Aus der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck Direktor: Professor Dr. med. Hendrik Lehnert

Einfluss des mineralo- und glukokortikoiden Rezeptors auf die Transdifferenzierung und Thermogenese in weißen, murinen Adipozyten

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

> vorgelegt von Ingo Israel aus Kassel

Lübeck 2011

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Radke

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.11.2012

–Promotionskommission der Sektion Medizin–

"Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle."

Albert Einstein (1879–1955)

Für meine Eltern

Im Zeitraum dieser Dissertation sind folgende Publikationen entstanden:

Posterpräsentation	Annual Meeting of the Endocrine Society im Juni 2010 in San Diego (USA)
	Mineralocorticoid Receptor Activation Mediates Thermogenesis in White Adipocytes
	<u>I. Israel</u> , N. Perwitz, J. Hoppmann, H. Lehnert, J. Klein
	Medizinische Klinik I, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland

Posterpräsentation	27. Jahrestagung der Deutschen Adipositas-Gesellschaft im Oktober 2011 in Bochum (BRD)
	The Role of Corticosteroid Receptors in Oxidative Metabolism in White Adipocytes
	<u>I. Israel</u> , J. Hoppmann, N. Perwitz, J. Klein
	Medizinische Klinik I, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

AI	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis			VII
1	Einl	eitung	und Fragestellung	1
	1.1	Adipo	sitas	1
	1.2	Folger	und Therapien der Adipositas	2
	1.3	Funkt	ionen des Fettgewebes	4
	1.4	Trans	differenzierung	7
	1.5	Thern	nogenese	8
	1.6	Kortik	costeroide	10
		1.6.1	Der glukokortikoide Rezeptor	11
		1.6.2	Der mineralokortikoide Rezeptor	12
	1.7	Frages	stellung	14
2	Mat	terial u	nd Methoden	15
	2.1	Mater	ial	15
		2.1.1	Geräte	15
		2.1.2	Chemikalien	16
		2.1.3	Verbrauchsmaterialien	17
		2.1.4	Kulturmedien	18
		2.1.5	Puffer und Lösungen	19
		2.1.6	Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	20
		2.1.7	Small interfering RNA	22
	2.2	Metho	oden	22
		2.2.1	Zellmodell	22
		2.2.2	Zellkultur	22
		2.2.3	Differenzierung und Zellstimulation	23

6 7	Lite Dan	raturve ksagur	erzeichnis ng	58 79
6	Lite	raturve	erzeichnis	58
5	Zus	ammer	ıfassung	56
	4.3	Gewo	nnene Erkenntnisse und Ausblick	54
		4.2.3	Einfluss von MR/GR auf den Sauerstoffverbrauch	53
		4.2.2	GR-Knockdown und MR-Knockout	52
		4.2.1	Mitochondriale Biogenese	50
	4.2	Thern	nogenese	50
		4.1.2	Braune Fettzellmarker	49
		4.1.1	Differenzierungsverhalten	47
	4.1	Trans	differenzierung	47
4	Disk	cussion		46
		3.2.4	Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs via MR und GR	44
		3.2.3	Basale UCP-1-Expression in MR- <i>Knockout</i> -Zellen	43
		3.2.2	Stimulation in GR- <i>Knockdown</i> -Zellen mit Kortikosteron	41
		3.2.1	Einfluss auf die mitochondriale Biogenese	38
	3.2	Thern	nogenese	38
		3.1.2	Expression brauner Fettzellmarker	36
		3.1.1	Differenzierungsverhalten	33
	3.1	Trans	differenzierung	33
3	Erge	ebnisse		33
		2.2.8	Statistische Auswertung	32
		2.2.7	Sauerstoffverbrauch	29
		2.2.6	Short-interfering RNA	27
		2.2.5	Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT PCR)	25
		2.2.4	On Red O-Farbung	24

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Typ 1
Typ 2
1
n
t

$\begin{array}{l} \mathrm{FADH}_2\\ \mathrm{FBS}\\ \mathrm{FG} \end{array}$	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form) Fetales, bovines Serum Freiheitsgrad
g	Gramm
gez.	gezeichnet
GLUT	Glukosetransporter
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GR	Glukokortikoider Rezeptor
H_2O	Wasser
HCl	Hydrochlorid
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IL-6	Interleukin-6
K ⁺	Kaliumion, einfach positiv geladen
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Knock out
95 %-KI	95 %-Konfidenzintervall
1	Liter
l	Liter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MR	Mineralokortikoider Rezeptor
mRNA	messenger RNA
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
l	Liter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MR	Mineralokortikoider Rezeptor
mRNA	messenger RNA
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NaF	Natriumflourid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NRF-1	Nuklearer Respirationsfaktor-1

PGC-1 α	PPAR γ coactivator-1 α
PKA	Proteinkinase A
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
$\mathrm{PPAR}\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
QS	Quadratsumme
R	Produktregistrierung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
O_2	Sauerstoff
siRNA	short interfering RNA
St.	Sankt
SV 40	Simian vacuolating virus 40
TFAM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TM	Handelsbezeichung
$TMF \alpha$	Tumornokrosofaktor o
$1117-\alpha$	1 union next oseiax toi- α
U	Unit
UCP-1	Uncoupling Protein 1
USA	United States of America
v	Varianz
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Adipositas

Evolutionsbiologisch bedeutete ursprünglich die Fähigkeit, Energie in Form von Fett speichern zu können, einen klaren Überlebensvorteil. Fern unserer modernen Welt mit geregeltem Speiseplan war es bedeutsam, in Perioden des Nahrungsmangels von den aufgebauten Reserven zu zehren. Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeit zwischen genetischer und geistiger Entwicklung des Menschen mit all seinen Errungenschaften hat sich dieser einstige Vorteil nun zu einem Nachteil gewandelt. Neben einer krankheitsbedingten Gewichtszunahme führen vor allem der hohe Lebensstandard mit seinem reichhaltigen Nahrungsmittelangebot sowie eine zunehmende, körperliche Inaktivität zu einem Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -abgabe. Um die über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts zu definieren, orientieren sich die Leitlinien der Deutschen Adipositas-Gesellschaft am sogenannten Bodymassindex (BMI). Dieser berechnet sich als Quotient aus dem Körpergewicht in Kilogramm und der quadrierten Körpergröße in Metern. Die nachfolgende Tabelle zeigt die offiziellen Einteilungskriterien:

Kategorie	BMI (kg/m^2)
Untergewicht	$\leq 18,5$
Normalgewicht	18,5 - 24,9
Präadipositas	25,0 - 29,9
Adipositas Grad I	30,0 - 34,9
Adipositas Grad II	35,0 - 39,9
Adipositas Grad III	$\geq 40,0$

 Tabelle 1.1: Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des BMI
 Quelle: Evidenzbasierte Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas Version 2007, [1]



Abbildung 1.1: Prävalenz des Übergewichts für Männer älter als 15 Jahre Quelle: 2010 WHO [2]

Übergewicht und Adipositas werden aufgrund ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit mittlerweile als eine Pandemie angesehen [3]. Schätzungen zufolge können weltweit mehr als eine Milliarde Menschen mit einem BMI größer 25 kg/m² eingestuft werden [4, 5]. Die obige Weltkarte zeigt exemplarisch die prozentuale Verteilung von übergewichtigen Männern älter als 15 Jahre und verdeutlicht damit die drohende Gefahr im Hinblick auf die Entstehung von Adipositas. Um einen Eindruck von der Dynamik dieser Entwicklung zu bekommen, sei an dieser Stelle erwähnt, dass sich gemäß den Angaben der Weltgesundheitsorganisation die Zahl an adipösen Menschen weltweit in den letzten 30 Jahren verdoppelt hat und laut Schätzungen in den nächsten 20 Jahren noch einmal duplizieren wird [5,6].

1.2 Folgen und Therapien der Adipositas

Übergewicht und Adipositas selbst sind zwar nicht als eigenständige Krankheitsentität definiert, aber ihnen wird ein beträchtlicher Krankheitswert aufgrund ihrer assoziierten Morbidität und Mortalität zuteil [3]. Die Erklärung hierfür liegt besonders in der endokrinologischen Aktivität des Fettgewebes [7–11]. Durch die Adipozyten werden zahlreiche Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Komplementproteine sezerniert und über das Blut dem Gesamtorganismus zur Verfügung gestellt [5]. Im Fall von Adipositas wird das Sekretionsmuster derart verändert, dass es unter anderem die Entstehung von kardiovaskulären, endokrinologischen und neoplastischen Erkrankungen fördert und zu einer Reduktion der Lebenserwartung von bis zu acht Jahren beitragen kann [12].

In diesem Zusammenhang stellt die stammbetonte Adipositas in Verbindung mit der Insulinresistenz eine Kernkomponente des Metabolischen Syndroms dar [13]. Dieses Modell wurde schon 1988 von Reaven et al. entwickelt und wird seither wissenschaftlich immer weiter verfeinert [14, 15].



Abbildung 1.2: Assoziierte Erkrankungen des Metabolischen Syndroms Quelle: 2009 Duvnjak (modifiziert) [14]

An der Pathogenese des Metabolischen Syndroms sind zwar auch genetische, aufgrund ihrer rasanten weltweiten Zunahme aber vermutlich vielmehr umweltbedingte Faktoren, wie z. B. quantitative Überernährung, qualitative Fehlernährung und mangelhafte Bewegung, beteiligt. Diese Grundvoraussetzungen für das Krankheitsbild münden schließlich in den typischen Komplikationen, wie sie in Abbildung 1.2 schematisch aufgezeigt sind [13, 16, 17]. Zur Behandlung der Adipositas werden derzeit drei Therapieschemata verfolgt:

Der <u>konservative Ansatz</u> beruht auf einer Umstellung der Lebensgewohnheiten mit Verstärkung der körperlichen Aktivität und der verminderten Kalorienaufnahme. Diese Methode ist an eine nachhaltige Selbstdisziplin gebunden und verlangt eine Fortführung der veränderten Lebensgewohnheiten über die Zeit der Gewichtsabnahme hinaus, die allerdings entgegen des vielversprechenden Ansatzes von den meisten Patienten nicht in adäquater Weise verfolgt wird (bzw. werden kann).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der <u>pharmakologischen Therapie</u> zur Beeinflussung des Metabolismus. Hier stehen in Deutschland zur Zeit zwei Wirkstoffklassen zur Verfügung. Als Lipasehemmer führt Orlistat (Xenical[®]) zu einer spezifischen und lang anhaltenden Inhibition der gastrointestinalen Lipasen und vermindert auf diese Weise die Resorption der Lipide über den Darm. Demgegenüber fungieren die drei Wirkstoffe Cathin-HCl, Phenylpropanolamin-HCl und Amfepramon-HCl als indirekte Sympathomimetika und dämpfen so über das zentrale Nervensystem das Appetitverhalten. <u>Bariatrische Operationen</u> sind bei wiederholt frustranen Therapieversuchen der Adipositas im Stadium III als letzte Option indiziert. Hier stehen im Wesentlichen restriktive

Techniken mit einer Verkleinerung des Magenreservoirs, malabsorptive Verfahren unter Teilumgehung der Darmpassage oder Kombinationen aus beidem zur Verfügung.

1.3 Funktionen des Fettgewebes

Die Einteilung der Fettzellen erfolgt gemäß der histologischen Unterschiede in weiße und braune Adipozyten, deren Verteilungs- und Aufgabenmuster sich voneinander unterscheiden.

In den letzten Jahrzehnten hat besonders das weiße Fettgewebe aufgrund seiner endokrinologischen Aktivität enormes Forschungsinteresse erfahren. Neben den klassischen Funktionen als Energiespeicher, Isolierschicht und Baufett sind mittlerweile über hundert verschiedene Substanzen bekannt, die als Adipokine systemübergreifend in Prozesse des Immunsystems, der Gerinnungskaskade, der Inflammation und des Lipidmetabolismus eingreifen [5]. Im Umkehrschluss ist das Fettgewebe nicht nur Signalgeber, sondern auch Signalempfänger im Sinne der Expression einer Reihe von Rezeptoren, die eine Rückkoppelung aus anderen Organen erlauben. Im folgenden sollen Leptin und Adiponektin beispielhaft die aktive Funktion des Fettgewebes illustrieren:

Leptin wurde als erstes Adipokin von Zhang und seinen Kollegen im Jahr 1994 als Produkt des obese/obese (ob/ob)-Gens entdeckt [18]. Der Name leitet sich aus dem Griechischen *leptos* ab und bedeutet dünn in Anlehnung an die anorexigene Wirkung des Proteins. Es wird besonders durch das weiße Fettgewebe sezerniert, wobei die daraus resultierenden Blutplasmaspiegel in enger Korrelation zum BMI bzw. zu der vorhandenen Körperfettmasse stehen [19–21]. Im zentralen Nervensystem finden sich im Bereich des Nucleus arcuatus des Hypothalamus zwei unterschiedliche Gruppen leptin-sensitiver Neurone, die gleichsinnig in den Energiehaushalt eingreifen und die Kalorienaufnahme reduzieren. Dabei werden die sogenannten Proopiomelanokortin-Neurone durch Leptin in ihrer appetithemmenden Wirkung stimuliert, während die andere Gruppe von Neuronen, die ihrerseits Neuropeptid Y oder Aqouti-related-peptides bilden, in ihrer appetitfördernden Wirkung gehemmt werden [22]. In Phasen der Nahrungskarenz kommt es interessanterweise zu einem deutlichen Abfall des Leptinspiegels noch vor Abnahme der eigentlichen Fettmasse, sodass hierdurch frühzeitig neuroendokrinologisch gegengesteuert werden kann [23]. Umgekehrt findet sich bei dauerhaftem Übergewicht nicht die zu erwartende Appetitlosigkeit, sondern vielmehr infolge der chronischen Überbeanspruchung der Rezeptoren eine Leptinresistenz, die letztlich sogar zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führt [24, 25]. Der Einsatz von Leptin zur Behandlung von Übergewicht zeigte nur bei Patienten mit hereditären Störungen in der Leptinproduktion bzw. einer Lipoatrophie eine positive Wirkung [26–30]. Darüberhinaus besitzt Leptin noch zahlreiche andere Wirkungen auf zentraler und peripherer Ebene, die neben dem Energiehaushalt und -stoffwechsel auch das Verhalten, die Inflammation, die Koagulation und die Thrombozytenaggregation beeinflussen [29, 31].

<u>Adiponektin</u> wurde zwei Jahre nach der Entdeckung des Leptins als das am stärksten exprimierte Protein des weißen Fettgewebes identifiziert und beeinflusst ähnlich wie Leptin das Hungergefühl und die Nahrungsaufnahme [32]. Interessanterweise wird das 30kDa-große Protein im Gegensatz zu Leptin invers zum Bodymassindex und besonders bemerkenswert zum Anteil des viszeralen Fettgewebes sezerniert [33–35]. Daraus kann gefolgert werden, dass ein negativer Feedback-Mechanismus für die endogene Produktion des Adiponektins im Fettgewebe bestehen muss [36]. Dementsprechend findet sich bei Patienten mit Adipositas oder Diabetes mellitus Typ II ein verringerter Adiponektinspiegel [37] und umgekehrt entwickelten sich in Versuchen mit Mäusen, bei denen man das Gen für Adiponektin ausschaltete, adipöse, insulinresistente und hypertensive Tiere mit endothelialer Dysfunktion [38].

Aufgrund der Verbindung zwischen Adiponektin und der Energiehomöostase wurde die Beeinflussung weiterer Organsysteme untersucht. So konnte von Dupont und seiner Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Adiponektin über den Energiehaushalt in die Genese von Follikeln und Eizellen eingreift [39]. Im Skelettmuskel wird eine höhere Glukoseutilisation unter anderem durch eine verstärkte Translokation von Glukosetransportern und einer erhöhten Fettsäureoxidation erreicht [40–42]. Daneben entfaltet dieses Adipokin auch antiinflammatorische Effekte [43], zeigt kardioprotektive und antiarteriosklerotische Eigenschaften [44–46] sowie antineoplastische Wirkungen [47,48].

Das braune Fettgewebe erhält seine typische Farbe durch mitochondriale Zytochrome und in den Lipidtröpfchen gelöste Lipochrome. Die Anwesenheit von braunem Fettgewebe ist besonders bei winterschlafhaltenden Säugetieren und Neugeborenen ausgeprägt. Beide nutzen diesen Mechanismus zur Regulation ihrer Körpertemperatur, da eine ausreichende Muskelaktivität zur Energieumwandlung in Wärme nicht zur Verfügung steht. Bei Neugeborenen kommt zusätzlich noch ein ungünstiges Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen hinzu, welches eine verstärkte Wärmeabgabe begünstigt. Während man früher von einem vernachlässigbaren Anteil des braunen Fettgewebes im adulten Menschen ausgegangen war, ist diese Anschauung heute weitestgehend revidiert. Zur genauen Lokalisation wurden zahlreiche Bildgebungsverfahren, unter anderem auch Positronen-Emissions-Tomographien, durchgeführt, die im Wesentlichen die Anordnung im zervikal-supraklavikulären Bereich, im oberen Mediastinum sowie untergeordnet auch paraspinal und perirenal belegten [49–51]. Darüber hinaus lassen sich auch weitere Mengen an braunen Adipozyten vermuten, die aufgrund ihrer Dissemination im weißen Fettgewebe und dem begrenzten Auflösungsvermögen der bildgebenden Verfahren nicht quantifiziert werden können (siehe auch Abschnitt 1.4 Transdifferenzierung auf Seite 7). Interessanterweise ergab sich bei diesen Untersuchungen folgender Zusammenhang: Je größer der BMI der Probanden war, umso mehr weißes bzw. umso weniger braunes Fett wurde gemessen. Die Hauptaufgabe dieser

meist plurivakuolär auftretenden Zellen mit eher zentralisiertem Nukleus besteht in der Thermogenese, d. h. der Umwandlung chemisch gespeicherter Energie in Wärme, und wird somit zur Regulierung der Körpertemperatur genutzt [52]. Eine pharmakologische Steigerung der Thermogenese konnte unter anderem durch die Substanz Sibutramin nachgewiesen werden [53]. Bis 2010 war sie unter dem Handelsnamen Reductil[®] in den Staaten der Europäischen Union als Antiadipositum verfügbar, bevor sie aufgrund eines negativen Nutzen-Risiko-Profils im Hinblick auf kardiovaskuläre Nebenwirkungen vom Markt genommen wurde.

