

**Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck**

**Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Lehnert**

**Cannabinoid Typ 1-Rezeptorblockade vermittelt  
depotspezifische Effekte auf Differenzierung,  
Inflammation und oxidativen Metabolismus in  
subkutanen und viszeralen Adipozyten**



**Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Universität zu Lübeck**

**Aus der medizinischen Fakultät**

vorgelegt von

**Isabel Viola Wagner**

aus Hamburg

**Lübeck 2012**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. univ. MSc. Georg Griesinger

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2012

Zum Druck genehmigt Lübeck, den: 26.10.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

***Für meine Eltern***

*„Das Schönste was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle“.*

*Albert Einstein (1879-1955), Physiker*

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1 Adipositas und das metabolische Syndrom als Volkskrankheit.....  | 1         |
| 1.2 Mögliche Therapien gegen Adipositas.....   | 4         |
| 1.3 Das Fettgewebe und seine Funktionen.....   | 5         |
| 1.4 Charakterisierung der unterschiedlichen Fettzelldepots.....  | 8         |
| 1.5 Endocannabinoidsystem.....   | 11        |
| 1.6 CB1-Rezeptormodulation.....  | 14        |
| 1.7 Fragestellung .....  | 15        |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>2.1. Material</b> .....   | <b>17</b> |
| 2.1.1 Geräte .....   | 17        |
| 2.2.2 Verbrauchsartikel .....  | 18        |
| 2.1.3 Chemikalien .....  | 19        |
| 2.1.3 Antikörper .....   | 21        |
| 2.1.4 Primer .....   | 22        |
| 2.1.5 Puffer und Medien.....   | 23        |
| <b>2.2 Methoden</b> .....  | <b>25</b> |
| 2.2.1 Generierung von Fettzelllinien.....  | 25        |
| 2.2.2 Kultivierung und Differenzierung von Adipozyten .....  | 26        |
| 2.2.3 Experimente zum <i>Knockdown</i> von Fettzellrezeptoren durch RNA-Interferenz.....   | 26        |
| 2.2.4 <i>Shorthairpin</i> -Transfektion.....   | 29        |
| 2.2.5 Nachweis der Transfektionseffizienz .....  | 32        |
| 2.2.6 Messung der Veränderungen der mitochondrialen Biogenese.....   | 33        |
| 2.2.7 Weitere Methoden zur Evaluierung der peripheren Effekte auf das Fettgewebe nach CB1-<br>Rezeptor- <i>Knockdown</i> bzw. - <i>Knockout</i> .....                                  | 35        |
| 2.8 Statistik.....   | 40        |
| <b>3. Ergebnisse</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>3.1 Etablierung der <i>siRNA</i>- und <i>shRNA</i>-Transfektion in Präadipozyten und Adipozyten</b> .....   | <b>41</b> |
| 3.1.1 Methodenetablierung der <i>siRNA</i> -Transfektion in Präadipozyten und Adipozyten mittels <i>MAP-</i><br><i>Kinase p42/44</i> .....   | 41        |
| 3.1.2 Etablierung des CB1-Rezeptor- <i>Knockdowns</i> durch <i>siRNA</i> -Transfektion .....   | 42        |
| 3.1.3 Etablierung des CB1-Rezeptor- <i>Knockdowns</i> durch <i>shRNA</i> -Transfektion .....   | 44        |
| <b>3.2 Ergebnisse nach CB1-Rezeptor-<i>Knockdown</i> durch <i>siRNA</i>-und <i>shRNA</i>- Transfektion auf das<br/>Differenzierungsverhalten und den oxidativen Metabolismus</b> ..... | <b>45</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 3.2.1 Differenzierungsfähigkeit der Adipozyten nach CB1-Rezeptor- <i>Knockdown</i> .....   | 45         |
| 3.2.2 Positive Auswirkungen auf den oxidativen Metabolismus nach transienter und stabiler CB1-Rezeptormodulation .....                       | 47         |
| <b>3.3 Depotspezifische Unterschiede in Präadipozyten und Adipozyten von CB1-Rezeptor <i>Knockout</i>-Mäusen .....</b>                       | <b>51</b>  |
| 3.3.1 Nachweis des CB1-Rezeptor- <i>Knockout</i> in Adipozyten .....   | 51         |
| 3.3.2 Depotspezifische Differenzierungsunterschiede während der Adipogenese.....   | 52         |
| 3.3.3 Gesteigerte Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation in die inguinalen Adipozyten nach CB1-Rezeptor- <i>Knockout</i> .....              | 55         |
| 3.3.4 Depotspezifische Unterschiede im Apoptoseverhalten bzw. Messung der DNA-Schäden in Adipozyten nach CB1-Rezeptor- <i>Knockout</i> ..... | 57         |
| 3.3.5 Depotspezifische Inflammationsunterschiede in den Adipozyten nach CB1-Rezeptor- <i>Knockout</i> .....                                  | 59         |
| 3.3.6 Depotspezifische Unterschiede auf den oxidativen Metabolismus in CB1-Rezeptor- <i>Knockout</i> -Zellen.....                            | 61         |
| <b>4. Diskussion .....</b>   | <b>68</b>  |
| 4.1 Methodenetablierung: <i>siRNA</i> -Transfektion in Präadipozyten und Adipozyten .....  | 68         |
| 4.2 CB1-Rezeptor- <i>Knockdown</i> im inguinalen Fettgewebe durch <i>siRNA</i> - und <i>shorthairpin-RNA</i> Transfektion .....              | 69         |
| 4.3 Depotspezifische Unterschiede im Fettgewebe nach CB1-Rezeptor- <i>Knockout</i> mittels CB1-Rezeptor- <i>Knockout</i> -Mäusen.....        | 71         |
| 4.4. Erkenntnisse .....  | 80         |
| 4.5. Ausblick .....  | 82         |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>6. Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>84</b>  |
| <b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>   | <b>92</b>  |
| <b>8. Danksagung.....</b>  | <b>95</b>  |
| <b>9. Lebenslauf .....</b>   | <b>96</b>  |
| <b>10. Erklärung.....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>11. Anhang .....</b>  | <b>100</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 Adipositas und das metabolische Syndrom als Volkskrankheit

Vor einigen hundert Jahren galt Fettleibigkeit als Zeichen von Fruchtbarkeit und Reichtum. Diese Sicht hat sich grundlegend geändert. Adipositas widerspricht dem heutigen Schönheitsideal. Außerdem ist seit Jahrzehnten bekannt, dass zu viel Fettgewebe zu gesundheitlichen Problemen führt und die Lebenserwartung um durchschnittlich acht Jahre reduziert (Trayhurn *et al.*, 2006). Vor einigen hundert Jahren war die Fähigkeit zur schnellen Energiespeicherung zum Überleben notwendig. Bei der heutigen Lebensweise ist sie gesundheitlich von Nachteil und erhöht die Chance, an einem sog. metabolischen Syndrom zu erkranken. Das metabolische Syndrom wird häufig begleitet von leichtgradigen, chronischen Entzündungen, einem erhöhten Risiko der Insulinresistenz und geht oft mit Diabetes oder einer koronaren Herzkrankheit einher (Iacobellis *et al.*, 2005).

Zwar führt die USA immer noch die Statistiken der übergewichtigen Menschen an, aber auch in Deutschland steigt die Zahl drastisch. Neue Untersuchungen der *International Association for the Study of Obesity (IASO)* zeigen, dass auch in Deutschland bereits 75 % der Männer und 59 % der Frauen übergewichtig sind und ihre Zahl weiter steigen wird (IASO, 2007). Fettleibigkeit ist zur weltweiten Pandemie geworden.

Der Unterschied zwischen Übergewicht und Adipositas ist rein quantitativ. Nach einer Definition der *World Health Organisation (WHO)* sind über eine Milliarde Menschen übergewichtig und haben einen *Body Mass Index (BMI)* von über 25 kg/m<sup>2</sup>. Mehr als 300 Millionen sind nach den *WHO* Kriterien sogar adipös. Das heißt, sie haben einen *BMI* von über 30 kg/m<sup>2</sup> (WHO, 2008). Der *Body Mass Index (BMI)* erlaubt es auch den Grad der Adipositas zu klassifizieren. Er errechnet sich aus dem Gewicht in kg, dividiert durch das Quadrat der Körpergröße in m.

| Diagnose/Gewichtsklasse | BMI = kg/m <sup>2</sup> |
|-------------------------|-------------------------|
| Normalgewicht           | 18,5-24,9               |
| Übergewicht             | 25-29,9                 |
| Adipositas Grad 1       | 30-34,9                 |
| Adipositas Grad 2       | 35-39,9                 |
| Adipositas Grad 3       | >40                     |

Abbildung 1: Einteilung von Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas nach *BMI* (WHO, 2008)

Jährlich sterben allein in Europa mehr als 250.000 Menschen und weltweit 2,5 Milliarden Menschen an den Folgen von Übergewicht und den damit verbundenen metabolischen und kardiovaskulären Störungen (WHO, 2002).

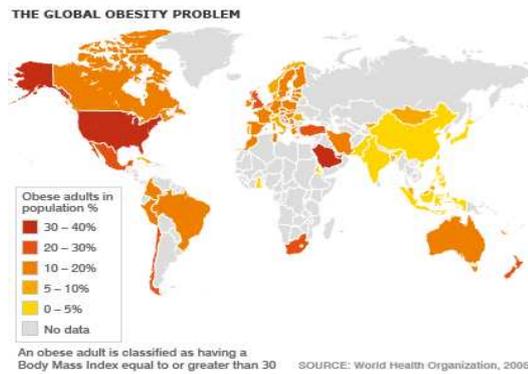
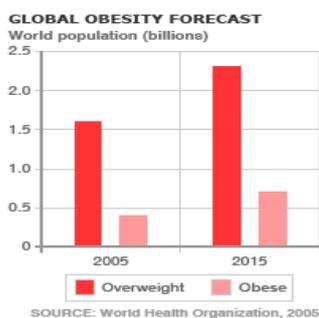


Abbildung 2: Die globale Verteilung der Adipositas nach prozentualem Anteil der Einwohnerzahl (WHO, 2005)



Eine Prognose der WHO sagt voraus, dass die Zahl der Übergewichtigen bis zum Jahr 2015 weltweit um 43 % (auf 1,6 Billionen) steigen wird. Die Zahl der Adipösen soll sich im selben Zeitraum sogar um 75 % (auf 2,25 Billionen) erhöhen (WHO, 2008).

Abbildung 3: Adipositasvorhersage für die Weltbevölkerung (WHO, 2005).

Ein weiteres zentrales Kriterium für die Klassifizierung von Adipositas ist der Taillenumfang. Bei einem Vergleich der Körpermerkmale von 1950 und 2004 zeigt sich zum Beispiel in Großbritannien eine dramatische Zunahme des Taillenumfanges von über 22 %. Dagegen sind Größe und Brustumfang lediglich minimal gewachsen (siehe Abb. 4).

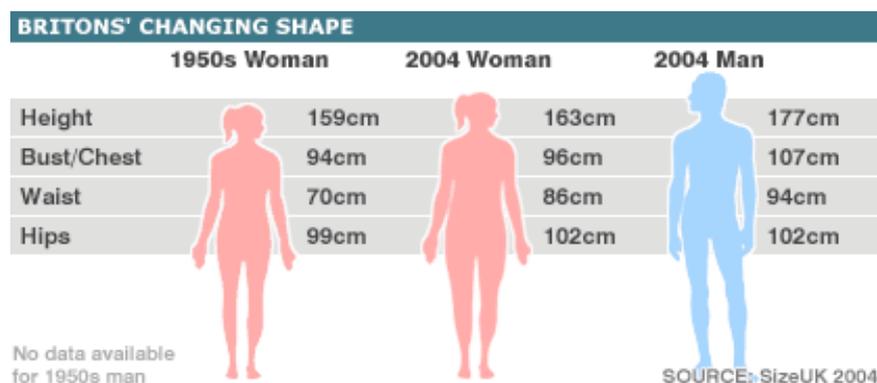


Abbildung 4: Veränderungen der Größe und Körperform in Großbritannien bei Frauen zwischen 1950 und 2004 und bei Männern für 2004 (Quinn, 2004).

Ein zentrales Problem der Adipositas sind die vielfältigen und teilweise schwerwiegenden Folgeerkrankungen, sowie die daraus resultierenden finanziellen Belastungen für das

Gesundheitssystem. Knapp 5 % aller Gesundheitsausgaben in den Industrieländern werden nach Schätzungen der Deutschen Adipositasgesellschaft (DAG) für die Behandlung der Adipositas und ihrer Folgen aufgewendet (DAG, 2009). Allein in den USA verursachen Adipositas und deren Folgen schätzungsweise Kosten von ca. 90 Milliarden Dollar pro Jahr. Adipositas und ihre Komorbiditäten führen häufig zum Tod und zur Invalidität. Studien zufolge ist die Krankheit weltweit für rund 2,6 Milliarden Todesfälle und mindestens für 2,3 % der Gesundheitskosten verantwortlich (IASO, 2007).

Die mit Adipositas verbundenen Störungen werden als metabolisches Syndrom bezeichnet. Die *International Diabetes Federation (IDF)* definiert diese Krankheit wie folgt (IDF, 2011):

- Zentrale Adipositas (Taillenumfang > 94 cm für Männer und > 80 cm für Frauen)

Hinzu kommen mindestens zwei der folgenden Pathologien:

- Gesteigerte Triglyceridspiegel: >150 mg/dl (1,7 mmol/l) oder Therapie bei vorher erhöhten Triglyceridspiegeln
- Reduzierte HDL Cholesterinspiegel: <40 mg/dl (1,03 mmol/l) bei Männern und <50 mg/dL (1,29 mmol/l) bei Frauen oder Therapie bei vorher erniedrigten HDL Cholesterinspiegel
- Erhöhter Blutdruck: systolischer Blutdruck >130 mmHg oder diastolischer Blutdruck >85 mmHg oder Behandlung einer vorher diagnostizierten arteriellen Hypertonie
- Gesteigerte nüchtern Glukosespiegel im Plasma: >100 mg/dl (5,6 mmol/l) oder bereits diagnostizierter Typ 2 Diabetes

Das metabolische Syndrom gilt als proinflammatorischer, prothrombotischer und proatherogener Zustand. Neben genetischen und umweltbedingten Faktoren spielt vor allem ein Ungleichgewicht von Energieaufnahme und -abgabe eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Adipositas (Spiegelman und Flier, 2001). Für die Energieaufnahme sind die zugeführte Nahrungsmenge und das Ausmaß ihrer Resorption entscheidend, für die Energieabgabe der Grundumsatz, die körperliche Aktivität und die Wärmeabgabe (Thermogenese). Adipositas verändert bei vielen Betroffenen die sekretorische Funktion von Adipozyten und Makrophagen. Außerdem kann Adipositas zahlreiche funktionelle und morphologische Veränderungen auslösen, z.B. Natriumretention, renale Hyperfiltration, endotheliale Dysfunktion, Linksherzhypertrophie, Mikroalbuminurie und eine erhöhte Konzentration an Entzündungsmarkern (Sharma, 2004). Adipositas gilt als eine wichtige Ursache für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

## 1.2 Mögliche Therapien gegen Adipositas

Obwohl das Fettgewebe und die Fettsucht seit mehr als zehn Jahren im Fokus endokrinologischer Forschung stehen, sind bis heute nur winzige Bruchstücke ihrer Pathophysiologie entschlüsselt und wenige therapeutische Ansätze entwickelt worden. Bisher sind zwei therapeutische Wege gegen Adipositas verfolgt worden: ein chirurgischer und ein medikamentöser.

In der bariatrischen Chirurgie gibt es mehrere Operationsmethoden. Restriktive Verfahren wie z.B. das Magenband wirken über eine Kapazitätsreduktion des Magens und führen zu rascher Sättigung. Malabsorptive Techniken wie der Roux-Y-Magenbypass oder der biliopankreatische Bypass reduzieren die Dünndarmlänge und verändern dadurch den Verdauungsprozess und verhindern die vollständige Resorption von Nährstoffen.

Alle bariatrischen Verfahren führen zu einem beeindruckenden initialen Gewichtsverlust von 50-70 %. Sogar nach zehn Jahren lag das Gewicht noch um 10-20 % niedriger als das präoperative Gewicht. Außerdem sanken nach prospektiven Studien die Mortalität und Komorbiditäten wie Diabetes, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie (Sjostrom *et al.*, 2007). Auch die Ausprägung des Schlafapnoesyndroms war rückläufig (Korenkov und Sauerland, 2007).

Trotz vielversprechender Forschungsansätze in der medikamentösen Adipositas therapie werden momentan nur zwei Medikamente auf dem pharmazeutischen Markt angeboten: Orlistat und Sibutramin. Ein drittes - Rimonabant (Acomplia®) - wurde 2008 aufgrund von Nebenwirkungen vom Markt genommen.

Orlistat (Xenical®) ist ein Lipaseinhibitor. Bei kontinuierlicher Einnahme führt das Medikament jedoch nur zu einem geringen Gewichtsverlust. Unerwünschte Nebenwirkungen sind u.a. Steatorrhoe und Meteorismus.

Sibutramin (Reductil®) ist ein Noradrenalin- und Serotoninwiederaufnahmehemmer. Auch er verbessert die metabolische Stoffwechsellage, löst aber zahlreiche Nebenwirkungen wie Obstipation, Übelkeit, Mundtrockenheit, Schlaflosigkeit, Angst, Tachykardie, Flush und Hypertonie aus.

Der vom Markt genommene Antagonist des Cannabinoid Rezeptor Typ 1 Rimonabant (Acomplia®) verursachte eine Fülle von positiven metabolischen und kardiovaskulären Stoffwechseleffekten bei adipösen Patienten. Gravierend waren aber die von Rimonabant

ausgelösten Nebenwirkungen, wie z.B. psychische Symptome, die mit einer gesteigerten Suizidrate einhergingen.

Für das bessere Verständnis der gewonnenen Daten werden in den nächsten Absätzen die Fettgewebefunktionen erläutert, die unterschiedlichen Fettgewebsdepots näher charakterisiert, das Endocannabinoidsystem und seine Funktion beschrieben und die bisherigen Ergebnisse einer CB1-Rezeptormodulation evaluiert.

### **1.3 Das Fettgewebe und seine Funktionen**

Früher wurde angenommen, dass das Fettgewebe eine träge Masse ist. Heute weiß man, dass es als aktives endokrines Organ wirkt. Es reguliert nicht nur optimal das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -abgabe, sondern auch die Synthese und Sekretion pleiotroper Hormone (Fruhbeck *et al.*, 2001; Pittas *et al.*, 2004). Um die Wirkweise und mögliche therapeutische Ansätze besser verstehen zu können, ist es notwendig, auf die wichtigsten Fettgewebefunktionen wie Insulinsensitivität, Thermogenese und endokrine Funktionen einzugehen.

Die Speicherung von Triglyceriden ist eine zentrale Aufgabe des Fettgewebes. Die Prozesse der Lipogenese (Energiespeicherung) und der Lipolyse (Energiebereitstellung) wechseln sich ständig ab. Dabei ist Insulin ein wichtiges lipogenese-regulierendes Hormon. Es regt die Zellen zur Glukoseaufnahme und Lipogenese an. Insulin senkt die Glukosekonzentration im Blut durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme in den Muskeln und im Fettgewebe und reduziert die Glukoseproduktion in der Leber. Wird dieser Prozess bei Adipositas aus dem Gleichgewicht gebracht, kann Insulin nicht mehr optimal auf seine Zielzellen wirken. Es kommt zu einer Insulinresistenz als Vorstufe einer gestörten Glukosetoleranz. Der Prozess der Lipolyse wird gesteigert und es kommt zur Oxidation von freien Fettsäuren und einer erhöhten Glukoneogenese. Die dadurch verursachte Lipotoxizität führt wiederum zu einer reduzierten Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle und letztendlich zur Hyperglykämie. Bleibt dieser Zustand längerfristig bestehen, ist er irreversibel und führt zum Diabetes mellitus Typ 2. Eine weitere Funktion des Fettgewebes ist die Wärmeregulation des Körpers. Im Körper gibt es verschiedene Fettgewebsdepots. Funktionell unterscheiden sich vor allem das weiße und das braune Fettgewebe. Das weiße Fettgewebe dient unter anderem der Wärmeisolierung. Demgegenüber können die braunen Fettzellen durch die Oxidation von Fettsäuren sogar Wärme produzieren. In der inneren Membran der Mitochondrien dient das sog. Protein Thermogenin als Entkoppler, indem es als Uniporter Protonen über die Membran transportiert. Der durch die  $\beta$ -Oxidation und die

Atmungskette aufgebaute Protonengradient wird abgebaut und die darin gespeicherte Energie in Wärme umgesetzt. Dieser Prozess wird als Thermogenese bezeichnet. Energie wird also nicht mehr dem Organismus in Form von ATP zur Verfügung gestellt, sondern als Wärme abgegeben. Zusätzlich weist das braune Fettgewebe eine besonders hohe Konzentration an Glycerolkinase auf, so dass das durch den Fettabbau frei werdende Glycerin phosphoryliert und ebenfalls metabolisch genutzt werden kann.

Des Weiteren besitzt das Fettgewebe endokrine Aktivität. In ihm werden Botenstoffe produziert und sezerniert. Etwa 100 solcher Stoffe sind bis zum heutigen Tag entdeckt.

Unter Adipozytokinen versteht man bioaktive Peptide des Fettgewebes, die autokrin, parakrin oder endokrin wirken. Diese Adipozytokine beeinflussen die Energiebalance, den Lipid- und Glukosemetabolismus, Zytokine, Angiogenese und Blutdruckregulation, Immun- und Komplementsystem, sowie Zellteilung und Mitose (Guerre-Millo, 2003; Muoio und Newgard, 2006). Als erstes Adipozytokin wurde 1994 Leptin beschrieben, das auf den Hypothalamus wirkt und die Nahrungsaufnahme vermindert (Zhang *et al.*, 1994). Die Leptingabe - lange Zeit ein Hoffnungsträger der Adipositas therapie - konnte nur bei Patienten mit schwerer genetisch bedingter oder erworbener Lipodystrophie positive Ergebnisse erzielen. Sie versagte hingegen als Breitbandtherapeutikum gegen Adipositas. Danach wurden viele weitere, von Fettzellen sezernierte Hormone entdeckt, u.a. Resistin, PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor), Adiponectin, TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor), Angiotensin und diverse Zytokine. Diverse Effekte dieser Adipozytokine, vor allem auf den Metabolismus, aber auch auf Teile des Immunsystems, kardiovaskuläre Komponenten und das reproduktive System wurden beschrieben (Xu *et al.*, 2004; Bertolani und Marra, 2010; DeMarco *et al.*, 2010; Kassi *et al.*, 2010; Kloting *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Zhuo *et al.*, 2010). Diese Sekretionsprodukte sind essentiell, um die Pathologie und Komplexität der Adipositas und ihre Komplikationen etwas besser zu verstehen.

Neben der Funktion der Adipozyten soll hier erläutert werden, wie Adipozyten entstehen und differenzieren. Adipozyten entwickeln sich aus multipotenten Stammzellen mesodermalen Ursprungs. Die terminale Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten wird von einer vermehrten Lipideinlagerung begleitet. Der Großteil der Zellen reift heran, ein Rest an pluripotenten Stammzellen bleibt erhalten und steht bei Zellverlusten als Reserve zur Verfügung (Vespohl EJ, 2006). Während der

Differenzierung können Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet werden. Präadipozyten weisen eine fibroblastenartige Struktur auf. Im Laufe der Adipogenese runden sich diese Zellen ab und lagern Lipide ein. Neben den morphologischen Veränderungen kommt es differenzierungsabhängig zu der Expression von Adipozytenmarkern. Die Adipozytendifferenzierung beruht auf dem komplexen Zusammenspiel einiger Faktoren, die - je nach Reifungsstadium - aktiviert oder supprimiert werden. Die Adipogenese wird in drei Phasen unterteilt: In der frühen Phase unterdrückt der Präadipozytenfaktor Pref-1 die Lipideinlagerung, in der anschließenden intermediären Phase sind Proteine wie C/EBP  $\alpha/\beta/\delta$  (*CCAAT/enhancer binding protein*) aktiv. Diese initiieren ihrerseits den Übergang und die Expression der späten Differenzierungsmarker wie PPAR $\gamma$ , AP2 und GLUT 4 und somit die dritte und letzte Phase (Hamm *et al.*, 1999; Verspohl EJ, 2006). Dieser Differenzierungsprozess von Präadipozyten zu Adipozyten ist die Voraussetzung für die Auswahl des Untersuchungszeitpunktes während der Adipogenese und der Interpretation der gewonnenen Daten.

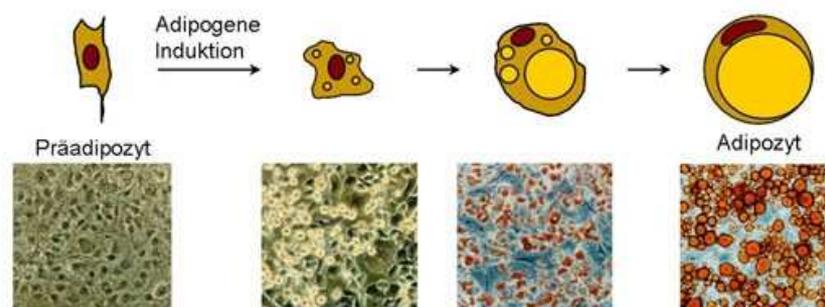


Abbildung 5: **Differenzierungsprozess vom Präadipozyten zum reifen, lipidgefüllten Adipozyten**

Dieser Differenzierungsprozess läuft bei schlanken und adipösen Menschen zunächst in ähnlicher Weise ab. Wird dem menschlichen Organismus nun bei Adipositas ein Überangebot an Glukose und Lipiden zur Verfügung gestellt, kann das Fettgewebe auf zwei Arten reagieren: durch eine Erhöhung der Zellzahl bei gleichbleibender Zellgröße der adipozytären Hyperplasie oder durch Zellvergrößerung der adipozytären Hypertrophie. Bei der Adipositas im Erwachsenenalter kommt es meist erst zur Hypertrophie der Fettzellen. Diese hypertrophen Riesenzellen sind hochgradig insulinresistent und sezernieren zudem die resistenzfördernden und inflammatorisch wirksamen Adipozytokine (Schilling *et al.*, 2004). Bei anhaltender übermäßiger Fettaufnahme kann es dann wieder zu einer Hyperplasie der Fettzellen kommen.

## 1.4 Charakterisierung der unterschiedlichen Fettzelldepots

In der Wissenschaft ist seit Jahrzehnten bekannt, dass unterschiedliche Fettgewebsdepots auch verschiedene metabolische Eigenschaften besitzen. Differenziert wird u.a. zwischen drei Depots: dem viszeralen, dem subkutanen und dem braunen Fettgewebe.

Die genannten Fettdepots werden durch verschiedene metabolische Funktionen wie Adipozytokinproduktion, Lipolyse und Insulinsensitivität charakterisiert (Wajchenberg, 2000). Als Maß für das Viszeralfett (Bauchfett) dient der Taillen-Hüft-Umfang oder auch der „*waist to hip ratio*“. Ein Taillenumfang von über 80 cm bei Frauen und über 94 cm bei Männern gilt als negativer Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und ist im Hinblick auf gesundheitliche Folgen sogar deutlich aussagekräftiger als der *BMI*. Das viszerale Fett gilt unter anderem als Prädiktor des Mortalitätsrisikos. Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass eine ausgeprägte Reduzierung des viszeralen Fettgewebes lebensverlängernd wirkt (Huffman und Barzilai, 2010). Bei Mäusen wird es als epididymales Fettgewebe bezeichnet. Denn das viszerale Fett birgt ein erhöhtes Risiko für Dyslipidämie, Bluthochdruck, Typ 2 Diabetes mellitus, Schlafapnoesyndrom etc., also den Komponenten des metabolischen Syndroms (Jensen, 2008). Eine Reduzierung des viszeralen Fettes durch eine Omentektomie verringert den Glukose- und Insulinspiegel im Menschen. Dagegen führt eine Abnahme des subkutanen Fettgewebes, zum Beispiel durch Liposuktion, häufig nicht zu einer Verbesserung des Glukose- und Lipidstoffwechsels (Giugliano *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2004). Die Adipositasentwicklung ist mit einer gesteigerten Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe assoziiert. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Monocyteninfiltrationsrate ins viszerale Fett deutlich höher ist als in das subkutane Fettgewebe. Die Genexpression für Angiotensinogen, Komplementfaktoren und Fettsäure bindendes Protein 4 ist im viszeralen Fett deutlich ausgeprägter als im subkutanen Fettgewebe. Eine Humanstudie an extrem adipösen Patienten kam zu dem Ergebnis, dass viszerales Fett ein Hauptrisikofaktor für die Produktion von erhöhten Plasma IL-6-Konzentrationen ist und dadurch eine inflammatorische Antwort auslöst. Durch die Dysfunktion des viszeralen Fettgewebes kommt es zur Hypersekretion von proatherogenen, proinflammatorischen und prodiabetischen Adipozytokinen, die die Adiponektinproduktion vermindern (Hajer *et al.*, 2008). Auch CT-Untersuchungen haben gezeigt, dass die viszerale Fettmasse deutlich stärker mit Entzündungsprozessen und Biomarkern des oxidativen Stresses verknüpft ist als das subkutane Fett (Pou *et al.*, 2007).

Das subkutane Fettgewebe befindet sich in der Subkutis und in der Leistenregion. Bei der Maus wird es als inguinales Fett bezeichnet. Subkutanes Fett wirkt zum Teil protektiv, da es das Risiko eines gestörten Glukosemetabolismus und einer Dyslipidämie reduziert - unabhängig von der Menge an viszeralem Fett (Snijder *et al.*, 2005; Huffman und Barzilai, 2010). Transplantiert man inguinales Fett zwischen epididymale, viszerale Depots in Mausmodellen, kommt es zu einer Abnahme des Gewichtes und der Fettmasse, sowie einer Verbesserung des Glukosemetabolismus (Tran *et al.*, 2008). Porter *et al.* fanden in einer Humanstudie heraus, dass die subkutane Fettmasse - im Gegensatz zum viszeralen Fett - die Risikofaktoren für das metabolische Syndrom nicht linear steigert. Bei hohen Triglyceridspiegeln kann das subkutane Fett sogar protektiv wirken (Porter *et al.*, 2009).

Die Hauptaufgabe des braunen Fettgewebes liegt in der sog. Thermogenese, also der Wärmeerzeugung. Lange Zeit wurde angenommen, dass dieses Fettgewebe nur bei Säugetieren und Säuglingen vorkommt, nicht jedoch bei Erwachsenen. Diese Hypothese konnte aber in den letzten Jahren revidiert werden. Da Säuglinge eine besonders große Körperoberfläche haben, und sie nicht wie Erwachsene durch Muskelzittern Wärme produzieren können, ist das braune Fettgewebe bei ihnen für die Wärmeproduktion unverzichtbar. Adulte Menschen verlieren zwar das subscapuläre Fett, haben aber dennoch vereinzelte braune Fettgewebs-Cluster, die aktiv Thermogenese betreiben können (Nedergaard *et al.*, 2007). Diese Cluster und ihre Funktionsfähigkeit konnten durch diverse Studien mit PET-Untersuchungen verifiziert werden (Hany *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2003; Tatsumi *et al.*, 2004; Weber, 2004; Alkhalaf und Alavi, 2008) (Abb. 6). Vor allem nach Kälteexposition lässt sich interscapulär, cervical, paravertebral und subscapulär aktives braunes Fettgewebe nachweisen (Cypess *et al.*, 2009; Cypess und Kahn, 2010). Diese Regionen exprimieren hohe Level von PRDM 16, PGC-1 $\alpha$  und UCP-1 (Seale *et al.*, 2009). Diese sind Marker die typischerweise im braunen Fettgewebe exprimiert werden.

Braunes Fett ist sehr mitochondrienreich und wird von den sympathischen Nervenfasern innerviert. Im Vergleich zum weißen Fettgewebe hat es außerdem die Fähigkeit, den aufgebauten Protonengradienten der Atmungskette zu entkoppeln (Hansen und Kristiansen, 2006). Dieser Mechanismus der Thermogenese spielt bei Säugetieren für das Überleben in der Kälte und die Kontrolle des Energiehaushaltes nach Nahrungszufuhr („Diät-induzierte Thermogenese“) eine bedeutende Rolle (Cannon und Nedergaard, 2004).

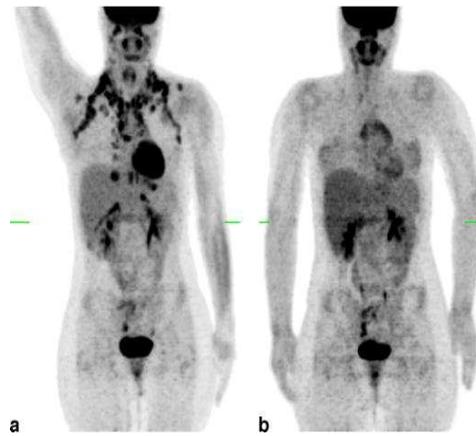


Abbildung 6: **Nachweis des braunen Fettgewebes bei Kälteexposition (a) und nach Aufwärmung (b) mit Hilfe eines PET-Scans:** Braunes Fettgewebe (in Schwarz dargestellt) findet sich v.a. cervical und perirenal (Garcia *et al.*, 2006).

Die Regulierung erfolgt über das sympathische Nervensystem, vermittelt durch die Aktivierung der  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptoren. Diese sind eng an die Induktion von *ucp-1* bei Maus und Mensch gekoppelt. UCP-1 dient als Entkoppler der Atmungskette, indem es als Uniporter Protonen über die Membran transportiert. Hierdurch wird der durch die  $\beta$ -Oxidation und Atmungskette aufgebaute Protonengradient abgebaut und die darin gespeicherte Energie in Wärme umgesetzt. Untersuchungen haben belegen können, dass Polymorphismen im *ucp-1* Gen allein und in Kombination mit Mutationen im  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor-Gen die Entwicklung von Adipositas begünstigen. Die Zerstörung aller drei  $\beta$ -adrenerger Rezeptor-Subtypen verhindert eine durch Kälte oder Nahrung induzierte Thermogenese und führte bei Mäusen zu einer starken Gewichtszunahme bei fettreicher Kost (Bachman *et al.*, 2002). Mäuse mit einer höheren Menge an braunem Fettgewebe neigen weniger zur Gewichtszunahme, haben eine höhere Insulinsensitivität, niedrigere Spiegel an freien Fettsäuren und sind vor Diabetes und anderen metabolischen Erkrankungen geschützt (Seale *et al.*, 2009).

