

Aus der Medizinischen Klinik 1
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
durch das Institut für Medizinische Molekularbiologie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. N. Tautz

der Universität zu Lübeck

**Neuropeptiderge Regulation der Fettgewebsfunktion – molekulare
Mechanismen direkt peripherer Wirkansätze zur Kontrolle der
Energiehomöostase**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von
Nina Perwitz
aus Mülheim an der Ruhr

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 04.09.2008

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld

*In den Wissenschaften ist viel Gewisses, sobald man sich von den Ausnahmen nicht
irre machen lässt und die Probleme zu ehren weiß.*

(J.W. Goethe)

für meine Mutter

Im Zeitraum dieser Dissertation sind folgende Publikationen entstanden:

Originalartikel:

1. Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, **Perwitz N**, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein HH. (2002) Troglitazone treatment increases protein kinase B phosphorylation in skeletal muscle of normoglycemic subjects at risk for the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2691-7.
2. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, **Perwitz N**, Klein HH, Tschop M, Klein J (2002) Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res.* 34:640-645 (Special Issue on Endocrinology of Adipose Tissue)
3. Ott V, Fasshauer M, Meier B, Dalski A, Kraus D, Gettys TW, **Perwitz N**, Klein J. (2004) Ciliary neurotrophic factor influences endocrine adipocyte function: inhibition of leptin via PI 3-kinase. *Mol Cell Endocrinol.* 30:224:21-7.
4. Klein J, Westphal S, Kraus D, Meier B, **Perwitz N**, Ott V, Fasshauer M, Klein HH. (2004) Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinasesignalling pathway in brown adipocytes. *J Endocrinol.* 183:299-307
5. **Perwitz N**, Fasshauer M, Klein J. (2004) Die neue Sicht des Fettgewebes: „Master Mind“ hinter Pathogenese und Therapie des Metabolischen Syndroms. *Focus (Universität zu Lübeck)* 21 14-21
6. **Perwitz N**, Klein J. Neue Konzepte gegen das Metabolische Syndrom (2004) *Medical Tribune* 39: 10
7. **Perwitz N**, Sievert H, Meier B, Drenckhan M, Fasshauer M, Klein J (2005) Cocaine –and amphetamine-related transcript (CART) directly stimulates UCP-1 expression and enhances insulin-induced glucose uptake. *Adipocytes* Vol. 1, No. 3, pp. 145-150
8. Klein J, **Perwitz N**, Kraus D, Fasshauer M (2006) Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol Metab* 17,1:26-32
9. **Perwitz N**, Fasshauer M, Klein J (2006) Cannabinoid Receptor Signaling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin. *Horm. Metab. Res.* 38:356-358

10. Iwen KA, **Perwitz N**, Kraus D, Fasshauer M, Klein J (2006) Putting fat cells onto the road map to novel therapeutic strategies. *Discovery Medicine* 6:75-81
11. Mäuser W, **Perwitz N**, Meier B, Fasshauer M, Klein J.: Direct adipotropic actions of atorvastatin: differentiation state-dependent induction of apoptosis, modulation of endocrine function and inhibition of glucose uptake. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jun 14;564(1-3):37-46. Epub 2007 Feb 22
12. Westphal S, **Perwitz N**, Iwen A, Kraus D, Fasshauer M, Klein J (2008) Expression of ATRAP in adipocytes and negative regulation by beta3-adrenergic stimulation of JAK/STAT. *Horm. Metab. Res.* (in press)

Vorträge

1. "Pathogenic Mechanisms of the Metabolic Syndrome: Studies using a Brown Adipocyte Model" (2003) Pennington Biomedical Research Center; Louisiana State University Baton Rouge, LA, USA
2. "Cocaine-and Amphetamine-Related Transcript (Cart) Directly Alters Adipose Tissue Thermogenesis, Insulin Sensitivity, and Leptin Expression" (2005) 49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Bremen
3. "Cannabinoid Cb1 receptor-mediated effects on white and brown adipocytes" (2006) 50. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) und der 23. Jahrestagung der Niederländischen Gesellschaft für Endokrinologie (NVE), Essen
4. "The Endocannabinoid-System: Molecular and Clinical Target for Controlling Metabolic & Endocrine Fat Cell Function" (2006), Sanofi-Aventis
5. „Depotspezifische direkte Effekte einer Cannabinoid-(Cb)1-Rezeptor-Blockade in Fettzellen: Induktion von Insulinsensitivität und negativer Energiebilanz.“ (2007) 42. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Hamburg

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung:	1
1.1. Funktionen des Fettgewebes	2
1.2. Insulinsensitivität	3
1.3. Thermogenese	5
1.4. Endokrine Aktivität	7
1.4.1. Leptin	7
1.4.2. Adiponectin	8
1.4.3. Visfatin	9
1.5. Neuropeptide	10
1.5.1 Cocain- und amphetaminreguliertes Transcript: CART	12
1.5.2. Endocannabinoid System	13
2. Fragestellung	16
3. Materialien	18
3.1. Verwendete Geräte	18
3.2. Verbrauchsmaterialien	19
3.3. Chemikalien	20
3.4. Molekulargewichtsmarker	22
3.5. Antikörper:	22
3.6. Enzyme und Puffer für RT-PCR	23
3.7. Primer	23
3.8. Puffer und Medien:	24
3.8.1. Zellkulturmedien	24
3.8.2 Puffer für Proteinanalysen	26
3.8.3. Oil Red O Färbelösung	26
3.8.4. Puffer zur Glukoseaufnahme Messung:	26
3.8.5. Puffer für die Agarosegelelektrophorese	27

4. Methoden	28
4.1. Zellkultivierung	28
4.1.1 Fettzellimmortalisierung durch SV40 T Antigen	29
4.1.2. Herstellung von Virusüberstand	29
4.1.3. Kultivierung und Differenzierung von Adipozyten	29
4.2. Oil red O Färbung	30
4.3 Zellyse zur Proteinaufreinigung	30
4.4 Proteinbestimmung nach Bradford	31
4.5 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	32
4.6 Westernblot	33
4.7. Immunopräzipitation	34
4.8. Messung der Glukoseaufnahme in die Zelle	35
4.9. Gewinnung von RNA aus Adipozyten	35
4.10. Bestimmung der RNA-Menge	36
4.11. Herstellung eines Agarosegels	37
4.12. Herstellung von cDNA	38
4.13. Quantifizierende RT-PCR	38
4.14. Reaktionsansatz für quantitative RT-PCR	39
4.15. Primer Design	40
4.16. Statistik	40
5. Ergebnisse	41
5.1. Charakterisierung einer neu generierten weißen Adipozytenlinie	41
5.1.1. Differenzierung	41
5.1.2. Differenzierungsmarker	42
5.1.3 Insulinsensitivität	42
5.1.4. Adipokinexpression	43
5.2. Nachweis des CB1 Rezeptors in Adipozyten	44
5.3. Energieaufnahme/Lipidspeicherung	45
5.4. Insulinvermittelte Glukoseaufnahme	47
5.5. Insulinsignalwege	49
5.6. Aktivierung von Signalproteinen durch CART	50
5.6.1. Tyrosin-Phosphorylierung von IRS1	50

5.6.2. PKB Phosphorylierung	51
5.7. Aktivierung von Signalproteinen durch den CB1 Rezeptor	53
5.7.2. Regulation der P70S6 Kinase und GSK3 durch WIN 55212.2	54
5.7.3. Aktivierung des MAP 44/42 Signalweges	54
5.8. Energieabgabe	55
5.9. Endokrine Aktivität	59
5.9.1. Adiponektinexpression	59
5.9.2. Visfatin-Expression:	60
5.9.3. Leptin Expression	62
6. Diskussion	64
6.1. Zellmodell	65
6.2. Neuropeptide und Fettzellendifferenzierung	66
6.3. Insulinsensitivität	68
6.4. Signalweiterleitung	69
6.5. Energieabgabe/ Energiehaushalt	71
6.6. Adipozyten-Sekretion	73
6.6.1. Adiponektin	73
6.6.2. Visfatin	74
6.6.3. Leptin	75
7. Gewonnene Erkenntnisse	77
8. Zusammenfassung	79
9. Literatur	81
10. Abkürzungsverzeichnis	90
11. Danksagung	92
12. Lebenslauf	93
13. Erklärung	99

1. Einleitung:

Die Körperform des Menschen war schon immer ein zentraler Gegenstand der Betrachtung. Waren früher üppige Formen ein Zeichen von Fruchtbarkeit und Reichtum, gelten Übergewichtige heute als unattraktiv und sozial benachteiligt. Doch Adipositas ist mehr als nur ein kosmetisches Problem, in den letzten Jahren ist sie zu einem der größten Gesundheitsrisiken weltweit geworden und beeinflusst sogar die Lebenserwartung. So verkürzt Fettleibigkeit die Lebensspanne um ca. 8 Jahre (Trayhurn *et al.*, 2006). Zwar führt die USA noch immer die Liste der übergewichtigsten Einwohner an, doch auch in Deutschland ist deren Zahl drastisch gestiegen. Wie das Statistische Bundesamt in seinem Jahresbericht 2003 mitteilte, waren 49% der erwachsenen Bevölkerung ab 18 Jahre übergewichtig¹). Neuere Untersuchungen dazu geben sogar noch mehr Grund zur Besorgnis. So besagen Studien der *International Association for the study of Obesity (IASO)*, dass 2007 bereits 75% der Männer und 59% der Frauen in Deutschland übergewichtig sind; damit ist Deutschland führend im europäischen Verbund. Trotzdem ist die Tendenz noch immer steigend. Die Klassifizierung von Adipositas erfolgt über die Berechnung des Körpermaßindex (*Body Mass Index*; BMI; Gewicht in (kg) dividiert durch das Quadrat der Körpergröße (m^2)). Der so errechnete Wert korreliert mit der Körperfettmasse. Die Risiken einer Folgeerkrankung durch erhöhte BMI Werte werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wie folgt eingeteilt:

Adipositas-Grad	BMI (kg/m^2)	Risiko für eine Folgeerkrankung
Normalgewicht	18-24,9	durchschnittlich
Übergewicht	25-29,9	Leicht erhöht
Adipositas 1. Grades	30-34,9	erhöht
Adipositas 2. Grades	35-39,9	Stark erhöht
Adipositas 3. Grades	> 40	Sehr stark erhöht

(aus: *Preventing and managing the global epidemic. Hrsg. WHO consultation on obesity; Genova, 3-5 Juni 1997*)

¹ (Mikrozensus-Zusatzbefragung 2003; Pressemitteilung vom 27. April 2004. Statistisches Bundesamt Pressestelle Wiesbaden)

Doch nicht nur die Verbreitung von Adipositas nimmt erschreckende Ausmaße an, parallel dazu steigt auch die Zahl der Folgeerkrankungen wie Diabetes oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Trayhurn *et al.*, 2006). Neben genetischen und umweltbedingten Faktoren, spielt vor allem das Ungleichgewicht von Energieaufnahme und Energieabgabe eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Adipositas (Spiegelman und Flier, 2001). Unsere Nahrungsaufnahme geht nicht mehr konform mit der körperlichen Aktivität, die wir erbringen.

Wann der Körper Nahrung aufnimmt, wird vor allem durch unsere Physiologie gesteuert. Dabei spielen neben der Verfügbarkeit von Essen, metabolische, neuronale und endokrine Faktoren eine herausragende Rolle. Modifiziert wird dieses Zusammenspiel durch visuelle, emotionale und kognitive Reize. Alle diese Informationen müssen verarbeitet werden, um den Beginn, die Dauer und das Ende der Nahrungsaufnahme festzulegen. Um eine dauerhaft gestörte Energiebilanz zu verhindern, ist der Körper mit einem komplexen Regulationssystem ausgestattet. Im zentralen Nervensystem werden neuronale und endokrine Signale zusammengebracht und ausgewertet (Rosenbaum *et al.*, 1997). Dabei gilt der Hypothalamus als ein Schaltzentrum für die Steuerung des Sättigungsgefühls. Afferente Signale, die Auskunft über die vorhandenen Energiespeicher geben, und efferente Signale, die die Energieabgabe übermitteln, werden hier ausgewertet und verarbeitet. Neben dem zentralen Nervensystem, ist auch das Fettgewebe aktiv an der Steuerung der Energiehomöostase beteiligt. Im Fettgewebe wird die aufgenommene Glukose in Form von Triglyceriden gespeichert. Bei Bedarf werden diese Energiereserven freigesetzt und dem Organismus wieder zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus produziert die Fettzelle spezifische Botenstoffe, die ihrerseits in die Regulation des Energiebedarfs eingreifen. Das Fettgewebe ist also nicht nur ein passives Depot zur Speicherung von Energie, sondern ein dynamisches, endokrines Organ, welches eine entscheidende, regulative Funktion in der Glukose- und Energie Homöostase übernimmt.

1.1. Funktionen des Fettgewebes

Bisher galt das Fettgewebe als Ort der Speicherung bzw. Verbrennung von Energie in Form von Triglyzeriden. Dabei sind Lipolyse, Lipogenese und die adrenerg gesteuerte Thermogenese seit langem bekannt. Fett war bisher also ausschließlich ein Energieverwalter. Durch neue, intensive Forschung, wandelte sich dieses Bild vollständig. Das Fettgewebe ist

ein aktives endokrines Organ, welches nicht nur optimal das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -abgabe reguliert, sondern durch die Synthese und Sekretion pleiotroper Hormone eng mit einer Vielfalt biologischer Prozesse verwoben ist (Fruhbeck *et al.*, 2001; Pittas *et al.*, 2004). Dazu gehören vor allem Systeme, die das Überleben des Organismus sichern. Um eine natürliche Selektion zu überleben, muss ein Organismus Strategien und Systeme aufbauen, die sowohl die Spezies als auch das Individuum schützen. Dazu gehört neben einem optimalen Energiemanagement ebenso ein starkes Immunsystem um jederzeit „*fit for fight and flight*“ zu sein, so wie ein aktives endokrines System, das den Alterungsprozess steuert und die Reproduktion sichert. Interessanterweise ist das Fettgewebe in der Lage, all diese Grundvoraussetzungen zu erfüllen. Diese Erkenntnis macht das Fettgewebe zu einem Organ mit hohem therapeutischen Interesse. Da Störungen der Fettgewebefunktionen nachweislich beträchtliche Konsequenzen für den Gesamtorganismus haben, kann sich umgekehrt die selektive Modulation an eben diesen Funktionen therapeutisch positiv auswirken. Im nachfolgenden sollen daher die einzelnen Fettgewebefunktionen wie Insulinsensitivität, Thermogenese und endokrine Aktivität näher beleuchtet werden.

1.2. Insulinsensitivität

Insulinresistenz ist die Hauptursache für die Entstehung von Typ II Diabetes und des metabolischen Syndroms. Von einer Resistenz spricht man, wenn die Wirksamkeit von Insulin an seinem Zielorgan vermindert ist. Eine Dysregulation auf der Ebene der Insulinsensitivität im Fettgewebe geht einher mit einer Veränderung im Energiestoffwechsel insbesondere auf die Glukoseverwertung nach Zuckierzufuhr. In den letzten Jahren sind durch die Erforschung der Insulinresistenz wichtige molekulare Mechanismen der Insulinsignalweiterleitung aufgedeckt und zentrale zelluläre Signal-Elemente entschlüsselt worden.

Nachdem Insulin an seinen Rezeptor gebunden hat, ist dieser in der Lage, sich selber zu phosphorylieren. Diese Autophosphorylierung ermöglicht die Bindung und Phosphorylierung weiterer Signalmoleküle wie zum Beispiel den Insulinrezeptorsubstraten (IRS) 1 und 2. Auch deren Aktivierung führt zur Weiterleitung des Insulinsignals. Dabei vermitteln die IRS Moleküle über SH2-Protein-Domänen die Anlagerung und Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase). Die PI 3-Kinase ist ein Heterodimer und besteht

aus einer regulatorischen Untereinheit p85 und einer katalytischen Untereinheit p110. P110 phosphoryliert Phosphatidyl Inositol (PI) zu Phosphatidyl-Inositol-3,4-bisphosphat und Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat, das dann als *second messenger* wirken kann und weiter zentrale Signalmoleküle, wie AKT oder p70S6 aktiviert. Diese sind schließlich eng an die Proteinbiosynthese gebunden und sorgen durch die Translokation des Glukosetransporters 4 vom Zytosol in die Membran dafür, dass Glukose von der Zelle aufgenommen werden kann. Ein anderer Signalweg, der von den IRS-Molekülen ausgeht, führt zur Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalweges, der die Gentranskription steuert (White und Kahn, 1989; Saltiel und Kahn, 2001).

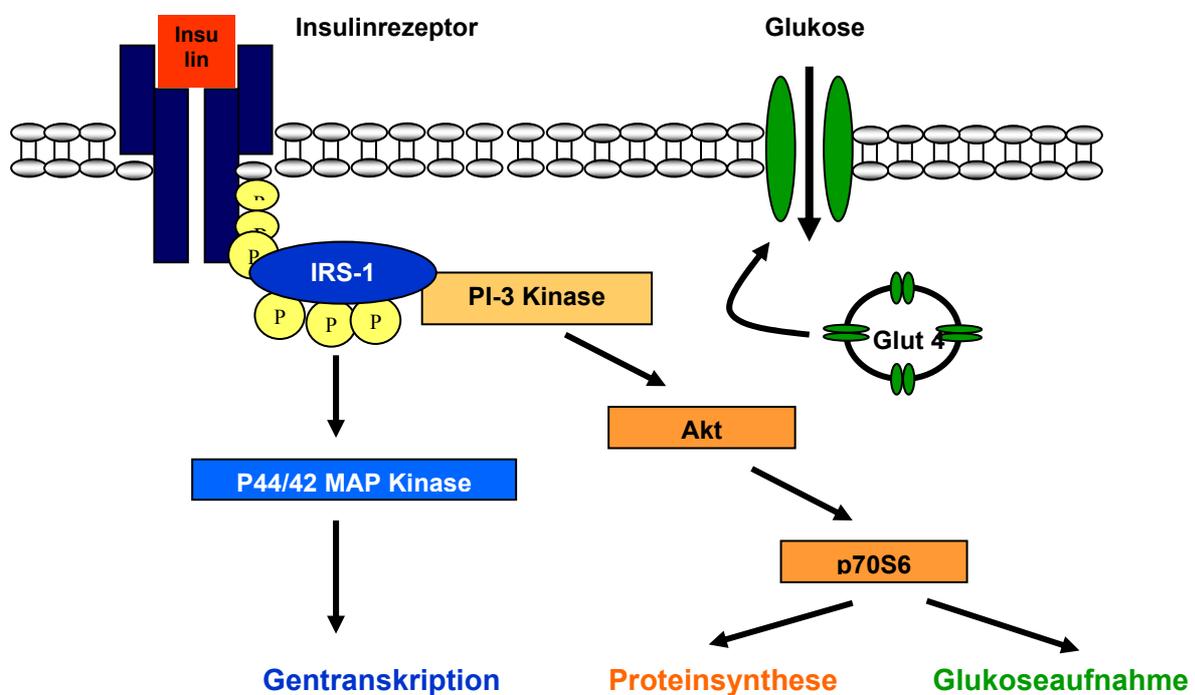


Abbildung. 1: Schematische Darstellung der Insulinsignalweiterleitung. Durch die Anlagerung von Insulin an seinen Rezeptor, autophosphoryliert sich dieser und aktiviert die PI 3-Kinase. Das führt über die Aktivierung weiterer Signalwege zu einer veränderten Proteinsynthese und Glukoseaufnahme. Die Aktivierung der 44/42 MAP-Kinase beeinflusst die Gentranskription

Doch die Funktion des Insulinrezeptors im Fettgewebe ist vielschichtig. Durch die Möglichkeit, Gene zu modifizieren oder auszuschalten, ist es gelungen, neue Erkenntnisse über die Rolle des Insulinrezeptors und dessen Signalwege zu gewinnen. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass ein ubiquitärer Insulinrezeptor knockout innerhalb von 4-5 Tagen nach der Geburt zum Tod des Nachwuchses führt. Anders dagegen bei einer rein lokalen Störung der Insulinsignalvermittlung in verschiedenen Geweben. Schaltet man z.B. den

Insulinrezeptor ausschließlich im Fettgewebe aus (*fat-specific insulin receptor knockout = FIRKO*), bilden diese Tiere, verglichen mit Kontrolltieren weniger Fettmasse aus und sind geschützt vor altersbedingter Adipositas und deren metabolischen Störungen (Bluher *et al.*, 2002). Spektakulär dabei ist allerdings die Beobachtung, dass diese Tiere eine um ca. 18 % erhöhte durchschnittliche Lebenserwartung haben (Bluher *et al.*, 2003). Schaltet man das Insulinrezeptorsubstrat-1 aus, sind diese Tiere von vermindertem Wuchs und haben eine leichte Glukoseintoleranz. Mäuse mit einem IRS-2 Verlust, entwickeln einen schweren Diabetes (Shirakami *et al.*, 2002). Auch die Beeinträchtigung der Glukosetransporter führt zu Diabetes und Insulinresistenz (Guerra *et al.*, 2001).