1.4 Transdifferenzierung

Der Begriff der Transdifferenzierung bezeichnet allgemein die Umwandlung volldifferenzierter Zellen in andere Zelltypen, die mit oder ohne Zellteilungen stattfinden kann [54]. Angewendet auf das Fettgewebe, bedeutet dies den Übergang von braunen in weiße Fettzellen und umgekehrt. Die Arbeitsgruppe um Cinti hat diesbezüglich ein Fettzellkonzept entwickelt, nach welchem es eine Koexistenz von braunen und weißen Adipozyten in den Fettzelldepots gibt und diese auch reversibel ineinander umwandelbar sind [55–59]. Dabei kann entsprechend den herrschenden Lebensbedingungen das Verhältnis aus beiden Gewebstypen dynamisch angepasst werden. In Ratten konnte beispielsweise durch chronische Kälteexposition die Menge an braunen Fettzellen gesteigert werden, um für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur zu sorgen [60]. Wie im folgenden Kapitel noch ausführlicher erklärt werden wird, erfolgt die Innervation des braunen Fettgewebes durch das Sympathische Nervensystem mittels β_3 -Adrenozeptoren. Studien zeigten, dass eine Stimulation ebenfalls zu einer Vermehrung brauner Fettzellen bzw. zu einer Steigerung brauner Fettzellcharakteristika beitrug [61–63]. Übergangsformen dieses Transdifferenzierungsprozesses wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen weißer Fettzellen nach dauerhafter Kälteeinwirkung nachgewiesen [64]. Umgekehrt kann eine Konversion von braun nach weiß durch eine adipogene Diät induziert werden, um überschüssige Energie in Form von Triglyzeriden zu speichern [55].

Das Wissen um die Möglichkeit einer physiologisch vorkommenden Transdifferenzie-

rung mit nachfolgender Aktivierung eröffnet neue therapeutische Perspektiven in der Behandlung der Adipositas. Die interventionelle Verlagerung des Verhältnisses beider Fettzelltypen zugunsten der braunen Adipozyten könnte folglich das Energiegleichgewicht verschieben und somit einer Adipositas vorbeugen bzw. eine Gewichtsabnahme begünstigen. Den umgekehrten Fall konnte man im Tierversuch bereits belegen. Mäuse bildeten eine deutliche Adipositas mit den bekannten Folgeerkrankungen aus, wenn sie durch genetische Veränderung kein braunes Fettgewebe mehr ausbilden konnten [65]. Entsprechende Resultate zeigten sich in Experimenten mit β_3 -Adrenozeptor-defizienten Mäusen, die unter der fehlenden Aktivierbarkeit der braunen Adipozyten ebenfalls eine massive Adipositas entwickelten [66].

1.5 Thermogenese

Braunes Fettgewebe verfügt aufgrund seiner speziellen Proteinausstattung und seines Mitochondrienreichtums über die Fähigkeit, chemisch gespeicherte Energie in Wärme umzuwandeln [67]. Es stellt ein metabolisch hochaktives Organ dar, welches der Organismus zur Regulation der Körperkerntemperatur nutzt und dessen Energie im Wesentlichen der Aufnahme von Glukose und Triglyzeriden entstammt [67–69]. Dieser als Thermogenese bezeichnete Prozess wird nach derzeitigem Kenntnisstand über den Hypothalamus als Zentrum für Thermoregulation gesteuert [70]. Dabei erhält dieser Teil des Dienzephalons über noch nicht näher bekannte somatosensorische Afferenzen in der Haut Informationen über die vorliegende Temperatursituation [71].

Über diesen Empfangsmechanismus kann der Hypothalamus gezielt mittels Aktivierung bzw. Suppression des Sympathischen Nervensystems, Vasodilatation bzw. -konstriktion und auch über die Aktivierung der Muskulatur in Form von Zittern in die Regulation des Energiemetabolismus eingreifen [70]. Wie in Abbildung 1.3 auf Seite 9 zu sehen ist, werden die Effekte der Sympathischen Efferenzen im braunen Fettgewebe über β_3 -Adrenozeptoren vermittelt [72]. Dabei aktivieren die neuronalen Signale G_S-Proteingekoppelt eine Adenylatcyclase und erhöhen somit den intrazellulären cAMP-Spiegel. Es resultiert eine verstärkte Phosphorylierung von CREB (*cAMP responsive element* *binding protein*) durch die Proteinkinase A (PKA) mit der Folge, dass sowohl direkte als auch indirekte Prozesse auf das thermogene Programm vermittelt werden [73].



Abbildung 1.3: Signalkaskade der Thermogenese in braunen Adipozyten Quelle: 1999 Wu (modifiziert) [72]

Innerhalb dieser Signalkaskade spielt PGC-1 α für die Initiierung sowohl nukleärer als auch mitochondrialer Prozesse des oxidativen Stoffwechsels eine zentrale Rolle und führt unter anderem zur Expressionsteigerung von UCP-1 (uncoupling protein-1) in braunen Adipozyten [72–76]. Letzteres ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und erlaubt den Ausgleich des während der Atmungskette entstandenen, transmembranären Protonengradienten unter Entkoppelung der ATP-Synthese und folglich der Freisetzung von thermischer Energie. Im Umkehrschluss bewirkt eine Ausschaltung von PGC-1 α in entsprechend defizienten Adipozyten eine Verminderung der UCP-1-Expression mit einer gestörten Thermogenese und erniedrigtem O₂-Verbrauch [77]. Es ist wichtig an dieser Stelle zu erwähnen, dass für die Beurteilung sowohl der Transdifferenzierung als auch der Thermogenese die beiden Proteine UCP-1 und PGC-1 α unerlässlich sind, da sie sowohl explizite Marker für das braune Fettgewebe darstellen als auch essentiell an der Signalkaskade der Thermogenese beteiligt sind. Die Aktivierung von PGC-1 α leitet schließlich über verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NRF-1, Veränderungen in den Mitochondrien ein, die im Resultat dann einen erhöhten Energiestoffwechsel mit gesteigertem Sauerstoffverbrauch bewirken. In diesem Zusammenhang konnte die Arbeitsgruppe um Puigserver 1998 nachweisen, dass im braunen Fettgewebe durch Kälteexposition die Menge der mRNA sowohl von PGC- 1α als auch von UCP-1 hochreguliert wird [78]. Andere wichtige Einflussfaktoren auf die Thermoregulation sind auch Triiodthyronin als Schilddrüsenhormon sowie die Aktivität des Sympathischen Nervensystems. Die genannten Beispiele belegen dabei die

Anpassungsfähigkeit des Organismus an die jeweils herrschenden Lebensbedingungen.

1.6 Kortikosteroide

Die Kortikosteroide beeinflussen ein breites Spektrum an Stoffwechselprozessen und sind diesbezüglich auch an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Sowohl der mineralo- als auch der glukokortikoide Rezeptor, kurz MR bzw. GR genannt, gehören aufgrund ihrer evolutionär hochkonservierten Gemeinsamkeiten im strukurellen Aufbau und der funktionellen Wirkungsweise innerhalb der Nuklearrezeptor-Superfamilie zur Gruppe der Kortikosteroidrezeptoren [79, 80]. Beide Rezeptoren liegen im zytoplasmatischen Raum der Zelle und werden durch Chaperon-Proteine in einer ligandenfreundlichen Konformation stabilisiert. Durch den Kontakt mit einem Bindungspartner dissoziieren diese Hilfsproteine und erlauben eine gerichtete Translokation in den Kern. In aufeinanderfolgenden Interaktionen besonders mit Koaktivatoren und Korepressoren wird auf diese Weise die Transkription GR- und MR-spezifischer Gene reguliert [81,82].

1.6.1 Der glukokortikoide Rezeptor

Die Wirkung des nahezu ubiquitär vorkommenden Glukokortikoidrezeptors betrifft schätzungsweise 10% aller Gene [83]. Dabei beeinflusst der Rezeptor maßgeblich den Energiehaushalt des Organismus, was besonders in Extremsituationen deutlich wird. Liegt ein Mangel an Kortisol beispielsweise im Rahmen des Morbus Addison vor, leiden betroffene Patienten unter anderem an Gewichtsverlust und Hypoglykämien [84]. Im Gegensatz dazu führt ein Kortisolüberschuss wie beim Morbus Cushing zu einer stammbetonten Adipositas, zu Hyperglykämien und Muskelatrophien [85].

Exogene Einflüsse, wie Hungerzustände, Stress oder Infektionen, fördern die Freisetzung von Kortisol, welches dann wichtige Energiestoffwechselprozesse der Leber, des Fettgewebes und der Skelettmuskulatur reguliert [86]. Dabei greift es unter Beteiligung von PGC-1 α aktivierend in die hepatische Glukoneogenese ein und hält damit bei Nahrungsmangel den Blutglukosespiegel durch Verwertung von Aminosäuren, Glyzerin und Laktat aufrecht [86]. Ergänzend werden in der proteinreichen Skelettmuskulatur Vorkehrungen für eine Mobilisation von Aminosäuren getroffen. Kortisol hemmt dort die Aufnahme von Glukose und Aminosäuren, fördert die Degradation von Proteinen und reduziert die Glykogensynthese [87–93]. Weiterhin aktiviert es in der Leber die Triglyzeridsynthese, hemmt die mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren und begünstigt die Pathogenese einer Fettleber (Steatosis hepatis) [94].

Speziell im Fettgewebe entfaltet das Kortikosteroid sogar ortsabhängige Funktionen, indem es peripher lipolytische sowie zentral lipogene Eigenschaften zeigt und damit zu einer stammbetonten Adipositas beiträgt [95–97].

Neben dieser Auswahl an Effekten auf den Energiehaushalt wirken Glukokortikoide aber auch antiinflammatorisch und immunsuppressiv, beeinflussen das Herz-Kreislauf-System, zeigen katabole Effekte auf Knochen und Bindegewebe und vermitteln über Stimulation des mineralokortikoiden Rezeptors Einflüsse auf den Wasser- und Elektrolythaushalt.

Die Ausschüttung der Glukokortikoide steht unter der Kontrolle des hypothalamischhypophysären Systems. Dabei sezerniert der Hypothalamus mittels zirkadianer Rhythmik *corticotropin releasing hormone* (CRH), welches in der Hypophyse die Freisetzung von adrenokortikotropem Hormon (ACTH) vermittelt. Die folglich veranlasste Ausschüttung von Kortisol aus der Nebennierenrinde in den systemischen Kreislauf wirkt wiederum hemmend auf die CRH- und ACTH-Freisetzung (doppelt negatives Feedback).

In der Pathogenese des Metabolischen Syndroms spielt Kortisol eine wichtige Rolle. Masuzaki führte in diesem Zusammenhang aufschlussreiche Experimente durch, indem er bei Mäusen mittels genetischer Veränderung für eine fettgewebsspezifische Überexpression des Enzyms 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1) sorgte. Folglich entwickelten die Mäuse einen künstlichen Hyperkortisolismus, da dieses Enzym inaktives Kortison in aktives Kortisol umwandelt. Die Mäuse zeigten daraufhin alle charakteristischen Symptome des Metabolischen Syndroms mit einer zentralen Adipositas, einer erhöhten Insulinresistenz, Dyslipoproteinämien und Hypertension [98,99]. Im Umkehrschluss waren 11β -HSD1-defiziente Mäuse gegen eine diät-induzierte Adipositas geschützt. Vergleichende Ergebnisse wurden in Humanstudien beobachtet, in denen der 11 β -HSD1-Spiegel sowohl im subkutanen wie auch im viszeralen Fettgewebe in Verbindung mit Adipositas erhöht war [100–107]. Pharmakologische Studien mit 11β -HSD1-selektiven Antagonisten in Nagetieren zeigten eine deutliche Verbesserung im Lipidprofil, eine erhöhte Insulinsensitivität sowie eine verringerte Nahrungsaufnahme inklusive Gewichtsabnahme [108, 109]. Konsekutiv befinden sich derartige Wirkstoffe für den Menschen gerade in der Entwicklung.

1.6.2 Der mineralokortikoide Rezeptor

Der MR wird in zahlreichen epithelialen und nicht-epithelialen Geweben des Körpers exprimiert [110]. Entsprechend seiner Namensgebung dient er unbestritten zur Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes und der Flüssigkeitshomöostase.

Die Ausschüttung des physiologischen Agonisten Aldosteron wird dabei über den Blutdruck bzw. das Blutvolumen reguliert, deren Absinken zu einer Aktivierung des Sympathischen Nervensystems und konsekutiv zu einer verminderten Nierendurchblutung führt. Beide Effekte stimulieren die Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere. Dieses Enzym spaltet das aus der Leber stammende Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I, welches durch das ubiquitär vorkommende *angiotensin-converting enzyme* (ACE) in das Oktapeptid Angiotensin II gespalten wird. Letzteres wirkt selbst stark vasokonstriktorisch, fördert die Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und hemmt die weitere Freisetzung von Renin im Sinne einer negativen Feedbackkontrolle.

Die Aufgabe des Aldosterons in der Niere wird vor allem durch die expressionsstimulierende Wirkung auf zwei Ionentransporter erreicht: Die apikale Platzierung des endothelialen Natriumkanals (ENaC) und die basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase erlauben einen unidirektionalen Ionentransport [111]. Bemerkenswerterweise können auch Glukokortikoide agonistische Wirkungen am MR entfalten. Da im Plasmaspiegel die Konzentrationen um mehrere Zehnerpotenzen größer sind, existieren besonders in epithelialen Geweben spezielle Mechanismen zum Erreichen der Rezeptorselektivität, deren wichtigster die enzymatische Inaktivierung von aktivem Kortisol in inaktives Kortison ist [112]. Dieses Enzym wird als 11β -HSD Typ 2 (11β -HSD2) bezeichnet und ist besonders in den epithelialen Geweben mit besonderer mineralokortikoider Funktion stark exprimiert.

In den letzten Jahren hat sich herauskristallisiert, dass Aldosteron an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt ist. Erhöhte Plasmaspiegel verursachen dabei maladaptive Veränderungen mit einer begünstigenden Wirkung für die Entstehung des Metabolischen Syndroms und therapieresistenter Hypertension sowie einer kardiovaskulären und renalen Funktionsstörung [113]. Für die pathologische Erhöhung der Aldosteronkonzentrationen wird neben neoplastischen Erkrankungen der Nebenniere auch die Bildung sogenannter Aldosteron-ähnlicher Faktoren aus dem Fettgewebe verantwortlich gemacht. Epoxyketo-Derivate der Linolsäure beispielsweise verursachen in adipösen Patienten mit erhöhten Spiegeln freier Fettsäuren eine deutliche Stimulation der Aldosteronsekretion und lassen eine Rolle bezüglich des oxidativen Stresses vermuten [114]. Besonders das viszerale Fett steht im Fokus, proinflammatorische Zytokine zu sezernieren und demzufolge systemische Entzündungszustände, oxidativen Stress und Insulinsensitivität zu begünstigen [115, 116]. Umgekehrt zeigte der Einsatz von Spironolacton bzw. Eplerenon als Antagonisten des MR in den groß angelegten RALESbzw. EPHESUS-Studien eine kardiovaskulär-protektive, mortalitätssenkende Wirkung beim Einsatz nach Herzinfarkt oder bei Herzinsuffizienz [117, 118].

1.7 Fragestellung

Im Fettgewebe existieren zwei verschiedene Zellarten, deren Aufgabenspektrum sich deutlich voneinander unterscheidet. Während weiße Adipozyten als Energiespeicher, Isolierschicht, Baustoff und als endokrinologisches Organ dienen, sind nur braune Adipozyten funktionell befähigt, im Rahmen der Thermogenese Energie in Form von Wärme freizusetzen. Entsprechend den Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO nehmen Übergewicht und Adipositas weltweit pandemische Ausmaße an und sind therapeutisch bis heute nur sehr unbefriedigend zu behandeln. Da in adulten Menschen der Anteil an weißem Fettgewebe deutlich überwiegt, ist die als Transdifferenzierung bezeichnete Umwandlung der Adipozyten von einem weißen zu einem braunen Phänotyp und damit die Verschiebung der Energiebalance hin zu einem höheren Verbrauch eine wissenschaftlich schon länger verfolgte Therapiestrategie [119]. Die Anwesenheit von mineralo- und glukokortikoidem Rezeptor im Fettgewebe ist seit Dekaden bekannt, deren Funktion aber noch nicht vollständig verstanden. Aufgrund des maßgeblichen Eingreifens dieser Kortikoidrezeptoren in den Energiemetabolismus aller Zellen – insbesondere auch der Adipozyten – ergaben sich die folgenden Themenschwerpunkte dieser Arbeit:

- 1. Frage: Welchen Einfluss üben der mineralo- und glukokortikoide Rezeptor auf die Transdifferenzierung von weiß nach braun aus?
- 2. Frage: Wie greift das kortikoide System in den oxidativen Metabolismus ein?
- 3. Frage: Können Aussagen über den Mechanismus getroffen werden?