In einer Humanstudie wurden gesunde Menschen mit murinen  $\beta$ 3-Agonisten behandelt, um deren positive metabolische Effekte zu analysieren. Nach 12-wöchiger Behandlung wurde eine verbesserte Insulinsensitivität, sowie eine verstärkte Lipolyse und Fettoxidation festgestellt (Weyer *et al.*, 1999). Das Problem ist jedoch, dass der  $\beta$ 3-adrenerge Rezeptor kaum im weißen Fettgewebe exprimiert wird und ein therapeutischer Nutzen deshalb unwahrscheinlich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass in weißen Fettzellen neue Fettzellen mit einer gesteigerten metabolischen Rate entstehen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um braune Fettzellen. Wenn diese Fettzellen in weißen Fettdepots entstehen, geht dies mit einem schlanken Phänotyp einher, wie es in transgenen Mausmodellen (*Knockout* von *eif4ebp1*<sup>-/-</sup>) gezeigt werden konnte (Cederberg *et al.*, 2001; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 2001). In den Mäusen war eine gesteigerte metabolische Rate, eine Zunahme des Sauerstoffverbrauches und der Insulinsensitivität messbar. Diese Tiere waren auch bei einem Überangebot an Nahrung vor Adipositas geschützt, ebenso wie UCP-1 transgene Mäuse, die UCP-1 in weißen Fettgewebedepots exprimierten (Stefl *et al.*, 1998).

Tiraby *et al.* fanden heraus, dass der *Peroxisome proliferator activated receptor*  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) und seine Coaktivatoren PGC-1 $\alpha$  und SRC-1 die Entwicklung des braunen Fettgewebes maßgeblich mitbestimmen. Eine ektope Expression von *pgc-1 $\alpha$*  induziert die Expression von braunen Adipozytengen innerhalb weißer Adipozyten. Diese Veränderungen der Genexpression gehen mit einer gesteigerten Fettsäureoxidation einher (Tiraby *et al.*, 2003). Die Behandlung von Mäusen mit synthetischen *ppar $\gamma$* -Agonisten unterdrückten die Expression von Genen im weißen Fettgewebe und induzierten einen braunen Adipozytenphänotyp (Vernochet *et al.*, 2009). Um eine Konversion von weißen zu braunen Adipozyten zu erreichen, benötigen diese Zellen die typischen Merkmale des braunen Fettgewebes. *Pgc-1 $\alpha$* , *ucp-1* müssen exprimiert bzw. hochreguliert werden. Es folgt eine stärkere Expression von Atmungskettengen und eine gesteigerte Kapazität zur Fettsäureoxidation. Inzwischen ist deutlich, dass noch viele weitere Transkriptions-Cofaktoren neben *pgc-1 $\alpha$*  - wie zum Beispiel *prdm 16* - existieren, die unerlässlich für eine Konversion von weißen zu braunen Adipozyten sind und die die Mitochondrienaktivität und -masse verändern können (Shi *et al.*, 2005; Powelka *et al.*, 2006; Seale *et al.*, 2007; Sonoda *et al.*, 2007).

## **1.5 Endocannabinoidsystem**

Seit mehreren tausend Jahren ist bekannt, dass die Cannabispflanze (*Cannabis sativa*) und vor allem der Stoff Tetrahydrocannabinol eine ausgeprägte psychoaktive Wirkung haben. Aber Cannabis war und ist bis heute nicht nur eine illegale Droge in einigen Ländern Europas, sondern findet auch therapeutische Anwendung: In der traditionellen indischen Medizin wird Cannabis seit langem als Analgetikum, Sedativum, Relaxans und Anxiolytikum verwendet (Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2003). Das Tetrahydrocannabinol wurde 1964 entdeckt (Mechoulam und Gaoni, 1965; Gaoni und

Mechoulam, 1971). Es dauerte jedoch noch einige Jahre bis zum Nachweis spezifischer Bindungsstellen für Cannabinoide und deren Derivate im Gehirn (Devane *et al.*, 1988). 1990 gelang es der Forschungsgruppe um Matsuda dann den Cannabinoid Typ 1-Rezeptor (CB1-Rezeptor) nachzuweisen (Matsuda *et al.*, 1990). Der Rezeptor wird nicht nur - wie anfänglich angenommen - im Gehirn exprimiert, sondern auch in peripheren Organen, wie zum Beispiel im Herz, im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas, im Skelettmuskel und auch im Fettgewebe (Bensaid *et al.*, 2003; Pagotto *et al.*, 2005; Matias und Di Marzo, 2007). Einer dänischen Arbeitsgruppe gelang dann 2011 ein weiterer Schritt. Sie fand heraus, dass der CB1-Rezeptor im humanen subkutanen Fettgewebe deutlich höher exprimiert wird als in viszeralen Depots (Bennetzen, 2011).

Kurze Zeit nach der Entdeckung des CB1-Rezeptors wurde 1993 ein weiterer Cannabinoidrezeptor identifiziert: der Cannabinoidrezeptor Typ 2 (CB2-Rezeptor). Er wird insbesondere in Immunzellen, aber auch in weiteren peripheren Organen wie Lunge, Uterus, Pankreas und im Fettgewebe exprimiert (Bouaboula *et al.*, 1993).

Bei den beiden Cannabisrezeptoren handelt es sich um 7-Transmembranrezeptoren, die G-Protein gekoppelt sind. Über das Pertussis-Toxin binden sie an Gi/G0-gekoppelte Proteine. Dabei vermindern sie die Aktivität der Adenylatcyclase und der Calciumkanäle. Gleichzeitig werden Kaliumkanäle und die *MAP-Kinase* aktiviert (Howlett, 2002).

Nach der Entdeckung der Rezeptoren wurde nach körpereigenen Liganden gesucht, um ihre Wirkung zu analysieren. Identifiziert wurden dabei zwei Hauptvertreter der endogenen Cannabinoide: das Arachidonethanolamid (Anandamid) und das 2-Arachidonyl-Glycerol (2-AG) (Devane *et al.*, 1988; Devane *et al.*, 1992; Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995). Diese Substanzen wirken an der gleichen Bindungsstelle wie das Tetrahydrocannabinol und sorgen so für eine Reizübertragung auf die Synapsen mit Auswirkungen auf das zentrale und periphere Nervensystem. Sie beeinflussen das Glücksgefühl, die Entspannung und die Analgesie (Schmerzlinderung). Sie können bei Bedarf im Gehirn, aber auch als Mediatoren in anderen Geweben gebildet werden. Zur Inaktivierung und zum Abbau werden die beiden Substanzen durch die Enzyme FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) bzw. durch die Monoacylglycerol-Lipase hydrolysiert (Cravatt *et al.*, 1996; Dinh *et al.*, 2002). So haben Tierversuche bestätigt, dass Mäuse, denen das FAAH Enzym fehlt, deutlich weniger Anandamide abbauen (Cravatt *et al.*, 2001).

In der folgenden Abbildung soll dargestellt werden, welche unterschiedlichen Wirkungen das Endocannabinoidsystem hat:

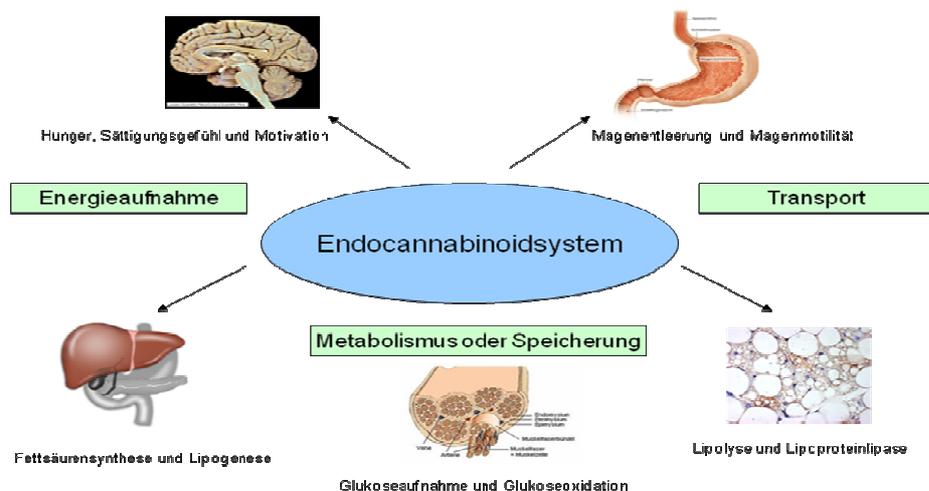


Abbildung 7: **Funktionen des Endocannabinoidsystems (ECS)**

Das ECS beeinflusst das Sättigungsgefühl im Hypothalamus, die Fettsäuresynthese und Lipogenese in der Leber, die Glukoseaufnahme und –oxidation im Muskel, die Lipolyse und Lipoproteinlipase im Fettgewebe und die Magenmotilität und Nährstoffweiterleitung aus dem Magen

Über den Cannabinoidrezeptor Typ 1 werden diverse Funktionen moduliert, z.B. das emotionale Verhalten, die Schmerzwahrnehmung, unterschiedliche kognitive Eigenschaften und das Essverhalten (Kirkham und Williams, 2004). Cannabiskonsum wirkt appetitanregend. Studien zeigen, dass Probanden nach Cannabiskonsum mehr Nahrung und vor allem besonders viele süße Snacks konsumieren (Kirkham, 2005). Diese appetitsteigernde Wirkung acht man sich heute in bestimmten Gebieten der Medizin therapeutisch zu Nutze. Bei zehrenden Krankheiten wie z.B. Krebserkrankungen oder HIV-Infektionen wird Dronabinol - ein synthetisch gewonnenes Tetrahydrocannabinol - eingesetzt. Es soll den Appetit anregen und dem Gewichtsverlust entgegenwirken (Plasse, 1991; Beal *et al.*, 1995; Haney *et al.*, 2005). In den letzten Jahren wird Dronabinol auch zunehmend bei älteren Menschen und Demenzkranken angewendet, um deren Appetit zu steigern (Volicer, 1997).

Für das Untersuchungsziel dieser Dissertation ist nur der CB1-Rezeptor relevant. Nur er hat bei einer medikamentösen Rezeptorblockade zu positiven metabolischen Effekten bei Tier und Mensch geführt.

## 1.6 CB1-Rezeptormodulation

Der CB1-Rezeptor kann durch einen Rezeptorantagonisten gehemmt werden. Dies gelang erstmals 1994 durch den medikamentösen CB1-Rezeptorblocker Rimonabant (SR 1417 16) (Rinaldi-Carmona *et al.*, 2004). Dieser Antagonist ist eine lipophile Substanz, die den endogenen Cannabinoiden sehr ähnlich ist. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es durch die Rezeptorblockierung zur Reduktion der Nahrungsaufnahme und zu anhaltendem Gewichtsverlust kam. Bei Mäusen mit Übergewicht, verursacht durch fettreiche Ernährung, verringerte Rimonabant (CB1-Rezeptorantagonist) die Fettmasse und verbesserte die metabolischen Parameter: Die Insulin- und Leptinkonzentrationen im Plasma wurden gesenkt und das Verhältnis von HDL- und LDL-Konzentration konnte positiv beeinflusst werden (Ravinet Trillou *et al.*, 2004). Bei adipösen Mäusen bewirkte eine Behandlung mit Rimonabant einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und eine gesteigerte Glukoseaufnahme im Muskel (Liu *et al.*, 2005). Rimonabant steigert *in-vitro* und *in-vivo* die Expression des Adipokins Adiponektin, das negativ regulierend auf die Lipogenese wirkt (Bensaid *et al.*, 2003). Zudem hemmt Rimonabant die Proliferation von 3T3-L1 Präadipozyten - eine murine Fettzelllinie - und steigert die Expression von Markern der späten Differenzierungsphase, ohne dass Lipidtröpfchen entstehen (Gary-Bobo *et al.*, 2006). Diese Wirkung ist nicht nur zentral gesteuert, sondern wird auch peripher vermittelt. Mit Rimonabant behandelte Mäuse wurden bei normaler Ernährung schlanker als Kontrolltiere aus dem gleichen Wurf und zeigten eine deutlich geringere Fettmasse (Cota *et al.*, 2003a; Cota *et al.*, 2003b). Die Tiere entwickelten - auch bei fettreicher Ernährung - weder Adipositas noch eine Insulin- oder Leptinresistenz (Ravinet Trillou *et al.*, 2004).

Das Medikament wurde in mehreren klinischen Studien, den sog. *RIO*-Studien (*Rimonabant in Obesity*) getestet. 6.600 Probanden, die übergewichtig oder meist sogar adipös waren, wurden in vier randomisierten, placebokontrollierten 1- bzw. 2-Jahres-Studien (*RIO-Lipids*, *RIO-Diabetes*, *RIO-Europe*, *RIO-North America*) untersucht (Despres *et al.*, 2005; Van Gaal *et al.*, 2005; Pi-Sunyer, 2006; Scheen *et al.*, 2006). Die Einnahme von 20 mg Rimonabant pro Tag führte im Vergleich zum Placebo zu einem Gewichtsverlust von 5 kg und zu einer Reduzierung des Hüftumfangs um durchschnittlich 4 cm. Zusätzlich konnten positive Effekte auf den Cholesterin- und Triglyceridhaushalt festgestellt werden. Der HbA1c wurde um durchschnittlich 0,7 % reduziert (Scheen *et al.*, 2006) und der systolische Blutdruck signifikant gesenkt. Nach Beendigung der Rimonabanttherapie glichen sich die metabolischen Parameter und die Gewichtssituation

der Placebogruppe wieder an (Engeli, 2008). Die *RIO*-Studien konnten demnach belegen, dass die Blockade des Endocannabinoidrezeptors die kardiovaskulären Risikofaktoren und die Glukosetoleranz verbessert, sowie die Fettmasse, die Dyslipidämien und Entzündungsmarker verringert (Rosenson, 2009).

Rimonabant wurde 2006 durch die *European Medical Agency (EMA)* zugelassen und war unter dem Namen Acomplia® in Deutschland und neun weiteren europäischen Ländern auf dem Markt erhältlich, um Patienten mit einem BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> oder einem BMI > 27 kg/m<sup>2</sup> und einem weiteren Risikofaktor wie Bluthochdruck oder Typ 2 Diabetes mellitus behandeln zu können. 2007 wurde Rimonabant in den USA wegen unerwartet starker psychischer Nebenwirkungen (Angstzustände, Depressionen und Suizidversuchen) von der *Food and Drug Administration (FDA)* nicht zugelassen (FDA, 2007) und auch ein Jahr später (2008) durch die *EMA* vom europäischen Arzneimittelmarkt zurückgezogen.

Dass Fettzellen Ziel- und Produktionsort von Endocannabinoiden sein können, steht mittlerweile fest. Adipogenese, Lipogenese und Glukoseaufnahme können durch Endocannabinoidwirkung über den CB1-Rezeptor stimuliert werden. Eine Blockade der genannten Effekte kann durch CB1-Rezeptorantagonisten erfolgen (Pagano *et al.*, 2008). Man kann also vermuten, dass die metabolisch positiven Effekte auf das Fettgewebe durch CB1-Rezeptormodulation zumindest teilweise durch periphere Wirkungen erreicht werden können, über die bisher wenig bekannt ist. Dadurch würde sich die Möglichkeit eröffnen, die Wirkungen einer CB1-Rezeptormodulation auf das Fettgewebe zu beschränken und damit gleichzeitig die negativen Auswirkungen in anderen Organen zu vermeiden.

## **1.7 Fragestellung**

Wegen ihrer vielschichtigen Wirkungen stehen die Endocannabinoide weiterhin im Fokus zahlreicher pharmakologischer Forschungsprojekte. Zurzeit liegt das Hauptaugenmerk auf peripheren Effekten, um negative zentrale Wirkungen zu reduzieren. Dabei ist bis heute unklar geblieben, welche peripheren Effekte im Fettgewebe nach CB1-Rezeptormodulation entstehen. Ziel der Arbeit ist es daher, die direkten Auswirkungen eines CB1-Rezeptor-*Knockdowns* bzw. -*Knockouts* auf das Fettgewebe zu analysieren.

Nach dem Stand der Forschung ergeben sich zwei zentrale Fragestellungen für die vorliegende Doktorarbeit:

1. **Kommt es zu peripheren metabolischen und endokrinen Veränderungen der Fettzellfunktionen während einer CB1-Rezeptorherunterregulation?**
2. **Kommt es zu depotspezifischen Unterschieden im Fettgewebe nach einem CB1-Rezeptor-Knockout?**

Um die Fragestellungen und die gewählten Verfahren zu illustrieren, wurde folgende Graphik konzipiert:

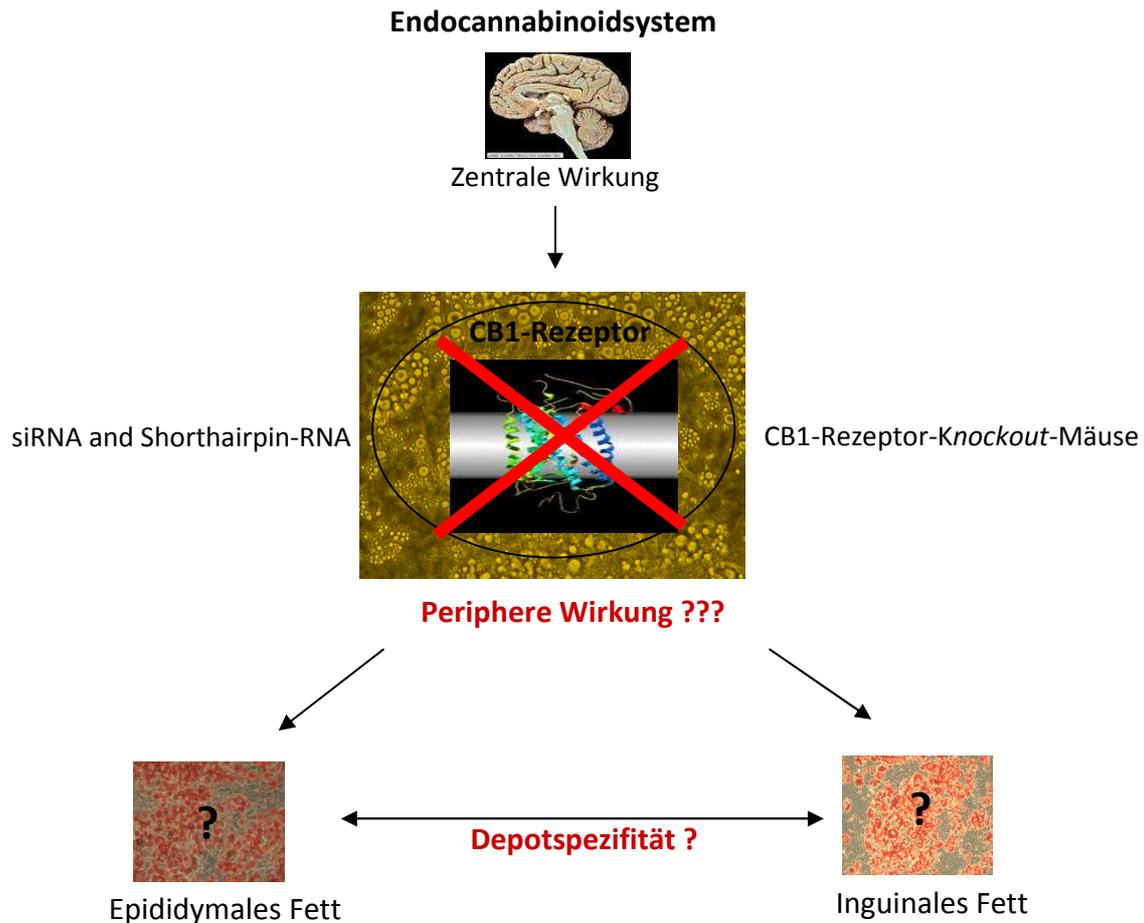


Abbildung 8: **Darstellung der Fragestellung und der Methodik.** Ziel ist durch CB1-Rezeptormodulation die Auswirkungen auf das periphere Fettgewebe zu untersuchen.

Der CB1-Rezeptor soll mit Hilfe von *siRNA*- und *shorthairpin*- Transfektion in Fettzellen herunterreguliert werden bzw. durch Generierung neuer Fettzelllinien aus CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen blockiert werden. Periphere metabolische und endokrine Veränderungen der Fettzellfunktion nach CB1-Rezeptorherunterregulation können so untersucht werden. Durch die Generierung neuer Fettzelllinien aus CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen besteht die Möglichkeit, einen kompletten Funktionsverlust des CB1-Rezeptors in den Fettzellen und somit depot-spezifische Unterschiede zu analysieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Geräte

- Agarosegelkammern: Peqlab Biotechnology GMBH, ErlangenRoth, Karlsruhe
- Autoklaviergeräte: 2540EL Systec, Wetzlar; Varioklav, H+P, Oberschleißheim
- Analysenwaage: Sartorius, Göttingen
- Digitalcamera: Olympus, Hamburg
- $\beta$ -Counter: 1409, Wallac, Turku, FIN
- Eismaschine: Scotsman AF-20, Enodis, Herborn
- Elektronikrührer Typ M23: Int. Laborat. App., Dottingen
- Elektronische Pipettierhilfe: accu-jet, Brand, Wertheim
- Elektroporationsgeräte: Gene pulser, BioRad, München; *Nucleofector* (Transfektionsgerät): Amaxa Biosystems/Lonza, Köln
- FACS-Gerät: FACS Canto, Becton and Dickinson, Franklin Lakes, USA
- Filmkassette: Hypercassette, Amersham Biotech, UK
- Fluoreszenzmikroskop: CKX 41, Olympus, Hamburg
- Fotokamera: Mp-4, Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
- Fugene Transfektionsreagenz, Roche, Mannheim
- Gelkammern (Agarose): Peqlab, Erlangen
- Heizblöcke: Thermomixer Compact Eppendorf, Hamburg
- Heizschrank: Lab-Therm, B. Braun, Melsungen
- Hiperfekt Transfektionsreagenz, Qiagen, Hilden
- Inkubator Typ B5060, EK CO<sub>2</sub>: Heraeus, Osterode
- Mikroskop: CK2, Olympus, Hamburg
- Mikrowellengerät: S2719N, Samsung, Schwalbach/Ts.
- Multistepper: Multipette Plus, Eppendorf, Hamburg
- Netzgeräte: Power Pac 300, BioRad, München; Power Supply 600, Pharmacia BioTech, SF, USA
- Neubauer-Zählkammer: Assistant Karl Hecht KG, Sondheim
- pH-Meter: 766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
- Photometer: BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
- Pipetten: Research, Eppendorf, Hamburg

- Real Time Thermocycler: Applied Biosystems, FC, CA, USA
- Real Time Thermocycler: Realplex, Eppendorf, Hamburg
- Rotator: Renner GmbH, Dannstadt
- Sauerstoffmessgerät: Oxygraph System, Hansatech, Norfolk, England
- Scanner: UMAX Astra 2200
- Schüttler Vortex Genie 2: Scientific Industries, Bohemia, USA
- Schwenker: Hassa, Lübeck
- Stickstofftank: Arpege 110, VWR International GmbH, Darmstadt
- Thermocycler: Cyclone Gradient, Peqlab, Erlangen
- UV-Leuchttisch: Vilber-Lourmat, Eberhardzell
- Wasserbad: Typ 3044, Köttermann, Hänigsen
- Werkbank (Steril) Nuaire Class II: Zapf Instruments, Sarstedt
- Westernblot-Apparatur: Mini Protean 3, BioRad, München
- Wippe: Doumax 1030, Heidolph
- Zentrifugen: Biofuge fresco, Rotor 3765; Heraeus, Osterode; MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburg ; Multifuge 3 S-R, Heraeus, Osterode

### 2.2.2 Verbrauchsartikel

#### Einmal-Küvetten

- Proteinphotometrie: Halbmikroküvetten Plastibrand, Wertheim
- RNA-Photometrie: Mikroküvetten Uvette, Eppendorf, Hamburg
- Elektroporationsgerät (Nucleofector), Amaxa Biosystems/ Lonza Köln

Film: Hyperfilm, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

Filter: Steritop Express Plus, 0,22 µm, Millipore Corporation, USA

Nitrozellulosemembran, Protan BA 85, Whatman, Dassel

Parafilm M, American National Can., St. Louis, USA

#### Pipettenspitzen

- *Biosphere Filter Tips* (10, 100, 200, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl), Sarstedt, Nümbrecht
- Stabpipetten (5, 10, 25, 50 ml), *Serological Pipette*, Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße (1,5/2 ml) Sarstedt, Nümbrecht

- RNase-frei, Sarstedt, Nümbrecht
- 96-Loch Platten, Sarstedt, Nümbrecht

Szintillationsröhrchen, Sigma, Deisenhofen

Zellschaber, Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturschalen:

- Zellkulturschalen (100/150 x 20 mm) Sarstedt, Nümbrecht
- 12-Loch-Platten Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- 6-Loch-Platten Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- 50 ml Röhrchen Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.3 Chemikalien

**Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany:** Aprotinin, Dexamethason, EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure, Titriplex II), Formalin, IGEPAL CA-630, Indomethazin, Isobutylmethylxanthin (IBMX), Isopropanol (100%), Leupeptin,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Natriumfluorid, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, *Oil Red O*, T3 (3,3',5-Triiod-L-Thyronin-Natriumsalz), TEMED (Tetramethylethylendiamin), Tween 20, bovines Insulin, Puromycin

**Fa. Merck, Darmstadt, Germany:** Chloroform, Dinatriumhydrogenphosphat 2H<sub>2</sub>O, Ethanol, Glukose, Kaliumchlorid, Kalium-dihydrogenphosphat, Kalziumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, 2-Propanol

**Fa. Qiagen, Hilden, Germany:** *siRNA* (Mm\_Cnr1\_1 HP *siRNA*: TAAGTTTACCATGTTTAGTAA, Mm\_Cnr1\_2 HP *siRNA*, Mm\_Cnr1\_3 HP *siRNA*, Mm\_Cnr1\_4 HP *siRNA*, Mm\_Cnr1\_5 HP *siRNA*, Mm\_Cnr1\_8 HP *siRNA*: TACAATAAGTATAGTGCTAAA), *siRNA*-kit (HiPerFect Transfection Reagent, Nonsilencing Control *siRNA*, Alexa Fluor 488 Labeled, Hs/Mm\_ MAPK1 Control *siRNA*, *siRNA* Suspension Buffer), QIAprep Spin Miniprep Kit

**Fa. Operon Biotechnologies GMBH, Köln, Germany:** *shCB1R-3*: GCCTATAAGAGGATCGTCA (sense: GCCTATAAGAGGATCGTCA antisense: CGGATATTCTCCTAGCAGT); *shCB1R-4*: GCGGAAAGCTGCATCAAGA (sense:

GCGGAAAGCTGCATCAAGA antisense: CGCCTTTCGACGTAGTTCT); **shControl:** TAGCGACTAAACACATCAA (sense); ATCGCTGATTTGTGTAGTT (antisense)

**Fa. Roche, Mannheim, Germany:** Chemolumineszenzkit (BM Chemoluminescence Western Blotting Kit (Mouse, Rabbit), Cell death detection Plus kit, Ethidiumbromid, FuGene Transfektionsreagenz

**Fa. BioMol, Hamburg, Germany:** Glycin, HEPES (1 M Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure), Rinderserumalbumin (BSA), Tris

**Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Germany:** Fetales Kälberserum, (1,4-Dithiothreitol), Dulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM) *high Glukose* (45 g/l), Trizol, Trypsin-EDTA, Lipofektamin 2000 (Transfektionsreagenz), OptiMEM (reduziertes Serummedium)

**Fa. LONZA, Köln, Germany:** Nucleofection kit V for adherent cells (*Nucleofector Solution*)

**Fa. Macherey und Nagel:** Nucleospin RNA II kit

**Fa. New England Biolabs:** T4-Puffer, T4-Ligase,  $\alpha$ -Select-E.coli, NEB2-Puffer, XhoRI

**Chemikalien anderer Hersteller:** Acrylamid 30 (Roth, Karlsruhe), Agarose (Appllichem, Darmstadt), APS (Serva, Heidelberg), Aquasafe 300 Plus (ICN Biomedicals, Meckenheim), Bradford *Proteinassay* (BioRad, München), 2-Deoxy-[<sup>3</sup>H]-Glukose (NEN Life Science Products (Dreieich), DEPC (Fluka, Steinheim, CH), dNTPs (Fermentas, ST. Leon Roth) Entwickler: G 153B (Agfa-Gevaert Ag, Dübendorf), Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg) Fixierer: G 354 Schnellfixierer (AgfaGevaert Ag, Dübendorf), Glycerol (85 %) (Apotheke der Universität zu Lübeck), Insulin (Boehringer Mannheim), Nucleospin RNA Extract II (Macherey Nagel, Düren), Methanol (Baker, NL), Penicillin/Streptomycin (PAA, Cölbe), PMSF (Boehringer, Mannheim), SDS (Fluka, Steinheim, CH), siGLO (Thermo Fischer Scientific, Schwerte), pLXSN-EGFP (Vektor) und pSIREN-RetroQ-Neo® (Clontech/Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France; modifiziert durch Dr. D. Hadaschik PuroR ausgetauscht gegen NeoR Gen)

#### **2.1.3.1 Molekulargewichtsmarker**

BenchMark™ PreStained Protein Ladder, Invitrogen, Karlsruhe Germany

Ready-Load 100bp DNA ladder, Invitrogen, Karlsruhe, Germany

### **2.1.3 Antikörper**

#### **Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany**

Anti PPAR gamma

Anti Cannabinoid Receptor 1

#### **Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt, Germany**

Anti p44/42 Map Kinase

Anti phospho p44/42 Map Kinase (Thr 202/ Tyr 204)

Caspase-3 Antikörper

Phospho p53 (1C12) und p53 Antikörper

#### **Millipore, Schwalbach, Germany (ehemals Chemicon International Temecula, CA, USA)**

Anti Uncoupling Protein 1

Anti Cannabinoid Receptor 1

#### **Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany**

Anti Cannabinoid Receptor 1

#### **Sekundärantikörper**

anti-Ig-Mouse/anti Ig-Rabbit: (Chemiluminescence-Kit, Roche Diagnostics)

Goat anti-Rabbit: Dako, Glostrup, DK

Rabbit anti Goat: Dako, Glostrup, Dk

### **Enzyme und Puffer für RT-PCR**

Taq DNA Polymerase: Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

SuperScriptII RNase: Invitrogen, Karlsruhe

Anti-RNase: Ambion Inc. Austin TX, USA

dNTPs: Fermentas GmbH, ST. Leon-Rot

SYBR Premix Ex Taq: TaKaRa/ Lonza (Basel, Schweiz)

Water RT-PCR Grade: Ambion Inc., Austin TX, USA

Die Reaktionspuffer für alle Polymerasen wurden entsprechend der Herstellerempfehlung verwendet und vom jeweiligen Hersteller bezogen.

## 2.1.4 Primer

Oligo dT Primer zur c-DNA Synthese: Fa. Roche, Mannheim, Germany

Alle *Primer* wurden mit dem Programm *Primer Express* der Firma *Applied Biosystems* erstellt. Die so ausgewählte Primersequenz wurde von der Firma *Whatman Biotmetra*, (Göttingen) synthetisiert.

|  |   |
|--|---|
| <i>36B4:</i> Acc. Nr. NM_007475                      | AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT (Forward)<br>CCGCAGGGGCAGCAGTGGT (Reverse)  |
| <i>ucp-1:</i> Acc Nr. NM_009463                      | GTACTGGAAGCCTGGCCTTCACCTTGG (F)<br>ATGGTGAACCCGACAACCTCCGAAGTG(R) |
| <i>cnr-1:</i> Acc.Nr. NM_007726                      | ATGGTGAACCCGACAACCTCCGAAGTG (F)<br>TGTGCAGGCAGTCTGAGTCC (R)       |
| <i>pgc-1 <math>\alpha</math>:</i> Acc. Nr. NM_008904 | AGCACACGTTTATTCACGGGT (F)<br>GCCCCAAGTCCTCACATG (R)               |
| <i>ppary:</i> Acc. Nr. NM_011146                     | TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC (F)<br>AATCCTTGGCCCTCTGAGAT (R)              |
| <i>ap 2:</i> Acc. Nr. NM_001040106                   | CAAAATGTGTGATGCCTTTGTG (F)<br>CTCTTCCTTTGGCTCATGCC (R)            |
| <i>pref-1:</i> Acc. Nr. NM_010052                    | GATCTAAGCAGCGTTCCCCA (F)<br>AGCGTTCACTCGATTCCACAC (R)             |
| <i>glut 4:</i> Acc. Nr. NM_009204                    | GTGGCCACCTAGATGGGCT (F)<br>CCTGCAGACCCCTTCTCGA (R)                |
| <i>tfam:</i> Acc. Nr. NM_009360                      | GATGGCTGAAGTTGGACGAAG (F)<br>GGGCCTAATCCCAATGACAA (R)             |
| <i>nrf-1:</i> Acc. Nr. NM_010938                     | GCATGGAGCTCTATCATGGCA (F)<br>TGGCGTTCATTCCACCAGA (R)              |
| <i>il-6:</i> Acc. Nr. NM_031168                      | AGCCAGAGTCCTTCAGA (F)<br>GGTCCTTAGCCACTCC (R)                     |
| <i>mcp-1:</i> Acc. Nr. NM_011333                     | GCCCCACTCACCTGCTGCTACT (F)<br>CCTGCTGCTGGTGATCCTCTTGT (R)         |
| <i>tnf-<math>\alpha</math>:</i> Acc. Nr. NM_013693   | GGACCCAGTGTGGGAAGCT (F)<br>GCAAAAGAGGAGGCAACAAGG (R)              |

## **2.1.5 Puffer und Medien**

### **2.1.5.1 Zellkulturmedien**

#### Grundmedium

Fetales Kälberserum 20 %, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, DMEM mit Glukose, Pyridoxin und Glutamax (4,5 g/l)

#### Differenzierungsmedium

Fetales Kälberserum 20 %, T3 1 nM, Insulin 20 nM, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, DMEM mit Glukose, Pyridoxin und Glutamax (4,5 g/l)

#### Induktionsmedium

Dexamethasone 2 mg/l, NaCl 8 g/l, Indomethacine 50 µM, KCl 0,2 g/l, IBMX 100 µM, H<sub>2</sub>KO<sub>4</sub>P 0,2 g/l in Differenzierungsmedium Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\* 2H<sub>2</sub>O 1,44 g/l

#### Kulturmedium Primärzellen

1 M HEPES in Grundmedium

#### Isolationspuffer

NaCl 123 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, Glukose 5 mM, HEPES 100 mM, PEN/Strep 100 U/ml, BSA 4 % w/v Steril filtriert durch 0,2 micron

### **2.1.5.2 Puffer für Proteinanalysen**

#### Lysis-Puffer (pH 7,4 bei 4 °C)

HEPES 50 mM, NaCl 137 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl<sub>2</sub> 1 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, IGEPAL 1 % w/v, Glycerol (85%) 10 % vol., Inhibitoren frisch zu geben: Vanadat 2 mM, Leupeptin 10 µg/ml, Aprotinin 10 µg/ml, PMSF 2 mM, NaF 10 mM, EDTA 2 mM

#### Laemmli (5x)

Glycerol 50 % vol., SDS 100 g/l, Bromphenolblau 0,1 g/l, NaH<sub>2</sub>PO 50 mM, DTT 500 mM

#### Herstellung 1 M Natriumphosphat pH 7

1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monobasic, 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dibasic, beide Lösungen solange zusammen geben, bis pH 7 erreicht ist

#### Transferpuffer 10X

Methanol 20 % vol., Tris 30 mg/l, Glycin 144 mg/l

### Transferpuffer 1X zur Verwendung für 1000 ml

Methanol 200 ml, 10 X Transferpuffer 100 ml, Ad Aqua dest.

