkeit, über einen cGMP- und PKG-abhängigen Signalweg die zelluläre Glukoseaufnahme zu stimulieren (Bergandi *et al.*, 2003). Da Natriuretische Peptide wie BNP ihre Wirkungen nach Rezeptorbindung hauptsächlich über eine cGMP- und PKG-abhängige Signalweiterleitung vermitteln, könnten sie durch Interferenz dieser Signalmoleküle möglicherweise ebenfalls Einfluss auf die zelluläre Glukoseaufnahme und Insulinsensitivität nehmen. Die Arbeitsgruppe um Sosa konnte vor kurzem tatsächlich zeigen, dass ANP die Glukoseaufnahme an Kardiomyozyten erhöhen kann (Sosa *et al.*, 2007). Das Signalmolekül cGMP distal des Natriuretischen Peptidrezeptors schien diesen Effekt jedoch wiederum zu hemmen. Der gängigen Meinung nach ist für die physiologischen Effekte der Natriuretischen Peptide wie z.B. die Natri- und Diurese oder auch die Lipolyse die Bildung von cGMP als *second messenger* jedoch essentiell. Weitere Untersuchungen müssten zur Klärung dieser Diskrepanz unternommen werden.

Festzuhalten ist in jedem Falle, dass BNP nach den Ergebnissen dieser Arbeit auf zellulärer Ebene offensichtlich nicht an Änderungen der adipozytären Insulinsensitivität beteiligt ist.

## 4.5 Funktionelle Konsequenzen der BNP-Effekte für die Physiologie der Fettzelle und des Gesamtorganismus

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das kardiale Natriuretische Peptid BNP direkte Effekte an braunen murinen Adipozytenkulturen hervorrufen kann. Diese beinhalten die Modulation wichtiger Adipokinexpressionsmuster und die Aktivierung von Schlüsselementen der Insulinsignalkaskade. Hinsichtlich der Fettzellendifferenzierung konnten keine relevanten Veränderungen durch BNP beobachtet werden. Auch andere Fettzellfunktionen wie die Thermogenese oder die Insulinsensitivität wurden durch BNP nicht beeinflusst. Die beschriebenen Wirkungen an unterschiedlichen adipozytären Signaltransduktionsmolekülen sprechen dennoch für vielfältige Beeinflussungsmöglichkeiten der Fettzellfunktion durch BNP. Der Nachweis aktivierender Effekte auf wichtige Elemente des Insulinsignalweges weist auf dessen Fähigkeit zur Interferenz mit dieser Signalkaskade hin und könnte neben der Lipolyse bedeutend für weitere Komponenten des Fettzellmetabolismus und gesamten Energiestoffwechsels sein.

Die dargestellten Effekte wurden vermutlich durch eine direkte rezeptorvermittelte Signalweiterleitung hervorgerufen. In der Tat sind Fettzellen von Säugetieren und Nagern für ihren Besitz mit Natriuretischen Peptidrezeptoren schon länger bekannt (Jeandel *et al.*, 1989; Sarzani *et al.*, 1996). Untersuchungen in der jüngeren Vergangenheit hatten jedoch gezeigt, dass Nagerfettzellen quantitativ mehr sogenannte *Clearance*-Rezeptoren (NPR-C) als Wirkungsrezeptoren (NPR-A und -B) besitzen, während an der Zelloberfläche von Primatenadipozyten die genau entgegengesetzte Rezeptorkonstellation zu finden ist. Auf diese unterschiedliche Rezeptorverteilung zwischen den Spezies wurde die Effektdifferenz z.B. hinsichtlich der durch Natriuretische Peptide induzierbaren Lipolyse zurückgeführt (Sengenès *et al.*, 2002). Gleichwohl wird durch NP-Stimulation an Nageradipozyten der *second messenger* cGMP gebildet, wenn auch in geringerem Maße als bei Primaten. Auch aufgrund einer fehlenden, für die Weiterleitung des Signals bedeutsamen Proteinkinase (PKG) scheint dies für eine effektive Lipolyse bei Nagern nicht auszureichen, wenngleich eine aktuelle Publikation zu einem abweichenden Ergebnis kommt (Nishikimi *et al.*, 2009). Andere Effekte sind jedoch sehr wohl denkbar (Jeandel *et al.*, 1989). Adipozyten stellen daher auch im Nagermodell ein Zielgewebe für Natriuretische Peptide dar, deren physiologische Funktionen dort bislang weitestgehend unerforscht waren.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sprechen für eine generelle Stressreaktion der Fettzelle auf erhöhte BNP-Konzentrationen, welche v.a. im Rahmen akuter oder chronischer Volumen- und Druckbelastung des Herzens mit vermehrter ventrikulärer

Dehnung und einer gesteigerten Herzarbeit auftreten. Die erhobenen Daten deuten in der Mehrheit auf eine sinnvolle physiologische Reaktion zur Bewältigung der kardialen Belastungssituation hin und unterstützen bereits bekannte Theorien über die Wirkungsweise des Kardialen Natriuretischen Peptidsystems. Dazu gehört auch die bereits bekannte lipolytische Wirkung kardialer Natriuretischer Peptide zur Bereitstellung notwendiger Energiereserven.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass BNP weder das adipozytäre Differenzierungsverhalten noch die Thermogenese beeinflusst. In der Literatur finden sich Daten, die von einem hemmenden Einfluss Natriuretischer Peptide auf die Proliferation von weißen Adipozyten berichten (Sarzani *et al.*, 2008a). Vor dem Hintergrund der BNP-Ausschüttung bei Herzbelastung erscheinen diese Beobachtungen sehr plausibel, da in einer solchen Situation die Bereitstellung von Energie für die gesteigerte Herzarbeit oberste Priorität hat und anabole Wachstumsvorgänge oder ein Energieverlust in Form von Thermogenese eher kontraproduktiv wären.

Bei drohender ventrikulärer Überfüllung senkt BNP bekanntermaßen die Aktivität des systemischen RAS und bewirkt so eine Minderung von Volumen und Blutdruck, was zur Entlastung des Herzens führt und der Optimierung der Herzfunktion dient. Die in dieser Arbeit erstmals nachgewiesene Steigerung der ATRAP-Genexpression durch BNP an Adipozyten bietet dabei möglicherweise ein neues Erklärungsmodell zur zellulären Wirkungsvermittlung eines solchen hemmenden Effektes.

Im Falle von Adipositas könnte diese physiologische Anpassungsreaktion des Organismus auf eine konkrete Herzbelastung allerdings gestört sein, da die Plasmalevel der kardialen Natriuretischen Peptide bei Adipositas unabhängig von Herzfunktion oder systemischem Blutdruck erniedrigt sind (Mehra *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Bei adipösen Individuen wird daher die Hemmung des systemischen RAS aufgrund der niedrigeren NP-Plasmalevel wahrscheinlich reduziert sein, wodurch es zu einem inadäquaten Aktivierungszustand des RAS mit erhöhten Blutvolumina, erhöhten peripheren Gefäßwiderständen und konsekutiv gesteigertem arteriellen Blutdruck kommen kann. In herzbelastenden Situationen wäre der Organismus dann nicht mehr in der Lage, adäquat zu reagieren, wodurch es schneller zu einer akuten kardialen Dekompensation kommen könnte.

