

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

---

**Direkte Aldosteroneinflüsse  
auf die metabolische Fettzellfunktion,  
die Thermogenese und die Adipokinexpression  
in einem braunen Fettzellmodell**



Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Sektion Medizin -**

vorgelegt von  
**Jessica Jäger**  
aus Hamburg

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Krüger  
Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2012  
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.09.2012  
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aldosteron und das Metabolische Syndrom.....	1
1.1.1 Aldosteron .....	1
1.1.2 Das Metabolische Syndrom.....	4
1.2 Fettgewebe .....	5
1.2.1 Die klassische Fettzellfunktion.....	6
1.2.2 Thermogenese - eine spezifische Eigenschaft von braunem Fett - .....	7
1.2.3 Fettgewebe als endokrines Organ .....	8
1.3 Gibt es direkte Aldosteroneinflüsse auf das Fettgewebe? .....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Material .....	12
2.1.1 Zellmodell.....	12
2.1.2 Hep G2-Zellen .....	12
2.1.3 Chemikalien.....	12
2.1.4 Antikörper.....	15
2.1.4.1 Primärantikörper .....	15
2.1.4.2 Sekundärantikörper.....	15
2.1.4.3 Primer.....	15
2.1.5 Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	16
2.1.5.1 Nährmedien .....	16
2.1.5.2 Puffer für die Zellkultur und Zellstimulation .....	16
2.1.5.3 Puffer für die Proteinanalyse.....	17
2.1.5.4 Puffer für die Glukoseaufnahmemessung .....	18
2.1.5.5 Puffer und Lösungen für die RNA-Analyse.....	19
2.1.5.6 Oil-Red-O Färbung .....	19
2.1.6 Geräte .....	19
2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.8 Software .....	21
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Zellkultur.....	22
2.2.2 Zellfärbung .....	23
2.2.3 Proteinanalyse.....	23

# Inhaltsverzeichnis

---

2.2.3.1	Anfertigung von Totallysaten und Proteinbestimmung .....	23
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	24
2.2.3.3	Western-Blot-Analyse und Immundetektion .....	25
2.2.4	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.2.4.1	Stimulation und RNA-Isolation .....	25
2.2.4.2	cDNA-Synthese .....	26
2.2.4.3	Real Time – PCR (RT-PCR) .....	26
2.2.5	Glukoseaufnahme-Messung.....	28
2.2.6	Statistische Auswertung .....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	Nachweis des MR in braunen Adipozyten .....	29
3.2	Aldosteron induziert Insulinresistenz .....	30
3.2.1	Aldosteron führt zu einer Reduktion der insulininduzierten Glukoseaufnahme .....	30
3.2.2	Aldosteron vermindert die Phosphorylierung wichtiger Elemente der Signalkaskade am Insulinrezeptor .....	32
3.3	Aldosteron inhibiert die Expression von UCP-1 .....	37
3.4	Aldosteron hat keinen Einfluss auf die Differenzierung .....	39
3.5	Aldosteroneinflüsse auf die Adipokinexpression .....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
4.1	Fettgewebe als Zielgewebe des Aldosteroneinflusses.....	41
4.2	Aldosteron inhibiert die klassische Fettzellfunktion .....	42
4.2.1	Aldosteron beeinflusst die insulininduzierte Glukoseaufnahme.....	42
4.2.2	Aldosteron beeinflusst die Signaltransduktion.....	44
4.2.2.1	Einflüsse auf den PKB-Signalweg.....	44
4.2.2.2	Einflüsse auf die MAP-Kinasen Regulation .....	46
4.3	Aldosteron beeinflusst die Thermogenese.....	46
4.4	Aldosteron hat keinen Einfluss auf die Fettzeldifferenzierung .....	47
4.5	Aldosteron beeinflusst die Adipokinexpression.....	48
4.5.1	Aldosteron erhöht die Leptinexpression.....	48
4.5.2	Aldosteron hat keinen Einfluss auf die Adiponektinexpression.....	50
4.6	Gewonnene Erkenntnisse und Ausblick.....	51
4.6.1	Gewonnene Erkenntnisse.....	51
4.6.2	Ausblick.....	52
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomogramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylcyanophosphat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DTT	1,4-Dithiothreitrol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FBS	Fetales Kälberserum (Fetal bovine serum)
GR	Glukokortikoidrezeptor
GSK 3	Glykogensynthase Kinase 3
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HSD11 $\beta$ 2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2
IBMX	sobuthylmethylxanthin
IL-6	Interleukin-6
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
KRH	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MR	Mineralokortikoidrezeptor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomogramm
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B/ Akt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Real Time-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat

## Abkürzungsverzeichnis

---

T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UCP-1	Uncoupling Protein-1
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

### 1.1 Aldosteron und das Metabolische Syndrom

#### 1.1.1 Aldosteron

Das Steroidhormon Aldosteron galt lange Zeit nur als ein wichtiges Kontrollelement in der Regulation des Salz-Wasserhaushaltes und des Blutdrucks. Erst in jüngster Zeit wurden neue Zielgewebe und Wirkweisen von Aldosteron entdeckt und das Hormon in einen Zusammenhang mit verschiedenen anderen Krankheitsbildern, u.a. mit dem Metabolischen Syndrom, gebracht (Williams und Williams 2003).

Simpson und Tait gelang es 1953 als Ersten Aldosteron zu isolieren und 1954 wurde seine Struktur entschlüsselt (Simpson, et al. 1953). Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde synthetisiert und gelangt von dort über die Blutbahn zu seinen Zielorganen.

Als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems (RAAS) spielt Aldosteron bei der Regulation des Salz-Wasserhaushaltes und des Blutdrucks eine wichtige Rolle.

Die Ausschüttung von Aldosteron wird über verschiedene Wege reguliert. Hauptstimuli für eine erhöhte Aldosteronsekretion aus der Nebennierenrinde sind eine Verminderung des extrazellulären Volumens und der damit verbundene Anstieg des Angiotensin II sowie eine Hyperkaliämie.

Bei einer Abnahme des intravasalen Volumens kommt es zur Ausschüttung von Renin am juxtaglomerulären Apparat der Niere. Renin fördert die Bildung von Angiotensin II aus Angiotensinogen, was wiederum über Bindung an den AT1-Rezeptor zu Aktivierung einer G-Protein gekoppelten Signalkaskade und zur Stimulation der Aldosteronsynthese und -ausschüttung führt.

Erhöhtes Serumkalium hingegen führt zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, wodurch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Proteinkinasen aktiviert werden und so die Aldosteronsynthese und -ausschüttung steigt.

Der klassische Aldosteroneffekt besteht dann über Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) in einer vermehrten Natriumretention sowie Kaliumexkretion, vor allem an den Nieren und am Darm, und führt somit zu einer Erhöhung des extrazellulären Volumens und einer Abnahme des Serumkaliums (Kojima, et al. 1985, Williams und Williams 2003).

Der MR gehört wie der Glukokortikoidrezeptor (GR) zur Familie der nukleären Rezeptoren. Diese Rezeptoren binden ihre Liganden im Zytosol und translozieren dann in ihrer aktivierten Form (Hormon-Rezeptor-Komplex) in den Kern, um dort auf genomischer

# 1 Einleitung

---

Ebene wirksam zu werden. Dieser Wirkmechanismus erklärt auch den oft verzögerten Wirkeintritt von Aldosteron-Effekten (Pascual-Le Tallec und Lombes 2005, Williams und Williams 2003).

Der MR bindet in In-vivo-Experimenten Mineralo- und Glukokortikoide mit annähernd derselben Affinität. Um bei den im Serum vorherrschenden deutlich höheren Glukokortikoidkonzentrationen (ca. 1000fach) dennoch eine selektive Mineralokortikoidwirkung zu erreichen, gibt es mehrere Mechanismen.

Die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (HSD11 $\beta$ 2), die in vielen mineralokortikoidsensitiven Geweben das aktive Kortisol in seine inaktive Form, das Kortison, umwandelt und somit eine Bindung an den MR verhindert, ist der am besten bekannte Mechanismus (Pascual-Le Tallec und Lombes 2005, Zennaro, et al. 2009).

In anderen Geweben, z.B. dem Fettgewebe, ist HSD11 $\beta$ 2 nicht in signifikanter Menge vorhanden (Engeli, et al. 2004). In diesen Geweben wäre davon auszugehen, dass der MR hauptsächlich durch Glukokortikoide aktiviert wird. Es gibt jedoch noch andere Mechanismen, die für eine gewisse Mineralokortikoidselektivität sorgen. So konnte gezeigt werden, dass der MR über eine intrinsische Selektivität für Mineralokortikoide verfügt, ausgelöst durch Unterschiede in dem entstehenden Hormon-Rezeptor-Komplex (Lombes, et al. 1994, Pascual-Le Tallec und Lombes 2005).

Zu einem gewissen Anteil sind jedoch auch Glukokortikoide für die MR-vermittelten Wirkungen verantwortlich (Caprio, et al. 2007, Hoppmann, et al. 2010, Zennaro, et al. 2009).

Die klassische physiologische Aldosteronfunktion besteht in der Stabilisierung des Blutdrucks und des Salz-Wasserhaushaltes.

Ein stark erhöhter Plasmaaldosteronspiegel (Hyperaldosteronismus) entweder primär, z.B. durch ein Nebennierenadenom oder sekundär, durch ein stark aktiviertes RAAS, trägt zur Entstehung erhöhter Blutdruckwerte bei (Williams und Williams 2003). Das Syndrom des klassischen primären Hyperaldosteronismus mit seiner Symptomtrias aus Hypertonie, ggf. Hypokaliämie und metabolischer Alkalose ist nach seinem Erstbeschreiber Conn benannt (Conn und Louis 1955).

Ein stark aktiviertes RAAS mit signifikant erhöhten Plasmaaldosteronspiegeln und konsekutiv erhöhten Blutdruckwerten wird auch bei adipösen Personen beschrieben. Eine Reduktion des Körpergewichtes führte bei den beobachteten Personen sowohl zu einem Absinken des Aldosteronspiegels als auch zu rückläufigen Blutdruckwerten (Engeli, et al. 2005).

# 1 Einleitung

---

In letzter Zeit sind neben den klassischen Zielgeweben von Aldosteron mehrere weitere Wirkorte, aber auch Wirkweisen, des Hormons beschrieben worden. So gibt es vermehrt Publikationen, die Hinweise auf einen entscheidenden Einfluss von Aldosteron bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen geben (Rocha und Stier 2001, Williams und Williams 2003). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus ein deutlich erhöhtes Risiko für Endorganschäden bzw. das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen, wie linksventrikuläre Hypertrophie, Schlaganfall und andere thromboembolische Zwischenfälle, haben. Dieser Effekt besteht auch im Vergleich zu Patienten mit essentieller Hypertonie und normwertigem Aldosteron (Grady, et al. 1996, Napoli, et al. 1999, Takeda, et al. 1995). Zudem zeigte sich bei hypertensiven Patienten mit erhöhten Aldosteronserumkonzentrationen ein deutlich erhöhtes Risiko für Insulinresistenz und Hyperinsuliämie (Colussi, et al. 2007) .

Interessant ist, dass gerade bei den kardiovaskulären Effekten des Aldosterons ein schneller Wirkeintritt zu beobachten ist, so dass von einem nicht genomischen Wirkmechanismus ausgegangen werden muss (Rocha und Stier 2001, Williams und Williams 2003). Auch konnte eine extra-adrenale Aldosteronproduktion u.a. im Herzen oder in mononukleären Blutzellen nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf eine dortige parakrine Wirkweise sein könnte (Miura, et al. 2006, Silvestre, et al. 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das Bild des Aldosterons in den letzten Jahren grundlegend gewandelt hat. Von einem Hormon mit beschränkter Wirkung im Bereich der Blutdruckregulation und des Salz-Wasserhaushaltes, hin zu einem komplexen Hormon mit diversen Einflüssen auf verschiedene metabolische Funktionen. Es ist klar geworden, dass Aldosteron ein wichtiger Regulator in der Aufrechterhaltung des metabolischen Gleichgewichts ist und in der Pathogenese aktueller Krankheitsbilder eine entscheidende Rolle spielt (Zennaro, et al. 2009).

# 1 Einleitung

---

## 1.1.2 Das Metabolische Syndrom

Der Anteil adipöser Menschen an der Gesamtbevölkerung nimmt in den letzten Jahren, vor allem in den industrialisierten Ländern, dramatisch zu. Der Anteil übergewichtiger Menschen (BMI >25) wird weltweit bereits jetzt auf über eine Milliarde geschätzt. Allein in den USA wird davon ausgegangen, dass mehr als 65% der Bevölkerung übergewichtig sind und auch in Deutschland steigen die Zahlen alarmierend. Die Zunahme des Körpergewichtes resultiert aus verschiedenen Faktoren. Zum einen spielen genetische Faktoren eine Rolle, zum anderen geänderte Lebensgewohnheiten, wie z.B. Bewegungsmangel und das Überangebot an billigen, industriell hergestellten Nahrungsmitteln.

Unabhängig von der Genese der Adipositas ist bekannt, dass diese mit einer erhöhten Mortalität, einem erhöhten kardiovaskulären Erkrankungsrisiko und einer erhöhten Inzidenz für Diabetes mellitus Typ II einhergeht (Grundy 2004, Hansen und Kristiansen 2006, Hauner, et al. 2008, Zennaro, et al. 2009).

Das Zusammentreffen der verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Insulinresistenz, Adipositas, Dyslipidämie und Hypertonie bezeichnet man als Metabolisches Syndrom (Bochud, et al. 2006, Isomaa 2003).

Die Fettleibigkeit ist hierbei ein grundlegender Risikofaktor, der über die Triggerung weiterer Risikofaktoren einen wesentlichen Beitrag zu den pathophysiologischen Entstehungsmechanismen des Syndroms leistet.

Die genauen Mechanismen, die zu einer Verknüpfung der einzelnen Risikofaktoren führen, sind immer noch nicht vollends verstanden (Bochud, et al. 2006). Nur ein genaues Verstehen der Pathogenese und der Wechselwirkungen der einzelnen Faktoren kann jedoch zu vernünftigen neuen therapeutischen Ansätzen für die Behandlung des Metabolischen Syndroms führen.

Die Erkenntnis, dass das Fettgewebe durch seine vielseitigen metabolischen Regulationsmechanismen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Metabolischen Syndroms spielt, rückte es in den vergangenen Jahren wieder mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (Hansen und Kristiansen 2006).

# 1 Einleitung

---

## 1.2 Fettgewebe

Lange Zeit wurde das Fettgewebe nur als passiver Energiespeicher gesehen, doch diese Ansicht hat sich durch die intensive Forschung in den vergangenen Jahrzehnten grundlegend geändert. Heute ist bekannt, dass Fettgewebe ein komplexes Organ ist, welches über die Beteiligung an hormonellen Regelkreisen und neuronale Rückkopplung bei der Steuerung wichtiger Stoffwechselfunktionen eine entscheidende Rolle spielt (Kershaw und Flier 2004). Fettgewebe ist dabei nicht nur über seine klassische Funktion, die Energiespeicherung und -freisetzung beteiligt, sondern auch als endokrin aktives Organ, das außerdem mit der Fähigkeit zur Thermogenese über einen wichtigen energetischen Regulationsmechanismus verfügt (Klein, et al. 2006).

Das Fettgewebe lässt sich in subkutane und viszerale Depots unterteilen. Beide Depots enthalten sowohl weiße als auch braune Adipozyten. Anders als bei kleinen Säugetieren oder Neugeborenen sind beim Erwachsenen keine großen Depots von braunem Fett mehr nachweisbar. Neue Studien konnten jedoch metabolisch aktives braunes Fettgewebe in Erwachsenen nachweisen (Virtanen, et al. 2009). Dieses braune Fettgewebe findet sich disseminiert im weißen Fettgewebe (Cannon und Nedergaard 2004, Cinti 2006). Der Anteil von braunen Fettzellen an den weißen Fettdepots variiert mit genetischen Voraussetzungen, Alter, Ernährungszustand und anderen Umwelteinflüssen (Cinti 2005).

Braune Fettzellen lagern Lipide multilokulär ein, d.h. in mehreren Fetttröpfchen. Weiße Adipozyten hingegen speichern die Lipide unilokulär in einem einzigen großen Lipidtropfen. Ein weiterer Unterschied zwischen weißen und braunen Adipozyten ist die hohe Mitochondriendichte in braunen Adipozyten, die sie zur Thermogenese befähigt (Cinti 2006).

Braune Adipozyten gehen entwicklungsgeschichtlich auf das zentrale Dermomyotom zurück und sind daher ihrer Herkunft nach, anders als weiße Adipozyten, mit den Muskelzellen verwandt (Langin 2010). Neuere Forschungsarbeiten zeigen jedoch, dass einige weiße Adipozyten unter gewissen Stimuli, wie z.B. durch chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation oder Inhibition des Cannaboidrezeptors, einen braunen Phänotyp entwickeln können (Perwitz, et al. 2010, Petrovic, et al. 2010). Dabei zeigen sie auch das wichtigste Merkmal brauner Adipozyten, sie exprimieren UCP-1. Solche Zellen werden auch als „brite cells“ (brown out of white) bezeichnet (Iwen, et al. 2011).

Nach dem heutigen Kenntnisstand sind drei wesentliche Fettzellfunktionen zu unterscheiden: die klassische Fettzellfunktion der Energiespeicherung, die Thermogenese und die endokrine Fettzellfunktion.

# 1 Einleitung

---

## 1.2.1 Die klassische Fettzellfunktion

Die klassische Funktion des Fettgewebes besteht in der Speicherung von Lipiden und der Fähigkeit diese Lipide bei Bedarf als freie Fettsäuren wieder freizusetzen. Reguliert wird die Lipolyse, d.h. die Wiederfreisetzung von Fettsäuren und Glykogen, über verschiedene Mediatoren, wobei Insulin und Katecholamine die wichtigsten akuten Regulatoren zu sein scheinen. Katecholamine steigern die Lipolyse, wohingegen Insulin ein wesentlicher Hemmstoff der Lipolyse ist.

Ein Ungleichgewicht zwischen Lipogenese und Lipolyse im Fettgewebe ist oft bei Menschen mit Übergewicht oder Adipositas zu beobachten. Hohe Plasmakonzentrationen von freien Fettsäuren stellen einen unabhängigen Marker für das Risiko des Entstehens von Insulinresistenz oder Typ-2-Diabetes dar (Lafontan, et al. 2005).

Fettgewebe gehört zu den insulinsensitiven Geweben. Insulin bewirkt im Fettgewebe klassischerweise eine Stimulation der Glukoseaufnahme in die Zelle und trägt somit zur Aufrechterhaltung eines konstanten Blutzuckers bei.

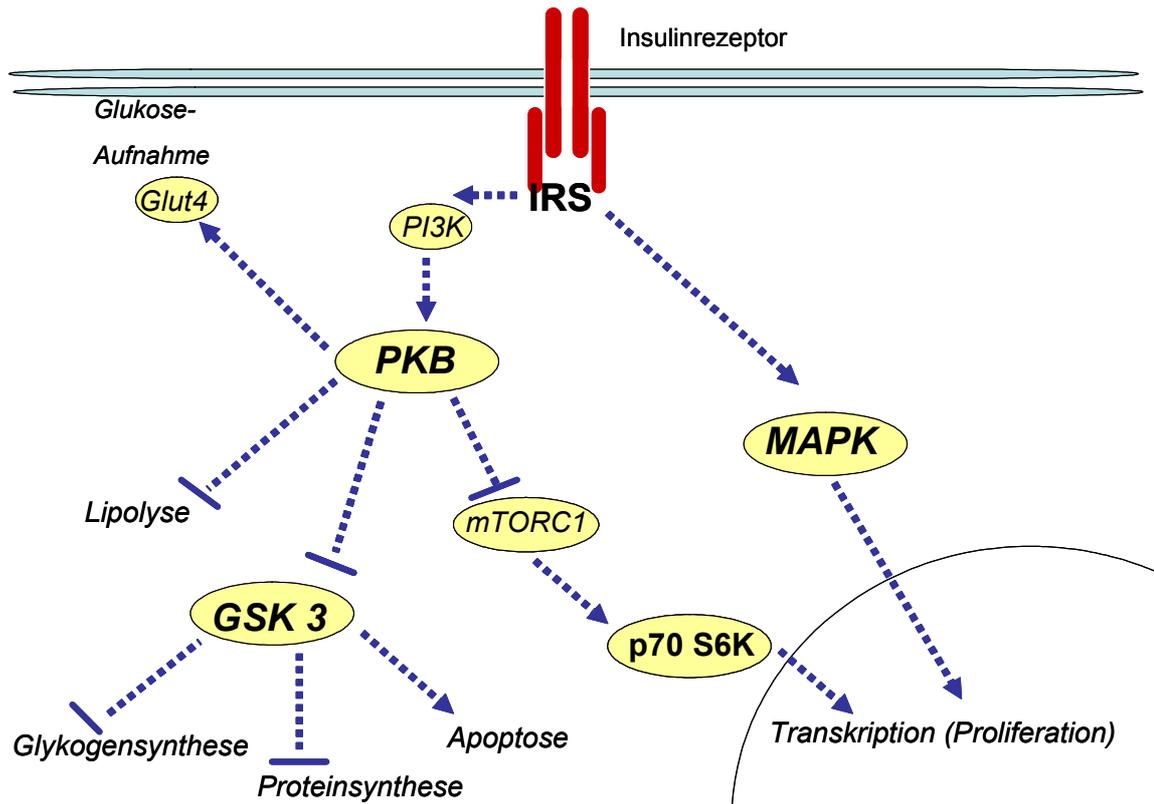
Die Stimulation mit Insulin führt im Fettgewebe, auch in dem in dieser Arbeit benutzten Modell, über Stimulation des Insulinrezeptors zur Aktivierung der Insulinsignalkaskade (Klein, et al. 2002). Hierbei werden über verschiedene Phosphorylierungsschritte die einzelnen Signalelemente aktiviert.