### Laufpuffer 10X

Tris 30,3 g/l, Glyzin 142,5 g/l, EDTA 3,35 g/l, SDS 10 g/l

### Waschpuffer (Rinsing Buffer)

Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 %, pH 7,2 bei 4 °C

### APS-Lösung

10 % (w/v) APS

### **2.1.5.3 Oil Red O Färbelösung**

Stocklösung: *Oil Red O* 0,5 g in 100 ml Isopropanol

Gebrauchslösung: 60 % *Oil Red O* Stocklösung, 40 % aqua dest.

### **2.1.5.4 Puffer zur Glukoseaufnahme Messung**

Krebs-Ringer-Puffer (KRH) pH 7,4

HEPES 20 mM, NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,25 mM

### **2.1.5.5 Puffer für die Agarosegelelektrophorese**

TBE Puffer

Tris 890 mM, Borsäure 890 mM, Bromphenolblau 0,05 % (w/v) in 1x TBE

Auftragspuffer

Glycerin 50 % (w/v), SDS 0,2 % (w/v), EDTA 2 mM

DEPC Wasser

DEPC 1:1000 in Aqua dest.; mindestens 30 min rühren; über Nacht bei 37 °C dann autoklavieren

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generierung von Fettzelllinien

Epididymales und inguinales Fettgewebe wurde von CB1-Rezeptor-*Knockout* (KO)- und -*Wildtyp* (WT)-Mäusen isoliert. Es folgte ein Kollagenaseverdau in einem mit Kollagenase versetzten Isolationspuffer (1 mg Kollagenase in 1 ml Isolationspuffer bestehend aus 0,123 mM NaCl, 5 mM KCL, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glukose, 100 mM Hepes, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 4 % BSA) für 40 Minuten im 37 °C warmen und schwenkenden Wasserbad. Das verdaute Gewebe wurde anschließend durch einen Nylofilter (100 µm) filtriert und danach bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit Isolationspuffer gewaschen und es folgte eine weitere Zentrifugation bei 200 g für 10 min. Das Pellet wurde in Grundmedium resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden auf Kulturplatten gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zu einer Konfluenz von 60-70 % kultiviert.

Phoenix-Zellen wurden kultiviert, um einen Virusüberstand zu erhalten. Die Transfektion der Helferzellen erfolgte mit 45 µl Fugene. Hinzugefügt wurde 1,5 ml DMEM und der Mix wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurden 60 µl gelöste DNA des für SV40T-Antigen-kodierenden pBabe-Vektors und der eben beschriebene Mix für 30 min inkubiert. Die Lösung wurde nach Inkubation auf eine Zellkulturplatte gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Grundmedium ersetzt. Der Virusüberstand wurde nach 24 h in ein Falcon-Gefäß überführt und mit 8 µg Polybrene versetzt und filtriert (0,45 µm). Nach 24 Stunden erfolgte erneut eine Abnahme des Virusüberstandes. Nach Erreichen einer 50 %igen Konfluenz wurden isolierte Präadipozyten über Nacht mit 1 ml des Virusüberstandes des retroviralen Vektors pBabe infiziert. Dieser kodiert für das SV40T-Antigen und weist eine Puromycin-Resistenz auf. Eine Kultivierung erfolgte für 72 h in Grundmedium. Dann kam es zur Selektionierung der Zellen für eine Dauer von 3 Wochen mit 2 µg/ml Puromycin-enthaltendem Grundmedium. Immortalisierte Zellen wurden nach 80 %iger Konfluenz auf große Zellkulturschalen ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde für spätere Versuchsreihen weggefroren, die restlichen Platten konnten direkt für geplante Versuche verwendet werden. Die Isolation und die Selektion wurden unter Anleitung der Biologin Dr. rer. nat. Nina Perwitz durchgeführt.

Beim Aufbau der neuen murinen Fettzelllinie und den Experimenten im Labor wurden die Leitlinien des *National Institute of Health* (NIH) befolgt. Das Konzept für die Pflege und

den Umgang mit Labortieren hat das zuständige Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Bundeslandes Schleswig-Holstein genehmigt (Genehmigung siehe Anhang S.101).

### **2.2.2 Kultivierung und Differenzierung von Adipozyten**

Verwendet wurden die neu generierten Fettzelllinien aus CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen. Diese Fettzellen lassen sich für ca. 28-35 Teilungszyklen kultivieren. Zuerst wachsen die Zellen auf einer sogenannten Masterschale im Grundmedium (DMEM mit Glukose, Pyridoxin und Glutamax 4,5 g/l, 20 % FBS, 100 U/l Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin). Bei 80-90 %iger Konfluenz werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann von der Platte mit Trypsin (5 ml) für 3 min inkubiert und anschließend gelöst. Die Präadipozyten wurden dann in 10 cm Schalen bzw. 6-Loch-Platten ausgesät und wurden im Differenzierungsmedium DMEM (20 % Fetal bovines Serum, 4,5 g/l Glukose, 20 nM Insulin und 1 nM Trijodthyronin) im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C gelagert. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurde durch die einmalige Gabe von Induktionsmedium für 24 h die Einlagerung von Lipiden initiiert. Bis zur vollständigen Reifung wurden die Zellen in Differenzierungsmedium kultiviert, das täglich erneuert wurde (Klein *et al.*, 2002). Der Erfolg der Adipogenese wurde mikroskopisch durch Überprüfung der Lipideinlagerungen um den Zellkern herum untersucht. Im Durchschnitt waren die Fettzellen 6 Tage nach Induktion vollständig ausgereift.

### **2.2.3 Experimente zum *Knockdown* von Fettzellrezeptoren durch RNA-Interferenz**

Im Zentrum der Experimente stand das Ziel, den *Knockdown* (Herunterregulation) von Fettzellrezeptoren durch *small interfering RNA* (*siRNA*) zu erreichen. Diese Methode wird angewendet, um mit synthetisch hergestellter *siRNA* die Expression bestimmter Zielgene zu unterdrücken. Es mussten mehrere methodische Ansätze getestet werden, um einen erfolgreichen *Knockdown* in den schwer zu transfizierenden Adipozyten zu erreichen.

#### **2.2.3.1 Lipofektion**

Zuerst wurde die Transfektion mit Lipotransfektionsreagenzien versucht. Dieses Verfahren nutzt die unterschiedlichen Ladungen des *siRNA*-Komplexes und die negativ geladene Zellmembran. Die Tests wurden mit der Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 durchgeführt. Die Transfektion mit Lipidreagenzien ist lediglich für Präadipozyten

geeignet, da die Transfektionsreagenzien Schwierigkeiten haben in die Lipidvakuolen zu endozytieren.

Die Transfektion wurde in 70-90 % konfluenten Präadipozyten ausgeführt. Die Zellen konnten bei dieser Methode adhärent auf der Zellkulturplatte bleiben. Für das Einschleusen der *siRNA* wurde das Differenzierungsmedium durch DMEM high glucose ohne Serum- und Antibiotikazugabe ersetzt. 5 µl Lipofectamin 2000 wurde in 250 µl serumfreiem Medium aufgenommen und für 5 min inkubiert. 100 pmol bzw. 200 pmol *siRNA* wurden zu 250 µl Medium hinzugefügt. Beide Suspensionen wurden kombiniert und erneut für 20 min inkubiert. 500 µl des Gemischs wurde dann auf ein Loch einer 6-Loch Kulturplatte gefüllt, indem jeweils 2500 µl serumfreies Medium vorgelegt waren. Die Zellen wurden nun 6 h mit dem Transfektionsmix inklusive der *siRNA* im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Transfektionsmix wurde abgenommen und die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde frisches Differenzierungsmedium hinzugefügt und die Zellen kultiviert.

#### **2.2.3.2 Elektroporation und Lipofektionsreagenz (Nucleofector)**

Generell sind Adipozyten aufgrund der vielen Lipideinlagerungen mit einem Lipofektionsreagenz schwerer zu transfizieren als Präadipozyten und dadurch erreicht man in den ausdifferenzierten Zellen meist etwas niedrigere Transfektions- und *Knockdown*-Raten. Um die Transfektionsrate zu steigern, wurde deshalb eine Kombination aus Elektroporation und Lipofektionsreagenz getestet. Dazu wurde das Transfektionsgerät *Nucleofector* der Firma Amaxa/Lonza verwendet. Dieses basiert auf einer non-viralen Methode mit einer Kombination von elektrischen Parametern und einer speziellen Lipofektionsreagenz, der *Nucleofectorsolution*. Mit ihr können hohe Transfektionsraten erreicht werden, da die Einschleusung der *siRNA* direkt in den Zellkern gelingt.

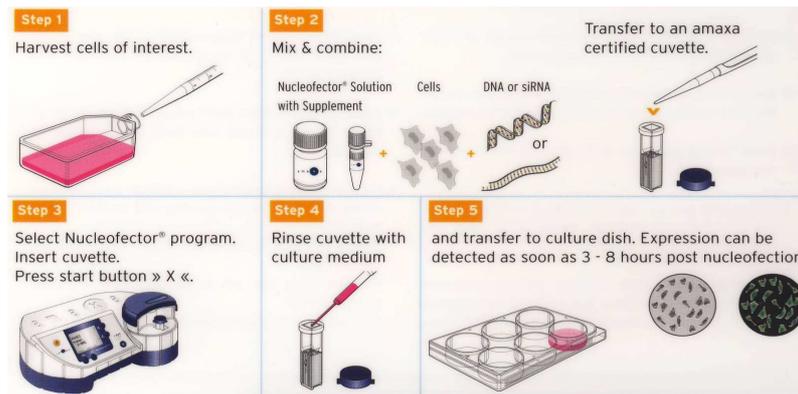


Abbildung 9: **Transfektionsprotokoll des Nucleofectors:** Kultivierte Zellen werden mit der „Nucleofectorsolution“ und siRNA in eine Kuvette transferiert und im Nucleofector elektroporiert. Dabei wandert die siRNA in den Kern. Anschließend kann die transfizierte Zellsuspension neu kultiviert werden (Transfektionsprotokoll der Firma Amaxa/Lonza).

Mit diesem Verfahren der Elektroporation gelang es in einem ersten Schritt einen *Knockdown* der *MAP-Kinase* in Präadipozyten und Adipozyten zu etablieren. Die *MAP-Kinase* ist ein Rezeptor, der sich gut herunter regulieren lässt und sich zur Etablierung des *Knockdown*-Verfahrens eignet. In einem nächsten Schritt folgte dann die Etablierung des Transfektionsprozesses für den CB1-Rezeptor-*Knockdown*. Präadipozyten bei 90 %iger Konfluenz bzw. Adipozyten am 2. Tag nach Induktion wurden mit 200 pmol siRNA (siRNA 1 200 pmol bzw. siRNA 1+8 jeweils 100 pmol) und parallel mit einer Negativkontrolle (*non-targeting Allstars Negative Control siRNA*) transfiziert. Die Elektroporation folgte nach Angaben des Herstellers. Die adhärenen Zellen wurden mit 500 µl Trypsin von der Kulturplatte gelöst. Anschließend wurde der Prozess mit Kultumedium gestoppt und die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation mit 800 g und ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS (*Phosphate Buffer Saline; Phosphat gepufferte Salzlösung*). Danach wurde das Zellpellet in 100 µl Nucleofektorlösung V (Zelllinien *Nucleofactor Kit V*) resuspendiert und die CB1-Rezeptor siRNA bzw. die Kontroll siRNA hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die Transfektionskuvette überführt, und die Elektroporation mit dem Programm T-030 für Präadipozyten bzw. T-033 für Adipozyten verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen auf 6-Loch Schalen zur weiteren Kultivierung ausgesät. Die geplanten Experimente wurden zwischen 48 h und 96 h nach Transfektion durchgeführt.

#### 2.2.4 *Shorthairpin*-Transfektion

Da mit dem *Knockdown* des CB1-Rezeptors durch Elektroporation nur eine transiente Herunterregulation gelingt, wurde parallel versucht, den *Knockdown* durch stabile Transfektion von *Hairpin*-Expressionsvektoren zu erreichen. Der größte Vorteil dieser Methode im Vergleich zu den anderen Verfahren ist, dass mit ihr die Expression des Zielgens langfristig unterdrückt werden kann.

Zuerst wurden die Sequenzen des zu regulierenden Gens in den Datenbanken *NCBI* (*National Center for Biotechnology*) und *Ensembl* gesucht und verglichen. Die verwendete *shRNA* wurde mit dem *siRNA Design Tool* der Firma Dharmacon, die die Ziel-mRNA nach möglichen Bindungsstellen absucht und bestimmte Regeln beachtet, herausgesucht. Aus den *siRNA*-Sequenzen wurden dann *shRNA*-Oligonukleotide konstruiert und in den pSIREN RetroQ-Neo kloniert. Somit konnten vier unterschiedliche *shRNA* verwendet werden, wobei die Ergebnisse der beiden Konstrukte mit den erfolgreichsten CB1-Rezeptor-*Knockdown*-Raten, Konstrukt 3 und Konstrukt 4, gezeigt werden. Als Negativkontrolle wurde eine Kontrolle kloniert, die keine Homologien zum bekannten Gen aufwies.

Zuerst wurde die Hybridisierung der Oligonukleotide durchgeführt. Die Oligonukleotide (*Sense* plus *Antisense* Strang) wurden in TE-Puffer aufgenommen, um eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu erhalten. Beide wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Dann wurde die Proben zum Aufbrechen der Sekundärstrukturen und der Hybridisierung in folgenden Zyklen erhitzt: 95 °C: 30 sec., 72 °C: 2 min, 37 °C: 2 min, 25 °C: 2 min. Auf Eis wurden die Proben mit TE-Puffer 50 fach verdünnt, um eine Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  zu erzielen.

Anschließend folgte die Ligation und Klonierung. Es wurde ein Ligationsmix pipettiert: 1  $\mu\text{l}$  pSIREN-RetroQ mit Neomycin Resistenz (EcoRI/BamHI-geschnitten; 25 ng/ $\mu\text{l}$ ); 1  $\mu\text{l}$  0,5  $\mu\text{M}$  hybridisierte Oligonucleotide; 1,5  $\mu\text{l}$  Wasser; 1  $\mu\text{l}$  5 x Puffer und 0,5  $\mu\text{l}$  T-4 Ligase. Der Ligationsansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Vervielfältigung der *shRNA*-Plasmide wurden diese in  $\alpha$ -Select E. coli transformiert. Durch einen Hitzeschock werden die Zellwände für die DNA durchlässiger. In der Zelle besteht dann die Möglichkeit der aktiven DNA-Replikation der Plasmide und es kommt zur Vermehrung. Dafür wurden 2  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes zu 15  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -Select-Bakterien hinzugefügt. In einem parallelen Ansatz wurde als Kontrolle das Plasmid ohne Insert

mitgeführt. Auf eine 30 minütige Inkubation auf Eis folgte ein 45 Sekunden dauernder Hitzeschock bei 42 °C. Nach 2 min auf Eis wurden zu jedem Ansatz 400 µl LB-Medium zugegeben und für 1 h im Thermomixer bei 37 °C geschüttelt. Dieser Ansatz wurde danach komplett auf eine LB-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgreicher Vermehrung wurden mehrere Bakterien-Klone von der LB-Platte gepickt und in 6 ml LB-Medium (inkl. 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert bzw. vermehrt.

Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des *QiaPrep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen, Miniprep*) aus den Bakterien isoliert (nach Herstellerangaben).

Die nächsten Schritte beinhalteten die Restriktionsanalyse und Sequenzierung. Es musste also erst einmal kontrolliert werden, ob die Bakterienklone das richtige Plasmid enthalten haben bzw. die richtige *shRNA* im Vektor enthalten war, und ob diese unmutiert vorlag. Bei der ursprünglichen Klonierung der Oligonukleotide wurde auch eine XhoI Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die isolierten Plasmide können im Anschluss mit dem Restriktionsenzym XhoI gespalten werden und dadurch wird es möglich, die korrekte Insertion der Oligonukleotide nachzuweisen. Es folgte also für zwei h ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA bei 37 °C: 4 µl Plasmid-DNA, 1 µl NEB 2, 1 µl 10x BSA; 3,5 µl Wasser und 0,5 µl des Restriktionsenzym XhoI (10 U/µl). Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Bei erfolgreicher Klonierung der Oligonukleotide mit XhoI-Schnittstellen sind nach dem Restriktionsverdau zwei DNA-Fragmente zu erwarten, die im Gel als Banden (5,25 kb und 1,34 kb) sichtbar werden. Die DNA von positiven Klonen wurde anschließend sequenziert, um sicherzustellen, dass die *shRNA*-kodierende Sequenz unmutiert vorlag. Für die Sequenzierung wurde folgender Ansatz pipettiert: 13 µl Plasmid-DNA (1 µg), 5 µl 5x Puffer, 1 µl pSIREN *Forward Primer* (10 µM), 2 µl *Big Dye*. Es gab mehrere Erwärmungsphasen: a. 3 min bei 96 °C, b. 25 mal 30 sec bei 96 °C, 20 sec bei 50 °C, und 4 min bei 60 °C und c. 20 sec bei 96 °C. Zur DNA-Fällung mussten noch 80 µl RNase-freies Wasser, 10 µl Natriumacetat und 250 µl Ethanol hinzugegeben werden. Der Ansatz wurde gevortext und bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das DNA-Pellet musste mit 70 %igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert werden. Erneut wurde der Überstand abpipettiert und das Reaktionsgefäß offen für 20 min zum Trocknen gelagert.

Die Konzentration von vier CB1-Rezeptor *shRNA*-Expressionsplasmiden und zwei Plasmiden, die jeweils eine Kontroll-*shRNA* kodieren, wurde im Photometer (280 nm) bestimmt.

Nach Restriktionsanalysen und Sequenzierung wurden die Proben mit den korrekten *shRNA*-Sequenzen nochmals transformiert, um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten.

Um reife Viren herzustellen, müssen diese Vektoren zunächst in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden. Bei ausreichend hoher DNA-Konzentration konnte nun die Transfektion der retrovirus-produzierenden Verpackungszelllinie *BOSC* vorgenommen werden. Diese Zelllinie exprimiert alle nötigen viralen Gene zur Virusreplikation und verpackt das transkribierte virale RNA-Genom von pSIREN in die Viruspartikel. Diese schnüren sich daraufhin von der Zellmembran ab und sind im Zellkulturüberstand zu finden. Der gewonnene Überstand wurde steril filtriert und in das Kulturmedium der Präadipozyten gegeben, um so eine Infektion der Zellen zu erreichen. Die infizierten Zellen wandern dann vom viralen Genom in das zelleigene, von dem dann die *shRNA* und das Neomycin-Resistenzgen exprimiert werden. Die erhaltenen Zellen können dann mit Neomycin (G418) selektiert werden.

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die *BOSC*-Zellen zunächst gezählt und ausgesät ( $1,7 \times 10^6$  in  $25 \text{ cm}^2$ ). Hinzugefügt wurden 6 ml DMEM mit 10 % FBS und die Zellen im Brutschrank für 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  gelagert. Für die folgende Transfektion wurden *Fugene* und *OptiMem* verwendet. Durch das nicht liposomale Transfektionsreagenz *Fugene* kann eine hohe Transfektionseffizienz erzielt werden, bei niedriger Toxizität. *OptiMem* ist ein Serumreduziertes Medium. Zu 50  $\mu\text{l}$  *OptiMem* wurde 5  $\mu\text{g}$  Plasmid hinzugefügt. Ein weiteres Reaktionsgefäß wurde für 5 min inkubiert, das 450  $\mu\text{l}$  *OptiMem* und 15  $\mu\text{l}$  *Fugene* enthielt. Danach wurden beide Gemische zusammenpipettiert und für 20 min inkubiert. Die Transfektionslösung wurde in die Kulturflaschen zu den Zellen hinzugefügt und dann für 48 h im Brutschrank kultiviert. Bei jeder Transfektion wurde auch pLXSN-EGFP transfiziert, ein EGFP-kodierendes Retrovirus. Dadurch konnte dann im Mikroskop die EGFP-Fluoreszenz als Transfektions- und Infektionskontrolle benutzt werden.

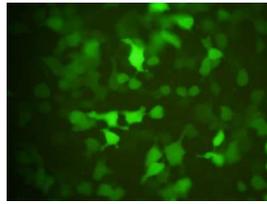


Abbildung 10: **BOSC-Zellen:** mikroskopisches Bild (x10) mit EGFP-kodierendem Retrovirus transfizierte BOSC-Zellen (grün gefärbt), verwendet als Transfektions- und Infektionskontrolle

Die Infektion der inguinalen Adipozyten mit den Retroviren erfolgte 48-72 h nach Transfektion der BOSC-Zellen. Am Tag vor der Infektion wurden 50.000 inguinale Präadipozyten in T25 Flaschen ausgesät. Zu 3 ml filtriertem Überstand wurde 1 ml DMEM (inkl. 20 % FBS und 16 µg/ml Polybrene - ein kationisches Polymer, dass die Interaktion zwischen Zellen und Retrovirus erhöht) hinzugefügt und diese Mischung auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium von den Wildtypzellen (ca. 80 %ige Konfluenz) entfernt und durch die Viruslösung mit Polybren ersetzt und wiederum für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden dann gesplittet und pro Konstrukt auf zwei 25 cm<sup>2</sup> Kulturschalen ausgesät und für weitere 24 h im Brutschrank gelagert. Dann wurde mit der Selektion begonnen und zu dem Grundmedium wurden 600 µg/ml Geneticin (G418) hinzugefügt. Positiv infizierte Zellen exprimieren das Neomycin-Resistenzgen und sind somit von der toxischen Wirkung des Geneticins geschützt. Dadurch wurde gewährleistet, dass ausschließlich infizierte Zellen für die folgenden Versuche verwendet wurden. Die Selektion wurde für eine Woche durchgeführt, bis sicher gestellt werden konnte, dass alle nicht infizierten Zellen eliminiert wurden. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Präadipozyten mitgeführt, um evaluieren zu können, wann die Zellen abgestorben waren.

Nach erfolgreicher Selektion konnten die Präadipozyten, bei denen die CB1-Rezeptorexpression dauerhaft inhibiert wurde, für die geplanten Versuche verwendet werden. Die Zellen wurden bei 80 %iger Konfluenz gesplittet und dann, je nach Experiment, in 10 cm-Schalen oder 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. So konnten Versuche an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 während der Differenzierung und somit in Präadipozyten und Adipozyten durchgeführt werden.

## **2.2.5 Nachweis der Transfektionseffizienz**

### **2.2.5.1 Lichtmikroskop und Immunfluoreszenzmikroskop**

Mit Hilfe eines Lichtmikroskopes konnte die Zellmorphologie und die Differenzierungsfähigkeit von Adipozyten analysiert werden. Lichtmikroskopische Bilder wurden in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung angefertigt. Durch den Einsatz von Filtern

im Immunfluoreszenzmikroskop wurden gefärbte Zellen beobachtet. Dadurch konnte die Transfektionseffizienz beurteilt werden. Das *Green Fluorescent Protein (GFP)* wurde bei einer Wellenlänge von 469 nm gemessen.

## **2.2.6 Messung der Veränderungen der mitochondrialen Biogenese**

### **2.2.6.1 Durchflusszytometrie (FACS= Fluoreszenz activated cell sorting)**

Die Anzahl der Mitochondrien wurde mittels *FACS*-Analysen gemessen. Diese Messmethode nutzt die Emission optischer Signale durch die Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Dafür wurden Adipozyten vorher mit dem mitochondrien-spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff *MitoTrackerGreen* (Emission bei 516 nm, Anregung bei 490 nm) gefärbt. Dadurch konnte eine quantitative Aussage über die Mitochondrienmenge gemacht werden.

Die in 6-Loch transfizierten und differenzierten Zellen wurden in PBS gewaschen und trypsiniert (0,5 ml für 5 Minuten bei 37 °C). Anschließend wurden die Zellen in 2,5 ml Differenzierungsmedium aufgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurden in 1 ml PBS aufgenommen und erneut bei 200 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 2 mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen dann in 500 µl 1:1 mit PBS verdünntem 4 % Paraformaldehyd aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gefärbt wurde nach einfachem Waschen in PBS mit 100 nM *MitoFluor-Green*-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert. Es wurde jeweils eine ungefärbte Zellprobe mit vorbereitet, um die Zellpopulation zu „gaten“, d.h. das Fenster aus Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht so zu verschieben, dass die Zellpopulation optimal erfasst werden kann. Die Histogramme wurden mit dem Programm *Flow jo Version 7.2.2* erstellt (siehe Ergebnisteil Seite 64) und anschließend ausgewertet.

### **2.2.6.2 Messung des Sauerstoffverbrauches**

Um die mitochondriale Aktivität der unterschiedlichen Zellen evaluieren zu können, wurde der Sauerstoffverbrauch mit einem *Oxygraphen* gemessen. Dabei wird mit einer Clark-Elektrode die respiratorische Aktivität der Zellsuspension gemessen. Zur Auswertung wurde das Programm *OxygraphPlus* verwendet.

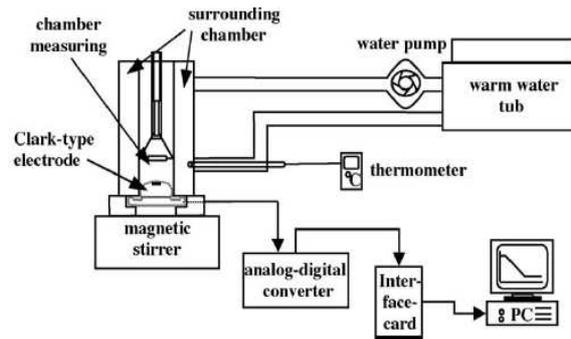


Abbildung 11: **Aufbau und Messgerät zur Sauerstoffmessung mit Hilfe des Oxygraphen:** Über ein Warmwasserbad wird die Messkammer auf einer konstanten Temperatur gehalten. In der Messkammer befinden sich die Clark-Elektrode und ein Magnetrührer. Das analoge Signal wird über einen Konverter in ein digitales umgewandelt und auf dem Computer angezeigt (Abbildung aus der Bedienungsanleitung).

Der Sauerstoffverbrauch wurde 96 h nach *siRNA*-Transfektion bzw. am 6. Tag nach Induktion bei bei *Shorthairpin*-transfizierten Zellen und den CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen gemessen. Zu Beginn jeder Messung, musste das Gerät aufgebaut und kalibriert werden. Auf die Elektrode wurde ein Tropfen KCl pipettiert und anschließend ein Stück Zigarettenpapier und Membran mittels Applikator und Applikatorring befestigt, ohne dass Luftblasen entstehen. Danach wurde die Messeinheit auf die Elektrode geschraubt und an ein 37 °C warmes Wasserbad angeschlossen. Um sicher zustellen, dass durch die Messeinheit keine Luft in die Messkammer gelangen konnte, wurde in diese destilliertes Wasser gefüllt und für 30 min gerührt. Bildeten sich während dieses Zeitraums Luftblasen auf der Membran wurde diese verworfen und erneuert. In die Öffnung wurde destilliertes Wasser gegeben und für 30 min beobachtet, dass keine Luftblasen entstehen. Dann folgte eine Kalibrierung mit vorgewärmtem, destilliertem Wasser und mit Hilfe von Stickstoff, um den Sauerstoff zu verdrängen. Nach der Kalibrierung erfolgte zunächst die Messung von DMEM ohne Zellen um sicher zu gehen, dass die Messlösung kein Sauerstoffverbrauch zeigte. Die Zellen wurden mit Trypsin von der Platte gelöst, in Kulturmedium aufgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2500 rpm für 5 min. Anschließend wurde das Zellpellet in 1000 µl DMEM ohne Zusätze aufgenommen. 250 µl der Probe wurde über einen Zeitraum von 10 min in der Messeinheit in 750 µl DMEM ohne Zusätze gemessen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Messkammer zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension während der gesamten Messzeit mit einem Magnetrührer durchmischt. Der Messbereich war an ein Zirkulationssystem und ein Wasserbad angeschlossen, um eine konstante Umgebungstemperatur von 37 °C zu garantieren. Die während der Messung

ankommenden Signale wurden durch die *Hansatech Software* registriert und in eine graphische Darstellung umgewandelt.

Nach der Sauerstoffmessung wurde die Zahl der lebenden Zellen in der Probe durch Färbung mit Trypanblau bestimmt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Dadurch konnte der Sauerstoffverbrauch pro Zelle ermittelt und in den unterschiedlichen Proben verglichen werden. Die Verbrauchsrate wurde in nmol O<sub>2</sub>/ml/min angegeben.

## **2.2.7 Weitere Methoden zur Evaluierung der peripheren Effekte auf das Fettgewebe nach CB1-Rezeptor-Knockdown bzw. -Knockout**

### **2.2.7.1 Oil red O Färbung**

Der fettspezifische *Oil red O* Farbstoff lagert sich in die Lipide ein. Dadurch ist es möglich, die Differenzierung von Adipozyten zu beurteilen und zu vergleichen.

Die Färbung der Zellen erfolgte jeweils am Tag 0, also vor der Induktion, und an den Tagen 3 und 6 nach der Induktion. Vor der Färbung mit *Oil red O*, wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 5 ml einer Formalinlösung fixiert. Die *Oil red O* Stocklösung wurde in einem Verhältnis von 2:3 mit Aqua dest. verdünnt und musste anschließend filtriert werden. Danach wurden die Zellen eine Stunde lang mit jeweils 5 ml pro 10 cm Schale und 1,5 ml pro 6-Loch mit der Färbelösung inkubiert. Um unspezifisch angelagerten Farbstoff zu entfernen, wurden die Zellen mehrmals mit Aqua dest. gewaschen. Die Auswertung erfolgte auf drei verschiedenen Wegen: die gesamte Zellkulturschale wurde gescannt und mikroskopische Aufnahmen wurden angefertigt und densitometrische Messungen wurden durchgeführt.

Vor der densitometrischen Messung wurde der Farbstoff durch Isopropanol im Verhältnis 1:20 aus den Lipiden ausgewaschen. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wurde jeweils 1 ml der entstandenen Farblösung in eine Küvette überführt. Bei Proben mit extrem hoher Lipideinlagerung musste eine Verdünnung erfolgen. Für jede Probe wurden Doppelwerte gemessen. Die optische Dichte konnte so bei einer Wellenlänge von 500 nm im Photometer bestimmt und Aussagen über den Grad der Differenzierung der Fettzellen getroffen werden.

### **2.2.7.2 Zelllyse zur Proteinaufreinigung**

Durch Zugabe von 450 µl 4 °C kaltem Lysispuffer (HEPES 50 mM, Na Cl 137 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Natriumpyrophosphat 10 mM, Natriumfluorid 10 mM, EDTA 2 mM, Glycerol 10 % vol., IGEBAL 1 % w/v, 2 mM Vanadate, 10 µl/ml Leupeptin, 10 µl/ml Aprotinin, 2 mM Phenylmethylsulphonylfluorid) wurden die Zellen aufgebrochen, mit einem Zellschaber von der Platte entfernt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden für 10 min bei 4 °C in einem Drehrad zur kompletten Zelllyse durchmischt. Um die Komponenten der Zellsuspension aufzutrennen, wurden diese für 10 min bei 13.000 rpm in der 4 °C kalten Zentrifuge sedimentiert. Anschließend wurden die Protein enthaltende Fraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration mit einem Bradford-Assay bestimmt (siehe Herstellerangaben, Bio-Rad).

### **2.2.7.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden können. Die Proteine wandern elektrophoretisch in Natriumlaurylsulfat.

Bei den Versuchen wurde ein Sammelgel (Aqua dest. 3,4 ml, Tris 0,5 M pH 6,8 625 µl, Acrylamid 850 µl, 10 % SDS 50 µl, 10 % APS 50 µl, TEMED 10 µl) und ein Trenngel (10 %: Aqua dest. 6 ml, Tris 1,5 M pH 8,8 3,75 ml, Acrylamid 5 ml, 10 % SDS 150 µl, 10 % APS 150 µl) verwendet. Die Proben wurden vor der Auftrennung im Gel für 5 min bei 95 °C erhitzt. Es wurde eine durchschnittliche elektrische Spannung von 100 Volt angelegt, bis die Proteine bzw. der Marker aufgetrennt waren.