Als pathogenetischer Hintergrund der reduzierten NP-Plasmalevel wird bei Adipositas u.a. ein gesteigerter Abbau der Natriuretischen Peptide durch *Clearance*-Rezeptoren im Fettgewebe vermutet (Sarzani *et al.*, 2008b). Diese Hypothese wird indirekt durch die Beobachtung gestützt, dass ein diätetischer Gewichtsverlust in der frühen Phase häufig von

einer verstärkten Diurese und Natriurese gekennzeichnet ist und zu einer Reduktion des systemischen Blutdrucks führt. Die Gewichtsreduktion könnte also wiederum mit einer erhöhten biologischen Aktivität Natriuretischer Peptide vergesellschaftet sein. Sarzani et al. wiesen mit einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1995 nach, dass Fasten im Fettgewebe von Ratten zu einer ausgeprägten Herunterregulation des *Clearance*-Rezeptors NPR-C führte, während der Wirkungsrezeptor NPR-A davon unbeeinträchtigt blieb und die cGMP-Plasmakonzentration gesteigert waren. Diese Daten erklären damit sowohl die verstärkte Di- als auch Natriurese als auch die Blutdrucksenkung bei Gewichtsabnahme (Sarzani *et al.*, 1995).

Durch die reduzierte biologische Aktivität des KNPS bei Adipositas sind vor dem Hintergrund lokaler Fettgewebs-RAS zusätzliche lokale Auswirkungen denkbar. An Kardiomyozyten hemmt ATRAP z.B. die bekannten ATII-induzierten hypertrophen Wachstumsreize (Tanaka *et al.*, 2005). Die fehlende Stimulation von ATRAP bei Adipositas könnte sich daher insbesondere in lokalen Proliferationsanreizen der Adipozyten oder auf systemischer Ebene auch an anderen Geweben wie dem Herzen äußern. Durch die weniger gehemmte Angiotensin II-Wirksamkeit wären aber auch parakrine Effekte beispielsweise auf die von Fettgewebskapseln umgebenen Gefäße möglich, da ATRAP in Gefäßen die Proliferation glatter Muskelzellen hemmen kann (Cui *et al.*, 2000). Adipositas könnte sich auch auf diese Weise negativ auf die Gefäß- und Herzgesundheit auswirken.

Durch Interaktionen mit Signalmolekülen der Insulinsignalkaskade ist BNP zudem offenbar in der Lage, Einfluss auf den Energiestoffwechsel und adipozytäre Wachstumsvorgänge zu nehmen. Während ein Schlüsselregulator der Zellproliferation und Insulinsensitivität, das Molekül p70S6, unbeeinflusst blieb, konnte in der vorliegenden Arbeit bei der Proteinkinase B (AKT) ein starker Aktivitätsanstieg durch BNP beobachtet werden. Durch die Beteiligung von AKT an der insulinvermittelten Glukoseaufnahme und an zellulären Wachstumsvorgängen, aber auch durch die Vermittlung antiapoptotischer Effekte untermauert dieses Ergebnis die Vorstellung einer zellschützenden Funktion von BNP. An einigen Organen wie dem Ventrikelmyokard und der Leber konnte diese protektive Funktion Natriuretischer Peptide bereits von verschiedenen Forschungsgruppen nachgewiesen werden (Kato *et al.*, 2005; Grutzner *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). So minimierte beispielsweise die experimentelle Vorbehandlung von Kaninchenherzen mit BNP den ischämiebedingten Reperfusionsschaden nach akutem Myokardinfarkt durch Hemmung der myokardialen Apoptose (Wu *et al.*, 2009). Andere Autoren beschrieben eine

ANP-vermittelte Steigerung der zellulären Glukoseaufnahme durch Kardiomyozyten (Sosa *et al.*, 2007). All diese Effekte erscheinen im Rahmen einer kardialen Belastungssituation physiologisch sinnvoll. Für Adipozyten ist diese Erkenntnis hingegen völlig neu und wirft Fragen hinsichtlich ihrer Bedeutung auf. BNP könnte demnach eine schützende Funktion auf das Fettgewebe ausüben, um die Energieversorgung des Herzens und Gesamtorganismus aus den Fettdepots bei Herzinsuffizienz zu gewährleisten.

Zumindest hinsichtlich der Glukoseaufnahme kann diese Hypothese jedoch nicht unterstützt werden, da in dieser Arbeit keine Beeinflussung der insulinvermittelten Glukoseaufnahme von Adipozyten durch BNP festgestellt werden konnte. Antiapoptotische Effekte zur Verhinderung eines Fettzellverlusts wären aber durchaus denkbar und neben einer durch die Natriopeptide gesteigerten Lipolyse physiologisch sinnvoll. Hier müssten weiterführende Untersuchungen unternommen werden.

In dieser Arbeit konnte des Weiteren eine ausgeprägte Stimulation der Aktivität der p38 und p44/42 MAP-Kinasen (MAPK) durch BNP nachgewiesen werden. Insbesondere die Aktivitätssteigerung der sogenannten Stresskinase p38 unterstreicht die Stressreaktion des Organismus bei erhöhten BNP-Plasmakonzentrationen. Funktionell könnte daraus durch Steuerung der Gentranskription eine verbesserte Anpassung des Körpers an eine kardiale Belastungssituation resultieren. Allerdings könnten beispielsweise bei chronischer Herzbelastung mit längerfristig erhöhten BNP-Plasmakonzentrationen auch negative Folgeerscheinungen durch eine verstärkte Genexpression anorexigener Adipokine wie Leptin oder inflammatorischer Adipokine wie MCP-1 auftreten.

Die Genexpression von Leptin wurde in dieser Arbeit durch BNP z.T. hochsignifikant gesteigert. Durch seine anorexigenen Eigenschaften könnte Leptin bei schwerer chronischer Herzinsuffizienz zur Entstehung der dabei häufiger auftretenden kardialen Kachexie beitragen. Dieser ungewollte Gewichtsverlust im Rahmen schwerer Herzinsuffizienz ist mit einer schlechteren Prognose und erhöhten Mortalität vergesellschaftet. Daneben treten bei diesen Patienten auch häufiger metabolische Komplikationen wie eine Hyperinsulinämie und Insulinresistenz auf, welche ebenfalls in Zusammenhang mit den erhöhten Leptin-Plasmaspiegeln stehen könnten.