Über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren hat die Insulinsignalkaskade auch Einfluss auf das Zellwachstum. Die Transkriptionsfaktoren werden sowohl über den Protein Kinase B (PKB) Aktivierungsweg beeinflusst als auch über die Aktivierung mitogenaktivierter Protein Kinasen (MAPK) (Klein, et al. 2002, Lafontan, et al. 2005, Schinner, et al. 2005).

Im Modell mit *knockout*-Mäusen für Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1) und IRS-2 zeigte sich, dass diese Mäuse eine Insulinresistenz entwickeln. Bei den IRS-2 *knockout*-Mäusen entwickelte sich sogar ein manifester Diabetes mellitus auf Grund von Verlust der  $\beta$ -Zell-Funktion im Pankreas. Auch beim Menschen kann bei seltenen Mutationen des IRS-1 die Entwicklung einer Insulinresistenz festgestellt werden (Schinner, et al. 2005).

Im Mausmodell mit einem fettgewebsspezifischen *knockout* des Insulinrezeptors besitzen diese Tiere nur eine sehr geringe Fettmasse und es ist ein protektiver Effekt gegenüber Adipositas und adipositasinduzierter Insulinresistenz nachzuweisen (Blüher, et al. 2002). Dies deutet auf einen entscheidenden Einfluss des Fettgewebes, insbesondere im Insulinstoffwechsel, und bei der Entwicklung von Insulinresistenz hin.

# 1 Einleitung



**Abb.1 Insulinsignalling:**

Modell der Signalkaskade am Insulinrezeptor modifiziert nach Klein et al. 2002 (Klein, et al. 2002)

## 1.2.2 Thermogenese - eine spezifische Eigenschaft von braunem Fett -

Die Fähigkeit zur Thermogenese ist eine exklusive Eigenschaft von braunen Adipozyten (Cinti 2006). Diese wird über das mitochondriale Uncoupling Protein-1 (UCP-1) vermittelt. Dieses Protein führt in den Mitochondrien zu einer Entkopplung der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) von der Adenosintriphosphat (ATP)-Gewinnung und überführt somit die bei der Zellatmung gewonnene Energie in Wärme ohne das energiereiche Substrat ATP zu erzeugen (Cinti 2006, Klein, et al. 2006, Viengchareun, et al. 2001).

Der Prozess der Wärmegewinnung durch Entkopplung der Atmungskette ist eine wichtige Überlebensstrategie für kleine Wirbeltiere bei Kälteexposition, aber auch ein wichtiger Mechanismus zum Erhalt der Energiehomöostase. Bei der sogenannten Diät-induzierten Thermogenese führt die Nahrungsaufnahme zu einer gesteigerten UCP-1 Expression und somit zur Energieverbrennung durch Hitzeentwicklung (Cinti 2006, Klein, et al. 2002, Klein, et al. 2006).

Die UCP-1 Expression wird durch Katecholamine gesteigert. Dies geschieht über die Interaktion mit  $\beta$ 3-Rezeptoren und eine nachfolgende Protein Kinase A (PKA)-Aktivierung (Klein, et al. 2002).

# 1 Einleitung

---

Eine Aktivierung des Cannaboidrezeptors hingegen führt zu einer deutlichen Reduktion der UCP-1 Expression (Perwitz, et al. 2006).

Mehrere Studien zeigen sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen einen Zusammenhang zwischen Mutationen von UCP-1 oder der in großem Maße an der Regulation der UCP-1-Expression beteiligten  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptoren und der Entwicklung von Adipositas (Klein, et al. 2002). Bei adipösen Erwachsenen kann ein vermindertes Expressionsniveau von UCP-1 im intraperitonealen Fettgewebe nachgewiesen werden. Auch dies ist ein Hinweis auf einen Zusammenhang von UCP-1 und dem Entstehen von Adipositas (Oberkofler, et al. 1997). Bis heute gibt es jedoch keinen vielversprechenden pharmakologischen Ansatz, der für eine Nutzung der Thermogenese in der Therapie der Adipositas klinisch anwendbar wäre (Klein, et al. 2006). Die Möglichkeit weiße Adipozyten zur Transdifferenzierung in braune Adipozyten anzuregen und somit eine größere Anzahl thermogenetisch aktiver Fettzellen zu erhalten könnte jedoch in naher Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen (Perwitz, et al. 2010).

## 1.2.3 Fettgewebe als endokrines Organ

Bereits seit 1987 ist bekannt, dass Fettgewebe auch eine endokrine Funktion hat. Damals wurde entdeckt, dass Fettgewebe am Metabolismus der Sexualhormone (v.a. der Östrogene), durch die im Fettgewebe befindlichen Aromatasen, entscheidend beteiligt ist und Adipsin wurde als vom Fettgewebe sezernierte Protease identifiziert (Kershaw und Flier 2004).

Endgültig rückten die Adipozyten aber als endokrin aktive Zellen mit der Entdeckung des Hormons Leptin 1994 in den Fokus. Leptin entsteht durch die Expression des *ob*-Gens (Klein, et al. 2006). Die Leptin Expression und Ausschüttung ist direkt proportional zur Masse des Fettgewebes, sie ist positiv korreliert mit dem BMI und zum Ernährungsstatus. Sie wird jedoch auch durch eine Vielzahl von weiteren Mechanismen reguliert (Kershaw und Flier 2004, Rajala und Scherer 2003).

Leptin ist ein wichtiges Hormon zur Aufrechterhaltung der Energiebalance im Körper. Erhöhte Leptinspiegel signalisieren eine ausreichende bis zu hohe Energieaufnahme. Sie führen über direkte Wirkung im Gehirn im Bereich des Hypothalamus, z.B. am Nucleus arcuatus, durch Freisetzung orexigener/anorexigener Peptide zu einer Regulation der Nahrungsaufnahme und, gesteuert über das sympathische Nervensystem, zu einer Erhöhung des Energieverbrauchs (Kershaw und Flier 2004, Kraus, et al. 2002, Rajala und Scherer 2003).

# 1 Einleitung

---

Darüber hinaus ist Leptin noch an anderen wichtigen Regelkreisen beteiligt, so beeinflusst es das Immunsystem und die Fertilität (Rajala und Scherer 2003).

In unserem Zellmodell konnte ein negativer autokriner Effekt von Leptin auf die Insulinsignalkaskade und die insulininduzierte Glukoseaufnahme nachgewiesen werden (Kraus, et al. 2002).

Im Mausmodell mit Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen, bei denen das *ob*-Gen deletiert wurde, zeigt sich, dass diese an massiver Adipositas, Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Sterilität leiden. Leptininjektionen bewirken bei den Mäusen eine dramatische Gewichtsreduktion mit Normalisierung des Stoffwechsels (Buyse, et al. 2001, Klein, et al. 2006). Dieser Effekt zeigt sich auch bei Menschen, die an der seltenen erblichen Leptin-Defizienz leiden (Klein, et al. 2006).

Bei Diät-induzierter Adipositas ist dieser positive Effekt sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen nicht zu sehen. Vielmehr geht Adipositas mit einem deutlich erhöhten Serum-Leptinspiegel einher, der nicht den gewünschten Effekt der Gewichtsregulation zur Folge hat. Es ist davon auszugehen, dass sich, vielleicht infolge dauerhaft erhöhter Leptinspiegel, eine Leptinresistenz entwickelt. Die genauen Entstehungsmechanismen sind bis heute unklar (Kershaw und Flier 2004, Rajala und Scherer 2003). Die Hoffnungen, rekombinantes Leptin als potentes Therapeutikum in der Adipositas therapie einsetzen zu können, wurden durch die Leptinresistenz in der therapeutischen Zielgruppe zunichte gemacht. Analoga, die die Leptinsignalkaskaden im Zentralnervensystem (ZNS) aktivieren, könnten vielleicht in Zukunft eine potente therapeutische Möglichkeit darstellen. Zudem gibt es Hinweise auf interessante Therapieansätze für Leptin z.B. in der Therapie der Amenorrhoe (Klein, et al. 2006).

Ein weiteres wichtiges Fettgewebshormon, ein sog. Adipokin, ist das Adiponektin. Zunächst wurde angenommen, dass Adiponektin ausschließlich ein Produkt weißer Adipozyten ist. 2002 konnten Viengchareun und Kollegen jedoch die Expression von Adiponektin auch im braunen Fettgewebe nachweisen (Viengchareun, et al. 2002).

Adiponektin hat die Eigenschaft Zielgewebe, wie z.B. Muskel, für Insulin zu sensitivieren. Bei Insulinresistenz und Übergewicht finden sich sowohl im Mausmodell als auch in klinischen Studien erniedrigte Adiponektinspiegel (Chandran, et al. 2003, Viengchareun, et al. 2002). Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder einem Lipid-Risikoprofil für kardiovaskuläre Erkrankungen wurden sogar noch stärker erniedrigte Serum-Adiponektinspiegel gemessen, was auf einen Einfluss von Adiponektin bei kardiovaskulärer Morbidität hinweist (Chandran, et al. 2003).

Im Mausmodell konnte bei adenoviral erhöhter Adiponektinexpression eine deutliche Steigerung der Insulinsensitivität im Glukosetoleranztest erreicht werden (Satoh, et al.

# 1 Einleitung

---

2005). Adiponektin spielt also, wie auch Leptin, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase und hat Einfluss auf Bestandteile des Metabolischen Syndroms.

Bis heute sind eine Vielzahl von Adipokinen bekannt, wie z.B. Resistin, Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Angiotensinogen u.v.a.m., die autokrin, parakrin oder endokrin an der Regulation wichtiger Regelkreise mitwirken (Kershaw und Flier 2004, Viengchareun, et al. 2002)

## **1.3 Gibt es direkte Aldosteroneinflüsse auf das Fettgewebe?**

Das Fettgewebe ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase im Körper. Störungen auf den verschiedenen Ebenen der Fettzellfunktion können jeweils zu starken Beeinträchtigungen der Energiebalance führen (Klein, et al. 2006).

Aldosteron hat neben seiner klassischen Wirkung auf den Salz-Wasserhaushalt noch weit mehr Funktionen. Es konnten entscheidende Einflüsse auf verschiedene Komponenten des metabolischen Syndroms nachgewiesen werden (Williams und Williams 2003).

1998 konnte eine Arbeitsgruppe um Lombes Fettgewebe, insbesondere braunes Fettgewebe, als neues Zielgewebe für Aldosteron identifizieren. Mit dem Ziel die Regulationsmechanismen des MR genauer zu untersuchen, generierte diese Arbeitsgruppe eine transgene Maus, die das SV 40 groß T Antigen unter Kontrolle des MR-Promoters exprimierte. Überraschenderweise verstarben alle diese Tiere früh an Hibernomen, braunen Fettgewebstumoren. Aus den Hibernomazellen wurden Zellen für ein Zellmodell gewonnen und die endogene Expression des MR konnte an diesen Zellen nachgewiesen werden (Zennaro, et al. 1998). 2010 gelang der Nachweis des MR auch in humanen Adipozyten (Urbanet, et al. 2010).

Des Weiteren gelang es 2003 einer Arbeitsgruppe um Bornstein in einem Modell mit humanen Zellen einen von weißen Adipozyten sezernierten Faktor nachzuweisen, der an der Nebenniere die Sekretion von Aldosteron steigert. Dieser Effekt war vollständig unabhängig von der Stimulation der Aldosteronsekretion durch Angiotensin II. Damit gab es einen weiteren Hinweis auf eine direkte Verbindung zwischen Aldosteron und dem Fettgewebe, welcher vermuten ließ, einen wichtigen Verbindungspunkt von Hypertonus und Adipositas gefunden zu haben (Ehrhart-Bornstein, et al. 2004, Ehrhart-Bornstein, et al. 2003).

Trotz der sich mehrenden Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Aldosteron und dem Fettgewebe ist darüber bisher nur sehr wenig bekannt.

# 1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung eines direkten Einflusses von Aldosteron auf die drei entscheidenden Fettzellfunktionen, die Thermogenese, die insulininduzierte metabolische Funktion und die Adipokinexpression, in einem braunen Fettzellmodell. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden.

1. **Gibt es einen direkten Einfluss von Aldosteron auf die insulininduzierte metabolische braune Fettzellfunktion?  
Über welche Wege/Mechanismen kommt es zu diesen Veränderungen?**
2. **Beeinflusst Aldosteron die Thermogenese in braunen Adipozyten?**
3. **Ändert sich die Differenzierung brauner Adipozyten durch Aldosteroneinfluss?**
4. **Modifiziert Aldosteron die Expressionsmuster wichtiger Adipokine?**

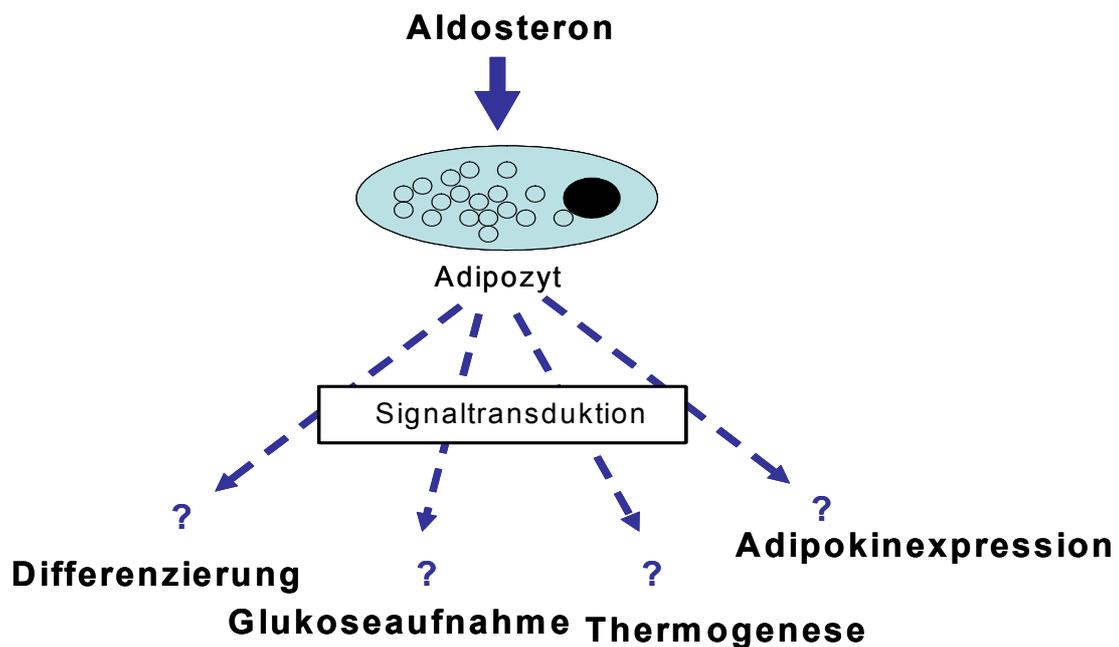


Abb. 2 : Schematische Darstellung der Fragestellung

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellmodell

Für alle Versuche wurden, soweit nicht anders angegeben, SV40 T-immortalisierte braune murine Adipozyten verwendet. Die verwendete Zelllinie wurde von Prof. J. Klein etabliert (Klein, et al. 2002).

Für die Herstellung der Zelllinie war zunächst interscapuläres braunes Fett von einer neugeborenen Wild-Typ-Maus isoliert worden. Die so gewonnenen braunen Präadipozyten wurden kultiviert und kurz vor Erreichen der Konfluenz durch Infektion mit dem retroviralen Vektor pBabe, der für das SV40 T-Antigen kodiert, immortalisiert.

Es konnte, anhand von spezifischer Färbung und der Expression von Differenzierungsmarkern, gezeigt werden, dass diese immortalisierten Präadipozyten nach Erreichen der Konfluenz und unter entsprechenden Kulturbedingungen (Differenzierungsmedium) vollständig ausdifferenzierten. Die ausdifferenzierten braunen Adipozyten zeigten alle charakteristischen Eigenschaften von braunem Fett. Die Zelllinie hat sich in den letzten Jahren als gutes Modell zur Erforschung der braunen Fettzellfunktion erwiesen (Klein, et al. 2004, Ott, et al. 2004).

Die Präadipozyten können über 30 Passagen kultiviert werden ohne ihre zellspezifischen Eigenschaften oder ihre Differenzierungsfähigkeit zu verlieren (Klein, et al. 2002).

#### 2.1.2 Hep G2-Zellen

Die Lysate der HepG2-Zellen wurden dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe um Prof. H.H. Klein zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.3 Chemikalien

Acrylamid „Rotiophorese Gel 30“	Roth (Karlsruhe)
Agarose MP	AppliChem (Darmstadt)
Aldosteron	Sigma-Aldrich Co. (USA)
	Calbiochem Inc. (USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva (Heidelberg)
Amphotericin B	Invitrogen (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma (Deisenhofen)
Aqua dest.	Eigene Destillieranlage
BM 1/2 –Cyclin	Roche (Mannheim)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol (Hamburg)
Bradford-Protein-Assay	BioRad (München)

## 2 Material und Methoden

---

Bromphenolblau 0,01%	Biomol (Hamburg)
Calziumchlorid	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Clß3 (CL316,243)	Sigma (Deisenhofen)
1,4-Dithiotheitrol (DTT)	Invitrogen (Karlsruhe)
2-Desoxy-[ <sup>3</sup> H]Glukose	NEN Life Science Products (Dreieich)
Diethylcyanophosphat (DEPC)	Fluka (Steinheim, CH)
Dexamethason	Sigma (Deisenhofen)
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Glukose (4,5g/l), Pyridoxin und Glutamax®	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure, Titriplex II)	Sigma (Deisenhofen)
Entwickler G153	Agfa-Gevaert (Belgien)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roche (Mannheim)
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma (Deisenhofen)
5x First Strand Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Fixierer G354	Agfa-Gevaert(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)
Isobuthylmethylxanthin (IBMX)	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol für RNA	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol für Oil-Red-O-Färbung	Sigma (Deisenhofen)
Isoproterenol	Sigma (Deisenhofen)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
2-Mercatoethanol	Sigma (Deisenhofen)
Methanol	Baker (Niederlande)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumfluorid	Sigma (Deisenhofen)

## 2 Material und Methoden

---

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-	
Sulfonsäure (HEPES)	Biomol (Hamburg)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumorthovanadat	Sigma (Deisenhofen)
Natriumphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumpyrophosphat	Sigma (Deisenhofen)
dNTP	Fermentas GmbH (St. Leon- Rot)
Oil-Red-O-Farbstoff	Sigma (Deisenhofen)
Oligo-dT-Primer	Roche (Mannheim)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
PBS-Tabletten	INC Biomedicals (USA)
Penicillin/ Streptomycin	Bio Whittaker (Belgien)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Boehringer (Mannheim)
Protein Bench Mark Prestained	Invitrogen (Karlsruhe)
QuantiTec™ SYBR-Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-Inhibitor	Roche (USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RT-PCR Grade Water	Ambion Inc. (USA)
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Fluka (Steinheim, CH)
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Szintillationflüssigkeit Aquasafe 300 plus	ICN Biomedicals (Meckenheim)
Taq DNA Polymerase	Peqlab (Erlangen)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen)
Trijodthyronin (T <sub>3</sub> )	Sigma (Deisenhofen)
TRIS	Biomol (Hamburg)
Trizol Reaganz	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.4 Antikörper

#### 2.1.4.1 Primärantikörper

Anti-PKB

Anti-phospho-PKB (Ser 473)

Anti-p42/44 MAP Kinase

Anti-phospho-p42/44 MAP Kinase

Anti-phospho-GSK3 $\alpha/\beta$

Anti-GSK3 $\beta$

Anti-phospho-p70 S6

Anti-p70 S6

Cell Signaling Technology,  
Inc. (Danvers, MA, USA)

Anti-UCP-1

Chemicon International  
(Temecula, CA, USA)

Anti -MR (H300)

Santa Cruz Biotechnology  
(Heidelberg)

#### 2.1.4.2 Sekundärantikörper

Anti-Ig-Mouse/Anti-Ig-Rabbit

Chemiluminescence-Kit,  
Roche (Mannheim)

#### 2.1.4.3 Primer

Oligo dT Primer zur cDNA Synthese

Roche (Mannheim)

Alle folgenden Primer wurden von der Firma Biometra (Göttingen), nach mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems) erstellten Sequenzen, synthetisiert.