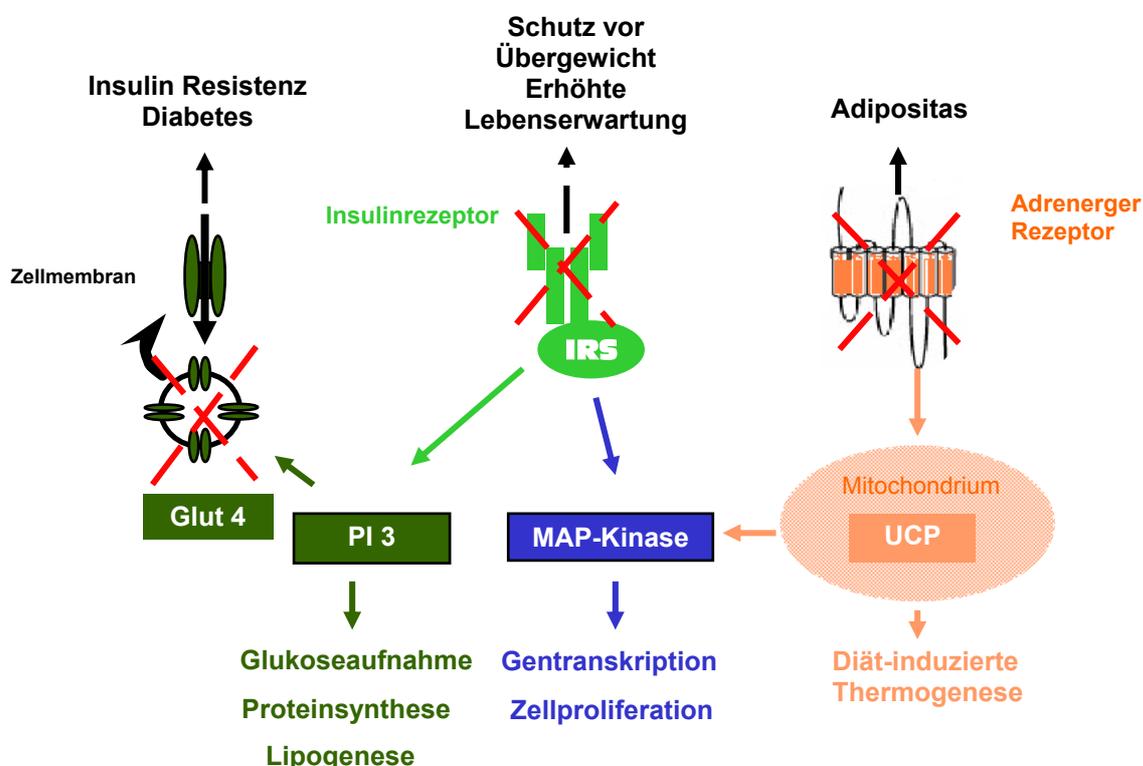


Abbildung 2: Physiologische Auswirkung einer selektiven Störung intraadipozytärer Signalwege. Die mit „X“ gekennzeichneten Gen-Deletionen des jeweiligen Signalelementes hat die mit dem Pfeil angezeigten physiologischen Konsequenzen im Mausmodell. (Aus: *Die neue Sicht es Fettgewebes: „Master Mind“ hinter Pathogenese und Therapie des Metabolischen Syndroms*“ N. Perwitz *et al.* Focus 21, Heft 1, 2004, Universität Lübeck)

1.3. Thermogenese

Neben den bekannteren weißen Fettdepots, die vorwiegend für die Speicherung der Triglyzeride verantwortlich sind, gibt es ein weiteres Fettdepot, welches sich anatomisch und morphologisch von den anderen abgrenzen lässt. Das so genannte braune Fettgewebe, ist sehr mitochondrienreich und stark von symphathischen Nervenfasern innerviert. Seine besondere

Funktion ist die Thermoregulation. Das *uncoupling protein-1* (UCP-1) oder Thermogenin wird ausschließlich in den Mitochondrien exprimiert und ermöglicht die Entkopplung der Atmungskette. Dabei wird ein Nebenweg für den Protonenfluss vom Zytosol zur Matrix gebildet, der die protonenmotorische Kraft an der inneren Mitochondrienmembran zerstört und damit eine ATP-Synthese verhindert. Die gewonnene Energie wird in Form von Wärme freigesetzt. Kleine Säugetiere nutzen diesen Mechanismus, um in der Kälte überleben zu können und ihren Energiehaushalt nach der Nahrungsaufnahme zu regulieren („Diät-induzierte Thermogenese“) (Cannon und Nedergaard, 2004). Braunes Fettgewebe existiert in allen Säugetieren, also auch im Menschen. Bei Neugeborenen bildet es dabei klar definierte Bereiche aus, die z.B. in den Schulterblättern, in der Halsregion und dem Thorax gebündelt vorliegen. Bei Erwachsenen war die Existenz von braunem Fettgewebe lange unklar. Erst durch Zufall ist es möglich gewesen, braune Fettzellanhäufungen im *Positron Emission Imaging* (PET-Imaging) sichtbar zu machen. Diese Methode wird zur Analyse von Tumoren eingesetzt. F-18-Fluorodeoxy-Glukose wird dabei appliziert und lagert sich in besonders stoffwechselaktiven Zellansammlungen ein. Diese sind dann meist ein gutes Indiz für eine mögliche Tumorbildung. Patienten, die bei solchen Untersuchungen noch nicht an die Umgebungswärme adaptiert waren, zeigten deutlich Signale, die nicht auf einen Tumor zurückzuführen waren, sondern auf das ebenfalls sehr stoffwechselreiche braune Fettgewebe (Christensen *et al.*, 2006). Braunes Fettgewebe ist demnach in allen Altersstufen vorhanden. Allerdings ist hier die Depotbildung aufgelöst. Die braunen Fettzellen liegen eingebettet zwischen weißem Fett (Lonnqvist *et al.*, 1993; Spiegelman und Flier, 2001; Cannon und Nedergaard, 2004). Der Mensch ist also auch in der Lage, durch die Expression von UCP-1 im Fettgewebe, Thermogenese zu betreiben. Interessanterweise haben Studien bei adipösen Erwachsenen gezeigt, dass diese eine verminderte UCP-1 Expression im intraperitonealen Fett aufweisen (Oberkofler *et al.*, 1997). Auch Polymorphismen im UCP-1 Gen allein (Fumeron *et al.*, 1996) und in Kombination mit Mutationen im β 3-adrenergen Rezeptor-Gen (Fogelholm *et al.*, 1998; Valve *et al.*, 1998), begünstigen die Entwicklung von Adipositas. Diese Erkenntnisse machen das braune Fettgewebe daher immer attraktiver für gezielte Pharmakotherapien. Ein selektiver Agonist für den β 3-adrenergen Rezeptor, der vor allem im braunen Fettgewebe exprimiert wird und sich positiv auf die UCP1 Menge auswirkt, wird bereits in klinischen Studien getestet (Weyer *et al.*, 1998; Weyer *et al.*, 1999). Unterstützt werden diese Therapieansätze noch dadurch, dass es bereits gelungen ist, durch spezielle Transkriptionsfaktoren weiße Fettzellen in braune umzuwandeln (Tiraby und Langin, 2003;

Tiraby *et al.*, 2003). Dabei könnte überflüssiges Speicherfett in Energie verbrauchende Zellen umgewandelt werden.

1.4. Endokrine Aktivität

Das Fettzellen nicht nur Energiespeicher sind, wurde Anfang der neunziger Jahre entdeckt. Beobachtet wurden Mäuse, die vermehrt Nahrung zu sich nahmen und gleichzeitig physisch äußerst inaktiv waren. Diese Mäuse zeigten einen auffällig adipösen Phänotyp. Durch genetische Untersuchungen wurde eine Mutation in einem einzigen Gen aufgedeckt. Die Identifizierung und Charakterisierung dieses Genproduktes, nämlich Leptin, eröffnete ein ganz neues Feld der Adipozytenforschung (Zhang *et al.*, 1994). Es wurden eine Reihe von Substanzen entdeckt, die exklusiv von Fettzellen gebildet und sezerniert werden. Sie sind unter dem Sammelbegriff Adipokine zusammengefasst worden (Matsuzawa *et al.*, 1999). Neben diesen fettspezifischen Proteinen werden aber auch andere Botenstoffe wie z.B. TNF alpha, Interleukin 6, PAI-1, VEGF und Angiotensinogen von Adipozyten freigesetzt. Da sowohl weiße als auch braune Fettzellen dieses endokrine Potential besitzen, unterstreicht das Fettgewebe hier erneut seine zentrale Rolle im Organismus. Neben dem Energiestoffwechsel spielt es demnach auch eine entscheidende Rolle bei der Inflammation, Hämostase, Angiogenese, im Salzhaushalt und Vasotonus.

Auf die zentralen Adipokine der Energiehomöostase wird nun im weiteren Verlauf intensiver eingegangen.

1.4.1. Leptin

Leptin ist das erste bekannte Adipokin. Sein Name leitet sich vom griechischen Wort *leptos* also schlank ab. Tatsächlich handelt es sich bei Leptin um eine anorexigene Substanz. Dabei hemmt Leptin die Nahrungsaufnahme und erhöht gleichzeitig den Energiestoffwechsel. Es wirkt im zentralen Nervensystem, wo es die Produktion von anorexigen wirkenden Substanzen steigert und die Bildung von orexigenen Neuropeptiden vermindert. Leider haben sich die Hoffnungen schnell zerschlagen, Leptin als neue „Waffe“ gegen Adipositas einzusetzen. Zwar konnte die Gabe von Leptin bei Maus und Mensch das Gewicht reduzieren, aber nur, wenn diese einen Defekt im Leptingen aufwiesen, also nicht in der Lage waren, selber Leptin zu produzieren (Farooqi *et al.*, 1999). Eine Leptintherapie bei adipösen Menschen, die eine „normale“ Leptinsekretion aufwiesen, wirkt dagegen nicht wie erhofft

gewichtsreduzierend (O'Rahilly, 2002). Der Leptinplasmaspiegel ist direkt proportional zur Körperfettmasse, je mehr Körperfett vorhanden ist, desto höher ist auch die Leptinkonzentration. Eine zusätzliche Gabe von Leptin führt dann nicht zur Gewichtsabnahme, sondern fördert eher eine Leptinresistenz (Havel, 2004). Kraus *et al* haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die Glukoseaufnahme, also ein zentraler Endpunkt des Insulinsignalweges in murinen Adipozyten durch die Gabe von Leptin vermindert ist (Kraus *et al.*, 2002). Demnach wird der Körper mit zunehmendem Fettvolumen nicht nur insulinresistent, sondern auch leptinresistent.

Leptin wirkt aber nicht nur auf die Energiehomöostase, sondern spielt in vielen anderen physiologischen Regelkreisen eine gewichtige Rolle. So kontrolliert es die Geschlechtsreife, beeinflusst das Immunsystem wirkt auf die Angiogenese und Hämatopoese, außerdem ist es an der Steuerung des Knochenstoffwechsels beteiligt (Fruhbeck *et al.*, 2001).

1.4.2. Adiponektin

Ein weiteres klassisches Adipokin, welches in engem Zusammenhang mit der Kontrolle der Energiehomöostase und Insulinsensitivität steht ist Adiponektin. Dabei handelt es sich um ein 30kDa großes Plasmaprotein, welches ebenfalls ausschließlich vom Fettgewebe sezerniert wird (Arita *et al.*, 1999). Seine Wirkung vermittelt es über zwei bekannte Rezeptoren: der Adiponektinrezeptor 1 kommt vorwiegend auf Muskelzellen vor, der Adiponektinrezeptor 2 findet sich vor allem auf Leberzellen (Yamauchi *et al.*, 2003). Das Adiponektinrezeptoren auch autokrine Wirkung haben müssen, beweist das Vorkommen beider Rezeptoren auf Fettzellen (Fasshauer *et al.*, 2004). Die Blutspiegel von Adiponektin korrelieren negativ mit Insulinresistenz und Hyperinsulinämie (Weyer *et al.*, 2001). So weisen adipöse und an Diabetes erkrankte Menschen niedrige Adiponektin-Plasmakonzentrationen auf. Diese steigen allerdings unter Gewichtsabnahme wieder an (Yang *et al.*, 2001). Im Tiermodell erhöht die Adiponektingabe Insulinsensitivität und normalisiert die durch genetischen *knockout* des Gens erzeugte Insulinresistenz (Maeda *et al.*, 2002). Die insulinsensitivierende Wirkung wird wahrscheinlich über Veränderung des Fettsäure-Stoffwechsels vermittelt, so wird die Glukosekonzentration im Plasma durch eine gesteigerte Fettsäureoxidation im Muskel reduziert (Fruebis *et al.*, 2001). Auch der parakrine Einfluss auf die Fettzelle trägt zur Normalisierung des Glukosehaushaltes bei. So verbessert ein erniedrigter Insulinspiegel auch die Glukoseaufnahme in die Fettzelle (Wu *et al.*, 2003). Neben der regulatorischen Aufgabe von Adiponektin in der Energiehomöostase (Samal *et al.*, 1994) hemmt es außerdem die

Expression von Proteinen, die an der Pathogenese von Atherosklerose beteiligt sind (Hotta *et al.*, 2000). Zusätzlich erkennen neue Studien geringe Adiponektinmengen als Risikomarker für einen drohenden Herzinfarkt an (von Eynatten *et al.*, 2006).

1.4.3. Visfatin

Als Pre B-cell-colony-enhancing factor (PBEF) wurde Visfatin Anfang der 90iger Jahre isoliert, wobei der Name aus seiner Funktion als Wachstumsfaktor für B-Vorläuferzellen resultierte (Samal *et al.*, 1994). Erst 10 Jahre später wurde von Fukuhara *et al.* ein Protein aus viszeralen Adipozyten isoliert, welches eine identische Sequenz mit PBEF aufwies (Fukuhara *et al.*, 2005). Seinen „neuen“ Namen erhielt es dadurch, dass es vor allem von viszeralen Adipozyten sezerniert wird. Obwohl bereits viele Studien zu Visfatin veröffentlicht wurden, sind noch immer viele Fragen zur Regulation und Funktion offen. Visfatin hat einen Insulin mimetischen Effekt. *In vitro* steigert es die Glukoseaufnahme in Fett und Muskelzellen und verringert die Glukosefreisetzung in der Leber. Ergänzend dazu haben heterozygote Mäuse mit einer Mutation im Visfatingen höhere Plasmaglukosespiegel als vergleichbare Kontrolltiere (Murphy und Bloom, 2006). Ein „eigener“ Rezeptor für Visfatin konnte bis heute nicht identifiziert werden, interessanterweise nutzt Visfatin aber den Insulinrezeptor zur Vermittlung seiner Funktion. Dabei lagert es sich aber nicht an die Bindungsstelle von Insulin an, sondern bindet und aktiviert den Rezeptor an anderer Stelle. Obwohl Insulin und Visfatin einen Rezeptor teilen, hat Insulin keinen Einfluss auf die Visfatin-Synthese (Kralisch *et al.*, 2005), auch führt eine Gabe von Visfatin nicht zu einer Insulinresistenz (Fukuhara *et al.*, 2005). Wie auch Insulin erhöht Visfatin den Glukosetransport und die Lipogenese. In 3T3-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Visfatinlevel während der Adipogenese ansteigen (Kralisch *et al.*, 2005), damit konform geht auch die Beobachtung, dass die Expressionslevel positiv mit der Entwicklung von Adipositas korrelieren. Neben Leptin und Adiponektin spielt also auch Visfatin eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase

Die neue Funktion des Fettgewebes als endokrines Organ und Knotenpunkt des Energiestoffwechsels beinhaltet eine komplexe Integration der auf das Fettgewebe wirkenden Signale. Betrachtet man neben den klassischen Adipokinen auch solche Faktoren die zusätzlich vom Fettgewebe sezerniert werden, wird immer klarer, welche unterschiedlichen physiologischen Prozesse wie Energiestoffwechsel, Hämatopoese, sexuelle Reifung, und Salz- Wasserhaushalt durch das Fettgewebe mit gesteuert werden.

1.5. Neuropeptide

Eine zentrale Rolle bei der Energiehomöostase spielt neben dem Fettgewebe das Gehirn. Anfang der vierziger Jahre wurden erste Experimente am Rattengehirn durchgeführt, die dem Hypothalamus eine entscheidende Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme zuwiesen. Die Läsion des lateralen Hypothalamus reduzierte dabei die Nahrungsaufnahme, während eine Läsion des ventromedialen Hypothalamus zu einer übersteigerten Nahrungsaufnahme der Tiere führte. Die „*dual centre hypothesis*“, wurde aufgestellt, welche das „Hungerzentrum“ im lateralen Hypothalamus und das korrespondierende „Sättigungszentrum“ im ventromedialen Hypothalamus definierte (Anand und Brobeck, 1951). Diese Erklärung ist in ihrer Gesamtheit allerdings stark vereinfacht. Die Kernaussage, nämlich den Hypothalamus als Kontrollzentrum der Nahrungsaufnahme anzusehen, hat allerdings bis heute ihre Gültigkeit nicht verloren. In verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten, werden kognitive und metabolische Informationen über den Energiezustand des Organismus verarbeitet und ausgewertet. So führt ein Energiemangel dazu, dass der Appetit angeregt wird, der Energieverbrauch über die Verlangsamung des Stoffwechsels gesenkt und das sympathische Nervensystem gehemmt wird. Dabei kann auch die Körpertemperatur gesenkt werden und das Fortpflanzungsverhalten eingeschränkt. Vermittelt werden diese essentiellen Eingriffe in den Organismus durch Neuropeptide, die in den hypothalamischen Nerven gebildet werden bzw. durch Hormone aus der Peripherie. Eingeteilt werden diese Botenstoffe in orexigene (Nahrungsaufnahme steigernde) und anorexigene (Nahrungsaufnahme senkende) Substanzen.

	anorexigen	orexigen
Neuropeptide: produziert in hypothalamischen Nerven	Alpha MSH CART CRH Neurotensin	NPY MCH Orexin Endocannabinoide Agouti Peptid
Hormone: gebildet in der Peripherie	Leptin Insulin CCK PYY	Cortisol Ghrelin

Tabelle1: Neuropeptide und Hormone die die Nahrungsaufnahme fördern bzw. hemmen.

Zum besseren Verständnis der Gewichtsregulation durch Neuropeptide hat vor allem die Erschaffung und Erforschung immer neuer Gen *knockout*-Modelle beigetragen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die mRNA Menge und das Protein des Neuropeptides Y im Hypothalamus von Leptin defizienten (*ob/ob*) Mäusen und Zucker Ratten (*fa/fa*) erhöht war (Wilding *et al.*, 1993; Kowalski *et al.*, 1999). Ein weiterer Weg zur Erforschung des Effekts von hypothalamischen Peptiden auf die Energiebilanz ist die direkte Gabe dieser Substanzen. So führt die Gabe von NPY, AgRP oder MC4 Rezeptor Antagonisten in den Hypothalamus von normalen Nagern zu einer Erhöhung des Körpergewichts und der Fettmasse (Stanley *et al.*, 1986; Kask *et al.*, 1999; Hagan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000) wohingegen die anorexigenen Peptide wie alpha MSH, CART und CRH den gegenteiligen Effekt auslösen (Kristensen *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2000). Die wichtigsten Neurone für die Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus sind die orexigenen NPY/AgRP und die anorexigenen POMC/CART synthetisierenden Neurone. Sie sind in einer Region des Hypothalamus lokalisiert, der für Faktoren aus der Peripherie, die Auskunft über den Energiestatus geben wie z. B. Leptin, Insulin, Glukokortikoide oder Ghrelin zugänglich ist. So können diese Hormone ihrerseits Einfluss auf die orexigenen und anorexigenen Kreisläufe im *Nucleus Arcuatus* (NA) nehmen. NPY/AgRP und POMC/CART Neuronen werden aber nicht nur durch Signale aus der Peripherie gesteuert, sondern sind auch untereinander verbunden, so dass eine gegenseitige Regulation nicht ausgeschlossen ist.

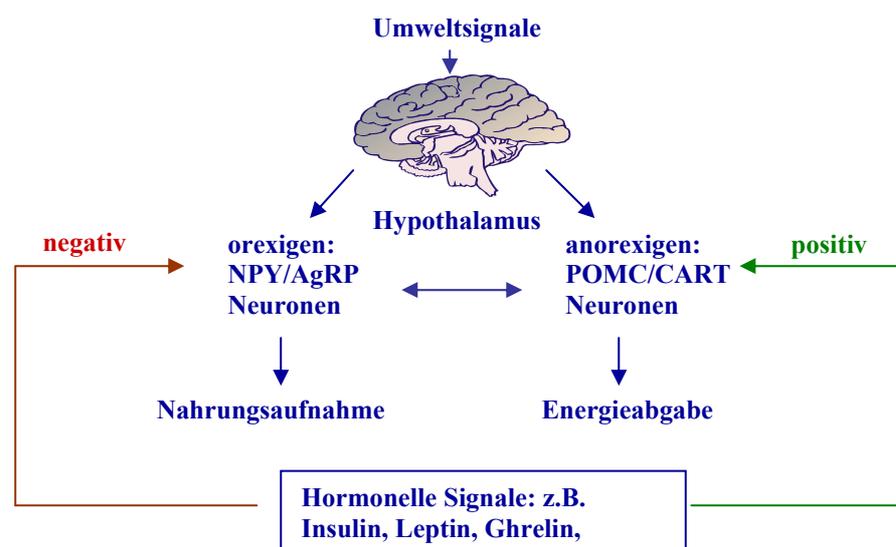


Abb. 3: Schematische Darstellung des Regelkreises zwischen Hypothalamus und Peripherie. Neuropeptide wirken im Hypothalamus und steuern Nahrungsaufnahme und Energieabgabe. Die Aktivität und Genexpression dieser Peptide regulieren sich gegenseitig bzw. werden durch Umweltsignale oder metabolische Hormone aus der Peripherie beeinflusst.