Auch die Genexpression des chemokinen Botenstoffes MCP-1 wurde in dieser Arbeit durch BNP gesteigert. MCP-1 gilt als Locksubstanz für die Migration von Monozyten in Gewebsverbände. Dort können diese zu Makrophagen ausreifen und Entzündungsvorgänge induzieren und unterhalten. Adipositas wird inzwischen von vielen Experten als Ursprung eines systemisch-entzündlichen Geschehens angesehen, welches zu den damit assoziierten

Folgeerkrankungen prädestiniert. Der Nachweis einer proinflammatorischen Wirkung kardialer Natriuretischer Peptide an Fettgewebe erscheint vor dem Hintergrund der überwiegend für eine generell vaso- und kardioprotektive Funktion dieser Peptide sprechenden Daten zunächst paradox. Neuere Anwendungsbeobachtungen mit dem rekombinanten humanen BNP-Derivat *Nesiritide* (Natreacor®) zeigen jedoch, dass dieses kardiale Natriuretische Peptid mit größerer Vorsicht betrachtet werden sollte, da es nach Gabe des Medikamentes bei Herzinsuffizienzpatienten offenbar zu vermehrten Todesfällen im Vergleich mit anderen Standardtherapien gekommen ist (SciosInc., 2009). Die Ursachen konnten bislang nicht hinreichend charakterisiert werden, so dass auch eine mögliche proinflammatorische und damit destruktive Wirkungskomponente dieses Natriopeptids in Frage käme. Diese Überlegungen werden durch ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit indirekt bekräftigt: BNP zeigt keine Beeinflussung der Genexpression des kardiovaskulär protektiv wirksamen Adipokins Adiponectin. Auch durch ANP konnten in der Literatur keine Steigerungen von Adiponectin im Fettgewebe detektiert werden. Diese Beobachtungen können als Bestätigung einer proinflammatorischen Wirkungskomponente kardialer Natriuretischer Peptide interpretiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen eine neue differenziertere Sichtweise der Funktion des Kardialen Natriuretischen Peptidsystems. Anhand des eingesetzten BNP konnten verschiedenartige Effekte am Fettgewebe beobachtet werden, welche für eine Stressreaktion des Körpers auf herzbelastende Situationen sprechen. Diese könnten sich für den Gesamtorganismus sowohl protektiv als auch destruktiv auf lokaler und systemischer Ebene auswirken.

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz könnte die Dauer der Erkrankung und das persönliche Körpergewicht bei dieser neuen Betrachtungsweise eine entscheidende Rolle spielen. So führen erhöhte BNP-Plasmakonzentrationen in der akuten Herzbelastungssituation u.a. durch Steigerung der Natriuresis und Hemmung des systemischen RAS zu einer raschen kompensatorischen Senkung des Blutdrucks, wodurch das Herz entlastet und seine Funktion optimiert wird. Die Hemmung des lokalen RAS im Fettgewebe könnte durch parakrine Effekte auf die von Fettgewebskapseln umgebenen Gefäße systemisch zu dieser Entlastung beitragen. Durch Induktion der Lipolyse würde der gesteigerte Energiebedarf gedeckt. Gleichzeitig würde einem (Fett-) Zellverlust durch antiapoptotische Effekte entgegengewirkt. Auch unerwünschte Proliferationsanreize auf Kardiomyozyten oder Gefäßendothelzellen würden gehemmt. Bei übergewichtigen Individuen sind die BNP-Plasmakonzentrationen erniedrigt, so dass in dieser Situation eine schlechtere Adaptation

auf eine akute Herzinsuffizienz zu erwarten ist und es schneller zu einer kardialen Dekompensation kommen könnte. Des Weiteren wären Übergewichtige vor kardiovaskulären proliferativen und fibrotischen Umbauvorgängen weniger geschützt. Interessanterweise sprechen die Daten in der aktuellen Literatur allerdings für einen schützenden Einfluss von Übergewicht oder Adipositas auf die Mortalitätsraten sowohl bei akuter als auch chronischer Herzinsuffizienz. Man spricht vom „Adipositas-Paradoxon“, da Adipositas ein anerkannter wichtiger Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz ist, nach deren Manifestation aber paradoxerweise lebensverlängernd wirkt (Arena und Lavie, 2010). Patienten mit Metabolischem Syndrom entwickeln ebenfalls deutlich häufiger als andere eine Herzinsuffizienz, besitzen nach Manifestation der Herzinsuffizienz aber trotz ihres erhöhten Körpergewichts keine bessere sondern eine schlechtere Prognose verglichen mit Patienten ohne Metabolisches Syndrom (Tamariz *et al.*, 2009). Es muss also einen entscheidenden Unterschied zwischen allein adipösen Herzinsuffizienzpatienten und denjenigen mit Metabolischem Syndrom geben.

Es existieren verschiedene Hypothesen zur Erklärung „Adipositas-Paradoxons“, welche von größeren Energiereserven adipöser Patienten zur Bewältigung des gesteigerten Energiebedarfs bei Herzinsuffizienz über eine Elimination erhöhter schädlicher TNF- $\alpha$ -Konzentrationen durch das Fettgewebe bis hin zu Fehlern im Studiendesign der entsprechenden Untersuchungen reichen (Arena und Lavie, 2010). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit könnten diese Patienten auch von längerfristig geringeren BNP-Plasmawerten profitieren, da das Risiko der Entwicklung einer kardialen Kachexie mit der damit einhergehenden schlechten Prognose auch aufgrund niedrigerer Leptinwerte und einer geringeren Lipolyseinduktion vermutlich geringer ist. Auch durch BNP ausgelöste, MCP-1-vermittelte inflammatorische Stimuli am Fettgewebe dürften niedriger ausfallen.

Normal- oder untergewichtige Herzinsuffizienzpatienten hätten aufgrund ihrer primär höheren BNP-Plasmalevel und den damit verbundenen besseren Kompensationsmöglichkeiten in der akuten Herzbelastungssituation zunächst wahrscheinlich eine bessere Prognose. Die durch BNP hervorgerufene Stressreaktion wäre als physiologische Antwort auf die Herzbelastung zu verstehen. Die mittel- und längerfristige Prognose dieser Patienten würde nach den Ergebnissen dieser Arbeit allerdings von metabolischen Komplikationen wie einer Insulinresistenz durch die erhöhten Leptin- und unveränderten Adiponectinwerte, einer möglichen Inflammationskomponente durch gesteigerte MCP-1-Expression im Fettgewebe und der verstärkten Lipolyse mit der Entwicklung einer kardialen Kachexie bestimmt.