Adiponektin

*Sense:* CTT AAT CCT GCC CAG TCA TGC

*Antisense:* CCA TCC AAC CTG CAC AAG TTC

HPRT

*Sense:* GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GT

*Antisense:* CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC

Leptin

*Sense:* ACA CAC AGC TGG AAA CTC CCA

*Antisense:* GAT TGA AAG CAG CAC CCC A

UCP-1

*Sense:* ATG GTG AAC CCG ACA ACT TCC GAA GTG

*Antisense:* GTA CTG GAA GCC TGG CCT TCA CCT TGG

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.5 Nährmedien, Puffer und Lösungen

#### 2.1.5.1 Nährmedien

##### Grundmedium

DMEM mit	
FBS	20%
Amphotericin B	1mg/ml
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
BM1 oder BM2	10mM

##### Differenzierungsmedium

DMEM mit	
FBS	20 %
Insulin	20nM
T <sub>3</sub>	1nM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml

##### Induktionsmedium

Differenzierungsmedium mit	
Dexamethason	2mg/ml
IBMX	500µM
Indomethazin	250µM

Starvingmedium = DMEM

#### 2.1.5.2 Puffer für die Zellkultur und Zellstimulation

##### 10x Phosphatpuffer (PBS)

Natriumchlorid	2g/l
Kaliumchlorid	2g/l
Kaliumhydrogenphosphat	2g/l
di-Natriumhydrogenphosphat x2H <sub>2</sub> O	14,4g/l

cum aqua dest. ad 1000 ml

pH 7,4 , Lagerung bei Raumtemperatur

##### Phosphatpuffer für die Zellkultur

1 PBS-Tablette auf 100ml aqua dest.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.5.3 Puffer für die Proteinanalyse

#### Lysispuffer (pH 7,4, 4°C)

HEPES	50mM
Natriumchlorid	37mM
Magnesiumchlorid	1mM
Kalziumchlorid	1mM
Natriumpyrophosphat	10mM
Natriumfluorid	10mM
EDTA	2mM
Glycerol	10%
IGEPAL CA-630	1%
cum aqua dest. ad 1000ml	
Lagerung bei +4°C	

Inhibitoren vor Gebrauch frisch zugeben:

Aprotinin	10µg/ml
Leupeptin	10µg/ml
Natriumorthovanadat	2mM
PSMF	2mM

#### Laemmli-Auftragspuffer (pH 6,8)

Bromphenolblau	0,002%
Glycerol	0,2g/ml
SDS	4%
Tris	50mM
DTT	100mM

#### Elektrophoresepuffer (10x)

Tris	30,3g/l
Glycin	142,5g/l
EDTA	3,35g/l
SDS	10g/l
cum aqua dest. ad 2000 ml	

## 2 Material und Methoden

---

### Transferpuffer (10x)

Glycin 144mg/l

Tris 30mg/l

cum aqua dest. ad 1000 ml

Lagerung bei +4°C

### zum Gebrauch Transferpuffer 1x

10xTransferpuffer 100ml

Methanol 200ml

cum aqua dest. ad 1000 ml

### Waschpuffer (pH 7,2)

Tris 10mM

Natriumchlorid 150mM

Tween 20 0,05%

cum aqua dest. ad 2000 ml

Lagerung bei +4°C

### Blockpuffer

Waschpuffer mit 3% BSA

### **2.1.5.4 Puffer für die Glukoseaufnahmemessung**

#### Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRH) pH7,4

Calciumchlorid 1,25mM

HEPES (pH 7,4) 20mM

Kaliumchlorid 4,7mM

Magnesiumsulfat 1,25mM

Nariumchlorid 136mM

cum aqua dest. ad 1000 ml

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.5.5 Puffer und Lösungen für die RNA-Analyse

#### TBE-Puffer

Tris	890mM
Borsäure	890mM
EDTA	2mM
cum aqua dest. ad 500ml (pH 8,0)	

#### Auftragspuffer

In 1x TBE:

Glycerin	50%
SDS	0,2%
Bromphenolblau	0,05%

#### DEPC Wasser

DEPC 1:1000 in aqua dest.

Mindestens 30 min. rühren

Ü.N. bei 37°C dann autoklavieren

### 2.1.5.6 Oil-Red-O Färbung

#### Oil-Red-O-Stammlösung

Oil Red O Farbstoff	0,5g
Isopropylalkohol	100ml

#### Oil-Red-O-Gebrauchslösung

Stammlösung	60%
Aqua bidest.	40%

### 2.1.6 Geräte

Analysenwaage	Satorius (Göttingen)
Autoklaviergeräte:	
• 2540EL	Systemec (Wettenberg)
• Varioklav	H+P(Oberschleißheim)
β-Zähler 1409	Wallac (Turcu, Finnland)
Begasungsbrutschrank Typ B5060, EK/CO2	Heraeus (Osterode)
Eismaschine „Scotsman AF-20“	Enodis (Herborn)
Elektronikrührer Typ M23	Internat. Laborat. App. (Dottingen)

## 2 Material und Methoden

---

### Elektrophoresesysteme:

- Agarosegel (RNA) Peqlab (Erlangen)
- SDS-Gel, „Mini Protean 3“ BioRad (München)
- Filmkassetten, „Hypercassette™“ Amersham Biotech (UK)
- Fotokamera „Mp-4 land camera“ Polaroid (Dreieich-Sprendlingen)
- Mikroskop „Olympus CK2“ Olympus (Hamburg)

### Netzgeräte:

- Consort E802 VWR (Belgien)
- Power Pac 300 BioRad (München)
- Power Supply 600 Pharmacia BioTech (USA)
- pH-Meter „766 Calimatic“ Knick Elektronisch Messgeräte (Berlin)
- Photometer „Biophotometer“ Eppendorf (Hamburg)

### Pipetten:

- Pipettboy „Accu-Jet“ Brand (Wertheim)
- Pipetten „Eppendorf research“ Eppendorf (Hamburg)
- Multipette Plus Eppendorf (Hamburg)

### Real Time Thermocycler

“Abi Prism 5700 und 7000” Applied Biosystems (USA)

### Rotator

Renner GmbH (Dannstadt)

### Scanner „Astra 2000“

Umax (USA)

### Schüttler „Vortex Genie 2“

Scientific Industries (Bohemia, USA)

### Schwenker

Hassa (Lübeck)

### Thermocycler „Cyclone Gradient“

Peqlab (Erlangen)

### UV-Leuchttisch

Vilbert-Lourmat (Eberhardzell)

### Wasserbad Typ 3044

Köttermann (Hänigsen)

### Werkbank (Steril) „Nuair ClassII“

Zapf Instruments (Sarstedt)

### Wippe „Duomax 1030“

Heidolph Instruments

### Thermomixer compact

Eppendorf (Hamburg)

### Zentrifugen:

- Biofuge fresco/Rotor 3765 Heraeus (Osterode)
- MiniSpin Plus Eppendorf (Hamburg)
- Multifuge 3S-R Heraeus (Osterode)

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Einmal-Küvetten

- Proteinphotometrie
- RNA-Photometrie
- Falcon-Röhrchen

Film „Hyperfilm“

Filter „Steritop Express Plus“, 0,22µm

Filterpapier

Mikrotiterplatten, Mikro-Amp., 96-Well

Nitrozellulosemembran „Protan BA 85“

Parafilm M

Pipettenspitzen:

- Biosphere Filter Tips (10, 100, 200, 1000 µl)
- Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)
- Stabpipetten “Serological pipette”

(5, 10, 25, 20 ml)

Reaktionsgefäße (“Eppis”)

Szintillationsröhrchen

Wattestäbchen (steril)

Zellschaber

Zellkulturschalen:

- 10 cm + 15 cm Durchmesser
- 12-Loch-Platten

### 2.1.8 Software

Sigma Plot 7.0

Quantity One

Relativ Expression Software Tool = REST©

Brand (Wertheim)

Eppendorf (Hamburg)

Sarstedt (Nümbrecht)

Amersham Bioscience (UK)

Millipore Corporation (USA)

Whatman International Ltd.  
(UK)

Applied Biosystems (USA)

Schleicher und Schuell (Dassel)

American National Can. (USA)

Eppendorf (Hamburg)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sigma (Deisenhofen)

NOBA Verbandmittel Danz  
GmbH + CoKG (Wetter)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sarstedt (Nümbrecht)

Corning Instruments (USA)

Systat Software Inc. (USA)

BioRad (München)

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

Die unter 2.1.1 beschriebenen SV40 T- immortalisierten braunen Präadipozyten wurden nach dem Auftauen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in 15cm Kulturschalen, sog. „Masterplatten“, in 25ml Grundmedium kultiviert.

Sobald die Zellen mikroskopisch eine Konfluenz von ca. 80% erreichten, was nach 4-5 Tagen der Fall war, wurde die Platte geteilt.

In der keimarmen Umgebung der Werkbank wurde zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen dann vorsichtig, ohne ihn zu lösen, 2 x mit warmem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2,5ml Trypsin von der Platte abgelöst. Der Ablöseprozess wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach der vollständigen Lösung der Zellen von der Platte (max. 5min) wurde die Zell-Trypsin-Suspension in 30,5ml Grundmedium aufgenommen. Hiervon wurden 3ml auf die Masterplatte zurückgegeben, in 25ml Grundmedium verteilt und als neue Passage weiterkultiviert. Die restlichen 30ml wurden entweder verworfen oder zur Differenzierung in 10cm Kulturschalen oder 12-Loch-Platten mit Differenzierungsmedium ausgesät. Dabei kamen bei 10cm Kulturschalen pro Schale 3ml Zellsuspension auf 7ml Differenzierungsmedium und bei 12-Loch-Platten 7 Tropfen Zellsuspension mit 2ml Differenzierungsmedium in ein Loch.

Die zur Differenzierung und weiteren Testung vorgesehenen Zellen wurden unter den gleichen Kulturbedingungen wie die Masterplatte kultiviert, nur anstelle des Grundmediums wurde jetzt Differenzierungsmedium verwendet. Nach ca. 4 Tagen, mit Erreichen der Konfluenz, wurden die Zellen für 18-24h in Induktionsmedium inkubiert. Die Zellen begannen daraufhin, durch Kontaktinhibition und Induktion, sich von Präadipozyten hin zu volldifferenzierten Zellen zu entwickeln. Die Zellen hörten dabei auf sich zu teilen und begannen Lipidtröpfchen zu bilden. Dieser Prozess wurde mikroskopisch kontrolliert. Während der Differenzierung steigerte sich die Stoffwechselaktivität der Zellen ständig, was ein tägliches Wechseln des Mediums notwendig machte. Eine katabole Stoffwechsellage galt es zu diesem Zeitpunkt der Zellkultur unbedingt zu vermeiden.

Die Stoffwechselaktivität und den richtigen Zeitpunkt zum Wechsel des Mediums konnte man an der Farbe des Mediums ablesen. Ein pH-Indikator im Medium führte bei einer Anhäufung von sauren Metaboliten zu einem Farbumschlag von rot nach gelb.

5-6 Tage nach der Induktion, abhängig vom Differenzierungsgrad, wurden die nun volldifferenzierten Zellen, je nach Versuchsansatz, für 24-48 Stunden in Starvingmedium kultiviert und anschließend entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen stimuliert.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.2.2 Zellfärbung

Zur Beurteilung der Fettzellendifferenzierung erfolgte eine fettspezifische Färbung mit dem Farbstoff Oil-Red-O. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.2.1 kultiviert und ab Induktion bzw. ab Aussaat täglich mit 10µM Aldosteron stimuliert.

Für die Färbung wurden die entsprechenden Kulturplatten mit 4°C kaltem PBS gewaschen und so die Zellen fixiert. Dann wurde die Platte für mindestens 15 Minuten mit Formalin überschichtet. Anschließend wurde das Formalin durch ca. 5ml Oil-Red-O Gebrauchslösung ersetzt. Nach einer Stunde konnte die Oil-Red-O-Lösung entfernt werden. Die Platte wurde mehrfach mit Aqua dest. gespült, um unspezifische Anhaftungen des Farbstoffs zu entfernen. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch und wurde durch das Einscannen der Platten archiviert.

### 2.2.3 Proteinanalyse

#### 2.2.3.1 Anfertigung von Totallysaten und Proteinbestimmung

Zur Durchführung der Proteinanalyse mussten zunächst Totallysate der Zellen hergestellt werden. Dazu wurden die Zellen als erstes entsprechend dem Versuchansatz stimuliert (z.B. 1 Stunde mit Aldosteron). Zur Kontrolle erfolgte eine Stimulation mit 100nM Insulin für 10 Minuten und mit 100nM Clß3 für 20 Minuten.

Nach Ablauf der vorgegebenen Stimulationsdauer wurde das Medium abgegossen und die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Sodann wurden 450µl Lysispuffer auf die Kulturschale gegeben und diese auf Eis gelagert. Nach kurzer Einwirkzeit wurde der Zellrasen mit dem Zellschaber zusammengeschaht und in dem Lysispuffer suspendiert. Die Suspension wurde in ein Reagiergefäß überführt, 15 Minuten im Kühlschrank im Rotator durchmischt und anschließend in der Kühlzentrifuge für 10 Minuten bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren kam es zu einer Auftrennung in das Fettpellet, die zytosolische, proteinhaltige Fraktion und die korpuskulären Zellbestandteile. Das Fettpellet wurde vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt und die flüssige Phase in ein frisches Reagiergefäß überführt. Nun wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben photometrisch modifiziert nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Dabei wurden zur Minimierung von Pipettierfehlern für alle Werte Doppelbestimmungen durchgeführt. Anhand der bestimmten Proteinmengen der einzelnen Proben wurde diese standardisiert, d.h. durch Zugabe von Lysispuffer und Laemmli-puffer wurde in allen Proben eine einheitliche Proteinkonzentration hergestellt. Zum Denaturieren der Proteine wurden die Proben für 2 Minuten auf 95°C erhitzt und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

## 2 Material und Methoden

### 2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von denaturierten Proteinen ihrem Molekulargewicht entsprechend (Laemmli 1970, Weber und Osborn 1969). Dabei wird sich die Eigenschaft des SDS zu nutze gemacht mit den Proteinen einen negativ geladenen Komplex zu bilden, der im elektrischen Feld zur Anode wandert. Diese SDS-Protein-Komplexe haben unabhängig von ihrer Länge eine ungefähr gleiche Ladungsdichte und somit in freier Lösung eine ungefähr gleiche Wanderungsgeschwindigkeit. Im SDS-Polyacrylamid-Gel, das in gewisser Weise ein Maschenwerk bildet, wandern Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht schneller zur Anode als solche mit einem hohen Molekulargewicht, so kommt es innerhalb des Gels zu einer Größenauftrennung der Proteine.

Als erster Schritt der Gelelektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele vorbereitet. Ein Trenngel (8%, 10% oder 12% Acrylamid) wurde mit einem Sammelgel überschichtet.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b> <b>8%/ 10%/ 12%</b>
Aqua dest.	3,4ml	7 ml/ 6 ml/ 5ml
1,5 mM Tris (pH8,8)	625 µl	3,75 ml
Acrylamid	850 µl	4 ml/ 5 ml/ 6 ml
10% SDS	50 µl	150 µl
10% APS	50µl	150 µl
TEMED	5 µl	10µl

**Tab. 1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele**

Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurde eine unterschiedliche Acrylamidkonzentration im Trenngel gewählt. Je größer das Protein, desto geringer die Acrylamidkonzentration.

Die zu untersuchenden Proben wurden erneut für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend zentrifugiert. Die Geltaschen des Sammelgels wurden mit gleichen Mengen der Proteinprobe (100µg) befüllt. Neben den Proteinproben wurde ein Proteinmolekular-Marker aufgetragen, der im Anschluss eine eindeutige Größenzuordnung der Proteine ermöglichte.

Für die Auftrennung im elektrischen Feld wurde zunächst für ca. 15 Minuten eine Spannung von 80V gewählt, um einen gleichmäßigen Übertritt der Proben auf das

## 2 Material und Methoden

---

Trenngel zu gewährleisten, dann wurde die Spannung auf 100V gesteigert. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Marker den unteren Gelrand erreicht hatte. Anschließend wurde das Bandenmuster auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

### **2.2.3.3 Western-Blot-Analyse und Immundetektion**

Als Western-Blot-Analyse bezeichnet man die elektrophoretische Übertragung von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran.

Für den Transfer wurde das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt und zusammen mit einer Nitrocellulosemembran in einer Transferkammer platziert. Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei einer Spannung von 100V für 1 Stunde. Lediglich bei sehr großen Proteinen wurde die Transferzeit verlängert.

Die auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine konnten, mit für sie spezifischen Antikörpern, detektiert werden. Um unspezifische Antikörper Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran für mindestens eine Stunde blockiert. Dabei wurden durch Inkubation im Blockpuffer, freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt.

Als Vorbereitung auf die Fluoreszenzmarkierung wurden die Membranen dann dreimal für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran für eine Stunde auf dem Schüttler mit einem spezifischen Primärantikörper (1:1000 in Blockpuffer) inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang. Daran anschließend wurde die Membran für eine halbe Stunde mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser bindet an die F<sub>c</sub>-Region des Primärantikörpers und ist mit einer Peroxidase gekoppelt. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde die Membran durch eine einminütige Inkubation mit Chemilumineszenz-Lösung aktiviert. Die an die Antikörper gebundene Peroxidase katalysiert hierbei die Oxidation von Luminol wodurch es zur Chemilumineszenz kommt. Das emittierte Licht wurde genutzt, um einen Film in einer Filmkassette zu belichten. So wurden die spezifischen Proteinbanden sichtbar gemacht und konnten anschließend eingescannt und am PC mit dem Programm Quantity One quantitativ ausgewertet werden.

### **2.2.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

#### **2.2.4.1 Stimulation und RNA-Isolation**

Zur RNA-Analyse wurden die Adipozyten, wie unter 2.2.1 beschrieben, kultiviert und stimuliert. Abweichend dazu, wurde lediglich vor Versuchsbeginn auf eine Hungerphase verzichtet. Nach Ablauf der Stimulation wurde das Medium abgekippt, die Platten mit 4°C

## 2 Material und Methoden

---

kaltem PBS gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die Platten bei  $-150^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Die gefrorenen Platten wurden auf Eis gelegt und auf jede 10cm-Kulturplatte wurden 8ml Trizol gegeben. Der Zellrasen wurde mit dem Zellschaber von der Platte gelöst, die Zell-Trizol-Suspension mit einer Pipette homogenisiert und dann in ein Falcon-Röhrchen überführt. Jedem Falcon-Röhrchen wurden nun noch 1,6ml Chloroform zugegeben, die Suspension auf dem Rüttler gut vermischt und anschließend für 15 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 4500rpm zentrifugiert.

Durch dieses Vorgehen kam es zur Bildung von drei Phasen. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA und wurde zusammen mit 4ml kaltem Isopropanol in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Während einer 10 minütigen Ruhephase bei Raumtemperatur erfolgte das Fällern der RNA durch das Isopropanol. Nun wurden die Proben erneut 10 Minuten bei 4500rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die RNA war danach als Pellet auf dem Boden des Röhrchens sichtbar. Der Überstand wurde verworfen, das auf dem Boden befindliche RNA-Pellet mit 8ml 70% Ethanol (in DEPC Wasser) überdeckt und die Probe gevortext. Es wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, diesmal bei 3500rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde erneut abgekippt und das verbleibende Pellet für 5-10 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde das restliche Ethanol vorsichtig mit einem sterilen Wattestäbchen entfernt und das Pellet in 100 $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy-Kit nach Herstellerangaben. Die Qualität der gewonnenen RNA wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese und photometrisch kontrolliert. Die Photometrie diente wie bei der Proteinmessung auch der Mengenkontrolle sowie der Herstellung standardisierter Proben.

### 2.2.4.2 cDNA-Synthese

Zur quantitativen Auswertung mittels Real Time-PCR wird DNA benötigt, daher muss die gewonnene RNA zunächst in c-DNA umgeschrieben werden.