### **2.2.7.4 Western Blot**

Der *Western Blot* erlaubt eine quantitative Bestimmung von Proteinen. Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden von einem Trenngel auf andere geeignete Träger übertragen und die Banden signalisieren die Proteinexpression. Die Proteinmoleküle wurden nach der Auftrennung mit einer Spannung von 100 V auf eine Nitrocellulosemembran bzw. auf eine PDVF-Membran übertragen. Die Transferzeit wurde der jeweiligen Proteingröße angepasst. Nach erfolgtem Transfer wurden die Membranen meist über Nacht in einer *Blockingsolution* bei 4 °C belassen. Es wurde entweder ein Waschpuffer mit 3-5 % BSA (*albumin bovine fraction*) oder einer mit *skim milk* verwendet.

Nach dem Entfernen der *Blockingsolution* und dreimaligem Waschen mit einem Waschpuffer wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper für das zu

detektierende Protein für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (3 x 5 min) folgte eine zweite Antikörperlösung (mit dem sog. Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper). Diese wurde für eine weitere Stunde auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:1500 eingesetzt. Nach weiteren Waschschritten (wieder 3 x 5 min) wurden die Proteinbanden nun mittels Chemolumineszenz und somit Substratumsetzung der Peroxidase sichtbar gemacht. Das Fluoreszenzsignal wurde in der Dunkelkammer auf den Film übertragen. Zur Quantifizierung und Auswertung der Proteinmenge wurde die *Quantity One Software* (Bio-Rad) verwendet.

#### **2.2.7.5 Cell death detection ELISA Plus**

Um einen Erklärungsansatz für das unterschiedliche Differenzierungsverhalten der beiden Fettzelldepots (inguinal und epididymal) zu finden, wurde der programmierte Zelltod näher analysiert. Die Apoptose wurde mittels *Cell death detection ELISA Plus* Kit von Roche nach Herstellerangaben bestimmt. Der Assay ist als quantitativer Sandwich-Enzym-Immunoassay aufgebaut.

Zellen wurden von der Kulturplatte entfernt und für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Es folgte eine Lysereaktion durch Zugabe von Lysepuffer. Nach der Zellyse und zehnminütiger Zentrifugation bei 2500 rpm wurde der Überstand bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden dann aufgetaut und am gleichen Tag gemessen. Bei der Doppelmessung wurden 20 µl der Probe in eine Streptavidin beschichtete 96-Loch *ELISA* Platte gegeben. Zur Auswertung wurden erst Mittelwerte gebildet, und diese dann durch die Basalwerte unbehandelter Zellen geteilt. Die Ergebnisse wurden relativ zu diesem Basalwert in Prozent angegeben.

#### **2.2.7.6 Glukoseuptake: Messung der Glukoseaufnahme in die Zelle**

Um eine Veränderung der Insulinsensitivität in den Fettzellen zu messen, wurde die Glukoseaufnahme in den Adipozyten bestimmt. Die Analysen erfolgten radioaktiv.

Gemessen wurde die Menge an radioaktiv markierter 2-Desoxyglukose, die unter Insulinstimulation mit verschiedenen Konzentrationen von den Adipozyten aufgenommen wurde. Ermittelt wurde die Glukoseaufnahme in ausdifferenzierten Zellen, also am 6. Tag nach Induktion im 12-well Format. Ab dem 5. Tag nach Induktion wurden die Zellen für 24 h im Mangelmedium (Nährmedium ohne Zusätze) kultiviert. Jede Stimulation wurde als Triplet durchgeführt. Nach Entfernung des Mangelmediums wurden die Adipozyten zur

Vorbereitung 2 x mit einem Krebs-Ringer-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 450 µl Krebs-Ringer-Puffer inkubiert und mit jeweils 1 nM, 10 nM oder 100 nM Insulin pro well für 30 min stimuliert. Es folgte eine vierminütige Inkubation mit 50 µl eines Gemisches aus einer 1 mM 2-Desoxyglukoselösung und 50 µCi/ml 2-Desoxy-3H Glukose. Danach wurde mit kaltem PBS gespült. Pro well wurden 500 µl einer 0,1 %igen Natriumdodezylsulfatlösung verwendet und für ca. 10 min inkubiert und geschüttelt. Das Zelllysat wurde in ein Messgefäß überführt und jeweils 2 ml einer Szintillationsflüssigkeit hinzugefügt. Anschließend wurde der Anteil der 2-Desoxyglukose für je eine Minute im  $\beta$ -Counter gezählt. Zur Auswertung des Versuchs wurde der Mittelwert der dreifachen Stimulation bestimmt.

#### **2.2.7.7 Gewinnung von RNA aus Präadipozyten und Adipozyten**

Um die RNA-Expression fettzellspezifischer Marker bestimmen zu können, muss die RNA isoliert und in c-DNA umgeschrieben werden.

Bei der Gewinnung von RNA aus *siRNA*- oder *shorthairpin* transfizierten Zellen aus 6-Lochs bzw. der Zellen nach CB1-Rezeptor-*Knockout* in 10 cm Kulturschalen wurde die RNA-Isolation mit Trizol durchgeführt und anschließend das *Nucleospin RNA II kit* von der Firma Macherey und Nagel verwendet.

Nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem PBS gespült. Sie wurden in flüssigem Stickstoff bei  $-134\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Es wurden 500 µl Trizol pro 6-Loch bzw. 1 ml Trizol pro 10 cm Platte verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf dem Vortexer gemischt. Da bei Adipozyten aufgrund des Fettfilms ein zusätzlicher Reinigungsschritt notwendig ist, wurde das Zelllysat anschließend für 10 min bei 13.000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne die entstandene Fettschicht in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und mit 250 µl Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde für 15 sec gevortext und bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Durch eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bildeten sich drei Schichten. Die RNA in der oberen wässrigen Schicht wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 700 µl kaltes Isopropanol hinzugefügt. Zur Fällung der RNA wurde das Reaktionsgefäß kurz durchgemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 13.000 rpm für 10 min und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Das dadurch entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml/500 µl 75 % ETOH

überschichtet und für 10 Sekunden gemischt. Die Probe wurde dann erneut für 10 min bei 4 °C zentrifugiert.

Das am Boden haftende Pellet enthielt die RNA, die in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde. Der anschließende DNA-Verdau wurde während eines zusätzlichen Reinigungsschrittes der RNA vorgenommen (*clean up* und DNA-Verdau nach Herstelleranleitung; *Nucleospin RNA II kit*). Die RNA Konzentration wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.7.8 Herstellung von c-DNA (Reverse Transkription)**

Zur Herstellung von c-DNA wurden 4 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl eingestellt. Zuerst wurde ein Primer-Mix aus Oligo-dt-Primern und dNTP-Mix angesetzt und für 5 min zusammen mit der RNA bei 65 °C im *Thermocycler* inkubiert. Des Weiteren wurde ein Transkriptase-Mix hergestellt und der Probe hinzugefügt. Die Mischung bestand aus 5 x Puffer, DTT, RNase-Inhibitor, Aqua dest. und *Super Script II*. Sie wurde für 60 min bei 45 °C und dann für 15 min bei 70 °C im *Thermocycler* erhitzt.

#### **2.2.7.9 Quantifizierende RT-PCR**

Nach Herstellung der cDNA konnte durch Anwendung einer quantitativen PCR die RNA-Expression bestimmter Rezeptoren und Fettzellmarker gemessen werden

Für diese Quantifizierung der RNA wurde eine 96-Loch Platte als Reaktionsgefäß eingesetzt. Zur besseren Kontrolle wurden Doppelmessungen durchgeführt und über 36B4 als *Housekeeping*-Gen normalisiert.

Pro Probenansatz wurden je 12,5 µl *SYBR Green Mix*, 1 µl *forward primer*, 1 µl *reward primer* und 8,5 µl Aqua dest. vorgelegt. Dazu wurden jeweils 2 µl der vorverdünnten c-DNA-Probe pipettiert. Vor Messbeginn wurde die Platte bei ca. 2000 rpm zentrifugiert.

Zum Denaturieren der cDNA wurden die Proben auf 95 °C erhitzt. Im anschließenden Amplifikationsprozess folgten 40 Zyklen meist in einer Zweiphasenreaktion (95 °C für 20 s, 60 °C für 30 s). Das PCR Programm richtete sich nach dem jeweiligen Primer für das zu bestimmende Zielgen.

Die Auswertung erfolgte über die Quantifizierungssoftware des *Mastercyclers Realplex* Eppendorf, basierend auf der delta Ct Methode (Pfaffl *et al.*, 2002).

$$(E_{\text{target}})_{\Delta \text{CP target}} (\text{mean control}) - (\text{mean sample})$$

Ratio =

$$\frac{\quad}{(E_{\text{ref}})_{\Delta \text{CP ref}} (\text{mean control}) - (\text{mean sample})}$$

## 2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten und die graphische Darstellung erfolgte mit der Software SigmaPlot 10.0 von Systat Software (Chicago, USA). Zur Bestimmung der Signifikanzen wurden je zwei Gruppen von Daten mit dem ungepaarten Student t-Test verglichen. Ein p-Wert kleiner/gleich als 0,05 wurde mit \* gekennzeichnet und als signifikant bezeichnet, ein p-Wert kleiner/gleich 0,01 wurde mit \*\* gekennzeichnet und als hochsignifikant bezeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der siRNA- und shRNA-Transfektion in Präadipozyten und Adipozyten

##### 3.1.1 Methodenetablierung der siRNA-Transfektion in Präadipozyten und Adipozyten mittels MAP-Kinase p42/44

Zur Untersuchung der direkten Wirkung auf das Fettgewebe nach CB1-Rezeptorherunterregulation, wurde der Mechanismus der siRNA-Transfektion in Präadipozyten und Adipozyten etabliert. Es handelt sich um Fettzellen aus weißen, subkutanen Depots. Nachdem die Transfektionsmethoden Lipofektionsreagenzien, Elektroporation und Magnet-assistierte-Transfektion ohne durchschlagenden Erfolg getestet wurden, gelang eine erfolgreiche Transfektion mit einer Kombination aus Elektroporation und Lipofektionsreagenzien (siehe Methodenteil, Seite 28). Wiedergegeben werden daher nur die Ergebnisse des *Knockdowns* der MAP-Kinase p42/44 nach Transfektion mit dem „Nucleofector“, einem Gerät das die Elektroporation und Lipofektionsreagenzien kombiniert, in Präadipozyten und Adipozyten.

Um die Methode der siRNA-Transfektion zu etablieren, wurden erst unterschiedliche Verfahren und Konzentrationen getestet, um die MAP-Kinase p42/44 Rezeptorexpression zu beeinflussen. Die MAP-Kinase p42/44 ist ein Standardsystem. Wie in der Literatur mehrfach gezeigt, lässt sich die MAP-Kinase p42/44 relativ einfach herunter regulieren und gut auf Proteinebene nachweisen, um den *Knockdown*-Erfolg prüfen zu können. Somit ist es ein ideales System, um die siRNA-Transfektion in unseren Fettzellen zu etablieren.

In Präadipozyten:

a) 48h nach Transfektion in Präadipozyten



siRNA 1 siRNA 2 Kon 1 Kon 2 Zellen Zellen

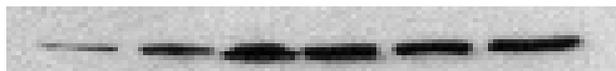
96h nach Transfektion in Präadipozyten



siRNA 1 siRNA 2 Kon 1 Kon 2 Zellen Zellen

In Adipozyten:

b) 48h nach Transfektion in Adipozyten



siRNA 1 siRNA 2 Kon 1 Kon 2 Zellen Zellen

96h nach Transfektion in Adipozyten



siRNA 1 siRNA 2 Kon 1 Kon 2 Zellen Zellen

Abbildung 12: **Darstellung des Knockdowns der MAP-Kinase p42/44 auf Proteinebene:** Abgebildet sind die Ergebnisse der Proteinexpression der MAP-Kinase (*Western Blots*) jeweils 48 h und 96 h nach Transfektion mit einer Kombination aus Elektroporation und Lipofektionsreagenzien in Präadipozyten (a) und in Adipozyten (b). Die untransfizierten Zellen gelten als Kontrolle.

In Abbildung 12 wird deutlich, dass ein *Knockdown* der *MAP-Kinase* möglich ist. Am ausgeprägtesten war der Effekt in Präadipozyten 48 h nach Transfektion. Die *MAP-Kinase p42/44* Rezeptorexpression wurde auf Proteinebene gemessen. Die Zellen, die mit der *siRNA 1* transfiziert wurden, waren um 95,03 %, die mit der *siRNA 2* um 91,46 % herunter reguliert. Nach 96 h war der *Knockdown*-Effekt weniger stark, betrug aber noch 49,97 % bei der Transfektion der *siRNA 1* zur Herunterregulation der *MAP-Kinase p42/44* Rezeptorexpression und 64,96 % bei der Transfektion der *siRNA 2*. In Adipozyten ist der *Knockdown*-Erfolg generell geringer als in Präadipozyten. Er lag zum Zeitpunkt 48 h nach Transfektion bei 68,2 % bei *siRNA 1* und bei 30,92 % bei der Verwendung von *siRNA 2*. Nach 96 h war eine Herunterregulation von 50,60 % bei Verwendung der *siRNA 1* und 37,69 % bei der *siRNA 2* des Rezeptors zu messen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus Elektroporation und Lipofektionsreagenzien eine Möglichkeit bietet, einen gewünschten Rezeptor in Präadipozyten und auch in Adipozyten herunterzuregulieren. Allerdings mussten für den CB1-Rezeptor-*Knockdown* erneut unterschiedliche *siRNAs* und verschiedene Konzentrationen getestet werden, um durch Elektroporation mit dem Gerät „*Nucleofector*“ einen zufriedenstellenden *Knockdown* zu erreichen.

### 3.1.2 Etablierung der CB1-Rezeptor-*Knockdown* durch *siRNA*-Transfektion

Um die Auswirkungen einer CB1-Rezeptorherunterregulation auf die Fettzellfunktion untersuchen zu können, wurde der Rezeptor mit spezifischer *siRNA* herunter reguliert. Um die Transfektionseffizienz dieser Versuchsansätze zu bestimmen, wurde der *Knockdown* auf Protein- und oder RNA-Ebene gemessen.



a) *siRNA 1* (200pmol) *siRNA* (100pmol) Kontrolle b) *siRNA 1* (200pmol) *siRNA* (100pmol) Kontrolle

**Abbildung 13: CB1-Rezeptorherunterregulation durch Elektroporation und Lipofektionsreagenzien auf Proteinebene:** Die Proteinexpression ist nach a. 48 h und b. 96 h abgebildet und zeigt die erfolgreiche CB1-Rezeptorherunterregulation nach *siRNA*- Transfektion. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche *siRNA*-Konzentrationen getestet (200 pmol und 100 pmol).

Zur Etablierung des CB1-Rezeptor-*Knockdowns* wurden anfangs unterschiedliche *siRNA*-Konzentrationen verwendet, die vorher einen erfolgreichen *Knockdown* der *MAP-Kinase* gezeigt hatten. In Abbildung 13 ist die Proteinexpression des CB1-Rezeptors nach *siRNA*-

Transfektion dargestellt, die am 2. Tag nach Induktion zur Differenzierung durchgeführt wurde. Bei der höheren Konzentration (200 pmol) konnte nach 48 h eine Herunterregulation des CB1-Rezeptors von 83,01 % erreicht werden, bei einer Konzentration von 100 pmol waren es 71,12 %. 96 h nach Transfektion waren die *Knockdown*-Raten dann rückläufig. Bei der höheren Konzentration konnten noch 77,56 % Herunterregulation gezeigt werden, bei der niedrigeren Konzentration jedoch nur noch 35,15 % *Knockdown*. Bei den weiteren Versuchen wurden also jeweils 200 pmol *siRNA* eingesetzt. Bei den folgenden Versuchen wurden die Expressionsanalysen auf RNA-Ebene durchgeführt. Die RNA-Ebene ist der zu untersuchende Endpunkt der Genregulation. Der Nachweis auf Protein-Ebene gestaltete sich schwierig, da wir im Verlauf Probleme mit der Verwendung des CB1-Rezeptor Antikörpers auf Proteinebene hatten.

### 3.1.2.1 Erfolgreicher Nachweis des CB1-Rezeptor-Knockdowns auf RNA-Ebene

Um den Zeitraum eines erfolgreichen CB1-Rezeptor-*Knockdowns* zu ermitteln, wurden die Zellen mit einer Konzentration von 200 pmol elektroporiert und über einen Zeitraum von 48 h bis 120 h analysiert.

Der *Knockdown* des CB1-Rezeptors mittels *siRNA* wurde am 2. Tag nach Induktion durchgeführt. Verwendet wurde die *siRNA 1* in einer Konzentration von 200 pmol sowie ein Gemisch aus zwei *siRNAs* (*I+8*), von denen jeweils 100 pmol eingesetzt wurden.

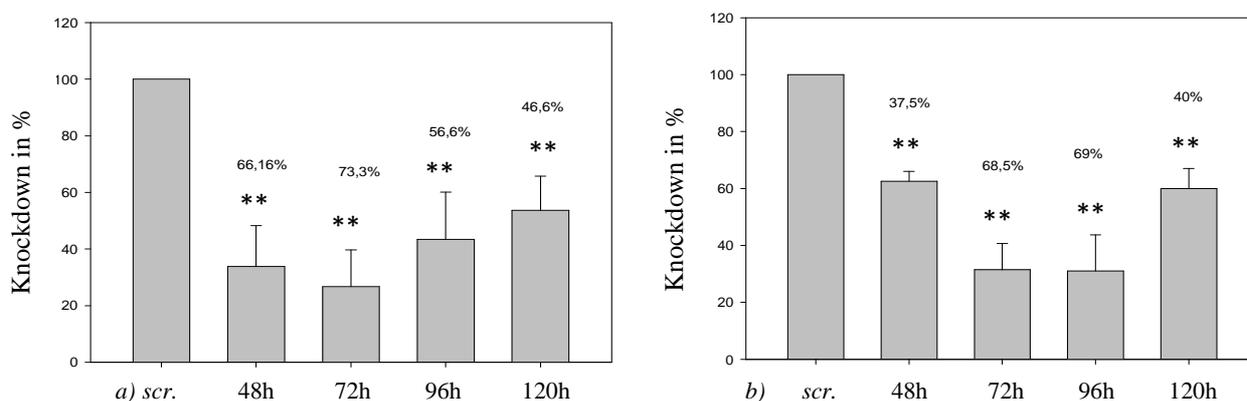


Abbildung 14: **Knockdown des CB1-Rezeptors mit Hilfe von *siRNA***: a. *siRNA 1* (200 pmol) und b. *siRNA I+ 8* (jeweils 100 pmol) *Knockdown*-Raten im Vergleich zur Negativkontrolle (*scrambled*). Angegeben sind die Prozentzahlen der Herunterregulation bei 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Transfektion. Die Versuchszahl beträgt N=3. Die Daten, die hochsignifikant sind, sind mit \*\*p <0,01 gekennzeichnet. Als Referenzgen wurde 36B4 mitgeführt.

Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse zeigen den *Knockdown* des CB1-Rezeptors in Prozent durch *siRNA*-Transfektion. Ein *Knockdown* des CB1-Rezeptors von 46,6 % - 73,3 % gelingt über einen Zeitraum von 120 h in Adipozyten. Der stärkste Effekt war bei 72 h messbar: Durch Verwendung der *siRNA 1* wurde eine Herunterregulierung von 73,3 % und durch den *siRNA* Pool von knapp 69 % erreicht. Deutlich wird bei beiden *siRNAs*, dass der transiente *Knockdown* nach 120 h rückläufig ist und der Rezeptor-*Knockdown* der *siRNA 1* bei nur noch 46,6 % und bei dem *siRNA* Pool bei lediglich 40 % liegt. Alle Ergebnisse sind hochsignifikant. Die Länge des *Knockdowns* durch *siRNA* stimmt mit Daten aus der Literatur überein, die in 3T3- L1 Adipozyten erreicht wurden (Echeverri und Perrimon, 2006).

### 3.1.3 Etablierung des CB1-Rezeptor-*Knockdowns* durch *shRNA*-Transfektion

Um eine längerfristige und stabile Transfektion des CB1-Rezeptors zu erreichen, wurden vier unterschiedliche *Shorthairpin*-Konstrukte getestet. Zwei der vier Konstrukte zeigten im Zeitverlauf gute bis sehr gute *Knockdown*-Raten von durchschnittlich 75 % bis zu 82 %. Konstrukt drei wies einen *Knockdown* von 74,3 % auf und das erfolgreichste Konstrukt vier einen durchschnittlichen *Knockdown* von 82,3 %

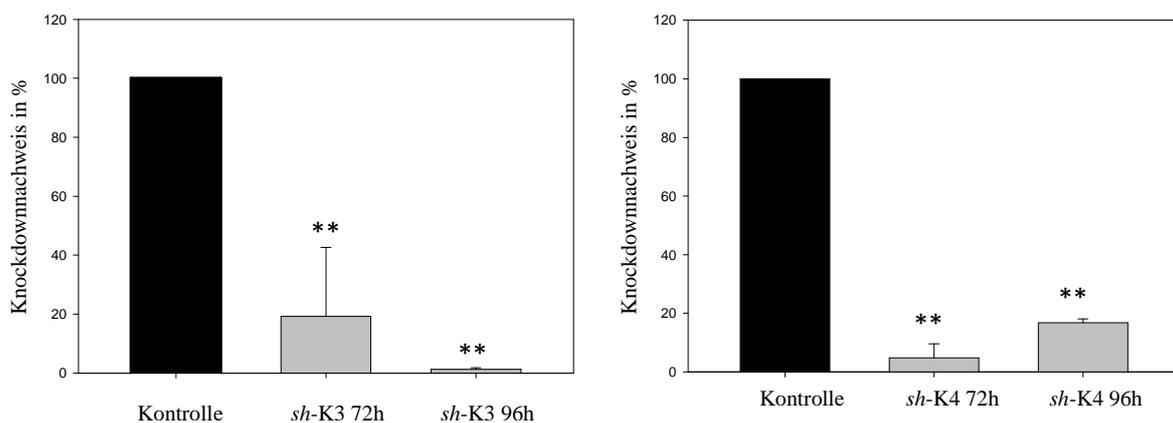


Abbildung 15: **Darstellung des *Knockdown*-Nachweises des CB1-Rezeptors durch *Shorthairpin*-Konstrukte 3 und 4:** Die CB1-Expression nach 72 h und 96 h nach der Transfektion der *Shorthairpin*-Konstrukte 3 und 4 (graue Balken) im Vergleich zu einer Kontrolle (schwarzer Balken) sind gezeigt. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. \*\* kennzeichnen statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Nach Abbildung 15 wird durch die Transfektion von *sh*-Konstrukt 3 ein *Knockdown* des CB1-Rezeptors von 80,75 % nach 72 h und von 98,75 % nach 96 h erzielt. *sh*-Konstrukt 4 führte ebenfalls zu erfolgreichen *Knockdown*-Raten von 95,25 % nach 72 h und 83,25 % nach 96 h. Für die geplanten Versuche wurden die *sh*-Konstrukte 3 und 4 verwendet, um einen stabilen *Knockdown* zu erreichen. Dadurch ist es möglich geworden, die eventuell unterschiedlichen Ergebnisse einer kurzfristigen Herunterregulation mit einem langfristigen, stabilen *Knockdown* zu vergleichen.

### ***3.2 Ergebnisse nach CB1-Rezeptor-Knockdown durch siRNA- und shRNA- Transfektion auf das Differenzierungsverhalten und den oxidativen Metabolismus***

#### **3.2.1 Differenzierungsfähigkeit der Adipozyten nach CB1-Rezeptor-Knockdown**

Um Aussagen über die Auswirkung einer CB1-Rezeptorherunterregulation auf die Differenzierung von weißen subkutanen Fettzellen treffen zu können, wurde die Differenzierung morphologisch im Mikroskop analysiert.

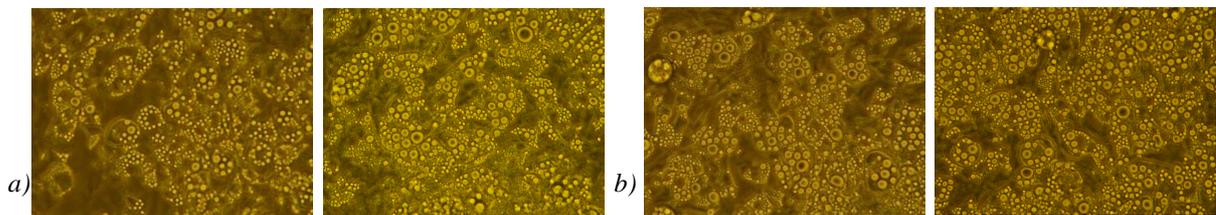


Abbildung 16: **Differenzierung von *siRNA* transfizierten Zellen:** Illustriert sind mikroskopische Bilder (40x) der Zellen zum Zeitpunkt 96 h (a) und 120 h (b). Verglichen werden Zellen, die mit einer Negativkontrolle transfiziert wurden (*scrambled*) mit *siRNA* transfizierten Zellen zur Herunterregulation des CB1-Rezeptors. Die Versuchsanzahl betrug N=4.

Abbildung 16 illustriert, dass durch eine transiente CB1-Rezeptorherunterregulation durch *siRNA*-Transfektion makroskopisch und mikroskopisch keine Differenzierungsunterschiede festzustellen sind.

Bei einem stabilen *Knockdown* mittels *shorthairpin-RNA* zeigt sich demgegenüber in den CB1-Rezeptor herunter regulierten inguinalen Zellen der Trend zu einem leichten Differenzierungsvorteil im Vergleich zu den Kontrollen - sowohl makroskopisch als auch densitometrisch (Abb. 17).

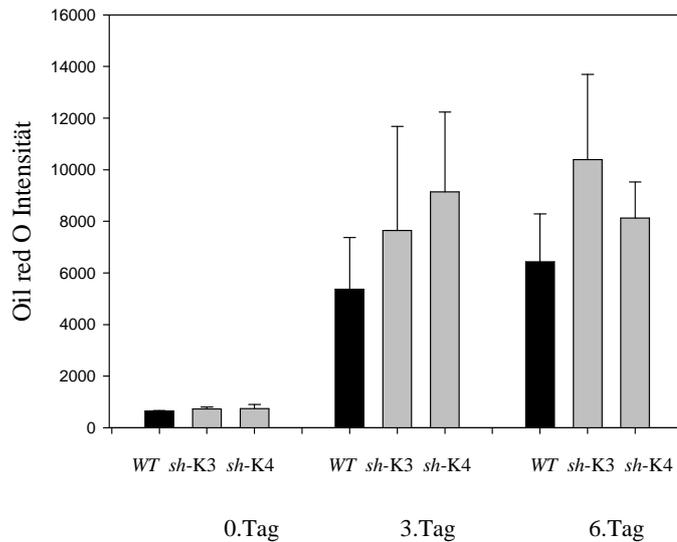
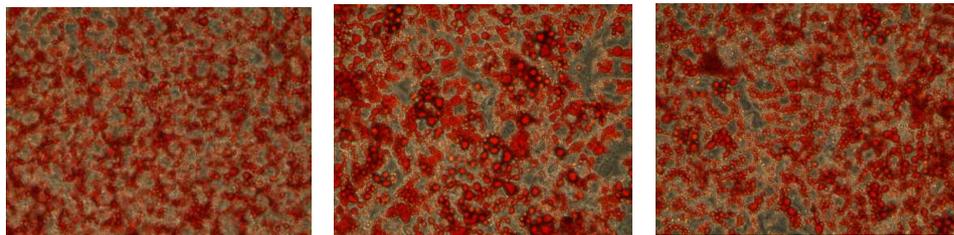


Abbildung 17: **Densitometrie in *Shorthairpin*-transfizierten Zellen:** Illustriert sind die densitometrischen Ergebnisse während der Adipogenese nach stabiler Transfektion zur Herunterregulation des CB1-Rezeptors durch *sh*-Konstrukt 3 und *sh*-Konstrukt 4 und ihre Wildtypkontrollen. Daten der densitometrischen Messung im Photometer nach *Oil red O* Färbung in *Shorthairpins* an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 während der Differenzierung werden dargestellt. Die Versuchszahl beträgt N=4.



Tag 3: Kontrolle

*sh*-Konstrukt 3

*sh*-Konstrukt 4

Abbildung 18: **Mikroskopische Bilder nach *Oil red O* Färbung:** Mikroskopische Darstellung von CB1-Rezeptor *Knockdown*-Zellen durch *Shorthairpin*-Transfektion (10 X fache Vergrößerung). Gezeigt ist der Vergleich zwischen den *sh*-Konstrukten 3 und 4 und einer leervektor transfizierten Kontrolle am Tag 3 während des Differenzierungsprozesses.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, zeigte sich nach *Oil red O* Färbung densitometrisch, dass am Tag 3 und am Tag 6 nach Induktion leichte Differenzierungsvorteile zu messen sind. Diese Daten deuten nur auf eine Tendenz hin, da sie nicht signifikant sind. Am Tag 0 der Adipogenese bei Verwendung des *sh*-Konstruktes 3 zur Rezeptorherunterregulation war eine Zunahme der Absorption von 14,9 % im Photometer messbar. Die Differenzierungszunahme zeigte sich noch ausgeprägter am Tag 3 mit 42,37 % und 61,66 % am Tag 6. Ähnliche Effekte konnten auch im *sh*-Konstrukt 4 analysiert werden. Ein Plus von 17,3 % an Tag 0, 70,30 % an Tag 3 und 26,37 % an Tag 6. Somit konnte

mikroskopisch und densitometrisch in den durch *shorthairpins*-RNA langfristig herunter regulierten CB1-Rezeptor Zellen ein leichter, aber nicht signifikanter Differenzierungsvorteil im Vergleich zu den Kontrollzellen evaluiert werden. Die Ergebnisse sind lediglich ein Trend und aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant.

### 3.2.2 Positive Auswirkungen auf den oxidativen Metabolismus nach transienter und stabiler CB1-Rezeptormodulation

Nach den bisherigen Forschungsergebnissen führte eine Stimulationen mit dem CB1-Rezeptoragonisten WIN (55212.2) zu einer Hemmung der *ucp-1* Expression (Perwitz *et al.*, 2010). Interessant war deshalb, ob ein CB1-Rezeptor-*Knockout* zu einem gegenteiligen Effekt führen kann und die braunen Fettgewebmarker hochreguliert werden.

#### 3.2.2.1 Gesteigerte *pgc-1 $\alpha$* Expression auf RNA-Ebene nach CB1-Rezeptor-Knockdown

*Pgc-1 $\alpha$*  ist ein Fettzellmarker, der besonders stark in braunen Fettzellen exprimiert wird. Er wurde nach RNA-Isolierung, DNA-Verdau und Umschreiben der Proben in cDNA auf RNA-Ebene gemessen.

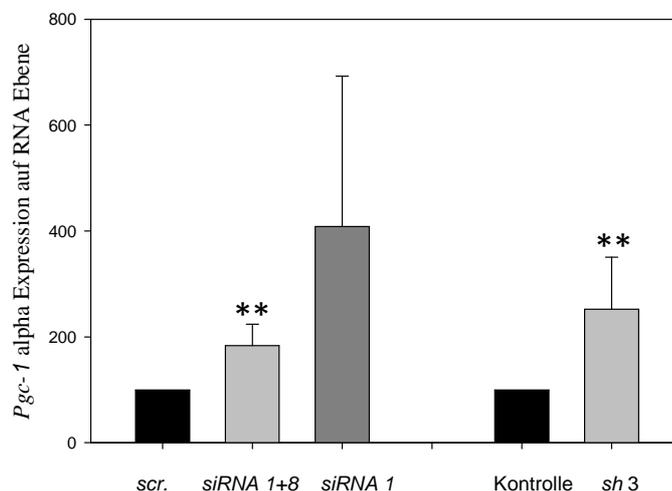


Abbildung 19: *Pgc-1 $\alpha$*  Expression nach CB1-Rezeptor-*Knockdown* durch *siRNA*- und durch *Shorthairpin*-Transfektion im Vergleich mit einer Kontrolle: Gemessen wurde die *pgc-1 $\alpha$*  Expression 48 h bzw. am 3. Tag nach Transfektion von *siRNA* bzw. *Shorthairpins*. Die Versuchszahl beträgt N=6. \* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* kennzeichnet statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Wie aus der Graphik 19 ersichtlich, war eine signifikante Zunahme der *pgc-1 $\alpha$*  Expression nach Transfektion der *siRNA1* von 83,40 % und der *siRNA 1+8* von 308,82 % (hohe Standardabweichung) messbar. Die Rezeptorblockade durch *Shorthairpin*-Konstrukte führte ebenfalls zu einer starken Expressionszunahme im Vergleich zu den Kontrollen. Die Zunahme der *pgc-1 $\alpha$*  Expression ist am 3. Tag nach Induktion abgebildet, hochsignifikant und beträgt 152,53 %.