1.5.1 Cocain- und amphetaminreguliertes Transcript: CART

Das Neuropeptid CART gehört zu den stark anorexigen wirkenden Substanzen, die in Gehirnregionen exprimiert werden, die eine wichtige Rolle bei der Nahrungsaufnahme spielen. Sequenziert wurde CART erstmals 1980 als Peptid ohne bekannte Funktion (Spiess und Vale, 1980), erst 15 Jahre später wurde die Sequenz erneut identifiziert, nachdem die homologe mRNA nach der Behandlung von Ratten mit Kokain und Amphetaminen signifikant erhöht war (Douglass *et al.*, 1995). Nachgewiesen wurde dieses Neuropeptide im ventromedialen, im dorsomedialen und periventriculären Nucleus so wie im Nucleus accumbens (Smith *et al.*, 1999). In diesen Nuclei ist CART kolokalisiert mit anderen, an der Gewichtsregulation beteiligten Peptiden und Neurotransmittern (Elias *et al.*, 1998; Broberger *et al.*, 1999). Da es sich dabei sowohl um orexigene als auch anorexigene Substanzen handelt, wird CART eine eher modulierende Rolle zugeschrieben (Vicentic und Jones, 2007). Durch posttranslationale Modifizierungen sind mehrere Isoformen von CART bekannt (Kuhar und Dall Vechia, 1999; Kuhar und Yoho, 1999). Obwohl die mRNA-Homologie zwischen Ratte und Menschen ca. 92% beträgt, finden sich bei der Ratte 2 *Splice-Varianten* des Gens, wohin gegen beim Menschen nur eine biologisch aktive Form identifiziert wurde. Diese *Splice-Varianten* unterscheiden sich dabei in ihrer Länge (Larsen *et al.*, 2000). Doch CART-Peptide sind nicht nur im Gehirn vorhanden, sondern konnten auch in der Hypophyse, Nebenniere, Pancreas und im Darm nachgewiesen werden (Vicentic und Jones, 2007). Außerdem zirkuliert es im Blut (Jensen *et al.*, 1999). Die i.c.v. Gabe von CART-Peptiden inhibiert nachhaltig das Essverhalten von Ratten (Lambert *et al.*, 1998), wohingegen die Behandlung mit einem CART Antikörper die Nahrungsaufnahme stimuliert (Kristensen *et al.*, 1998). Zusätzlich reduziert CART unter dieser Behandlung die Plasma Insulin und Leptin Level bei gleichzeitiger Erhöhung der Lipid Oxidation (Rohner-Jeanrenaud *et al.*, 2002). Eine chronische, zentrale Infusion von CART geht einher mit verminderter Nahrungsaufnahme und Körpergewichtsverlust in normalen und übergewichtigen Versuchstieren (Larsen *et al.*, 2000). Eine Injektion von CART in den paraventriculären Nucleus führt zu einer Erhöhung der UCP1 Expression und damit zu einer vermehrten Thermogenese in braunen Adipozyten (Wang *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2003). CART interagiert mit NPY (Lambert *et al.*, 1998) und Leptin. In vielen Mausmodellen, die eine funktionelle Störung im Leptin System haben, ist die CART mRNA Menge im Hypothalamus sehr gering (Murphy, 2005). In *ob/ob*-Mäusen, die einen Defekt im Leptinrezeptor aufweisen, kann z. B. durch die Rückgabe von Leptin auch die Menge an CART wieder erhöht werden (Kristensen *et al.*, 1998).

Mutationen im CART-Gen gehen einher mit Essstörungen wie Übergewicht und Anorexie. Fehlt das CART-Gen vollständig, zeigen die Versuchsmäuse ein erhöhtes Körpergewicht, und verminderte Insulinsekretion, allerdings ist keine Veränderung der Nahrungsaufnahme zu beobachten (Wierup *et al.*, 2005). Auch human sind Mutationen des CART-Gens beschrieben. So führt eine Missense Mutation im CART-Gen bei einer italienischen Familie, die über drei Generationen untersucht wurde, früh zur Ausprägung eines starken Übergewichts (del Giudice *et al.*, 2001). Ein ebenfalls stark erhöhtes Gewicht wurde bei 30 Japanern beobachtet, die sechs Polymorphismen in der Promotorregion des CART-Gens aufwiesen (Yamada *et al.*, 2002).

Bisher konnte für CART noch kein spezifischer Rezeptor nachgewiesen werden (Kuhar *et al.*, 2000; Dey *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2004). Erste Hinweise zeigen allerdings, dass es sich wahrscheinlich um mehrere G-Protein gekoppelte Rezeptoren handelt, die bevorzugt mit G_{0/i} interagieren (Lakatos *et al.*, 2005).

CART spielt aber nicht nur eine herausragende Rolle bei der Regulation des Essverhaltens, sondern hat auch Einfluss auf kardiovaskuläre Funktion und Knochenumbildung (Hunter und Kuhar, 2003; Vicentic und Jones, 2007). Außerdem findet man hohe CART-Konzentrationen in Geweben, die Stressantworten vermitteln. So konnten Balkan *et al* zeigen, dass eine Adrenalektomie zu einer Verminderung der CART-mRNA führt und die Menge an CART Peptid im *Nucleus Arcuatus* reduziert (Balkan *et al.*, 2003).

1.5.2. Endocannabinoid-System

Schon vor 5000 Jahren wurde die Wirkung der Cannabis Pflanze (*Cannabis sativa*) zu medizinischen Zwecken eingesetzt. So diente Cannabis in der traditionellen indischen Medizin als Analgetikum, Sedativum, Relaxans und Anxiolytikum (Mendizabal und Adler-Graschinsky, 2007). Auch in der westlichen Medizin kam es seit dem 16. Jahrhundert zum Einsatz, obwohl sein psychoaktiver Wirkstoff Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) 1964 erstmalig beschrieben wurde (Mechoulam und Gaoni, 1965; Gaoni und Mechoulam, 1971). Seit dieser Zeit, widmet sich die Forschung intensiv dem therapeutischen Potential der Cannabis Pflanze. In den 80-iger Jahren gelang es Devane *et al.* (Devane *et al.*, 1988) spezifische Bindungsstellen für Cannabinoide und deren Derivate im Gehirn nachzuweisen. So wurde 1990 erstmals von Matsuda *et al.* der Cannabinoid Rezeptor 1 (CB1R) beschrieben. Exprimiert wird dieser Rezeptor vorwiegend im Gehirn, aber auch in der Peripherie wie z.B.

im Herz, im Gastrointestinal-Trakt, im Fettgewebe, im Pankreas und im Muskel (Bensaid *et al.*, 2003; Pagotto *et al.*, 2005; Matias *et al.*, 2006). Neben dem CB1-Rezeptor wurde wenige Jahre später auch ein 2. Rezeptor, welcher vor allem auf Immunzellen aber auch in der Lunge, im Uterus, im Fettgewebe und im Pankreas vorkommt, gefunden (Bouaboula *et al.*, 1993). Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte, 7-Transmembranrezeptoren. Über das Pertussis-Toxin (PTX) koppeln sie an $G_{i/o}$ Proteine; dabei vermindern sie die Aktivität der Adenylylcyclase sowie der Calciumkanäle, gleichzeitig werden Kaliumkanäle und die MAP-Kinase aktiviert (Howlett, 2002). Die Homologie der beiden Rezeptoren beträgt nur 44% (Munro *et al.*, 1993). Neueste Untersuchungen weisen auf mindestens einen weiteren Rezeptor für Endocannabinoide und deren Derivate hin. Ein möglicher Kandidat könnte der Rezeptor GPR55 sein, eine Bestätigung dafür steht allerdings noch aus (Petitet *et al.*, 2006).

Der Fund von spezifischen Rezeptoren für Cannabinoide im Organismus legte die Existenz von körpereigenen Liganden nahe. Identifiziert wurden darauf hin die zwei Hauptvertreter der endogenen Cannabinoide das Arachidonylethanolamid (Anandamid) und das 2-Arachidonyl-Glycerol (2-AG) (Devane *et al.*, 1992; Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995). Das Anandamid wurde nach dem Wort *ananda*, was so viel wie Glückseligkeit bedeutet, benannt. Beide Substanzen binden wie auch Δ^9 THC an die Cannabinoidrezeptoren und haben dabei vergleichbare biologische und pharmakologische Eigenschaften. Anandamide und Arachidonyl-Glycerol sind Derivate der Arachidonsäure, einer mehrfach ungesättigten $\omega 6$ -Fettsäure. Sie werden bei Bedarf nicht nur im Gehirn gebildet, sondern auch als lokale Mediatoren in anderen Geweben. Zur Inaktivierung und zum Abbau werden die beiden Substanzen schnell durch die Enzyme FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) bzw. durch die Monoacylglycerol-Lipase hydrolysiert (Cravatt *et al.*, 1996; Dinh *et al.*, 2002). So exprimieren Mäuse, denen das Enzyme FAAH fehlt, eine signifikant erhöhte Menge an Anandamiden (Cravatt *et al.*, 2001).

Endocannabinoide haben im Organismus eine Vielzahl von physiologischen Funktionen. So steuern sie das emotionale Verhalten, modulieren Schmerzen sowie kognitive Eigenschaften und haben einen sehr großen Einfluss auf das Essverhalten (Kirkham und Williams, 2004). Schon früh hatte man beobachtet, dass es bei Menschen nach Cannabisgenuss zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme kam. Dabei wurde in häufigeren Frequenzen gegessen und vor allem süßes „*snack-food*“ konsumiert (Kirkham, 2005). Diese appetitsteigernde Wirkung von Cannabis wird auch heute in der Medizin zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Bei AIDS und Krebspatienten wird ein synthetisch gewonnenes Δ_9 -THC (*Dronabinol*®)

eingesetzt, welches dem rapiden Gewichtsverlust entgegenwirken soll (Plasse, 1991; Beal *et al.*, 1995; Haney *et al.*, 2005). Auch bei Demenzkranken und alten Menschen wird so die Appetitlosigkeit bekämpft (Volicer *et al.*, 1997). Die zentrale Steuerung des Endocannabinoidsystems verläuft auf zwei Ebenen. Zum einen wird durch die Interaktion mit mesolimbischen Bahnen die Motivation, schmackhafte Nahrung zu finden und zu konsumieren, angeregt. Zum anderen wird es, nach kurzfristigem Nahrungsentzug, bei Bedarf im Hypothalamus aktiviert und reguliert dort die Spiegel und Wirkungen anderer orexigener und anorexigener Mediatoren (Di Marzo *et al.*, 2005). Bei Ratten kann man die Menge der Endocannabinoide im Hypothalamus den vier Phasen des Fressverhaltens zuordnen. Die höchste Konzentration ist bei Nahrungsentzug zu messen, die Geringste während der Nahrungsaufnahme (Kirkham *et al.*, 2002). Dabei korreliert die Endocannabinoidmenge im Hypothalamus invers mit der Menge an Leptin im Blut. Nagetiere, die einen Defekt im Leptingen aufweisen, haben darüber hinaus auch signifikant erhöhte Endocannabinoidmengen im Hypothalamus (Di Marzo *et al.*, 2001). Besonders eindrucksvoll wird die Rolle des Endocannabinoidsystems bei der Energiehomöostase durch *knockout* Modelle und unter der Verwendung des CB1R Blockers Rimonabant bewiesen. CB1R *knockout* Mäuse sind bei normaler Ernährung schlanker als die Kontrolltiere aus dem gleichen Wurf und haben eine geringere Fettmasse (Cota *et al.*, 2003a; Cota *et al.*, 2003b). Darüber hinaus werden diese Tiere auch bei fettreicher Diät nicht adipös und entwickeln weder eine Insulin noch Leptin Resistenz (Ravinet Trillou *et al.*, 2004). Die Gabe von Rimonabant, einem spezifischen Antagonisten des CB1R führt sowohl beim Menschen als auch in verschiedenen Mausmodellen zur Erforschung von Adipositas (z.B. *ob/ob* oder *db/db* Mäuse) zu einem signifikanten Gewichtsverlust. Dieser Gewichtsverlust entsteht allerdings nicht nur durch die zentrale Regulation von orexigenen und anorexigenen Mediatoren, sondern auch durch Effekte in der Peripherie. Durch die Entdeckung von CB-Rezeptoren in weißen Fettzellen konnte eine durch Endocannabinoide vermittelte Aktivierung der Lipoproteinlipase gemessen werden (Cota *et al.*, 2003a; Cota *et al.*, 2003b). Auch führt hier eine Blockade des CB1R sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einem Anstieg von Adiponektin (Bensaid *et al.*, 2003). Doch nicht nur im Fettgewebe spielen Endocannabinoide eine Rolle. So steigert z.B. die Stimulation des CB1R in den Hepatozyten der Leber die *de-novo* Fettsäurebiosynthese (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Wegen ihrer vielschichtigen Wirkungen stehen die Endocannabinoide weiterhin im Focus zahlreicher pharmakologischer Ansatzpunkte.

2. Fragestellung

Die Regulation der Nahrungsaufnahme und somit des Energiehaushaltes ist ein komplexes Zusammenspiel von zentralen und peripheren Signalen. Zwei der wichtigsten Komponenten dabei sind das zentrale Nervensystem und das Fettgewebe. Dabei hat sich gezeigt, dass gerade diese beiden Systeme rege mit einander kommunizieren. Neben ihrer parakrinen Wirkung zirkulieren Neuropeptide im Blut und können so ihre endokrine Wirkung in der Peripherie entfalten. Das Fettgewebe weist spezifische Bindungsstellen und Rezeptoren für Neuropeptide wie z.B. CART oder Endocannabinoide auf. Ob es sich dabei aber um direkte Interaktionen handelt, wurde bisher nicht ermittelt. Zur Aufklärung der Adipozytenantworten auf Neuropeptidstimulation standen folgende Fragen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

- 1. Gibt es eine direkte funktionelle Interaktion orexigener und anorexigener Neuropeptide mit der Fettzelle?**
- 2. Was sind die funktionellen Konsequenzen auf die Schlüsselebenen der Fettzellbiologie, die relevant sind für die Steuerung der Energiehomöostase?**
- 3. Welche Mechanismen liegen den Veränderungen zu Grunde?**

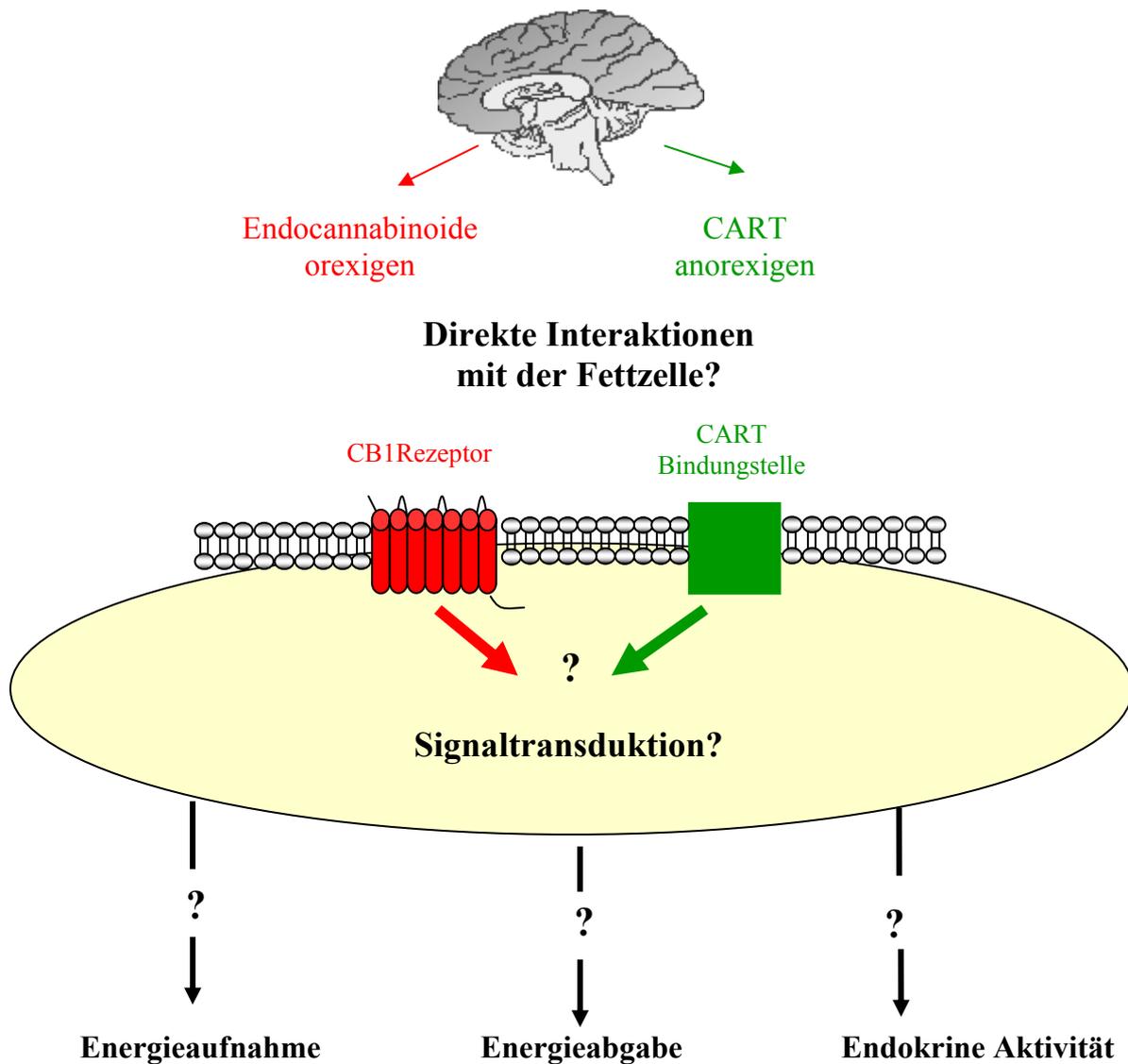


Abb. 4: Schematische Darstellung der zugrunde liegenden Fragestellungen. Gibt es direkte Interaktionen zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Fettgewebe? Wie werden diese vermittelt und zu welchen funktionellen Konsequenzen führt das in der Fettzelle?

3. Materialien

3.1. Verwendete Geräte

Agarosegelkammern:	Peqlab Biotechnology GMBH, Erlangen Roth, Karlsruhe
Autoklaviergeräte:	2540EL Systec, Wetztenberg Varioklav, H+P, Oberschleißheim
Analysenwaage:	Sartorius, Göttingen
Digitalcamera	Olympus, Hamburg
β -Counter:	1409, Wallac, Turku, FIN
Eismaschine:	Scotsman AF-20, Enodis, Herborn
Elektronikrührer Typ M23:	Int. Laborat. App., Dottingen
Elektronische Pipettierhilfe:	accu-jet, Brand, Wertheim
Filmkassette:	Hypercassette, Amersham Biotech, UK
Fluoreszenzmikroskop:	CKX 41, Olympus, Hamburg
Fotokamera:	Mp-4, Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
Gelkammern (Agarose)	Peqlab, Erlangen
Heizblöcke Thermomixer Compact:	Eppendorf, Hamburg
Heizschrank	Lab-Therm, B. Braun, Melsungen
Inkubator Typ B5060, EK CO ₂ :	Heraeus, Osterode
Mikroskop:	CK2, Olympus, Hamburg
Mirkowellengerät	S2719N, Samsung, Schwalbach/Ts.
Multistepper:	Multipette Plus, Eppendorf, Hamburg
Netzgeräte:	Power Pac 300, BioRad, München Power Supply 600, Pharmacia BioTech, SF, USA
pH-Meter:	766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Photometer:	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Pipetten:	Research, Eppendorf, Hamburg
Real Time Thermocycler:	Applied Biosystems, FC, CA, USA Realplex, Eppendorf, Hamburg

Rotator:	Renner GmbH, Dannstadt
Scanner:	UMAX Astra 2200
Schüttler Vortex Genie 2:	Scientific Industries, Bohemia, USA
Schwenker:	Hassa, Lübeck
Stickstofftank:	Arpege 110, VWR International GmbH, Darmstadt
Thermocycler	Cyclone Gradient, Peqlab, Erlangen
Tiefkühlschrank	MDF-1155 Ultra Low Temperature Freezer, Sanyo, München
UV-Leuchttisch:	Vilber-Lourmat, Eberhardzell
Wasserbad:	Typ 3044, Köttermann, Hänigsen
Werkbank (Steril) Nuair Class II:	Zapf Instruments, Sarstedt
Westernblot-Apparatur:	Mini Protean 3, BioRad, München
Wippe:	Doumax 1030, Heidolph
Zentrifugen:	Biofuge fresco, Rotor 3765; Heraeus, Osterode MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburg Multifuge 3 S-R, Heraeus, Osterode Sorvall Ultrazentrifuge, DuPont, Bad Homburg

3.2. Verbrauchsmaterialien

Einmal-Küvetten:

- Proteinphotometrie Halbmikroküvetten Plastibrand, Wertheim
- RNA-Photometrie Mikroküvetten UVette, Eppendorf, Hamburg

Falcon-Röhrchen Sarstedt, Nümbrecht

Film Hyperfilm, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

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

Nitrozellulosemembran Protan BA 85, Schleicher und Schuell, Dassel

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

Pipettenspitzen:

- *Biosphere Filter Tips* (10, 100, 200, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg

- Pipettenspitzen (10, 200, 1000 μ l), Sarstedt, Nümbrecht
- Stabpipetten (5, 10, 25, 50 ml), *Serological Pipette*, Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße (Eppis) Sarstedt, Nümbrecht

- RNase-freie Sarstedt, Nümbrecht
- 96-Well Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Szintillationsröhrchen Sigma, Deisenhofen

Zellschaber Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturschalen:

- „*Tissue culture dish*“ (100/150 x 20 mm) Sarstedt, Newton, USA
- 12-Loch-Platten Corning Instruments, Corning, NY, USA
- 6-Loch-Platten Nunclon Surface, Nalge Nunc International, DK

3.3. Chemikalien

Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany

Aprotinin, Dexamethason, EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure, Titriplex II), Fetales Kälberserum, Formalin, IGEPAL CA-630, Indomethazin, Isobutylmethylxanthin (IBMX), Isopropanol (100%), Leupeptin, β -Mercaptoethanol, Natriumfluorid, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Oil Red O, T3 (3,3',5-Triiod-L-Thyronin-Natriumsalz), TEMED (Tetramethylethylendiamin), Tween 20, bovines Insulin, Puromycin

Fa. Merck, Darmstadt, Germany

Chloroform, Dinatriumhydrogenphosphat * 2 H₂O, Ethanol, Glukose, Kaliumchlorid, Kalium-dihydrogenphosphat, Kalziumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Isopropanol

Fa. Qiagen, Hilden, Germany

RNeasy-Kit (DNase Stock-Lösung, RDD-Puffer, RLT-Puffer, RNase-freies Wasser, RPE-Puffer, RW1-Puffer)

Fa. Roche, Mannheim, Germany

BM1/2-Cyclin, Chemolumineszenzkit (BM Chemoluminescence Western Blotting Kit (Mouse, Rabbit)), Ethidiumbromid, FuGene Transfektionsreagenz

Fa. BioMol, Hamburg, Germany

Glyzin, HEPES (1 M Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure), Rinderserumalbumin (BSA), Tris

Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Amphotericin B, DTT (1,4-Dithiothetrol), Dulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM) *high glucose* (45 g/l), Trizol, Trypsin-EDTA,

Chemikalien anderer Hersteller

Acrylamid 30 (Roth, Karlsruhe), Agarose (Applichem, Darmstadt), APS (Serva, Heidelberg), *aqua dest.* aus eigener Destillieranlage, Aquasafe 300 Plus (ICN Biomedicals, Meckenheim), Bradford *Proteinassay* (BioRad, München), CART (Bachem, Bubendorf), 2-Deoxy-[³H]-Glukose (NEN Life Science Products (Dreieich)), DEPC (Fluka, Steinheim, CH), dNTPs (Fermentas, ST.Leon Roth) Entwickler: G 153B (Agfa-Gevaert Ag, Dübendorf), Ethidiumbromid (Serva Heidelberg) Fixierer: G 354 Schnellfixierer (AgfaGevaert Ag, Dübendorf), Glycerin (85 %) (Apotheke der Universität zu Lübeck), Insulin (Boehringer Mannheim) Nucleospin RNA Extract II (Macherey Nagel, Düren) Methanol (Baker, NL), Penicillin/Streptomycin (Bio Whittaker, Belgien), PMSF (Boehringer, Mannheim), SDS