1 $\mu\text{l}$  Probe wird mit 11 $\mu\text{l}$  von Mix 1 (4nM Oligo-dT-Primer und 2,5mM dNTPs in Aqua dest.) zusammenpipettiert, zentrifugiert und anschließend für 5 Minuten auf  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Danach kommt die Probe sofort auf Eis.

Es werden nun je 8 $\mu\text{l}$  Mix 2 (50% Vol. 5x Puffer, 25mM DTT, 1,25 U/ $\mu\text{l}$  RNase Inhibitor und 25U/ $\mu\text{l}$  Super Script II in Aqua dest.) zu jeder Probe gegeben und der Ansatz zunächst für eine Stunde auf  $45^{\circ}\text{C}$  und anschließend für 15 Minuten auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

### 2.2.4.3 Real Time – PCR (RT-PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde von Mullis und Saiki entwickelt (Mullis 1990, Saiki, et al. 1988). Sie erlaubt die in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Ein

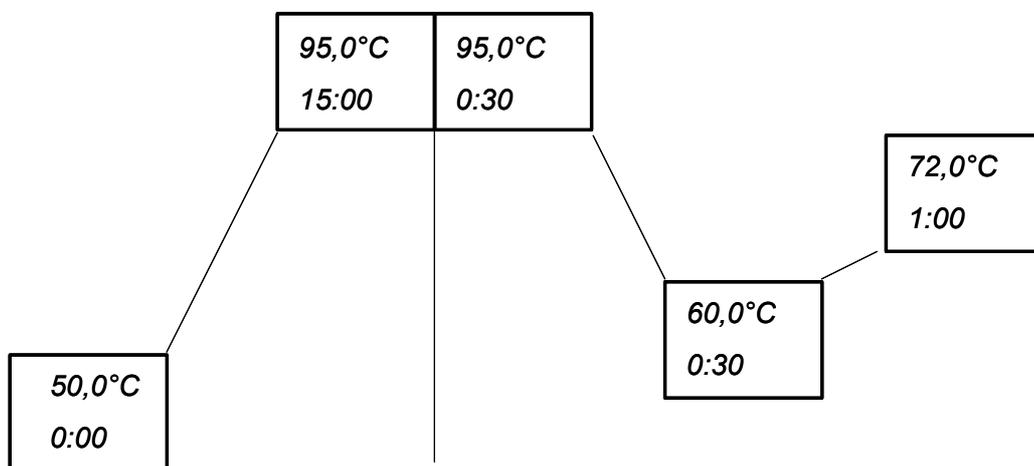
## 2 Material und Methoden

Zyklus einer PCR umfasst drei Schritte. Zuerst wird die doppelsträngige DNA denaturiert, spezifische Primer lagern sich an die Ziel-DNA-Abschnitte an (Annealing) und schließlich wird der DNA Strang mit den fehlenden Nucleotiden aufgefüllt (Elongation). Mit einer steigenden Anzahl von Zyklen erhält man auf diese Weise eine exponentiell ansteigende Menge der spezifischen Ziel-DNA.

Bei der quantitativen PCR/RT-PCR interkaliert ein Fluoreszenzfarbstoff in den Doppelstrang der neusynthetisierten DNA. Dadurch wird die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes gesteigert. Nach jedem Zyklus wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Auf diese Weise kann eine quantitative Analyse der Menge einer spezifischen Ziel-DNA erfolgen.

Für die RT-PCR wurde eine 96-well-Platte mit je 2µl Probe und 22,5µl Reaktionsansatz (55% Vol. SYBR Green Mix, 0,9mM Primer1 (Sense), 0,9mM Primer 2 (Antisense) in Aqua dest.) befüllt. Jede Probe wurde auf das Ziel-Gen und auf ein sogenanntes Housekeeping-Gen, bei unserem Versuchsansatz HPRT, hin untersucht. Das Housekeeping-Gen ist ein Gen, von dem angenommen wird, dass es unabhängig von äußeren Bedingungen in einer spezifischen Konzentration in der Zelle vorliegt. Es dient daher als Referenzwert. Für beide Gene wurden Doppelmessungen durchgeführt.

Anschließend wurde die RT-PCR nach einem spezifischen Protokoll über 40 Amplifikationszyklen durchgeführt.



**Abb. 3: Temperatur- und Zeit-Protokoll für die RT-PCR**

Gültig für die Untersuchung von UCP-1, Leptin und Adiponektin

Die Zeitangabe ist in Minuten

Anschließend wurde eine statistische Auswertung der gewonnenen Messwerte mit dem Relative Expression Software Tool (REST©) vorgenommen (Pfaffl, et al. 2002).

## 2 Material und Methoden

---

### 2.2.5 Glukoseaufnahme-Messung

Die Glukoseaufnahme-Messung erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Klein etablierten Protokoll. Die verwendete 2-Desoxy-[<sup>3</sup>H]Glukose ist für diese Versuche besonders geeignet, da sie sich in den Zellen anreichert und nicht durch die Hexokinase weiter verstoffwechselt wird.

Für die Messung der Glukoseaufnahme wurden Adipozyten in 12-Loch-Platten kultiviert. Die Kultur und Stimulation erfolgte unter den in 2.2.1 beschriebenen Bedingungen. Für jede Versuchsbedingung erfolgten drei gleiche Versuchsansätze, um durch eine Dreifachmessung eventuelle Messfehler auszugleichen.

Nach Ende der Stimulationszeit (bei Langzeitstimulation) mit z.B. Aldosteron wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1ml KRH gewaschen. Dann wurden pro Vertiefung 450µl KRH vorgelegt. Die Kurzzeitstimulation, z.B. mit Insulin, fand nun in KRH statt. Vier Minuten vor Ende der Stimulationszeit wurden pro Vertiefung 50µl einer 1mM 2- Desoxyglukoselösung mit 5µCi/ml 2-Desoxy-[<sup>3</sup>H]Glukose (Radioaktive Endkonzentration: 500 nCi/ml) zugegeben.

Nach Ablauf der vier Minuten wurde die Flüssigkeit abgegossen und die Reaktion durch Waschen mit kaltem PBS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500µl SDS (0,1%) lysiert. Die Lysate wurden in Szintillationsröhrchen überführt und 2ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Die radioaktive Aktivität wurde in einem β-Szintillationszähler gemessen.

### 2.2.6 Statistische Auswertung

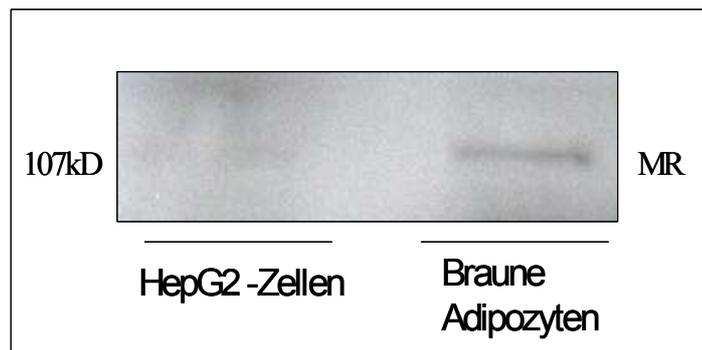
Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte mit Standard-Fehler. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der ungepaarte Student-t-Test verwendet. Ein p-Wert von <0,05 gilt als statistisch signifikant und ist in dieser Arbeit mit \* gekennzeichnet. Ein p-Wert von <0,01 gilt als statistisch hoch signifikant und ist in dieser Arbeit mit \*\* gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Sigma Plot 7.0.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis des MR in braunen Adipozyten

Das Vorhandensein des MR, als klassischem Vermittler der Aldosteronwirkung, ist eine wichtige Grundvoraussetzung für alle weiteren Untersuchungen. Zwar konnte der MR bereits in einer braunen Fettzelllinie nachgewiesen werden (Zennaro, et al. 1998). Da es sich bei dieser Zelllinie jedoch um eine aus transgenen Mäusen gewonnene Tumorzelllinie handelt, sind diese Ergebnisse möglicherweise nicht direkt auf das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell übertragbar. Der Nachweis des MR in unserem Zellmodell stellt den Startpunkt der hier vorgelegten Arbeit dar.

Als Nachweismethode wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, um den Rezeptor auf Proteinebene zu detektieren. Aufgetrennt wurden Totallysate von vollständig differenzierten braunen Adipozyten und HepG2-Zellen. HepG2-Zellen exprimieren keinen MCR und dienen daher als Negativkontrolle.



**Abb.4: MCR Immunoblot**

Immunoblotting vollständig differenzierter brauner Adipozyten und HepG2-Zellen im Vergleich

Die rechte Spur stellt das Totallysat der braunen Adipozyten dar. Hier findet sich bei 107kDa, entsprechend dem MR (Pascual-Le Tallec und Lombes 2005), eine deutliche Bande. In der Negativkontrolle (HepG2-Zellen) ist diese Bande nicht nachzuweisen. (Abb. 4).

In den in dieser Arbeit verwendeten braunen Adipozyten kann also im Gegensatz zu HepG2-Zellen der MR mittels Westernblot nachgewiesen werden. Damit stellt auch diese braune Fettzelllinie ein potentielles Zielgewebe für Aldosteroneinflüsse dar.

Im Weiteren werden nun die Einflüsse von Aldosteron auf die drei entscheidenden Funktionen brauner Fettzellen, die metabolische Fettzellfunktion, die Thermogenese und die Adipokinexpression, näher untersucht.

### **3.2 Aldosteron induziert Insulinresistenz**

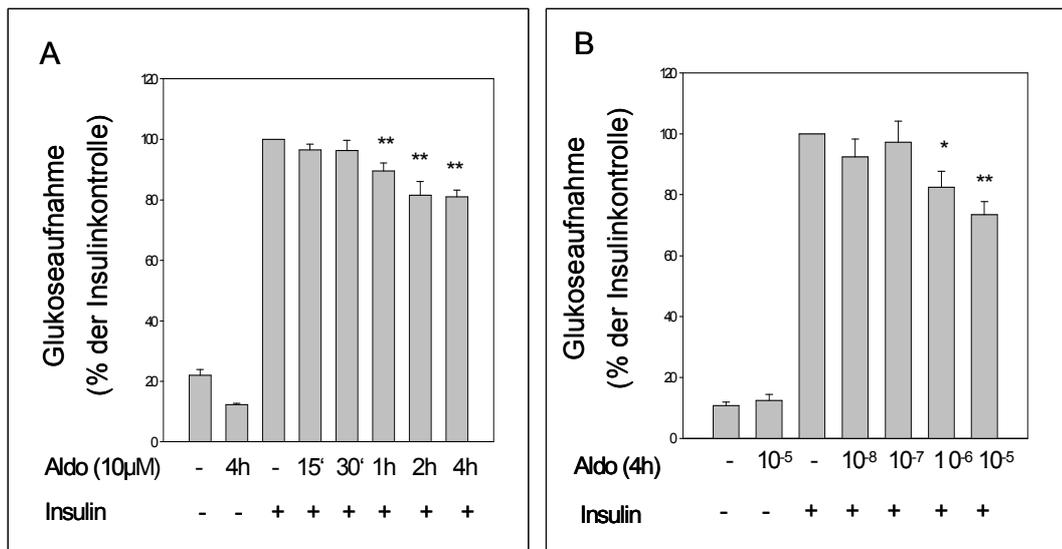
#### **3.2.1 Aldosteron führt zu einer Reduktion der insulininduzierten Glukoseaufnahme**

Die insulininduzierte Glukoseaufnahme ist ein wichtiger Beitrag des Fettgewebes zur Aufrechterhaltung stabiler Blutzuckerwerte und einer Energiehomöostase. Eine Beeinträchtigung der Glukoseaufnahme und damit eine gestörte Glukosetoleranz sind entscheidende Faktoren bei der Entstehung von Störungen im Energiehaushalt und dem Metabolischen Syndrom.

In dem verwendeten Zellmodell war nach einer Stimulation mit Insulin (100nM) für 30 Minuten eine Verfünffachung der basalen Glukoseaufnahmerate zu beobachten (Abb. 5). Eine alleinige Aldosteronstimulation hatte keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme. Eine Co-Stimulation mit Aldosteron und Insulin führte bereits nach einer Stunde zu einer Reduktion der insulininduzierten Glukoseaufnahme um ca. 10%. Dieser Effekt war zeitabhängig mit einer maximalen Reduktion von 25% nach 4 Stunden (Abb. 5A).

Wie in Abbildung 5B zu sehen, ist der beschriebene Aldosteroneffekt auf die Glukoseaufnahme nicht nur zeit-, sondern auch dosisabhängig. Bei einer Stimulationsdauer von 4 Stunden zeigte sich bei Konzentrationen von 1 $\mu$ M eine statistisch signifikante und bei 10 $\mu$ M eine statistisch hoch signifikante Verminderung der insulininduzierten Glukoseaufnahme im Vergleich zu nur mit Insulin stimulierten Zellen.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 5: Glukoseaufnahme nach Stimulation mit Aldosteron**

**A:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 4 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt und dann für 30 Minuten mit 100nM Insulin co-stimuliert. Anschließend wurde die Menge der aufgenommenen Glukose gemessen.

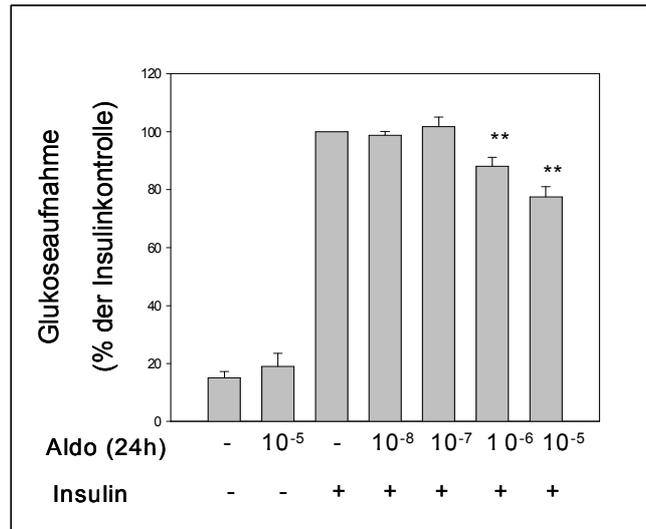
**B:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden 4 Stunden mit verschiedenen Aldosteronkonzentrationen behandelt und dann für 30 Minuten mit 100nM Insulin co-stimuliert. Ein Glukoseaufnahme Assay wurde durchgeführt.

Die Graphiken zeigen die Ergebnisse von mindestens vier unabhängigen Experimenten, wobei \*  $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  bedeutet, im Vergleich zum Kontrollwert (nur Insulin stimulierte Zellen)

Dieser Effekt ist nicht nur über einen Zeitraum von 4 Stunden nachweisbar, sondern ist auch nach 8h bzw. 24h weiterhin sichtbar. Allerdings führte eine längere Stimulation zu keiner weiteren Reduktion der Glukoseaufnahme. Jedoch blieb der gesehene Effekt einer 25%igen Reduktion im Vergleich zur ausschließlichen Stimulation mit Insulin erhalten (Abb. 6).

Es zeigt sich nach 24 Stunden sogar bei Konzentrationen von 1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M eine hoch signifikante Reduktion.

## 3 Ergebnisse



**Abb. 6: Glukoseaufnahme nach Stimulation mit Aldosteron**

Vollständig differenzierte Adipozyten wurden 24 Stunden mit verschiedenen Aldosteronkonzentrationen behandelt und dann für 30 Minuten mit 100nM Insulin co-stimuliert. Ein Glukoseaufnahme Assay wurde durchgeführt.

Die Graphik zeigt die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten, wobei  $**p < 0,01$  bedeutet, im Vergleich zu Zellen, die allein mit Insulin behandelt wurden.

### 3.2.2 Aldosteron vermindert die Phosphorylierung wichtiger Elemente der Signalkaskade am Insulinrezeptor

Durch Aktivierung des Insulinrezeptors werden über verschiedene Signalkaskaden unterschiedliche Endpunkte wie Glukoseaufnahme, Lipolyse, Glykogensynthese und Zellwachstum/ Apoptose reguliert (Klein, et al. 2002).

Die Glukoseaufnahme wird u.a. durch die Aktivierung einer Signalkette über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (PKB) gesteuert. An deren Ende steht die Translokation von Glukosetransportern (GLUT4) in die Zellmembran.

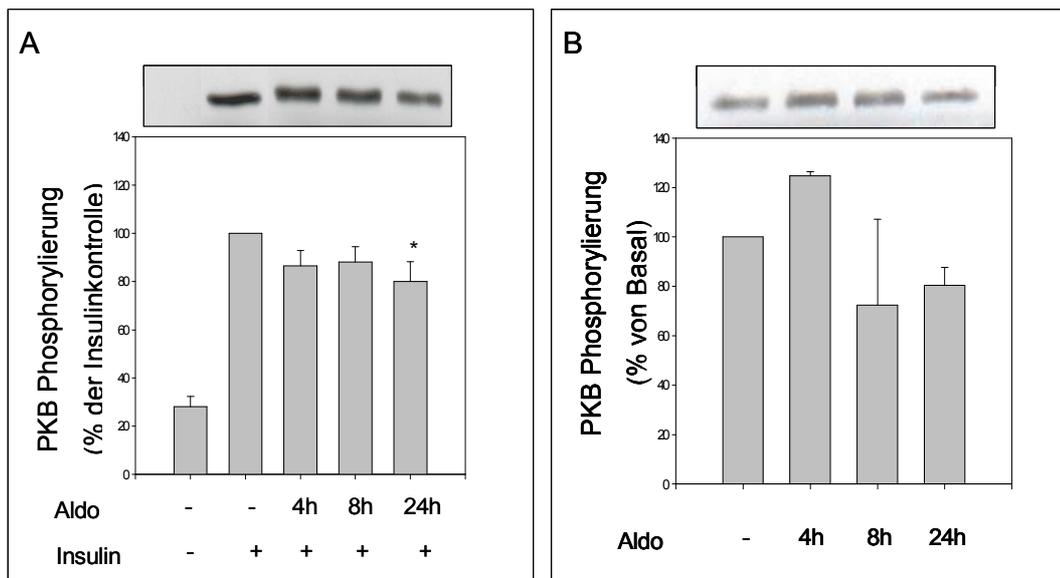
In der Signalkaskade erfolgt die Signalweitergabe durch die Phosphorylierung der einzelnen Elemente (Schinner, et al. 2005). Bei PKB /Akt geschieht die Aktivierung über Phosphorylierung an zwei unterschiedlichen Aminosäureresten, am Threonin 308 und am Serin 473 (Alessi, et al. 1996).

Die Behandlung vollständig differenzierter brauner Adipozyten mit Aldosteron führte schon nach 4 Stunden zu einer deutlichen, wenn auch nicht signifikanten, Abnahme der insulininduzierten Phosphorylierung von PKB. Diese erreichte nach 24 Stunden ihr Maximum ( $p < 0,05$ ) von ca. 20% (Abb. 7A).

### 3 Ergebnisse

Bei alleiniger Stimulation mit Aldosteron kommt es nach vier Stunden zu einer Zunahme der PKB Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu ist nach 8 bzw. 24 Stunden eine Abnahme der Phosphorylierung messbar. Eine statistische Signifikanz wird aufgrund der geringen Fallzahl nicht erreicht (Abb. 7B).

Die Proteinmenge der PKB wurde bei allen Versuchen zur Kontrolle mitbestimmt, dabei zeigten sich keine relevanten Veränderungen.



**Abb. 7: PKB Phosphorylierung nach Stimulation mit Aldosteron**

**A:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt und dann für 10 Minuten mit 100nM Insulin co-stimuliert. Eine Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt.

Die Graphik zeigt die Ergebnisse von sieben unabhängigen Experimenten, wobei \* $p < 0,05$  bedeutet, im Vergleich zu Zellen, die allein mit Insulin behandelt wurden.

**B:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt. Eine Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen PKB/Akt (Ser 473)-Antikörpern wurde durchgeführt. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Protein Kinase B ist ein Knotenpunkt vieler Signalkaskaden. Ihre Regulation hat nicht nur Auswirkungen auf die Glukoseaufnahme, sondern hat auch Konsequenzen für andere zelluläre Mechanismen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung der GSK3, einer von PKB regulierten Kinase, die an der Steuerung der Glykogensynthese beteiligt ist, analysiert.

GSK3 wird als Antwort auf die Insulinstimulation durch die PKB phosphoryliert und dadurch inhibiert (Groom, et al. 1996). Eine zunehmende Phosphorylierung bedeutet also eine abnehmende Aktivität der Kinase und umgekehrt.