### 3.2.2.2 Gesteigerte *ucp-1* Expression auf RNA-Ebene nach CB1-Rezeptor-Herunterregulation

Ein weiterer brauner Fettgewebemarker ist UCP-1 (Uncoupling Protein 1). Es entkoppelt die Atmungskette und dient somit der Wärmeproduktion. Ein Anstieg der *ucp-1* Genexpression war in Zellen, in denen der CB1-Rezeptor durch *siRNA* und *Shorthairpins* herunter reguliert war, deutlich sichtbar:

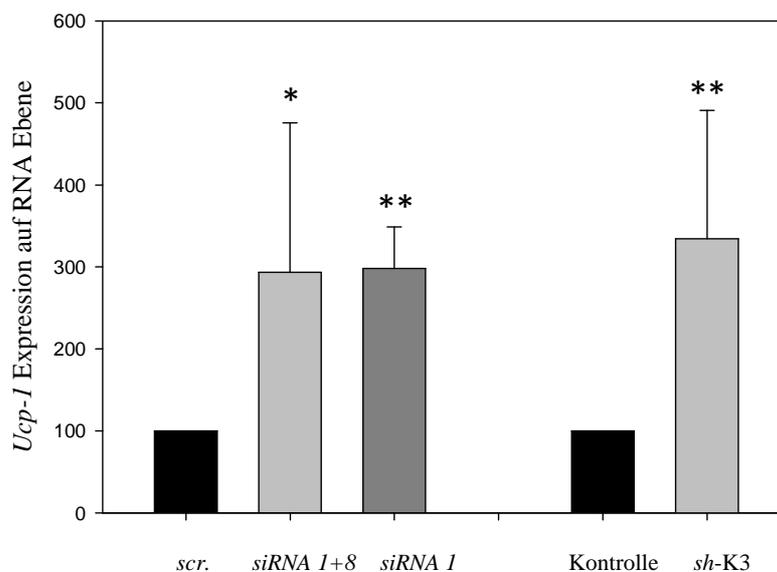


Abbildung 20: ***Ucp-1* Expression nach CB1-Rezeptorherunterregulation durch *siRNA*- bzw. *Shorthairpin*-Transfektion:** Demonstriert wird hier die *ucp-1* Expression auf RNA-Ebene 72 h nach *siRNA*-Transfektion und am 3. Tag während der Differenzierung in den *Shorthairpin*-Konstrukten und ihren Kontrollen. Die Versuchszahl beträgt N=6. \* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* kennzeichnet statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Durch Transfektion von *siRNAs* zur Rezeptorherunterregulation war eine deutliche Zunahme der *ucp-1* Expression im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (Abb. 20). Bei 72 h war das Ergebnis der einzelnen *siRNAs* hochsignifikant und betrug plus 193,58 %. Am 3. Tag war auch das Ergebnis der Expression durch Transfektion der *gepoolten siRNA*

signifikant und um 198,06 % gestiegen. In den *Shorthairpin*-transfizierten Zellen war ein Anstieg der *ucp-1* Expression von 234,43 % auf RNA-Ebene messbar.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte auf RNA-Ebene eine deutliche Steigerung der *ucp-1* Expression gemessen werden. Aufgrund der Standardabweichung kann das Ergebnis allerdings nur nach 72 h als signifikant ( $p < 0,05^*$ ) angesehen werden (Abb. 20). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Hemmung des CB1-Rezeptors eine Hochregulation von braunen Fettgewebemarkern verursacht. Das sind erste Hinweise auf eine mögliche Transdifferenzierung von einem weißen zu einem braunen Fettgewebstyp.

### 3.2.2.3 Steigerung der Mitochondrienzahl und -biogenese nach CB1-Rezeptorherunterregulation durch siRNA- und shRNA-Transfektion.

Ein Charakteristikum brauner Fettzellen ist u.a. die hohe Zahl an Mitochondrien und eine gesteigerte mitochondriale Biogenese. Um diese ersten Hinweise einer Transdifferenzierung in einen braunen Fettgewebstyp zu bestätigen, wurde die Anzahl der Mitochondrien bestimmt und der Sauerstoffverbrauch analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einem fluoreszierenden Mitochondrienfarbstoff markiert (*Mitotracker Green*). Sowohl FACS- als auch RNA-Analysen zeigten eine erhöhte mitochondriale Biogenese, ein weiteres Indiz für eine mögliche Transdifferenzierung.

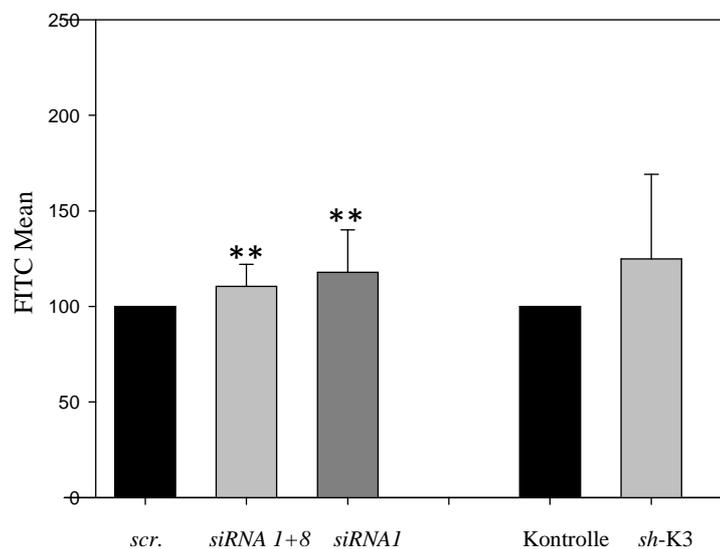


Abbildung 21: **Mitochondrienzahl und -biogenese nach Herunterregulation des CB1-Rezeptors durch siRNA- und shRNA-Transfektion:** Veränderte Mitochondrienzahlen in siRNA- und sh-transfizierten Zellen, gemessen im FACS nach Färbung der Mitochondrien mit dem Farbstoff *Mitotracker Green*. Gemessen wurde am 6. Tag nach Induktion in den Zellen. Die Versuchszahl beträgt N=6. \* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* kennzeichnet statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Im Vergleich zur Negativkontrolle (*scrambled*) stieg - wie die Abbildung 21 zeigt - die Zahl der Mitochondrien bei der Verwendung der *gepoolten siRNA* zum *Knockdown* um 10,3 % (signifikant, da  $p < 0,05$ ). Nach Transfektion der *siRNA 1* konnte eine Zunahme von 17,8 % gemessen werden, die allerdings nicht signifikant war.

Auch bei dem *Knockdown* durch *Shorthairpin*-Konstrukte konnte eine Zunahme der Mitochondrienzahl in den CB1-Rezeptor-*Knockdown*-Zellen von 24,85 % im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen werden.

### 3.2.2.4 Veränderungen des oxidativen Metabolismus durch Messung eines gesteigerten Sauerstoffverbrauches in Präadipozyten und Adipozyten nach CB1-Rezeptor-Knockdown

Um weitere Hinweise für einen braunen Fettgewebstyp und eine Transdifferenzierung zu gewinnen, wurde unter anderem der Sauerstoffverbrauch mit Hilfe des *Oxygraphen* ermittelt.

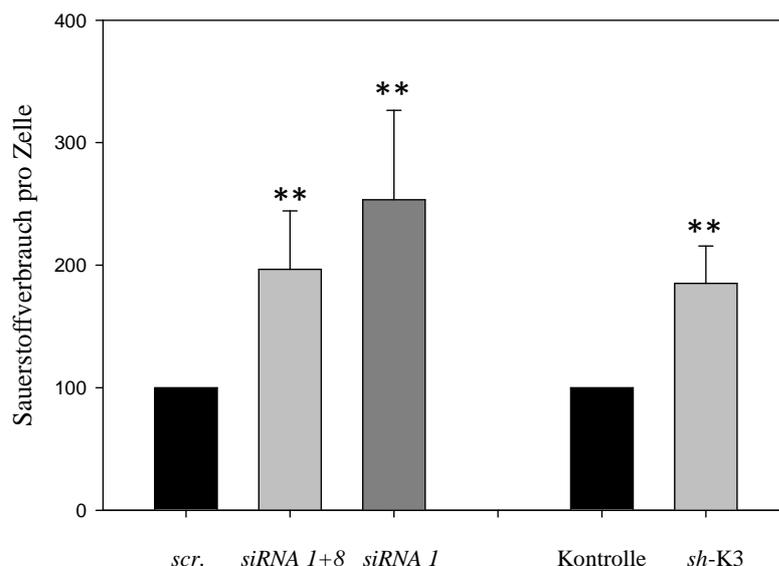


Abbildung 22: **Ergebnisse der Sauerstoffverbrauchsmessung mittels *Oxygraph***: Abgebildet wird der Sauerstoffverbrauch von mit *siRNA*- und *sh*- transfizierten Zellen zum Rezeptor-*Knockdown* und ihren Kontrollen. Gemessen wurde 48 h nach Transfektion bzw. am 3. Tag während der Differenzierung. Der Sauerstoffverbrauch pro Zelle wurde gemessen und berechnet. Die Versuchsanzahl beträgt N=8.

\* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Die Ergebnisse der Sauerstoffverbrauchsmessung waren, wie aus Abbildung 22 ersichtlich, bei Verwendung beider *siRNAs* hochsignifikant. Die *gepoolten* transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle (*scrambled*) einen Anstieg im

Sauerstoffverbrauch von 96,5 %. Ebenfalls hochsignifikant waren die Daten der transfizierten *siRNA 1* zum CB1-Rezeptor-*Knockdown* mit einem noch stärkeren Anstieg des Sauerstoffverbrauches von 153 %.

Auch die Verwendung der *Shorthairpin*-Konstrukte führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Der Anstieg des Sauerstoffverbrauches in den stabil transfizierten Zellen nach Rezeptorblockade von 85,19 % war im Vergleich zu vektortransfizierten Kontrollzellen hochsignifikant.

Damit zeigen sich sowohl nach Herunterregulation des CB1-Rezeptors durch *siRNA* - als auch nach *shRNA*-Transfektion Indizien für eine Veränderung von einem weißen subkutanen zu einem braunen Fettgewebstyp. Die Zellen zeigen eine erhöhte Expression brauner Fettgewebismarker, eine gesteigerte Anzahl an Mitochondrien und eine Zunahme des Sauerstoffverbrauches.

### ***3.3 Depotspezifische Unterschiede in Präadipozyten und Adipozyten von CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen***

#### **3.3.1 Nachweis des CB1-Rezeptor-Knockout in Adipozyten**

Um einen kompletten Funktionsverlust des Rezeptors von Geburt an zu erreichen, wurden neue Zelllinien aus CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen generiert. Dabei gelang der Aufbau neuer depotspezifischer Fettzelllinien. Es wurde Gewebe aus epididymalen und inguinalen Depots aus jeweils drei Wildtypmäusen und drei CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen entnommen.



DNA Leiter KO-Maus 1 KO-Maus 2 WT

Abbildung 23: **PCR-Kontrolle zum Nachweis des CB1-Rezeptor-Knockouts**: Das Ergebnis einer PCR ist dargestellt, um den CB1-Rezeptor-*Knockout* auf RNA-Ebene zu überprüfen. Abgebildet sind epididymale und inguinale *KO-Zellen* im Vergleich mit einer Wildtypkontrolle.

Mit Hilfe der *Polymerase Chain Reaction (PCR)* konnte nachgewiesen werden, dass der CB1-Rezeptor im inguinalen und im epididymalen Fettgewebe nur in den Wildtypen exprimiert wurde, dagegen nicht in den CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen, wie aus

Abbildung 23 ersichtlich. Damit wird bestätigt, dass die Fettzellen der CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäuse, wie geplant, den CB1-Rezeptor nicht mehr exprimieren.

### 3.3.2 Depotspezifische Differenzierungsunterschiede während der Adipogenese

Depotspezifische Differenzierungsunterschiede wurden während der Adipogenese mittels *Oil red O* Färbung mikroskopisch und densitometrisch analysiert.

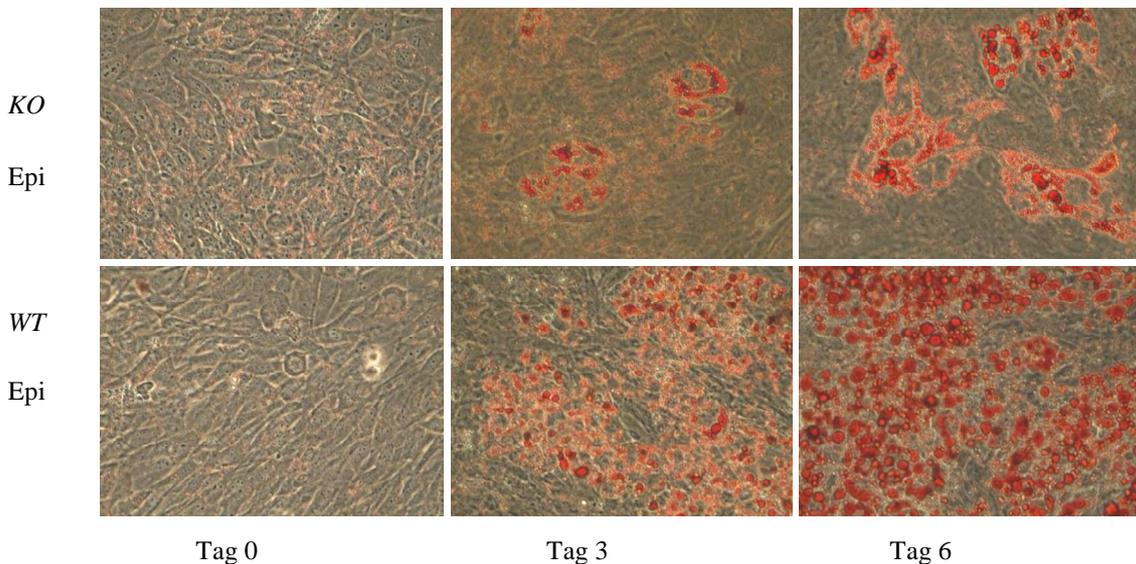


Abbildung 24: **Mikroskopische Bilder (40 x) während der Differenzierung nach *Oil red O* Färbung in epididymalen Zellen:** Zu sehen ist ein exemplarisches Beispiel der Differenzierungsunterschiede in *KO* Epi- im Vergleich zu *WT* Epi-Zellen an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 während der Differenzierung. Versuchsanzahl beträgt N=6.

Epididymale CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen zeigten ein Differenzierungsdefizit im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Der Effekt ist am stärksten am 6. Tag, aber auch am 3. Tag nach Induktion sind bereits größere Lipideinlagerungen in den *WT* Epi-Zellen im Vergleich zu den *KO* Epi-Zellen sichtbar (Abb. 24).

In den inguinalen CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen lässt sich bereits makroskopisch nach *Oil red O* Färbung deutlich ein Differenzierungsvorteil im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisen. Dieser Vorteil während der Adipogenese ist bereits am 3. Tag und am deutlichsten am 6. Tag während der Differenzierungsphase zu erkennen. Die mikroskopischen Aufnahmen (40 x) der *KO* Ing-Zellen zeigen eine stärkere Lipideinlagerung als ihre *WT*-Kontrollzellen (Abb. 25).

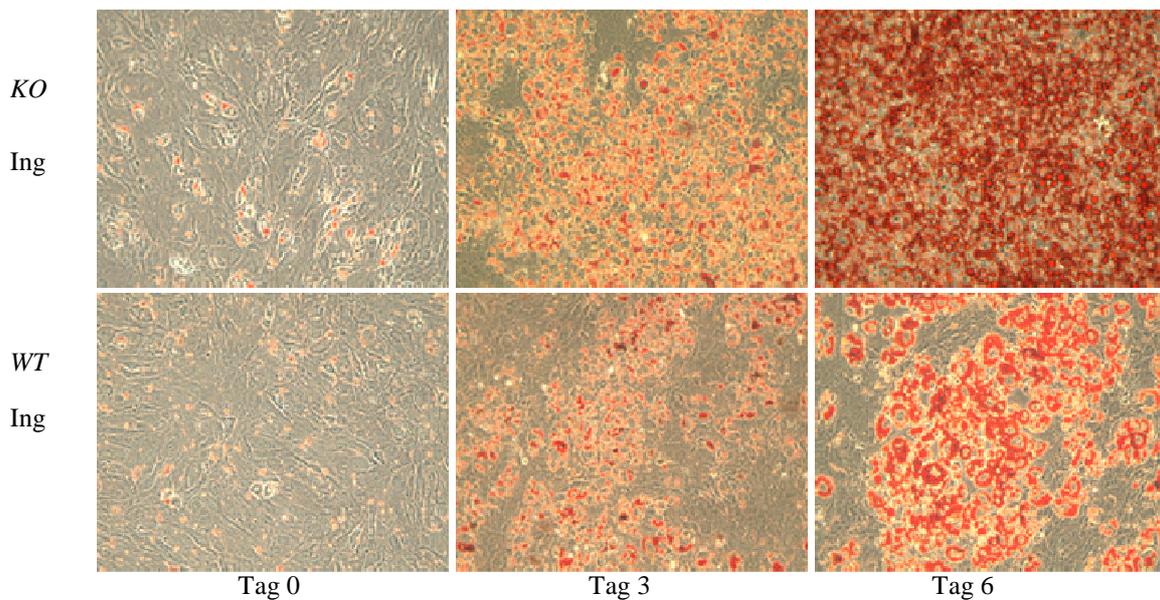


Abbildung 25: **Mikroskopische Bilder (40 x) während des Differenzierungsprozesses nach Oil red O Färbung in inguinalen Zellen:** Abgebildet ist der Differenzierungsunterschied *KO* Ing im Vergleich zu *WT* Ing an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 während des Differenzierungsprozesses. Die Versuchszahl beträgt N=6.

Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es nach einem Funktionsverlust des CB1-Rezeptors zu depotspezifischen Differenzierungsunterschieden kommt. Dabei entstehen ein Differenzierungsdefizit in den Zellen aus dem epididymalen Depot und ein Differenzierungsbenefit in den Zellen aus dem inguinalen Depot.

Was mikroskopisch bereits sichtbar wurde, bestätigt eine densitometrische Analyse: Die *KO* Epi-Zellen zeigen ein deutliches Differenzierungsdefizit. Die Daten waren am 3. Tag mit einer geringeren Absorption im Photometer von minus 37,85 % hochsignifikant wie auch am 6. Tag nach Induktion und während des Differenzierungsprozesses mit einem Defizit von minus 54,45 % (Abb. 26 a).

In Abbildung 26 b spiegelt sich eine bessere Differenzierung der inguinalen *KO*-Fettzellen im Vergleich zu den Zellen aus den Wildtypen wider. Am Tag 0 ist bereits eine Zunahme von 27,25 % zu verzeichnen. Der Effekt ist noch deutlicher und signifikant am 3. Tag mit einem Anstieg von 89,98 % und hochsignifikant am 6. Tag mit einer Zunahme von 165,36 % (Abb. 26 b).

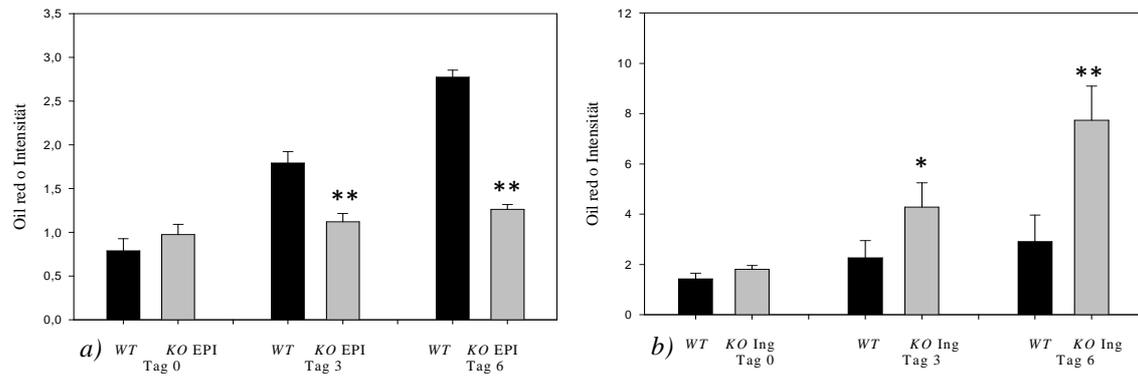


Abbildung 26 a und b: **Densitometrische Messung nach Oil red O Färbung:** Dargestellt ist die Farbintensität am 0., 3. und 6. Tag nach Anfärben mit Oil red O Farbstoff im Photometer. Die schwarzen Balken stellen jeweils die Kontrollzellen dar. Die grauen Balken in Abbildung 26 a zeigen epididymale KO-Zellen, die in Abbildung 26 b inguinale KO-Zellen. Die Versuchsanzahl beträgt N=8. \* markiert statistisch signifikante Ergebnisse (p<0,05), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse (p<0,001).

Um die mikroskopisch und densitometrisch festgestellten Differenzierungsunterschiede zu bestätigen, wurden die wichtigsten Differenzierungsmarker auf RNA-Ebene gemessen.

| Differenzierungsmarker | <i>pref-1</i> |       | <i>pparγ</i> |       | <i>ap2</i> |       | <i>glut4</i> |       |
|------------------------|---------------|-------|--------------|-------|------------|-------|--------------|-------|
|                        | Tag 3         | Tag 6 | Tag 3        | Tag 6 | Tag 3      | Tag 6 | Tag 3        | Tag 6 |
| Epididymal WT vs. KO   | ↑121%         | ↑699% | ↓44%         | ↓39%  | ↓27%       | ↓52%  | ↓35%         | ↓68%  |
| Inguinal WT vs. KO     | ↓69%          | ↓65%  | ↑186%        | ↑233% | ↑132%      | ↑467% | ↑49%         | ↑33%  |

Tabelle 1: **Expressionslevel der Differenzierungsmarker *pref-1*, *pparγ*, *ap2*, *glut4* auf RNA-Ebene:** Gemessen wurden die Expressionslevel von Differenzierungsmarkern auf RNA-Ebene jeweils am Tag 3 und am Tag 6. In Tabelle 1 sind die Expressionslevel von WT Epi und KO Epi und von WT Ing und KO Ing im Vergleich dargestellt. Die Versuchsanzahl beträgt N=6.

In Tabelle 1 ist eine Expressionssteigerung von 689,75 % bei *pref-1* in den KO Epi-Zellen im Vergleich zu den WT Epi-Zellen angegeben. Der Grund: *pref-1* ist ein Inhibitor der Adipogenese. Alle anderen abgebildeten Differenzierungsmarker sind späte, die Adipogenese fördernde Marker. Diese weisen auf eine Expressionsabnahme bzw. ein Differenzierungsdefizit in den KO Epi-Zellen hin. Folglich zeigte sich zum Beispiel an Tag

6 eine Expressionsabnahme folgender Differenzierungsmarker: *ppary* von 39,28 %, *ap2* von 52,31 % und *glut 4* von 86,14 % (Tab. 1).

Im Gegensatz dazu machen die Ergebnisse in Tabelle 1 deutlich, dass *pref-1*, ein Inhibitor der Adipogenese, in den *KO* Ing-Zellen im Vergleich zum *WT* Ing-Zellen deutlich weniger exprimiert wurde (65-69 %). Alle Differenzierungsmarker, die für eine gesteigerte Differenzierung typisch sind, waren somit in den inguinal gewonnenen *KO*-Zellen stärker exprimiert als in den Wildtypkontrollen. So zeigte *ppary* eine Expressionszunahme in den *KO* Ing-Zellen von 233,19 %, *ap2* von 466,86 % und *glut 4* von 33,15 % an Tag 6 (Tab. 1). Diese Ergebnisse stehen also im Einklang mit den erhobenen anderen Differenzierungsdaten, die mit der *Oil red O* Färbung und der Densitometrie gewonnen wurden.

### 3.3.3 Gesteigerte Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation in die inguinalen Adipozyten nach CB1-Rezeptor-Knockout

Aufgrund der positiven Wirkung der CB1-Rezeptormodulation auf die Insulinsensitivität und die Glukosetoleranz in den humanen Studien, wollten auch wir direkte depotspezifische Effekte im Fettgewebe auf den Zuckerstoffwechsel untersuchen. Gemessen wurde also die Glukoseaufnahme in voll ausdifferenzierten Adipozyten. Durch Insulinstimulation für einen Zeitraum von 30 min nahm die Glukoseaufnahme in *KO* Epi-Zellen deutlich weniger zu als in den *WT* Epi-Kontrollzellen.

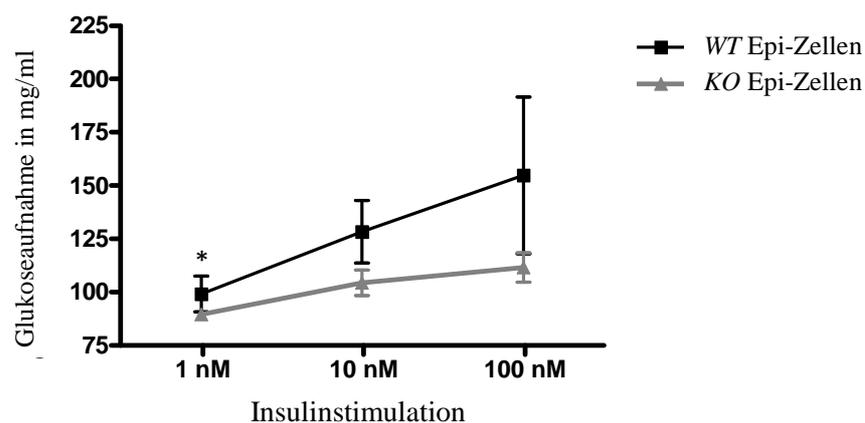


Abbildung 27 a

Abbildung 27 a: **Glukoseaufnahme in Adipozyten aus CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen in WT Epi- und KO Epi-Zellen:** Voll ausdifferenzierte Adipozyten wurden mit folgenden Insulinkonzentrationen stimuliert: 1 nM, 10 nM, und 100 nM. Anschließend wurde die Glukoseaufnahme in den Zellen mit radioaktiv markierter Desoxyglukose ermittelt, um Aussagen über die Insulinsensitivität der Zellen zu machen.

Dargestellt ist die Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation. Die graue Linie zeigt die Glukoseaufnahme der *KO* Epi-Zellen, die schwarze Linie, die der Kontrollzellen. Die Versuchszahl betrug N=4. \* markiert statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

So war bereits nach einer Stimulation mit nur 1 nM Insulin ein signifikanter Unterschied mit knapp 10 % zu messen. Auch mit höheren Konzentrationen (10 nM Insulinstimulation) war eine Differenz von -18,38 % festzustellen und bei der höchsten Konzentration von 100 nM Insulin ergab sich ein Unterschied in der Glukoseaufnahme von -27,97 % (Abb. 27a).

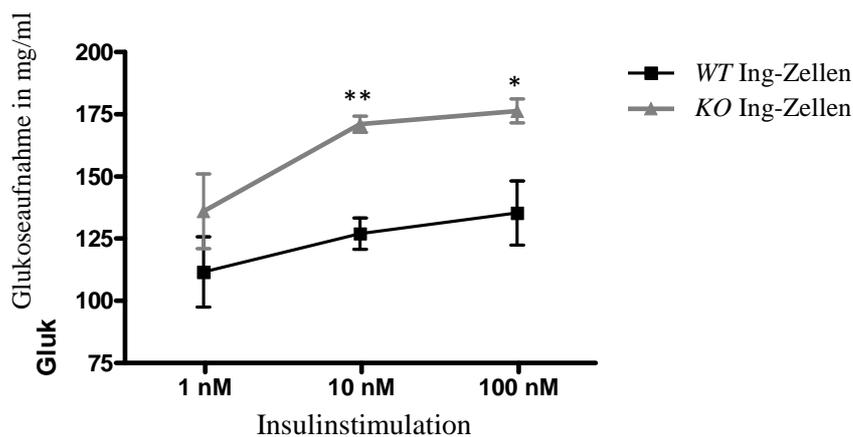


Abbildung 27 b

Abbildung 27 b: **Glukoseaufnahme in Adipozyten aus CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen in WT Ing- und KO Ing-Zellen:** Die Glukoseaufnahme wurde, wie in der Bildunterschrift zur Abbildung 27 a beschrieben, gemessen. Dargestellt ist die Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation. Die graue Linie zeigt die Glukoseaufnahme der *KO* Ing-Zellen, die schwarze Linie die der Kontrollzellen. Die Versuchszahl betrug N=4. \* markiert statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Es konnte gezeigt werden, dass bei allen drei gemessenen Zeitpunkten die CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen des inguinalen Fettgewebes im Gegensatz zu den epididymalen CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen insulinsensitiver sind als ihre Wildtypkontrollen. Ein Anstieg der Glukoseaufnahme von 21,79 % war bereits am 0. Tag der Differenzierung festzustellen. Am 3. Tag war die Zunahme der Glukoseaufnahme um 34,64 % sogar hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Auch am 6. Tag nach Induktion waren die Zellen noch 30,30 % insulinsensitiver als ihre Wildtypkontrollen. Dieses Ergebnis ist auch signifikant ( $p < 0,05$ ), wie Abbildung 27 b verdeutlicht.

Die Daten lassen erkennen, dass Zellen nach CB1-Rezeptor-*Knockout* aus epididymalen Depots weniger Glukose aufnehmen und somit insulinresistenter sind als Zellen aus

dem inguinalen Depot. Letztere weisen eine gesteigerte Glukoseaufnahme und somit eine höhere Insulinsensitivität auf. Es kommt also zu folgenden positiven metabolischen Veränderungen: Das insulinresistente viszerale Fettgewebe zeigt ein Differenzierungsdefizit und das Glukose aufnehmende, insulin-sensitive inguinale Fettgewebe eine zunehmende Differenzierung.

### **3.3.4 Depotspezifische Unterschiede im Apoptoseverhalten bzw. Messung der DNA-Schäden in Adipozyten nach CB1-Rezeptor-Knockout**

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Differenzierung der untersuchten Zellen könnte in ihrem Apoptoseverhalten zu finden sein. Deshalb wurde die Menge an phosphoryliertem p53, ein Marker für DNA-Schäden in der Zelle, untersucht. Des Weiteren wurde die DNA-Degradation mit Hilfe eines *ELISAs* zur Detektion des induzierten Zelltodes analysiert.

Die Abbildung 28 a zeigt, dass am 3. Tag und am 6. Tag deutlich mehr *KO* Epi-Zellen DNA-Schäden aufwiesen als ihre *WT* Epi-Kontrollzellen. Am Tag 3 stieg die Phosphorylierung von p53 um 561,92 %, und auch am Tag 6 war die Induktion von Zellschäden deutlich mit einem Anstieg von 1328,75 % messbar (Abb. 28 a). Diese Daten sind hochsignifikant. In den *KO* Ing-Zellen zeigen sich erneut divergente Daten und somit depotspezifische Unterschiede. Sowohl am 3. als auch am 6. Tag der Differenzierung bei inguinalen *KO*-Zellen war bei deutlich weniger Zellen ein DNA-Schaden erkennbar. Am 3. Tag war eine Abnahme der Phosphorylierung von p53 von minus 56,91 % messbar und am 6. Tag von minus 83,72 %. Die Daten sind am Tag 6 hochsignifikant (Abb. 28 b).

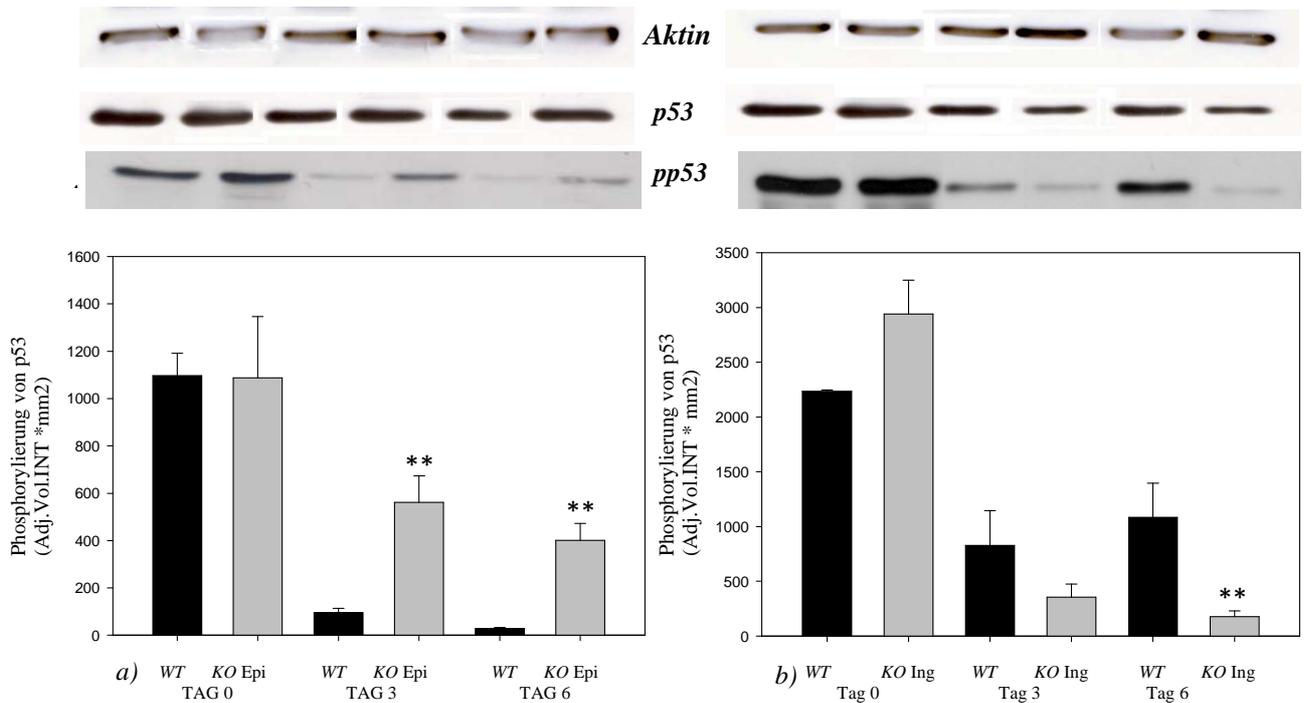


Abbildung 28 a und 28 b: **Phosphorylierung von Phospho p53 (Ser 15) gemessen auf Proteinebene mit Hilfe eines Western Blots:** Die Expression von Aktin, p53 und Phospho p53 sind mit Proteinbanden abgebildet. Dargestellt sind außerdem die Expressionsergebnisse am Tag 0, 3 und 6 in graphischer Form. In Abbildung 28 a ist der Unterschied in der Expression von Phospho p53 zwischen *WT* Epi- (schwarze Balken) und *Ko* Epi-Zellen (graue Balken) dargestellt, in 28 b zwischen *WT* Ing (schwarze Balken) und *KO* Ing (graue Balken). Die Versuchszahl betrug N=4. \* markiert statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Des Weiteren wurde die Apoptoserate mittels *ELISA* gemessen. Bereits in undifferenzierten Zellen am Tag 0 zeigte sich, dass 51 % der *KO* Epi-Zellen im Vergleich zu ihrem Wildtyp apoptotisch wurden. Andererseits war in den *KO* Ing-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erkennbar, dass 41 % weniger Zellen den programmierten Zelltod einleiteten (Abb. 29 a und 29 b).