(Fluka, Steinheim, CH), WIN 55212.2 Tocris (Avonmouth, UK), Immno Pure Immobilized Protein G Beads; (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn),

3.4. Molekulargewichtsmarker

BenchMark™ PreStained Protein Ladder, Invitrogen, Karlsruhe Germany

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

DNA Molecular Weight MarkerX, Roche, Mannheim, Germany

3.5. Antikörper

Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA

Anti-IRS1

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Anti-PPAR gamma

Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA

Anti-PKB

Anti-phospho-PKB (Ser 473)

Anti-GSK3β

Anti-phospho GSK3α/β

Anti-p38 MAP Kinase

Anti-phospho p38 Map Kinase (Thr 180/ Tyr 182)

Anti-p44/42 Map Kinase

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

Anti-p70S6 Kinase

Anti-phospho p70S6 Kinase (Thy 421/ Ser 424)

Chemicon International Temecula, CA, USA

Anti-Uncoupling Protein-1

Anti-Cannabinoid Receptor 1

sekundäre Antikörper

Anti-Ig-Mouse/Anti-Ig-Rabbit,	(Chemiluminescence-Kit, Roche Diagnostics
Goat-Anti-Rabbit	Dako, Glostrup, DK
Rabbit-Anti-Goat	Dako, Glostrup, Dk

3.6. Enzyme und Puffer für RT-PCR

Taq DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
SuperScriptII RNase H ⁻	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-RNase	Ambion Inc. Austin TX, USA
dNTPs	Fermentas GmbH, ST. Leon-Rot
SYBR Green Mix	TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan
RT-PCR Grade Water	Ambion Inc., Austin TX, USA

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

3.7. Primer

Oligo dT Primer zur cDNA Synthese: Fa. Roche, Mannheim, Germany

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

36B4:	Acc. Nr. NM_007475	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT (<i>Forward</i>) CCGCAGGGGCAGCAGTGGT (<i>Reverse</i>)
Leptin	Acc. Nr. NM_008493	ACACACAGCTGGAAACTCCCA (<i>Forward</i>) GATTGAAAGCAGCACCCCA (<i>Reverse</i>)
Adiponektin	Acc.Nr. NM_009605	CTTAATCCTGCCCAGTCATGC (<i>Forward</i>) CTTAATCCTGCCCAGTCATGC (<i>Reverse</i>)

UCP1	Acc Nr. NM_009463	GTACTGGAAGCCTGGCCTTCACCTTGG (F) ATGGTGAACCCGACAACCTTCCGAAGTG(R)
CNR1	Acc.Nr. NM_007726	ATGGTGAACCCGACAACCTTCCGAAGTG (F) TGTGCAGGCAGTCTGAGTCC (R)
CNR2	Acc. Nr.X93168	GCAGAAAGCCCTCGTACCTG (F) CCTTGGGCCTTCTTCTTTCC (R)
Visfatin	Acc. Nr.NM_021524	TCGTTTCTGGTGGCGCTTTGCTAC (F) AAGTTCCCCGCTGGTGTCTATGT (R)

3.8. Puffer und Medien

3.8.1. Zellkulturmedien:

Grundmedium:

Fetales Kälberserum	20 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
in Dulbecco's Eagle Modified Medium	

Differenzierungsmedium:

Fetales Kälberserum	20 %
T3	1 nM
Insulin	20 nM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100µg/ml
in DMEM	

Induktionsmedium:

Dexamethasone	2 mg/l
Indomethazine	50 µM
IBMX	100 µM
in Differenzierungsmedium	

PBS (pH 7,4)

NaCl	8 g/l
KCl	0.2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	1,44 g/l

Kulturmedium Primärzellen:

1M HEPES in Grundmedium

Isolationspuffer:

NaCl	123 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1,3 mM
Glukose	5 mM
HEPES	100 mM
Pen/Strep	100 U/ml
BSA	4 % w/v
Steril filtriert durch 0.2 micron	

3.8.2 Puffer für Proteinanalysen

Lysis-Puffer (pH 7,4 bei 4°C)

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

Laemmli (5x)

Glyzerin	50% vol.
SDS	100 g/l
Bromphenolblau	0,1 g/l
NaH ₂ PO	50 mM
DTT	500 mM

Herstellung 1M Natriumphosphat pH 7

1 M NaH₂PO₄ monobasisch
 1 M NaH₂PO₄ dibasisch
 beide Lösungen solange zusammen
 geben, bis pH 7 erreicht ist

Transferpuffer 10X:

Methanol	20 % vol.
Tris	30 mg/l
Glyzin	144 mg/l

Transferpuffer 1X zur Verwendung:

für 1000 ml
 Methanol 200 ml
 10X Transferpuffer 100 ml
 Ad Aqua dest.

Laufpuffer 10X:

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

Waschpuffer (Rinsing Buffer):

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

APS-Lösung:

10 % (w/v) APS

Waschpuffer für Immunpräzipitation

konz. Elutionspuffer
Igepal (10 %)
85 % Glyzerin
0.1 % BSA
Vanadat (200 mM)
pH 7,4 bei 4°C

Konz. Elutionspuffer:

1 M NaCl
25,5 mM KCL
200 mM HEPES

3.8.3. Oil Red O Färbelösung

Stocklösung:

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

Gebrauchslösung:

60% Oil Red O Stocklösung
40% aqua dest.

3.8.4. Puffer zur Glukoseaufnahme Messung

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

HEPES	20 mM
NaCl	136 mM
KCl	4,7 mM
MgSO ₄	1,25 mM
CaCl ₂	1,25 mM

3.8.5. Puffer für die Agarosegelelektrophorese

TBE Puffer:

Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	2 mM

Auftragspuffer:

Glyzerin	50%(w/v)
SDS	0,2%(w/v)
Bromphenolblau	0.05%(w/v)
In 1x TBE	

DEPC Wasser:

DEPC 1:1000 in Aqua dest.

Mindestens 30 Min rühren

Ü.N. bei 37°C dann autoklavieren

4. Methoden

4.1. Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Verwendet wurden nur steril filtrierte oder autoklavierte Lösungen. Alle Zellkulturmedien und Puffer wurden vor Gebrauch auf 37°C angewärmt.

4.1.1 Fettzellimmortalisierung durch SV40 T-Antigen

Einer 5 Tage alten Maus wurde ca 10 mg weißes subkutanes Fettgewebe aus dem Oberschenkel entnommen, zerstückelt und zur Isolierung der einzelnen Fettzellen aus dem Zellverband, mit Kollagenase inkubiert. Dazu wurde 1 ml Isolierungspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und zusammen mit dem zerkleinerten Fettgewebe bei 37°C für 30-40 Minuten im Wasserbad leicht geschüttelt. Nach der Kollagenasebehandlung wurde das Gewebe durch ein Nylonsieb filtriert (Porengröße 100 µm) und das Filtrat anschließend für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das entstandene Pellet mit Isolierungspuffer gewaschen und erneut für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine 30 mm Schale gegeben, die bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend erneut mit Kulturmedium bedeckt. Danach wurde jeden Tag das Kulturmedium gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten und auf eine neue 60 mm Schale umgesetzt wurden. Bei ca. 50 % Konfluenz wurden die Zellen mit einem retroviralen Vektor (*pBabe*) der für das SV40 T Antigen kodiert und eine Puromycinresistenz aufweist, transfiziert. Dazu wurden die Zellen mit einem Virus infiziert (siehe Herstellung des Virusüberstandes). 0.5 ml des Virusüberstandes wurde mit 8 µg Polybrene und 5 ml Kulturmedium vermischt und für 24 h auf die Zellen gegeben. Anschließend regenerierten die Zellen für 48 h in Grundmedium. Zur Selektion der transfizierten Zellen erfolgte eine 3-wöchige Puromycinbehandlung.

Bis zur Neukultivierung lagerten die verwendeten Zelllinien in flüssigem Stickstoff.

4.1.2. Herstellung von Virusüberstand zur Immortalisierung von Zellen

Die Immortalisierung der Adipozytenzellen erfolgte über ein retrovirales Gentransfersystem. Dazu wurden ein retroviraler Vektor und eine geeignete Verpackungszelllinie benötigt. Bei dem verwendeten Plasmid handelte es sich um einen pBabe Vektor, mit einem Puromycinresistenzgen. Außerdem enthielt dieser Vektor retrovirale 5' und 3' LTRs sowie das Verpackungssignal Psi und das SV40T Gen. Um Virus herstellen zu können, wurde der Vektor mit Hilfe von Fugene in eine Helferzelle transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers für das verwendete Transfektionsreagenz. Als Verpackungszellen dienten Phoenix Zellen. Sie stellten die retroviralen Proteine pol, gag, und env zur Verfügung, um die Vektor RNA später in das Zielgenom zu integrieren bzw. um die Verpackung der neu gebildeten Viria zu gewährleisten. Die von der Helferlinie produzierten Viren wurden in das Kulturmedium sezerniert und konnten nach 48-72 Stunden geerntet werden. Mit Hilfe der so gewonnenen Viren wurden Adipozytenzellen infiziert (siehe auch Fettzellimmortalisierung durch SV40 T-Antigen).

Aus Sicherheitsgründen wurden ausschließlich ecotope (nur für Ratten/Mäuse infektiöse) Viren verwendet. Die infizierten Adipozyten sind zudem nicht fähig, ihrerseits neue, intakte Viria herzustellen.

4.1.3. Kultivierung und Differenzierung von Adipozyten

Die Kultivierung der Präadipozyten erfolgte in einer 150 mm Schale bei einer Temperatur von 37°C und 5 % CO₂. Essentiell für die Aufrechterhaltung der Differenzierungspotenz war die Vermeidung von Zellanhäufungen. Präadipozyten, die weiter passagiert und nicht differenziert werden sollten, durften höchstens eine Konfluenz von 70-80 % erreichen. Ein dichteres Zellwachstum begünstigte die spontane Fetteinlagerung, die einhergeht mit einem veränderten Wachstumsverhalten bis hin zu einem Verlust des Differenzierungspotentials.

Zur kontrollierten Differenzierung wurden die Zellen auf 100 mm Schalen überführt. Dazu wurde die 150 mm Schale 2x mit vorgewärmten PBS gewaschen und für 3 Minuten mit 2,5 ml Trypsin bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen von der Schale gelöst hatten, wurden sie in 35,5 ml Grundmedium aufgenommen und gleichmäßig aufgeteilt (3 ml pro Schale). Dabei wurde ein Teil der Zellen zurück auf eine 150 mm Schale gegeben und diese als Stammpolplatte zur weiteren Vermehrung der Präadipozyten verwendet. Die zu differenzierenden Zellen wurden bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz in Differenzierungsmedium inkubiert. Bei 100 %iger

Konfluenz der 100 mm Platten wurden die Zellen für 24 h mit Induktionsmedium behandelt. Die darin vorhandenen Substanzen wie Dexamethason, Indomethazin und Isobotylmethylxanthin (IBMX), geben der Fettzelle das Signal, die Proliferation zu stoppen, und vermehrt Fett einzulagern indem sie die Expression verschiedener Differenzierungsmarker induzieren. Der erhöhte Stoffwechsel der Zellen in diesem Stadium der Differenzierung verlangte nach einem täglichen Wechsel des Differenzierungsmediums. Im Laufe der Adipozytenausreifung wurde die Ausbildung der Lipidtröpfchen, die sich multilokulär um den Zellkern anordneten, mikroskopisch kontrolliert. Sechs Tage nach Induktion waren die Zellen vollständig differenziert. Um einen Einfluss von Serum auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert.

Zur Differenzierung und Versuchsdurchführung wurden ausschließlich Zellen aus den Passagen 10 bis 28 verwendet.

4.2. Oil red O Färbung

Um die Akkumulation von Lipiden in der Differenzierungsphase der Zellen aufzuzeigen, wurden diese mit dem fettspezifischen Farbstoff Oil red O gefärbt. Dazu wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit einer Formalinlösung fixiert. Nachdem die Fixierlösung entfernt wurde, schloss sich eine einstündige Färbung mit einer Oil red O-Lösung an. Nach der Inkubation mit der Farblösung wurden unspezifische Farbreste durch eine Spülung mit Aqua dest. entfernt. Die Dokumentation der Färbung erfolgte fotografisch und densitometrisch. Zur densitometrischen Auswertung wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen ausgewaschen. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die so entstandene Farblösung in eine Küvette überführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 500 nm im Photometer bestimmt.

4.3 Zellyse zur Proteinaufreinigung

Nach Beendigung der Stimulation wurden die adhären wachsenden Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig von der Platte entfernt war, wurden die Zellen durch die Zugabe von 450 µl kaltem Lysispuffer aufgebrochen und mit einem Zellschaber

vorsichtig von der Platte gekratzt. Das Zelllysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min auf einem Drehrad bei 4°C zur Vervollständigung der Zelllyse inkubiert. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (10 min 13000 rpm) trennte sich das Zelllysat in 3 Komponenten auf. Am Boden des Reaktionsgefäßes befand sich ein Pellet aus Zellresten und Zellkernen. Die wässrige Phase darüber beinhaltete das Protein. Auf der Proteinphase hatte sich eine Fettschicht gebildet, die vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt werden konnte. Zur Lagerung wurde die wässrige Proteinphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde die von Bradford 1976 beschriebene Methode verwendet. Bei dieser Methode wird „Coomassie Brilliantblue G 250 verwendet. Dieser Farbstoff bildet Komplexe mit den Proteinen, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweisen. Der ungebundene Farbstoff dagegen hat sein Absorptionsmaximum bei 465 nm. Die Änderung der Absorption bei 595 nm wird photometrisch bestimmt. Um die genaue Proteinkonzentration berechnen zu können, musste eine Eichgerade mit Proteinen einer bekannten Konzentration erstellt werden.

Vor Gebrauch wurde eine 1:5 mit Aqua dest. verdünnte Bradfordfarblösung hergestellt, und davon je 1 ml in einer Küvette vorgelegt. Anschließend wurde 1 µl des Proteinlysates dazugegeben und gründlich mit dem Vortexer gemischt. Zum Nullabgleich des Photometers bei 595 nm wurde 1 ml der Farblösung ohne Proteinzugabe gemessen. Dieser Probe wurde lediglich 1 µl Lysispuffer zugegeben, um die darin enthaltenen Proteine in Form von Inhibitoren in der Messung zu berücksichtigen. Die aus BSA erstellte Eichgerade umfasste Proteinkonzentrationen von zwei bis 16 mg/ml. Aus der Extinktion der Standardwerten wurde durch lineare Regression eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinmengen der unbekanntes Probelösungen bestimmt werden konnten. Gemessen wurden alle Konzentrationen in Doppelwerten. Anschließend wurden ein Teil der Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und mit Lysispuffer auf gleiche Konzentrationen eingestellt. Zur Denaturierung wurden die Proben für 5 min bei 95°C gekocht. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80°C.

4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese handelt es sich um die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Gegenwart von Natriumlaurylsulfat. Das negativ geladene SDS lagert sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an die Proteine und kompensiert so deren Eigenladung. Zusätzlich werden alle Proteine denaturiert. Durch die Verwendung von reduzierendem DTT werden auch die Disulfidbrücken aufgebrochen. Die Proteine laufen nun nur entsprechend ihrer Molmasse zur Anode. Dazu werden die Zelllysate zunächst in einer Sammelschicht konzentriert, um dann im großporigen Trenngel aufgetrennt zu werden. Der prozentuale Anteil an Acrylamid bestimmt die Porengröße des Gels. Daher wurde je nach Größe des zu detektierenden Proteins der Anteil an Acrylamid im Trenngel bestimmt. Für Proteine mit einem Molekulargewicht von 60-200 kDa wurde ein Gel mit einem 8 % Acrylamidanteil gewählt. Für Proteine mit 16-70 kDa ein Anteil von 10 % Acrylamid und Proteine mit 12-45 kDa wurden in einem 12 % Acrylamidgel aufgetrennt.

Das Trenngel setzte sich wie folgt zusammen:

	8%	10%	12%
Substanz	Volumen		
Aqua dest.	7 ml	6 ml	5 ml
Tris 1,5M ph 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Acrylamid	4 ml	5 ml	6 ml
10 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Nachdem die Lösung in die Gelkammer gegeben worden war, überschichtete man sie mit n-Butanol, um zu vermeiden, dass Luftsauerstoff die Polymerisierung verzögert. Das Gel musste dann für mindestens 30 min polymerisieren. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen. Die Komponenten wurden wie folgt gemischt:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	3,4 ml
Tris 0,5M ph 6,8	625 μ l
Acrylamid	850 μ l
10 % SDS	50 μ l
10 % APS	50 μ l
TEMED	10 μ l

Um die Proben auf das Gel aufzubringen, wurde in das noch flüssige Sammelgel ein Kamm gegeben, der nach dem Entfernen Taschen für ein Volumen von ca. 60 μ l lieferte. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden sie erneut für 5min bei 95°C erhitzt. Parallel zu den Proben wurde auf das Gel ein Proteingewichtsmarker aufgetragen. Die Gele liefen bei einer Spannung von 100V so lange, bis eine größtmögliche Auftrennung der Proteine bzw. des Markers erfolgt war.

4.6 Westernblot

Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Acrylamidgel auf einen Trägerfilter übertragen und auf diesem immobilisiert. Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster der Proteinmoleküle bleibt erhalten. Proteine sind nach dem Transfer für verschiedene Liganden, Antikörper, Lectine oder Enzymsubstrate zugänglich. Der Westernblot erlaubt sowohl eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner Proteine im Gemisch als auch deren Identifikation. Beim Immuno-Blotting reagieren geeignete Antikörper mit den auf der Membran transferierten Proteinen. Ist der Antikörper markiert, (durch Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Beta-Galaktosidase), kann er direkt nachgewiesen werden. Bei der indirekten Nachweismethode wird der gebundene Antikörper durch einen markierten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Nachdem die Proteine vollständig aufgetrennt waren, wurden sie mit einer Spannung von 100 V auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Länge des Transfers wurde durch die Größe des Proteins bestimmt. Dabei galt die Regel: je größer das Protein ist, desto länger ist die Transferzeit. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Waschpuffer mit 3 %

BSA (*Bovines Serum Albumin*) inkubiert. BSA sättigte die Bindungsstellen der Membran und verhindert so bei der anschließenden Antikörperdetektion unspezifische Bindungen.

Am nächsten Morgen wurde die Membran für 2 h mit einem für das zu detektierende Protein spezifischen Antikörper bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Antikörper wurde dazu 1:1000 mit Rinsingpuffer + BSA verdünnt. Um den Primärantikörper vollständig zu entfernen, wurde die Membran nach der Inkubationszeit 3 mal für 5 min mit Rinsingpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Zweitantikörper für eine weitere Stunde auf die Membran gegeben. Der Zweitantikörper richtet sich gegen den Erstantikörper und war zusätzlich Peroxidase gekoppelt. Er wurde mit einer Verdünnung von 1:1500 in Rinsingpuffer eingesetzt. Nach erneutem Waschen der Membran für 3 mal 5 min mit Rinsingpuffer, wurde auf die Membran eine Detektionslösung geträufelt. In dieser Lösung befand sich ein Substrat, welches durch die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers ein Fluoreszenzsignal ergab. Dieses Fluoreszenzsignal wurde in der Dunkelkammer auf einem Film dokumentiert. Zur Auswertung wurde der Film gescannt und die optische Dichte des Signals durch eine geeignete Software bestimmt. Dabei war die Schwärzung des Films proportional zur Proteinmenge auf der Membran.

4.7. Immunopräzipitation

Um ein spezifisches Protein zu konzentrieren, ist es möglich, dieses mit seinem Antikörper einen Komplex formen zu lassen und diesen Komplex an Beads zu koppeln. Die Zellen wurden wie beschrieben stimuliert und lysiert. Nach der Proteinbestimmung wurde das Zelllysat zusammen mit dem spezifischen Zielantikörper in einem Reaktionsgefäß für 4 h bei 4°C geschüttelt. Zur Vorbereitung der Beads wurden diese dreimal mit Waschpuffer gespült. Dazu wurde der Puffer auf die Beads gegeben und gründlich gevortext. Danach wurde dieses Gemisch durch Zentrifugation für 1 Minute bei 4000 rpm getrennt und der Überstand entfernt. Die so gewaschenen Beads wurden dann gleichmäßig auf die Reaktionsgefäße mit dem Protein-Antikörper Komplex verteilt und bei 4°C über Nacht unter langsamem Schütteln inkubiert. Dabei wurde der Protein-Antikörper-Komplex an die Beads gebunden. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 4000 rpm und 4°C. Der so gewonnenen Überstand wurde abgenommen und mit Laemmli-Puffer versetzt. Durch Gelelektrophorese und anschließendem Westernblot konnte die Menge der nicht Beads gekoppelten Proteine bestimmt werden. Dies diente als Kontrolle für eine vollständige Bindung des Zielproteins an seinen Antikörper.

Das Pellet, welches aus Beads und Protein-Antikörper bestand, wurden 3 mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit ca. 30 µl Laemmli-Puffer versetzt. Dieses Gemisch wurde dann

für 30 min bei 37°C geschüttelt. Dabei lösten sich die Proteine von den Beads und reicherten sich im Laemmli-Puffer an. Diese Lösung wurde zur vollständigen Trennung der Beads in ein Filterreaktionsgefäß gegeben und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen und die Probe für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Das Proteinlysate wurde im Westernblot dargestellt und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

4.8. Messung der Glukoseaufnahme in die Zelle

Die Bestimmung der Glukoseaufnahme in eine Zelle erfolgte radioaktiv. Gemessen wurde die Menge an radioaktiv markierte 2-Desoxyglukose, die unter Insulinstimulation von der Zelle aufgenommen wurde. Möglich ist diese Messung, da die Zelle 2-Desoxyglukose nicht weiter verstoffwechselt, sondern speichert.