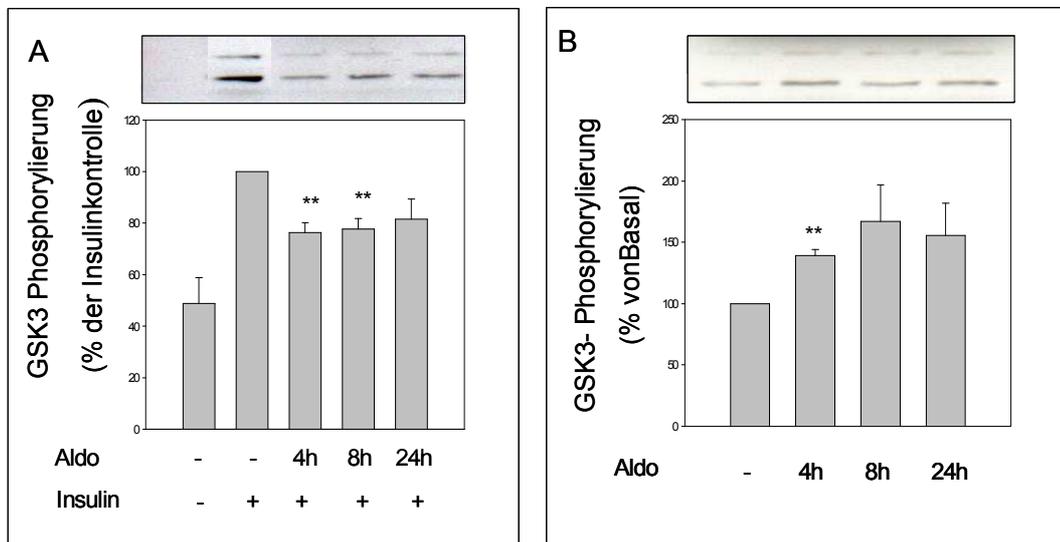
### 3 Ergebnisse

Entsprechend der Analyse der PKB-Aktivität wurden die vollständig differenzierten Zellen bis zu 24h mit Aldosteron stimuliert, abschließend kurzzeitig mit Insulin co-stimuliert und dann der Grad der GSK3-Phosphorylierung bestimmt.

Wie erwartet zeigt sich eine Reduktion der insulininduzierten GSK3-Phosphorylierung um gut 20%. Diese Reduktion war schon nach 4 Stunden hochsignifikant nachweisbar und blieb bis zu 24 Stunden annähernd konstant (Abb. 8A).

Eine Stimulation nur mit Aldosteron führte hingegen nach 4 Stunden zu einem hoch signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von GSK3 um ca. 35 %. Im Zeitverlauf kam es zu einem weiteren, wenn auch nicht mehr signifikanten, Anstieg der GSK3 Phosphorylierung (Abb. 8B).

Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde die GSK3-Menge mitbestimmt.



**Abb. 8: GSK3 Phosphorylierung nach Stimulation mit Aldosteron**

**A:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt und dann für 10 Minuten mit 100nM Insulin co-stimuliert. Eine Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt. Die Graphiken zeigen die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten, wobei \*\* $p < 0,01$  bedeuten, im Vergleich zu Zellen, die allein mit Insulin behandelt wurden.

**B:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt. Eine Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen GSK3-Antikörpern wurde durchgeführt. Die Graphiken zeigen die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten, wobei \*\* $p < 0,01$  bedeutet, im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3 Ergebnisse

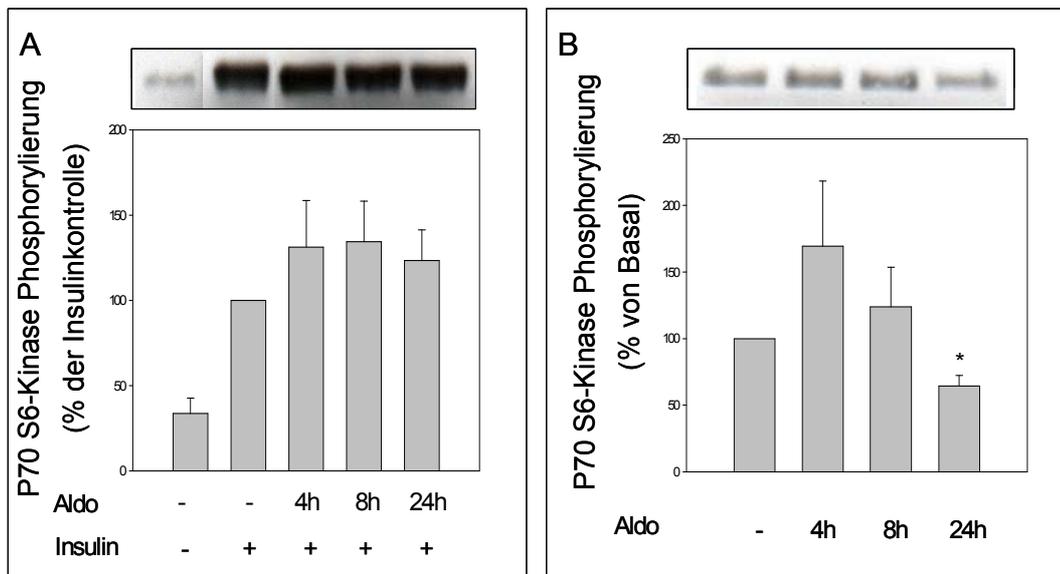
Die p70 S6-Kinase (p70 S6K) ist ein weiteres, PKB nachgeordnetes, wichtiges Element des Insulinsignalweges. Das Substrat dieser Kinase ist das ribosomale Protein 6, dessen Phosphorylierung führt zur Steigerung der Proteinsynthese an den Ribosomen. Die p70S6K spielt daher eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation (Hansen und Kristiansen 2006).

Die Untersuchung der Aldosteroneinflüsse auf die Phosphorylierung der p70 S6K wurde analog zu den vorbeschriebenen Untersuchungen vorgenommen.

Es konnte kein signifikanter Effekt von Aldosteron auf die insulininduzierte Steigerung der p70 S6K-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 9A).

Eine alleinige Stimulation mit Aldosteron führte hingegen nach 24 Stunden zu einer Reduktion der p70 S6K-Phosphorylierung um fast 50% (Abb. 9B).

Wie schon bei den vorhergehenden Experimenten wurde die Proteinmenge zur Kontrolle mitbestimmt.



**Abb. 9: p70 S6K Phosphorylierung nach Stimulation mit Aldosteron**

**A:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt und dann für 10 Minuten mit 100nM Insulin co-stimuliert. Eine Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt.

**B:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt. Eine Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen p70 S6K-Antikörpern wurde durchgeführt. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, wobei \* $p < 0,05$  bedeutet, im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

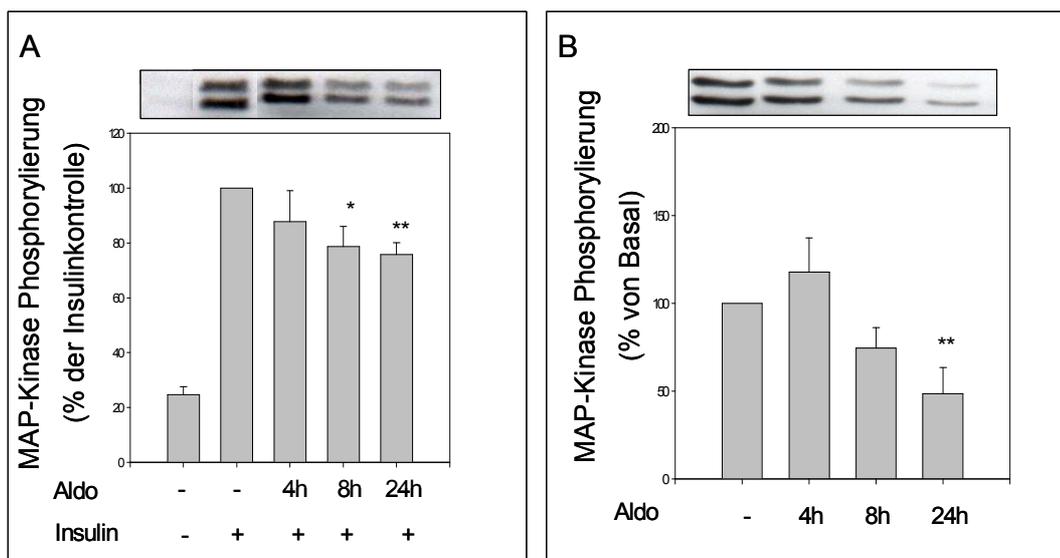
### 3 Ergebnisse

Ein weiterer wichtiger Signalweg, ausgehend vom Insulinrezeptor, ist MAP-Kinasen vermittelt und reguliert u.a. das Zellwachstum. Dies geschieht PI3K unabhängig.

Die am besten bekannten MAP-Kinasen sind die 42 und 44kDa Isoformen (ERK 1+2).

Um zu untersuchen ob Aldosteron auch Einfluss auf diesen Teil der insulininduzierten Signaltransduktion hat, wurde die Phosphorylierung an MAP-Kinasen bestimmt. Die Stimulation erfolgte nach dem bereits bekannten Stimulationsschema mit Aldosteron und Insulin in Co-Stimulation.

Auch die insulininduzierte Phosphorylierung von 42/44 MAPK war bereits nach einer Stimulation mit Aldosteron für 4 Stunden sichtbar reduziert. Diese Reduktion nahm zeitabhängig immer stärker zu. Nach 8 Stunden war ein statistisch signifikanter Effekt nachweisbar, der nach 24 Stunden sein Maximum von ca. 25% erreichte (Abb 10A). Dieser Effekt war nach 24 Stunden auch bei einer alleinigen Stimulation mit Aldosteron zu sehen. Hier fiel er mit einer maximalen Reduktion von 50% sogar noch ausgeprägter aus (Abb. 10B). In beiden Fällen wurden die Ergebnisse über die Gesamtproteinmenge normalisiert.



**Abb. 10: MAPK Phosphorylierung nach Stimulation mit Aldosteron**

**A:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt und dann für 10 Minuten mit 100nM Insulin co-stimuliert. Eine Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten, wobei \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  bedeuten, im Vergleich zu Zellen, die allein mit Insulin behandelt wurden.

**B:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden bis zu 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Aldosteron behandelt. Eine Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen 42/44 MAPK-Antikörpern wurde durchgeführt. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten, wobei \*\* $p < 0,01$  bedeutet, im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

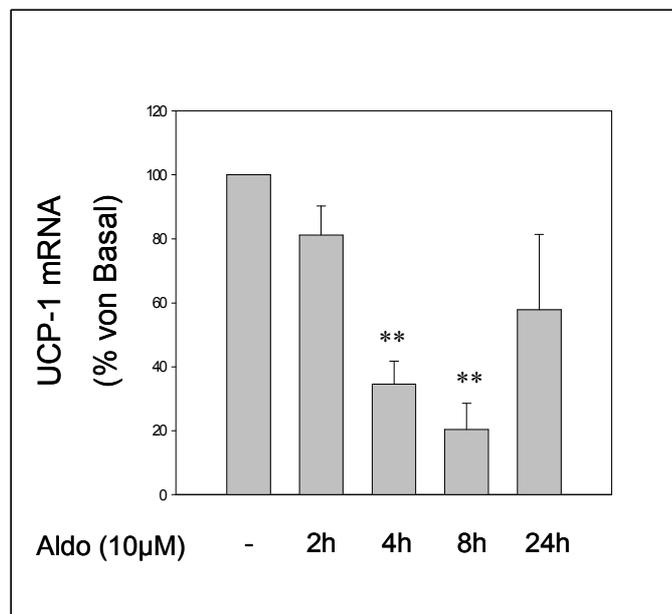
## 3 Ergebnisse

### 3.3 Aldosteron inhibiert die Expression von UCP-1

Die Thermogenese, vermittelt durch das Protein UCP-1, ist eine spezifische Eigenschaft der braunen Adipozyten, sie ist ein wichtiger Regulator im Energiestoffwechsel (Klein, et al. 2006).

Um den putativen Einfluss von Aldosteron auf den Energiestoffwechsel zu überprüfen, wurde zunächst die Expression von UCP-1, als wichtigem Regulator, unter Aldosteroneinfluss überprüft.

Die Stimulation voll-differenzierter brauner Adipozyten mit 10µM Aldosteron führte bereits nach 4 Stunden zu einer statistisch hoch signifikanten Reduktion der UCP-1 m-RNA Expression um über 60% im Vergleich zur basalen UCP-1 mRNA Expression. Der Effekt ließ sich durch eine längere Stimulationsdauer noch steigern. Nach 8h war mit einer 80%igen Reduktion der UCP-1 Expression das Maximum erreicht (Abb.11). Nach 24h war kein signifikanter Effekt mehr nachweisbar.



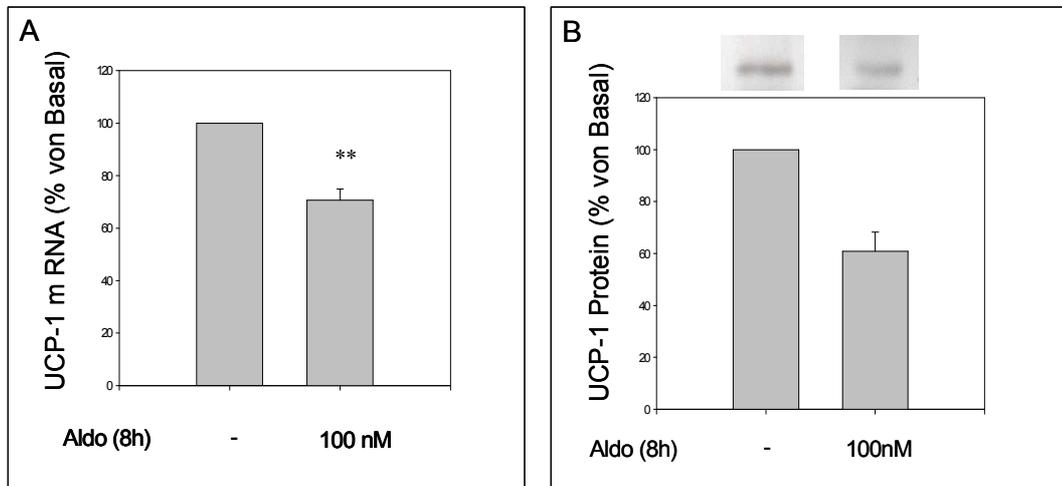
**Abb. 11: UCP-1 mRNA Expression:** Vollständig differenzierte Adipozyten wurden für die angegebene Zeitspanne mit 10µM Aldosteron behandelt, anschließend wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von sechs unabhängigen Experimenten, wobei \*\*  $p < 0,01$  bedeutet, im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Der gesehene Effekt war sowohl zeit- als auch dosisabhängig. Bei einer Stimulation mit 100nM war nach 8 Stunden eine 30%ige Reduktion der UCP-1 Expression ( $p < 0,01$ ) nachweisbar (Abb. 12A).

Auch auf Proteinebene war der auf Transkriptionsebene gesehene Effekt als Tendenz nachvollziehbar. Bei der Western-Blot-Analyse von Totallysaten vollständig differenzierter Zellen, nach Stimulation mit 100 nM Aldosteron für 8 Stunden, zeigte sich eine Reduktion

### 3 Ergebnisse

der Proteinmenge von UCP um ca. 40% im Vergleich zur basalen Proteinmenge nicht stimulierter Zellen (Abb. 12B). Eine statistische Signifikanz wurde aufgrund der geringen Fallzahl nicht erreicht.



#### Abb. 12A. UCP-1 mRNA Expression

Vollständig differenzierte Adipozyten wurden für die angegebene Zeitspanne mit 100nM Aldosteron behandelt, anschließend wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, wobei \*\*  $p < 0,01$  bedeutet, im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

#### Abb. 12B UCP-1 Immunoblot

Vollständig differenzierte Adipozyten wurden für die angegebene Zeitspanne mit 100nM Aldosteron behandelt. Die Totallysate der Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet, und UCP-1 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.4 Aldosteron hat keinen Einfluss auf die Differenzierung

Um differenzierungsabhängige Effekte von Aldosteron auszuschließen, wurden die Zellen entweder chronisch mit Aldosteron stimuliert oder unbehandelt gelassen. An Tag 0, 3 und 6 ab Induktion wurde die fettspezifische Oil-Red-O Färbung durchgeführt. Sie gibt Aufschluss über die Fetteinlagerung in die Zellen und somit über die Differenzierung.

Nach chronischer Behandlung mit Aldosteron war kein Einfluss auf die Differenzierung erkennbar. Behandelte Zellen und Kontrollzellen zeigten eine gleiche Fetteinlagerung (Abb. 13).



**Abb. 13: Differenzierung nach Aldosteron-Stimulation**

Oil-Red-O gefärbte Zellen am angegebenen Tag der Differenzierung entweder nach chronischer Stimulation mit 10 $\mu$ M Aldosteron oder unbehandelt

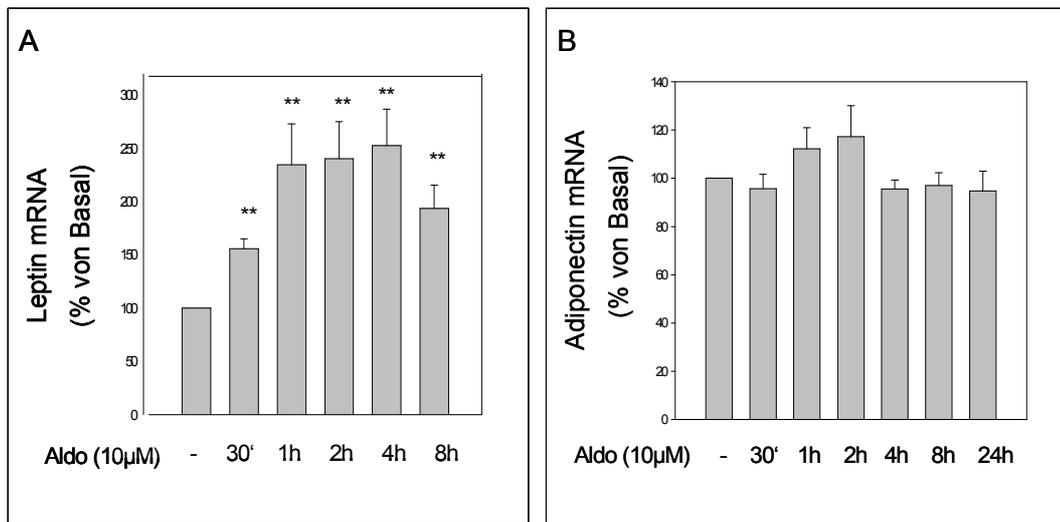
### 3.5 Aldosteroneinflüsse auf die Adipokinexpression

Um zu analysieren, ob Aldosteron die Expression der verschiedenen Adipokine beeinflusst, wurden voll-differenzierte Zellen für eine Zeitspanne von 30 Minuten bis 24 Stunden mit Aldosteron behandelt und anschließend mittels quantitativer PCR ihre Expressionsmuster gemessen. Als klassische Vertreter der Adipokine wurden in dieser Arbeit Leptin und Adiponektin untersucht.

Bereits nach einer Stimulationsdauer von 30 Minuten kam es zu einem hoch signifikanten Anstieg der Leptinexpression um das 1,5 fache. Nach 1 Stunde erreichte dieser Anstieg mit einem 2,5 fachen Wert im Vergleich zur basalen Leptinexpression sein Maximum. Nach 8 Stunden Stimulationsdauer war der Effekt rückläufig. Es ließ sich jedoch immer noch eine hoch signifikante Steigerung der Leptinexpression um das 2 fache der basalen Expressionsrate nachweisen (Abb. 14A).

### 3 Ergebnisse

Die Expression von Adiponektin zeigte im Gegensatz zu Leptin keine signifikanten Veränderungen unter dem Einfluss von Aldosteron (Abb. 14B).



#### Abb. 14A: Leptin mRNA Expression

Volldifferenzierte Adipozyten wurden für die angegebene Zeitspanne mit 10µM Aldosteron behandelt, anschließend wurde eine quantitative PCR durchgeführt.

#### Abb. 14B: Adiponektin mRNA Expression

Volldifferenzierte Adipozyten wurden für die angegebene Zeitspanne mit 10µM Aldosteron behandelt, anschließend wurde eine quantitative PCR durchgeführt.