Abbildung 1.4: Fragestellung zum Energiemetabolismus der Fettzelle

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Analysewaage, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
- Autoklaviergerät 2540El Systec (Wettenberg, Deutschland)
- Autoklaviergerät Varioklav, H+P (Oberschleißheim, Deutschland)
- Eismaschine Scotsman AF-20, Enodis (Herborn, Deutschland)
- Elektronikrührer Typ M23, Int. Laborat. App. (Dottingen, Deutschland)
- Elektronische Pipettierhilfe accu-jet[®], Brand (Wertheim, Deutschland)
- Heizblock Thermomixer Compact, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Inkubator Typ B5060, EK CO₂, Heraeus (Osterode, Deutschland)
- Mikroskop CK2, Olympus (Hamburg, Deutschland)
- Multistepper Multipette Plus, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Nukleofektionsgerät Nucleofector $^{\text{TM}}$, Amaxa Biosystems (Walkersville, USA)
- pH-Meter 766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte (Berlin, Deutschland)
- Photometer, BioPhotometer Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Pipetten Research Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Real-Time Thermocycler Realplex, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Rotator Renner GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Scanner CanoScan 4400F, Canon (Tokio, Japan)
- Schüttler Vortex Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, USA)
- Sauerstoffmessgerät Oxygraph System, Hansatech (Norfolk, England)
- Stickstofftank Arpege 110, VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Thermocycler Cyclone Gradient, Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)

- Tiefkühlschrank MDF-1155 Ultra Low Temperature Freezer, Sanyo (München, Deutschland)
- Wasserbad Typ 3044, Köttermann (Hänigsen, Deutschland)
- Wasserbad mit Pumpe, Thermomix UM, B. Braun (Melsungen, Deutschland)
- Werkbank (steril) Nuaire Class II, Zapf Instruments (Sarstedt, Deutschland)
- Zentrifuge Biofuge fresco, Rotor 3765, Heraeus (Osterode, Deutschland)
- Zentrifuge Minispin plus, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge Multifuge 3 S-R, Heraeus (Osterode, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

- Aldosteron, Fluka (Steinheim, Schweiz)
- Aprotinin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Aqua destillata, hausinterne Destillieranlage
- Bradford Proteinassay (BioRad, München, Deutschland)
- BSA (Bovines Serumalbumin), BioMol (Hamburg, Deutschland)
- Cell Line NucleofectorTM Kit V, Amaxa Biosystems/Lonza (Basel, Schweiz)
- Chloroform, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- DEPC (Diethylpyrocarbonat), Fluka (Steinheim, Schweiz)
- Dexamethason, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Dinatriumhydrogenphosphat, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- DNA-free-Kit, Ambion (Austin, USA)
- dNTPs, Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
- DTT, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
- DMEM high glucose (4,5 g/l), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
- DMSO, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- EDTA, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol 96%, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- FBS (Fetales Kälberserum), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Formalin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Glycerol 85 %, Apotheke der Universität zu Lübeck (Lübeck, Deutschland)
- HCl 25%, Merck (Darmstadt, Deutschland)

- HEPES 1M, Biomol (Hamburg, Deutschland)
- IBMX (Isobutylmethylxanthin), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- IGEPAL CA-630, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Indomethacin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Insulin (bovines), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Isopropanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumchlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Leupeptin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- MgCl₂, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- MycokillTM, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
- Natriumchlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Natriumfluorid, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumpyrophosphat, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- NucleoSpin[®] RNA II, Macherey Nagel (Düren, Deutschland)
- Oil Red O, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Oligo-p(dT)15-Primer, Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin, BioWhittaker (Verviers, Belgien)
- PMSF, Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- Puromycin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- RNase-Inhibitor, Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
- RT PCR Grade Water, Ambion (Austin, USA)
- SuperScript[®] II Reverse Transscriptase, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
- SYBR Green Mix, TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan
- T₃ (Triiodthyronin), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- TRIzol-Reagens, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
- Trypsin, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
- Vanadat, Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

• Falcon-Röhrchen, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

- Faltenfilter, Ø 150 mm, Whatman[®] (Dassel, Deutschland)
- Filter Steritop Express plus 0,22 µm, Millipore Corporation (Billicore, USA)
- Latex-Handschuhe Peha-Soft, Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
- Mikroküvetten UVette, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Parafilm M, American National Can. (St. Louis, USA)
- Pipettenspitzen:
 - Biosphere Filter Tips (1, 10, 100 µl), Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
 - Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
 - Stabpipetten (5, 10, 25, 50 ml), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäße:
 - PCR Softtubes 0,5 ml, Biozym Scientific GmbH
 - (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
 - RNase-free 1,5 ml Microfuge Tubes, Ambion (Austin, USA)
 - Safe-lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- 96-well-Reaktionsplatten, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- Zellkulturschalen:
 - *Tissue culture dish* (100/150 mm x 20 mm), Sarstedt (Newton, USA)
 - 6 well Multidish, Nunclon Surface, Nalge Nunc. International (Roskilde, Dänemark)
- Zellschaber, Sarstedt (Nümbrecht, Hamburg)

2.1.4 Kulturmedien

Tabelle 2.1: Grundmedium

Reagenz	Konzentration
DMEM high glucose $(4,5 \text{ g/l})$	Grundlage
Fetales Kälberserum (FBS)	20%
Penicillin G	$100 \mathrm{U/ml}$
Streptomycin	$100 \mathrm{U/ml}$

Bei der Herstellung wurden alle Reagenzien mittels Steritop-Filtration gereinigt.

Tabelle 2.2: Differenzierungsmedium

Reagenz	Konzentration
DMEM high glucose $(4,5 \text{ g/l})$	Grundlage
Fetales Kälberserum (FBS)	20%
Penicillin G	$100\mathrm{U/ml}$
Streptomycin	$100 \mathrm{U/ml}$
Insulin	20 nmol/l
Triiodthyronin (T_3)	1 nmol/l

Bei der Herstellung wurden alle Reagenzien mittels Steritop-Filtration gereinigt.

Tabelle 2.3: Induktionsmedium

Reagenz	Konzentration
DMEM high glucose $(4,5 \text{ g/l})$	Grundlage
Fetales Kälberserum (FBS)	20%
Penicillin G	$100\mathrm{U/ml}$
Streptomycin	$100 \mathrm{U/ml}$
Insulin	$20\mathrm{nmol/l}$
Triiodthyronin (T_3)	$1 \mathrm{nmol/l}$
Indomethacin	$250\mu mol/l$
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	$500\mu mol/l$

Bei der Herstellung wurden alle Reagenzien mittels Steritop-Filtration gereinigt.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.4: PBS (pH 7,4 bei Raumtemperatur)

Reagenz	Konzentration
Natriumchlorid (NaCl)	$80 {\rm g/l}$
Kaliumchlorid (KCl)	2 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	2 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	$14,4 { m g/l}$

Tabelle 2.5: Oil Red O-Färbelösung

Reagenz	Menge
Oil Red O Isopropanol 70 %	$\begin{array}{c} 0,5\mathrm{g} \\ 100\mathrm{ml} \end{array}$

Tabelle 2.6: Lysispuffer pH 7,4 bei $4\,^\circ\mathrm{C}$

Reagenz	Konzentration
HEPES	$50\mathrm{mmol/l}$
NaCl	$137\mathrm{mmol/l}$
Glycerol 85%	10% (V/V)
$MgCl_2$	$1\mathrm{mmol/l}$
KCl	1 mmol/l
Natriumpyrophosphat	10 mmol/l
NaF	10 mmol/l
EDTA	$2 \mathrm{mmol/l}$
IGEPAL	1% (W/V)
Aprotinin	$10 \mu g/ml$ (frisch zugegeben)
Leupeptin	$10 \mu\text{g/ml}$ (frisch zugegeben)
PMSF	2 mmol/l (frisch zugegeben)
Vanadat	2 mmol/l (frisch zugegeben)

2.1.6 Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Tabelle 2.7: Transkriptase-Mix

Reagenz	Beschreibung
$2,00\mu l$ First-Strand Buffer	pH- und Elektrolyteinstellung (250 mmol/l Tris-HCl mit pH 8 3: 15 mmol/l MgCle: 375 mmol/l KCl)
$0,25\mu$ l SuperScript TM II	Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase mit eliminierter BNase H Aktivität [120]
0,50 µl DTT	Konservierung der Enzyme durch Vermeidung der Oxi- dation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbindungen
0,25 µl RNase-Inhibitor	Inaktivierung ubiquitär vorkommender RNasen

Tabelle 2.8: Housekeeping- bzw. Zielgen-Ansatz

Reagenz	Beschreibung
5 µl Sybergreen	Interkalierender Zyanin-Farbstoff mit Lichtabsorption bei $\lambda = 494 \text{ nm}$ und -emission bei $\lambda = 521 \text{ nm}$.
1 µl Primer-Sense	Startsequenz für Polymerase
1 µl Primer-Antisense	Startsequenz für Polymerase am komplementären Strang
$3\mu l$ RNase-freies H_2O	Reaktionsmedium
2μl cDNA-Probe	

Tabelle 2.9: Primer-Tabelle

Primer	Nukleotidabfolge	
Housekeeping-Gen • Sense • Antisense	AAG CGC GTC CTG GAT TGT CT CCG CAG GGG CAG CAG TGG T	
UCP-1 (NM 009463) Verdün • Sense	nnung 1:10 GTA CTG GAA GCC TGG CCT TCA CCT TGG ATC CTC AAC CCC ACA ACT TCC CAA CTC	
 And GTG AAC CCG ACA ACT TCC GAA GTG PGC-1α (NM 008904) Verdünnung 1:25 Sense AGC ACA CGT TTA TTC ACG GGT 		
• Antisense	GCC CCC AAG TCC TCA CAT G	
SenseAntisense	GGC TGC TGG ATT CTC TTA CAC A CCA AAT ACT CCA TCA GGG TAT CCT	
NRF-1 (NM 010938) Verdün • Sense • Antisense	nnung 1:50 GCA TGG AGC TCT ATC ATG GCA TGG CGT TCA TTC CAC CAG A	
TFAM (NM 009360) Verdür • Sense • Antisense	nung 1:25 GAT GGC TGA AGT TGG ACG AAG GGG CCT AAT CCC AAT GAC AA	

Alle Primer entstammten der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland).

2.1.7 Small interfering RNA

- Negative Control siRNA
- $\bullet\,$ siRNA GR
 - Sense r(GAC UUCA GBA UGG AGA AUU A)dTdT
 - Antisense r(UAA UUC UCC AUG CUG AGU C)dTdG

Alle siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) erworben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellmodell

Die Experimente wurden in Fettzellen der Maus vorgenommen, welche sich aufgrund der Analogie zum humanen Organismus und der Verfügbarkeit von MR-*Knockout*-Zellen besonders gut eigneten. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, weißen Präadipozyten entstammten der Mauslinie C57BL6. Einzig die Durchführung der MR-KO-Experimente fand in braunen Zellen statt, die von Berger et al. aus genetisch veränderten Mäusen (MR^{-/-}) etabliert und in unserer Arbeitsgruppe nach bereits publiziertem Protokoll methodisch aufgearbeitet wurden [121–123].

Alle Zellarbeiten wurden in einer Laminar-Flow-Einheit unter keim- und partikelarmen Bedingungen durchgeführt und entsprachen einer schnellen und sorgfältigen Arbeitsweise zur Vermeidung von langen Standzeiten außerhalb des Brutschrankes. Zum Einsatz kamen nur autoklavierte oder sterilisierte Materialien sowie Reagenzien, die unmittelbar vor ihrem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt worden waren.

2.2.2 Zellkultur

Das Auftauen der im flüssigen Stickstoff gelagerten Präadipozyten erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden zusammen mit 25 ml Grundmedium auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 150 mm aufgetragen und durch vorsichtiges Schwenken homogen auf dem Untergrund verteilt. Nachfolgend wurden die Kulturen täglich kontrolliert, um eine gleichmäßige Proliferation zu gewährleisten. Als Ziel stand dabei die Vermeidung von Zellanhäufungen im Vordergrund, um nicht an verschiedenen Stellen des Zellrasens – bedingt durch Zell-Zell-Kontakte – eine vorzeitige Fetteinlagerung und damit ein ungleichmäßiges Wachstum zu generieren. Die Kultivierung erfolgte im Wärmeschrank bei 37 °C mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 .

Erreichte der Zellrasen entsprechend der eingesetzten Zellmenge nach 2-5 Tagen eine Dichte von 70-80 %, erfolgte die Passagierung der Präadipozyten. Dieser Schritt beinhaltete das vorsichtige Absaugen des Grundmediums, das zweimalige Waschen mit PBS sowie die proteolytische Ablösung der adhärierten Zellen von der Bodenplatte durch Zugabe von 2,5 ml Trypsin bei 37 °C für 3 Minuten. Die flottierenden Zellen wurden in 32,5 ml Grundmedium aufgenommen und je nach Zelldichte der Suspension in Volumina von ungefähr 3 ml zum Fortbestand der Zelllinie auf eine Masterplatte (\emptyset 150 mm) überführt. Die portionierten Zellen erhielten zusätzlich 25 ml Grundmedium und wurden im Anschluss in den Brutschrank zurückgestellt.

Zur Eradikation eventuell vorhandener intrazellulärer Mykoplasmen wurden die Masterplatten unmittelbar nach dem Auftauen für eine Woche mit 2 % MycokillTM gemäß des Herstellerprotokolls behandelt und anschließend für weitere sieben Tage in Grundmedium kultiviert.

2.2.3 Differenzierung und Zellstimulation

Die Kultivierung der Zellen für Experimente erfolgte entweder auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm oder auf 6-well-Platten (6-well-Multidishes) im Rahmen der siRNA-Versuche. Unmittelbar nach dem Splitten, d. h. der Überführung der Zellen von einer Masterplatte auf Versuchsplatten analog zum Passagieren, wurden die Präadipozyten in 10 ml Differenzierungsmedium aufgenommen und unter täglicher Kontrolle bis zur vollständigen Entwicklung eines Monolayers im Brutschrank aufbewahrt. Die Ergänzung des Grundmediums um Triiodthyronin und Insulin - dann als Differenzierungsmedium bezeichnet - wirkt sich vorteilhaft auf die Zellentwicklung aus, indem ersteres über die Regulation von fettzellspezifischen Transkriptionsfaktoren zur Steigerung der Lipogenese beiträgt [124, 125] und Insulin unter anderem die Glukoseaufnahme durch die Einlagerung von Transportern in die Zellmembran fördert [126–128]. Nach Erreichen der vollständigen Konfluenz des Zellrasens innerhalb von 2-5 Tagen wurde das Differenzierungsmedium gegen Induktionsmedium ausgetauscht und für maximal 24 Stunden auf den Zellen belassen. Als Supplement im Induktionsmedium diente sowohl das antiinflammatorisch und proliferativ wirksame Indomethacin als auch 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) [129,130]. Letzteres fördert als cAMP-Phosphodiesteraseinhibitor über den cAMP/PKA-Signalweg die mitotisch klonale Expansion während der postkonfluenten Phase und leitet somit die Adipozytendifferenzierung ein [131–133].

Während der 6-tägigen Differenzierungsphase mit der charakteristischen Einlagerung von Fetttröpfchen wurde das Differenzierungsmedium täglich erneuert. Die chronische Stimulation der Zellen mit dem jeweiligen Agonisten, Antagonisten bzw. der Kombination aus beiden begann jeweils mit der Induktionsphase und erfolgte durch Pipettieren in die täglich wechselnde Nährlösung. Am Ende der Experimentalphase wurden die Zellen entweder sofort methodisch aufgearbeitet oder nach Dekantieren des Nährmediums in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -150 °C aufbewahrt.

2.2.4 Oil Red O-Färbung

Mit Hilfe dieses Diazofarbstoffs ist es möglich, neutrale Triglyzeride und Lipide zu visualisieren sowie photometrisch zu quantifizieren. Aufgrund seiner lipophilen Struktur ist er in der Lage, die Zellmembranen zu überwinden und sich in den fetthaltigen Kompartimenten anzureichern.