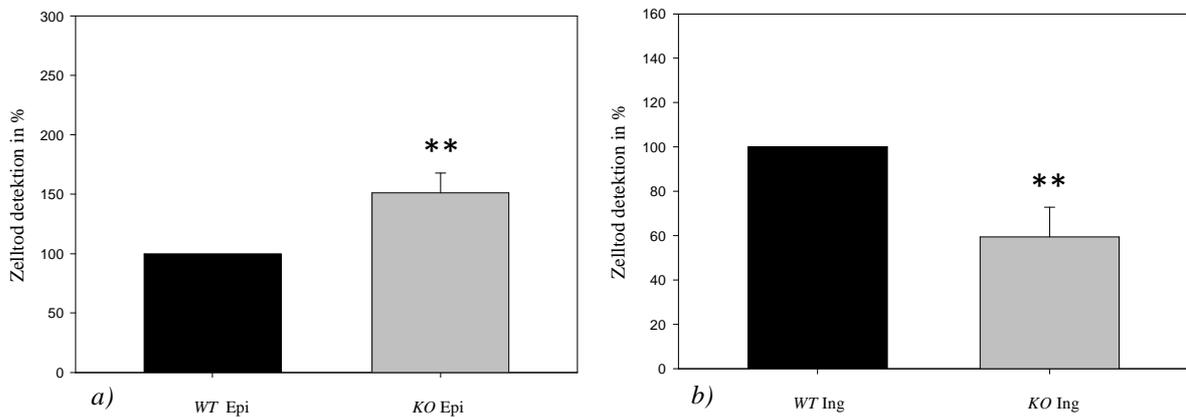


Abbildung 29 a und 29 b: **Detektion der apoptotischen Zellen (ELISA)**: Die Abbildung demonstriert die Anzahl der apoptotischen Zellen in Prozent am Tag 0 des Differenzierungsprozesses. Die Graphik 29 a zeigt die unterschiedliche Zahlen von toten Zellen in WT Epi-Zellen (schwarzer Balken) und in KO Epi-Zellen (grauer Balken). Die Abbildung 29 b vergleicht die Apoptoserate in WT Ing (schwarzer Balken) und in KO Ing (grauer Balken). Die Versuchsanzahl war N=10. \* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Die Daten legen nahe, dass die Apoptose eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Differenzierungsverhalten der beiden Depots ist. Die Zellen aus dem epididymalen Depot zeigten eine gesteigerte Apoptoserate, während die aus dem inguinalen Depot durch eine abnehmende Apoptoserate auffielen.

### 3.3.5 Depotspezifische Inflammationsunterschiede in den Adipozyten nach CB1-Rezeptor-Knockout

Aus der Literatur ist bekannt, dass das viszerale Fettgewebe proinflammatorisch wirkt (Kuk *et al.*, 2006; Pou *et al.*, 2007; Hajer *et al.*, 2008). Deshalb sollte untersucht werden, ob durch den Funktionsverlust des CB1-Rezeptors auch depotspezifische Unterschiede der Inflammation nachgewiesen werden können. Drei unterschiedliche Inflammationsmarker wurden auf RNA-Ebene analysiert: *il-6*, *mcp-1* und *tnf- $\alpha$* .

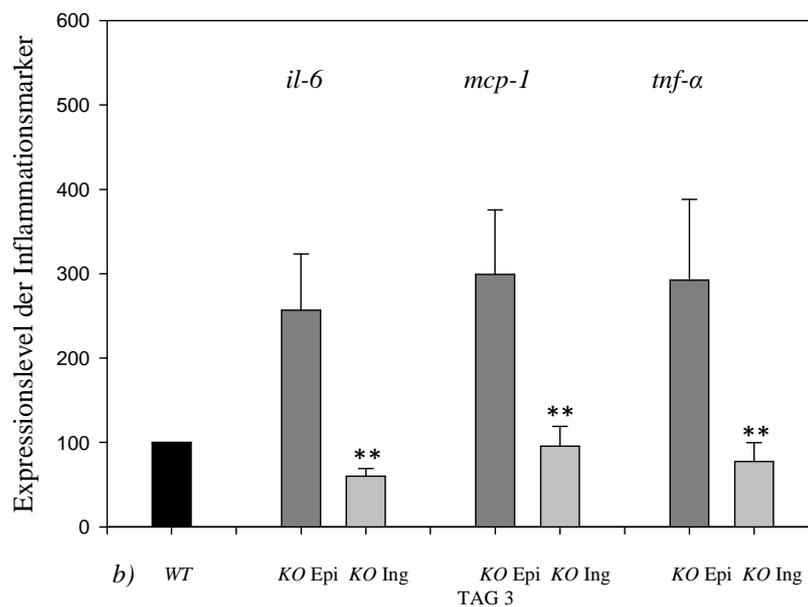
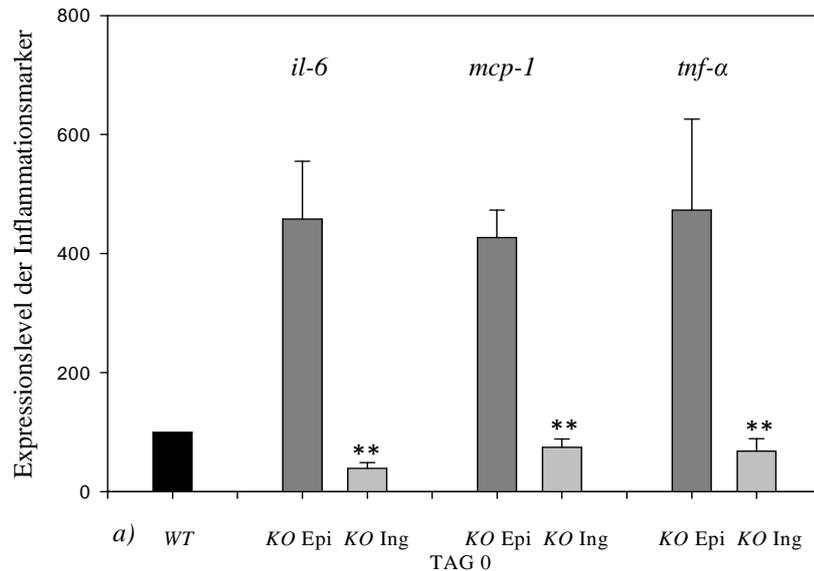


Abbildung 30 a und 30 b: **RNA-Expression von Inflammationsmarkern:** Gemessen wurde die Expression von *il-6*, *mcp-1* und *tnf-α* am Tag 0 (Abb. 30 a) und Tag 3 (Abb. 30 b), bezogen auf den jeweiligen WT auf 100% (schwarzer Balken). Die KO Epi-Zellen sind für jeden Inflammationsmarker als dunkelgraue Balken dargestellt, die KO Ing-Zellen für jeden Inflammationsmarker als hellgraue Balken. Die Versuchszahl betrug N=6. \* markiert statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Am Tag 0 lässt sich in Abbildung 30 a eine hochsignifikant gesteigerte Expression aller Entzündungsmarker in KO Epi-Zellen im Vergleich zur Wildtypkontrolle erkennen. *Il-6* stieg um 358 %, *mcp-1* um 327 % und *tnf-α* um 373 %. Auch am Tag 3 konnten diese hochsignifikanten Daten bestätigt werden. Somit war eine Zunahme von 156 % bei *il-6*, 199 % bei *mcp-1* und 192 % bei *tnf-α* zu messen. Wiederum gegenläufig waren die Ergebnisse in Abbildung 30 b in den inguinalen KO-Zellen: In diesen sank die *il-6* Expression am Tag 0 um -61 %, die *mcp-1* Expression um -25 % und die *tnf-α* Expression

um -32 %. Ebenso wie am Tag 0 waren auch die erhobenen Daten am 3. Tag hochsignifikant. Bei den inguinalen *Knockout*-Zellen wurde eine Reduzierung der *il-6* Menge um 40 %, bei der *mcp-1* Menge um 4 % und bei *tnf- $\alpha$*  Menge um 23 % gemessen (Abb. 30 b).

Aus den Daten ergibt sich, dass nach CB1-Rezeptor-*Knockout* die epididymalen Zellen die Entzündungsmarker höher exprimieren, während sie in den inguinalen Zellen abnehmen. Somit führt die Rezeptorblockade insgesamt also zu einer Hemmung der inflammatorischen Antwort.

### **3.3.6 Depotspezifische Unterschiede auf den oxidativen Metabolismus in CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen**

Da sich in den CB1-Rezeptor herunter regulierten Zellen durch *siRNA*- bzw. *Shorthairpin*-Transfektion deutliche Effekte auf den oxidativen Metabolismus zeigten, wurden auch in den CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen die *pgc-1 $\alpha$*  Expression, *ucp-1* Expression, die Mitochondrienanzahl und -biogenese und der Sauerstoffverbrauch gemessen.

#### **3.3.6.1 Depotspezifische Unterschiede der Expression von *pgc-1 $\alpha$* in Präadipozyten und Adipozyten nach CB1-Rezeptor-*Knockout***

*Pgc-1 $\alpha$*  ist ein Marker, der vor allem in braunem Fettgewebe exprimiert wird. Bei Zunahme der Expression in weißen Adipozyten kann auf eine Transdifferenzierung zu einem braunen Fettzellphänotyp geschlossen werden.

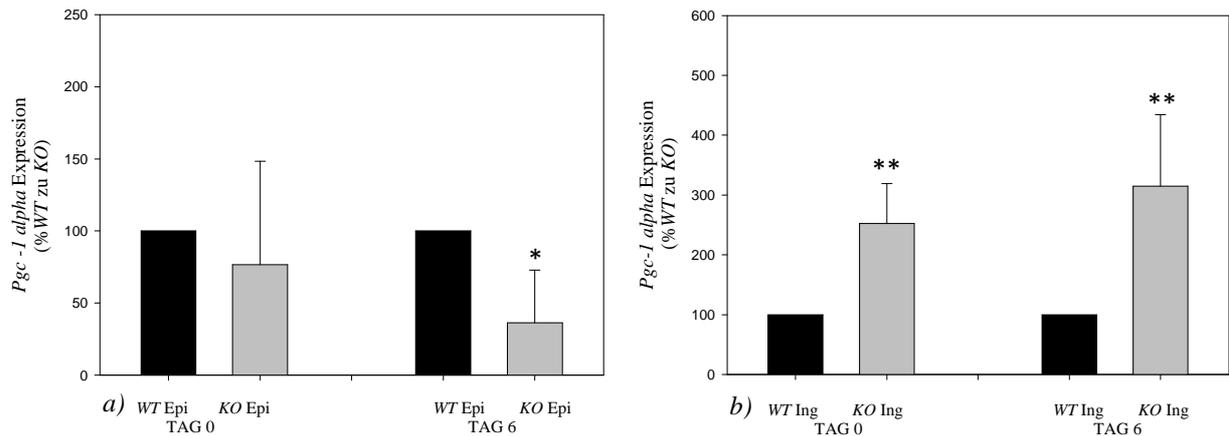


Abbildung 31 a und 31 b: ***Pgc-1 $\alpha$*  Expression auf RNA-Ebene nach CB1-Rezeptor-Knockout:** Dargestellt ist die *pgc-1 $\alpha$*  Expression auf RNA-Ebene am Tag 0 und am Tag 6 jeweils WT Epi (schwarzer Balken) im Vergleich zu KO Epi (grauer Balken) in Abbildung 31 a. In Abbildung 31 b wird die Expression von WT Ing (schwarzer Balken) im Vergleich zu KO Ing (grauer Balken) dargestellt. Die Versuchszahl betrug N=6. \* markiert statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

In epididymalen KO-Zellen ist die Expression von *pgc-1 $\alpha$*  im Vergleich zu WT Epi-Zellen reduziert. Am Tag 0 sieht man eine Abnahme der Expression um 23,38 %, am Tag 6 um 63,62 %. Dabei ist das Ergebnis noch nicht an Tag 0, sondern erst an Tag 6 signifikant (Abb. 31 a).

Wie die Abbildung 31 b zeigt, wird in den CB1-Rezeptor-Knockout-Zellen *pgc-1 $\alpha$*  viel stärker exprimiert als in den WT-Kontrollen. Sowohl am Tag 0 als auch am Tag 6 ist diese Zunahme hochsignifikant. Am Tag 0 handelt es sich um einen Zuwachs von 152,25 % und am Tag 6 um 314,51 %.

### 3.3.6.2 Depotspezifische Unterschiede der Expression von *ucp-1* auf RNA-Ebene in Präadipozyten und Adipozyten nach CB1-Rezeptor-Knockout

Bei der Messung von *ucp-1*, einem weiteren braunen Fettgewebemarker, ergab sich, dass auch die *ucp-1* Expression in den epididymalen KO-Zellen im Vergleich zu epididymalen Wildtypzellen am Tag 0 nur minimal - um 6 % - und am Tag 6 deutlicher und hochsignifikant - um 56,69 % - gesunken war (Abb. 32 a).

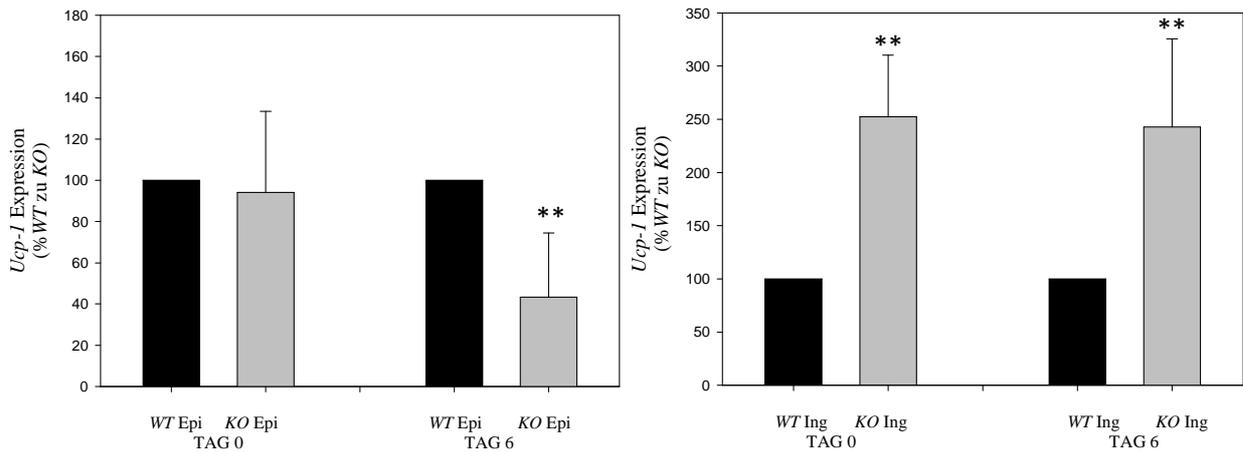
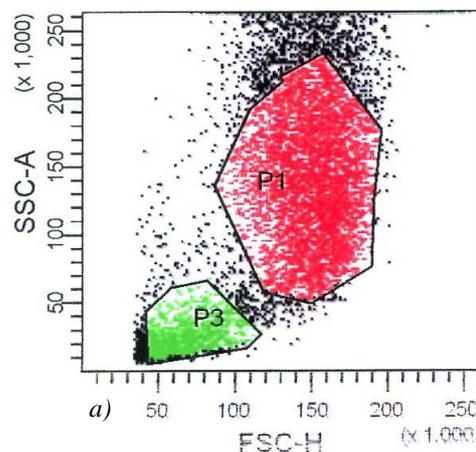


Abbildung 32 a und 32 b: ***Ucp-1* Expression auf RNA-Ebene nach CB1-Rezeptor-Knockout:** Illustriert ist die *ucp-1* Expression auf RNA-Ebene, ein Marker des braunen Fettgewebes. Die Expression wurde gemessen am Tag 0 und Tag 6. In Abbildung 32 a WT Epi im Vergleich zu KO Epi und in Abbildung 32 b WT Ing im Vergleich zu KO Ing. Die Versuchszahl betrug N=6. \* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Wie auch bei *pgc-1 $\alpha$*  ersichtlich, steigt in den inguinalen *Knockout*-Zellen die *ucp-1* Expression. Im Laufe der Differenzierung zeigt sich eine deutliche Zunahme der Expression. In Präadipozyten steigerte sich die Expression um 252,25 %, am 6. Tag - während des Differenzierungsprozesses - um 242,88 %. Die Daten waren hochsignifikant in den KO Ing-Zellen im Vergleich zu den WT Ing-Kontrollzellen (Abb. 32 b).

### 3.3.6.3 Depotspezifische Unterschiede in der Mitochondrienanzahl und der mitochondrialen Biogenese in Adipozyten nach CB1-Rezeptor-Knockout

Bevor die Mitochondrienanzahl bestimmt werden kann, muss zwischen der Anzahl der lebenden und der toten Zellen differenziert werden. Die Abbildung 33 a illustriert exemplarisch eine Messung gefärbter Adipozyten.



| b)         |         |         |             | c)         |         |         |             |
|------------|---------|---------|-------------|------------|---------|---------|-------------|
| Population | #Events | %Parent | FITC-A Mean | Population | #Events | %Parent | FITC-A Mean |
| All Events | 10.000  | ####    | 566         | All Events | 10.000  | ####    | 605         |
| P1         | 4.763   | 47.6    | 369         | P1         | 2.218   | 22.2    | 669         |
| P2         | 4.660   | 97.8    | 376         | P2         | 2.147   | 96.8    | 690         |
| P3         | 648     | 6.5     | 135         | P3         | 2.426   | 24.3    | 315         |

Abbildung 33, Tabelle 3 und 4: **Messung der Mitochondrienanzahl mit Hilfe der FACS-Analyse:** Gemessen wurde die Mitochondrienanzahl mit Hilfe des *FACS*-Gerätes nach Färbung der Mitochondrien mittels *Mitotracker Green*. Dargestellt ist eine exemplarische Messung im *FACS* am Beispiel von *WT* Epi-Zellen (33 a). Die rot dargestellte Population P1 stellt die lebenden Zellen dar. Die grüne Population P3 illustriert die toten Zellen bzw. den Zellschrott. Die Population 2 spiegelt die Anzahl der farbstoffmarkierten Mitochondrien wieder, die anhand des *FITC-Mean* analysierbar sind. Dadurch konnte die Anzahl der Mitochondrien gemessen werden (Tabelle b und c). Die Versuchsanzahl betrug N=8.

Die Tabellen 3 und 4 demonstrieren unterschiedliche *FITC-Mean*-Werte. So zeigt die linke Tabelle einen *FITC-Mean*-Wert der Population 2 - also der farbstoffmarkierten Mitochondrien - von 376. In der rechten Tabelle kann man einen deutlich gesteigerten *FITC-Mean*-Wert von 690 ablesen, was für eine gesteigerte Mitochondrienanzahl in den *KO* Ing-Zellen im Vergleich zu den *WT* Ing-Zellen spricht.

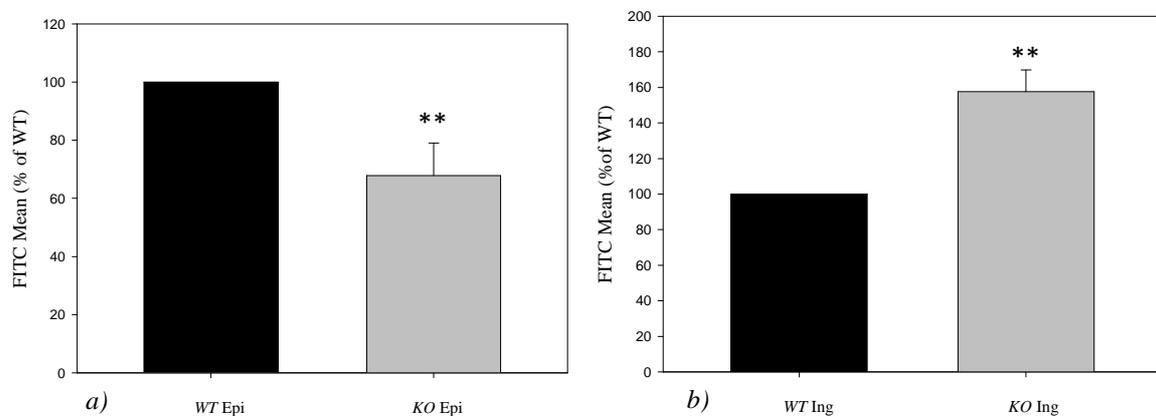


Abbildung 34 a und 34 b: **Anzahl der Mitochondrien in CB1-Rezeptor-Knockout-Zellen nach FACS-Analyse und Mitochondrienfärbung:** Der Graph 34 a zeigt die Anzahl der Mitochondrien in *KO* Epi-Zellen (grauer Balken) im Vergleich zu *WT* Epi-Zellen (schwarzer Balken). Die Abbildung 34 b illustriert hingegen die Mitochondrienzahl von *WT* Ing (schwarzer Balken) im Vergleich zu *KO* Ing (grauer Balken). Die Versuchsanzahl betrug N=10. \* markiert statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Durch *FACS*-Analysen und eine Färbung der Zellen mit *Mitotracker Green*, einem Mitochondrienfarbstoff, konnte die Zahl der Mitochondrien ermittelt werden. In den epididymalen *KO*-Zellen wurde eine Reduzierung der Mitochondrienanzahl von 20 %

gemessen. Ähnlich wie in Abbildung 21 konnte in den inguinalen *KO*-Zellen im Vergleich zu inguinalen Kontrollzellen eine Zunahme der Mitochondrienanzahl von 52 % im *FACS* registriert werden. Nach *CB1*-Rezeptormodulation durch murine *Knockout*-Zellen war dieser Effekt deutlich ausgeprägter und hochsignifikant im Vergleich zum kurzfristigen transienten *Knockdown*.

### 3.3.6.4 Depotspezifische Unterschiede von Expressionsmarkern der mitochondrialen Biogenese nach *CB1*-Rezeptor-Knockout während der Adipogenese

Durch den in Tabelle 3 abgebildeten Vergleich wird erkennbar, dass die *KO* Epi-Zellen eine deutlich geringere Expression mitochondrialer Marker auf RNA-Ebene zeigen als die Kontrollzellen, während in den *KO* Ing-Zellen ein Anstieg dieser Marker messbar war. Diese Ergebnisse waren identisch mit den aus der *FACS*-Analyse gewonnenen Daten zur Mitochondrienanzahl.

| <i>Mitochondriale Marker</i> | <i>nrf-1</i> |              | <i>tfam</i>  |              |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                              | <i>Tag 3</i> | <i>Tag 6</i> | <i>Tag 3</i> | <i>Tag 6</i> |
| <i>Epididymal WT vs. KO</i>  | ↑ 3 %        | ↑ 7 %        | ↓ 24 %       | ↑ 11 %       |
| <i>Inguinal WT vs. KO</i>    | ↑ 79 %       | ↑ 162 %      | ↑ 104 %      | ↑ 194 %      |

Tabelle 3: **Darstellung der Expressionslevel der Mitochondrienmarker *nrf-1* und *tfam* auf RNA-Ebene nach *CB1*-Rezeptor-Knockout:** Gemessen wurden die Expressionslevel von *nrf-1* und *tfam* - Regulatoren der mitochondrialen Biogenese - am Tag 0, Tag 3 und Tag 6 während der Differenzierung. Die obere Spalte bildet jeweils die Daten des Vergleichs *WT* Epi zu *KO* Epi ab. Im Gegensatz dazu illustriert die untere Spalte die Kontraste zwischen der Expression von *WT* Ing zu *KO* Ing. Die Versuchsanzahl betrug N=6. \* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ).

Am Tag 3 ist eine Steigerung der *nrf-1* Expression von 79 % in *KO* Ing im Vergleich zu *WT* Ing-Zellen, am Tag 6 eine Zunahme von 162 % messbar. Die Tabelle bildet auch die Expressionszunahme von *tfam* ab. Am Tag 3 wurde in den *KO* Ing-Zellen ein prozentualer Anstieg von 104 % und am Tag 6 von 194 % gemessen (Tab. 3). Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ist erkennbar, dass die *KO* Epi-Zellen keine signifikante Veränderung der Expressionslevel beider mitochondrialer Marker auf RNA-Ebene im

Vergleich zu epididymalen *WT*-Kontrollen haben, aber eine deutlich niedrigere als die *KO* Inguinal-Zellen.

### 3.3.6.5 Depotspezifische Unterschiede im Sauerstoffverbrauch von Präadipozyten und Adipozyten nach *CB1*-Rezeptor-Knockout

Der Sauerstoffverbrauch ist ein Indikator der mitochondrialen Biogenese. Ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch würde für einen gesteigerten oxidativen Metabolismus sprechen und damit weitere Hinweise für eine Transdifferenzierung zu einem braunen Fettzellphänotyp liefern.

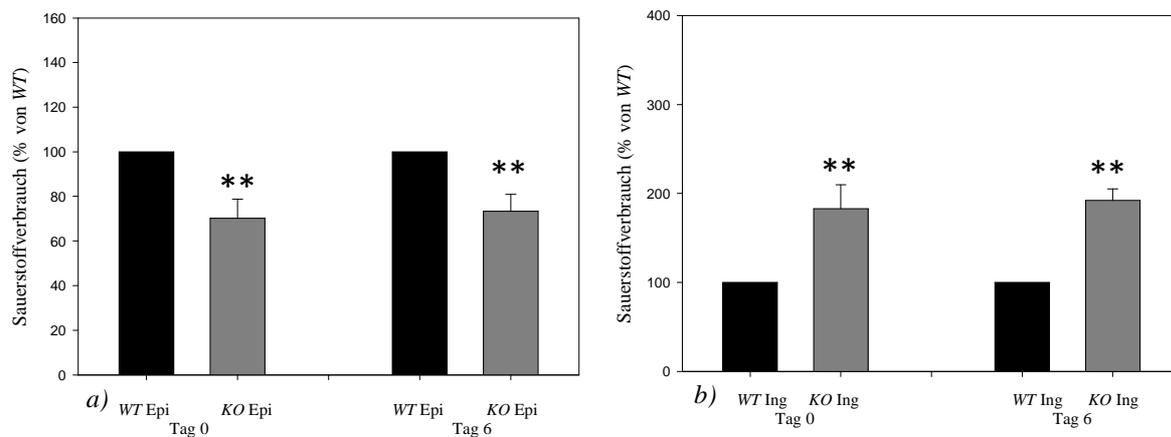


Abbildung 35 a und 35 b: **Sauerstoffverbrauchsmessung mit Hilfe des Oxygraphen nach *CB1*-Rezeptor-Knockout:** Die Rate des Sauerstoffverbrauches wurde am Tag 0 und Tag 6 während der Adipogenese gemessen. Abbildung 35 a zeigt *WT* Epi-Zellen (schwarze Balken) im Vergleich zu *KO* Epi-Zellen (graue Balken). Und Abbildung 35 b stellt den unterschiedlichen Sauerstoffverbrauch von *WT* Ing-Zellen (schwarze Balken) im Vergleich zu *KO* Ing-Zellen (graue Balken) dar. Die Versuchszahl betrug N=12. \* kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ), \*\* statistisch hochsignifikante ( $p < 0,001$ ).

In epididymalen *KO*-Zellen nimmt der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu epididymalen *WT*-Zellen deutlich ab. Am Tag 0 konnte eine hochsignifikante Reduktion des Sauerstoffverbrauches von 30 % und am Tag 6 eine hochsignifikante Abnahme des Sauerstoffverbrauches von 27 % gemessen werden (Abb. 35 a). Andererseits kommt es in den inguinalen *KO*-Zellen zu einer ausgeprägten und hochsignifikanten Zunahme des Sauerstoffverbrauches. So war am Tag 0 ein Anstieg von 83 % und am Tag 6 sogar von 92 % messbar (Abb. 35 b).

Die Versuche zum oxidativen Metabolismus ergaben, dass ein *CB1*-Rezeptor-Knockout zu depotspezifischen Unterschieden führt. Für die epididymalen *KO*-Zellen war eine niedrigere Expression von *pgc-1 α* und *ucp-1*, eine Abnahme der Mitochondrienanzahl und -funktion und ein reduzierter Sauerstoffverbrauch charakteristisch. Andererseits kam es in

den inguinalen *KO*-Zellen zu einer deutlichen Zunahme des oxidativen Metabolismus mit einer gesteigerten *pgc-1  $\alpha$*  und *ucp-1* Expression, einer Erhöhung der Mitochondrienzahl und -funktion und einer Zunahme des Sauerstoffverbrauches. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass ein CB1-Rezeptor-*Knockout* in Fettzellen in depotspezifischen Unterschieden mündet und Zellen aus dem subkutanen Depot zu einem braunen Fettzellphänotyp transdifferenzieren.

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodenetablierung: *siRNA*-Transfektion in Präadipozyten und Adipozyten

In der Literatur gibt es eine weitgehende Übereinstimmung darüber, dass ausdifferenzierte Adipozyten sehr schwierig zu transfizieren sind, insbesondere, wenn man Lipofektionsreagenzien verwendet (Kilroy *et al.*, 2009). Jiang *et al.* haben nachgewiesen, dass die Transfektion von *siRNA* mit Lipofektionsreagenzien bei 3T3-L1 Präadipozyten gut funktioniert, jedoch nur sehr geringe *Knockdown*-Erfolge in 3T3-L1 Adipozyten erzielt werden (Jiang *et al.*, 2003). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch wir nach *siRNA*-Transfektion durch Lipofektionsreagenzien. Ein zufriedenstellender *Knockdown* gelang in Präadipozyten, jedoch nicht in Adipozyten. Dabei ergibt sich folgendes Hauptproblem: Je ausdifferenzierter die Fettzellen sind, desto schwerer kann die Transfektionsreagenz die Lipidvakuolen durchdringen. Kilroy *et al.* bestätigen, dass Adipozyten quasi refraktär zu Lipid-basierter Transfektion sind (Kilroy *et al.*, 2009).

Aus dieser Erkenntnis folgte der Versuch, reife Adipozyten mittels Elektroporation und Lipofektionsreagenzien („*Nucleofector*“) zu transfizieren. Durch dieses Verfahren konnten wir erfolgreiche *Knockdown*-Raten (>80 %) der *MAP-Kinase* und des CB1-Rezeptors erzielen. Hier stimmen unsere Daten weitgehend mit denen von anderen Forschungsgruppen überein, die ebenfalls eine *siRNA*-Transfektion in Adipozyten durch Elektroporation oder durch Vektor-medierte Transfektion erreichten (Liao *et al.*, 2006; Welsh *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2009; Kilroy *et al.*, 2009; Cypess und Kahn, 2010).

Eine weitgehende Übereinstimmung gab es auch bei der Dauer des *Knockdowns*. Die Transfektion der Adipozyten am 2. Tag nach Induktion hielt über einen Zeitraum von 96 h an. Andere Studien sind ebenfalls zu einem erfolgreichen *Knockdown* von 5 bis 6 Tagen gekommen (Echeverri *et al.*, 2006). In unseren Untersuchungen war die *Knockdown*-Rate nach 48 h am höchsten und entsprach damit den Ergebnissen von Kilroy *et al.* und Puri *et al.* (Puri *et al.*, 2007; Kilroy *et al.*, 2009).

Allerdings kann die *siRNA*-Transfektion einen gravierenden Nachteil haben: eine toxische Wirkung auf die Zelle. Wie in unseren Experimenten gezeigt werden konnte, wurden das Wachstumsverhalten und die Funktionen der Fettzellen durch die Elektroporation und die Lipofektionsreagenzien nicht beeinträchtigt. Generell verursachen hohe *siRNA*-Konzentrationen eine gesteigerte Toxizität und eine signifikante Alteration in der

Zellphysiologie (Echeverri und Perrimon, 2006). Im Gegensatz dazu wurde in unseren Experimenten eine niedrigere Konzentration an *siRNA* (200 pmol) eingesetzt - und zwar eine hundertfach niedrigere Konzentration im Vergleich zu anderen Forschungsgruppen (Jiang *et al.*, 2003; Puri *et al.*, 2007). Damit wurde die Wahrscheinlichkeit einer Interferonantwort und weiterer zellulärer Toxizitäten deutlich reduziert.

Diese Erkenntnis wurde durch eine Negativkontrolle (*scrambled*), die für die grobe Evaluierung von unerwünschten Nebenwirkungen („*off targets effects*“) erforderlich ist, bestätigt (Echeverri und Perrimon, 2006). Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nicht mit Elektroporation behandelt und auch nicht mit *siRNA* transfiziert wurden, um makroskopische und mikroskopische Zellschäden so weit wie möglich auszuschließen. Ausgeprägte Zellschäden konnten dabei nicht festgestellt werden. Erhärtet wird dieser Befund durch die äquivalenten Ergebnisse, die wir in den Fettzelllinien nach *CB1-Rezeptor-Knockout*, auf die Differenzierung und die Adipozytenbiologie nachweisen konnten.

Durch Transfektion von *siRNA* ist ein transienter *Knockdown* möglich (höchstens bis zu 120 h nach der Transfektion). Dieses Modell imitiert vermutlich am ehesten eine kurzfristige Wirkung der Rezeptorregulation, ähnlich wie durch eine medikamentöse Blockade mit Rimonabant. Wahrscheinlich werden durch die Einnahme von 20 mg Rimonabant (Acomplia ®) ebenfalls nicht alle Rezeptoren chronisch und hundertprozentig blockiert. Fazit: Die kurzfristige Herunterregulation des Rezeptors durch *siRNA*-Transfektion erweist sich als ein vielversprechendes Untersuchungsmodell zur Analyse von peripheren Effekten im Fettgewebe.

Um einen längerfristigen *Knockdown* des *CB1-Rezeptors* zu erzielen, wurden *Shorthairpin-RNA* in die Zelle eingeschleust, die dort ins Genom integriert werden. Dieses Modell entspricht damit eher einer chronischen, längerfristigen Blockade des *CB1-Rezeptors*.