Die Graphiken zeigen die Ergebnisse von mindestens vier unabhängigen Experimenten, wobei \*\*  $p < 0,01$  bedeutet, im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 4 Diskussion

Aldosteron ist ein wichtiger Regulator des Salz-Wasser-Haushaltes. Erhöhte Aldosteronwerte gehen häufig mit erhöhten Blutdruckwerten und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung anderer kardiovaskulärer Erkrankungen einher (Rocha und Stier 2001). Außerdem sind erhöhte Serumaldosteronwerte häufig mit gestörter Glukosetoleranz und Diabetes vergesellschaftet (Colussi, et al. 2007). All diese Symptome bilden zusammen mit Adipositas eines der wichtigsten Krankheitsbilder unserer Zeit, das Metabolische Syndrom (Isomaa 2003).

Personen mit Metabolischem Syndrom zeigen gehäuft erhöhte Serumaldosteronwerte (Engeli, et al. 2005). Bisher ist nur wenig über die direkten Einflüsse von Aldosteron auf das Fettgewebe bekannt. Ein besseres Verstehen der Wirkungen und Wirkwege von Aldosteron im Fettgewebe könnte neue Therapieoptionen für das Metabolische Syndrom eröffnen. In dieser Arbeit konnten wir einen direkten Einfluss von Aldosteron auf die metabolische und endokrine Fettzellfunktion nachweisen.

#### 4.1 Fettgewebe als Zielgewebe des Aldosteroneinflusses

Bereits 1998 hat eine Arbeitsgruppe um Lombes das braune Fettgewebe als neues Zielgewebe der Aldosteronwirkung identifiziert. Transgene Mäuse, bei denen der MR-Promoter mit dem SV40T-Gen gekoppelt war, starben vorzeitig an großen Hibernomen. Aus den Tumorzellen wurde eine Zelllinie entwickelt, in der dann auch der Nachweis des MR gelang (Zennaro, et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir den MR in einer ausführlich charakterisierten braunen Fettzelllinie nachweisen. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Zellen handelt es sich bei diesen Zellen nicht um eine Tumorzelllinie. Dies bietet den Vorteil, dass es sich nicht um „entartete“ Zellen mit einem veränderten Wachstumsverhalten handelt. So ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse besser auf natives Fettgewebe übertragbar sind.

Als Negativkontrolle wurden in der vorliegenden Arbeit HepG2-Zellen verwendet, da sie keinen MR Rezeptor exprimieren.

### **4.2 Aldosteron inhibiert die klassische Fettzellfunktion**

Die insulinabhängige Glukoseaufnahme ist eine klassische Funktion des Fettgewebes. Eine gestörte Glukosetoleranz ist neben Adipositas einer der wichtigen Risikofaktoren beim Metabolischen Syndrom. Glukoseintoleranz ist auch ein häufig beobachtetes Symptom bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus (Corry und Tuck 2003).

#### **4.2.1 Aldosteron beeinflusst die insulininduzierte Glukoseaufnahme**

In dieser Arbeit konnte ein direkter Einfluss von Aldosteron auf die insulininduzierte Glukoseaufnahme nachgewiesen werden. Unter der Einwirkung von Aldosteron wird die insulininduzierte Glukoseaufnahme in unserem braunen Fettzellmodell in einer zeit- und dosisabhängigen Weise gehemmt.

Eine Reduktion der Glukoseaufnahme ist ab einer Aldosteronkonzentration von  $1\mu\text{M}$  signifikant und wird bei einer Dosissteigerung auf  $10\mu\text{M}$  hochsignifikant. Die hier verwendete Aldosterondosis liegt also in einem nicht-spezifischen Bereich, so dass eine Co-Aktivierung des GR durch Aldosteron möglich ist (Hellal-Levy, et al. 1999).

2009 konnte die Arbeitsgruppe um T. Wada die von uns für braune Adipozyten erhobenen Daten für weiße 3T3-L1 Adipozyten bestätigen. Sie zeigten für die gleichen Aldosteronkonzentrationen ( $1\mu\text{M}$  und  $10\mu\text{M}$ ) eine Abnahme der insulininduzierten Glukoseaufnahme. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine chronische Aldosteronstimulation mit einer Reduktion der Proteinmenge und Phosphorylierung von Insulinrezeptorsubstrat 1 und 2 (IRS1 und IRS2) einherging. Diese aldosteron-induzierte Degradierung von IRS1 und IRS2 war durch Vorbehandlung der Zellen mit RU486, einem selektiven GR-Antagonisten, aufzuheben, nicht jedoch durch Vorbehandlung mit Eplerenon, einem selektiven MR-Antagonisten, zu beeinflussen (Wada, et al. 2009).

Untersuchungen an primären humanen Adipozyten konnten für Aldosteronkonzentrationen von  $10\mu\text{M}$  eine Reduktion der insulininduzierten Glukoseaufnahme nachweisen. Es zeigte sich in diesem Adipozytenmodell auch eine Reduktion der basalen Glukoseaufnahme durch Aldosteron. Hydrocortison führte ebenfalls in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  zu einer Verminderung der basalen und insulininduzierten Glukoseaufnahme. Sowohl die durch Aldosteron als auch die durch Hydrocortison induzierte Abnahme der Glukoseaufnahme war durch RU486 nicht jedoch durch Eplerenon antagonisierbar. Der Effekt auf die basale Glukoseaufnahme war nicht zu antagonisieren (Urbanet, et al. 2010).

Aldosteron scheint also in hohen Konzentrationen nicht selektiv über den MR zu wirken, sondern auch über andere Wege, wie z.B. eine Aktivierung des GR, seine Wirkung zu entfalten.

## 4 Diskussion

---

Dafür sprechen auch von der Arbeitsgruppe um Sindelka publizierte Patientendaten. So konnte bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus und gestörter Glukosetoleranz, diese durch eine operative Normalisierung des Aldosteronspiegels (durch Adrenektomie bei NNR-Adenom) ausgeglichen werden. Eine pharmakologische Therapie mit Spironolacton (selektiver MR-Antagonist) zeigte nicht die erwünschte Wirkung einer Normalisierung der metabolischen Situation (Sindelka, et al. 2000).

Es existieren jedoch auch Daten, die für eine MR-vermittelte Aldosteronwirkung auf die Glukoseaufnahme sprechen. Die Arbeitsgruppe um Hirata veröffentlicht 2009 *in vivo* und *in vitro* Daten aus dem Mausmodell. Dabei zeigte sich eine deutliche Besserung der Insulinresistenz bei *ob/ob*-Mäusen durch ein Blockieren des MR mit Eplerenon (Hirata, et al. 2009).

Eine Beeinträchtigung der Insulinsensitivität von Adipozyten wird durch unsere Daten und die Daten anderer Arbeitsgruppen gezeigt. Über welche Signalwege diese vermittelt wird ist noch unklar. Einiges spricht für eine Beteiligung von GR und MR.

Weiterhin geben die im Zellmodell für einen signifikanten Effekt nötigen hohen Aldosteronkonzentrationen, die weit über den physiologischen Konzentrationen liegen, weitere Fragen auf. Die Arbeitsgruppe um Urbanet sieht in den hohen Konzentrationen eher einen Widerspruch zu der Annahme, dass Fettzellen *in vivo* einen Anteil an der mit primärem Hyperaldosteronismus einhergehenden Insulinresistenz haben. Da sie nicht davon ausgehen, dass solche Konzentrationen *in vivo* erreicht werden (Urbanet, et al. 2010).

Es gibt aber auch gute Argumente, die dafür sprechen, dass die Daten Erklärungsgrundlage für in Tierversuchen und Patientenstudien gesehene Effekte sein können. Zum einen sind häufig *in vivo* und *in vitro* unterschiedliche Konzentrationen nötig, da *in vivo* viele verschiedene Regelkreise synergistisch wirken können, die *in vitro* nicht zum Tragen kommen. Zum anderen gibt es auch von der Arbeitsgruppe um Wada vertretene Argumente, die für eine lokal höhere Aldosteronkonzentration im Fettgewebe im Vergleich zum Serum sprechen. Fettgewebe wäre für das stark lipophile Aldosteron ein idealer Akkumulationsort. Es gibt Hinweise auf eine lokale Produktion von Aldosteron in einigen Organen z.B. im Herzen (Silvestre, et al. 1999). Adipositas führt zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Fettgewebe mit einer vermehrten Ansammlung von Makrophagen (Wellen, et al. 2003). Makrophagen sezernieren unter dem Einfluss von Angiotensin II und teilweise auch durch MR-Aktivierung Aldosteron (Miura, et al. 2006, Wada, et al. 2009). Lokal erhöhte Aldosteronkonzentrationen, die auch über den GR wirken könnten, liegen also durchaus im Bereich des Möglichen.

## 4 Diskussion

---

Um zu klären über welche intrazellulären Signalwege die Beeinflussung der Insulinsensitivität durch Aldosteron vermittelt sein könnte, haben wir die vom IR abhängigen Signalwege untersucht.

### 4.2.2 Aldosteron beeinflusst die Signaltransduktion

#### 4.2.2.1 Einflüsse auf den PKB-Signalweg

In Übereinstimmung mit den zur Glukoseaufnahme erhobenen Daten konnten wir in unserem Fettzellmodell eine Reduktion der Phosphorylierung wichtiger Signalelemente der Insulinrezeptorsignalkaskade zeigen. Insbesondere zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der Phosphorylierung von PKB/Akt.

PKB, vor allem die PKB  $\beta$ -Isoform, ist ein wichtiges Signalelement bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomeostase (Gonzalez und McGraw 2009). PKB $\beta$  (Akt2)-*knockout* Mäuse zeigen eine deutlich gestörte Glukosetoleranz und einige entwickeln einen manifesten Diabetes (Cho, et al. 2001, Garofalo, et al. 2003). Auch beim Menschen zeigte sich die Bedeutung von PKB $\beta$  (Akt2) für die Glukosehomeostase. In einer Familie mit einer hereditären autosomal dominanten Mutation der PKB $\beta$  (Akt2) zeigten alle betroffenen Personen mindestens eine gestörte Glukosetoleranz mit begleitender Hyperinsulinämie und manche entwickelten frühzeitig einen manifesten Diabetes mellitus Typ II (George, et al. 2004).

Auch die Arbeitsgruppe um Wada zeigte in ihrem weißen Fettzellmodell eine signifikante Reduktion der insulininduzierten Phosphorylierung aller drei PKB Isoformen durch Aldosteron (Wada, et al. 2009).

Die GSK 3 befindet sich in der Insulinsignalkaskade distal der PKB und wird durch diese phosphoryliert und damit inaktiviert. Erhöhte GSK 3 Aktivität konnte im Fettgewebe insulinresistenter bzw. diabetischer Mäuse nachgewiesen werden (Eldar-Finkelman, et al. 1999). Des Weiteren entwickeln transgene Mäuse, die GSK 3 im Muskel überexprimieren, eine Glukoseintoleranz (Pearce, et al. 2004). Erhöhte GSK 3 Aktivität scheint einen wichtigen Beitrag bei der Entstehung von Insulinresistenz zu leisten. Dafür sprechen auch Studien, die einen positiven Effekt von GSK 3-Inhibitoren auf die Insulinsensitivität nahe legen (Ring, et al. 2003).

Passend zu den zu PKB erhobenen Daten können wir auch für GSK 3 eine Verminderung der insulininduzierten Phosphorylierung nachweisen.

Aldosteron führt also zur Abnahme der insulininduzierten GSK 3 Hemmung und fördert damit das Entstehen von Insulinresistenz.

## 4 Diskussion

---

Ein weiteres Signalelement distal der PKB ist die ribosomale Proteinkinase p70 S6. Die p70 S6-Kinase spielt eine wesentliche Rolle bei der Zellproliferation.

Zudem zeigen Studien mit p70 S6-defizienten Mäusen, dass diese kleiner sind und eine Hypoinsulinämie aufgrund einer reduzierten  $\beta$ -Zellmasse im Pankreas aufweisen (Pende, et al. 2000). Trotzdem deuten andere Ergebnisse daraufhin, dass diese Mäuse vor Adipositas geschützt sind und über eine gute Insulinsensitivität verfügen. Dies wird über ein Fehlen der negativen Rückkopplungsschleife von p70 S6 auf IRS-1 und IRS-2 erklärt. Passend zu diesen Ergebnissen konnte bei Wildtyp Mäusen mit hochkalorischer Diät und *ob/ob*-Mäusen eine erhöhte Phosphorylierung von p70 S6 nachgewiesen werden (Um, et al. 2004). Zudem konnten im weißen Fettgewebe dieser Mäuse vermehrt Areale mit einem braunen Phänotyp nachgewiesen werden (Hansen und Kristiansen 2006). All dies spricht für einen wesentlichen Einfluss von p70S6 bei der Entstehung von Insulinresistenz.

Ein Einfluss von Aldosteron auf den insulininduzierten Anstieg der p70S6-Phosphorylierung konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Der PIK3/PKB Signalweg ist aber neben der Regulation der Glukosehomeostase auch in viele andere wichtige Zellprozesse eingebunden, wie z.B. Zellproliferation und Differenzierung, aber auch in die Regulation der Apoptose. Dabei wird dieser Signalweg nicht nur insulinabhängig aktiviert, sondern auch über verschiedenste andere Stimuli (Scheid und Woodgett 2001). Daher wurde in dieser Arbeit nicht nur die insulinabhängige Regulation des Signalweges untersucht, sondern auch nach insulinunabhängigen Effekten Ausschau gehalten.

Bei der PKB zeigte sich insulinunabhängig als Tendenz nach 4h ein kurzer Anstieg der Aktivität und dann nach 4h bzw. 8h ein Abfall analog zu den Beobachtungen unter Insulin Co-Stimulation, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Zu der Beobachtung einer akuten Aktivitätszunahme von PKB passt der zu beobachtende hoch signifikante Anstieg der basalen GSK 3 Phosphorylierung der sich ebenfalls nach 4 Stunden zeigt. Eine Zunahme der GSK 3 Phosphorylierung bedeutet eine Hemmung der Kinaseaktivität und damit eine Zunahme der Glykogensynthese und eine Erhöhung der Insulinsensitivität. Aldosteron scheint also unabhängig von Insulin akut einen positiven Effekt auf die Glukosehomeostase zu haben.

Ein weiteres wichtiges Signalelement gerade, im Hinblick auf Zellproliferation und Differenzierung, ist die p70S6-Kinase. Hier zeigt, sich anders als bei der Insulin Co-Stimulation, nach 24h eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung. Auch dies könnte im Sinne einer zunehmenden Insulinsensitivität gedeutet, aber auch, wie bereits für Muskelgewebe vermutet (Katta, et al. 2009), mit einer Proliferationshemmung und

## 4 Diskussion

---

abnehmenden Proteinsynthese korreliert werden und damit mit einer Funktionseinschränkung des Fettgewebes einhergehen.

### 4.2.2.2 Einflüsse auf die MAP-Kinasen Regulation

Ein weiterer von PKB unabhängiger Insulinsignalweg ist MAP-Kinasen abhängig. MAP-Kinasen sind wichtige Regulatoren für Zellwachstum und Differenzierung (Seeger und Krebs 1995). Die Beobachtung, dass MAP-Kinasen in der Lage sind in den Zellkern zu translozieren, unterstützt die These, dass aktivierte MAP-Kinasen ein wichtiges Verbindungsstück der Insulinsignalkette zur Transkription und zum Zellwachstum darstellen (Groom, et al. 1996).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von p42/44 MAP-Kinasen sowohl insulinabhängig, als auch insulinunabhängig durch Aldosteron hoch signifikant reduziert wird. Diese Ergebnisse konnten von der Arbeitsgruppe um Wada für ähnliche Konzentrationen und Zeitintervalle in weißen Adipozyten bestätigt werden (Wada, et al. 2009). Dies spricht für einen entscheidenden negativen Einfluss von Aldosteron auf Transkription und Zellwachstum.

In primären Adipozytenkulturen von Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus und gesunden Probanden konnte hingegen keine Veränderung der MAP-Kinasen Phosphorylierung nachgewiesen werden (Urbanet, et al. 2011). Die Unterschiede lassen sich zum einen mit den unterschiedlichen Zellmodellen begründen. Zum anderen sind bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus durch die lange Expositionsdauer mit sehr hohen Aldosteronkonzentrationen vielleicht schon Resistenzen oder eine gewisse Desensibilisierung aufgetreten.

## 4.3 Aldosteron beeinflusst die Thermogenese

Die UCP-1 gesteuerte Thermogenese ist eine spezifische Funktion von braunem Fett (Cannon and Nedergaard 2004). Bei adipösen Erwachsenen ist eine Veränderung der UCP-1 Expression im Fettgewebe nachzuweisen (Oberkofler, et al. 1997).

In dieser Arbeit konnte eine eindeutige Inhibition der UCP-1 Expression durch Aldosteron nachgewiesen werden. Dies zeigte sich als deutliche Tendenz auch auf Proteinebene.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der bereits beschriebenen, aus Hibernomen gewonnenen, braunen Fettzelllinie (T37i) erzielt werden. Dort ließ sich eine Verminderung der durch Isoproterenol oder Retinoid Säure stimulierten UCP-1 Expression um 50% nachweisen. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung und Kinetik entsprachen denen dieser Arbeit. Allerdings wurde die basale UCP-1 Expression in dieser Studie nicht untersucht (Viengchareun, et al. 2001).

## 4 Diskussion

---

In der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal Aldosteroneinflüsse auf die basale UCP-1 Expression nachgewiesen. Die Ergebnisse sprechen für eine starke zeit- und dosisabhängige Verminderung der Thermogenese in braunem Fettgewebe durch Aldosteron. Aldosteron vermindert somit die Möglichkeit von braunem Fettgewebe, Energie in Form von Wärme abzugeben, was wiederum das Entstehen von Adipositas fördern könnte.

Braunes Fettgewebe ist gerade in der letzten Zeit wieder in den wissenschaftlichen Fokus geraten. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Erwachsene kein funktionsfähiges braunes Fett mehr besitzen, da es nicht nachzuweisen war und alle Versuche, die Thermogenese für gewichtsreduzierende Therapieansätze zu nutzen, scheiterten. Neue Studien konnten mittels PET-CT metabolisch aktives braunes Fettgewebe in Erwachsenen nachweisen. Dieses Fettgewebe konnte mittels seiner UCP-1 Expression und seiner histologischen Charakteristika einwandfrei identifiziert werden (Virtanen, et al. 2009). Die Aktivität dieses Fettgewebes war umgekehrt korreliert zur Außentemperatur,  $\beta$ -Blocker-Einnahme und BMI der jeweiligen Person. Dies weist darauf hin, dass braunes Fettgewebe bei Erwachsenen denselben Stimuli unterliegt, wie auch bei Nagetieren (Cypess und Kahn 2010, Virtanen und Nuutila 2011).

Dazu passen die Ergebnisse einer Projektgruppe um Patsch, die bereits 1997 in intraperitonealem Fett adipöser Probanden, verglichen mit schlanken Probanden, eine signifikant reduzierte UCP mRNA Mengenachweisen konnten. Zu dieser Zeit war eine Korrelation zur Masse an braunem Fett noch nicht möglich (Oberkofler, et al. 1997).

Zudem erlangte braunes Fettgewebe mit der Entdeckung der „brite cells“ neue Bedeutung, da diese ein potentiell neues pharmakologisches Target bei der Regulation der UCP-1 induzierten Thermogenese darstellen könnten (Cypess und Kahn 2010, Petrovic, et al. 2010, Virtanen und Nuutila 2011).

### **4.4 Aldosteron hat keinen Einfluss auf die Fettzeldifferenzierung**

Als Differenzierung bezeichnet man die Entwicklung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten, die sich durch die Einlagerung von Fett und, im Fall von braunen Fettzellen, durch eine Zunahme der Mitochondriendichte auszeichnen. Braune Präadipozyten sind nicht in der Lage UCP-1 zu exprimieren. Im Laufe der Differenzierung nimmt diese Eigenschaft zu (Klein, et al. 1999, Sell, et al. 2004). UCP-1 könnte also als Differenzierungsmarker angesehen werden. Aldosteron beeinflusst die UCP-1 Expression und vermindert den Einfluss von Insulin, einem wichtigen Differenzierungsfaktor, auf die

## 4 Diskussion

---

braunen Adipozyten. Ein Einfluss von Aldosteron auch auf die Differenzierung wäre also naheliegend.

Ein direkter Einfluss von Aldosteron auf die Fettzellendifferenzierung konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden.

Andere Arbeiten stützen eher die These, dass Aldosteron einen fördernden Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung hat. Perforinis et al. konnten in der von ihnen generierten braunen Tumorfettzelllinie einen positiven Einfluss von Aldosteron auf die Fettzellendifferenzierung nachweisen (Perforinis, et al. 2000). Diese Arbeitsgruppe verwendete jedoch für die Zeit nach der Induktion durch Aktivkohle gereinigtes Medium. Die im Vollserum, wie von uns verwendet, weiter enthaltenen Fettsäuren und fettlöslichen Bestandteile könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Zum anderen haben wir bei unserem Versuchsansatz höhere Aldosteronkonzentrationen verwendet, so dass eine dadurch verursachte Mit-Aktivierung des GR eine weitere Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte.