Die übersättigte Stammlösung (siehe Tabelle 2.5 auf Seite 20) wurde mit bidestilliertem Wasser im Verhältnis 3:2 verdünnt und zum Ausschluss von Feststoffpartikeln einer normobaren Filtration durch einen Faltenfilter unterzogen. Der Zellrasen auf den Versuchsplatten wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit 4%iger Formalinlösung für mindestens 15 min bei Raumtemperatur überschichtet. Nach Abgießen der Fixierlösung erfolgte die Zugabe von jeweils 5 ml der vorbereiteten Oil Red O-Färbelösung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Durch das vorsichtige Abspülen des Zellrasens mit bidestilliertem Wasser konnten überschüssige Mengen an Färbelösung und Feststoffpartikeln entfernt werden. In diesem Stadium wurde die Lipidakkumulation lichtmikroskopisch untersucht und die Zellkulturschalen als Ganzes eingescannt. Der ausschließlich intrazellulär verbliebene Farbstoff wurde durch die Zugabe von 5 ml Isopropanol auf jede Versuchsplatte für einen Zeitraum von 15 min bei Raumtemperatur extrahiert. Es folgte die 50-fache Verdünnung der gefärbten Alkohollösungen mit Isopropanol sowie die photometrische Messung der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 500 nm.

2.2.5 Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT PCR)

RNA-Isolation

Zur Gewinnung der Ribonukleinsäuren wurde das Prinzip des Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsverfahrens angewendet, welches 1987 von Chomczynski und Sacchi publiziert wurde [134, 135]. Aufgrund der toxischen Bestandteile erfolgte die Durchführung aller Schritte unter dem Laborabzug und die Lagerung der Proben während der einzelnen Zwischenschritte auf Eis, um eine Degradation durch ubiquitär vorkommende RNasen zu vermeiden.

Die bei -150 °C tiefgefrorenen Versuchsplatten wurden im leicht angetauten Zustand bei Raumtemperatur mit jeweils 1 ml Trizol[®] überschichtet und unter Verwendung eines Zellschabers in jeweils 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Homogenisierung der Proben im Vortexer für mindestens eine Minute und anschließend eine 10minütige Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4 °C. Die flüssige Phase zwischen dem oberen Lipidfilm einerseits und dem am Boden haftenden Pellet andererseits wurde vorsichtig mittels einer Pipette in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 250 µl Chloroform wurde der Ansatz für 15 Sekunden gevortext und unter zuletzt genannten Bedingungen zentrifugiert. Im Reaktionsgefäß zeigten sich drei Phasen, deren obere die RNA enthielt, während sich in der Inter- und der unteren Chloroform- und Phenolphase DNA und Proteine anreicherten. Von der oberen, wässrigen Phase wurden 700 µl in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert und eine gleich große Menge an kaltem Isopropanol zupipettiert. Durch initial leichtes Schwenken und eine anschließende, 10minütige Inkubationszeit führte dieser Reaktionsschritt zur Präzipitation der gewünschten RNA. Der Reaktionsansatz wurde erneut für 10 Minuten mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand durch vorsichtiges Dekantieren verworfen.

Zur qualitativen Aufwertung der Ribonukleinsäure erfolgte ein Reinigungsschritt, indem 1 ml an 75 %igem Ethanol zugegeben, die Suspension 15 Sekunden gevortext und erneut unter identischen Bedingungen zentrifugiert wurde. Anschließend konnte die überstehende Flüssigkeit vollständig mit einer Pipette entfernt und das zurückgebliebene RNA-Pellet in 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst werden. In diesem Stadium war das Aufbewahren der Proben bei -80 °C bis zum nächsten Verarbeitungsschritt möglich. Zwecks Aufreinigung der RNA-Proben folgte die enzymatische Spaltung von verbliebener DNA mittels spezifischer DNasen. Hierzu kam das RNA-Kit II von Macherey-Nagel gemäß dem Herstellerprotokoll zur Anwendung.

Herstellung der cDNA

Die gleiche Gesamtmenge an RNA in jeder Probe ist die notwendige Voraussetzung, um relative Expressionsänderungen eines Gens in verschiedenen Proben feststellen zu können. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde ein Absorptionsverhältnis A_{260/280} mit 260 nm für RNA und 280 nm für Proteine von 1,7 bis 2 als valide eingestuft. Die spektroskopische Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte bei 260 nm in einer Verdünnung von 1:50 als Doppelwert. Von jeder Probe wurde entsprechend der gemessenen RNA-Konzentration ein Volumen mit exakt 3 µg RNA in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf identische Volumina von 18 µl aufgefüllt. Es folgte die Herstellung und Zugabe des Primermixes, bestehend aus 1,5 µl Oligo-dT-Primer und 1,5 µl dNTP-Mix pro Probe. Die 5minütige Inkubation bei 65 °C im Thermocycler bewirkte eine Entfaltung der RNA und die Hybridisierung mit den Primern. Den anschließend auf Eis gelagerten Proben wurde der vorbereitete Transkriptase-Mix hinzupipettiert, dessen Zusammensetzung tabellarisch in Abschnitt 2.1.6 auf Seite 20 aufgelistet ist. Um die Primer mit Hilfe der thermostabilen Reversen Transkriptase zu elongieren, erwärmte der Thermocycler die Proben zunächst für 60 Minuten auf $45\,^{\circ}\mathrm{C}$ und im Folgeschritt zwecks Inaktivierung des Enzyms für 15 Minuten auf 70 °C.

Quantifizierende RT PCR

Die 1984 durch Kary Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction) ist ein Verfahren zur Verfielfältigung von spezifischen einzel- oder doppelsträngigen DNA-Abschnitten. Mit Hilfe von komplementären Sequenzen, sog. Primern, wird auf der DNA das gewünschte Zielgen flankiert und durch die hitzebeständige DNA-Polymerase in Anwesenheit aller vier Desoxyribonukleinsäuretriphosphate (dNTPs) die neue DNA des Zielgens synthetisiert. Ein solcher temperaturabhängiger Zyklus führt somit zu einer Verdopplung des gewünschten DNA-Abschnitts und kann beliebig oft, meist 25 bis 50 Mal, wiederholt werden. Ein entsprechender Amplifizierungszyklus besteht aus drei Schritten: der Strangtrennung, der Hybridisierung und der DNA-Synthese.

Die quantifizierende RT PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Eppendorf mit luftdicht verschliessbaren 96-well-Platten durchgeführt. Die Zusammensetzung des Probenansatzes ist der Tabelle 2.8 auf Seite 21 zu entnehmen. Die Amplifizierung der cDNA startete mit einer Erwärmung der Proben auf 95 °C und durchlief anschließend 40 Zyklen eines Zweiphasenprogramms bestehend aus 95 °C für 20 s und 60 °C für 30 s. Das unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimierte Haushaltsgen 36B4 wurde als interner Standard eingesetzt, anhand dessen die Expressionssteigerung oder -minderung eines gewünschten Zielgens bestimmt werden konnte. Die Messung der einzelnen Proben erfolgte jeweils als Doppelbestimmung. In Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen für jeden Primer bzw. jedes Zielgen hinsichtlich Temperaturen, Zyklusdauer und Anzahl der Zyklen sowie Verdünnung der cDNA-Proben erfaßt. Die Ergebnisse der Real-Time PCR wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta$ C-Methode berechnet [136, 137]:

$$Ratio = \frac{(E_{\text{target}})^{\triangle \text{CP}_{\text{target}}(\text{mean control - mean sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\triangle \text{CP}_{\text{ref}}(\text{mean control - mean sample})}}$$

2.2.6 Short-interfering RNA

Ist der genetische Code eines bestimmten Zielgens bekannt, so eröffnet die RNA-Interferenz die Möglichkeit, die Aktivität dieses Gens durch intrazelluläres Einschleu-
sen sequenzspezifischer mRNA-Abschnitte zu verringern. Für den im Fachjargon als *Knockdown* bezeichneten Prozess wurde in unserer Arbeitsgruppe die Technik der Nu-kleofektion etabliert:

Die Präadipozyten wurden auf 6-well-Platten bis zur vollständigen Konfluenz in Differenzierungsmedium kultiviert. Es folgte die Behandlung der Zellen mit Dexamethasonfreiem Induktionsmedium für bis zu 24 Stunden und im Anschluss ein täglicher Wechsel des Differenzierungsmediums bis zum dritten Tag nach der Induktion. Nach zweimaligem, vorsichtigem Waschen mit PBS wurden die Zellen mittels Trypsin von der Bodenplatte abgelöst und in Differenzierungsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gereinigt, indem sie zwei Mal mit 800-facher Erdbeschleunigung für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und zwischenzeitlich in PBS resuspendiert wurden. Im Anschluss wurden dem verbliebenen Pellet 200 pmol entweder einer GR-spezifischen siRNA oder einer Negativkontrolle mit scrambled siRNA zugegeben und der Ansatz mit 100 µl einer Nukleofektionslösung versehen. Die Durchführung der eigentlichen Elektroporation mit dem NucleofectorTM der Firma Amaxa lehnte sich an die Vorgabe des Herstellers an und erlaubte durch ein starkes elektrisches Feld eine Permeabilitätssteigerung der Zellmembranen. Die transfizierten Zellen wurden für zwei weitere Tage mit Differenzierungsmedium versorgt und desweiteren über Nacht in DMEM aufbewahrt, um einen Einfluss durch hormonhaltiges Serum zu vermeiden. Am sechsten Tag nach der Induktion wurden 100 nmol Kortikosteron hinzupipettiert und für zwei Stunden auf den Zellen belassen, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-150\,^{\circ}\mathrm{C}$ gelagert wurden.

Das Ausmaß des *Knockdown* wurde mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt, wobei jeweils die Proben mit GR-spezifischer siRNA denen mit scrambled siRNA, die aufgrund einer Nonsense-Nukleotidabfolge keine Hybridisierungstendenz aufwiesen, gegenübergestellt wurden. Um einen nachteiligen Einfluss der Elektroporation auf die Adipozyten auszuschließen, wurden jeweils Kontrollzellen parallel kultiviert, die nicht der Nukleofektion ausgesetzt waren.



Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau der O₂-Messapparatur

2.2.7 Sauerstoffverbrauch

Die Hauptquelle zur Erzeugung von Energie in Form von ATP befindet sich in eukaryotischen Organismen innerhalb der Mitochondrien. Durch die oxidative Phosphorylierung werden Elektronen von den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH₂ über eine Reihe von Elektronenträgern auf O_2 übertragen. Der Sauerstoffverbrauch stellt somit das Endglied in der zellulären Atmungskette und damit dem Prozess der Energiegewinnung dar.

Apparatur:

In Abbildung 2.1 wird der Aufbau des Oxygraph-Systems der Firma Hansatech Instruments dargestellt. Die Probenkammer selbst ist zusammengesetzt aus einer Elektrodenplatte und einem Hohlzylinder aus Plexiglas, in dessen Wandung vortemperiertes Wasser aus einem Heizbad zirkuliert und auf diese Weise eine optimale Temperatur von 37 °C gewährleistet. Durch Zugabe eines Ministabmagneten in die Probenkammer und Positionierung der Apparatur auf einem Magnetrührer ist die vollständige Durchmischung der Zellsuspension während der gesamten Messung möglich. Die elektrischen Signale aus der Probenkammer werden an einen Computer weitergeleitet und können unter Verwendung der Herstellersoftware OxygraphPlus visualisiert werden.

Aufbau:

Der Zusammenbau der Probenkammer begann mit dem Aufbringen von einigen Tropfen einer halbgesättigten Kaliumchloridlösung (17,5 g KCl in 100 ml H_2O) sowohl auf die Platinelektrode an der Kuppelspitze als auch auf die zirkuläre Silberelektrode am Boden der Messzelle. Um die räumlich voneinander getrennten Leiter elektrisch miteinander zu verbinden, wurde ein 2 cm x 2 cm großes Stück Zigarettenpapier auf die Kuppelspitze aufgesetzt. Infolgedessen saugte das Papier die Flüssigkeit auf und legte sich haubenartig über die Kuppel, sodass sich eine "flüssige Strombrücke" zwischen der Platinkathode und der Silberanode bildete. Als Trennung zwischen der Platin-Elektrode und der darüber befindlichen Zellsuspension wurde eine sauerstoffdurchlässige Teflonmembran (2 cm x 2 cm) aufgesetzt. Diese wurde über das flüssigkeitsgetränkte Papier gelegt und mit einem Gummiring unter Zuhilfenahme eines Applikators luftblasenfrei über die Kuppel gestreift. Nach Zugabe von weiterer KCl-Lösung auf die Silberelektrode und Aufsetzen der Dichtungsringe wurde der Hohlzylinder aus Plexiglas auf die Elektrodenplatte aufgeschraubt und die elektrische Verbindung zum Computer hergestellt.

Kalibration:

Nach dem Start der Software OxygraphPlus auf dem angeschlossenen Computer wurden die Werte für Temperatur und Luftdruck eingegeben. Die Probenkammer wurde zunächst durch die Verbindung zum Heizbad auf 37 °C vortemperiert und anfänglich mehrfach mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte das Einfüllen von 1 ml dH₂O und das Einbringen eines Ministabmagneten in die Probenkammer. Der Rührfisch wurde sowohl beim Kalibrieren als auch bei den eigentlichen Messungen stets mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 50 Umdrehungen pro Sekunde betrieben. Um die Dichtigkeit der Teflonmembran zu überprüfen, wurde der laufende Rührfisch jeweils nach 5 und 30 Minuten angehalten und die ganze Messzelle auf die Entwicklung von Gasansammlungen abgesucht. Es folgte der Verschluss der Probenkammer mit einem passenden Plexiglaszylinder gegenüber dem umgebenden Luftsauerstoff. Über das Computerprogramm wurde das automatische Kalibrierungsverfahren gestartet und mit dem Einleiten von reinem Stickstoff in die Probenkammer fortgesetzt, um den Sauerstoff vollständig aus der Probenkammer zu verdrängen und somit eine Nulllinie festzulegen.

Messung des Sauerstoffgehalts:

Die Adipozyten wurden in 10 cm-Schalen kultiviert und bis zum Tag 6 chronisch stimuliert. Die Versuchsplatten wurden nacheinander der Sauerstoffmessung zugeführt, dessen Durchführung aus Gründen der Reproduzierbarkeit einem exakten Zeitprotokoll unterworfen war.

Vor jeder Messreihe wurde die Probenkammer zunächst mehrfach mit DMEM gespült und eine Kontrollmessung zur Bestätigung der intakten Teflonmembran mit 1 ml reinem DMEM für mindestens 6 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden in die Probenkammer des Oxygraphen 600 µl DMEM vorgelegt. Die zu messende Versuchsplatte wurde dem Brutschrank entnommen, das Nährmedium abgesaugt und die adhärenten Fettzellen zweimalig mit PBS gewaschen. Zur Vereinzelung der Zellen erfolgte die Zugabe von 1 ml Trypsin und eine 3-minütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Adipozyten quantitativ von der Bodenplatte abgelöst und die weitere Vereinzelung durch wiederholtes Pipettieren forciert. Die Überführung der Zellen in 10 ml Differenzierungsmedium inaktivierte schließlich das Trypsin durch seinen Gegenspieler Antitrypsin und die Zellvereinzelung wurde durch erneutes Pipettieren weiter vervollständigt. Bei 1500 rpm und 37 °C schloss sich eine 3-minütige Zentrifugation der Suspension mit anschließendem Entfernen des Überstandes an. Das verbliebene Pellet wurde in 1ml DMEM aufgenommen und mit einer 1000 µl-Pipette vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden 400 µl dieser Zellsuspension zu den vorgelegten 600 µl DMEM in die Probenkammer des Oxygraphen pipettiert. Die eigentliche Messung des Sauerstoffverbrauchs startete unmittelbar nach Verschluss der Messzelle durch Aktivierung über das Computerprogramm und dauerte in allen Fällen mindestens 6 Minuten. Am Ende jeder Messung wurden bei laufendem Magnetrührer exakt 800 µl der gemessenen Zellsuspension für die nachfolgende Proteinmengenbestimmung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, für 5 Minuten bei 4 °C mit 1500 rpm zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Zellpellet nach Resuspension mit 500 µl frisch angesetztem Lysispuffer (siehe Tabelle 2.6 auf Seite 20) bei 80 °C gelagert. Nach Abschluss der gesamten Messreihe wurde erneut eine DMEM-Kontrollmessung ausgeführt, um einerseits die Funktionalität der Teflonmembran sicherzustellen und andererseits die Veränderung der Sauerstoffpermeabilität in die exakte Berechnung aufnehmen zu können.

Funktionsprinzip:

Elektrochemisch nimmt der durch die Teflonmembran diffundierende Sauerstoff an der negativen Platinkathode Elektronen auf und wird über die Zwischenstufe des Wasserstoffperoxids zu Hydroxylionen reduziert. Gleichzeitig geben die Silberatome an der Anode Elektronen ab und bilden als Ag⁺-Ionen mit den CI⁻Ionen aus der überstehenden Lösung schwerlösliches Silberchlorid. Diese Verbindung wird nach vielen Messungen makroskopisch als schwarze Verfärbung auf der Silberanode sichtbar und ist mittels feinem Schleifpapier leicht zu entfernen. Durch die Abschirmung der Platinelektrode gegenüber der Zellsuspension kommt ein Stromfluss nur durch die Anwesenheit des gelösten Sauerstoffs zustande. Der in der Zellsuspension vorhandene Sauerstoffpartialdruck ist somit direkt proportional zum gemessenen Stromfluss.