Zur Messung der Glukoseaufnahme wurden Präadipozyten nach dem beschriebenen Protokoll in 12-Loch Schalen kultiviert und differenziert. Nachdem die Zellen vollständig differenziert waren, wurden sie für 24 h in Mangelmedium gehalten und anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Dabei wurde jede Stimulation als Triplet durchgeführt. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen in den Schalen zweimal vorsichtig mit Krebs-Ringer-Puffer gewaschen. In einem Volumen von 450 µl Krebs-Ringer-Puffer wurden die Zellen anschließend mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Danach wurden die Zellen mit 50 µl eines Gemisches aus einer 1 mM 2-Desoxyglukoselösung und 50 µCi/ml 2-Desoxy-[³H]Glukoselösung versetzt und für 4 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gespült und mit je 500 µl einer 0,1 %igen Natriumdodezylsulfatlösung für ca. 10 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gemischt. Das so entstandene Zelllysate wurde mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und jede Probe für je eine Minute in einem β -Counter gezählt. Die Mittelwerte der dreifachen Stimulation wurden zur Auswertung verwendet.

4.9. Gewinnung von RNA aus Adipozyten

Um RNA aus Fettzellen zu isolieren, wurden diese wie beschrieben in 10 cm Schalen kultiviert und differenziert. 24 h vor Stimulation wurden die Zellen in Mangelmedium gebracht. Anschließend wurden sie WIN bzw. CART behandelt. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Konzentrationen als auch unterschiedliche Stimulationszeitpunkte getestet. Nach der Stimulation wurde die Platte mit den Zellen vorsichtig mit kaltem PBS gespült. Um die Zellschalen über Nacht zu lagern wurden sie nach dem Waschen in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend in einer

Ultra-Tiefkühltruhe bei -134°C gelagert. Zur Weiterverarbeitung wurde auf die leicht angetauten Zellen 1 ml Trizol gegeben und die Zellen in dieser Trizollösung von der Platte geschabt. Die Flüssigkeit mit den Zellen wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min gründlich gevortext. Das so entstandene Zelllysat wurde für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen, die im nächsten Schritt getrennt wurden. Von Interesse war dabei nur die mittlere Trizolphase die die RNA enthielt. Die auf der Probe gebildete Fettschicht konnte verworfen werden, auch das Pellet bestehend aus Zelltrümmern wurde verworfen. Die Trizolphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit $250\ \mu\text{M}$ Chloroform versetzt. Dabei erfolgte eine Trennung von Proteinen und Nucleinsäuren. Dieses Trizol-Chloroformgemisch wurde für 15 sek. gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min und 4°C bildeten sich 3 Phasen aus. Zur weiteren Verwendung wurde die obere wässrige in der sich die RNA angereichert hatte in einem neuen Reaktionsgefäß mit $700\ \mu\text{l}$ kaltem Isopropanol vermischt. Ab diesem Zeitpunkt mussten alle verwendeten Reaktionsgefäße und Spitzen RNase frei sein. Um die RNA zu fällen, wurde die Probe kurz geschwenkt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min und 4°C . Dabei formte sich ein Pellet, welches mit 1 ml 75% ETOH überschichtet wurde, und für 10 s gevortext wurde. Die Probe wurde dann erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig vom Pellet abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde dann in $100\ \mu\text{l}$ RNase freiem Wasser aufgenommen. Um sicher zu stellen, dass die RNA frei von Kontaminationen mit DNA, und Protein war, wurde die so gewonnene RNA erneut über eine Säule aufgereinigt. Dazu wurde der RNA Isolierungskit der Firma Qiagen verwendet. Durchgeführt wurde dieser erneute Reinigungsschritt nach dem im Benutzerhandbuch beschriebenen *clean-up* Protokoll. Zusätzlich wurde, ebenfalls nach Herstelleranleitung ein DNA-Verdau durchgeführt. $350\ \mu\text{l}$ RLT Puffer des Herstellers und $250\ \mu\text{l}$ 100% iges Ethanol wurden zu der Probe gegeben um eine selektive Bindung an die Säulenmatrix zu unterstützen. Diese Probengemisch wurde gut durchgemischt und auf eine *RNeasy Mini spin* Säule aufgebracht und für 15 s bei 10000rpm zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Säulenmatrix. Um DNA Kontaminationen auszuschließen wurde ein Verdau mit DNase angeschlossen. Dazu wurde die Säulenmatrix mit der gebundenen RNA mit $350\ \mu\text{l}$ RW1 Puffer des Herstellers gewaschen (Zentrifugation 15 s, 10000rpm). $10\ \mu\text{l}$ DNase einer DNase Stocklösung wurden mit $70\ \mu\text{l}$ RDD Puffer des Herstellers versetzt und vorsichtig gemischt. $80\ \mu\text{l}$ dieses Gemisches wurde auf die RNA Säule gegeben dort für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden $350\ \mu\text{l}$ RW1 Puffer auf die Säule gegeben und diese für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Es folgten ein

Waschschritte mit 500 µl RPE Puffer des Herstellers. Nach einer Zentrifugation für 2 Minuten bei 10000rpm wurde die RNA mit 50µl RNase freiem Wasser von der Säule eluiert.

4.10. Bestimmung der RNA-Menge

Um den RNA Gehalt der Probe zu bestimmen, wurde eine 1:50 Verdünnung hergestellt und diese im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Um den Reinheitsgrad der Probe zu bestimmen, wurde zusätzlich ein Quotient aus der Messung von 260/280 gebildet. Dieser sollte im Idealfall zwischen 1,7 und 2 liegen. Außerdem wurde die RNA zur Qualitätskontrolle in einem Agarosegel aufgetrennt. Dabei zeigten sich bei einer intakten RNA zwei prominente Banden für die 18S und 28S rRNA. Außerdem betrug das Verhältnis der Fluoreszenzintensität zwischen den beiden Banden 2:1.

Ein Teil der so gewonnenen RNA wurde bei -80°C gelagert, der andere Teil in cDNA umgeschrieben.

4.11. Herstellung eines Agarosegels

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein biochemisches Trennverfahren, bei dem geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats in wässriger Lösung negativ geladen und wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar umso langsamer, je größer sie sind. Verwendet wurde dafür eine feste Gelmatrix aus Agarose. Zur Auftrennung der RNA wurde ein 2 % Gel verwendet. Die entsprechende Mengen Agarose wurde zusammen mit 1x TBE Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Das flüssige Gel wurde mit Ethidiumbromid versetzt und in eine mit Kämmen vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Erkalten des Gels, wurden die aufzutrennenden Proben in die Geltaschen pipettiert, wobei sie vor dem Auftragen mit $\frac{1}{4}$ ihres Volumens Bromphenolblaulösung gemischt wurden. Zur genaueren Bestimmung der Fragmentgrößen wurden parallel Markermoleküle aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 mA, bis die Bromphenolblaufront $\frac{3}{4}$ des Gels durchlaufen hatte. Danach konnte das Gel auf einem Leuchtkasten mit ultraviolettem Licht ausgewertet werden. Ethidumbromid interkaliert in die DNA und wird durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt. Das Bandenmuster wurde durch ein Photo dokumentiert. Bei einer sauberen RNA Präparation waren auf dem Gel sowohl die 18S als auch die 28S RNA Banden deutlich zu sehen.

4.12. Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurden 4 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl eingestellt. Anschließend wurde die RNA mit 2 µl oligo dt Primer (10 µM) hinzugefügt. Nach 2 min bei 70°C wurden weitere Komponenten dazugegeben.

8 µl First Strand Puffer

2 µl dNTP Mix (2,5 mM)

2 µl DTT (0,1 M)

1 µl MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)

1 µl RNase Inhibitor

Dieses Gemisch wurde dann für 1 h bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Nach abschließender Erhitzung der Probe auf 95°C konnte die so hergestellte cDNA in einer quantitativen PCR eingesetzt werden.

4.13. Quantifizierende RT-PCR

Durch eine quantifizierende PCR kann die Transkriptionshäufigkeit eines bestimmten Gens ermittelt werden.

Im Gegensatz zur Herstellung von cDNA unter Verwendung von Zufalls- (d.h. sequenzunspezifischer) Primer, wurde bei der darauf folgenden PCR sequenzspezifische Primer eingesetzt, die sich aus der Sequenz des zu untersuchenden Gens ableiteten. Zur Quantifizierung der PCR wurde der Abi Prism 7000 von der Firma Applied Biosystems verwendet. Dieser misst die Fluoreszenz eines in die neu synthetisierten DNA Doppelstränge interkalierenden Farbstoffes. Die emittierte Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus (Verdoppelung der Menge an doppelsträngiger DNA) gemessen. Dieses Signal ist dabei direkt proportional zur Menge der gebildeten DNA und steigt wie auch die Menge an DNA exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus und vergleicht mit Standards, ist eine direkte quantitative Aussage möglich. Anhand der Menge des PCR Produktes kann man demnach auf die Menge der eingesetzten Matrizen DNA schließen.

4.14. Reaktionsansatz für quantitative RT-PCR

Für die Quantifizierung der RNA wurde als Reaktionsgefäß ein 96-Loch Format verwendet. Alle Messungen wurden in Doppelwerten durchgeführt und parallel zum Zielgen auch die Menge eines Haushaltsgens für jede Probe bestimmt.

Mastermix für 1 well:

11,325 µl	Aqua dest. RNase frei	4 µl	50 % Glyzerin
2,5 µl	10x Puffer	0,75 µl	100 % DMSO
0,5 µl	25 mM MgCl ₂	0.375 µl	Reference Dye
1 µl	20 mM dNTP working solution	2,5 µl	SYBR Green
0,5 µl	<i>Primer forward</i>	0.05 µl	Taq Polymerase
0,5 µl	<i>Primer reverse</i>		

Der Mastermix wurde gründlich gemischt und je 23 µl davon in jede Bucht vorgelegt. Anschließend wurden 2 µl der jeweiligen cDNA zugegeben und die Platte mit einer Plastikfolie versiegelt. Danach wurde die Platte bei ca. 2000 rpm zentrifugiert. Das PCR-Programm richtete sich nach dem jeweiligen Primer für das zu bestimmende Zielgen.

Die Ergebnisse aus der quantifizierenden RT-PCR wurden mittels der delta delta ct Methode relativ zueinander bestimmt.

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

Dazu wurde das REST© Software Programm: *Relative Expression Software Tool; for the Relative Expression in real-time PCR using Pair. Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* verwendet. (Pfaffl *et al.*, 2002)

4.15. Primer Design

Die spezifischen Primer für jedes Zielgen leiteten sich von der jeweiligen Nucleotidsequenz des Gens ab. Dazu wurde unter zur Hilfenahme der Datenbank des National Center for Biotechnology (NCBI) die bekannte Nucleotid Sequenz für das Zielgen ermittelt, und unter Verwendung des Primer Design Programms Primer Express der Firma Applied Biosystems optimale Primer bestimmt. Diese wurden zur Absicherung ihrer Spezifität mit den Sequenzen aller bisher bekannter Genome verglichen (BLAST). Zusätzlich wurden alle PCR Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, um mögliche unspezifische Anlagerungen auszuschließen. Vor Verwendung der Primer in der Quantifizierungsreaktion wurde ihre Linearität in verschiedenen Verdünnungsstufen überprüft und die Spezifität mit einer Schmelzkurve abgesichert.

4.16. Statistik

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben. Zur Signifikanzberechnung wurde der ungepaarte Student t-Test verwendet, bei dem 2 voneinander unabhängige Proben miteinander verglichen wurden. Als statistisch signifikant waren Werte kleiner oder gleich 0.05. Statistisch hoch signifikant wurden Werte beschrieben, die kleiner oder gleich 0.01 waren.

5. Ergebnisse

5.1. Charakterisierung einer neu generierten weißen Adipozytenlinie.

Zur Untersuchung der direkten Neuropeptidwirkungen auf die Fettzellfunktionen wurden immortalisierte braune und weiße Adipozytenlinien verwendet. Bei den braunen Zellen handelte es sich um eine bereits etablierte und charakterisierte Linie die von Prof. Dr. med. J. Klein erstellt wurde (Klein *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde eine neue weiße Fettzelllinie im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Vor ihrer Verwendung als Modellsystem wurde sie funktionell charakterisiert, wobei essentielle Fetteigenschaften wie Differenzierung, Insulinsensitivität und Endokrineaktivität überprüft wurden.

5.1.1. Differenzierung:

Um eine vollständige Differenzierung der neuen weißen Zellen zu untersuchen, wurden diese, nachdem sie konfluent gewachsen waren, für 24 h induziert und anschließend über einen Zeitraum von 6 Tagen kultiviert. Zur makroskopischen Untersuchung wurden die Zellen am Tag der Induktion (Tag 0) und an den Tagen 3 und 6 mit einer fettspezifischen *Oil red O* Färbung behandelt. Die Intensität der Rotfärbung ließ eine Beurteilung der Fetteinlagerung zu. Die hier verwendeten Zellen bildeten während dieser Differenzierungsphase typische Lipidtropfen im Zytoplasma aus, die am 6. Tag nach der Induktion den gesamten Zellinnenraum ausfüllten. Dabei waren mindestens 95 % der Zellen vollständig differenziert.

Abb. 1

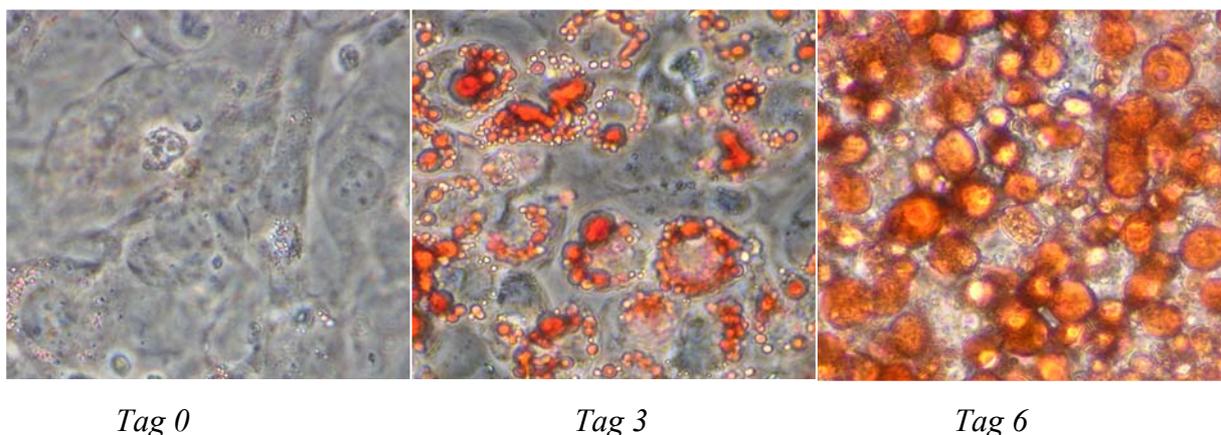


Abb. 1: vollständige Differenzierung der neuen weißen Zelllinie nach Induktion

Fettspezifische *Oil red O* Färbung an den Tagen 0, 3 und 6. Das Maß der Rotfärbung gibt Aufschluss über die Menge des akkumulierten Fetts. Dargestellt sind die Zellen bei einer 400x Vergrößerung.

5.1.2. Differenzierungsmarker:

Zur weiteren Überprüfung der vollständigen Ausreifung der neuen Zelllinie, wurden neben der optischen Kontrolle durch eine Oil red O Färbung auch die Expression verschiedener Differenzierungsmarker untersucht. PPAR gamma gehört zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren während der Adipogenese. Seine Expression nimmt mit zunehmender Reifung des Adipozyten zu. Durch Western Blot Analysen wurde die PPAR gamma Menge an den Tagen 0, 3 und 6 nach Induktion bestimmt. Dabei konnten am Tag 0 nur sehr geringe Mengen detektiert werden, diese stiegen während der Reifung des Adipozyten um das 3,5 fache an und erreichten schließlich an Tag 6 ihren maximalen Wert.

Abb. 2A.

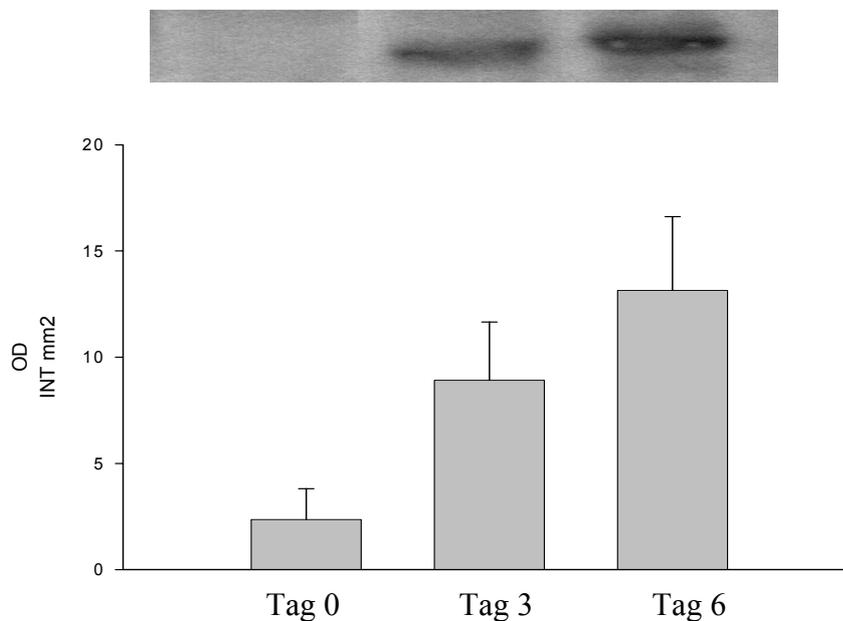


Abb.2A: Nachweis des Differenzierungsmarkers PPAR gamma während der Adipogenese.

Die Balkendiagramme zeigen Westernblot Analysen mit einem spezifischen PPAR gamma Antikörper. Zusammengefasst wurden 3 unabhängige Versuchsreihen. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des detektierten Bandenmusters.

5.1.3. Insulinsensitivität:

Um die Insulinsensitivität des Zellmodells zu überprüfen, wurde die Insulin induzierte Glukoseaufnahme gemessen. Hierzu wurden die differenzierten Adipozyten mit 1 nM, 10 nM oder 100 nM Insulin für 30 Minuten stimuliert. Schon bei einer geringen Insulinkonzentration

war ein Anstieg der Glukoseaufnahme zu messen. Den größten Effekt erbrachte die Stimulation mit einer maximalen Insulinkonzentration von 100 nM (Abb.2B).

Abb. 2B

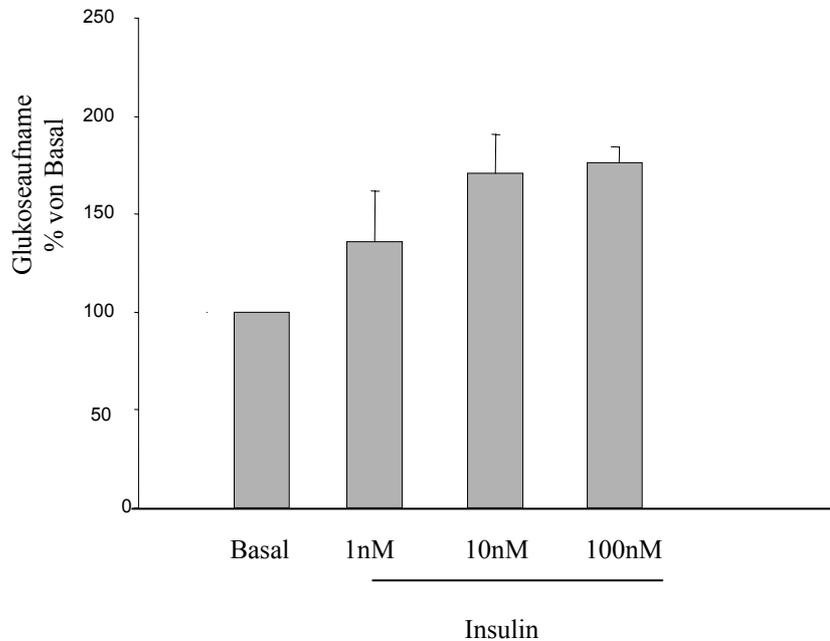


Abb.2B Messung der Insulinsensitivität. Adipozyten wurden mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen behandelt. Gemessen wurde die Menge an Tritium markierter Glukose, die von der Zelle aufgenommen wurden. Dabei erhöhte eine maximale Insulinstimulation mit 100nM Insulin die Glukoseaufnahme um 75%. Dargestellt wurden 3 unabhängige Experimente.

5.1.4. Adipokinexpression:

Neben dem Differenzierungspotential des neuen Fettzelllinie und ihrer Insulinsensitivität, wurde auch die Fähigkeit zur Expression von Adipokinen überprüft. Alle getesteten Adipokine wie Leptin, Adiponektin und Visfatin konnten dabei nachgewiesen werden. Die Literatur beschreibt negative Effekte auf die Adiponektin Expression unter β -adrenerger Stimulation in 3T3-L1 Zellen (Fasshauer *et al.*, 2001). Dieses etablierte murine Zellmodellsystem wird häufig zur Erforschung der Fettzellbiologie verwendet. Das neue Adipozytenmodell, reagiert ebenfalls auf eine β -adrenerge Stimulation durch die Reduktion der Adiponektinmenge. Differenzierte Zellen wurden mit 100 nM CL 316,243 für 24 h inkubiert und zeigten eine um 80% erniedrigte Adiponektin Expression.

Abb. 2C.

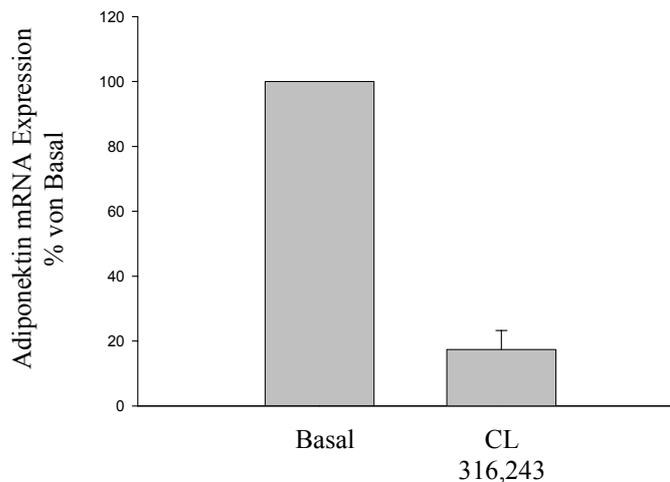


Abb. 2C Stimulation mit einem Agonisten für den β 3-adrenergen Rezeptor reduziert die Adiponectin Expression. Adipozyten wurden nach der vollständigen Differenzierung für 24 h mit CL 316,243 stimuliert. Wie in der Literatur für weiße Adipozyten beschrieben, wurde die Expression von Adiponectin inhibiert. Dargestellt wurden 2 unabhängige Experimente.