Das Kardiale Natriuretische Peptidsystem ist ein offenbar fein justiertes System, das eine optimale Herzfunktion durch verschiedene systemische und lokale Effekte an unterschiedlichsten Geweben unterstützt. Es kann dabei in Abhängigkeit von der jeweiligen körperlichen Konstitution eines Individuums wahrscheinlich sowohl protektiv als auch destruktiv wirksam werden. Durch seine in dieser Arbeit anhand der Beispielsubstanz BNP aufgeführten Wirkungen an Fettzellen ist es in der Lage, verschiedenartige Stoffwechselfvorgänge zu beeinflussen. Die daraus eventuell resultierende Bedeutung für den Gesamtorganismus gilt es in der Zukunft weiter zu erforschen, um durch neue Erkenntnisse bessere Therapiemöglichkeiten beispielsweise für Herzinsuffizienzpatienten mit und ohne Metabolischem Syndrom entwickeln zu können.

Aufgrund der dargestellten Beobachtungen konnten in dieser Dissertation folgende Fragen zur Wirkung von BNP auf thermogenetisch aktive braune Adipozyten geklärt werden (siehe Abb. 20):

1. Zeigt die Gabe von BNP Auswirkungen auf das Differenzierungsverhalten oder die thermogenetische Potenz brauner Adipozyten?

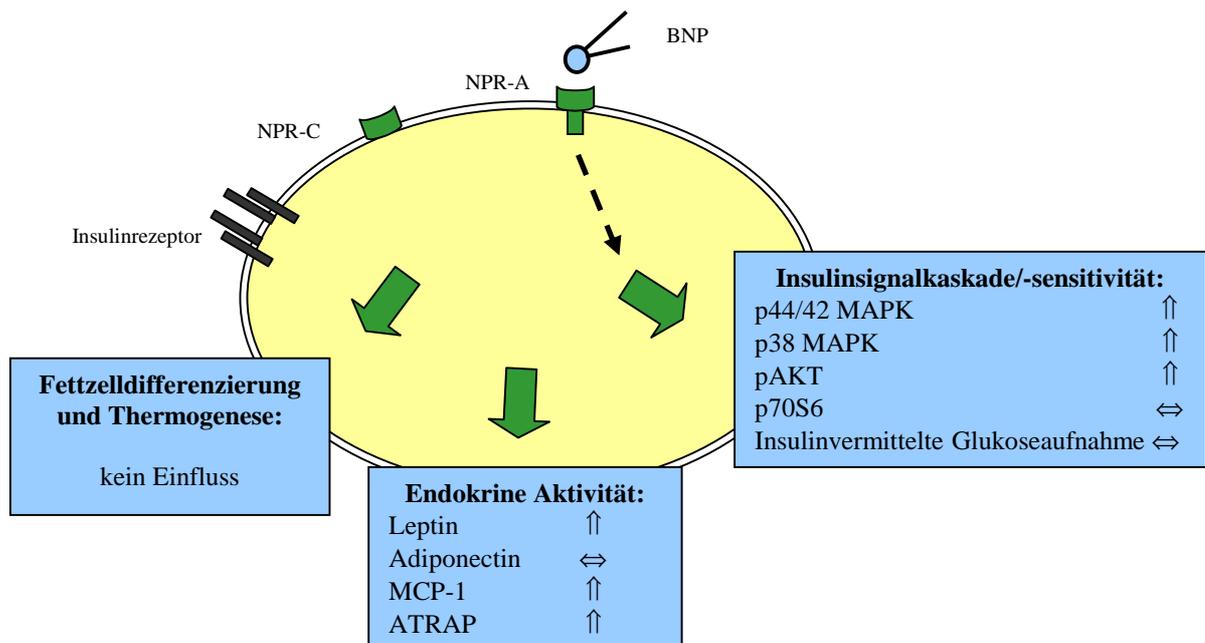
BNP beeinflusst weder die Differenzierung noch verursacht es eine Veränderung der Thermogeneseaktivität brauner Fettzellen.

2. Beeinflusst BNP die endokrine Adipozytenaktivität durch Veränderung der Genexpression wichtiger Adipokine?

BNP bewirkt eine Steigerung der Genexpression der Adipokine Leptin, MCP-1 und ATRAP. Die Genexpression von Adiponectin bleibt von BNP unbeeinflusst.

3. Werden Elemente der Insulinsignalkaskade durch BNP modifiziert und ist dies für die zelluläre Insulinsensitivität relevant?

BNP aktiviert akut einige wichtige Schlüsselemente der Insulinsignalkaskade. Dazu gehören AKT und die p38- sowie p44/42 MAPK. Der Schlüsselregulator der Zellproliferation, p70S6, wird durch BNP nicht beeinflusst. Auf die zelluläre Insulinsensitivität haben diese Veränderungen keine Auswirkungen.



**Abb. 20: Schematische Darstellung der Effekte von BNP am Adipozyten**

Steigerung ↑; kein Effekt ↔

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

Ein wesentliches gesundheitliches Problem unserer Gesellschaft besteht in der zunehmenden Inzidenz und Prävalenz der Adipositas, welche zu Diabetes mellitus und kardiovaskulären Folgeerkrankungen prädisponiert und mit der Pathogenese des Metabolischen Syndroms eng verknüpft ist. Die Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen ist für die Entwicklung effektiver neuer Behandlungsmethoden essentiell. Das Fettgewebe spielt neuesten Erkenntnissen zufolge eine entscheidende Rolle in der Regulation des Energie- und Glukosestoffwechsels. Dysregulationen der metabolischen und der erst in jüngerer Zeit entdeckten endokrinen Fettzellfunktion werden für die Entstehung adipositasassoziierter Erkrankungen verantwortlich gemacht. Das beim erwachsenen Menschen in geringerem Maße vorhandene braune Fettgewebe bietet aufgrund seiner Fähigkeit zur Energieabgabe durch Thermogenese und seiner medikamentös induzierbaren Expansion interessante therapeutische Optionen.

Das Kardiale Natriuretische Peptidsystem (KNPS) stellt eines der Hauptregulationssysteme des Volumenhaushalts und der Blutdrucksteuerung beim Menschen dar. Natriuretische Peptide beeinflussen endokrine adipozytäre Stoffwechselvorgänge und können an Fettzellen rezeptorvermittelt eine direkte lipolytische Wirkung entfalten. Fehlregulationen des KNPS werden pathophysiologisch mit der erhöhten Prävalenz arterieller Hypertonie und metabolischer Veränderungen bei Adipositas in Verbindung gebracht. Weitere Effekte dieser vergleichsweise jungen Stoffgruppe am Fettgewebe waren bislang allerdings weitestgehend unerforscht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine generelle Stressreaktion der Fettzelle auf erhöhte Konzentrationen des kardialen Natriuretischen Peptids BNP hin. Während bei Herzbelastung eher kontraproduktive Stoffwechselvorgänge wie die Adipozytendifferenzierung, die Thermogeneseinduktion und die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in die Fettzellen durch BNP unbeeinflusst bleiben, werden einige für das Zellüberleben und die Genexpression wichtige Schüsselemente und Stresskinasen der Insulinsignalkaskade akut aktiviert. Daneben greift BNP modulierend in die Adipokin-Genexpression ein, woraus sich neue Ansätze zur Bedeutung des KNPS sowohl auf lokaler als auch systemischer Ebene ergeben könnten. So werden Leptin und MCP-1 durch BNP hochreguliert, wodurch es in der Lage sein könnte, an der Entstehung der prognostisch ungünstigen kardialen Kachexie bei Herzinsuffizienz oder bei entzündlichen Vorgängen beteiligt zu sein. Das als protektiv geltende Adiponectin bleibt durch BNP hingegen