Messung der Proteinmenge:

Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Sauerstoffmessungen wurde jeweils die Zellzahl anhand der Proteinmenge abgeschätzt. Die im Lysispuffer eingefrorenen Proben aus jeder Sauerstoffmessung wurden auf Eis aufgetaut und anschließend im Schwenkrad bei 4 °C für 10 Minuten durchmischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt ebenfalls bei 4 °C mit 13000 rpm für weitere 10 Minuten. Die spektroskopische Messung der Konzentration der im Überstand enthaltenen Proteine erfolgte nach der Methode von Bradford durch die Verwendung von BSA-Standard und Bradford Proteinassay bei $\lambda = 280$ nm.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaStat Version 3.0 durchgeführt, die graphische Darstellung erfolgte mittels SigmaPlot Version 10.0 von Systat Software. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschieds zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Versuchsbedingung vom Sollwert der Kontrolle wurde der Einstichproben-t-Test, zwischen den Versuchsbedingungen untereinander die univariate Varianzanalyse (Oneway-ANOVA) angewendet. Bei einem p-Wert < 0,05 erfolgte die Kennzeichnung als signifikant mit einem Asteriskus (\star), bei zusätzlicher Erfüllung der Bonferroni-Holm-Prozedur mit zwei Asterisken ($\star\star$). Den Prozentangaben im Text wurden zusätzlich die 95%-Konfidenzintervalle angefügt.

3 Ergebnisse

3.1 Transdifferenzierung

3.1.1 Differenzierungsverhalten

Eine wesentliche Voraussetzung zur Objektivierung der Messergebnisse ist die gleiche Differenzierung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, wurde die Einlagerung von Lipidtropfen während der Differenzierungsphase untersucht. Nach Aussaat der Präadipozyten und Erreichen der vollständigen Konfluenz wurden die Zellen für 24 Stunden in Induktionsmedium kultiviert und in den folgenden 6 Tagen chronisch mit Stimulations- oder Kontrolllösung behandelt. Die lipidspezifische Oil Red O-Färbung wurde am Tag 0 direkt nach Ablauf der Induktion, am Tag 3 sowie am Tag 6 durchgeführt. Die Intensität der Rotfärbung ist dabei direkt proportional zur gebildeten Menge an Lipiden (siehe Abschnitt 2.2.4 auf Seite 24). Die Behandlung der Adipozyten mit Aldosteron, Dexamethason oder wirkstofffreier Kontrolllösung lieferte während der gesamten Differenzierungsphase weder auf mikroskopischer Ebene (Daten nicht gezeigt) noch auf makroskopischer Ebene signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 34).

Zur Objektivierung der bildmorphologischen Eindrücke wurde jeweils der Oil Red O-Farbstoff mittels Isopropanol aus den fetthaltigen Kompartimenten der Zellen herausgelöst und die Konzentration spektroskopisch gemessen (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 35). Die ergänzende Methode bestätigte, dass die chronische Stimulation keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten ausübte.



Abbildung 3.1: Differenzierungsverhalten unter chronischer Stimulation

Um die Einlagerung der Lipidtropfen während der Differenzierungsphase charakterisieren zu können, wurden die Adipozyten entweder mit Aldosteron (Grafik oben) oder mit Dexamethason (Grafik unten) chronisch behandelt und jeweils an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 einer Oil Red O-Färbung unterzogen. Beide Darstellungen zeigen repräsentative Ergebnisse von jeweils sechs unabhängig durchgeführten Experimenten.



Abbildung 3.2: Spektroskopische Messung der Oil Red O-Färbungen an Tag 6 Die Adipozyten wurden ab Induktion bis zum Tag 6 jeweils chronisch mit Aldosteron (oben) oder mit Dexamethason (unten) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach Färbung der Fetttröpfchen mit einer lipidspezifischen Oil Red O-Lösung wurde der Farbstoff extrahiert und spektroskopisch vermessen. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede im Differenzierungsverhalten bei jeweils sechs insgesamt durchgeführten Experimenten. Die Säulendiagramme stellen die Mittelwerte und Standardfehler dar.

3.1.2 Expression brauner Fettzellmarker

Braune Adipozyten haben im Gegensatz zu den weißen die besondere Fähigkeit, die oxidative Phosphorylierung von der ATP-Produktion zu entkoppeln. Eines der an diesem Prozess beteiligten Proteine ist das UCP-1, welches einen Kurzschluss in der mitochondrialen Protonenbatterie ermöglicht und folglich in der Energiebilanz Wärme freisetzt.



Abbildung 3.3: Wirkung von MR und GR auf die RNA-Expression von UCP-1 Infolge einer chronischen Stimulation mit Aldosteron zeigte sich eine Steigerung der UCP-1mRNA-Expression, die in Anwesenheit von Eplerenon tendenziell auf Kontrollniveau antagonisierbar war. Durch entsprechende Behandlung mit Dexamethason kam es zu einer hochsignifikanten Hemmung. Beide Abbildungen illustrieren die Ergebnisse als Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen mit den jeweiligen Standardfehlern (p-Werte < 0.05 mit zusätzlich bestandener Bonferroni-Holm-Prozedur sind mit zwei Asterisken gekennzeichnet).

Beim Vergleich der chronisch bis zum Tag 6 stimulierten Zellen ergaben sich hinsichtlich der mineralo- und glukokortikoiden Wirkungen gegensätzliche Ergebnisse. Die Verwendung von 10 nM Aldosteron führte zu einer Erhöhung um 60 % (95 %-KI: 0,93 bis 2,29) bei der Bildung von mRNA für UCP-1 bezogen auf die Ethanol-Kontrolle. Um zu zeigen, dass diese Wirkung spezifisch über den mineralokortikoiden Rezeptor übermittelt wird, wurden Experimente mit dem selektiven Antagonisten Eplerenon durchgeführt.



Abbildung 3.4: Kortikoide Wirkung auf die PGC-1a-Expression

Die mineralokortikoide Behandlung führte bei chronischer Exposition vollständig reversibel zu einer Steigerung der mRNA-Menge von PGC-1 α (obere Grafik), während die chronische Exposition mit Dexamethason keine Wirkung hatte (untere Grafik). Beide Darstellungen zeigen die Säulendiagramme als Mittelwerte mit Standardfehlern aus jeweils sechs unabhängigen Versuchen. Signifikante p-Werte < 0,05 sind mit einem Asteriskus, bei zusätzlich bestandener Bonferroni-Holm-Prozedur mit zwei Asterisken gekennzeichnet.

Sowohl in der Kombination von Agonist und Antagonist als auch in Anwesenheit von Eplerenon allein waren die Effekte auf Kontrollniveau. Bei identischen Versuchsbedingungen mit 10 nM bzw. 100 nM Dexamethason im Nährmedium wurde hingegen die Expression der UCP-1-mRNA in beiden Fällen hochsignifikant um 80 % (95 %-KI: 0,03 bis 0,37) bzw. 62 % (95 %-KI: 0,16 bis 0,60) reduziert.

PGC-1 α stellt neben UCP-1 einen weiteren spezifischen Marker für braunes Fettgewebe dar. Es spielt eine Schlüsselrolle für den Differenzierungsprozess in braunen Fettzellen und ist für die Regulation des Energiemetabolismus inklusive der mitochondrialen Biogenese verantwortlich.

Durch die chronische Stimulation mit Aldosteron kam es zu einer signifikanten Steigerung um mehr als 50 % (95 %-KI: 1,21 bis 1,86). In Kombination mit Eplerenon genauso wie im Vergleich zur Eplerenonbehandlung allein zeigte sich die PGC-1 α -Expression auf Kontrollniveau.

Eine glukokortikoide Beeinflussung durch Dexamethason in den verwendeten Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden.

3.2 Thermogenese

3.2.1 Einfluss auf die mitochondriale Biogenese

Um die Effekte von gluko- und mineralokortikoiden Rezeptoren auf die Thermogenese genauer zu untersuchen, ist ein Blick auf mitochondriale Marker unerlässlich. Ein wesentlicher Bestandteil der Atmungskette ist dabei Cytochrom c, welches in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Dieses Protein ist als Elektronenakzeptor und -donator direkt an der Ladungstransportkette beteiligt, sodass die Expression Hinweise auf die Menge der Mitochondrien und folglich auf den Energiemetabolismus liefert. Wurden die Zellen bis Tag 6 dauerhaft einer Konzentration von 10 nM Aldosteron ausgesetzt, erhöhte sich die Bildung von mRNA signifikant und war unter Zugabe des Antagonisten vollständig reversibel.

Die chronische Stimulation mit Dexamethason zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt, wobei ein dosisabhängiger Trend zur Erhöhung deutlich wurde.



Abbildung 3.5: Kortikoide Wirkung auf die Cytochrom-c-Expression

Unter dem chronischen Einfluss von Aldosteron zeigte sich, wie in der oberen Abbildung dargestellt, eine signifikante Erhöhung. In Anwesenheit des mineralokortikoiden Antagonisten Eplerenon wurde dieser Effekt komplett aufgehoben. Konzentrationsabhängig entwickelte Dexamethason zwar ebenfalls tendenziell eher eine Steigerung, die aber in insgesamt sechs unabhängigen Versuchen als nicht signifikant zu bewerten ist (untere Abbildung). Illustriert sind die Mittelwerte mit Standardfehlern, deren Signifikanzniveau im Fall von p-Werten < 0,05 mit einem Asteriskus gekennzeichnet sind.

NRF-1 (*nuclear respiratory factor-1*) ist wesentlich beteiligt an der Expression von respiratorischen Untereinheiten sowie mitochondrialen Transkriptionsfaktoren und wird als ein Bindeglied in den nukleo-mitochondrialen Verknüpfungen gesehen. Als Dimer mit PGC-1 α ist das Protein in der Lage, unter anderem TFAM (*transcription factor A*, *mitochondrial*) zu induzieren und so die mitochondriale Biogenese ausgehend vom Zellkern zu beeinflussen. Hinsichtlich beider Marker untermauern diese Versuche sowohl für



Abbildung 3.6: Kortikoide Wirkung auf die NRF-1-Expression

Dargestellt ist die Expression des nukleären Respirationsfaktors-1 (NRF-1) unter chronischer MR- und GR-Stimulation. Die signifikante Steigerung der Expression durch Aldosteron konnte mittels Eplerenon als selektiven MR-Antagonisten aufgehoben werden. Unter Aktivierung des glukokortikoiden Rezeptors stellte sich eine dosisabhängige Verstärkung dar. Die Säulendiagramme zeigen die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Standardabweichung. Signifikante p-Werte < 0,05 sind mit einem, bei zusätzlich bestandener Bonferroni-Holm-Prozedur mit einem doppelten Asteriskus versehen.

die mineralokortikoide als auch für die glukokortikoide Behandlung unter chronischen Bedingungen die bisherigen Ergebnisse: Aldosteron erhöhte reversibel die Expression sowohl von NRF-1 als auch tendenziell von TFAM, während Dexamethason in der niedrigen Konzentration keinen Effekt zeigte und bei 100 nM eher eine Expressionszunahme bewirkte.



Abbildung 3.7: Kortikoide Wirkung auf die TFAM-Expression

In den Grafiken ist die Expression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (TFAM) unter 6-tägiger Stimulation des MR bzw. GR dargestellt. Unter Zugabe von 10 nM Aldosteron zeigte sich ein tendenziell reversibler Anstieg um 20 % bezogen auf die Kontrolle. Die Stimulation mit 10 nM Dexamethason war wirkungslos, bei 100 nM kam es zu einem nichtsignifikanten Anstieg um knapp 30 % der TFAM-Expression. Die Diagramme zeigen jeweils die Mittelwerte mit Standardfehlern von sechs unabhängig durchgeführten Experimenten, die bei einem Signifikanzniveau von p < 0,5 mit einem Asteriskus gekennzeichnet sind.

3.2.2 Stimulation in GR-Knockdown-Zellen mit Kortikosteron

Die chronische Exposition der Adipozyten mit Aldosteron hatte in den vorangegangen Experimenten eine deutliche Steigerung der UCP-1 und PGC-1 α -Expression gezeigt, die unter Anwesenheit des Antagonisten Eplerenon vollständig reversibel waren. Während unter gleichen Bedingungen die Stimulation mit Dexamethason für UCP-1 den gegenteiligen und für PGC-1 α keinen Effekt erbrachte, wurde das RNA-Expressionsprofil von beiden Markern bei vermindert exprimiertem GR mittels der Methode der *shortinterfering* RNA untersucht. Dafür wurden weiße Fettzellen nach initialer Kultivierung in Differenzierungsmedium einem GR-spezifischen *Knockdown* am Tag 3 nach der Induktion unterzogen. Die Menge des glukokortikoiden Rezeptors wurde dabei mittels RNA-Expressionsanalyse bestimmt und konnte durchschnittlich um 80 % reduziert werden (Daten nicht gezeigt). An Tag 6 erfolgte eine 2-stündige Stimulation mit 100 nM Kortikosteron, welches ein agonistisches Potenzial sowohl für den mineralokortikoiden als auch den glukokortikoiden Rezeptor bietet. Als Resultat fand sich eine signifikante Steigerung von UCP-1 um mehr als 50 % (95 %-KI: 141,67 bis 167.00).



Abbildung 3.8

Expressionssteigerung von UCP-1 und PGC-1 α durch GR-Knockdown

Nach einer vorausgegangenen Transfektion mit GR-spezifischer siRNA wurden die Adipozyten an Tag 6 für 2 Stunden mit 100 nM Kortikosteron stimuliert. Das Balkendiagramm zeigt die deutliche Expressionssteigerung von UCP-1 und PGC-1 α unter Berücksichtigung des konstitutiv exprimierten Kontrollgens 36B4. Die Darstellung veranschaulicht die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen (doppelter Asteriskus bei p-Werten < 0,05 und zusätzlich bestandener Bonferroni-Holm-Prozedur).



Abbildung 3.9: UCP-1-Expression in MR-Knockout-Präadipozyten

Nach Erreichen der vollständigen Konfluenz wurde die basale UCP-1-Expression in MR-Knockout-Zellen mit Wildtyp-Kontroll-Adipozyten verglichen. Die Synthese von mRNA kam durch das Fehlen des mineralokortikoiden Rezeptors praktisch zum Erliegen. Die Grafik illustriert die Ergebnisse als Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweiligem Standardfehler. Bei einem p-Wert < 0,05 und zusätzlich bestandener Bonferroni-Holm-Prozedur erfolgte die Kennzeichnung mit einem doppelten Asteriskus.

3.2.3 Basale UCP-1-Expression in MR-Knockout-Zellen

Eine vielversprechende Möglichkeit, um die Beteiligung eines Rezeptors an einem bestimmten Effekt nachzuweisen, liegt in der Stilllegung des Rezeptors selbst. An dieser Stelle sei ein herzlicher Dank gerichtet an Julia Hoppmann für die umfangreichen Arbeiten sowohl bezüglich der GR-*Knockdown*- als auch der MR-*Knockout*-Experimente. Um den Einfluss des mineralokortikoiden Rezeptors bezüglich der Thermogenese zu untersuchen, wurden braune Fettzellen aus sog. MR-*Knockout*-Mäusen kultiviert. Der Nachweis der erfolgreichen, mineralokortikoiden Rezeptordepletion konnte mittels Genotypisierung geführt werden. Bei der Kultivierung dieser MR-*Knockout*-Zellen zeigte sich allerdings eine ausgesprochen geringe Differenzierungstendenz, sodass zum Ausschluss entwicklungsbedingter Inhomogenitäten die Durchführung der Experimente unmittelbar nach Erreichen der Konfluenz sinnvoll erschien. Dabei wurde bewußt auf die folgende Induktion zum Einleiten der Differenzierungsphase verzichtet, da die Zugabe von Indomethacin und IBMX für initiale Stoffwechselveränderungen gesorgt hätte. Durch den fehlenden mineralokortikoiden Rezeptor kam es zu einer hochsignifikanten Reduktion der basalen UCP-1-mRNA-Expression um mehr als 98 % (95 %-KI: -2,03 bis 5,01).

3.2.4 Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs via MR und GR

Die Atmungskette ist ein elementarer Bestandteil für die Energiegewinnung und findet bei Eukaryonten in den Mitochondrien statt. Einer der letzten Schritte innerhalb dieser komplexen Reaktionskaskade ist die exergonische Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Die Messung dieses O₂-Verbrauchs ermöglicht somit direkte Aussagen über die Aktivität der Mitochondrien.

Im vorliegenden Experiment wurden die Adipozyten chronisch ab der Induktionsphase entweder mit 100 nM Aldosteron oder mit 10 nM bzw. 100 nM Dexamethason behandelt. Die Sauerstoffverbrauchsmessung wurde am Tag 6 durchgeführt und zur Feststellung identischer Zellmengen um eine Proteinmessung ergänzt. Im Endergebnis zeigte sich durch die mineralokortikoide Stimulation eine signifikante Erhöhung des oxidativen Stoffwechsels um 25 % (95 %-KI: 107,59 bis 144,16), welcher durch die Antagonisierung mit Eplerenon vollständig reversibel war. Die Aktivierung der glukokortikoiden Rezeptoren bewirkte in niedrigen Konzentrationen mit Dexamethason keinen signifikanten Effekt, während in 10-fach höheren Dosen eine deutliche Steigerung des Sauerstoffverbrauchs um knapp 70 % (95 %-KI: 153,10 bis 185,70) gemessen wurde.