5.2. Nachweis des CB1 Rezeptors in Adipozyten

Essentiell für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Neuropeptiden und Fettzelle, ist die Ausbildung einer Bindungsstelle auf dem Adipozyten für die jeweilige Substanz. Bekannt sind bisher die Rezeptoren der Cannabinoide, ein eindeutiger Rezeptor für CART ist noch nicht identifiziert worden. Der hier verwendete Cannabinoidrezeptor Agonist WIN 55212.2 bindet spezifisch an den Cannabinoidrezeptor 1. Dieser konnte im Adipozyten sowohl auf RNA Ebene als auch im Western Blot detektiert werden. Zusätzlich war auch der Nachweis des bekannten zweiten Cannabinoidrezeptors (CB2) im vorliegenden Zellmodell möglich.

Ergänzend zur RNA wurden Western Blot Analysen für CB1R an verschiedenen Tagen der Differenzierung durchgeführt. Dabei zeigte sich eine differenzierungsabhängige Expression des Rezeptors, die einhergeht mit einer positiven Korrelation zwischen Rezeptormenge und Lipidakkumulation.

Zeitraums nicht (Abb. 4a.). Im gleichen Zeitrahmen ebenfalls unverändert bleibt die Fetteinlagerung unter Behandlung mit dem CB1 Agonisten WIN 55212.2. (Abb. 4b.)

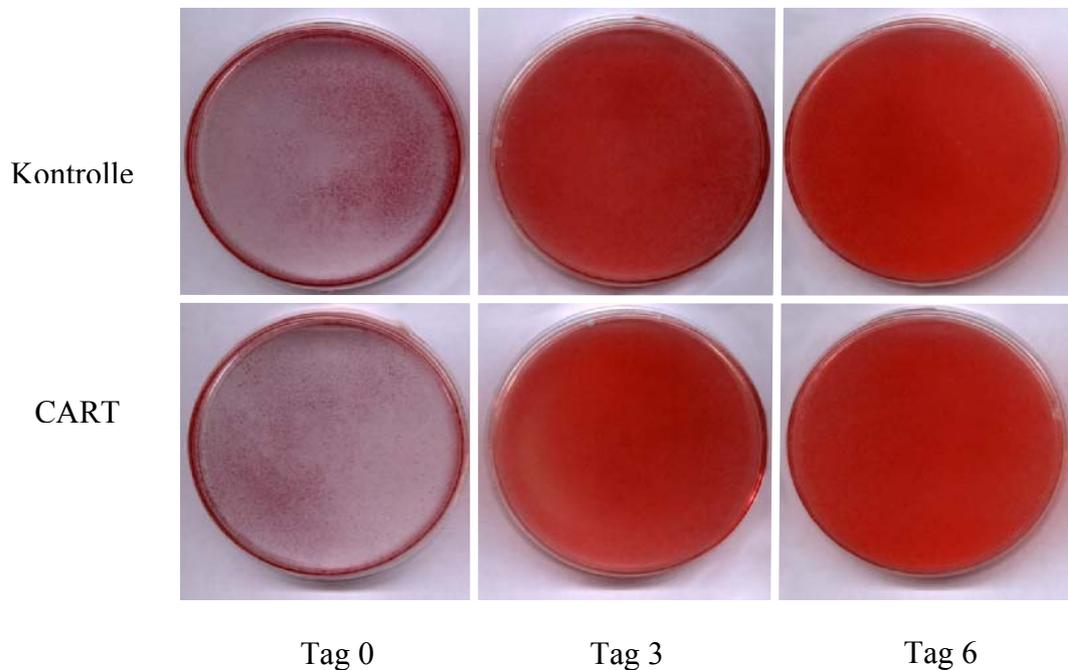
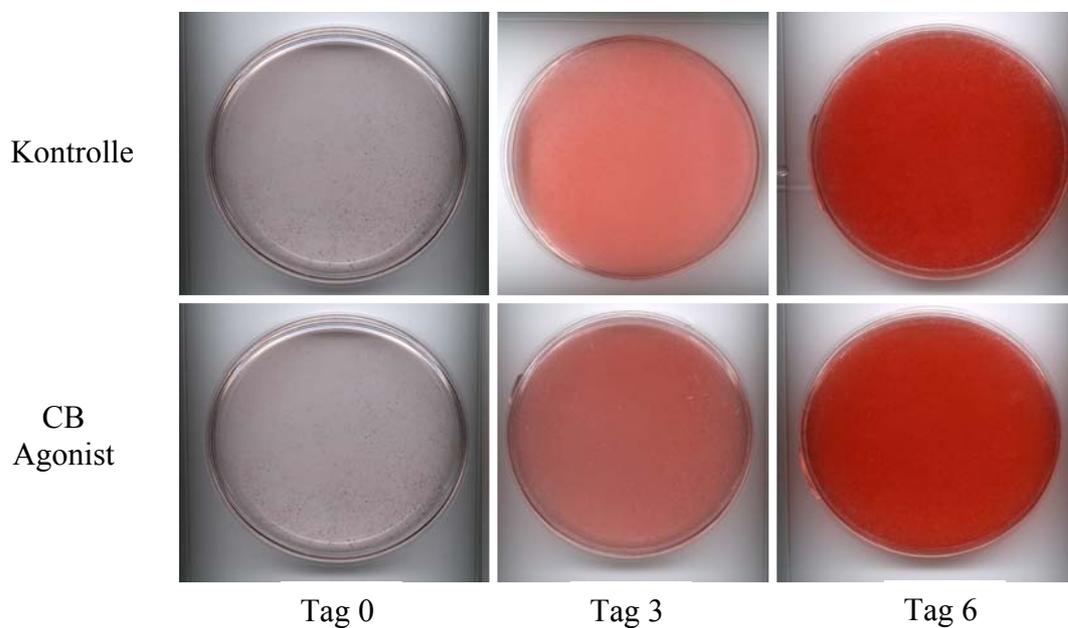
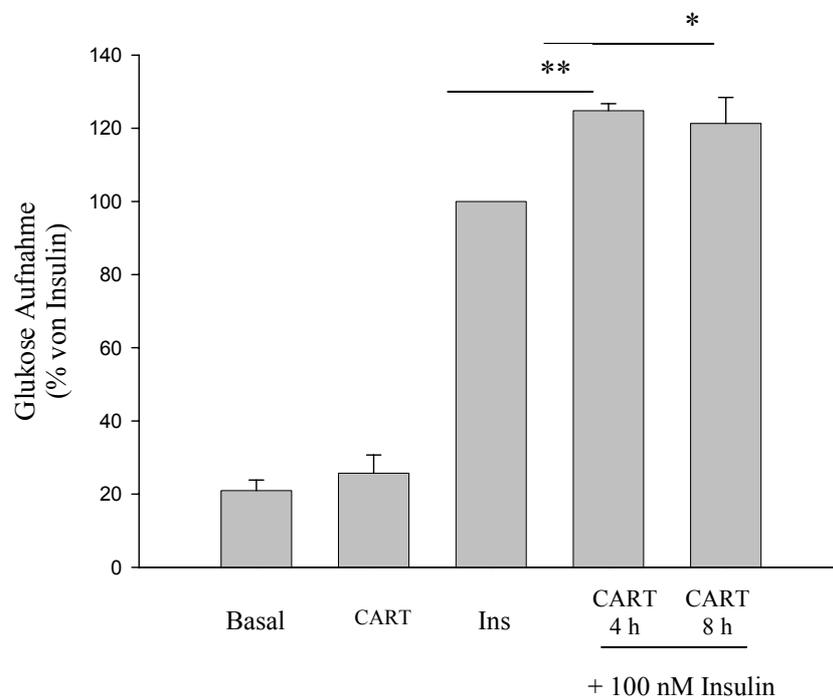
Abb. 4**a.****b.**

Abb. 4: Einfluss von CART und WIN 55212.2 auf das Differenzierungsverhalten von Fettzellen. Adipozyten wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen nach Induktion chronisch mit CART (Abb. 4a) oder WIN 55212.2 (Abb. 4b) behandelt. Weder CART noch der CB1 Agonist beeinflusste die Ausreifung der Fettzellen und deren Fettakkumulation wie hier mit einer fettspezifischen oil red O Färbung dargestellt.

5.4. Insulinvermittelte Glukoseaufnahme

Eine der klassischen Funktionen der Fettzelle ist die durch Insulin vermittelte Aufnahme und Speicherung von Glukose. Dabei wird die überschüssig aufgenommene Glukose in Triglyzeride umgewandelt. Die Glukoseaufnahme gilt als wichtiger Endpunkt der Insulinsignalkaskade, und Veränderungen hier wirken sich auf den Gesamtorganismus aus. Untersucht wurde daher die Auswirkung einer Stimulation mit Neuropeptiden auf die insulininduzierte Glukoseaufnahme. Dazu wurden differenzierte Adipozyten über einen Zeitraum von 8 h mit 1 μ M CART bzw. 1 μ M WIN 55212.2 alleine oder zusätzlich mit 100 nM Insulin stimuliert. Die Aufnahme von 3 H-markierter Glukose wurde nach 4 h und 8 h gemessen. Nach 4 h war eine maximale hochsignifikante Steigerung der Glukoseaufnahme um 25 % unter CART Stimulation zu beobachten. Dieser fördernde Effekt durch CART war auch nach 8 h in einem geringeren Ausmaß noch zu beobachten (Abb. 5a). Um einen deutlicheren additiven, synergistischen Effekt von CART und Insulin aufdecken zu können, wurden Adipozyten mit halbmaximalen Insulinkonzentrationen stimuliert. Eine Veränderung in der Menge der aufgenommenen Glukose konnte dabei nicht festgestellt werden (Abb. 5b)

Abb. 5a.



b.

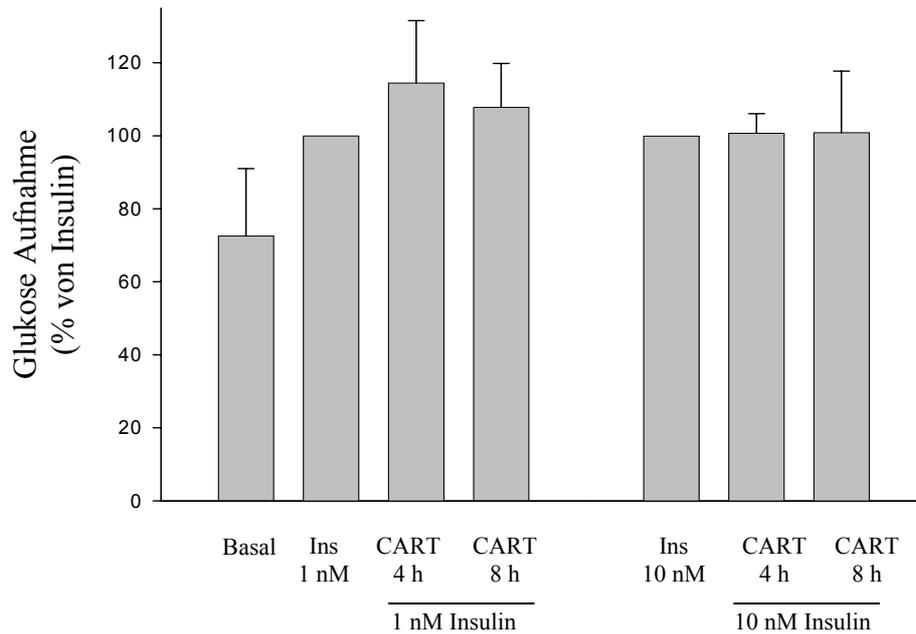


Abb. 5: Effekte von CART auf die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme.

Adipozyten wurden gleichzeitig mit CART und unterschiedlichen Insulinkonzentrationen behandelt. Gemessen wurde die Menge an Tritium markierter Glukose, die von der Zelle aufgenommen wurden. Dabei erhöhte eine maximale Insulinstimulation mit gleichzeitiger CART Behandlung die Glukoseaufnahme um 25 %.(a) Submaximale Insulinkonzentrationen zeigen keine Effekte (b). Dargestellt wurden 2-4 unabhängige Experimente. ** wenn p-Wert < 0.01, * wenn p-Wert < 0.05. zu Basal

Keinen Effekt auf die Menge der gemessenen Glukoseaufnahme zeigte die Behandlung der Zellen mit dem CB-Agonisten WIN 55212.2. Zwar war eine Antwort auf den Insulinstimulus vorhanden, dieser konnte aber nicht durch die zusätzliche Gabe von WIN gesteigert oder vermindert werden (Abb.6)

Abb.6

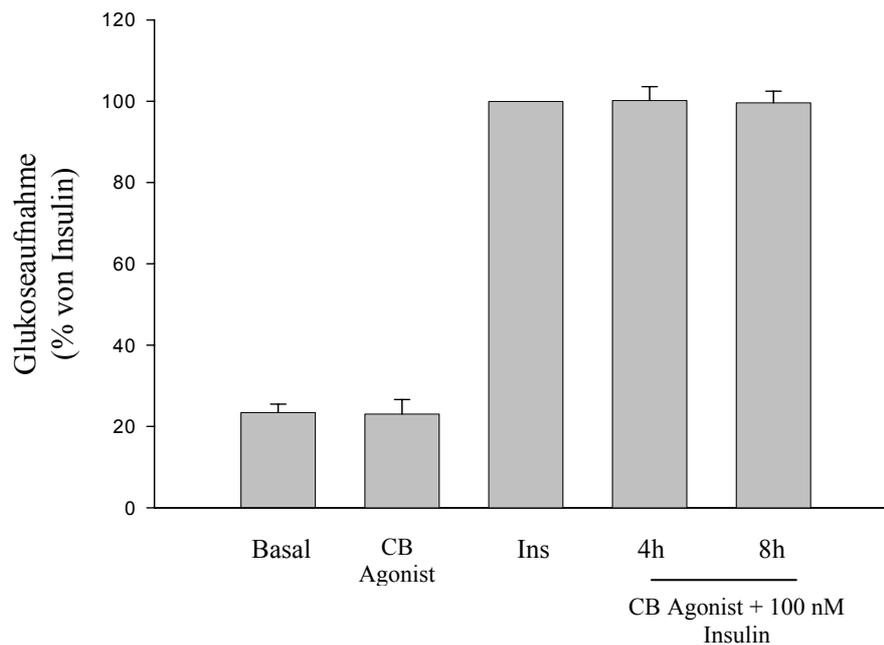


Abb. 6: Insulin-induzierte Glukoseaufnahme unter WIN 55212.2 Behandlung. Adipozyten wurden 4 h bzw. 8 h mit WIN vorstimuliert und anschließend 30 min mit Insulin behandelt. Am Ende der Insulininkubationszeit von 4 min wurden die Menge der aufgenommenen ^3H Glukose gemessen. Dabei waren keine Veränderungen durch WIN nach zuweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus 6 unabhängigen Messwerten.

5.5. Insulinsignalwege

Eine Änderung in der Insulin induzierten Glukoseaufnahme geht einher mit der Veränderung des Insulinsignalweges. Daher wurden Schlüsselproteine entlang der Insulinkaskade auf ihre Veränderungen durch die Stimulation mit CART oder dem CB-Agonisten WIN 55212.2 untersucht. Dazu wurden differenzierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten und unterschiedlichen Konzentrationen mit dem jeweiligen Neuropeptid behandelt, und anschließend lysiert. Proteinspezifische Antikörper gaben nach ihrer Detektion im Westernblot Auskunft über die Menge und den Phosphorylierungsgrad des jeweiligen Schlüsselproteins. Dabei signalisierte die Menge der Phosphorylierung den Grad der Aktivierung.

5.6. Aktivierung von Signalproteinen durch CART

5.6.1. Tyrosin-Phosphorylierung von IRS1

Nach der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor und dessen Autophosphorylierung lagert sich unter anderem das Insulinrezeptorsubstrat 1 an den Rezeptor an. Eine Tyrosinphosphorylierung am IRS1 gilt als Zeichen für eine weitere Aktivierung der Insulinsignalkaskade. Braune Adipozyten wurden für 2 min, 5 min, 10 min oder 20 min mit einer CART Konzentration von 1 μ M stimuliert. Dabei zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg der IRS1 Tyrosinphosphorylierung. Das um 50 % erhöhte Signal hatte seinen Maximalwert nach 2 Minuten und reduzierte sich nach 20 Minuten auf seinen Ausgangswert zurück.

Abb. 7

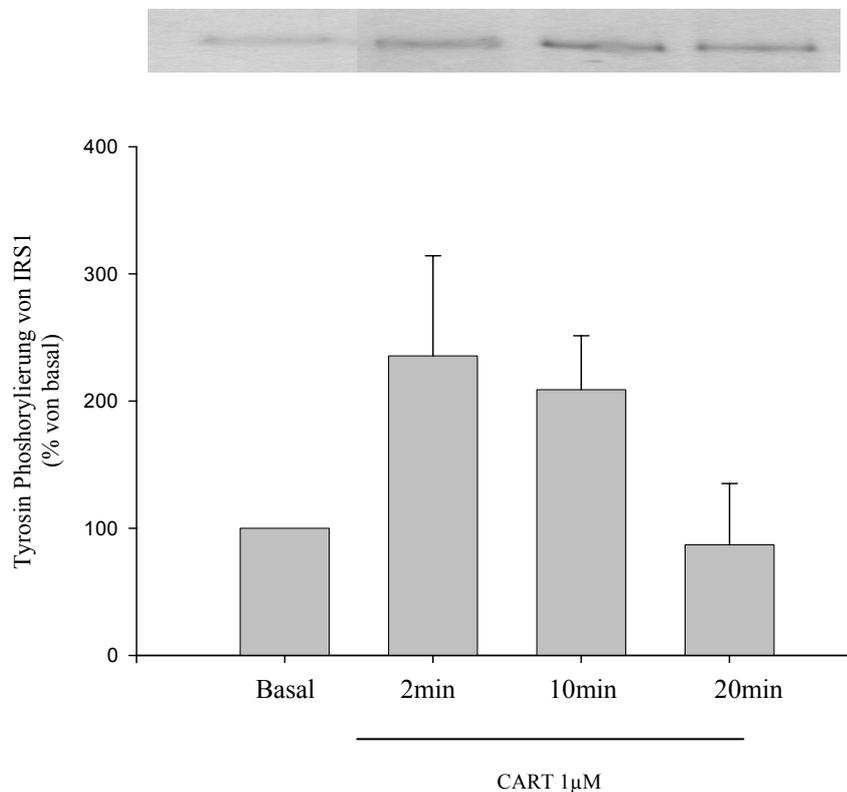


Abb. 7: CART vermittelt Tyrosinphosphorylierung an IRS 1. Differenzierte Adipozyten wurden mit 1 μ M CART über einen Zeitraum von 20 Minuten stimuliert. Dabei war nach 2 Minuten ein maximaler Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von 50 % zu beobachten. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und Standardfehler aus 3 unabhängigen Messwerten. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Westernblot detektierten Bandenmusters.

5.6.2. PKB Phosphorylierung:

Ein weiteres Schlüsselprotein bei der Weiterleitung des Insulinsignals ist die Proteinkinase B. Sie liegt distal vom Insulinrezeptor und des Insulinrezeptorsubstrats. Untersucht wurde das Maß der Phosphorylierung von PKB während einer akuten Stimulation mit 1 μM CART über einen Zeitraum von 20 min. Bereits nach 5 Minuten war ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung zu beobachten, dieser erhöhte sich nach 10 Minuten um maximal 70 % (Abb. 8).

Abb. 8

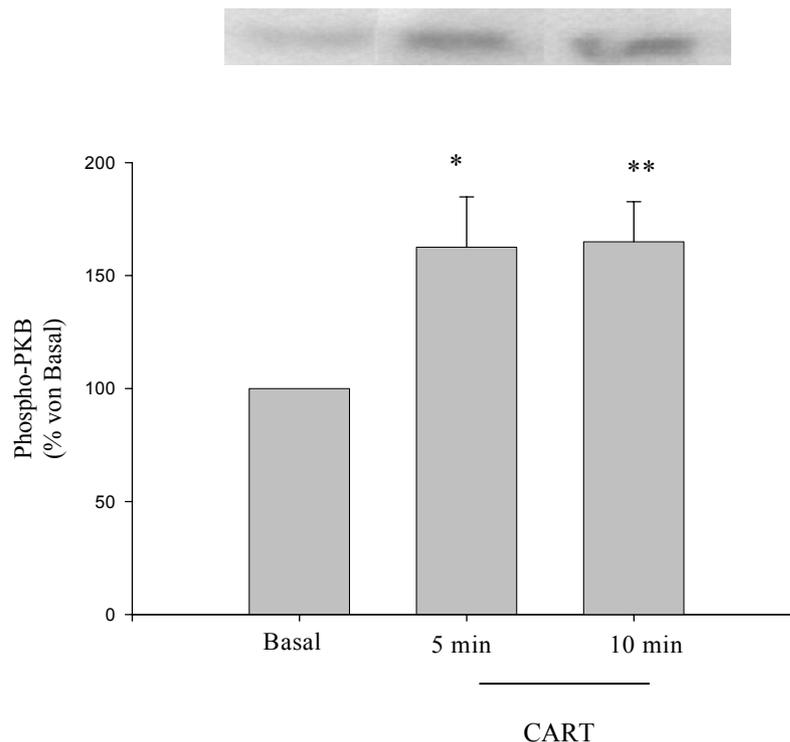


Abb. 8: Erhöhte PKB-Phosphorylierung durch CART-Behandlung. Nach akuter Stimulation von differenzierten Adipozyten mit CART wurde die Phosphorylierung von PKB durch spezifische Antikörper ermittelt. Dabei erhöht CART die PKB-Phosphorylierung maximal nach 10 min um 70 % verglichen mit nicht behandelten Zellen. Dargestellt wird der Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Messwerten. ** wenn p-Wert < 0.01, * wenn p-Wert < 0.05. im Vergleich zum Kontrollwert. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Westernblot detektierten Bandenmusters.