unbeeinflusst. Die reduzierten Plasmakonzentrationen der Kardialen Natriuretischen Peptide bei erhöhtem BMI dürften diese negativen Effekte bei Herzinsuffizienzpatienten weniger ins Gewicht fallen lassen, so dass sich hier möglicherweise ein neuer Ansatz zur Erklärung des „Adipositas-Paradoxons“ herauskristallisiert. Die in dieser Dissertation erstmals nachgewiesene Steigerung der Genexpression von ATRAP bietet zudem ein neues Erklärungsmodell zur direkten zellulären Vermittlung der bekannten hemmenden Wirkungen von BNP auf das Renin-Angiotensin-System.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass BNP neben seiner bekannten Lipolysewirkung weitere direkte Wirkungen an Fettzellen hervorrufen kann. Auf die Pathogenese des Metabolischen Syndroms dürfte dies aufgrund der geringeren Plasmakonzentrationen der Kardialen Natriuretischen Peptide bei einem erhöhten BMI jedoch kaum einen Einfluss haben. Die Mehrheit der erhobenen Daten untermauert dagegen bereits bekannte Theorien über die Wirkungsweise des Kardialen Natriuretischen Peptidsystems. Durch den Nachweis möglicher negativer Effekte beispielsweise durch Induktion entzündlicher Prozesse ergeben sich jedoch auch völlig neue Aspekte. Das KNPS stellt ein offenbar genau balanciertes System zur Optimierung der Herz- und Kreislauffunktion dar, welches unter gewissen konstitutionellen Umständen jedoch aus dem Gleichgewicht geraten und dann lokal oder systemisch auch negative Auswirkungen haben kann.

In zukünftigen Studien sollte dieser Ansatz einer differenzierteren Sichtweise zu Funktion und Bedeutung des Kardialen Natriuretischen Peptidsystems weiter untersucht werden, um durch neue Erkenntnisse bessere Therapiemöglichkeiten beispielsweise für Herzinsuffizienzpatienten mit und ohne Metabolischem Syndrom entwickeln zu können. Insbesondere beim therapeutischen Einsatz künstlich hergestellter Derivate von Natriuretischen Peptiden sollten diese Überlegungen schon heute mit berücksichtigt werden.

**6 LITERATURVERZEICHNIS**

1. **Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB:** Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733 (2001)
2. **Adipositas-Gesellschaft:** Deutsche Adipositas-Gesellschaft: Adipositasleitlinie 2007 (2007) <http://www.adipositas-gesellschaft.de/daten/Adipositas-Leitlinie-2007.pdf> (Tag des Zugriffs: 23.02. 2008)
3. **Anand-Srivastava MB, Sairam MR, Cantin M:** Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system. *J Biol Chem* 265:8566-8572 (1990)
4. **Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, Harrington D, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ:** Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349:1050-1053 (1997)
5. **Arena R, Lavie CJ:** The obesity paradox and outcome in heart failure: is excess bodyweight truly protective? *Future Cardiol* 6:1-6 (2010)
6. **Bae SS, Cho H, Mu J, Birnbaum MJ:** Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* 278:49530-49536 (2003)
7. **Bergandi L, Silvagno F, Russo I, Riganti C, Anfossi G, Aldieri E, Ghigo D, Trovati M, Bosia A:** Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2215-2221 (2003)
8. **Bergemann C, Loken C, Becker C, Graf B, Hamidizadeh M, Fischer Y:** Inhibition of glucose transport by cyclic GMP in cardiomyocytes. *Life Sci* 69:1391-1406 (2001)
9. **Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR:** A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-569 (1998)
10. **Buckley MG, Marcus NJ, Yacoub MH:** Cardiac peptide stability, aprotinin and room temperature: importance for assessing cardiac function in clinical practice. *Clin Sci (Lond)* 97:689-695 (1999)
11. **Cannon B, Nedergaard J:** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359 (2004)
12. **Casco VH, Veinot JP, Kuroski de Bold ML, Masters RG, Stevenson MM, de Bold AJ:** Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries. *J Histochem Cytochem* 50:799-809 (2002)
13. **Cassis LA, Police SB, Yiannikouris F, Thatcher SE:** Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 10:93-98 (2008)
14. **Chiurchiu V, Izzi V, D'Aquilio F, Carotenuto F, Di Nardo P, Baldini PM:** Brain Natriuretic Peptide (BNP) regulates the production of inflammatory mediators in human THP-1 macrophages. *Regul Pept* 148:26-32 (2008)
15. **Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM:** Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 29:146-150 (2005)
16. **Chudek J, Wiecek A:** Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep* 58 Suppl:81-88 (2006)

17. **Clement K, Vaisse C, Manning BS, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD:** Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* 333:352-354 (1995)
18. **Cohen D, Koh GY, Nikonova LN, Porter JG, Maack T:** Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. *J Biol Chem* 271:9863-9869 (1996)
19. **Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S:** The hormonal control of food intake. *Cell* 129:251-262 (2007)
20. **Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al.:** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295 (1996)
21. **Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Tamura K, Daviet L, Horiuchi M:** ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 279:938-941 (2000)
22. **Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, Griese DP, Horiuchi M, Dzau VJ:** Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem* 274:17058-17062 (1999)
23. **de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H:** A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28:89-94 (1981)
24. **Digby JE, Montague CT, Sewter CP, Sanders L, Wilkison WO, O'Rahilly S, Prins JB:** Thiazolidinedione exposure increases the expression of uncoupling protein 1 in cultured human preadipocytes. *Diabetes* 47:138-141 (1998)
25. **Doehner W, Pflaum CD, Rauchhaus M, Godsland IF, Egerer K, Cicoira M, Florea VG, Sharma R, Bolger AP, Coats AJ, Anker SD, Strasburger CJ:** Leptin, insulin sensitivity and growth hormone binding protein in chronic heart failure with and without cardiac cachexia. *Eur J Endocrinol* 145:727-735 (2001)
26. **Elferink JG, De Koster BM:** Atrial natriuretic factor stimulates migration by human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 288:335-340 (1995)
27. **Engeli S, Negrel R, Sharma AM:** Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35:1270-1277 (2000)
28. **Engeli S, Sharma AM:** The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension. *J Mol Med* 79:21-29 (2001)
29. **Fain JN, Kanu A, Bahouth SW, Cowan GS, Lloyd Hiler M:** Inhibition of leptin release by atrial natriuretic peptide (ANP) in human adipocytes. *Biochem Pharmacol* 65:1883-1888 (2003)
30. **Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S:** Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110:1093-1103 (2002)
31. **Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Paschke R:** Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 317:598-604 (2004)
32. **Felker GM, Petersen JW, Mark DB:** Natriuretic peptides in the diagnosis and management of heart failure. *Cmaj* 175:611-617 (2006)