Abbildung 3.10: Sauerstoffverbrauch in Adipozyten

Fettzellen wurden ab Induktion entweder mit Aldosteron oder Dexamethason chronisch behandelt und bis zum Tag 6 vollständig differenziert. Die Messung des O₂-Verbrauchs zeigte eine reversible, signifikante Steigerung durch Stimulation des MR mittels Aldosteron, während eine glukokortikoide Aktivierung durch Dexamethason nur in hohen Dosen verstärkend wirkte. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern aus vier unabhängigen Versuchen (p-Werte < 0,05 sind mit einem, bei zusätzlich bestandener Bonferroni-Holm-Prozedur mit zwei Asterisken gekennzeichnet).

4 Diskussion

Adipositas stellt einen Manifestationsfaktor für das Metabolische Syndrom dar und begünstigt die Genese von kardiovaskulären, neoplastischen und endokrinologischen Erkrankungen. Ein Überschuss an Fettmasse, besonders im viszeralen Bereich, ist dabei assoziiert mit Insulinresistenz, Hyperglykämie, Dyslipoproteinämie, arterieller Hypertension sowie prothrombotischen und proinflammatorischen Zuständen [138–143]. Die Existenz des mineralo- und glukokortikoiden Rezeptors im Fettgewebe ist seit langem bekannt [144–146] und erst kürzlich wurden ihre Wirkungen bezüglich subchronischer Entzündungsprozesse und Adipogenese beschrieben [147–149].

Die Beeinflussung der Thermogenese durch das Fettgewebe sowie die Transdifferenzierung weißer Adipozyten in Richtung eines braunen Fettzellphänotyps als antiadipöse Strategie ist in der wissenschaftlichen Literatur nur unzureichend erforscht. Die vorliegende Arbeit analysiert daher erstmals die Wirkung der beiden Steroidhormonrezeptoren auf den oxidativen Metabolismus im weißen Fettgewebe und belegt eine prothermogene, transdifferenzierende Wirkung infolge Stimulation des mineralokortikoiden Rezeptors sowie einen überwiegend konträren Effekt durch den glukokortikoiden Rezeptor.

Die Durchführung der Experimente erfolgte in einem eingehend charakterisierten und etablierten Zellmodel mit SV 40 T-Antigen-immortalisierten Adipozyten. In den jeweiligen Stimulationsversuchen wurden Aldosteron bzw. Dexamethason als Agonisten für den MR bzw. GR sowie Eplerenon als selektivem MR-Gegenspieler eingesetzt. In den folgenden Abschnitten wird auf das Differenzierungsverhalten, die veränderten Expressionsmuster hinsichtlich brauner Fettzellmarker, auf die Veränderung in der mitochondrialen Biogenese sowie auf die Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs als Endglied des energetischen Stoffwechsels näher eingegangen. Um die Signaltransduktion über den jeweiligen Rezeptortypus deutlicher hervorzuheben, wurden zudem Versuche in GR-*Knockdown*- und MR-*Knockout*-Zellen miteinbezogen.

4.1 Transdifferenzierung

4.1.1 Differenzierungsverhalten

Die in den Experimentalreihen eingesetzten Zellen entstammen dem etablierten Zellmodell von Herrn Prof. Dr. med. Klein und beinhalten alle wesentlichen Merkmale einer Fettzelle hinsichtlich Thermogenese, Insulinsensitivität, Adipokinexpression und Lipidakkumulation [122, 123]. Um möglichst Fettzellen mit einem hohen Proliferations- und Differenzierungspotential zu erhalten, wurde die Entnahme des Gewebes aus neugeborenen Mäusen getätigt [150–152]. Die anschließende Immortalisierung der Fettzellen gestattete die Kultivierung einer Zelllinie, welche im Gegensatz zu stets neu entnommenen Fettzellen eine ständige Verfügbarkeit, Reinheit, genaue Handhabung, einen homogenen Zellzyklus und unverfälschte Ergebnisse – ausgelöst beispielsweise durch Differenzierungsunterschiede – garantierte.

Wie sich in den letzten Jahren gezeigt hat, ist die Differenzierung von Adipozyten mit einem ausgesprochen komplexen Netzwerk von Transkriptionsfaktoren und Signalwegen verknüpft [150,153,154]. Bezüglich des mineralokortikoiden Rezeptors liegen sowohl für weiße als auch für braune Adipozyten wissenschaftliche Daten vor. Penfornis et al. beobachteten in braunen T37i-Zellen einen induktiven Effekt von Aldosteron auf die Einlagerung von Triglyzeriden und die Expression früh in der Differenzierungsphase auftretender Adipogenesemarker [155]. Für Fettzellen mit weißem Phänotypus liegen analoge Daten von Caprio et al. sowie von Rondinone et al. vor [145,148]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls eine erhöhte Lipidakkumulation bei chronischer Stimulierung mit Aldosteron festgestellt werden, wenn die Zellen in entsprechender Weise mit steroidfreiem Medium kultiviert worden waren (Daten nicht gezeigt). Unter physiologischen Bedingungen mit normalem, steroidhaltigem Medium konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Aldosteron-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die mikroskopischen und makroskopischen Ergebnisse wie auch die objektivierten, spektroskopisch gemessenen Lipidmengen mittels Oil Red O-Färbung ergaben einen stimulationsunabhängigen Differenzierungsprozess. Als Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen und als Annäherung an die physiologischen Verhältnisse wurden alle weiteren Experimente in steroidsupplementiertem Medium durchgeführt.

In zahlreichen Fettzellmodellen ist Dexamethason als Bestandteil des Induktionsmediums etabliert. Dieses begünstigt über eine Expressionssteigerung von CREB (cAMP response element binding protein) sowie über eine Verminderung von PREF-1 (preadipocyte factor-1) den Wechsel von der Proliferations- zur Differenzierungsphase [151,156]. Aufgrund der direkten Vergleichbarkeit bei Stimulation von mineralo- und glukokortikoidem Rezeptor wurde hier auf den Dexamethasonzusatz verzichtet, um den GR während der Aldosteronbehandlung möglichst nicht durch das Induktionsmedium zu beeinflussen. Neben dieser Stimulation des GR für Stunden in der postkonfluenten Phase ist die Datenlage bezüglich einer chronischen Dexamethason-Behandlung und der Auswirkung auf die Lipidakkumulation unzureichend. Sowohl die späte als auch die langfristige Exposition mit Dexamethason wurde von Caprio et al. untersucht und führte zu einer Hemmung der terminalen Fettzellreifung [148]. Die Durchführung der Experimente erfolgte allerdings in serumfreien Medium, sodass die glukokortikoid-induzierten, inhibitorischen Effekte auf die Lipidakkumulation unter physiologischen Gesichtspunkten nicht beurteilbar sind. Interessanterweise haben Versuche in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass in braunen GR-Knockout-Zellen initial eine gestörte Fettzelleinlagerung zu beobachten ist, welche aber in der folgenden Differenzierungsphase wieder kompensiert wurde [147]. Dies bestätigt die Bedeutung des glukokortikoiden Rezeptors für die frühe Differenzierungsphase und steht im Einklang mit unseren differenzierungsunabhängigen Ergebnissen sowie den Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe von Gregoire [151].

In der klinischen Erfahrung kann man bei langjährig bestehendem Hyperkortisolismus – allgemein auch als Cushing-Syndrom bezeichnet – die Entwicklung einer stammbetonten Adipositas bei den Patienten beobachten. Experimente mit transgenen Mäusen, die selektiv im Fettgewebe ein Kortisol-aktivierendes Enzym überexprimierten und somit einen iatrogen induzierten Hyperkortisolismus erfuhren, etablierten ebenfalls eine Tendenz zur Ausbildung einer viszeralen Adipositas [99]. Für diese scheinbar widersprüchlichen Erkenntnisse gibt es eine einfache Erklärung: Aufgrund der langen Beobachtungszeiträume in vivo sowohl innerhalb der Versuchsreihen von Masuzaki von bis zu 18 Wochen als auch innerhalb des Cushing-Syndroms ist es verständlich, wenn sich in unserem in vitro-Modell innerhalb von sechs Tagen nach Induktion diese Lipidakkumulation nicht bemerkbar gemacht hat.

4.1.2 Braune Fettzellmarker

Das Entkoppelungsprotein UCP-1 besitzt eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Transdifferenzierung und Thermogenese gleichermaßen. Als Protonenkanal erlaubt es einen direkten Kurzschluss innerhalb der mitochondrialen Protonenbatterie und trennt somit die oxidative Phosphorylierung von der ATP-Produktion unter Umwandlung zuvor chemisch gespeicherter Energie in Wärme. Das Protein ist ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran von braunen Fettzellen lokalisiert und stellt demzufolge einen charakteristischen Marker für diesen Gewebstyp dar, sodass es die phänotypische Änderung von weiß nach braun widerspiegelt [157]. Bekanntermaßen kann UCP-1 auf transkriptionaler Ebene durch Kälteexposition, Retinolsäure, Schilddrüsenhormone sowie über die Stimulation durch das Sympathische Nervensystem reguliert werden [78, 146, 158, 159]. Zusätzlich ist der Ionentransport im aktiven Kanal posttranslational auch über Purinnukleotide steuerbar, die an der zytosolischen Seite des Proteins eine Bindungsstelle besitzen, sowie über Fettsäuren, die als "second messenger" bei der Stimulation von β 3-Adrenozeptoren durch Noradrenalin freigesetzt werden [160, 161]. In stattgehabten Experimenten mit braunem Fettgewebe konnte sowohl in unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen bei akuter Stimulation des MR mittels Aldosteron eine deutliche Erniedrigung der UCP-1-Expression nachgewiesen werden [149, 162]. Während all diese Ergebnisse in braunem Fettgewebe generiert wurden und zum Teil nur eine Stimulationsdauer über Stunden besaßen, steht demgegenüber das Ergebnis der jetzigen Studie in weißen Adipozyten mit einer deutlichen, reversiblen Steigerung der Boten-RNA für UCP-1 infolge einer chronisch, selektiven Stimulation des MR. Derartige UCP-1-Erhöhungen in weißen Adipozyten waren zuvor auch schon durch Behandlung mit insulinsensitiven Thiazolidindionen sowie durch Blockade des Cannabinoidrezeptors Typ 1 gezeigt worden [163, 164].

Interessanterweise lieferte unsere Versuchsreihe mit Stimulation des GR durch Dexame-

thason signifikante Erniedrigungen bezüglich der UCP-1-Spiegel. Den gleichen Effekt fanden verschiedene Arbeitsgruppen in braunen Fettzellen [162, 165], der durch die Anwendung des GR-Antagonisten Mifepriston (RU-486) entsprechend bestätigt werden konnte [165, 166]. Als Konsequenz ergibt sich, dass die Aktivierung von mineralokortikoidem und glukokortikoidem Rezeptor in weißem bzw. braunem Fettgewebe für die UCP-1-Expression gegensätzliche Effekte zeigt und einmal mehr einen wichtigen Unterschied zwischen beiden Fettgewebstypen markiert.

PGC-1 α wurde 1998 von Puigserver et al. als kälteinduzierbarer Koaktivator von Rezeptoren im Zellkern entdeckt und ist im braunen Fettgewebe wesentlich stärker exprimiert als im weißen [78]. Dabei steht das Protein am Anfang einer gut untersuchten Signalkaskade, die über die Beteiligung von NRF-1 und TFAM zur Aktivierung mitochondrialer Prozesse mit einer Replikationsvermehrung mitochondrialer DNA, Expressionssteigerungen bezüglich UCP-1, Cytochrom c und PPAR γ sowie zu einer erhöhten β -Oxidation führt und somit die Transdifferenzierung von einem weißen in einen braunen Fettzellphänotyp kennzeichnet [72–75, 78, 167–173]. Durch die Verwendung von transgenen, PGC-1 α defizienten Mäusen (PGC-1 $\alpha^{-/-}$) waren diese Ergebnisse entsprechend umkehrbar [77,174]. In Anlehnung an diesen Signalweg zeigten sich die vorliegenden Ergebnisse bezüglich UCP-1 kohärent: Während bei chronischer Stimulation des mineralokortikoiden Rezeptors sowohl für PGC-1 α als auch für UCP-1 eine reversible, deutliche Expressionssteigerung nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei Verwendung von Dexamethason als Stimulus ein antithermogener Effekt mit Verminderung beider Mediatoren. Da beide Proteine als Marker für das braune Fettgewebe angesehen werden, kann man auch formulieren, dass der MR einen Shift vom weißen zum braunen Phänotyp begünstigt, während der GR keine Transdifferenzierungstendenz markiert.

4.2 Thermogenese

4.2.1 Mitochondriale Biogenese

In Anlehnung an die Ergebnisse bezüglich PGC-1 α als ein entscheidender Regulator für die mitochondriale Entwicklung sowie bezüglich UCP-1 als Kernkomponente der adaptiven Thermogenese bestätigten die Expressionsmuster von Cytochrom c, NRF-1 und TFAM die prothermogenen Effekte des MR und die non- bzw. antithermogenen Wirkungen des GR. Die in der Literatur dafür vorliegenden Daten beziehen sich fast ausschließlich auf braunes Fettgewebe, in welchem eine positive Korrelation zwischen PGC-1 α und Thermogenese inklusive UCP-1, Cytochrom c und Mitochondrienvolumen gezeigt werden konnte [72, 75, 77, 78, 170, 175].

Innerhalb der Atmungskette ist Cytochrom c direkt an den Elektronentransferreaktionen beteiligt und kann als ein Maß für die Menge der Mitochondrien und folglich für den Energiemetabolismus angesehen werden. Die chronische Behandlung von weißen Adipozyten mit Aldosteron zeigte hier eine signifikante Steigerung der mRNA. Dass unter Kostimulation mit dem zugehörigen Antagonisten Eplerenon diese Wirkung vollständig aufgehoben wurde und Eplerenon allein keinerlei Effekte zeigte, belegt einmal mehr die Wirkungsweise über den mineralokortikoiden Rezeptor.

NRF-1 induziert bekanntermaßen als Koaktivator mit PGC-1 α unter anderem Cytochrom c und TFAM [72–74, 169, 175, 176]. Die signifikante Erhöhung des nuklearen Atmungsfaktors durch Aldosteron allein wurde hier interessanterweise durch die Anwesenheit von Eplerenon unter Kontrollniveau reduziert. Dieser Effekt konnte ebenso durch Eplerenon allein beobachtet werden und gibt Hinweise auf einen alternativen Signalweg, der für die kompensatorische Wirkung verantwortlich gemacht werden könnte. Die Untersuchung des Transkriptionsfaktors TFAM erfolgte aufgrund seiner Funktion für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Genoms und seiner Vervielfältigung [177, 178]. Unter chronischer Aldosteronanwendung ließ sich übereinstimmend mit den Vorergebnissen die TFAM-Expression leichtgradig, aber reversibel steigern.

Die Wirkungen von Dexamethason unter denselben Versuchsbedingungen können vereinfacht in folgender Weise beschrieben werden: In niedriger Konzentration waren alle untersuchten Marker der mitochondrialen Biogenese auf Kontrollniveau und zeigten damit keinen thermogenetischen Effekt, während in hoher Konzentration für NRF-1 eine signifikante Steigerung beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse sind erklärbar durch die Tatsache, dass Dexamethason in unphysiologisch hohen Konzentrationen seine rezeptorspezifische Wirkung verliert und übergreifend auch einen agonistischen Effekt über den mineralokortikoiden Rezeptor besitzt [112, 179, 180].

4.2.2 GR-Knockdown und MR-Knockout

Um die selektiven Wirkungen der verwendeten Substanzen über ihren jeweiligen Rezeptor hinreichend zu belegen, wurden im weiteren Verlauf Experimente durchgeführt, bei denen der GR transient via siRNA herunterreguliert bzw. der MR vollständig stillgelegt wurde. Bekannt ist, dass sowohl mineralokortikoide wie auch glukokortikoide Hormone eine Bindungsaffinität zum jeweiligen anderen Rezeptor besitzen [179, 181]. Da aber unter physiologischen Bedingungen eine etwa 100- bis 1000-fach höhere Konzentration von Glukokortikoiden im Blut gemessen werden kann, existieren einige zelluläre und molekulare Mechanismen, um die Selektivität des mineralokortikoiden Rezeptors in den epithelialen Aldosteronzielgeweben sicherzustellen [112]. Neben unterschiedlichen intrinsischen Bindungseigenschaften der Liganden und der Möglichkeit zur Bildung von homo- und heterodimeren Rezeptoren sowie der regulatorischen Beeinflussung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren ist als wichtigster Selektionsmechanismus die enzymatische Inaktivierung von glukokortikoiden Hormonen in Epithelgeweben zu nennen [112]. Dieses Enzym namens 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD2) ist in der Lage, im Menschen aktives Kortisol in unwirksames Kortison und entsprechend im Nagetier aktives Kortikosteron in unwirksames 11-Dehydrokortikosteron zu verwandeln. In Fettgewebe als nicht-epithelialem Gewebe besteht weitgehend der wissenschaftliche Konsens, dass die 11β -HSD2 nicht signifikant exprimiert ist und somit eine gegenseitige Beeinflussung stattfinden kann [105, 182, 183].