Um zu beobachten, wie eine gleichzeitige Stimulation der Zellen mit CART und Insulin die Phosphorylierung von PKB beeinflusst, wurden differenzierte Zellen jeweils mit CART (1 μM) oder Insulin (100 nM) alleine bzw. mit einer Kombination aus CART und Insulin behandelt. Dabei wurde die Stimulation akut für 5 min (Abb. 9a) oder für 1 h bzw. 2 h (Abb. 9b) durchgeführt. CART alleine verdoppelt die Phosphorylierung von PKB sowohl nach

akuter als auch nach längerer Stimulation. Bei alleiniger Stimulation mit Insulin wurde eine 4-5-fach erhöhte Phosphorylierung beobachtet. Im gleichen Maße findet sich diese verstärkte Phosphorylierung auch bei der kombinierten Gabe von CART und Insulin. Ein synergistischer Effekt von CART und Insulin ist nicht zu beobachten.

Abb. 9a

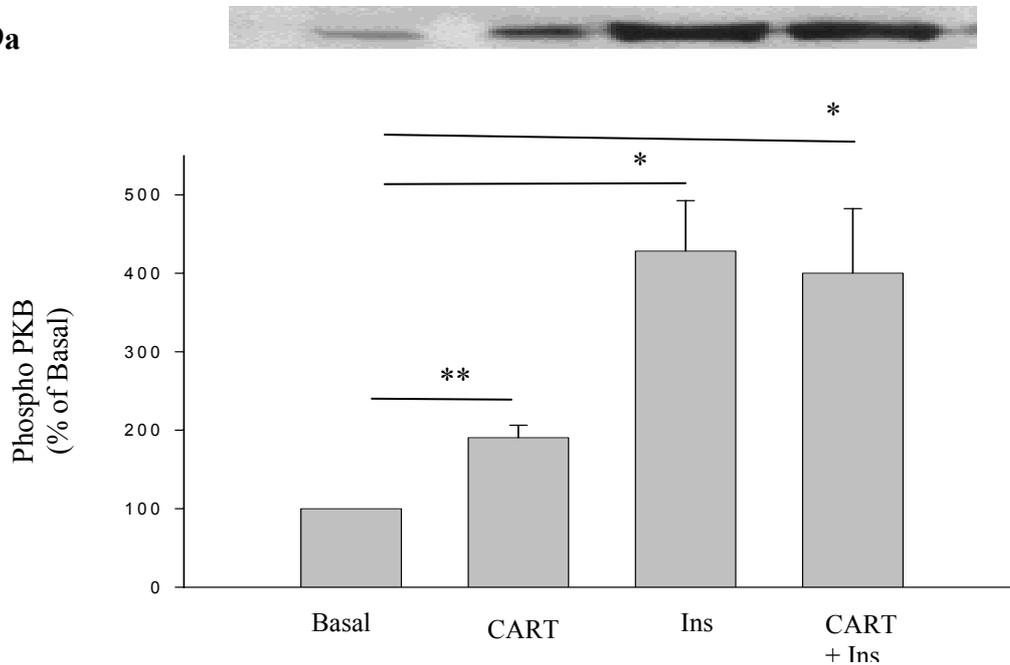


Abb. 9b

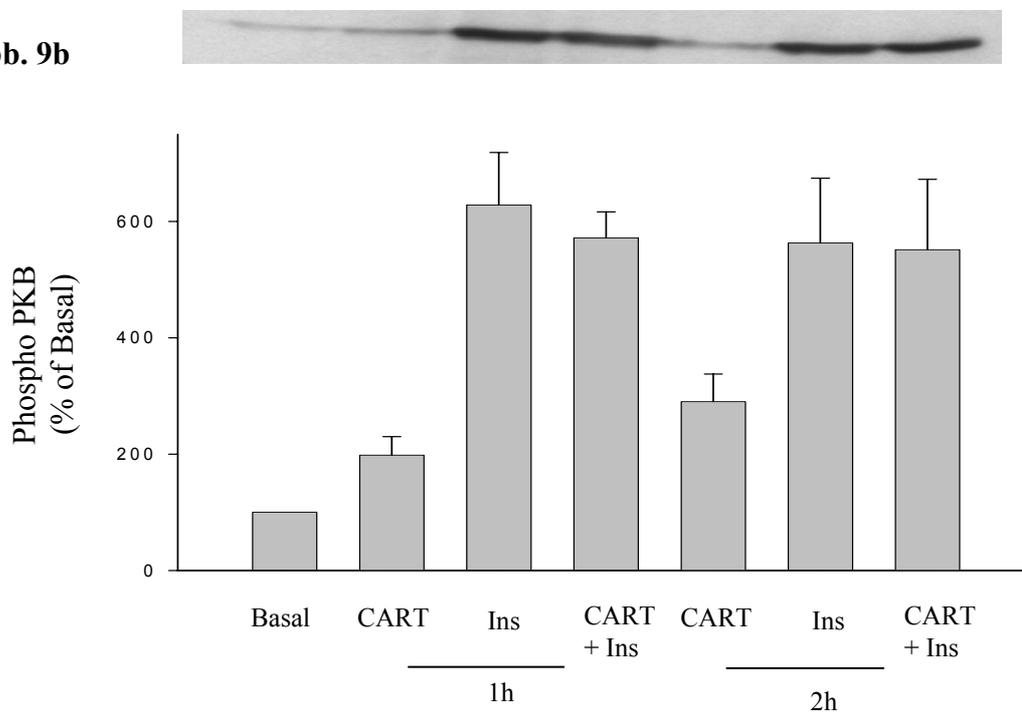


Abb. 9: CART hat keinen Effekt auf die Insulin-induzierte PKB Phosphorylierung. Dargestellt wird der Mittelwerte und Standardfehler aus 2-6 unabhängigen Messwerten. ** wenn p-Wert < 0.01, * wenn p-Wert < 0.05. im Vergleich zum Kontrollwert. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Western blot detektierten Bandenmusters.

5.7. Aktivierung von Signalproteinen durch den CB1 Rezeptor

Obwohl die Stimulation mit dem CB-1 Agonist WIN 55212.2 keinen Anstieg in der Glukoseaufnahme erbrachte, wurden Veränderungen der PKB-Phosphorylierung beobachtet. Die Stimulation mit WIN 55212.2 erhöhte die PKB-Phosphorylierung bereits nach 5 Minuten um 40 %, nach 10 Minuten erreichte sie dann einen maximalen Anstieg um ca. 350 % ihres Ausgangswertes (Abb.10).

Abb. 10

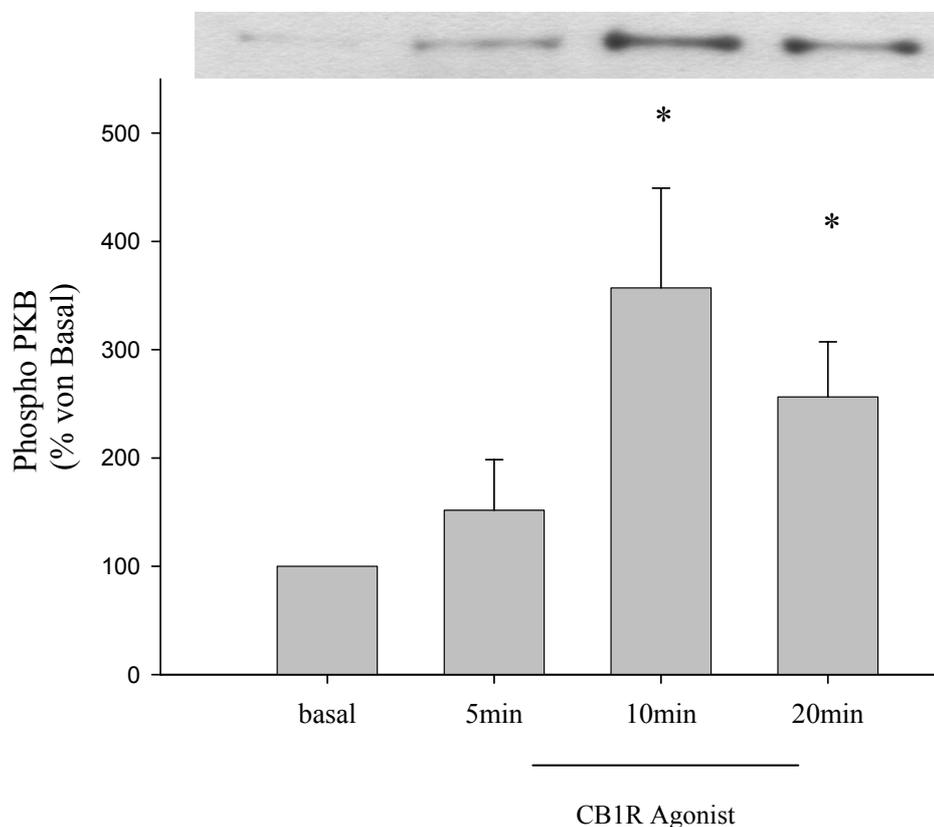


Abb. 10: Erhöhte PKB-Phosphorylierung durch WIN 55212.2. Nach akuter Behandlung differenzierter Fettzellen vermehrt sich die Phosphorylierung von PKB maximal nach 10 min um 250%. Dargestellt wird der Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Messwerten. * wenn p -Wert < 0.05 . im Vergleich zum Kontrollwert. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Westernblot detektierten Bandenmusters.

5.7.2. Regulation der P70S6 Kinase und GSK3 durch WIN 55212.2

Durch die Aktivierung der Proteinkinase B wurden im Verlauf der Signalweiterleitung distal liegende Proteine ebenfalls phosphoryliert. Sowohl ein zeitabhängiger Anstieg der p70S6 Kinase Phosphorylierung als auch eine erhöhte Glykogen Synthase Kinase Phosphorylierung war zu beobachten. Dabei wurde sowohl bei der p70S6 Kinase als auch bei der GSK3 Kinase ein Maximalwert nach 20 Minuten detektiert. Verglichen zur nicht behandelten Kontrolle war ein 2,9-facher (Abb. 11a) bzw. 2,8-facher (Abb. 11b) Anstieg nachzuweisen.

Abb. 11

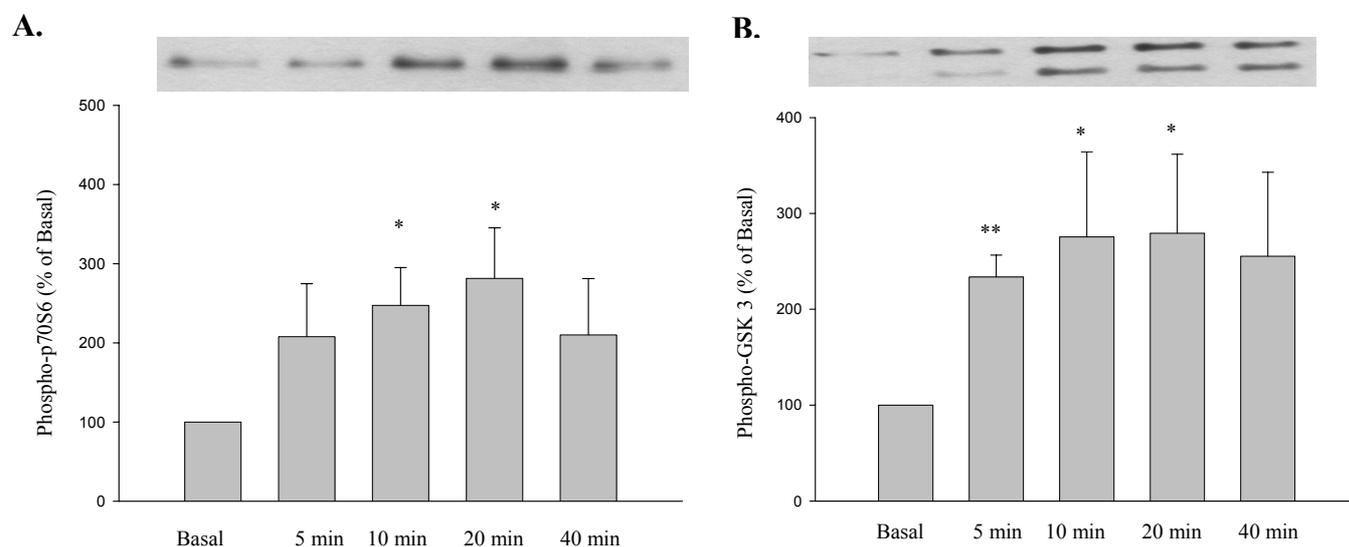


Abb. 11: WIN 55212.2 reguliert zeitabhängig die Phosphorylierung der p70S6 Kinase und Glycogen Synthase Kinase. Dargestellt wird der Mittelwert aus 5 bzw. 4 unabhängigen Messwerten. ** wenn p-Wert < 0.01, * wenn p-Wert < 0.05. im Vergleich zum Kontrollwert. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Westernblot detektiert mit spezifischen Antikörpern für p70S6 phospho-Threonin 389 (a) und phospho-GSK-3 Serin 219. Der Antikörper für die Glykogen Synthase Kinase detektiert sowohl die GSK-3 α als auch die GSK-3 β Isoform und färbt daher eine Doppelbande im Westernblot.

5.7.3. Aktivierung des MAP 44/42 Signalweges durch die Stimulation des CB1 Rezeptors

Neben der Signalweiterleitung über den Insulinrezeptor ist auch eine direkte Aktivierung der MAP 44/42 Kinase durch den CB1 Rezeptor zu beobachten. Nach Stimulation des G-gekoppelten 7-Transmembranrezeptors durch WIN 55212.2 wird zeitabhängig die MAP 44/42 Kinase an den Resten Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphoryliert. Der maximale

Anstieg zeigt sich hier nach 10 Minuten Inkubationszeit mit einer Verstärkung des Signals um 50 % gegenüber der nicht behandelten Probe (Abb. 12).

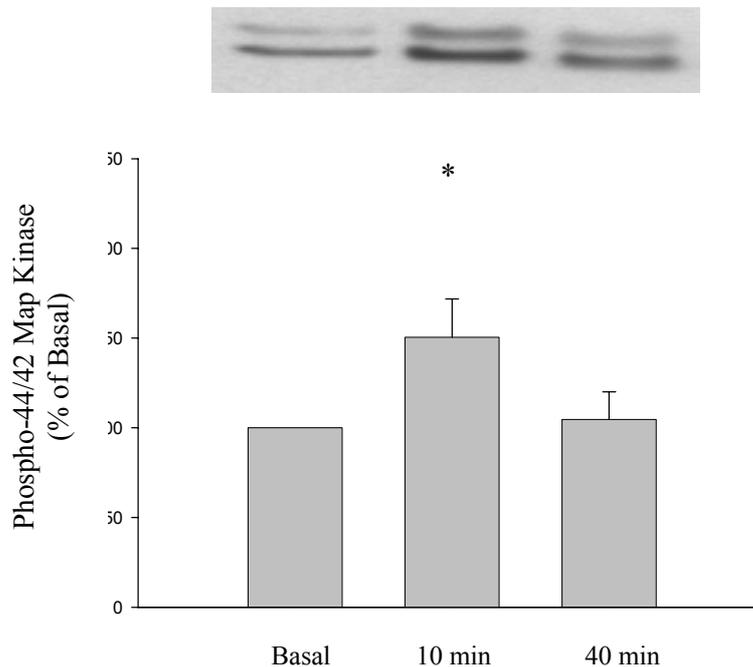


Abb.12: Direkte Aktivierung der MAP 44/42 Kinase durch die Behandlung mit WIN 55212.2. Differenzierte Adipozyten wurden zeitabhängig mit einer Konzentration von 1 μ M mit dem CB1Rezeptor Agonisten behandelt. Dabei wurde die Phosphorylierung der MAP 44/42 Kinase nach 10 Minuten signifikant um 50 % erhöht. Das Balkendiagramm stellt den Mittelwert und Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten dar. * wenn p-Wert < 0.05. im Vergleich zum Kontrollwert. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Western Blot detektierten Bandenmusters.

5.8. Energieabgabe

Neben der Lipidspeicherung zählt auch die Lipidabgabe zu den klassischen Funktionen des Fettgewebes. Dabei kann das braune Fettgewebe eine ganz besondere Form der Energieabgabe leisten. Durch die Expression eines besonderen Proteins, dem *Uncoupling Protein* (UCP) wird die Atmungskette in den Mitochondrien entkoppelt, so dass die entstehende Energie nicht in ATP umgewandelt und gespeichert, sondern als Wärme freigesetzt wird. Um eine mögliche Veränderung der Thermogenese durch die verwendeten Neuropeptide zu sehen, wurden Adipozyten über einen Zeitraum von 8 h mit CART (1 μ M) oder dem CB1 Agonisten WIN 55212.2 (1 μ M) stimuliert. Nach anschließender Zellyse und RNA Isolation wurde durch relative Quantifizierung die mRNA Menge von UCP-1 bestimmt. Eine Behandlung mit CART zeigte nach 8 h eine maximal erhöhte UCP-1 Expression um 30 % an. (Abb. 13)

Abb. 13

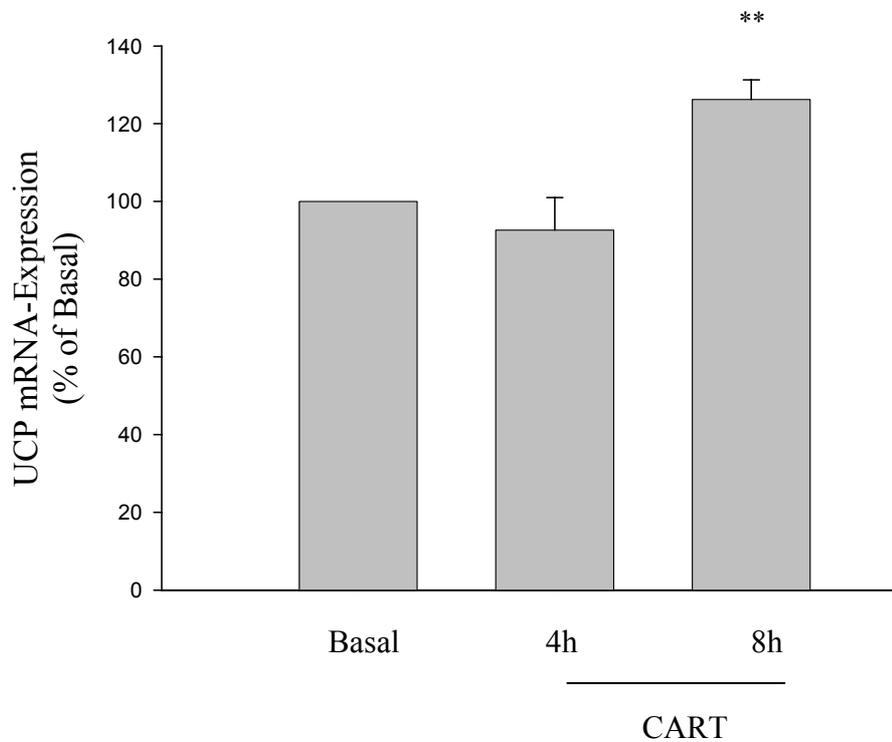


Abb. 13: CART erhöht die mRNA-Expression von UCP1. Nach der Stimulation von differenzierten Adipozyten mit 1 μ M CART erhöhte sich die UCP-1 mRNA Menge nach 8 h signifikant um 30 %. Das Balkendiagramm gibt den Mittelwert und den Standardfehler aus 4 unabhängigen Versuchsreihen wieder. ** wenn p-Wert < 0.01. im Vergleich zum Kontrollwert.

Während das anorexigen wirkende CART die Menge von UCP-1 in Adipozyten positiv beeinflusst, ist durch die Behandlung mit dem orexigen wirkenden CB1 Rezeptor Agonisten WIN 55212.2 ein Rückgang der UCP-1 mRNA Expression zu beobachten. Auch hier wurden die differenzierten Zellen über einen Zeitraum von 8 h mit WIN 55212.2 behandelt. Bereits nach 4 Stunden war ein 40 % der UCP-1 mRNA Menge nachzuweisen (Abb. 14)

Abb. 14

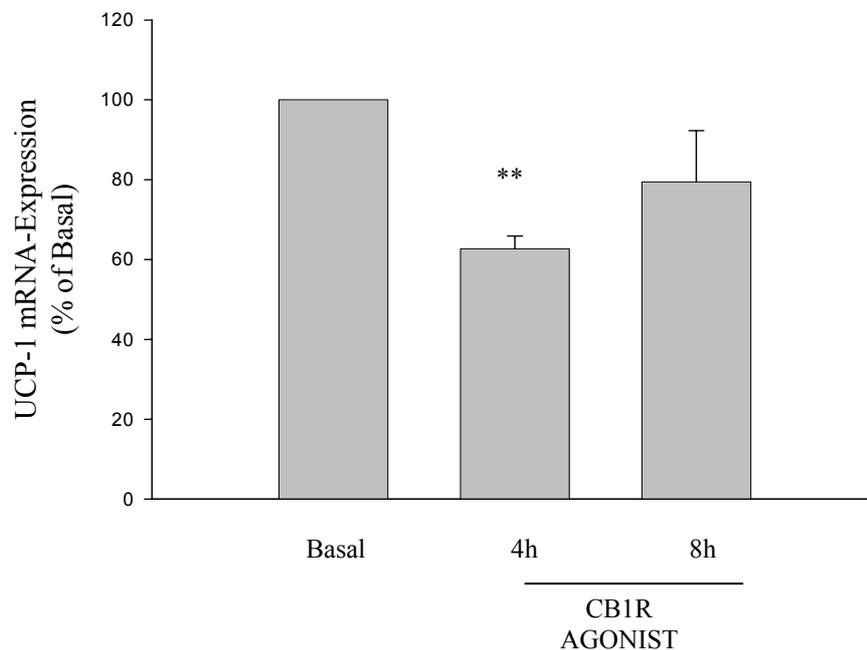


Abb. 14: WIN 55212.2 hat einen direkten Einfluss auf die RNA-Expression von UCP-1 in Adipozyten. Nach 4 Stunden Inkubation mit dem CB1 Rezeptor Agonisten verminderte sich die mRNA Expression von UCP-1 um 40 %. Dargestellt ist der Mittelwert und Standardfehler aus 5 unabhängigen Messungen. ** wenn p-Wert < 0.01. im Vergleich zum Kontrollwert.