Erst kürzlich gelang es unserer Arbeitsgruppe eine Fettzelllinie aus Mäusen mit einem MR-*knockout* zu generieren. Diese Zelllinie war nicht in der Lage Fett in Form von Fetttropfchen einzulagern und somit eine Differenzierung von Präadipozyten zu vollständig differenzierten Fettzellen zu vollziehen. Verglichen damit zeigte eine ebenfalls neu generierte Zelllinie aus Mäusen mit einem *knockout* des GR zwar eine zeitlich verzögerte jedoch im Endeffekt vollständige Differenzierung (Hoppmann, et al. 2010). Auch dies weist auf einen entscheidenden Einfluss des MR auf die Fettzellfunktion und die Differenzierung hin. Jedoch sind durch den *knockout* viele vitale Funktionen betroffen, was sich auch in der minimalen Lebenserwartung der *knockout*-Mäuse zeigt. So dass schon allein diese Tatsache die Unterschiede im Ergebnis zu Versuchen mit Wildtypzellen erklärt.

### 4.5 Aldosteron beeinflusst die Adipokinexpression

#### 4.5.1 Aldosteron erhöht die Leptinexpression

Leptin ist ein wichtiger Regulator des Energiehaushaltes (Kershaw und Flier 2004). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte eine signifikante Steigerung der Leptin Expression durch eine Stimulation mit 10 $\mu$ M Aldosteron gemessen werden.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch nachfolgende Studien unserer Arbeitsgruppe, die diesen Effekt auch schon bei deutlich geringeren, und damit selektiveren Aldosteronkonzentrationen (100nM) zeigen konnten. Bei diesen Konzentrationen war der Effekt sogar noch ausgeprägter. Darüber hinaus konnte in weißen Adipozyten nach

## 4 Diskussion

---

Behandlung mit 10nM Aldosteron für 24 Stunden eine erhöhte Leptinsekretion detektiert werden (Hoppmann, et al. 2010, Kraus, et al. 2005). Der höhere Effekt bei niedrigeren Aldosteronkonzentrationen wäre dadurch zu erklären, dass bei höheren Konzentrationen eine Co-Stimulation des GR zu einer Gegenregulation führt und damit zu einer Abmilderung des Aldosteroneffektes. Ein entsprechender hemmender Einfluss von Dexamethason (einem GR-Agonisten) auf die Leptinexpression und –sekretion konnte an weißen und braunen Adipozytenmodellen gezeigt werden (Buyse, et al. 2001, Hoppmann, et al. 2010).

In humanen Adipozyten konnte durch eine Stimulation mit Aldosteron (1-100nM) über 24h kein Effekt auf die Leptinexpression nachgewiesen werden (Urbanet, et al. 2010). Hierbei ist anzumerken, dass bei uns der optimale Stimulationseffekt akut (1-4h) auftrat und nach 8h schon rückläufig war. Nach 24h könnte der Aldosteroneffekt auf die Leptinexpression also schon nicht mehr nachzuweisen sein.

Für eine Wechselwirkung zwischen Aldosteron und der Leptinexpression spricht auch die Beobachtung, dass bei *ob/ob*-Mäusen und *db/db*-Mäusen (beide Modelle weisen eine Mutation im Leptinrezeptor auf) eine deutlich erhöhte Expression der MR-mRNA nachgewiesen werden konnte (Hirata, et al. 2009) .

Des Weiteren konnten erhöhte Leptinspiegel bei *db/db*-Mäusen durch Behandlung mit Eplerenon, einem selektiven MR-Antagonisten, fast komplett normalisiert werden. Auch alle weiteren Merkmale dieser Mäuse, die mit ihrer Adipositas, Insulinresistenz und Dyslipidämie ein Tiermodell für das Metabolische Syndrom darstellen, konnten durch Behandlung mit Eplerenon fast vollständig ausgeglichen werden (Guo, et al. 2008). In vitro und im Tiermodell sprechen die Daten also deutlich für einen Einfluss von Aldosteron auf die Leptinsekretion. Ein Anstieg der Leptinsekretion müsste bei gesunden Personen jedoch einer Adipositas mit all ihren negativen Folgen entgegen wirken. Doch, wie schon anfangs beschrieben, zeigen auch adipöse Personen einen erhöhten Leptinspiegel ohne die gewünschte Wirkung. Man spricht von einer Leptinresistenz (Rajala und Scherer 2003). Ein durch Aldosteron dauerhaft erhöhter Leptinspiegel könnte das Entstehen einer Leptinresistenz fördern.

Bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus hingegen zeigte sich kein Unterschied in der Serum-Leptinkonzentration im Vergleich zu gesunden Probanden (Haluzik, et al. 2002). Dieser Effekt war auch auf mRNA-Ebene nachzuvollziehen (Urbanet, et al. 2010). Erstaunlicherweise führt eine medikamentöse oder chirurgische Therapie des Hyperaldosteronismus zu einem deutlichen Anstieg des Serumleptins. Dieser Anstieg war paradoxerweise mit einer Verbesserung der Glukosetoleranz verbunden (Haluzik, et al. 2002, Torpy, et al. 1999). Zum einen bestärken diese Ergebnisse die in 4.2.

## 4 Diskussion

---

beschriebenen Daten zur aldosteroninduzierten Insulinresistenz, zum anderen passen sie nicht zu den von uns erhobenen Ergebnissen zur Leptinexpression. Natürlich ist es schwierig in der Zellkultur erhobene Daten direkt auf klinische Patientenbeobachtungen zu übertragen, da im Patienten viele weitere Regelkreise und Einflüsse wirken, die im Zellmodell keine Rolle spielen. Die chronische Aldosteronexposition könnte im Verlauf gegenregulatorische Mechanismen in Gang setzen, die die Leptinspiegel wieder absenken. Außerdem treten beim primären Hyperaldosteronismus als Symptome auch ein Hypertonus und erhöhte Kaliumkonzentrationen im Serum auf. Auch die Veränderung dieser Parameter könnte an dem Anstieg der Serumleptinkonzentrationen beteiligt sein.

### 4.5.2 Aldosteron hat keinen Einfluss auf die Adiponektinexpression

Adiponektin ist ein wichtiges antidiabetogenes und antiinflammatorisches Adipokin (Matsuzawa, et al. 2004). Personen mit Mutationen im Adiponektin-Gen, die eine genetische Hypoadiponektinämie vorweisen, zeigen eine gestörte Glukosetoleranz und häufig Bluthochdruck und Hyperlipidämie (Matsuzawa, et al. 2004). Auch Adiponektin-*knockout*-Mäuse reagieren auf hochkalorische Ernährung mit einer gestörten Glukosetoleranz (Maeda, et al. 2002). Niedrige Serumkonzentrationen von Adiponektin finden sich bei Personen mit klinischen Zeichen des Metabolischen Syndroms (Adipositas, gestörte Glukosetoleranz, Bluthochdruck etc.) (Ryo, et al. 2004). Für Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus gibt es unterschiedliche Daten. In einigen Studien zeigen sich erniedrigte Adiponektinspiegel (Fallo, et al. 2007), andere Daten weisen keine Veränderung der Adiponektinspiegel bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus im Vergleich zu gesunden Probanden auf (Urbanet, et al. 2010). All dies spricht dafür, dass erniedrigte Adiponektinspiegel in Zusammenhang mit erhöhten Aldosteronwerten und dem Metabolischen Syndrom stehen.

In weißen Adipozyten konnte vor kurzem durch eine Stimulation mit Aldosteron eine Verminderung der Adiponektinexpression und -sekretion nachgewiesen werden. Diese scheint über den GR und nicht über den MR vermittelt zu sein (Li, et al. 2011). Dazu passen Ergebnisse im Rattenmodell. Dort konnte nachgewiesen werden, dass Glukokortikoide die Adiponektinsekretion und -expression deutlich vermindern (Shi, et al. 2010). Dafür, dass es auch einen über das RAAS und den MR vermittelten Effekt auf die Adiponektinexpression gibt, spricht eine Arbeit von Kamari et al.. Diese Arbeitsgruppe konnte im Rattenmodell zeigen, dass eine salzreiche Diät zu einem Abfall der Serumaldosteronkonzentration und einem Anstieg der Adiponektinplasmaspiegel führt. Dieser Effekt ist durch Telmisartan (Angiotensin-Rezeptor-Blocker) und Eplerenon antagonisierbar (Kamari, et al. 2010).

## 4 Diskussion

---

In dieser Arbeit konnte jedoch kein Effekt einer Aldosteronstimulation auf die Adiponektinexpression nachgewiesen werden. Da bei Li et al. mit den gleichen hohen Aldosteronkonzentrationen und ähnlichen Stimulationszeiten gearbeitet wurde kann hierin keine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen. Ein entscheidender Unterschied scheint im verwendeten Zellmodell zu liegen. In der bereits beschriebenen braunen Tumorfettzelllinie (T37i) konnte ein hemmender Einfluss von Dexamethason (GR-Agonist) auf die Adiponektinexpression nachgewiesen werden (Viengchareun, et al. 2002). Zu dem Einfluss von Aldosteron auf die Adiponektinexpression in braunen Fettzellen liegen, nach unserem Kenntnisstand, bislang keine weiteren Daten vor.

### 4.6 Gewonnene Erkenntnisse und Ausblick

#### 4.6.1.1 Gewonnene Erkenntnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es einen direkten Einfluss von Aldosteron auf die verschiedenen Ebenen der Fettzellfunktion gibt. Diese Ergebnisse werden durch aktuelle Arbeiten anderer Projektgruppen gestützt und bestätigt (Hirata, et al. 2009, Hoppmann, et al. 2010, Urbanet, et al. 2010, Wada, et al. 2009).

Anhand der vorgelegten Daten konnten die zu Beginn gestellten Fragen beantwortet und folgende Erkenntnisse bezüglich der Aldosteroneinflüsse auf die braune Fettzellfunktion gewonnen werden:

**1. Gibt es einen direkten Einfluss von Aldosteron auf die insulininduzierte metabolische braune Fettzellfunktion? Über welche Wege/Mechanismen kommt es zu diesen Veränderungen?**

Chronische Stimulation mit Aldosteron reduziert die insulininduzierte Glukoseaufnahme und beeinflusst wichtige Elemente des Insulinrezeptorsignalweges wie PKB und GSK3.

**2. Beeinflusst Aldosteron die Thermogenese in braunen Adipozyten?**

Aldosteron beeinflusst die Thermogenese über Verminderung der UCP-1 Expression.

**3. Ändert sich die Differenzierung brauner Adipozyten durch Aldosteroneinfluss?**

Es ist in unserem Fettzellmodell kein Einfluss von Aldosteron auf die Fettzelldifferenzierung nachweisbar.

### 4. Modifiziert Aldosteron die Expressionsmuster wichtiger Adipokine?

Aldosteron führt zu einem Anstieg der Leptinexpression, die Expression von Adiponektin bleibt hingegen unbeeinflusst.

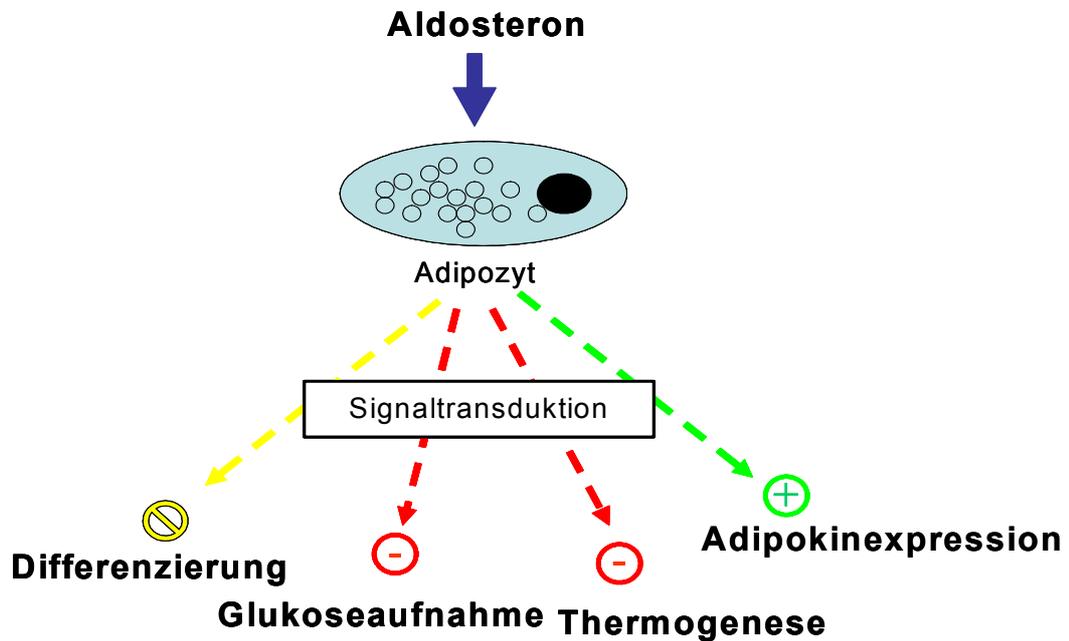


Abb. 15: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit dargestellten Aldosteronwirkungen auf braune Adipozyten

#### 4.6.2 Ausblick

Aldosteron ist ein wichtiger neuer Spieler bei der Entstehung und Unterhaltung des Metabolischen Syndroms.

Unklar bleiben aber bis heute die genauen Wege über die Aldosteron seinen Einfluss ausübt. Die Idee, einer alleinig über den MR vermittelten Wirkweise, scheint längst überholt. Es mehren sich die Hinweise, dass Aldosteron z.B. auch über den GR seine Wirkung entfaltet.

Die Wege zu entschlüsseln, über die Aldosteron seine Wirkung entfaltet ist die Herausforderung für die Zukunft. Hierzu sind In-vitro-Versuche mit Antagonisten der verschiedenen möglichen Rezeptoren, sowie weitere Versuche mit spezifischen *knockout*-Zelllinien, wie sie bereits von unserer Arbeitsgruppe generiert wurden (Hoppmann, et al. 2010), ein erster Ansatz.

Die Klärung der genauen Wirkwege von Aldosteron kann neue selektive therapeutische Ansätze eröffnen und uns einen entscheidenden Schritt im Verständnis und in der Therapie des Metabolischen Syndroms voranbringen.

### 5 Zusammenfassung

Aldosteron ist bekannt als ein wichtiges Hormon des Salz-Wasserhaushaltes und der Blutdruckregulation. In jüngerer Zeit wurden neue Wirkweisen und Wirkorte des Aldosterons entdeckt. So konnte ein Einfluss von Aldosteron bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen und ein Zusammenhang erhöhter Aldosteronwerte mit einem erhöhten Risiko für Insulinresistenz nachgewiesen werden. Aldosteron ist damit auch ein wichtiger Regulator vieler entscheidender metabolischer Funktionen.

Die dramatische Zunahme der Anzahl adipöser Personen in der Bevölkerung führt zu einer Zunahme adipositasassoziierter Krankheiten wie z.B. Hypertonus und Diabetes. Das gehäufte gemeinsame Auftreten dieser Erkrankungen wird als Metabolisches Syndrom bezeichnet und ist eines der wichtigsten Krankheitsbilder unserer Zeit.

Fettgewebe ist als wichtiges metabolisches Organ immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Insbesondere durch den Nachweis metabolisch aktiven braunen Fettgewebes bei Erwachsenen, gelangte dieses zu neuer wissenschaftlicher Bedeutung.

Braunes Fettgewebe konnte als Zielgewebe des Aldosterons identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten direkte Aldosteroneinflüsse auf das braune Fettgewebe nachgewiesen werden.

Braune murine Adipozyten wurden mit Aldosteron stimuliert. Hierbei zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Verminderung der insulininduzierten Glukoseaufnahme. Aldosteron induziert somit im braunen Fettgewebe Insulinresistenz.

In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte für wichtige Elemente des Insulinrezeptorsignalweges eine Abnahme der insulininduzierten Phosphorylierung beschrieben werden.

Des Weiteren konnte ein Einfluss von Aldosteron auf die Thermogenese gezeigt werden. Die Stimulation mit Aldosteron führte zu einer deutlichen Abnahme der UCP-1 Expression. Dieser Effekt ist nicht mit einer Veränderung im Differenzierungsverhalten zu erklären. Die Differenzierung der braunen Adipozyten blieb durch Aldosteron unbeeinflusst.

Außerdem zeigte sich unter Aldosteroneinfluss eine Veränderung der Adipokinexpression. Die Expression des wichtigen anorexigenen Adipokins Leptin stieg stark an, wohingegen sich keine Veränderung in der Adiponektinexpression zeigte.

Diese Ergebnisse demonstrieren einen wichtigen Einfluss von Aldosteron auf das braune Fettgewebe und lassen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Metabolischen Syndroms vermuten. Eine genaue Klärung der Wirkwege könnte vielversprechende neue therapeutische Ansätze eröffnen.

### 6 Literaturverzeichnis

- 1 **Alessi D. R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P. und Hemmings B. A.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1 *Embo J* 15 6541-51 (1996)
- 2 **Blüher M., Michael M. D., Peroni O. D., Ueki K., Carter N., Kahn B. B. und Kahn C. R.** Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance *Dev Cell* 3 25-38 (2002)
- 3 **Bochud M., Nussberger J., Bovet P., Maillard M. R., Elston R. C., Paccaud F., Shamlaye C. und Burnier M.** Plasma Aldosterone Is Independently Associated With the Metabolic Syndrome *Hypertension* (2006)
- 4 **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* 72 248-54 (1976)
- 5 **Buyse M., Viengchareun S., Bado A. und Lombes M.** Insulin and glucocorticoids differentially regulate leptin transcription and secretion in brown adipocytes *Faseb J* 15 1357-66 (2001)
- 6 **Cannon B. und Nedergaard J.** Brown adipose tissue: function and physiological significance *Physiol Rev* 84 277-359 (2004)
- 7 **Caprio M., Feve B., Claes A., Viengchareun S., Lombes M. und Zennaro M. C.** Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis *Faseb J* 21 2185-94 (2007)
- 8 **Chandran M., Phillips S. A., Ciaraldi T. und Henry R. R.** Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26 2442-50 (2003)
- 9 **Cho H., Mu J., Kim J. K., Thorvaldsen J. L., Chu Q., Crenshaw E. B., 3rd, Kaestner K. H., Bartolomei M. S., Shulman G. I. und Birnbaum M. J.** Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta) *Science* 292 1728-31 (2001)
- 10 **Cinti S.** The adipose organ *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73 9-15 (2005)
- 11 **Cinti S.** The role of brown adipose tissue in human obesity *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 569-74 (2006)
- 12 **Colussi G., Catena C., Lapenna R., Nadalini E., Chiuch A. und Sechi L. A.** Insulin resistance and hyperinsulinemia are related to plasma aldosterone levels in hypertensive patients *Diabetes Care* 30 2349-54 (2007)
- 13 **Conn J. W. und Louis L. H.** Primary aldosteronism: a new clinical entity *Trans Assoc Am Physicians* 68 215-31; discussion, 231-3 (1955)
- 14 **Corry D. B. und Tuck M. L.** The effect of aldosterone on glucose metabolism *Curr Hypertens Rep* 5 106-9 (2003)
- 15 **Cypess A. M. und Kahn C. R.** The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis *Curr Opin Pediatr* 22 478-84 (2010)