33. **Fogelholm M, Valve R, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Hakkarainen V, Laakso M, Uusitupa M:** Additive effects of the mutations in the beta3-adrenergic receptor and uncoupling protein-1 genes on weight loss and weight maintenance in Finnish women. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4246-4250 (1998)
34. **Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB:** Years of life lost due to obesity. *Jama* 289:187-193 (2003)
35. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF:** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010 (2001)
36. **Fruhbeck G, Jebb SA, Prentice AM:** Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 18:399-419 (1998)
37. **Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML:** Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 105:271-278 (2000)
38. **Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD:** Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 175:81-92 (2001)
39. **Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL:** Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95:2195-2204 (1995)
40. **Grutzner U, Keller M, Bach M, Kiemer AK, Meissner H, Bilzer M, Zahler S, Gerbes AL, Vollmar AM:** PI 3-kinase pathway is responsible for antiapoptotic effects of atrial natriuretic peptide in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 12:1049-1055 (2006)
41. **Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U:** Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2276-2283 (2007)
42. **Guzik TJ, Mangalat D, Korbust R:** Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 57:505-528 (2006)
43. **Guzik TJ, Marvar PJ, Czesnikiewicz-Guzik M, Korbust R:** Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. *J Physiol Pharmacol* 58:591-610 (2007)
44. **Hansen JB, Kristiansen K:** Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 398:153-168 (2006)
45. **Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M:** Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett* 494:225-231 (2001)
46. **Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M:** Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 111:1399-1407 (2003)
47. **Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y:** Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-1599 (2000)
48. **Hu E, Liang P, Spiegelman BM:** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703 (1996)

49. **Ingelsson E, Arnlov J, Lind L, Sundstrom J:** Metabolic syndrome and risk for heart failure in middle-aged men. *Heart* 92:1409-1413 (2006)
50. **Isomaa B:** A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 73:2395-2411 (2003)
51. **Jeandel L, Okamura H, Belles-Isles M, Chabot JG, Dihl F, Morel G, Kelly PA, Heisler S:** Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 62:69-78 (1989)
52. **John SW, Krege JH, Oliver PM, Hagaman JR, Hodgins JB, Pang SC, Flynn TG, Smithies O:** Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 267:679-681 (1995)
53. **Junqueira LC, Carneiro J:** Fettgewebe. In: Junqueira LC, Carneiro J: Histologie. 4. Aufl., S. 172-179, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1996).
54. **Kahn BB, Flier JS:** Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481 (2000)
55. **Kato T, Muraski J, Chen Y, Tsujita Y, Wall J, Glembotski CC, Schaefer E, Beckerle M, Sussman MA:** Atrial natriuretic peptide promotes cardiomyocyte survival by cGMP-dependent nuclear accumulation of zyxin and Akt. *J Clin Invest* 115:2716-2730 (2005)
56. **Kershaw EE, Flier JS:** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556 (2004)
57. **Kistorp C, Raymond I, Pedersen F, Gustafsson F, Faber J, Hildebrandt P:** N-terminal pro-brain natriuretic peptide, C-reactive protein, and urinary albumin levels as predictors of mortality and cardiovascular events in older adults. *Jama* 293:1609-1616 (2005)
58. **Klein J, Fasshauer M, Benito M, Kahn CR:** Insulin and the beta3-adrenoceptor differentially regulate uncoupling protein-1 expression. *Molecular Endocrinology* 14:764-773 (2000)
59. **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)
60. **Koller KJ, Goeddel DV:** Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 86:1081-1088 (1992)
61. **Komalavilas P, Shah PK, Jo H, Lincoln TM:** Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274:34301-34309 (1999)
62. **Kraus D, Fasshauer M, Ott V, Meier B, Jost M, Klein HH, Klein J:** Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes. *J Endocrinol* 175:185-191 (2002)
63. **Kromeyer-Hausschild K, Wabitsch M:** Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ): Aktuelle Sicht der Prävalenz und Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland (2009) <http://www.a-g-a.de/Trends.doc> (Tag des Zugriffs: 22.10.2009)
64. **Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T:** Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866 (2002)
65. **Kudoh A, Katagai H, Takazawa T:** Atrial natriuretic peptide increases glucose uptake during hypoxia in cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:601-610 (2002)

66. **Lafontan M, Moro C, Sengenès C, Galitzky J, Crampes F, Berlan M:** An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides: the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2032-2042 (2005)
67. **Langin D:** Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: Strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* (2009)
68. **Lawlor MA, Alessi DR:** PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114:2903-2910 (2001)
69. **Lean ME, Han TS, Morrison CE:** Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *Bmj* 311:158-161 (1995)
70. **Leyva F, Anker SD, Egerer K, Stevenson JC, Kox WJ, Coats AJ:** Hyperleptinaemia in chronic heart failure. Relationships with insulin. *Eur Heart J* 19:1547-1551 (1998)
71. **Löffler G, Petrides PE:** Aminosäuren und Proteine. In: Biochemie und Pathobiochemie. S. 51-52, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (1997).
72. **Lohmann SM, Fischmeister R, Walter U:** Signal transduction by cGMP in heart. *Basic Res Cardiol* 86:503-514 (1991)
73. **Luchner A, Holmer S, Schunkert H, Riegger GA:** Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-proBNP für die Klinik. *Deutsches Ärzteblatt* 100:A3314-A3321 (2003)
74. **Masaki T, Chiba S, Yasuda T, Tsubone T, Kakuma T, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Yoshimatsu H:** Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes* 52:2266-2273 (2003)
75. **Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR, Pedrazzini T:** Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension* 31:1324-1330 (1998)
76. **McEntegart MB, Awede B, Petrie MC, Sattar N, Dunn FG, MacFarlane NG, McMurray JJ:** Increase in serum adiponectin concentration in patients with heart failure and cachexia: relationship with leptin, other cytokines, and B-type natriuretic peptide. *Eur Heart J* 28:829-835 (2007)
77. **Mehra MR, Uber PA, Park MH, Scott RL, Ventura HO, Harris BC, Frohlich ED:** Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 43:1590-1595 (2004)
78. **Michels P, Tarnow J:** [Natriuretic peptides: physiological, pathophysiological and clinical aspects]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 36:406-416 (2001)
79. **Molkentin JD:** A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest* 111:1275-1277 (2003)
80. **Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S:** Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903-908 (1997)
81. **Moro C, Galitzky J, Sengenès C, Crampes F, Lafontan M, Berlan M:** Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:984-992 (2004)
82. **Moro C, Klimcakova E, Lolmede K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, Bouloumie A, Galitzky J, Arner P, Langin D:** Atrial natriuretic peptide inhibits