#### **4.2 *CB1-Rezeptor-Knockdown* im inguinalen Fettgewebe durch *siRNA*- und *Shorthairpin-RNA*-Transfektion**

In den inguinalen Adipozyten, dessen *CB1-Rezeptor* kurzfristig durch *siRNA* herunterreguliert war, konnte kein Differenzierungsunterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen

ermittelt werden - weder morphologisch noch densitometrisch. Allerdings konnte durch den längerfristigen *Knockdown* mittels *Shorthairpin-RNA*-Transfektion bereits ein Trend zu einem Differenzierungsvorteil in den inguinalen Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen gezeigt werden, der allerdings nicht signifikant war. Interessanterweise zeigen Ravinet Trillou *et al.*, dass Mäuse, die keinen CB1-Rezeptor exprimieren, sowohl bei der Geburt als auch während des gesamten Lebens deutlich dünner waren als ihre Kontrollgruppe. Sogar unter hochkalorischer Kost (*high fat diet*) zeigten die Tiere keine ausgeprägte Fettzunahme (Ravinet Trillou *et al.*, 2004). Diese Daten ähneln unseren Ergebnissen nach CB1-Rezeptormodulation durch *Knockout*-Mäuse. Aufgrund dieser Daten ist zu vermuten, dass es bei Tieren, bei denen der CB1-Rezeptor herunter reguliert bzw. blockiert wurde, möglicherweise sogar zu einer Hemmung der Differenzierung oder einer Hypoplasie des Fettgewebes kommt. Zu beachten ist allerdings, dass es sich um unterschiedliche Untersuchungsmodelle handelt: Während in der vorliegenden Arbeit *in-vitro*-Experimente einer transienten CB1-Rezeptormodulation während der Adipogenese durchgeführt wurden, handelt es sich bei Ravinet Trillou *et al.* um *in-vivo*-Studien in *Knockout*-Mäusen und somit um eine komplette und langfristige Genregulation.

Nach einer CB1-Rezeptorherunterregulation durch *siRNA*-Transfektion oder *sh*-Transfektion konnten wir eine Zunahme der Expression von braunen Fettgewebsmarkern messen. Des Weiteren zeigte sich eine gesteigerte mitochondriale Biogenese mit einer höheren Zahl an Mitochondrien, mitochondrialen Markern und einem erhöhtem Sauerstoffverbrauch. All dies sind Hinweise auf einen Prozess der Transdifferenzierung von einem weißen zu einem braunen Fettzellphänotyp. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Daten aus der Literatur überein. So konnten Tedesco *et al.* ebenfalls zeigen, dass eine CB1-Rezeptormodulation durch *Knockout* im Fettgewebe zu einer negativen Energiebilanz durch verstärkte Energieabgabe führt (Tedesco *et al.*, 2008). Nach Blockade des CB1-Rezeptors kommt es zu einer vermehrten Bildung und Aktivität von Mitochondrien und einem erhöhten Sauerstoffverbrauch. Braune Fettzellmarker wurden höher exprimiert (Tiraby und Langin, 2003; Tiraby *et al.*, 2003; Rohas *et al.*, 2007). Dies sind Indizien für eine gesteigerte Thermogeneseaktivität (Liu *et al.*, 2005), wie auch unsere Daten zeigen. Auch dieser Befund weist auf eine Konversion von weißen Adipozyten zu einem braunen Fettzellphänotyp hin. Metabolisch und kardiovaskulär wäre dies von Vorteil und eine mögliche Erklärung für die positiven Effekte, die während einer Rimonabantbehandlung bei Nagetieren und Menschen auftreten.

Wissenschaftlich ungeklärt ist bisher, ob der Prozess der Transdifferenzierung im Fettgewebe durch Funktionsverlust des CB1-Rezeptors überhaupt möglich ist und wie der Prozess gegebenenfalls abläuft.

Bei den transdifferenzierten Zellen handelt es sich um ehemals weiße Fettzellen mit braunen Fettzellcharakteristika. Die Arbeitsgruppe um Petrovic bezeichnen diesen Typ als „*brite adipocytes*“ - also zwischen braun und weiß (Petrovic N, 2010). Vermutlich lassen sich die Zellen aus dem subkutanen Depot nach Funktionsverlust des CB1-Rezeptors auch als „*brite adipocytes*“ beschreiben.

Dass eine Transdifferenzierung im Fettgewebe möglich ist, haben auch andere Arbeitsgruppen nach Blockierung anderer Rezeptoren festgestellt. Sie haben unter anderem nachgewiesen, dass die Medikamentengruppe Thiazolidindione (*ppar* $\gamma$ -Agonisten) zu einer gesteigerten Mitochondrienzahl und einer Veränderung der Cristae-Struktur in den Mitochondrien führt, es zu einer gesteigerten Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase kommt und braune Fettgewebismarker hochreguliert werden (Wilson-Fritch *et al.*, 2003).

Ein weiterer medikamentöser Ansatz, der ebenfalls das braune Fettgewebe zu aktivieren scheint, ist Sibutramin. Der zentral wirkende Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmeanhänger führte in einer Säugetierstudie zu einem signifikanten Gewichtsverlust und aktivierte in den Säugetieren das braune Fettgewebe (Giordano *et al.*, 2002). Allerdings stellt sich bei der Studie die Frage, ob es sich wirklich um eine Transdifferenzierung handelt oder lediglich um die Aktivierung des bereits bestehenden braunen Fettgewebes.

#### **4.3 Depotspezifische Unterschiede im Fettgewebe nach CB1-Rezeptormodulation mittels CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen**

Es gibt bisher nur eine Studie zu depotspezifischen Unterschieden nach CB1-Rezeptor-Knockout. Jourdan *et al.* haben Mäuse nach 19-wöchiger *high-sucrose high-fat diet* (*HSHF*) und anschließender sechswöchiger Rimonabanttherapie untersucht. Sie haben herausgefunden, dass durch *HSHF* Diät einige Gene, die im viszeralen Fett exprimiert werden und dadurch die Fettaufnahme, Lipolyse,  $\beta$ -Oxidation und Lipogenese beeinflussen, hochreguliert werden. Zusätzlich wurden Fettmasse, Insulinspiegel und

Lebertriglyceride reduziert. Der Grad der Leberverfettung in diät-induzierten adipösen Mäusen war ebenfalls rückläufig (Jourdan *et al.*, 2010).

Aufgrund der in dieser Arbeit neu generierten Fettzelllinien war es möglich, depotspezifische Unterschiede durch einen CB1-Rezeptor-*Knockout* in Zellkulturexperimenten zu untersuchen. Da die CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäuse weder pränatal noch während der gesamten Lebenszeit einen CB1-Rezeptor besitzen, können - im Gegensatz zur kurzfristigen bzw. späteren Rezeptorblockade durch *siRNA*- und *Shorthairpin*-Transfektion - auch Effekte einer langfristigen und frühen CB1-Rezeptormodulation in Fettzellen evaluiert werden.

Mit dieser neuen Methode gelang es, depotspezifische Unterschiede zu analysieren. Unsere Versuche ergaben, dass sich isolierte viszerale Fettzellen aus CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen schlechter differenzieren als die Wildtypkontrollen. Ein Übermaß an viszeraler Fettmasse geht meist mit metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen einher. Interessanterweise zeigten inguinal (subkutan) gewonnene Adipozyten von CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen einen deutlichen Differenzierungsvorteil gegenüber den Wildtypzellen. Aus Humanstudien ist bekannt, dass das subkutane Fett nicht mit einem erhöhten Risiko von metabolischen Komplikationen assoziiert zu sein scheint und bei hohen Triglyceridspiegeln sogar protektiv wirken kann (Porter *et al.*, 2009). Bestätigt werden konnten die Ergebnisse zur Differenzierung durch die Messung von Differenzierungsmarkern in unseren Fettzelllinien.

Unklar ist bisher, wie es zu diesen depotspezifischen Differenzierungsunterschieden kommt. Jourdan *et al.* haben bisher als einzige eine Erklärung gewagt. Aufgrund Ihrer Erkenntnis, dass durch die Gabe eines CB1-Antagonisten die Expressionslevel der lipogenetischen Gene normalisiert werden, stellten sie die Hypothese auf, dass es zu einer Akkumulation von intrazellulären Lipiddroplets kommen könnte. Durch diese begrenzte Akkumulation wird die viszerale Fettmasse reduziert. Außerdem berichtet die Forschergruppe von einer gesteigerten *ppary*-Expression im subkutanen Fett im Vergleich zu den Kontrolltieren und mutmaßt eine Aktivierung der Adipozytendifferenzierung (Jourdan *et al.*, 2010). Durch die Aktivierung des braunen Fettgewebes bzw. die Transdifferenzierung könnte man spekulieren, dass ektope Fettgewebsansammlungen durch gesteigerte  $\beta$ -Oxidation und gesteigerte Thermogenese reduziert werden.

In den durchgeführten Experimenten haben wir ähnliche Effekte beobachtet, der Ausprägungsgrad war jedoch abhängig von der Art der CB1-Rezeptormodulation. In den CB1-Rezeptor-*Knockout*-Linien waren die Differenzierungsunterschiede signifikant nachweisbar. In den Zellen nach *Shorthairpin*-Transfektion waren Differenzierungsunterschiede messbar, jedoch nicht signifikant und in den Zellen durch einen Rezeptor-*Knockdowns* mittels *siRNA*-Transfektion gar nicht nachweisbar. Das lässt drauf schließen, dass der Einfluss auf die Differenzierung schon in der frühen Proliferationsphase und nicht erst während der Adipogenese stattfindet. So scheint eine kurzfristige oder Teilblockierung nicht auszureichen, um Differenzierungseffekte hervorzurufen.

Depotspezifische Unterschiede nach Blockade anderer Rezeptoren im Fettgewebe wurden bereits von anderen Forschungsgruppen beschrieben. Laplante, Festuccia *et al.* entdeckten, dass die Medikamentengruppe Thiazolidindione Lipidablagerungen im subkutanen Fett begünstigt, während die viszerale Fettmasse gleich bleibt bzw. leicht reduziert wird (Laplante *et al.*, 2006; Festuccia *et al.*, 2009). Die Umwandlung von lipolytischem Fett zu eher anabolisch subkutanen Fett soll nach Ihren Erkenntnissen ein wichtiger Teil des insulinsensitisierenden Effektes von Thiazolidindionen (*ppary*-Agonisten) im Menschen sein (Laplante *et al.*, 2006). So sollen Thiazolidindione die Differenzierung von humanen Präadipozyten aus subkutanem, aber nicht viszeralem Fett induzieren (Adams *et al.*, 1997; Sewter *et al.*, 2002). Sie haben somit ähnliche Effekte entdeckt, wie sie hier durch CB1-Rezeptor-*Knockout* gezeigt werden konnten. Eine medikamentöse Therapie kann somit zu depotspezifischen Effekten und sogar Fettredistribution führen, die den Energieverbrauch positiv und die Lipideinlagerung negativ beeinflussen können (Kang JG, 2010).

Bestätigt werden die hier gewonnenen Ergebnisse auch durch eine Studie zur Wirkung und Behandlung mit dem Hormon Dehydroepiandrosteron (DHEA). Sie stellte ebenfalls unterschiedliche Effekte in inguinalen und viszeralen Fettdepots fest (Rice *et al.*, 2010). Der normale Differenzierungsprozess der subkutanen Präadipozyten war unbeeinflusst bis minimal gesteigert, und die omentalen Präadipozyten zeigten ein Differenzierungsdefizit (Rice *et al.*, 2010).

Kelly *et al.* konnten sogar in einer Humanstudie zeigen, dass eine Troglitazonbehandlung zur Reduktion der viszeralen Fettmasse im Menschen führt (Kelly *et al.*, 1999). Möglicherweise könnte also auch durch CB1-Rezeptorblockierung mittels Rimonabant eine Abnahme der viszeralen Fettmasse und dadurch ein Gewichtsverlust und positive

metabolische Effekte erreicht werden. Andere Medikamente wie Thiazolidindione und Hormone wie DHEA verursachen also ähnliche Differenzierungsunterschiede wie eine CB1-Rezeptorblockierung: auf der einen Seite eine Reduzierung der viszeralen Fettmasse, auf der anderen eine Förderung der Lipidablagerung im subkutanem Fettgewebe. Die genauen Mechanismen bleiben bis heute allerdings weitgehend ungeklärt.

Die experimentell gewonnenen Erkenntnisse helfen nun, die Ergebnisse von klinischen Rimonabant-Studien (*RIO*) nachzuvollziehen. Mehrere Arbeitsgruppen haben herausgefunden, dass eine CB1-Rezeptormodulation die kardiovaskulären Risikofaktoren verbessert und die Fettmasse, die Glukosetoleranz, die Dyslipidämien und Entzündungsmarker verringert (Despres *et al.*, 2005; Van Gaal *et al.*, 2005; Rosenson, 2009). Eine mögliche Erklärung für die metabolisch positiven Wirkungen bei den mit Rimonabant behandelten Patienten sind die peripheren und depotspezifischen Effekte, die in unseren CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zelllinien nachgewiesen werden konnten. In klinischen Studien haben Patienten v.a. viszerales Fett verloren, was man an einem verminderten *waist to hip ratio* ablesen konnte (Despres *et al.*, 2005; Van Gaal *et al.*, 2005; Pi-Sunyer, 2006; Scheen *et al.*, 2006). Ein viszerales Differenzierungsdefizit konnte bei unseren Untersuchungen der Fettzelllinien ebenfalls gemessen werden. Eine Ursache des Differenzierungsdefizits im viszeralen Fettgewebe könnte in der Induktion der Apoptose bzw. in der Schädigung der DNA-Synthese liegen.

Mit den hier erzielten Ergebnissen konnte erstmals demonstriert werden, dass es depotspezifische Unterschiede im Apoptoseverhalten bzw. der DNA-Synthese in Zellen gibt, die von CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen isoliert wurden. Eine erhöhte Schädigung der DNA-Synthese (Phosphorylierung von p53) und eine gesteigerte Apoptoserate waren in den Fettzellen aus dem epididymalen Depot messbar. Hallenborg *et al.* fanden heraus, dass p53 die Adipogenese inhibiert. Sie vermuten, dass p53 in der Aufrechterhaltung der Fettzellfunktion beteiligt ist (Hallenborg *et al.*, 2009) und stellen somit eine mögliche Erklärung für das Differenzierungsdefizit und die gesteigerte Apoptoserate in den epididymalen *KO*-Zellen im Vergleich zur Wildtypkontrolle dar.

Weitere depotspezifische Unterschiede in der Adipozytenantwort auf lipolytische und lipogene Stimuli und auf die Adipozytenapoptose haben auch andere Forschungsgruppen festgestellt (Niesler *et al.*, 1998; Rayalam *et al.*, 2008). Niesler *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass humane omentale Präadipozyten sensibler auf apoptotische Stimuli reagieren als subkutane Präadipozyten (Niesler *et al.*, 1998). Einige andere Substanzen

haben ebenfalls die Eigenschaft, die Adipogenese zu inhibieren und Apoptose zu induzieren. Eine Substanz ist zum Beispiel das Resveratrol (Inhaltsstoff des Rotweins). Es induziert die Apoptose und inhibiert die Zellviabilität und die Adipogenese in 3T3-L1 Zelllinien (Rayalam *et al.*, 2008). Daraus könnte auch ein Ansatz für die Therapie der Adipositas entstehen. In der Literatur werden noch einige weitere Substanzen erwähnt, zum Beispiel Ajoene (ein Knoblauchextrakt), Guggulsterone, Withaferin A und Chlorella methanol. Sie alle reduzieren die Lipidakkumulation, die Adipogenese und erhöhen die Zahl der apoptotischen Zellen (Park *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Ambati *et al.*, 2009; Chon *et al.*, 2009). Ihre Erkenntnisse sind mit den hier gewonnenen Befunden bei den epididymalen *KO*-Zellen vergleichbar.

Im Gegensatz dazu waren in den *KO*-Zellen der inguinalen Depots eine Induktion der Proliferation und eine Inhibierung der Apoptose festzustellen. Denselben Mechanismus haben Qiu *et al.* beobachtet: *lyrm 1* fördert die Proliferation und inhibiert die Apoptose in den Präadipozyten (Qiu *et al.*, 2009).

Es gibt bisher nur wenige Untersuchungen im Bereich der Inflammation, die depotspezifische Unterschiede beleuchten. Durch die Dysfunktion des viszeralen Fettes kommt es zur Hypersekretion von proatherogenen, proinflammatorischen und prodiabetischen Adipozytokinen, die die protektive Adiponektinproduktion vermindern (Hajer *et al.*, 2008). In dieser Untersuchung konnte erstmals demonstriert werden, dass es in Fettzellen von CB1-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen depotspezifische Unterschiede in der Expression von Inflammationsmarkern gibt. In viszeralen humanen Fettzellen war im Vergleich zu Zellen aus subkutanen Depots eine deutlich erhöhte Leukozytenzahl, gesteigerte Makrophagenanzahl, eine erhöhte Zahl von natürlichen Killerzellen und ein deutlich proinflammatorisches Zytokinprofil messbar (O'Rourke *et al.*, 2009). In den hier durchgeführten Versuchen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Entzündungsmarker wie *tnf- $\alpha$* , *il-6* und *mcp-1* deutlich höher in viszeralen *Knockout*-Zellen als in subkutanen Zellen exprimiert wurden. Ein Erklärungsansatz könnte die gesteigerte Apoptoserate sein. Möglicherweise gilt: Je mehr Apoptose, desto mehr Entzündungsmarker werden freigesetzt.

Im Gegensatz dazu wurde eine reduzierte Expression der Inflammationsmarker in inguinalen *Knockout*-Zellen im Vergleich zu inguinalen Wildtypzellen auf RNA-Ebene gemessen, obwohl vorher ein Differenzierungsdefizit festzustellen war. Es könnte aber auch sein, dass grundsätzlich weniger Inflammationsmarker aus dem subkutanen Gewebe

ausgeschüttet werden. Das würde allerdings nicht erklären, warum in den *Knockout*-Zellen sogar weniger Entzündungsmarker exprimiert werden als in den Wildtypkontrollen. Ein Ansatzpunkt könnte das Depot selbst sein: Hier könnten deutlich weniger Zellen apoptotisch werden und dadurch weniger Entzündungsmarker freigesetzt werden. Dies sind derzeit allerdings nicht mehr als Arbeitshypothesen, die experimentell genauer beleuchtet werden müssten.

Klinische Studien von mit Rimonabant behandelten adipösen Probanden haben positive Effekte auf den Glukosestoffwechsel festgestellt: Die Insulinsensitivität wurde verbessert und teilweise konnte sogar der Prozess einer gestörte Glukosetoleranz revidiert werden. Auch wir konnten in den vorliegenden Experimenten eine gesteigerte Glukoseaufnahme in den inguinalen Depots der CB1-Rezeptor-*Knockout*-Zellen sowie eine verstärkte *glut 4* Expression nachweisen. Die Glukoseaufnahme wird im Fettgewebe durch *glut 4* vermittelt. *glut 4* kann als Antwort auf eine Insulinstimulation vom Zytosol in die Membran dislozieren (Abel *et al.*, 2001). Unsere Daten weisen darauf hin, dass das zunehmende subkutane Fett nach CB1-Rezeptor-*Knockout* insulinsensitiver wird und das dadurch der Glukosestoffwechsel des Patienten positiv beeinflusst werden kann. Zu dem gleichen Schluss waren klinische Studien (*RIO*) nach Testreihen mit Rimonabant behandelten Patienten gekommen (Despres *et al.*, 2005; Van Gaal *et al.*, 2005; Pi-Sunyer, 2006; Scheen *et al.*, 2006). Überschüssiges viszerale Fett, das als Hauptverantwortlicher für die Insulinresistenz gilt, wird durch eine Blockade des CB1-Rezeptors reduziert. Auch diese Aussagen sind mit den vorgestellten Ergebnissen und Hypothesen sehr gut vereinbar. In den hier gezeigten Experimenten fanden wir ebenfalls nur eine minimal geringere Glukoseaufnahme in den *WT* Epi-Zellen im Vergleich zu den *KO* Epi-Zellen. Vor allem durch das entstandene Differenzierungsdefizit des viszeralen Fettgewebes und die bessere Insulinsensitivität und Glukoseaufnahme ins subkutane Fettgewebe kann sich eventuell klinisch die Insulinresistenz verbessern und sich möglicherweise langfristig auch eine vorher entstandene gestörte Glukosetoleranz zurückbilden.

Bekannt ist, dass die CB1-Rezeptormodulation zu einer erhöhten mitochondrialen Biogenese führt und den oxidativen Metabolismus steigert, wie wir es bereits durch *shRNA*- und *siRNA*-Transfektion darlegen konnten. Depotspezifische Unterschiede wurden dabei aber bisher nicht berücksichtigt (Tedesco *et al.*, 2008; Perwitz *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass subkutanes und viszerale Fett unterschiedlich auf einen CB1-Rezeptorverlust reagieren. Marker, die üblicherweise vor

allem im braunen Fettgewebe exprimiert werden, wie *pgc-1 $\alpha$*  und *ucp-1*, waren in den inguinalen *KO*-Zellen im Vergleich zu Wildtypkontrollzellen stark und hochsignifikant erhöht. Zusätzlich konnte die Hypothese der Transdifferenzierung mit einem vermehrten Sauerstoffverbrauch und einer gesteigerten mitochondrialen Biogenese untermauert werden. Ebenso waren die mitochondrialen Marker wie *tfam* und *nrf-1* stärker exprimiert.

Braune Fettzellen entstehen in weißen Fettdepots von transgenen Mausmodellen und sind mit einem schlanken Phänotyp assoziiert (Cederberg *et al.*, 2001; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 2001). Romanatto *et al.* zeigten überzeugend, dass *tnfr-1 KO*-Mäuse durch eine deutlich gesteigerte Thermogenese vor diät-induzierter Fettleibigkeit geschützt sind (Romanatto *et al.*, 2009). Langin geht noch einen Schritt weiter: Was in Mausmodellen möglich ist, passiert auch in humanen Fettzellen. Reife adulte weiße Adipozyten können in braune Fettzellen konvertieren und sich zu einem metabolisch aktiven braunen Fettzellphänotyp umwandeln (Langin, 2010).

Ist dieser Wechsel zwischen den Depots überhaupt möglich? Um zu untersuchen, ob ein metabolischer Wechsel von einem weißen humanen subkutanen Adipozyten zu einem braunen induzierbar ist, wurden Zellen in einer Studie von Larrouy *et al.* mit einem *pgc-1 $\alpha$*  exprimierende Adenovirus transfiziert. Die Expression des Koaktivators induzierte wiederum die Expression von *ucp-1*, Atmungskettenproteinen, Fettsäureoxidationsenzymen und weiteren braunen Markern (Larrouy *et al.*, 1999; Tiraby *et al.*, 2003). Die aus der Literatur bekannten Daten einer möglichen Transdifferenzierung und gesteigerten Thermogenese stimmen mit den hier erhobenen Daten überein. Dieser metabolisch positive Effekt, den wir in Mausadipozyten zeigen konnten, lässt sich somit sehr wahrscheinlich auf den Menschen übertragen und könnte möglicherweise die Wirkung durch eine Rimonabantbehandlung erklären.

Ähnlich unseren Erkenntnissen weisen Tedesco *et al.* daraufhin, dass durch Behandlung mit Rimonabant (SR 141716) der mitochondriale DNA-Gehalt steigt und erhöhte mRNA-Spiegel von Genen, die in der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind, gemessen werden können (Tedesco *et al.*, 2008). Hochkalorisch-gefütterte-Wildtypmäuse (*HFD*) zeigten in der Studie eine reduzierte mitochondriale Biogenese. Im Gegensatz dazu normalisierten sich bei *CB1*-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen, ebenso wie nach einer chronischen Rimonabantbehandlung, die Parameter wie in Wildtypmäusen unter *standard chow diet*. Die behandelten Tiere waren vor einer *HFD* induzierten Fettakkumulation geschützt (Tedesco *et al.*, 2008). Auch bei den hier untersuchten *CB1*-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen

erhöhten sich die Expressionslevel von drei wichtigen Markern der mitochondrialen Biogenese (*pgc-1 $\alpha$* , *nrf1*, *tfam*). Tedesco *et al.* differenzieren allerdings nicht zwischen den Fettgewebsdepots, sondern sprechen von weißem Fettgewebe generell. Unsere Ergebnisse belegen auch eine gesteigerte Aktivierung der mitochondrialen Biogenese, vor allem im subkutanen Fettgewebe.

Mit den neuen Erkenntnissen der CB1-Rezeptormodulation lässt sich an die Ergebnisse der Endocannabinoidforschung der siebziger Jahre anknüpfen. Damals wurden durch die Stimulation des Rezeptors folgende Effekte erzielt: Cannabinoide oder auch  $\Delta$  9-Tetrahydrocannabinol hemmten die Atmungskettenenzyme im Gehirn, in der Leber, Skelettmuskel und Herz und senkten bei Säugetieren den Sauerstoffverbrauch (Chiu *et al.*, 1975; Pertwee und Tavendale, 1977). Die durch Blockade ausgelösten unterschiedlichen Effekte bekräftigen die Hypothese, dass eine CB1-Rezeptormodulation zum gegenteiligen Effekt führt und die mitochondriale Biogenese ankurbelt.

Ähnlich den hier gezeigten depotspezifischen Unterschieden in der Transdifferenzierung beschreibt die Literatur eine solche Wirkung auch durch Thiazolidindione (Laplane *et al.*, 2006).

Die Frage, ob die experimentell gefundenen Erkenntnisse zur Transdifferenzierung und zu depotspezifischen Unterschieden die Wirkweise von Rimonabant erklären können, muss noch unbeantwortet bleiben. Allerdings spricht viel dafür, dass die metabolisch positiven Effekte der klinischen Studien durch unsere experimentell gewonnenen Erkenntnisse plausibel erläutert werden können.

Es scheint also ein vielversprechender Mechanismus, den Prozess der Transdifferenzierung therapeutisch bei der Behandlung der Adipositas zu nutzen. Vernochet *et al.* regen deshalb an, therapeutische Strategien zu entwickeln, die einerseits den braunen Fettgewebsphänotyp in weißen Adipozyten vermehren, andererseits die Sekretion stressabhängiger Zytokine vom viszeralen Fett reduzieren (Vernochet *et al.*, 2009). Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre die periphere und somit selektive CB1-Rezeptormodulation im Fettgewebe.

Man muss jedoch bei allen erhobenen Daten die Differenzierungsunterschiede berücksichtigen - bei der Auswertung depotspezifischer Unterschiede und vor allem bei den Expressionen verschiedener Marker auf RNA-Ebene. Natürlich produziert eine

Fettzelle, die besser differenziert, höhere Mengen an Differenzierungsmarkern und Adipozytokinen. Aber die starken Effekte und die spezifischen braunen Fettgewebismarker weisen trotzdem auf eine Transdifferenzierung hin, unabhängig vom Differenzierungsvorteil. Die Differenzierungsunterschiede der Transdifferenzierung spielen keine Rolle, weil sowohl die *FACS*-Analysen als auch die Messung des Sauerstoffverbrauches immer auf die jeweilige Zellzahl bezogen wurde. Außerdem waren die Effekte häufig auch schon vor Differenzierungsinduktion (am Tag 0 während der Adipogenese) signifikant messbar, als es noch kein Differenzierungsunterschied gab. Dieses Erkenntnis wird durch ähnliche Effekte bestätigt, die in *siRNA* bzw. *shRNA* transfizierten Zellen gezeigt werden konnten. Wobei die *siRNA* transfizierten Zellen zu gleiche Daten führten, obwohl in den Zellen morphologisch und densitometrisch kein Differenzierungsvorteil nachgewiesen werden konnte.

Im Großen und Ganzen stehen die hier erhobenen Daten im Einklang mit den Ergebnissen aus der Literatur. Durch eine CB1-Rezeptorherunterregulation kam es auch bei unseren Versuchen zu einer Transdifferenzierung von weißen inguinalen Adipozyten zu einem mitochondrienreichen, thermogenetisch aktiven braunen Fettzellphänotyp. Hinzu kamen jedoch auch einige neue Erkenntnisse. Eines der wichtigsten Ergebnisse ist, dass es nach CB1-Rezeptor-*Knockout* zu depotspezifischen Effekten im Fettgewebe kommt. Diese neuen Daten stehen ebenfalls nicht im Widerspruch zur Literatur. Durch Blockierungen anderer Rezeptoren konnte bereits gezeigt werden, dass es zu depotspezifischen und somit verschiedenen Effekten im subkutanen und viszeralen Fettgewebe kommt. Unsere Ergebnisse stimmen auch überein mit den erhobenen Daten aus klinischen Studien (*RIO*-Studien) und die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich somit sogar teilweise von *in-vitro* auf *in-vivo* übertragen. Ein Anstieg der Thermogenese und eine verbesserte Insulinsensitivität zeigen einen peripheren Mechanismus auf, der einen erfolgreichen Gewichtsverlust und eine verbesserte Glukosehomeostase bei Rimonabant behandelten Patienten induzieren könnte. So konnten wir sogar mögliche Erklärungen liefern für die positiven metabolischen Effekte, die nach medikamentöser Rimonabantbehandlung entstehen. Folglich ist eine medikamentöse und periphere CB1-Rezeptormodulation weiterhin ein erfolgreiches Konzept der Zukunft, um Adipositas und Adipositas-assoziierte metabolische Dysfunktionen zu behandeln.

#### 4.4. Erkenntnisse

Nach Auswertung und Analyse der Versuchsreihen können die beiden zentralen Fragestellungen beantwortet werden:

**1. Kommt es zu peripheren metabolischen und endokrinen Veränderungen der Fettzellfunktionen während einer CB1-Rezeptorherunterregulation?**

Mit den experimentell gewonnenen Daten konnte bewiesen werden, dass eine Blockade des CB1-Rezeptors im Fettgewebe peripher zu einigen direkten und positiven Effekten führt. Die wichtigste Veränderung der Fettzellfunktion ist die Transdifferenzierung von einem inguinalen, weißen Adipozyten zu einem braunen, energieverbrauchenden Fettzellphänotyp. Es gelang, signifikante Daten zur *pgc-1 $\alpha$*  und *ucp-1* Expression, zur Mitochondrienanzahl, zur Expression mitochondrialer Marker sowie gesteigertem Sauerstoffverbrauch zu erheben.

**2. Kommt es zu depotspezifischen Unterschieden im Fettgewebe nach einem CB1-Rezeptor-Knockout?**

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass es zu depotspezifischen Unterschieden im Fettgewebe kommt. Der Funktionsverlust des CB1-Rezeptors führt zu einem Differenzierungsdefizit im viszeralen Fettgewebe und somit können die negativen metabolischen und kardiovaskulären Effekte des viszeralen Fettgewebes reduziert werden. Außerdem wurde belegt, dass das inguinale und metabolisch deutlich günstigere Fettdepot einen Differenzierungsvorteil hat. Damit ist die Fähigkeit verbunden, in einen braunen Fettzellphänotyp differenzieren zu können.

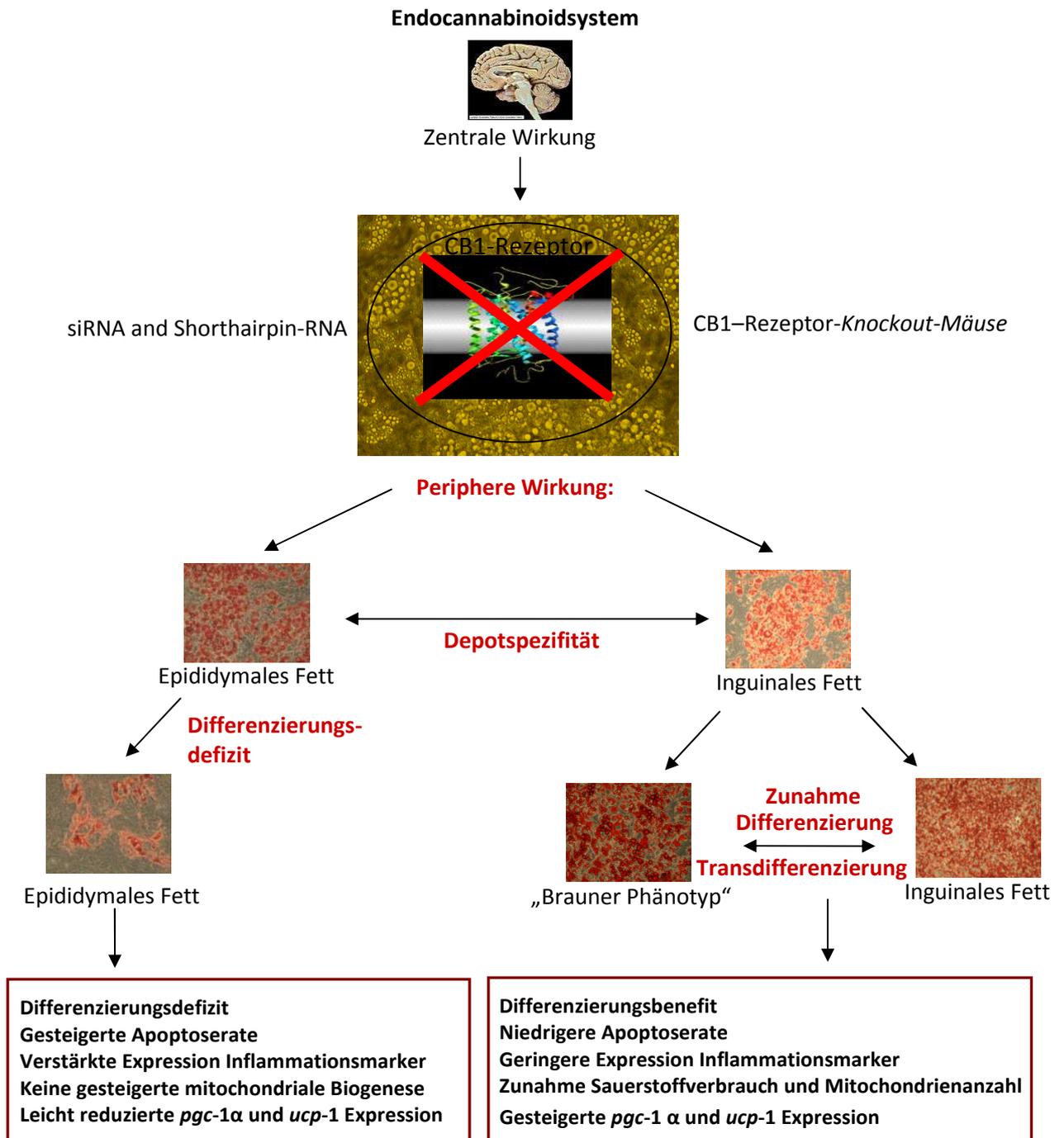


Abbildung 36: **Darstellung peripherer und depotspezifischer Effekte nach CB1-Rezeptor-Knockout:** Die roten Graphikunterschriften beschreiben den Erkenntnisgewinn der Experimente. Es kommt zu einem Differenzierungsdefizit des viszeralen Fettgewebes mit einer gesteigerten Apoptoserate und einer höheren Expression der Inflammationsmarker. Das inguinale Fettgewebe zeigt ein Differenzierungsbefit und kann zu einem braunen Fettzellphänotyp transdifferenzieren. Eine gesteigerte *pgc-1α* und *ucp1*-Expression, eine Zunahme der mitochondrialen Biogenese und des Sauerstoffverbrauches waren messbar.