Unter Berücksichtigung dieser Daten zeigten unsere Experimente in GR-Knockdown-Zellen ein konsistentes Bild. Die Stimulation mit Kortikosteron als Agonist beider Rezeptortypen führte hinsichtlich der UCP-1 und PGC-1 α -Expression zur einer Erhöhung um mehr als 50% im Vergleich zur Kontrolle. Dies kann damit erklärt werden, dass entweder aufgrund der verschobenen Rezeptorverhältnisse eine verstärkte Stimulation des MR basierend auf einem fast fehlenden GR beruht oder aber, dass durch den GR-Knockdown der mineralokortikoide Rezeptor hochreguliert und somit verstärkt exprimiert wurde. Ein komplementäres, dazu stimmiges Bild stellte sich bei der Durchführung der MR-Knockout-Versuche dar. Durch den fehlenden mineralokortikoiden Rezeptor war die Vermittlung eines prothermogenen Effekts durch Kortikosteron nicht möglich, während im Gegensatz dazu die Aktivierung des glukokortikoiden

Rezeptors zu einer deutlichen Absenkung der UCP-1-Expression auf 1,5 % (95 %-KI: -2,03 bis 5,01) des Kontrollniveaus führte. Daraus resultiert ein weiteres klares Indiz, dass vom glukokortikoiden Rezeptor keine positiven Effekte bezogen auf Thermogenese bzw. Transdifferenzierung ausgehen. Der GR muss diesbezüglich eher als ein Gegenspieler des MR aufgefaßt werden, wie es schon für die inflammatorischen Adipokine in Adipozyten durch Hoppmann et al. demonstriert werden konnte. Hier zeigte sich der GR im Fettgewebe mit antientzündlichen Eigenschaften, während der MR eher proinflammatorische Signale vermittelte [147].

4.2.3 Einfluss von MR/GR auf den Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch ist der letzte Schritt des Elektronentransfers innerhalb der Atmungskette und stellt damit einen offensichtlichen Bezug zur mitochondrialen Aktivität her. Bei dieser durch die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) katalysierten Reaktion werden Elektronen von Cytochrom-c-Molekülen ohne fassbares Zwischenprodukt auf ein Sauerstoffmolekül übertragen und zwei Moleküle Wasser durch Protonen aus der Matrix freigesetzt. Einen direkten Zusammenhang zwischen der UCP-1-Expression und dem Sauerstoffverbrauch wurde 1997 schon von Enerbaeck et al. in braunem Fettgewebe beobachtet [184]. Durch die Aktivierung der Thermogenese via β 3-Adrenozeptoren wurde ein verminderter O₂-Verbrauch in UCP-1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren gemessen [185,186]. In der vorliegenden Arbeit lag durch die chronische Stimulation mit Aldosteron eine signifikante Steigerung des O₂-Verbrauchs vor, der sich in Anwesenheit des Antagonisten Eplerenon vollständig reversibel zeigte. Die Behandlung mit 10 nM Dexamethason ergab dabei Werte auf Kontrollniveau, während in höherer Dosierung vermutlich wegen der unselektiven Wirkungsweise signifikant mehr O₂ verbraucht wurde.

Es manifestiert sich damit eine weitere, tragende Säule für die Hypothese, dass der mineralokortikoide Rezeptor eine prothermogene Wirkung mit Transdifferenzierung von weiß nach braun vermittelt, während der glukokortikoide Rezeptor non- bzw. antithermogene und eher konservierende Effekte hervorruft. Zusammengenommen verdichten sich damit die Hinweise auf ein gegenläufig gerichtetes Wirkspektrum zwischen beiden Rezeptortypen.

4.3 Gewonnene Erkenntnisse und Ausblick

1. Welchen Einfluss üben der mineralo- und glukokortikoide Rezeptor auf die Transdifferenzierung von weiß nach braun aus?

Die chronische Stimulation beider Steroidrezeptoren zeigt während der gesamten Versuchsdauer keine unterschiedlichen Lipidakkumulationen und ist somit makroskopisch als gleich einzustufen. Bei der molekularen Untersuchung der braunen Fettzellmarker UCP-1 und PGC-1 α werden über den mineralokortikoiden Rezeptor deutlich transdifferenzierende Effekte von weiß nach braun vermittelt, während der glukokortikoide Rezeptor solche Umwandlungstendenzen nicht oder sogar gegensätzlich bewirkt.

2. Wie greift das kortikoide System in den oxidativen Metabolismus ein?

In diesem Zusammenhang wurden neben Cytochrom c, welches einen Komplex in der Atmungskette darstellt, auch NRF-1 und TFAM untersucht, die als mitochondriale Transkriptionsfaktoren die Expression wichtiger respiratorischer Untereinheiten initiieren und somit maßgeblich an der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind. Diese energiemetabolischen Marker wurden unter Behandlung mit Aldosteron deutlich stärker exprimiert und waren unter Zugabe des MR-Antagonisten Eplerenon vollständig reversibel. Konträr dazu wirkte sich die Stimulation des GR mit Dexamethason in niedriger Konzentration aus und war nur in höherer Konzentration, vermutlich durch unspezifische MR-Stimulation, teilweise verstärkend. Die Untersuchung von UCP-1 als Schlüsselenzym der Thermogenese in GR-Knockdown-



Abbildung 4.1: Schema der Fettzellantwort

bzw. MR-Knockout-Experimenten, aber auch unter Normalbedingungen wie oben beschrieben, untermauerte die Wichtigkeit des MR in diesem Stoffwechselprozess. Als Endpunkt des oxidativen Stoffwechsels wurde der O_2 -Verbrauch unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen gemessen und bestätigte insgesamt die prothermogene Wirkung des MR und die non- bzw. anti-thermogene Wirkung des GR.

3. Können Aussagen über den Mechanismus getroffen werden?

Die gewonnenen Ergebnisse können durch bereits bekannte Signalkaskaden in braunen Adipozyten erklärt werden (siehe Abbildung 1.3 auf Seite 9). Dabei zeigte sich erstmals, dass durch Stimulation des mineralokortikoiden Rezeptors eine Aktivierung der verschiedenen Stufen dieser Signalkaskade stattfindet. Die prothermogenen und transdifferenzierenden Effekte wurden durch die Stimulation des MR mit Aldosteron vermittelt und konnten durch selektive Blockade des MR mittels Eplerenon vollständig wieder aufgehoben werden. Die drastische Reduzierung des Schlüsselenzyms UCP-1 in MR-Knockout-Zellen bestätigten den initiierenden Charakter des MR.

4. Ausblick

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen die prinzipielle, pharmakologische Beeinflussbarkeit des Energiestoffwechsels in weißen Adipozyten. Das weiterführende Ziel liegt dabei in einer selektiven, gewebsspezifischen Stimulation, um eine möglichst langfristige und nebenwirkungsarme Anwendung zu erlauben. Entsprechend dieses Ansatzes ergibt sich gleich in dreifacher Hinsicht eine effektive Strategie gegen Adipositas:

- Die wärmefreisetzende Wirkung ist proportional zur weißen Fettmasse und folglich umso stärker ausgeprägt, je größer das Gewichtsproblem ist.
- Es reichen bereits kleine Steigerungen der Thermogenese aus, um langfristig ausreichend effizient zu sein.
- Die forcierte Wärmeproduktion stellt einen kausalen Angriffspunkt im Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieabgabe dar.

5 Zusammenfassung

Adipositas begünstigt als Risikofaktor die Genese einer Vielzahl von Erkrankungen und erreicht mittlerweile pandemische Ausmaße. Grundsätzlich basiert sie auf einer positiven Energiebilanz und wird gerade durch die Vorzüge unseres modernen Lebens mit reichhaltigem Nahrungsmittelangebot sowie zunehmender Immobilität gefördert. Das Fettgewebe selbst besteht aus zwei verschiedenen Fettzellarten, die unterschiedliche Funktionen hinsichtlich des Energiestoffwechsels im Organismus erfüllen. Das braune Fett gestattet zum Beispiel Neugeborenen und winterschlafhaltenden Tieren die Umwandlung chemisch gespeicherter Energie in Wärme. Im adulten, humanen Organismus überwiegt das weiße Fett zur Speicherung von Lipiden ohne die Fähigkeit zur Thermogenese, wobei in den letzten Jahren zahlreiche Publikationen auch stoffwechselrelevante Mengen an braunen Adipozyten aufzeigten. Als Transdifferenzierung wird nun ein Prozess der Umwandlung von einer Fettzellart in die andere bezeichnet. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Kortikosteroide maßgeblich in den Energiestoffwechsel der Zellen eingreifen, wurde die Frage beantwortet, ob mineralo- bzw. glukokortikoide Rezeptorstimulation einen Wechsel des Phänotyps von weiß nach braun und damit eine Verschiebung der Energiebalance zu einem höheren Energieverbrauch mit konsekutivem Abbau weißer Depots begünstigen kann.

Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden Stimulations- und Inhibitionsexperimente in weißen Fettzellkulturen durchgeführt und die Expression sowohl von spezifischen Markern brauner Adipozyten als auch von mitochondrialen Proteinen mit energieregulatorischer Schlüsselfunktion bestimmt. Die Wirkung über den jeweiligen Rezeptor konnte durch GR-*Knockdown*- und MR-*Knockout*-Versuche bestätigt werden. Als wichtigste Methode wurde die Messung des Sauerstoffverbrauchs in den jeweils stimulierten Adipozyten etabliert und angewendet.

Unter chronischer Exposition mit Aldosteron bzw. Dexamethason lagerten die Adipo-

zyten gleichmäßige Mengen an Lipiden ein und kennzeichneten folglich ein unbeeinträchtigtes Wachstum. Die molekulare Untersuchung von UCP-1 und PGC-1 α markierte für den MR eine klare Transdifferenzierungstendenz, während sich dies für den GR nicht oder sogar in gegensätzlicher Weise zeigte. Die Expression von Cytochrom c, NRF-1 und TFAM als respiratorisch wichtige Schlüsselproteine in den Mitochondrien wurde durch Aldosteronstimulation deutlich und vollständig reversibel gesteigert; für die Dexamethasonbehandlung konnte eine solch selektive Wirkung nicht nachgewiesen werden. Als Endpunktmessung in der Atmungskette zeigte die Stimulation des MR eine Steigerung des O₂-Verbrauchs um 25 %, welche unter Einsatz von Eplerenon komplett antagonisierbar war. Dexamethason war diesbezüglich wirkungslos.

Anhand der Resultate ergeben sich für beide Steroidrezeptoren konträre Wirkungen. Der MR vermittelt eindeutig prothermogene und transdifferenzierende Effekte, während der GR als antithermogen mit nicht-transdifferenzierenden Eigenschaften bezeichnet werden muss. Eine gewebsspezifische Stimulation des mineralokortikoiden Rezeptors mit selektiver Aktivierung des Energiemetabolismus stellt somit möglicherweise in der weiterführenden Forschung eine erfolgversprechende Strategie in der Behandlung der pandemischen Adipositas dar.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Evidenzbasierte Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas Version 2007. Internetadresse http://www.adipositas-gesellschaft.de/index.php?id=9 (Tag des Zugriffs: 19.12.2011)
- [2] WHO Global Infobase. Internetadresse https://apps.who.int/infobase (Tag des Zugriffs: 19.12.2011)
- [3] Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. Mol Cell Endocrinol 2010; 316: 104–108
- [4] Gathercole LL, Stewart PM. Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. J Steroid Biochem Mol Biol 2010; 122: 21–27
- [5] Gnacinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, Lysiak-Szydlowska W, Sworczak K.
 Role of adipokines in complications related to obesity: a review. Adv Med Sci 2009; 54: 150–157
- [6] WHO, Overweight and Obesity, Fact Sheet Nr. 311, Update March 2011. Internetadresse http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html
- [7] Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. Arch Med Res 2008; 39: 715–728
- [8] Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr 2004; 92: 347–355

- [9] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 2548–2556
- [10] Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab 2000; 11: 327–332
- [11] Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. Am J Clin Nutr 1987; 45: 277–282
- [12] Trayhurn P, Bing C, Wood IS. Adipose tissue and adipokines-energy regulation from the human perspective. J Nutr 2006; 136: 1935S-1939S
- [13] Phillips LK, Prins JB. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. Curr Hypertens Rep 2008; 10: 156–164
- [14] Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome an ongoing story. J Physiol Pharmacol 2009; 60 Suppl 7: 19–24
- [15] Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.
 Diabetes 1988; 37: 1595–1607
- [16] Shirai K. Obesity as the core of the metabolic syndrome and the management of coronary heart disease. Curr Med Res Opin 2004; 20: 295–304
- [17] Ritchie SA, Connell JMC. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2007; 17: 319–326
- [18] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372: 425–432
- [19] Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. Nat Med 1995; 1: 1311–1314

- [20] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1995; 1: 1155–1161
- [21] Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 3424–3427
- [22] Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity–a review. Neuropeptides 2006; 40: 375–401
- [23] Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature 1996; 382: 250–252
- [24] Myers MG, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. Trends Endocrinol Metab 2010; 21: 643–651
- [25] Scarpace PJ, Zhang Y. Leptin resistance: a prediposing factor for diet-induced obesity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2009; 296: R493–R500
- [26] Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, Mantzoros CS. Leptin in human physiology and therapeutics. Front Neuroendocrinol 2010; 31: 377–393
- [27] Chong AY, Lupsa BC, Cochran EK, Gorden P. Efficacy of leptin therapy in the different forms of human lipodystrophy. Diabetologia 2010; 53: 27–35
- [28] Savage DB, O'Rahilly S. Leptin therapy in lipodystrophy. Diabetologia 2010;
 53: 7–9
- [29] Paz-Filho G, Wong ML, Licinio J. Ten years of leptin replacement therapy. Obes Rev 2011; 12: e315–e323

- [30] Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N Engl J Med 1999; 341: 879–884
- [31] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Sci 2011; 12: 3117–3132
- [32] Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). Biochem Biophys Res Commun 1996; 221: 286–289
- [33] Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. Diabetes 2006; 55: 249–259
- [34] Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. Diabetologia 2003; 46: 459–469
- [35] Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. Eur J Endocrinol 2002; 147: 173–180
- [36] Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adiposederived anti-inflammatory protein, adiponectin. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 3815–3819

- [37] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1930– 1935
- [38] Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T, Matsuzawa Y. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. Hypertension 2003; 42: 231–234
- [39] Dupont J, Chabrolle C, Ramé C, Tosca L, Coyral-Castel S. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. PPAR Res 2008; 2008: 176275
- [40] Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. Diabetologia 2005; 48: 132–139
- [41] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complementrelated protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 2005–2010
- [42] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med 2002; 8: 1288–1295
- [43] Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. Clin Chim Acta 2007; 380: 24–30
- [44] Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension.
 Hypertension 2008; 51: 8–14

- [45] Hulthe J, Hultén LM, Fagerberg B. Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. Metabolism 2003; 52: 1612–1614
- [46] Kantartzis K, Rittig K, Balletshofer B, Machann J, Schick F, Porubska K, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. The relationships of plasma adiponectin with a favorable lipid profile, decreased inflammation, and less ectopic fat accumulation depend on adiposity. Clin Chem 2006; 52: 1934–1942
- [47] Pischon T, Nöthlings U, Boeing H. Obesity and cancer. Proc Nutr Soc 2008; 67: 128–145
- [48] Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 2476–2481
- [49] 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 2009; 360: 1509–1517
- [50] Alkhawaldeh K, Alavi A. Quantitative assessment of FDG uptake in brown fat using standardized uptake value and dual-time-point scanning. Clin Nucl Med 2008; 33: 663–667
- [51] Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 293: E444–E452
- [52] Enerbäck S. Human brown adipose tissue. Cell Metab 2010; 11: 248–252
- [53] Giordano A, Centemeri C, Zingaretti MC, Cinti S. Sibutramine-dependent brown fat activation in rats: an immunohistochemical study. Int J Obes Relat Metab Disord 2002; 26: 354–360
- [54] Tosh D, Slack JMW. How cells change their phenotype. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 187–194
- [55] Cinti S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. Ann Med 2011; 43: 104–115
- [56] Cinti S. Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. Proc Nutr Soc 2009; 68: 340–349
- [57] Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the Adipose Organ. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;
- [58] Cinti S. The adipose organ. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005; 73: 9–15
- [59] Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. J Endocrinol Invest 2002; 25: 823–835
- [60] Morroni M, Barbatelli G, Zingaretti MC, Cinti S. Immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evidence for brown adipose tissue recruitment due to cold acclimation in old rats. Int J Obes Relat Metab Disord 1995; 19: 126–131
- [61] Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. Am J Physiol Cell Physiol 2000; 279: C670–C681
- [62] Granneman JG, Li P, Zhu Z, Lu Y. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 289: E608–E616

- [63] Murano I, Barbatelli G, Giordano A, Cinti S. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. J Anat 2009; 214: 171–178
- [64] Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, Matteis RD, Cinti S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010; 298: E1244–E1253
- [65] Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. Nature 1993; 366: 740–742
- [66] 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 2002; 297: 843–845
- [67] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev 2004; 84: 277–359
- [68] Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gordts PLSM, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. Nat Med 2011; 17: 200–205
- [69] Cannon B, Nedergaard J. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). Int J Obes (Lond) 2010; 34 Suppl 1: S7–16
- [70] Morrison SF, Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. Front Biosci 2011; 16: 74–104
- [71] Nakamura K, Morrison SF. Central efferent pathways mediating skin coolingevoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007; 292: R127–R136