- the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* 50:1038-1047 (2007)
83. **Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, et al.:** Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 87:1402-1412 (1991)
84. **Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K:** Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 96:1280-1287 (1995)
85. **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)
86. **Nishikimi T, Iemura-Inaba C, Akimoto K, Ishikawa K, Koshikawa S, Matsuoka H:** Stimulatory and Inhibitory regulation of lipolysis by the NPR-A/cGMP/PKG and NPR-C/G(i) pathways in rat cultured adipocytes. *Regul Pept* 153:56-63 (2009)
87. **NVS II:** Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel: Nationale Verzehrstudie II (2008)  
[http://www.bmely.de/clin\\_045/nn\\_1196770/SharedDocs/downloads/03-Ernaehrung/NVS2/NVS\\_Ergebnisbericht.html](http://www.bmely.de/clin_045/nn_1196770/SharedDocs/downloads/03-Ernaehrung/NVS2/NVS_Ergebnisbericht.html) (Tag des Zugriffs: 07.02.2008)
88. **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)
89. **Paulo Araujo J, Lourenco P, Rocha-Goncalves F, Ferreira A, Bettencourt P:** Adiponectin is increased in cardiac cachexia irrespective of body mass index. *Eur J Heart Fail* 11:567-572 (2009)
90. **Pessin JE, Saltiel AR:** Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:165-169 (2000)
91. **Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB:** Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama* 291:1730-1737 (2004)
92. **Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM:** Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27:47-72 (2006)
93. **Rademaker MT, Richards AM:** Cardiac natriuretic peptides for cardiac health. *Clin Sci (Lond)* 108:23-36 (2005)
94. **Richards AM, McDonald D, Fitzpatrick MA, Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Jans S, Grant S, Yandle T:** Atrial natriuretic hormone has biological effects in man at physiological plasma concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1134-1139 (1988)
95. **Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M:** Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens* 21:733-741 (2008)
96. **Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M:** High incidence of metabolically active brown adipose tissue in

- healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58:1526-1531 (2009)
97. **Saltiel AR, Kahn CR:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806 (2001)
98. **Sartipy P, Loskutoff DJ:** Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7265-7270 (2003)
99. **Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Paci VM, Espinosa E, Rappelli A:** Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *J Endocrinol Invest* 19:581-585 (1996)
100. **Sarzani R, Marcucci P, Salvi F, Bordicchia M, Espinosa E, Mucci L, Lorenzetti B, Minardi D, Muzzonigro G, Dessi-Fulgheri P, Rappelli A:** Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. *Int J Obes (Lond)* 32:259-267 (2008a)
101. **Sarzani R, Paci VM, Zingaretti CM, Pierleoni C, Cinti S, Cola G, Rappelli A, Dessi-Fulgheri P:** Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue. *J Hypertens* 13:1241-1246 (1995)
102. **Sarzani R, Salvi F, Dessi-Fulgheri P, Rappelli A:** Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J Hypertens* 26:831-843 (2008b)
103. **Schindler TH, Cardenas J, Prior JO, Facta AD, Kreissl MC, Zhang XL, Sayre J, Dahlbom M, Licinio J, Schelbert HR:** Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function. *J Am Coll Cardiol* 47:1188-1195 (2006)
104. **Schirger JA, Grantham JA, Kullo IJ, Jougasaki M, Wennberg PW, Chen HH, Lisy O, Miller V, Simari RD, Burnett JC, Jr.:** Vascular actions of brain natriuretic peptide: modulation by atherosclerosis and neutral endopeptidase inhibition. *J Am Coll Cardiol* 35:796-801 (2000)
105. **SciosInc.:** *Natreacor* (Nesiritide) (2009)  
<http://www.natreacor360.com/natreacor360/index.html> (Tag des Zugriffs: 11.11.2009)
106. **Seger R, Krebs EG:** The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9:726-735 (1995)
107. **Sengenés C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J:** Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *Faseb J* 14:1345-1351 (2000)
108. **Sengenés C, Bouloumie A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, Galitzky J:** Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278:48617-48626 (2003)
109. **Sengenés C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, Berlan M, Bouloumie A, Lafontan M, Galitzky J:** Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R257-265 (2002)
110. **Shibata R, Ouchi N, Murohara T:** Adiponectin and cardiovascular disease. *Circ J* 73:608-614 (2009)
111. **Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA:** Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 100:2858-2864 (1997)
112. **Silbernagl S, Despopoulos A:** Niere, Salz- und Wasserhaushalt. In: Taschenatlas der Physiologie. S. 152-153, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1991).
113. **Sosa V, Carbo R, Guarner V:** Participation of glucose transporters on atrial natriuretic peptide-induced glucose uptake by adult and neonatal cardiomyocytes under oxygenation and hypoxia. *Eur J Pharmacol* 568:83-88 (2007)

114. **Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H:** A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332:78-81 (1988)
115. **Swan JW, Anker SD, Walton C, Godsland IF, Clark AL, Leyva F, Stevenson JC, Coats AJ:** Insulin resistance in chronic heart failure: relation to severity and etiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 30:527-532 (1997)
116. **Tamariz L, Hassan B, Palacio A, Arcement L, Horswell R, Hebert K:** Metabolic syndrome increases mortality in heart failure. *Clin Cardiol* 32:327-331 (2009)
117. **Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M:** Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4239-4244 (2000)
118. **Tamura T, Furukawa Y, Taniguchi R, Sato Y, Ono K, Horiuchi H, Nakagawa Y, Kita T, Kimura T:** Serum adiponectin level as an independent predictor of mortality in patients with congestive heart failure. *Circ J* 71:623-630 (2007)
119. **Tanaka Y, Tamura K, Koide Y, Sakai M, Tsurumi Y, Noda Y, Umemura M, Ishigami T, Uchino K, Kimura K, Horiuchi M, Umemura S:** The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Lett* 579:1579-1586 (2005)
120. **Tiraby C, Langin D:** Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 14:439-441 (2003)
121. **van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ:** Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360:1500-1508 (2009)
122. **Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R:** Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* 533:329-340 (2001)
123. **Vellaichamy E, Kaur K, Pandey KN:** Enhanced activation of pro-inflammatory cytokines in mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Peptides* 28:893-899 (2007)
124. **Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P:** Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360:1518-1525 (2009)
125. **Vogeser M:** BNP-Bestimmung in der Routinediagnostik (2000) [http://www.w-klch.med.uni-muenchen.de/klch/Labor\\_aktuell/Labor\\_aktuell\\_1\\_00.html](http://www.w-klch.med.uni-muenchen.de/klch/Labor_aktuell/Labor_aktuell_1_00.html) (Tag des Zugriffs: 04.12.2002)
126. **Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PW, Vasan RS:** Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 109:594-600 (2004)
127. **Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF:** Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 143:293-311 (2000)
128. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.:** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808 (2003)
129. **Weiss R:** Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol* 157 Suppl 1:S39-45 (2007)
130. **Westphal S:** Metformin hemmt die Leptinsekretion in Fettzellen. Dissertation Lübeck, 2005