#### 4.5. Ausblick

Bisher wurde angenommen, dass der CB1-Rezeptorblocker Rimonabant über zentrale und über periphere Mechanismen wirkt. Offen blieb bisher, wie die peripheren Effekte im Fettgewebe zustande kommen. Die erhobenen Daten tragen dazu bei, diese Lücke zu schließen. Sie zeigen, dass eine Blockade des CB1-Rezeptors auch im peripheren Fettgewebe positive Effekte erzielt. Die Transdifferenzierung von weißen inguinalen Adipozyten in einen braunen Fettzellphänotyp birgt ein therapeutisches Potential für die Behandlung von Adipositas und für das metabolische Syndrom mit seinen kardiovaskulären Komplikationen.

Ein peripherer therapeutischer Ansatz wäre von großem Nutzen, um die unerwünschten Begleiterscheinungen zu reduzieren. Um Nebenwirkungen zu vermeiden, müssten zunächst spezifische Oberflächenmarker oder andere Eigenschaften der Fettzelle gefunden werden, die direkt im Fettgewebe wirken, ohne dass andere Gewebe mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen in Mitleidenschaft gezogen werden. Deshalb konzentriert sich die aktuelle Forschung darauf Stoffe zu entwickeln, die nicht die Blut-Hirn-Schranke penetrieren und nur periphere antagonistische Wirkungen hervorrufen. Dazu gehören allosterische Modulatoren des CB1-Rezeptors und neutrale Antagonisten für den CB1-Rezeptor (Lee *et al.*, 2009). Das kann nur gelingen, wenn die Forschung die Rolle von selektiven und peripheren CB1-Rezeptorantagonisten besser als bisher entschlüsselt, um Patienten mit einem hohen kardiometabolischen Risikoprofil erfolgreich zu behandeln.

Möglicherweise könnte man in ferner Zukunft sogar spezifische *siRNA* gegen den CB1-Rezeptor im peripheren Fettgewebe einschleusen, um auf diesem Wege die metabolisch positive Wirkung der CB1-Rezeptormodulation therapeutisch zu nutzen.

Durch die Entwicklung eines spezifischen CB1-Rezeptorblockers im Fettgewebe könnten also diverse positive Effekte genutzt werden, um medikamentöse Ansatzpunkte gegen Adipositas und das metabolische Syndrom zu entwickeln, ohne psychiatrische Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen.

## 5. Zusammenfassung

Adipositas ist inzwischen zum globalen Gesundheitsproblem geworden. Neben der bariatrischen Chirurgie gibt es bisher nur wenige medikamentöse Therapieansätze gegen Adipositas und assoziierte Erkrankungen. Ein Medikament ist Rimonabant, ein CB1-Rezeptorblocker. Rimonabant führt zur Gewichtsreduktion und beeinflusst positiv das kardiovaskuläre Risikoprofil. Zentrale Mechanismen der Endocannabinoidwirkung sind bereits relativ gut entschlüsselt. Unklar war bisher, durch welche peripheren Effekte die positiven metabolischen Eigenschaften und der Gewichtsverlust erreicht werden können. Hier konnte die Arbeit neue wesentliche Erkenntnisse bringen.

Es wurde erstmals gezeigt, dass eine Blockade des CB1-Rezeptors auch peripher im Fettgewebe zu metabolisch günstigen Effekten führt. Dies gelang durch drei unterschiedliche Methoden der CB1-Rezeptormodulation: der *siRNA*-Transfektion, der *Shorthairpin*-Transfektion und der Generierung neuer CB1-Rezeptor-*Knockout*-Linien.

Die wichtigste Veränderung der Fettzellfunktion ist die Transdifferenzierung von einem inguinalen weißen Adipozyten zu einem braunen energieverbrauchenden Fettzellphänotyp. Es kam zum Anstieg der *pgc-1 $\alpha$*  und *ucp-1* Expression. Eine erhöhte Mitochondrienanzahl, eine Zunahme der Expression mitochondrialer Marker und ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch konnten gemessen werden. Durch die Erstellung neuer Fettzelllinien war es außerdem möglich, depotspezifische Unterschiede nach CB1-Rezeptor-*Knockout* zu analysieren. So führte eine CB1-Rezeptormodulation zu einem Differenzierungsdefizit des viszeralen Fettgewebes und einer Induktion der Apoptose. Negative metabolische und kardiovaskuläre Effekte des viszeralen Fettes könnten dadurch reduziert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust des CB1-Rezeptors zu einem Differenzierungsvorteil des inguinalen und metabolisch deutlich günstigeren Fettdepots führt und es ebenfalls zu einer Induktion der mitochondrialen Biogenese und Thermogenese kommt.

Durch die Entwicklung eines selektiven CB1-Rezeptorblockers im peripheren Fettgewebe entsteht therapeutisch die Chance, schwerwiegende zentrale Nebenwirkungen zu vermeiden und diverse metabolisch positive Effekte zu erzielen. Die Ergebnisse der Arbeit schaffen damit eine Grundlage für die pharmakologische Weiterentwicklung einer peripheren und selektiven CB1-Rezeptormodulation im Fettgewebe, um die Adipositas und das metabolische Syndrom auch medikamentös erfolgreich behandeln zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB:** Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733 (2001).
2. **Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK, O'Rahilly S:** Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100:3149-3153 (1997).
3. **Alkhalaf K, Alavi A:** Quantitative assessment of FDG uptake in brown fat using standardized uptake value and dual-time-point scanning. *Clin Nucl Med* 33:663-667 (2008).
4. **Ambati S, Yang JY, Rayalam S, Park HJ, Della-Fera MA, Baile CA:** Ajoene exerts potent effects in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting adipogenesis and inducing apoptosis. *Phytother Res* 23:513-518 (2009).
5. **Bachman ES, Dhillon H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB:** betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297:843-845 (2002).
6. **Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV:** Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 10:89-97 (1995).
7. **Bennetzen MF:** Investigations of the endocannabinoid system in adipose tissue: effects of obesity/ weight loss and treatment options. *Dan Med Bull* 58:B4269 (2011).
8. **Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrie P:** The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63:908-914 (2003).
9. **Bertolani C, Marra F:** Role of adipocytokines in hepatic fibrosis. *Curr Pharm Des* 16:1929-1940 (2010).
10. **Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P:** Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 214:173-180 (1993).
11. **Cannon B, Nedergaard J:** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359 (2004).
12. **Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S:** FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 106:563-573 (2001).
13. **Chiu P, Karler R, Craven C, Olsen DM, Turkanis SA:** The influence of delta9-tetrahydrocannabinol, cannabimol and cannabidiol on tissue oxygen consumption. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 12:267-286 (1975).
14. **Chon JW, Sung JH, Hwang EJ, Park YK:** Chlorella methanol extract reduces lipid accumulation in and increases the number of apoptotic 3T3-L1 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1171:183-189 (2009).
15. **Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U:** Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:289-301 (2003a).
16. **Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U:** The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423-431 (2003b).

17. **Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH:** Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9371-9376 (2001).
18. **Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB:** Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87 (1996).
19. **Cypess AM, Kahn CR:** The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis. *Curr Opin Pediatr* 22:478-484 (2010).
20. **Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR:** Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509-1517 (2009).
21. **DAG:** Homepage der Deutschen Adipositas Gesellschaft: Kosten der Adipositas in Deutschland. [www.adipositas-gesellschaft.de](http://www.adipositas-gesellschaft.de) (2009).
22. **DeMarco VG, Johnson MS, Whaley-Connell AT, Sowers JR:** Cytokine abnormalities in the etiology of the cardiometabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 12:93-98 (2010).
23. **Despres JP, Golay A, Sjostrom L:** Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 353:2121-2134 (2005).
24. **Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC:** Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613 (1988).
25. **Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R:** Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949 (1992).
26. **Dinh TP, Freund TF, Piomelli D:** A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121:149-158 (2002).
27. **Du K, Chai Y, Hou L, Chang W, Chen S, Luo W, Cai T, Zhang X, Chen N, Chen Y, Chen J:** Over-expression and siRNA of a novel environmental lipopolysaccharide-responding gene on the cell cycle of the human hepatoma-derived cell line HepG2. *Toxicology* 243:303-310 (2008).
28. **Echeverri CJ, Perrimon N:** High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet* 7:373-384 (2006).
29. **Engeli S:** Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:110-115 (2008).
30. **Festuccia WT, Blanchard PG, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, Deshaies Y:** Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J Lipid Res* 50:1185-1194 (2009).
31. **Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA:** The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-847 (2001).
32. **Gaoni Y, Mechoulam R:** The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc* 93:217-224 (1971).
33. **Garcia CA, Van Nostrand D, Atkins F, Acio E, Butler C, Esposito G, Kulkarni K, Majd M:** Reduction of brown fat 2-deoxy-(F-18)fluoro-D-glucose uptake by controlling environmental temperature prior to positron emission tomography scan. *Mol Imaging Biol.* Jan;8 (1):24-29 (2006).
34. **Gary-Bobo M, Elachouri G, Scatton B, Le Fur G, Oury-Donat F, Bensaid M:** The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol* 69:471-478 (2006).
35. **Giordano A, Centemeri C, Zingaretti MC, Cinti S:** Sibutramine-dependent brown fat activation in rats: an immunohistochemical study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:354-360 (2002).

36. **Giugliano G, Nicoletti G, Grella E, Giugliano F, Esposito K, Scuderi N, D'Andrea F:** Effect of liposuction on insulin resistance and vascular inflammatory markers in obese women. *Br J Plast Surg* 57:190-194 (2004).
37. **Guerre-Millo M:** Extending the glucose/fatty acid cycle: a glucose/adipose tissue cycle. *Biochem Soc Trans* 31:1161-1164 (2003).
38. **Hajer GR, van Haefen TW, Visseren FL:** Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29:2959-2971 (2008).
39. **Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K:** The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets* 13:235-246 (2009).
40. **Hamm JK, el Jack AK, Pilch PF, Farmer SR:** Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci* 892:134-145 (1999).
41. **Haney M, Rabkin J, Gunderson E, Foltin RW:** Dronabinol and marijuana in HIV(+) marijuana smokers: acute effects on caloric intake and mood. *Psychopharmacology (Berl)* 181:170-178 (2005).
42. **Hansen JB, Kristiansen K:** Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 398:153-168 (2006).
43. **Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK:** Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29:1393-1398 (2002).
44. **Hashimoto T, Igarashi J, Kosaka H:** Sphingosine kinase is induced in mouse 3T3-L1 cells and promotes adipogenesis. *J Lipid Res* 50:602-610 (2009).
45. **Howlett AC:** The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:619-631 (2002).
46. **Huffman DM, Barzilai N:** Contribution of adipose tissue to health span and longevity. *Interdiscip Top Gerontol* 37:1-19 (2010).
47. **Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV, Leonetti F:** Prevalence of uncomplicated obesity in an Italian obese population. *Obes Res* 13:1116-1122 (2005).
48. **IASO:** International Association for the Study of Obesity. *Homepage: Clinically relevant epidemiology (2007)* [www.iaso.org](http://www.iaso.org):(2007).
49. **IDF:** IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. [www.idf.org/metabolic-syndrome](http://www.idf.org/metabolic-syndrome) (2011).
50. **Jensen MD:** Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93:S57-63 (2008).
51. **Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP:** Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7569-7574 (2003).
52. **Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Verges B, Degrace P:** CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 59:926-934 (2010).
53. **Kang JG PC, Ihm SH, Yoo HJ, Park H, Rhee EJ, Won JC, Lee WY, Oh KW, Park SW, Kim SW:** Mechanisms of adipose tissue redistribution with rosiglitazone treatment, in various adipose depots. *Metabolism*. 59(51):46-53 (2010).
54. **Kassi E, Dalamaga M, Hroussalas G, Kazanis K, Merantzi G, Zachari A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Dionyssiou-Asteriou A:** Adipocyte factors, high-sensitive C-reactive protein levels and lipoxidative stress products in overweight postmenopausal women with normal and impaired OGTT. *Maturitas* 67:72-77 (2010).
55. **Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME:** Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:288-293 (1999).
56. **Kilroy G, Burk DH, Floyd ZE:** High efficiency lipid-based siRNA transfection of adipocytes in suspension. *PLoS One* 4:e6940 (2009).

57. **Kirkham TC:** Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. *Behav Pharmacol* 16:297-313 (2005).
58. **Kirkham TC, Williams CM:** Endocannabinoid receptor antagonists: potential for obesity treatment. *Treat Endocrinol* 3:345-360 (2004).
59. **Klein J, Fasshauer M, Klein HH, Benito M, Kahn CR:** Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays* 24:382-388 (2002).
60. **Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, Mohammed BS:** Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:2549-2557 (2004).
61. **Kloting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schon MR, Kern M, Stumvoll M, Bluher M:** Insulin sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2010).
62. **Korenkov M, Sauerland S:** Clinical update: bariatric surgery. *Lancet* 370:1988-1990 (2007).
63. **Kuk JL, Katzmarzyk PT, Nichaman MZ, Church TS, Blair SN, Ross R:** Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obesity (Silver Spring)* 14:336-341 (2006).
64. **Langin D:** Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: Strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* 1801:372-376 (2010).
65. **Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gelinas Y, Lalonde J, Berger JP, Deshaies Y:** Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action on adipose tissue metabolism. *Diabetes* 55:2771-2778 (2006).
66. **Larrouy D, Vidal H, Andreelli F, Laville M, Langin D:** Cloning and mRNA tissue distribution of human PPARgamma coactivator-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1327-1332 (1999).
67. **Lee HK, Choi EB, Pak CS:** The current status and future perspectives of studies of cannabinoid receptor 1 antagonists as anti-obesity agents. *Curr Top Med Chem* 9:482-503 (2009).
68. **Liao W, Nguyen MT, Imamura T, Singer O, Verma IM, Olefsky JM:** Lentiviral short hairpin ribonucleic acid-mediated knockdown of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 147:2245-2252 (2006).
69. **Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ:** Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 29:183-187 (2005).
70. **Matias I, Di Marzo V:** Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 18:27-37 (2007).
71. **Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI:** Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564 (1990).
72. **Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al.:** Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90 (1995).
73. **Mechoulam R, Gaoni Y:** Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21:1223-1229 (1965).
74. **Mendizabal VE, Adler-Graschinsky E:** Cannabinoid system as a potential target for drug development in the treatment of cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 1:301-313 (2003).
75. **Muoio DM, Newgard CB:** Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 75:367-401 (2006).
76. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B:** Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444-452 (2007).
77. **Niesler CU, Siddle K, Prins JB:** Human preadipocytes display a depot-specific susceptibility to apoptosis. *Diabetes* 47:1365-1368 (1998).

78. **O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin, II, Jobe BA, Roberts CT, Jr., Slifka MK, Marks DL:** Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 33:978-990 (2009).
79. **Pagano C, Rossato M, Vettor R:** Endocannabinoids, adipose tissue and lipid metabolism. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:124-129 (2008).
80. **Pagotto U, Vicennati V, Pasquali R:** The endocannabinoid system and the treatment of obesity. *Ann Med* 37:270-275 (2005).
81. **Park HJ, Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Yang JY, Baile CA:** Withaferin A induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biofactors* 33:137-148 (2008).
82. **Pertwee RG, Tavendale R:** Effects of delta9-tetrahydrocannabinol on the rates of oxygen consumption of mice. *Br J Pharmacol* 60:559-568 (1977).
83. **Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Buning J, Drenckhan M, Zarse K, Ristow M, Lilienthal W, Lehnert H, Klein J:** Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes Metab* 12:158-166 (2010).
84. **Petrovic N WT, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J:** Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP-1 containing adipocytes molecularly distinct from classical brown adipocytes. *J Bio Chem.* 285(210):7153-7164 (2010).
85. **Pfaffl MW, Horgan GW, 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).
86. **Pi-Sunyer FX:** The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. *Clin Cornerstone* 8 Suppl 4:S14-23 (2006).
87. **Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS:** Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89:447-452 (2004).
88. **Plasse TF:** Clinical use of dronabinol. *J Clin Oncol* 9:2079-2080 (1991).
89. **Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnell CJ, Fox CS:** Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care* 32:1068-1075 (2009).
90. **Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF, Jr., Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS:** Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 116:1234-1241 (2007).
91. **Powelka AM, Seth A, Virbasius JV, Kiskinis E, Nicoloso SM, Guilherme A, Tang X, Straubhaar J, Cherniack AD, Parker MG, Czech MP:** Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J Clin Invest* 116:125-136 (2006).
92. **Puri V, Chakladar A, Virbasius JV, Konda S, Powelka AM, Chouinard M, Hagan GN, Perugini R, Czech MP:** RNAi-based gene silencing in primary mouse and human adipose tissues. *J Lipid Res* 48:465-471 (2007).
93. **Qiu J, Gao CL, Zhang M, Chen RH, Chi X, Liu F, Zhang CM, Ji CB, Chen XH, Zhao YP, Li XN, Tong ML, Ni YH, Guo XR:** LYRM1, a novel gene promotes proliferation and inhibits apoptosis of preadipocytes. *Eur J Endocrinol* 160:177-184 (2009).
94. **Quinn J:** Not-so little Britain. *BBC News Online Magazine* [http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/2//hi/uk\\_news/magazine/3616904.stm](http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/2//hi/uk_news/magazine/3616904.stm) (2004).
95. **Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P:** CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:640-648 (2004).
96. **Rayalam S, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Baile CA:** Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 22:1367-1371 (2008).

97. **Rice SP, Zhang L, Grennan-Jones F, Agarwal N, Lewis MD, Rees DA, Ludgate M:** Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment in vitro inhibits adipogenesis in human omental but not subcutaneous adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 320:51-57 (2010).
98. **Rinaldi-Carmona M, Barth F, Congy C, Martinez S, Oustric D, Perio A, Poncelet M, Maruani J, Arnone M, Finance O, Soubrie P, Le Fur G:** SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 310:905-914 (2004).
99. **Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jager S, Handschin C, Spiegelman BM:** A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7933-7938 (2007).
100. **Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperi GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA:** Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem* 284:36213-36222 (2009).
101. **Rosenson RS:** Role of the endocannabinoid system in abdominal obesity and the implications for cardiovascular risk. *Cardiology* 114:212-225 (2009).
102. **Roth CL, Kratz M, Ralston MM, Reinehr T:** Changes in adipose-derived inflammatory cytokines and chemokines after successful lifestyle intervention in obese children. *Metabolism* (2010).
103. **Scheen AJ, Van Gaal LG, Despres JP, Pi-Sunyer X, Golay A, Hanotin C:** [Rimonabant improves cardiometabolic risk profile in obese or overweight subjects: overview of RIO studies]. *Rev Med Suisse* 2:1916-1923 (2006).
104. **Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM:** Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. *Genes Dev* 23:788-797 (2009).
105. **Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM:** Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6:38-54 (2007).
106. **Sewter CP, Blows F, Vidal-Puig A, O'Rahilly S:** Regional differences in the response of human pre-adipocytes to PPARgamma and RXRalpha agonists. *Diabetes* 51:718-723 (2002).
107. **Sharma AM:** Is there a rationale for angiotensin blockade in the management of obesity hypertension? *Hypertension* 44:12-19 (2004).
108. **Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q:** SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280:13560-13567 (2005).
109. **Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, Lystig T, Sullivan M, Bouchard C, Carlsson B, Bengtsson C, Dahlgren S, Gummesson A, Jacobson P, Karlsson J, Lindroos AK, Lonroth H, Naslund I, Olbers T, Stenlof K, Torgerson J, Agren G, Carlsson LM:** Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 357:741-752 (2007).
110. **Snijder MB, Visser M, Dekker JM, Goodpaster BH, Harris TB, Kritchevsky SB, De Rekeneire N, Kanaya AM, Newman AB, Tylavsky FA, Seidell JC:** Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study. *Diabetologia* 48:301-308 (2005).
111. **Sonoda J, Mehl IR, Chong LW, Nofsinger RR, Evans RM:** PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5223-5228 (2007).
112. **Spiegelman BM, Flier JS:** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543 (2001).
113. **Stefl B, Janovska A, Hodny Z, Rossmeisl M, Horakova M, Syrový I, Bemova J, Bendlova B, Kopecky J:** Brown fat is essential for cold-induced thermogenesis but not for obesity resistance in aP2-Ucp mice. *Am J Physiol* 274:E527-533 (1998).

114. **Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K:** 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97 (1995).
115. **Tatsumi M, Engles JM, Ishimori T, Nicely O, Cohade C, Wahl RL:** Intense (18)F-FDG uptake in brown fat can be reduced pharmacologically. *J Nucl Med* 45:1189-1193 (2004).
116. **Tedesco L, Valerio A, Cervino C, Cardile A, Pagano C, Vettor R, Pasquali R, Carruba MO, Marsicano G, Lutz B, Pagotto U, Nisoli E:** Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes* 57:2028-2036 (2008).
117. **Tiraby C, Langin D:** Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 14:439-441 (2003).
118. **Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D:** Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278:33370-33376 (2003).
119. **Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR:** Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7:410-420 (2008).
120. **Trayhurn P, Bing C, Wood IS:** Adipose tissue and adipokines--energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 136:1935S-1939S (2006).
121. **Tsukiyama-Kohara K, Poulin F, Kohara M, DeMaria CT, Cheng A, Wu Z, Gingras AC, Katsume A, Elchebly M, Spiegelman BM, Harper ME, Tremblay ML, Sonenberg N:** Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat Med* 7:1128-1132 (2001).
122. **Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S:** Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365:1389-1397 (2005).
123. **Vernochet C, Peres SB, Davis KE, McDonald ME, Qiang L, Wang H, Scherer PE, Farmer SR:** C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol Cell Biol* 29:4714-4728 (2009).
124. **Verspohl EJ WF:** Größtes endokrines Organ des Körpers. *Pharmazeutische Zeitung* 29:1-6 (2006).
125. **Volicer L:** Hospice care for dementia patients. *J Am Geriatr Soc* 45:1147-1149 (1997).
126. **Wajchenberg BL:** Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697-738 (2000).
127. **Weber WA:** Brown adipose tissue and nuclear medicine imaging. *J Nucl Med* 45:1101-1103 (2004).
128. **Welsh GI, Leney SE, Lloyd-Lewis B, Wherlock M, Lindsay AJ, McCaffrey MW, Tavare JM:** Rip11 is a Rab11- and AS160-RabGAP-binding protein required for insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *J Cell Sci* 120:4197-4208 (2007).
129. **Weyer C, Gautier JF, Danforth E, Jr.:** Development of beta 3-adrenoceptor agonists for the treatment of obesity and diabetes--an update. *Diabetes Metab* 25:11-21 (1999).
130. **WHO:** Obesity and overweight--key facts. [www.who.int/entity/mediacentre/factsheets](http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets) Fact sheet N°311:(2008).
131. **WHO:** The World Health Organization warns of the rising threat of heart disease and stroke as overweight and obesity rapidly increases. *Media Centre WHO* <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005> (2005).
132. **WHO:** World Health Organization: Integrated management of cardiovascular risk. Report of a WHO meeting 2002, July 9-12, Geneva. (2002).
133. **Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloso S, Czech M, Corvera S:** Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol* 23:1085-1094 (2003).

134. **Xu A, Yin S, Wong L, Chan KW, Lam KS:** Adiponectin ameliorates dyslipidemia induced by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir in mice. *Endocrinology* 145:487-494 (2004).
135. **Xu L, Spinass GA, Niessen M:** ER stress in adipocytes inhibits insulin signaling, represses lipolysis, and alters the secretion of adipokines without inhibiting glucose transport. *Horm Metab Res* 42:643-651 (2010).
136. **Yang JY, Della-Fera MA, Baile CA:** Guggulsterone inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring)* 16:16-22 (2008).
137. **Yeung HW, Grewal RK, Gonen M, Schoder H, Larson SM:** Patterns of (18)F-FDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET. *J Nucl Med* 44:1789-1796 (2003).
138. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM:** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432 (1994).
139. **Zhuo Q, Wang ZQ, Fu P, Piao JH, Tian Y, Xu J, Yang XG:** Association between adiponectin and metabolic syndrome in older adults from major cities of China. *Biomed Environ Sci* 23:53-61 (2010).

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| µl              | Microliter  |
| µM              | Micromolar  |
| 2-AG            | 2-Arachidonyl-Glycerol                                    |
| AMPK            | AMP-aktivierte Proteinkinase                              |
| AP 2            | <i>Adipocyte protein 2</i>                                |
| Anandamid       | Arachidonethanolamid                                      |
| ATP             | Adenosintriphosphat                                       |
| AT-1            | Angiotensin-Rezeptorblocker                               |
| BAT             | <i>Brown adipose tissue</i>                               |
| BMI             | <i>Body Mass Index</i>                                    |
| BMP             | <i>Bone morphogeneic protein</i>                          |
| BSA             | Rinderserumalbumin  |
| °C              | Grad Celsius, Temperatureinheit                           |
| CB1-R <i>KO</i> | Cannabinoidrezeptor 1 <i>Knockout</i> Mäuse               |
| CB1/CB2         | Cannabinoidrezeptor 1 /2                                  |
| cDNA            | Komplementäre Desoxiribonucleinsäure                      |
| C/EBP α         | CCCAAT /enhancer binding protein alpha                    |
| CNR 1/2         | Cannabinoidrezeptor 1/2                                   |
| Cpm             | <i>Counts per minute</i>                                  |
| CT              | Computertomographie                                       |
| DMEM            | <i>Dulbecco's Eagle Modified Medium</i>                   |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid  |
| DNA             | Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäuren)          |
| DTT             | Dithiothreitol  |
| EDTA            | Ethylendiamin-Tetraessigsäure                             |
| ELISA           | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>                  |
| EMEA            | <i>European Medical Agency</i>                            |
| <i>EPI</i>      | Epididymal  |
| ETOH            | Ethanol   |
| FAAH            | <i>Fatty acid amide hydrolase</i>                         |
| FBS             | Fetales Bovines Serum                                     |
| FACS            | <i>Fluorescence activated cell sorting</i>                |
| FDA             | <i>Food and Drug Administration</i>                       |
| FDG             | 18F-FluordesoxyGlukose                                    |
| g               | Gram  |
| <i>Glut 4</i>   | Glukosetransporter 4                                      |
| HDL             | <i>High density lipoprotein</i>                           |
| HEPES           | Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure                    |
| HFD             | <i>High fat diet</i>                                      |
| HIV             | <i>Human immunodeficiency virus</i>                       |
| HSP-10          | Hitzeschockprotein 10                                     |
| IASO            | <i>International Association for the Study of obesity</i> |
| IBMX            | Isobutylmethylxanthin                                     |

|                |   |
|----------------|---|
| IGF-1          | <i>Insulin like growth factor</i>                                     |
| ING            | Inguinal  |
| <i>Il-6</i>    | Interleukin 6   |
| IRS-1          | <i>Insulin receptor substrate</i>                                     |
| KCL            | Kaliumchlorid   |
| kDA            | Kilo Dalton   |
| kg             | Kilogramm   |
| KO             | <i>Knockout</i>   |
| KO Epi         | Epididymale <i>Knockout</i> -Zellen                                   |
| KO Ing         | Inguinale <i>Knockout</i> -Zellen                                     |
| l              | Liter   |
| LDL            | <i>Low density lipoprotein</i>  |
| M              | Molar   |
| MAP-Kinase     | <i>Mitogen activated proteinkinase</i>                                |
| <i>Mcp-1</i>   | <i>Macrophages monocyten chemoattractant protein 1</i>                |
| mg             | Milligramm  |
| min            | Minute  |
| ml             | Milliliter  |
| mm             | Millimeter  |
| mM             | Millimolar  |
| mRNA           | Messenger Ribonucleinsäure  |
| NaCl           | Natriumchlorid  |
| NCBI           | <i>National Center For Biotechnology</i>                              |
| nm             | Nanometer   |
| <i>Nrf-1</i>   | <i>Nuclear respiratory factor 1</i>                                   |
| O <sub>2</sub> | Sauerstoff  |
| PAGE           | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                       |
| PAI-I          | Plasminogen activator-Inhibitor                                       |
| PBS            | Phosphat-Buffered- Saline   |
| PEN            | Penicillin  |
| PET            | Positronen Emission   |
| <i>Pgc-1 α</i> | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1</i> |
| <i>Pparγ</i>   | <i>Peroxisomen proliferator activator receptor gamma</i>              |
| PMSF           | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| POD            | Peroxidase  |
| <i>Prdm 16</i> | PR domain containing protein  |
| <i>Pref-1</i>  | Preadipocyte factor 1   |
| PVDF Membran   | Polyvinylidenfluorid Membran  |
| RAAS           | Renin Angiotensin Aldosteron System                                   |
| RAS            | Renin-Angiotensin System  |
| RIO            | Rimonabant in obesity studies   |
| RISC           | <i>RNA induced silencing complex</i>                                  |
| RNA            | Ribonucleid Acid (Ribonucleinsäure)                                   |
| RNAi           | RNA-Interferenz   |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Rpm                            | Umdrehungen pro Minute                    |
| RT                             | Raumtemperatur                            |
| RT-PCR                         | <i>Realtime polymerase chain reaction</i> |
| SDS                            | Sodium Dodecyl Sulfat                     |
| <i>shRNA</i>                   | <i>Shorthairpin RNA</i>                   |
| <i>siRNA</i>                   | <i>Small interfering RNA</i>              |
| SR 141716                      | Rimonabant                                |
| SRC-1                          | Steroid receptor coactivator 1            |
| Strep                          | Streptomycin                              |
| SV 40                          | <i>Simian vacuolating Virus 40</i>        |
| T <sub>3</sub>                 | Thyroxin                                  |
| TEMED                          | Tetramethylethylendiamin                  |
| <i>Tfam</i>                    | Transcription factor 4                    |
| THC                            | Tetrahydrocannabinol                      |
| <i>Tnf-<math>\alpha</math></i> | Tumor Nekrosefaktor alpha                 |
| Tris                           | Trishydroxymethylaminomethan              |
| U                              | <i>Unit</i>                               |
| <i>Ucp-1</i>                   | <i>Uncoupling protein 1</i>               |
| V                              | Volt                                      |
| WAT                            | <i>White adipose tissue</i>               |
| WHO                            | <i>World Health Organisation</i>          |
| ZNS                            | Zentrales Nervensystem                    |

## 8. Danksagung

*„Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken“*

*Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832), Dichter*

## 9. Lebenslauf

**Name:** Isabel Viola Wagner

**Geburtsdatum:** 22.04.1983

**Geburtsort:** Hamburg

**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

**Schulabschluss:** Abitur am Gymnasium Eppendorf, 2002

**Studium:** Humanmedizin an der Universität zu Lübeck und der Medizinischen Universität Graz 2002-2009,

## Publikationen:

### **Cannabinoid type 1 receptor mediates depot-specific effects on differentiation, inflammation and oxidative metabolism in inguinal and epididymal white adipocytes**

Wagner I.V., Perwitz N., Drenckhan M., Lehnert H., Klein J. *Nutrition and Diabetes* 2011 Sept 2044-4053/11

### **Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes**

Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Büning J, Drenckhan M, Zarse K, Ristow M, Lilienthal W, Lehnert H, Klein J. *Diabetes Obes Metab.* 2010 Feb;12(2):158-66

### **Effects of obesity on human sexual development**

Wagner I.V., Sabin M.A., Pfäffle R.W., Hiemisch A., Sergejev E., Körner A., & Kiess W. *Nature Review Endocrinology* 2012, Jan 31, Epub ahead of print

### **Bedeutung der Blutdruckmessung bei Kindern und Jugendlichen mit Adipositas- Fallstricke in der Diagnostik**

I. Wagner, R. Ketzscher, K. Dittrich, M. Neef, W. Kiess, A. Körner. *Adipositas.* 2010; 4:197-201

## Abstracts und Kongressbeiträge

### **Impact of body weight on exercise capacity and changes in metabolic parameters during spiroergometry in children and adolescents**

Wagner I.V., Dittrich K., Kiess W., Erbs S., Körner A  
EASD 2011 (Poster)

### **Depot-specific induction of transdifferentiation, inflammation and apoptosis via cannabinoid type 1 receptor blockade**

Wagner I, Perwitz N, Drenckhan M, Lehnert H, Klein J  
EASD 2010 (Vortrag)

### **Depot specific effects of CB1- receptor knockout mice of differentiation and oxidative metabolism in subcutaneous and visceral white adipocytes of cannabinoid receptor 1 knockout mice**

Wagner I, Perwitz N, Drenckhan M, Lehnert H, Klein J  
Endocrine Society 2009 (Poster)

**Phaeochromocytoma crisis associated with organ failure- a case series**

Wagner I, Srirangalingam U, Akker SA, Drake WM, Chew SL

Endocrine Society 2009 (Poster)

**CB1- Receptor blockade induces transdifferentiation towards an insulin-sensitive brown fat phenotype in white adipocytes**

Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Büning J, Drenckhan M, Zarse K, Ristow M, Lilienthal W, Lehnert H, Klein J

EADS 2008 (Poster)

## **10. Erklärung**

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Leipzig, den 04.04.2012

(Isabel Wagner)

## 11. Anhang

Ministerium für Landwirtschaft,  
Umwelt und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |  
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn  
Prof. Dr. Johannes Klein  
Medizinische Klinik I  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Ihre Anzeige vom: 23.05.2007

Mein Zeichen: V 312-72241.122-4

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:  
Herrn Dr. R. Noël  
Gemeinsame Tierhaltung  
der Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

1. Juni 2007

### Anzeige von Gewebeentnahmen zu wissenschaftlichen Zwecken

Sehr geehrter Herr Prof. Klein,

gegen die Durchführung des geplanten Vorhabens „Molekulare und funktionelle Analyse eines Cannabinoid Rezeptor knock-out im Fettgewebe“ und die Verwendung von bis zu 6 Mäusen zur Entnahme von Fettgewebe erhebe ich keine Einwände.

Mit freundlichen Grüßen

*Dr. Irmer*

Dr. Irmer