- [72] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell 1999; 98: 115–124
- [73] Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. Physiol Rev 2008; 88: 611–638
- [74] Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. Genes Dev 2004; 18: 357–368
- [75] Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptorgamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev 2003; 24: 78–90
- [76] Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator. Trends Endocrinol Metab 2001; 12: 360–365
- [77] Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. Cell Metab 2006; 3: 333–341
- [78] Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A coldinducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell 1998; 92: 829–839
- [79] Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. Pharmacol Rev 2006; 58: 685–704
- [80] Committee NRN. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Cell 1999; 97: 161–163
- [81] Stanisi? V, Lonard DM, O'Malley BW. Modulation of steroid hormone receptor activity. Prog Brain Res 2010; 181: 153–176

- [82] Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update 2000; 6: 225–236
- [83] Arnaldi G, Scandali VM, Trementino L, Cardinaletti M, Appolloni G, Boscaro M. Pathophysiology of dyslipidemia in Cushing's syndrome. Neuroendocrinology 2010; 92 Suppl 1: 86–90
- [84] Nieman LK, Turner MLC. Addison's disease. Clin Dermatol 2006; 24: 276–280
- [85] Shibli-Rahhal A, Beek MV, Schlechte JA. Cushing's syndrome. Clin Dermatol 2006; 24: 260–265
- [86] Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases.
 Mol Cell Endocrinol 2007; 275: 43–61
- [87] Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. Metabolism 1998; 47: 3–6
- [88] Weinstein SP, Paquin T, Pritsker A, Haber RS. Glucocorticoid-induced insulin resistance: dexamethasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin- and non-insulin-related stimuli. Diabetes 1995; 44: 441–445
- [89] Hasselgren PO, Fischer JE. Counter-regulatory hormones and mechanisms in amino acid metabolism with special reference to the catabolic response in skeletal muscle. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1999; 2: 9–14
- [90] Combaret L, Taillandier D, Dardevet D, Béchet D, Rallière C, Claustre A, Grizard J, Attaix D. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. Biochem J 2004; 378: 239–246

- [91] Komamura K, Shirotani-Ikejima H, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Kitakaze M, Miyatake K, Sunagawa K, Miyata T. Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. Cardiovasc Drugs Ther 2003; 17: 303–310
- [92] Marinovic AC, Zheng B, Mitch WE, Price SR. Ubiquitin (UbC) expression in muscle cells is increased by glucocorticoids through a mechanism involving Sp1 and MEK1. J Biol Chem 2002; 277: 16673–16681
- [93] Coderre L, Srivastava AK, Chiasson JL. Effect of hypercorticism on regulation of skeletal muscle glycogen metabolism by epinephrine. Am J Physiol 1992; 262: E434–E439
- [94] Cole TG, Wilcox HG, Heimberg M. Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. J Lipid Res 1982; 23: 81–91
- [95] Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. J Lipid Res 1994; 35: 1535– 1541
- [96] Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR. Glucocorticoids and 11betahydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. Recent Prog Horm Res 2004; 59: 359–393
- [97] Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA, Bannister PA, Frayn KN. Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 626–631
- [98] Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp MGF, Fleming S, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. J Clin Invest 2003; 112: 83–90

- [99] Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. Science 2001; 294: 2166–2170
- [100] Veilleux A, Rhéaume C, Daris M, Luu-The V, Tchernof A. Omental adipose tissue type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase oxoreductase activity, body fat distribution, and metabolic alterations in women. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 3550–3557
- [101] Sandeep TC, Andrew R, Homer NZM, Andrews RC, Smith K, Walker BR. Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone. Diabetes 2005; 54: 872–879
- [102] Paulsen SK, Pedersen SB, Fisker S, Richelsen B. 11Beta-HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization. Obesity (Silver Spring) 2007; 15: 1954–1960
- [103] Desbriere R, Vuaroqueaux V, Achard V, Boullu-Ciocca S, Labuhn M, Dutour A, Grino M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients. Obesity (Silver Spring) 2006; 14: 794–798
- [104] Kannisto K, Pietiläinen KH, Ehrenborg E, Rissanen A, Kaprio J, Hamsten A, Yki-Järvinen H. Overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 in adipose tissue is associated with acquired obesity and features of insulin resistance: studies in young adult monozygotic twins. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 4414–4421
- [105] Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Heintze U, Janke J, Luft FC, Sharma AM. Regulation of 11beta-HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. Obes Res 2004; 12: 9–17

- [106] Lindsay RS, Wake DJ, Nair S, Bunt J, Livingstone DEW, Permana PA, Tataranni PA, Walker BR. Subcutaneous adipose 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic acid levels are associated with adiposity and insulinemia in Pima Indians and Caucasians. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 2738–2744
- [107] Paulmyer-Lacroix O, Boullu S, Oliver C, Alessi MC, Grino M. Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2701–2705
- [108] Alberts P, Nilsson C, Selen G, Engblom LOM, Edling NHM, Norling S, Klingström G, Larsson C, Forsgren M, Ashkzari M, Nilsson CE, Fiedler M, Bergqvist E, Ohman B, Björkstrand E, Abrahmsen LB. Selective inhibition of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. Endocrinology 2003; 144: 4755–4762
- [109] Alberts P, Engblom L, Edling N, Forsgren M, Klingström G, Larsson C, Rönquist-Nii Y, Ohman B, Abrahmsén L. Selective inhibition of 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. Diabetologia 2002; 45: 1528–1532
- [110] Viengchareun S, Menuet DL, Martinerie L, Munier M, Tallec LP, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. Nucl Recept Signal 2007; 5: e012
- [111] Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. Annu Rev Physiol 2002; 64: 877–897
- [112] Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity.
 Am J Physiol Renal Physiol 2001; 280: F181–F192

- [113] Sowers JR, Whaley-Connell A, Epstein M. Narrative review: the emerging clinical implications of the role of aldosterone in the metabolic syndrome and resistant hypertension. Ann Intern Med 2009; 150: 776–783
- [114] Goodfriend TL, Ball DL, Egan BM, Campbell WB, Nithipatikom K. Epoxy-keto derivative of linoleic acid stimulates aldosterone secretion. Hypertension 2004; 43: 358–363
- [115] Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes Rev 2010; 11: 11–18
- [116] Després JP, Arsenault BJ, Côté M, Cartier A, Lemieux I. Abdominal obesity: the cholesterol of the 21st century? Can J Cardiol 2008; 24 Suppl D: 7D–12D
- [117] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med 1999; 341: 709–717
- [118] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, Efficacy EPAMIHF, Investigators SS. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. N Engl J Med 2003; 348: 1309–1321
- [119] Tiraby C, Langin D. Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? Trends Endocrinol Metab 2003; 14: 439–441
- [120] Kotewicz ML, Sampson CM, D'Alessio JM, Gerard GF. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. Nucleic Acids Res 1988; 16: 265–277
- [121] Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schütz G. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na+ metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 9424–9429

- [122] Klein J, Fasshauer M, Ito M, Lowell BB, Benito M, Kahn CR. beta(3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. J Biol Chem 1999; 274: 34795–34802
- [123] 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 2002; 24: 382–388
- [124] Mishra A, Zhu XG, Ge K, Cheng SY. Adipogenesis is differentially impaired by thyroid hormone receptor mutant isoforms. J Mol Endocrinol 2010; 44: 247–255
- [125] Obregon MJ. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. Thyroid 2008; 18: 185–195
- [126] Pandey V, Vijayakumar MV, Kaul-Ghanekar R, Mamgain H, Paknikar K, Bhat MK. Atomic force microscopy, biochemical analysis of 3T3-L1 cells differentiated in the absence and presence of insulin. Biochim Biophys Acta 2009; 1790: 57–64
- [127] Govers R, Coster ACF, James DE. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. Mol Cell Biol 2004; 24: 6456–6466
- [128] Sargeant RJ, Pâquet MR. Effect of insulin on the rates of synthesis and degradation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. Biochem J 1993; 290 (Pt 3): 913–919
- [129] Tsuboi H, Sugimoto Y, Kainoh T, Ichikawa A. Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. Biochem Biophys Res Commun 2004; 322: 1066–1072
- [130] Yan H, Kermouni A, Abdel-Hafez M, Lau DCW. Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. J Lipid Res 2003; 44: 424–429

- [131] Martini CN, Plaza MV, del C Vila M. PKA-dependent and independent cAMP signaling in 3T3-L1 fibroblasts differentiation. Mol Cell Endocrinol 2009; 298: 42–47
- [132] Qiu Z, Wei Y, Chen N, Jiang M, Wu J, Liao K. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. J Biol Chem 2001; 276: 11988–11995
- [133] Elks ML, Manganiello VC. A role for soluble cAMP phosphodiesterases in differentiation of 3T3-L1 adipocytes. J Cell Physiol 1985; 124: 191–198
- [134] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156–159
- [135] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc 2006; 1: 581–585
- [136] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: e45
- [137] 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 2002; 30: e36
- [138] Schelbert KB. Comorbidities of obesity. Prim Care 2009; 36: 271–285
- [139] Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature 2006; 444: 881–887
- [140] Bergman RN, Kim SP, Catalano KJ, Hsu IR, Chiu JD, Kabir M, Hucking K, Ader M. Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. Obesity (Silver Spring) 2006; 14 Suppl 1: 16S–19S

- Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease.
 Circ Res 2005; 96: 939–949
- [142] Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature 2000; 404: 635–643
- [143] Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. Diabetes 2000; 49: 883–888
- [144] Feldman D, Loose D. Glucocorticoid receptors in adipose tissue. Endocrinology 1977; 100: 398–405
- [145] Rondinone CM, Rodbard D, Baker ME. Aldosterone stimulated differentiation of mouse 3T3-L1 cells into adipocytes. Endocrinology 1993; 132: 2421–2426
- [146] Zennaro MC, Menuet DL, Viengchareun S, Walker F, Ricquier D, Lombès M. Hibernoma development in transgenic mice identifies brown adipose tissue as a novel target of aldosterone action. J Clin Invest 1998; 101: 1254–1260
- [147] Hoppmann J, Perwitz N, Meier B, Fasshauer M, Hadaschik D, Lehnert H, Klein J. The balance between gluco- and mineralocorticoid action critically determines inflammatory adipocyte responses. J Endocrinol 2010; 204: 153–164
- [148] Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. FASEB J 2007; 21: 2185–2194
- [149] Kraus D, Jäger J, Meier B, Fasshauer M, Klein J. Aldosterone inhibits uncoupling protein-1, induces insulin resistance, and stimulates proinflammatory adipokines in adipocytes. Horm Metab Res 2005; 37: 455–459
- [150] Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GMC, Fabbri A, Caprio M. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. J Cell Biochem 2010; 110: 564–572
- [151] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev 1998; 78: 783–809

- [152] Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS. Age, anatomic site, and the replication and differentiation of adipocyte precursors. Am J Physiol 1990; 258: C206–C210
- [153] White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. Mol Cell Endocrinol 2010; 318: 10–14
- [154] Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. Trends Endocrinol Metab 2009; 20: 107–114
- [155] Penfornis P, Viengchareun S, Menuet DL, Cluzeaud F, Zennaro MC, Lombès M. The mineralocorticoid receptor mediates aldosterone-induced differentiation of T37i cells into brown adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 279: E386–E394
- [156] Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. Exp Biol Med (Maywood) 2001; 226: 997–1002
- [157] Cannon B, Hedin A, Nedergaard J. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. FEBS Lett 1982; 150: 129–132
- [158] Ribeiro MO, Bianco SDC, Kaneshige M, Schultz JJ, yann Cheng S, Bianco AC, Brent GA. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. Endocrinology 2010; 151: 432–440
- [159] Cassard-Doulcier AM, Larose M, Matamala JC, Champigny O, Bouillaud F, Ricquier D. In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. J Biol Chem 1994; 269: 24335–24342
- [160] Kozak LP, Anunciado-Koza R. UCP1: its involvement and utility in obesity. Int J Obes (Lond) 2008; 32 Suppl 7: S32–S38
- [161] Nicholls DG, Rial E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. J Bioenerg Biomembr 1999; 31: 399–406

- [162] Viengchareun S, Penfornis P, Zennaro MC, Lombès M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors inhibit UCP expression and function in brown adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 280: E640–E649
- [163] Digby JE, Montague CT, Sewter CP, Sanders L, Wilkison WO, O'Rahilly S, Prins JB. Thiazolidinedione exposure increases the expression of uncoupling protein 1 in cultured human preadipocytes. Diabetes 1998; 47: 138–141
- [164] Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Büning 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 2010; 12: 158–166
- [165] Soumano K, Desbiens S, Rabelo R, Bakopanos E, Camirand A, Silva JE. Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line. Mol Cell Endocrinol 2000; 165: 7–15
- [166] Rodríguez AM, Palou A. The steroid RU486 induces UCP1 expression in brown adipocytes. Pflugers Arch 2004; 449: 170–174
- [167] Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. J Biol Chem 2001; 276: 1486–1493
- [168] Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. Biochim Biophys Acta 2002; 1576: 1–14
- [169] Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. Cell Metab 2005; 1: 361–370
- [170] Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. Int J Obes (Lond) 2005; 29 Suppl 1: S5–S9

- [171] Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. Endocr Rev 2006; 27: 728–735
- [172] Wu Z, Boss O. Targeting PGC-1 alpha to control energy homeostasis. Expert Opin Ther Targets 2007; 11: 1329–1338
- [173] Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgammacoactivator-1 (PGC1). Public Health Nutr 2007; 10: 1132–1137
- [174] Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. PLoS Biol 2005; 3: e101
- [175] Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. Ann N Y Acad Sci 2008; 1147: 321–334
- [176] Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ 2006; 30: 145–151
- [177] Kang D, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. Mitochondrion 2007; 7: 39–44
- [178] Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. Nat Genet 1998; 18: 231–236

- [179] Marzolla V, Armani A, Zennaro MC, Cinti F, Mammi C, Fabbri A, Rosano GMC, Caprio M. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. Mol Cell Endocrinol 2011;
- [180] Funder JW. Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. Heart Fail Rev 2005; 10: 15–22
- [181] Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. Science 1987; 237: 268–275
- [182] Yang K, Khalil MW, Strutt BJ, Killinger DW. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 activity and gene expression in human adipose stromal cells: effect on aromatase activity. J Steroid Biochem Mol Biol 1997; 60: 247–253
- [183] Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? Lancet 1997; 349: 1210–1213
- [184] Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. Nature 1997; 387: 90–94
- [185] HSIEH AC, CARLSON LD, GRAY G. Role of the sympathetic nervous system in the control of chemical regulation of heat production. Am J Physiol 1957; 190: 247–251
- [186] Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. Biochim Biophys Acta 2001; 1504: 82–106

7 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein, der mir die Bearbeitung dieses faszinierenden Themas im Bereich der Fettzellforschung ermöglichte und stets die volle Unterstützung zukommen ließ. Seine wissenschaftliche Führung und der optimistische Charakter haben maßgeblich zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich an Dr. rer. nat. Nina Perwitz richten. Als Laborleiterin und Mentorin stand sie mir immer mit wertvollen Ratschlägen zur Seite. Die vielen wissenschaftlichen Diskussionen sowie heiteren Gespräche im Büro und Labor werde ich vermissen.

Als gute Seele des Labors sind an dieser Stelle Britta Meier und Maren Drenckhan zu nennen. Ihnen gebührt ein großes Dankeschön für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und die unerschütterliche Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen.

Meiner Kommilitonin Julia Hoppmann danke ich, dass Sie mich auf diese Arbeitsgruppe aufmerksam gemacht und mir besonders in den wissenschaftlichen Experimenten bezüglich der *Knockout-* und *Knockdown*-Experimente einen großen Beitrag geleistet hat.

Für all die guten Korrekturvorschläge hinsichtlich Text und Gestaltung sei an dieser Stelle ein außerordentlicher Dank an meinen Bruder Roland Israel und vor allem an Julia Neubauer gerichtet.

Zu guter Letzt gilt mein innigster Dank meiner Familie - insbesondere meinen Eltern. Sie haben mir den Weg bis zu dieser Promotion geebnet und sowohl durch Ihre Fürsorge als auch durch den steten Rückhalt Unermessliches für mich geleistet.

8 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Ingo Israel
Geburtsdatum	11. August 1978

Universitäre Laufbahn Pharmazie

10/1999 - 09/2003	Studium an der Philipps-Universität Marburg
10/2003 - 04/2004	1. Teil des PJ: Forschungssemester an der Texas Tech University Health Sciences Center (USA)
05/2004 - 10/2004	2. Teil des PJ: Praktikumssemester in der Apotheke am Rothenbaum in Hamburg
11/2004	Approbation als Apotheker

Universitäre Laufbahn Medizin

10/2004 - 07/2009	Studium an der Universität zu Lübeck
07/2009 - 11/2009	Experimentelle Phase der Promotion
12/2009 - 12/2010	 Tertial: Innere Medizin, Spital Lachen (Schweiz) Terital: Neurologie, Universität zu Lübeck Tertial: Chirurgie, Universität zu Lübeck
06/2011	Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeiten

Seit 2005	Übernahme zahlreicher Notdienste und Apothekenvertretungen
01/2006 - 03/2011	Kahlhorst-Apotheke in Lübeck
05/2011 - 08/2011	apo-Rot Blankenese-Apotheke in Hamburg
09/2011 - 12/2011	Fertigstellung der Promotion