131. **Westphal S, Perwitz N, Iwen KA, Kraus D, Schick R, Fasshauer M, Klein J:** Expression of ATRAP in adipocytes and negative regulation by beta-adrenergic stimulation of JAK/STAT. *Horm Metab Res* 40:165-171 (2008)
132. **Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA:** Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935 (2001)
133. **WHO:** World Health Organization: Global Database on Body Mass Index (2006) <http://www.who.int/bmi/index.jsp> (Tag des Zugriffs: 23.02.2008)
134. **WHO:** World Health Organization: World Health Report 2004 (2004) [http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex\\_2\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf) (Tag des Zugriffs: 21.10.2009)
135. **Wu B, Jiang H, Lin R, Cui B, Wen H, Lu Z:** Pretreatment with B-type natriuretic peptide protects the heart from ischemia-reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis. *Tohoku J Exp Med* 219:107-114 (2009)
136. **Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM:** Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3815-3819 (2001)
137. **Yang X, Enerback S, Smith U:** Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res* 11:1182-1191 (2003)
138. **Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K:** Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 90:195-203 (1994)
139. **Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D:** Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5252-5256 (1991)
140. **Zarubin T, Han J:** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11-18 (2005)
141. **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)

## **7 DANKSAGUNG**

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein, bin ich sehr dankbar für die stets freundliche, geduldige und kompetente Betreuung dieser Arbeit, seine große Motivationsgabe in Zeiten missglückender Versuche und die Vergabe des anspruchsvollen Themas.

Herrn Prof. Dr. med. H. Lehnert danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Klinik abschließen zu dürfen. Herrn Prof. Dr. med. H. L. Fehm, dem ehemaligen Direktor der Medizinischen Klinik I, möchte ich dafür danken, diese Arbeit in seinem Hause begonnen haben zu können.

Britta Meier und Dr. rer. nat. Nina Perwitz danke ich für die gute Einarbeitung in die Methodik, sowie die zahlreichen Hilfestellungen bei den großen und kleinen Problemen des Laboralltags. Außerdem möchte ich mich bei Ihnen für die gute Laune und Unmengen an Glukoselieferanten bedanken, die so manchen langen Versuchstag „versüßt“ haben.

Meinen „Mit-Doktoranden“ Jessica Jäger, Özge Senyaman und Dr. med. Arne Schwartz, sowie Henning Sievert M.Sc. danke ich dafür, dass sie mir so oft im Labor Gesellschaft geleistet haben. Insbesondere Jessica bin ich zu großem Dank für die vielen Wochenenden verpflichtet, an denen sie sich meiner fettigen Freunde annahm und deren vorzeitigen Hungertod zu verhindern wusste.

Dr. med. J. Daniel S. Kraus bin ich für seine großzügige Hilfe bei allen Fragen zur Dissertation und bei den nicht selten auftretenden Computerproblemen dankbar.

Herrn Dr. med. Florian Stellmacher aus dem Institut für Pathologie danke ich für dessen Hilfe beim Erstellen der schönen Adipozytenfotographien.

Für ihre Freundschaft und Geduld möchte ich mich außerdem bei allen meinen Freunden bedanken.

Meiner Familie aber gebührt mein größter Dank. Durch ihre stetige Unterstützung wurde der erfolgreiche Abschluss meines Studiums und nun auch dieser Promotion erst ermöglicht. Vielen Dank für Euer Vertrauen!

Schließlich Rainer: Ich danke Dir für Deine Liebe, Deine Geduld, Deine Motivationskraft und Deinen Optimismus - und dafür, dass Du immer zu mir gehalten hast.

Und mein kleiner Nils Christian: Du hast meinem Leben einen ganz neuen, wunderbaren Sinn gegeben.

---

## **8 LEBENS LAUF**



### **PERSÖNLICHE DATEN**

Name: Nina Poll, geb. Christiansen  
Geburtsdatum: 10. Juli 1977  
Geburtsort: Flensburg  
Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Rainer M. Poll, ein Sohn  
Anschrift: Ringreiterweg 14  
23558 Lübeck  
Tel.: 0451-3995981  
mobil: 0179-2002351  
E-mail: n.poll@gmx.de  
Staatsangehörigkeit: deutsch und dänisch  
Eltern: Dipl. Ing. Andreas Stuhr Christiansen,  
Schiffbauingenieur  
Anneli Christiansen, geb. Schmidt, Zahnarzthelferin

### **SCHULABSCHLUSS**

16. Juni 1997 Abitur, Gymnasium Brake

### **STUDIUM**

Oktober 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
März - Juli 1998 Absolvieren verschiedener Praktika  
Ab Oktober 1998 Studium der Humanmedizin an der Universität zu  
Lübeck  
27. September 2000 Ärztliche Vorprüfung  
21. März 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
23. März 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
24. November 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
25. November 2005 Erteilung der Approbation

### **PROMOTION**

Seit August 2002 Experimentelle Arbeit in der Klinisch-  
Experimentellen Forschungseinrichtung der  
Universität zu Lübeck im Labor von  
Prof. Dr. med. Johannes Klein

**AUSLANDSAUFENTHALTE**

---

August/September 2001      Bauchchirurgie und Urologie, Sønderborg Sygehus,  
Dänemark  
September 2002              Orthopädie, Orthopaedic and Arthritic Hospital,  
Toronto, Kanada

**PRAKTISCHES JAHR**

---

August - November 2004      Innere Medizin, Sana Kliniken Ostholstein, Klinik  
Eutin  
November 04 - März 2005      Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum  
Schleswig-Holstein, Campus Lübeck  
März - Juli 2005              Chirurgie, Sana Kliniken Lübeck GmbH

**NEBENTÄTIGKEITEN IM  
STUDIUM**

---

März 2000 – November 2001      Studentische Extrawache bei der DRK-  
Schwesternschaft Lübeck e.V.  
November 2001 – Juli 2005      Mitbetreuung des Schlaflabors der Medizinischen  
Klinik III der Universität zu Lübeck  
2003/2004                      Studentisches Mitglied im Promotionsausschuss der  
Universität zu Lübeck

**KLINISCHE  
AUSBILDUNG**

---

01.01.2006 – 30.06.2006      Assistenzärztin in der Klinik für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-  
Holstein, Campus Lübeck  
Seit 01.07.2006              Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und  
Geburtshilfe der Sana Kliniken Ostholstein, Klinik  
Oldenburg

---

**Aus dieser Dissertation ist folgende Publikation hervorgegangen:**

*Wissenschaftlicher Beitrag auf nationalem Fachkongress:*

**Christiansen N, Kraus D, Perwitz N, Meier B, Fasshauer M, Klein J:**

Direct actions of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on brown adipose tissue include stimulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Angiotensin II and Leptin.

*49. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE)*

*Münster, 9.-12. März 2005*