## 6 Literaturverzeichnis

---

- 16 **Ehrhart-Bornstein M., Arakelyan K., Krug A. W., Scherbaum W. A. und Bornstein S. R.** Fat cells may be the obesity-hypertension link: human adipogenic factors stimulate aldosterone secretion from adrenocortical cells *Endocr Res* 30 865-70 (2004)
- 17 **Ehrhart-Bornstein M., Lamounier-Zepter V., Schraven A., Langenbach J., Willenberg H. S., Barthel A., Hauner H., Mccann S. M., Scherbaum W. A. und Bornstein S. R.** Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 14211-6 (2003)
- 18 **Eldar-Finkelman H., Schreyer S. A., Shinohara M. M., Leboeuf R. C. und Krebs E. G.** Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice *Diabetes* 48 1662-6 (1999)
- 19 **Engeli S., Bohnke J., Feldpausch M., Gorzelniak K., Heintze U., Janke J., Luft F. C. and Sharma A. M.** Regulation of 11beta-HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss *Obes Res* 12 9-17 (2004)
- 20 **Engeli S., Bohnke J., Gorzelniak K., Janke J., Schling P., Bader M., Luft F. C. und Sharma A. M.** Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system *Hypertension* 45 356-62 (2005)
- 21 **Fallo F., Della Mea P., Sonino N., Bertello C., Ermani M., Vettor R., Veglio F. und Mulatero P.** Adiponectin and insulin sensitivity in primary aldosteronism *Am J Hypertens* 20 855-61 (2007)
- 22 **Garofalo R. S., Orena S. J., Rafidi K., Torchia A. J., Stock J. L., Hildebrandt A. L., Coskran T., Black S. C., Brees D. J., Wicks J. R., Mcneish J. D. und Coleman K. G.** Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta *J Clin Invest* 112 197-208 (2003)
- 23 **George S., Rochford J. J., Wolfrum C., Gray S. L., Schinner S., Wilson J. C., Soos M. A., Murgatroyd P. R., Williams R. M., Acerini C. L., Dunger D. B., Barford D., Umpleby A. M., Wareham N. J., Davies H. A., Schafer A. J., Stoffel M., O'Rhilly S. und Barroso I.** A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2 *Science* 304 1325-8 (2004)
- 24 **Gonzalez E. und McGraw T. E.** The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer *Cell Cycle* 8 2502-8 (2009)
- 25 **Grady R. W., Kaylor W. M., Lee J. C., Bravo E. L., Gephardt G. N. und Novick A. C.** Renal pathology in patients with primary hyperaldosteronism secondary to an adrenal cortical adenoma *Urology* 48 369-72 (1996)
- 26 **Groom L. A., Sneddon A. A., Alessi D. R., Dowd S. und Keyse S. M.** Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase *Embo J* 15 3621-32 (1996)
- 27 **Grundy S. M.** Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease *J Clin Endocrinol Metab* 89 2595-600 (2004)
- 28 **Guo C., Ricchiuti V., Lian B. Q., Yao T. M., Coutinho P., Romero J. R., Li J., Williams G. H. und Adler G. K.** Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines *Circulation* 117 2253-61 (2008)

## 6 Literaturverzeichnis

---

- 29 **Haluzik M., Sindelka G., Widimsky J., Jr., Prazny M., Zelinka T. und Skrha J.** Serum leptin levels in patients with primary hyperaldosteronism before and after treatment: relationships to insulin sensitivity *J Hum Hypertens* 16 41-5 (2002)
- 30 **Hansen E., Hajri T. und Abumrad N. N.** Is all fat the same? The role of fat in the pathogenesis of the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus *Surgery* 139 711-6 (2006)
- 31 **Hansen J. B. und Kristiansen K.** Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation *Biochem J* 398 153-68 (2006)
- 32 **Hauer H., Bramlage P., Losch C., Steinhagen-Thiessen E., Schunkert H., Wasem J., Jockel K. H. und Moebus S.** Prevalence of obesity in primary care using different anthropometric measures--results of the German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS) *BMC Public Health* 8 282 (2008)
- 33 **Hellal-Levy C., Fagart J., Souque A. und Rafestin-Oblin M. E.** [Corticosteroid hormones: mechanisms involved in the recognition of aldosterone by mineralocorticoid receptors] *J Soc Biol* 193 355-60 (1999)
- 34 **Hirata A., Maeda N., Hiuge A., Hibuse T., Fujita K., Okada T., Kihara S., Funahashi T. und Shimomura I.** Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice *Cardiovasc Res* 84 164-72 (2009)
- 35 **Hoppmann J., Perwitz N., Meier B., Fasshauer M., Hadaschik D., Lehnert H. und Klein J.** The balance between gluco- and mineralo-corticoid action critically determines inflammatory adipocyte responses *J Endocrinol* 204 153-64 (2010)
- 36 **Isomaa B.** A major health hazard: the metabolic syndrome *Life Sci* 73 2395-411 (2003)
- 37 **Iwen K. A., Perwitz N., Lehnert H. und Klein J.** [Overweight. A valid predictor of cardiometabolic risk?] *Internist (Berl)* 52 352, 354-6, 358 passim (2011)
- 38 **Kamari Y., Shimoni N., Koren F., Peleg E., Sharabi Y. und Grossman E.** High-salt diet increases plasma adiponectin levels independent of blood pressure in hypertensive rats: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system *J Hypertens* 28 95-101 (2010)
- 39 **Katta A., Karkala S. K., Wu M., Meduru S., Desai D. H., Rice K. M. und Blough E. R.** Lean and obese Zucker rats exhibit different patterns of p70s6 kinase regulation in the tibialis anterior muscle in response to high-force muscle contraction *Muscle Nerve* 39 503-11 (2009)
- 40 **Kershaw E. E. und Flier J. S.** Adipose tissue as an endocrine organ *J Clin Endocrinol Metab* 89 2548-56 (2004)
- 41 **Klein J., Fasshauer M., Ito M., Lowell B. B., Benito M. und Kahn C. R.** beta(3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes *J Biol Chem* 274 34795-802 (1999)
- 42 **Klein J., Fasshauer M., Klein H. H., Benito M. und Kahn C. R.** Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action *Bioessays* 24 382-8 (2002)

## 6 Literaturverzeichnis

---

- 43 **Klein J., Perwitz N., Kraus D. und Fasshauer M.** Adipose tissue as source and target for novel therapies *Trends Endocrinol Metab* 17 26-32 (2006)
- 44 **Klein J., Westphal S., Kraus D., Meier B., Perwitz N., Ott V., Fasshauer M. und Klein H. H.** Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway in brown adipocytes *J Endocrinol* 183 299-307 (2004)
- 45 **Kojima I., Kojima K. und Rasmussen H.** Intracellular calcium and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate as mediators of potassium-induced aldosterone secretion *Biochem J* 228 69-76 (1985)
- 46 **Kraus D., Fasshauer M., Ott V., Meier B., Jost M., Klein H. H. und Klein J.** Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes *J Endocrinol* 175 185-91 (2002)
- 47 **Kraus D., Jäger J., Meier B., Fasshauer M. und Klein J.** Aldosterone inhibits uncoupling protein-1, induces insulin resistance, and stimulates proinflammatory adipokines in adipocytes *Horm Metab Res* 37 455-9 (2005)
- 48 **Laemmli U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227 680-5 (1970)
- 49 **Lafontan M., Moro C., Sengenès C., Galitzky J., Crampes F. und 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 2032-42 (2005)
- 50 **Langin D.** Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* 1801 372-6 (2010)
- 51 **Li P., Zhang X. N., Pan C. M., Sun F., Zhu D. L., Song H. D. und Chen M. D.** Aldosterone perturbs adiponectin and PAI-1 expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes *Horm Metab Res* 43 464-9 (2011)
- 52 **Lombes M., Kenouch S., Souque A., Farman N. und Rafestin-Oblin M. E.** The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase *Endocrinology* 135 834-40 (1994)
- 53 **Maeda N., Shimomura I., Kishida K., Nishizawa H., Matsuda M., Nagaretani H., Furuyama N., Kondo H., Takahashi M., Arita Y., Komuro R., Ouchi N., Kihara S., Tochino Y., Okutomi K., Horie M., Takeda S., Aoyama T., Funahashi T. und Matsuzawa Y.** Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30 *Nat Med* 8 731-7 (2002)
- 54 **Matsuzawa Y., Funahashi T., Kihara S. und Shimomura I.** Adiponectin and metabolic syndrome *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 29-33 (2004)
- 55 **Miura R., Nakamura K., Miura D., Miura A., Hisamatsu K., Kajiya M., Hashimoto K., Nagase S., Morita H., Fukushima Kusano K., Emori T., Ishihara K. und Ohe T.** Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells *J Pharmacol Sci* 102 288-95 (2006)
- 56 **Mullis K. B.** The unusual origin of the polymerase chain reaction *Sci Am* 262 56-61, 64-5 (1990)

## 6 Literaturverzeichnis

---

- 57 **Napoli C., Di Gregorio F., Leccese M., Abete P., Ambrosio G., Giusti R., Casini A., Ferrara N., De Matteis C., Sibilio G., Donzelli R., Montemarano A., Mazzeo C., Rengo F., Mansi L. und Liguori A.** Evidence of exercise-induced myocardial ischemia in patients with primary aldosteronism: the Cross-sectional Primary Aldosteronism and Heart Italian Multicenter Study *J Investig Med* 47 212-21 (1999)
- 58 **Oberkofler H., Dallinger G., Liu Y. M., Hell E., Krempler F. und Patsch W.** Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans *J Lipid Res* 38 2125-33 (1997)
- 59 **Ott V., Fasshauer M., Meier B., Dalski A., Kraus D., Gettys T. W., Perwitz N. und Klein J.** Ciliary neurotrophic factor influences endocrine adipocyte function: inhibition of leptin via PI 3-kinase *Mol Cell Endocrinol* 224 21-7 (2004)
- 60 **Pascual-Le Tallec L. und Lombes M.** The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action *Mol Endocrinol* 19 2211-21 (2005)
- 61 **Pearce N. J., Arch J. R., Clapham J. C., Coghlan M. P., Corcoran S. L., Lister C. A., Llano A., Moore G. B., Murphy G. J., Smith S. A., Taylor C. M., Yates J. W., Morrison A. D., Harper A. J., Roxbee-Cox L., Abuin A., Wargent E. und Holder J. C.** Development of glucose intolerance in male transgenic mice overexpressing human glycogen synthase kinase-3beta on a muscle-specific promoter *Metabolism* 53 1322-30 (2004)
- 62 **Pende M., Kozma S. C., Jaquet M., Oorschot V., Burcelin R., Le Marchand-Brustel Y., Klumperman J., Thorens B. und Thomas G.** Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice *Nature* 408 994-7 (2000)
- 63 **Penfornis P., Viengchareun S., Le Menuet D., Cluzeaud F., Zennaro M. C. und Lombes M.** The mineralocorticoid receptor mediates aldosterone-induced differentiation of T37i cells into brown adipocytes *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279 E386-94 (2000)
- 64 **Perwitz N., Fasshauer M. und Klein J.** Cannabinoid receptor signaling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin *Horm Metab Res* 38 356-8 (2006)
- 65 **Perwitz N., Wenzel J., Wagner I., Buning J., Drenckhan M., Zarse K., Ristow M., Lilienthal W., Lehnert H. und Klein J.** Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes *Diabetes Obes Metab* 12 158-66 (2010)
- 66 **Petrovic N., Walden T. B., Shabalina I. G., Timmons J. A., Cannon B. und Nedergaard J.** Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes *J Biol Chem* 285 7153-64 (2010)
- 67 **Pfaffl M. W., Horgan G. W. und Dempfle L.** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR *Nucleic Acids Res* 30 e36 (2002)
- 68 **Rajala M. W. und Scherer P. E.** Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis *Endocrinology* 144 3765-73 (2003)

## 6 Literaturverzeichnis

---

- 69 **Ring D. B., Johnson K. W., Henriksen E. J., Nuss J. M., Goff D., Kinnick T. R., Ma S. T., Reeder J. W., Samuels I., Slabiak T., Wagman A. S., Hammond M. E. und Harrison S. D.** Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo *Diabetes* 52 588-95 (2003)
- 70 **Rocha R. und Stier C. T., Jr.** Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues *Trends Endocrinol Metab* 12 308-14 (2001)
- 71 **Ryo M., Nakamura T., Kihara S., Kumada M., Shibazaki S., Takahashi M., Nagai M., Matsuzawa Y. und Funahashi T.** Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome *Circ J* 68 975-81 (2004)
- 72 **Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich H. A.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 239 487-91 (1988)
- 73 **Satoh H., Nguyen M. T., Trujillo M., Imamura T., Usui I., Scherer P. E. und Olefsky J. M.** Adenovirus-mediated adiponectin expression augments skeletal muscle insulin sensitivity in male Wistar rats *Diabetes* 54 1304-13 (2005)
- 74 **Scheid M. P. und Woodgett J. R.** PKB/AKT: functional insights from genetic models *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 760-8 (2001)
- 75 **Schinner S., Scherbaum W. A., Bornstein S. R. and Barthel A.** Molecular mechanisms of insulin resistance *Diabet Med* 22 674-82 (2005)
- 76 **Seger R. und Krebs E. G.** The MAPK signaling cascade *Faseb J* 9 726-35 (1995)
- 77 **Sell H., Deshaies Y. und Richard D.** The brown adipocyte: update on its metabolic role *Int J Biochem Cell Biol* 36 2098-104 (2004)
- 78 **Shi J. H., Du W. H., Liu X. Y., Fan Y. P., Hu X. L., Zhou H. Y., Xu H. B., Zhang X. M., Xiang P. und Chen F. L.** Glucocorticoids decrease serum adiponectin level and WAT adiponectin mRNA expression in rats *Steroids* 75 853-8 (2010)
- 79 **Silvestre J. S., Heymes C., Oubenaissa A., Robert V., Aupetit-Faisant B., Carayon A., Swynghedauw B. und Delcayre C.** Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis *Circulation* 99 2694-701 (1999)
- 80 **Simpson S. A., Tait J. F., Wettstein A., Neher R., Von Euw J. und Reichstein T.** [Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism] *Experientia* 9 333-5 (1953)
- 81 **Sindelka G., Widimsky J., Haas T., Prazny M., Hilgertova J. und Skrha J.** Insulin action in primary hyperaldosteronism before and after surgical or pharmacological treatment *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108 21-5 (2000)
- 82 **Takeda R., Matsubara T., Miyamori I., Hatakeyama H. und Morise T.** Vascular complications in patients with aldosterone producing adenoma in Japan: comparative study with essential hypertension. The Research Committee of Disorders of Adrenal Hormones in Japan *J Endocrinol Invest* 18 370-3 (1995)
- 83 **Torpy D. J., Bornstein S. R., Taylor W., Tauchnitz R. und Gordon R. D.** Leptin levels are suppressed in primary aldosteronism *Horm Metab Res* 31 533-6 (1999)

## 6 Literaturverzeichnis

---

- 84 **Um S. H., Frigerio F., Watanabe M., Picard F., Joaquin M., Sticker M., Fumagalli S., Allegrini P. R., Kozma S. C., Auwerx J. und Thomas G.** Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity *Nature* 431 200-5 (2004)
- 85 **Urbanet R., Pilon C., Calcagno A., Peschechera A., Hubert E. L., Giacchetti G., Gomez-Sanchez C., Mulatero P., Toffanin M., Sonino N., Zennaro M. C., Giorgino F., Vettor R. und Fallo F.** Analysis of insulin sensitivity in adipose tissue of patients with primary aldosteronism *J Clin Endocrinol Metab* 95 4037-42 (2010)
- 86 **Urbanet R., Pilon C., Giorgino F., Vettor R. und Fallo F.** Insulin signaling in adipose tissue of patients with primary aldosteronism *J Endocrinol Invest* 34 86-9 (2011)
- 87 **Viengchareun S., Penfornis P., Zennaro M. C. und Lombes M.** Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors inhibit UCP expression and function in brown adipocytes *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 E640-9 (2001)
- 88 **Viengchareun S., Zennaro M. C., Pascual-Le Tallec L. und Lombes M.** Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin *FEBS Lett* 532 345-50 (2002)
- 89 **Virtanen K. A., Lidell M. E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T., Taittonen M., Laine J., Savisto N. J., Enerback S. und Nuutila P.** Functional brown adipose tissue in healthy adults *N Engl J Med* 360 1518-25 (2009)
- 90 **Virtanen K. A. und Nuutila P.** Brown adipose tissue in humans *Curr Opin Lipidol* 22 49-54 (2011)
- 91 **Wada T., Ohshima S., Fujisawa E., Koya D., Tsuneki H. und Sasaoka T.** Aldosterone inhibits insulin-induced glucose uptake by degradation of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS2 via a reactive oxygen species-mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes *Endocrinology* 150 1662-9 (2009)
- 92 **Weber K. und Osborn M.** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis *J Biol Chem* 244 4406-12 (1969)
- 93 **Wellen K. E. und Hotamisligil G. S.** Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue *J Clin Invest* 112 1785-8 (2003)
- 94 **Williams J. S. und Williams G. H.** 50th anniversary of aldosterone *J Clin Endocrinol Metab* 88 2364-72 (2003)
- 95 **Zennaro M. C., Caprio M. und Feve B.** Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome *Trends Endocrinol Metab* 20 444-51 (2009)
- 96 **Zennaro M. C., Le Menuet D., Viengchareun S., Walker F., Ricquier D. und Lombes M.** Hibernoma development in transgenic mice identifies brown adipose tissue as a novel target of aldosterone action *J Clin Invest* 101 1254-60 (1998)

### 7 Danksagung

Viele Menschen haben zur Verwirklichung der vorliegenden Arbeit beigetragen. Ihnen möchte ich an dieser Stelle danken.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein, möchte ich danken für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für das interessante und anspruchsvolle Thema, für die optimale Betreuung, für seine stete Diskussionsbereitschaft und vor allem für sein Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. med. H. Lehnert und Herrn Prof. Dr. L. Fehm, aktueller und ehemaliger Direktor der Medizinischen Klinik I, möchte ich für die Möglichkeit danken, in ihrem Hause meine Dissertation anzufertigen.

Dr. rer. nat. Andreas Dalski, Britta Meier und Dr. rer. nat. Nina Perwitz möchte ich für die gute Einarbeitung, ihre Unterstützung bei der Datenerhebung und bei allen großen und kleinen Problemen des Laboralltags danken.

Dr. med. Daniel Kraus danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Erstellung unseres gemeinsamen Papers.

Meinen „Mit-Doktoranden“, allen voran Nina Poll, danke ich für die gute Zusammenarbeit und den Spaß den wir gemeinsam im Labor hatten.

Carmen danke ich für das intensive Korrekturlesen.

Meinem Freund Sebastian danke ich für die wiederholte Durchsicht der Arbeit, die konstruktiven Anregungen und seine motivierenden Worte.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meinen Bruder für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen. Ohne sie wäre diese Arbeit so nie zustande gekommen.

### 8 Lebenslauf

#### ZUR PERSON

Geboren am 04.05.1980 in Hamburg  
Familienstand: ledig



#### STUDIUM

1999 - 2007 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
07/2004 - 07/2005 Auslandsjahr an der Universitatea de Medicină si Farmacie  
„Gr.T. Popa“, Iași, Rumänien

09/2001 Ärztliche Vorprüfung  
08/2002 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2006 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
06/2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

#### FAMULATUREN, PJ

09/2002 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Krankenhaus Mariahilf,  
Hamburg

08/2003 Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Lübeck  
09/2003 Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Lübeck  
09/2005 Praxis für Allgemeinmedizin Schreiter und Dr.med. Boulanger,  
Hamburg

04/2006 - 07/2006 PJ Chirurgie, Sana Klinikum Eutin  
07/2006 - 11/2006 PJ Gynäkologie und Geburtshilfe, Regionalkrankenhaus Bozen,  
Italien  
11/2006 - 03/2007 PJ Innere Medizin, Klinikum Neustadt

#### BERUFLICHE TÄTIGKEIT

08/07- 09/10 Assistenzärztin in der Frauenklinik des DIAKO Krankenhauses  
Bremen

09/08 - 09/10 Koordinatorin des Brustzentrums am DIAKO

seit 02/11 Assistenzärztin in der Frauenklinik des Klinikums Lippe Detmold

### WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

03/2002-06/2005      Forschung für die Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Klein, Medizinische Klinik I des Universitätsklinikums Lübeck

### PUBLIKATIONEN

- 05/2003                      Vortrag auf der Jahrestagung der DDG, Bremen  
**Jäger J**, Perwitz N, Ott V, Dalski A, Meier B, Klein HH, Fasshauer M, Klein J,  
*Aldosteron induziert Insulinresistenz und beeinflusst die endokrine Adipozytenfunktion*  
(Abstract: *Aldosterone crosstalk induces insulin resistance and alters endocrine function in a brown adipocyte model, Diabetes und Stoffwechsel* 12:S. 29)
- 06/2003                      Poster beim Annual Meeting der Endocrine Society, Philadelphia  
Presentation #P1-279  
**Jessica Jaeger**, Nina Perwitz, Volker Ott, Britta Meier, Horst L. Fehm, Mathias Fasshauer, Johannes Klein  
*Aldosterone directly modulates adipocyte metabolism and adipokine expression in a brown adipocyte model*
- 06/2005                      Paper in 'Hormone and Metabolic Research' 2005; 37: 455-459  
Kraus D., **Jäger J.**, Meier B., Fasshauer M. und Klein J.  
Aldosterone Inhibits uncoupling protein-1, induces insulin resistance, and stimulates proinflammatory adipokines in adipocytes *Horm Metab Res* 37 455-9 (2005)

### STIPENDIEN

- 05/2003                      Reisestipendium der Deutschen Diabetes Gesellschaft
- 06/2003                      Reisestipendium "Freunde und Förderer" Universität zu Lübeck
- 10/2004                      Erasmus-Stipendium im Rahmen des europäischen Studentenaustauschprogramms (2 Semester Studium an der Universität in Iași, Rumänien)