Da eine Veränderung der mRNA Expression nicht immer einhergeht mit der Translation der RNA in das entsprechende Protein, wurde auch die UCP-1 Proteinmenge im Westerblot bestimmt. Dabei unterstrichen die so erhobenen Proteindaten die Ergebnisse der mRNA Expressionsanalyse.

Auch hier wurden differenzierte Adipozyten für 4 bzw. 8 Stunden mit CART behandelt. Die UCP-1 Menge stieg dabei zeitabhängig an und erreichte nach 8 h eine um 1,9 fach erhöhte Proteinexpression (Abb. 15).

Abb. 15

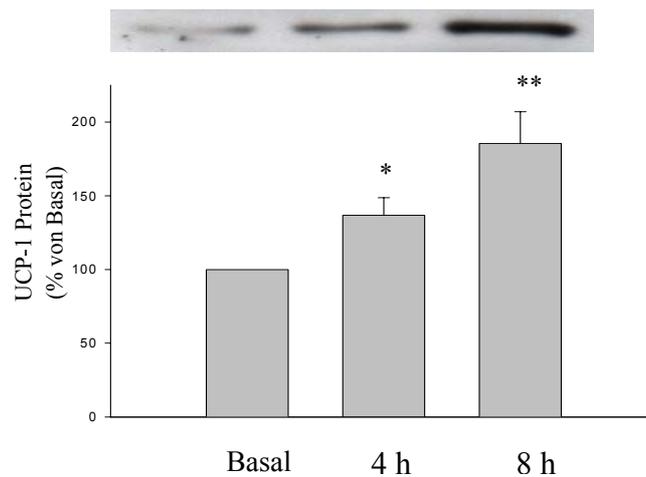


Abb. 15: CART erhöht zeitabhängig die Expression von UCP1. Braune differenzierte Adipozyten wurden über die angegebenen Zeiträume mit 1 μ M CART behandelt. Durch einen Westernblot wurde spezifisch die Menge von UCP-1 detektiert. Dargestellt wird der Mittelwerte und Standardfehler aus 5 unabhängigen Messwerten. * wenn p-Wert < 0.05 ** wenn p-Wert < 0.01 im Vergleich zum Kontrollwert. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Westernblot detektierten Bandenmusters.

Auch die Veränderungen der UCP-1 Proteinmenge unter entweder 100 nM oder 1 μ M WIN 55212.2 Behandlung, unterstützte die RNA Expressionsveränderungen. Dabei war eine signifikante Reduktion des UCP-1 Proteins bereits nach 2 h sichtbar. Die maximale Reduktion um 50% gegenüber den nicht behandelten Kontrollzellen wurde nach 4 h detektiert (Abb.15)

Abb. 16

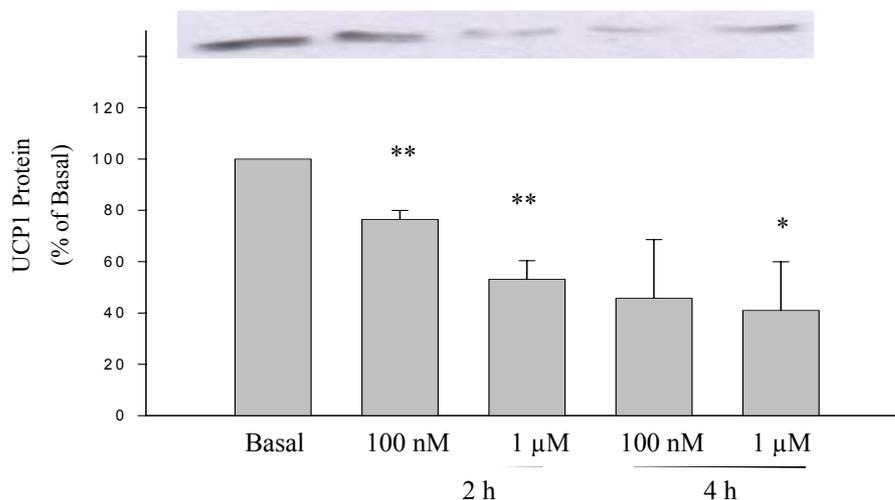


Abb. 16: WIN 55212.2 reduziert die UCP-1 Menge bei einer Konzentration von 100 nM nach 2 h um 20 %. Verstärkt werden konnte dieser Effekt durch die Erhöhung der WIN Konzentration auf 1 μ M. Die Verminderung der UCP-1 Menge betrug hier nach 2 h sogar 50 %. Das Balkendiagramm stellt den Mittelwert und Standardfehler aus 4 unabhängigen Messwerten dar. ** wenn p-Wert < 0.01, * wenn p-Wert < 0.05. im Vergleich zum Kontrollwert. Oberhalb des Graphen befindet sich eine exemplarische Abbildung des im Westernblot detektierten Bandenmusters.

5.9. Endokrine Aktivität

Eine neu entdeckte Funktion der Fettzelle ist die Sekretion von Botenstoffen, den sogenannten Adipokinen. Diese Substanzen werden ausschließlich von Fettzellen gebildet und sezerniert. Adipokine greifen in multiple metabolische Kreisläufe ein. Werden ihre Expressionsmuster durch den Einfluss der verwendeten Neuropeptide verändert, kann das weitreichende Konsequenzen auf den gesamten Organismus haben.

5.9.1. Adiponektinexpression

Ein wichtiger Regulator des Lipid- und Glukosestoffwechsels ist Adiponektin. Adiponektin gilt als endogener Insulinsensitizer. Niedrige Adiponektin Spiegel stehen für ein erhöhtes Risiko an Typ II Diabetes zu erkranken.

Für die Bestimmung der Adiponektin RNA Expression unter CART Stimulation wurden braune Adipozyten mit 10 nM, 100 nM oder 1 μ M CART für 8 h stimuliert. Bei anschließender relativer Quantifizierung konnte bei keiner Konzentration ein Unterschied im Expressionsmuster festgestellt werden (Abb.17). Auch eine Stimulation mit 1 μ M CART über einen Zeitraum von 2 h, 4 h, 8 h und 24 h beeinflusste die Menge der Adiponektin RNA nicht (Daten werden nicht gezeigt).

Abb. 17

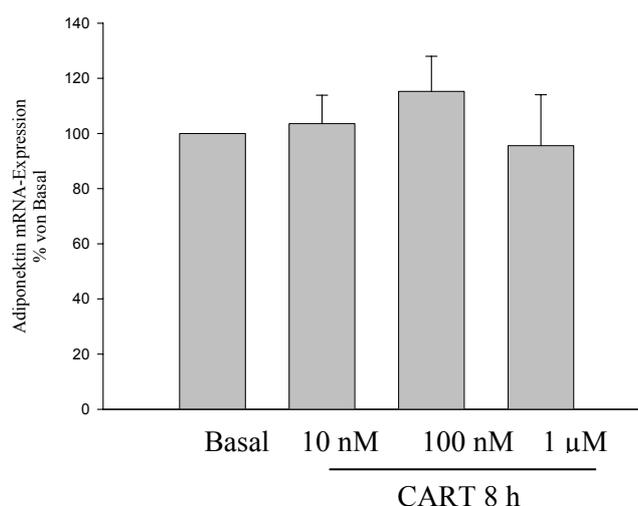


Abb. 17: CART hat keinen Einfluss auf die Expression von Adiponektin. Im Balkendiagramm dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Messwerten.

Zur Bestimmung von Veränderungen des Adiponektin RNA Expressionsmuster bei der Stimulation mit dem CB Agonist WIN 55212.2, wurden Adipozyten für 2 h mit 100 nM WIN behandelt. Dabei zeigte sich ein Rückgang der Adiponektin RNA Expression um 30 % gegenüber den nicht behandelten Kontrollzellen (Abb. 18).

Abb. 18

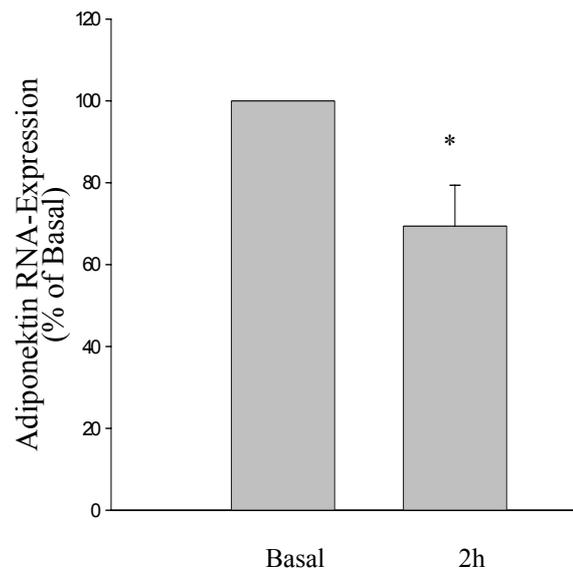


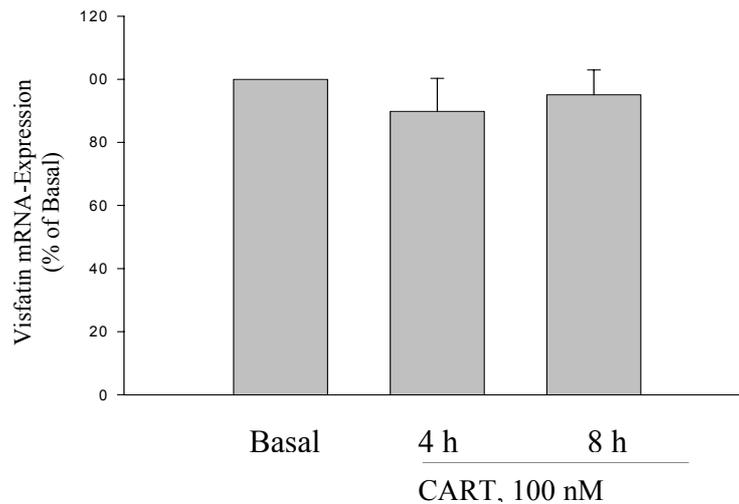
Abb. 18: WIN 55212.2 reduziert die Adiponektin RNA Expression. Adipozyten wurden für 2 h mit WIN 55212.2 in einer Konzentration von 100 nM stimuliert. Dabei war ein Rückgang der Adiponektin RNA Expression um 30 % nachzuweisen. Dargestellt wird der Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Messwerten. * wenn p-Wert < 0.05, im Vergleich zum Kontrollwert.

5.9.2. Visfatin-Expression

Visfatin gehört zu den Adipokinen, die vor allem im viszeralen Fettgewebe exprimiert werden. Dabei wird ihm ein Insulinmimetischer Effekt zugeschrieben. Obwohl es eine andere Bindungsstelle als Insulin hat, nutzt es dessen Rezeptor und Signalwege. *In vitro* steigert Visfatin die Glukoseaufnahme in Fett und Muskelzellen, verhindert dabei auch die Glukosefreisetzung in der Leber.

Eine quantitative Untersuchung der Visfatin RNA Expression in differenzierten Adipozyten die mit 100 nM CART über 4 h bzw. 8 h stimuliert wurden, zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu nicht behandelten Konrollzellen (Abb. 19A.).

Abb. 19A.



B.

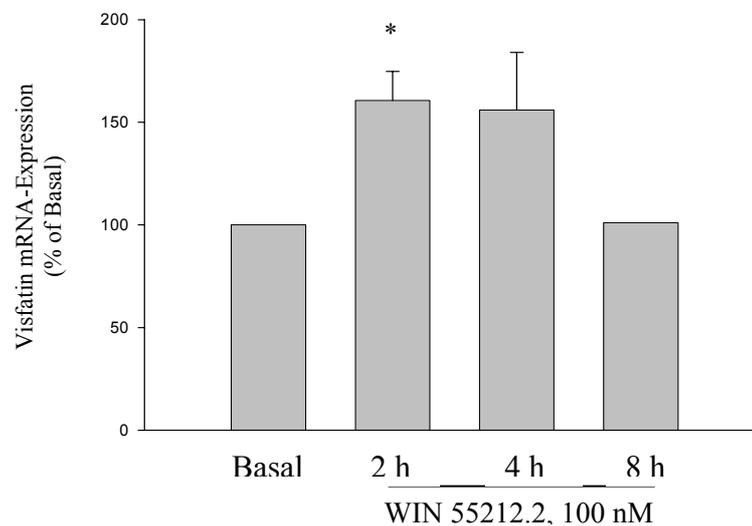


Abb. 19: WIN 55212.2 steigert die Visfatin RNA-Expression. Differenzierte Zellen wurden über einen Zeitraum von 8 h mit CART oder WIN stimuliert. Dabei hatte die CART Behandlung keinen Effekt auf die Visfatin Expression. Dagegen war ein transienter maximaler Anstieg von 60 % nach bereits 2 Stunden durch eine Stimulation mit WIN 55212.2 zu messen. Dargestellt wurde der Mittelwert und Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchsdurchführungen. * wenn p-Wert < 0.05 im Vergleich zum Kontrollwert.

Zur Untersuchung der Visfatin RNA Expression unter Stimulation mit dem CB-Agonisten WIN 55212.2 wurden differenzierte Zellen für 2, 4 oder 8 h mit 100 nM WIN inkubiert. Die anschließende quantitative Analyse der RNA Menge zeigte eine um 60 % gesteigerte Expression von Visfatin-RNA, gegenüber nicht behandelten Kontrollzellen, bereits nach 2 h. Im weiteren Zeitverlauf reduzierte sich dieser Effekt und war nach 8 Stunden nicht mehr detektierbar (Abb. 19B).

5.9.3. Leptin Expression

Leptin ist eines der ersten und auch wichtigsten Adipokine, die entdeckt wurden. Da bekannt ist, dass es eine wichtige Rolle bei der Nahrungsregulation spielt und ferner seine Wirkung nicht nur über das Fettgewebe sondern auch zentral nervös ausübt, wurden die Expressionsmuster von Leptin unter CART und WIN 55212.2 Stimulation gemessen. Dazu wurden differenzierte Adipozyten mit CART Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 1 μ M über einen Zeitraum von 8 h inkubiert. Die anschließende relative Quantifizierung zeigte, dass bei einer Konzentration von 1 μ M die Leptin Expression um 50 % gesteigert wurde. Dieser Effekt war dosisabhängig, und ein Trend zur Expressionssteigerung war schon bei einer Konzentration von 10 nM zu beobachten (Abb. 20).

Doch nicht nur CART zeigt einen Einfluss auf die Leptinexpression. Parallel wurden differenzierte Fettzellen für 2-8 Stunden mit dem CB1 Rezeptor Agonisten WIN 55212.2 behandelt. Die eingesetzte Endkonzentration betrug 1 μ M. Nach relativer Quantifizierung ergaben die Messwerte eine um 40 % reduzierte Leptin mRNA Expression nach 4 Stunden. Diese Reduktion war zeitabhängig und nach 8 Stunden nicht mehr zu messen. (Abb. 21)

Abb. 20.

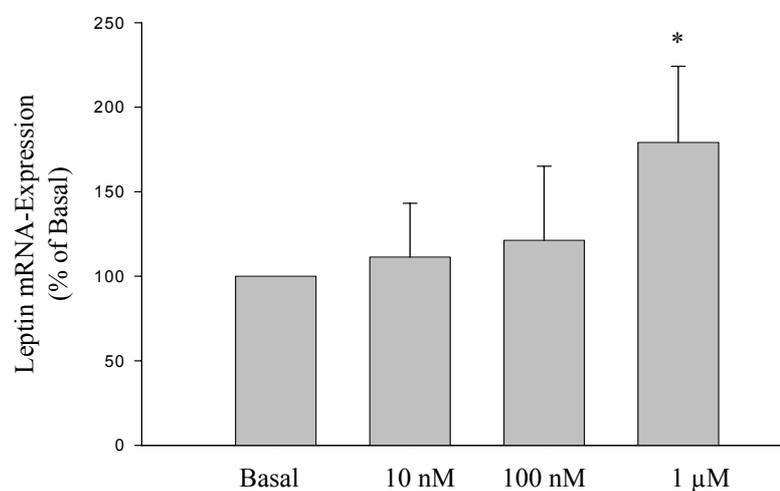


Fig. 20: CART verstärkt die Leptinexpression. Differenzierte Zellen wurden für 8 h mit CART Konzentrationen von 10 nM, 100 nM oder 1 μ M behandelt. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Leptin mRNA Expression, die ihr Maximum bei einer Konzentration von 1 μ M hat. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler aus 5 unabhängigen Messwerten. * wenn p-Wert < 0.05 im Vergleich zum Kontrollwert.

Abb. 21

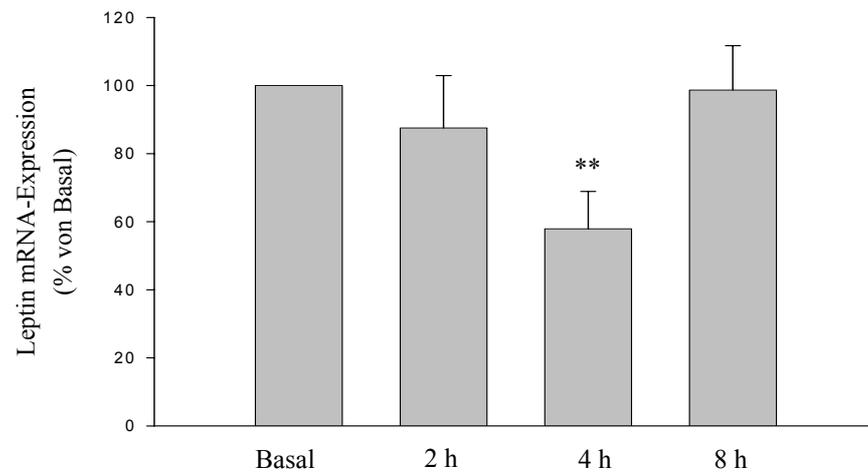


Fig. 21: WIN 55212.2 wirkt sich negativ auf die Leptinexpression aus. Die Stimulation der Zellen mit einer Konzentration von 1 μ M WIN 55212.2 bewirkte eine Reduktion der Leptin Expression um 40 % nach 4 h. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler aus 5 unabhängigen Messwerten. ** wenn p-Wert<0.01, im Vergleich zum Kontrollwert.

6. Diskussion

Adipositas ist eine Stoffwechselstörung, die aus einem Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieabgabe resultiert. Damit verbunden ist ein erhöhtes Risiko, Insulinresistenz oder Diabetes zu entwickeln, welche zusammen mit kardiovaskulären Erkrankungen als Hauptkomponenten des metabolischen Syndroms angesehen werden. Über die genauen Mechanismen der Dysregulation des Energiestoffwechsels ist noch wenig bekannt. Die Erforschung des Fettgewebshormon Leptin hat allerdings verdeutlicht, dass ein komplexes Netzwerk von Regelkreisen zwischen der Peripherie und dem zentralen Nervensystem die Steuerung des Energiegleichgewichtes bewirkt. Der Hypothalamus ist dabei als Synthese und Ausschüttungsort stoffwechselregulierender Neurotransmitter und Neuropeptide ein wichtiges Regulationszentrum. So werden im hypothalamischen *Nucleus Arcuatus* durch Leptin orexigen oder anorexigen wirkende Neuropeptide stimuliert, die ihrerseits auf nachgeordnete hypothalamische Kerngebiete einwirken. Mit diesen Melanokortinen wird der Cannabinoid Rezeptor CB1 koexprimiert. Beobachtungen an Menschen und Mäusen haben bewiesen, dass auch das Cannabinoidsystem als essenzieller endogener Regulator der Energiehomöostase anzusehen ist. Dabei werden neben der zentralen Steuerung auch periphere Effekte postuliert. So verlieren CB1 *knockout* Mäuse trotz Aufnahme gleicher Nahrungsmengen, signifikant an Körpergewicht. Einen Beweis für direkte periphere Effekte des Cannabinoidsystems auf die Energiehomöostase liefern die Ergebnisse dieser Arbeit. Dabei ist das Fundament der Untersuchungen die Rezeptorexpression beider, aus dem Hypothalamus stammender Systeme (Melanokortin- und Endocannabinoides System) in Adipozyten.

Das Cocain- and Amphetamine-Related Transcript (CART) sowie der Agonisten für den Cannabinoiden Rezeptor (WIN 55212.2) wurden dabei als Modellsubstanzen verwendet. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungen als orexigenen bzw. anorexigene Substanzen boten sie die Möglichkeit, im gleichen Zellmodell unter gleichen Bedingungen ganz unterschiedliche Zellreaktionen hervorzurufen und dadurch die Bandbreite der Kommunikation zwischen zentralem Nervensystem und dem Fettgewebe zu verdeutlichen. Zu beobachten waren dabei sowohl Veränderungen in den klassischen Fettzellfunktionen wie Lipidspeicherung und Energieabgabe als auch Einflüsse auf die Adipokinexpression.

6.1. Zellmodell

Bei dem verwendeten Fettzellmodell handelt es sich um eine von Herrn Prof. Dr. med. J. Klein etablierte braune Fettzelllinie, die alle wichtigen Merkmale einer primären Fettzelle wie Insulinsensitivität, Thermogenese und endokrine Aktivität zeigt (Klein *et al.*, 2002). Zusätzlich zu dieser braunen Fettzelllinie wurden auch Untersuchungen in weißen Fettzellen durchgeführt. Hierzu wurde eine neue Fettzelllinie generiert, die nach dem Vorbild der braunen Linie, ebenfalls durch das SV40 T Antigen immortalisiert wurde. Diese immortalisierten weißen Präadipozyten ließen sich, wie auch die braunen Zellen, durch die Zugabe verschiedener Stimuli (siehe Material und Methoden) in Adipozyten differenzieren. Die Bildung von weißem Fettgewebe in der Maus beginnt bereits im Embryo. Nach der Geburt kommt es noch einmal zu einer drastischen Steigerung sowohl der Adipozytenzahl als auch ihrer Größe. Mit zunehmendem Alter der Maus nimmt allerdings die Proliferationsfähigkeit der Zelle ab. Zwar sind auch bei alten Mäusen im Fettgewebe Marker der frühen Differenzierungsphase nachzuweisen, dort aber nur in geringeren Mengen. Sowohl das Proliferierungs- als auch das Differenzierungspotential dieser Zellen ist verringert (Gregoire *et al.*, 1998). Um eine Zelllinie mit möglichst hohem Proliferierungs bzw. Differenzierungspotentials zu gewinnen, wurden die Zellen zur Generierung der neuen Linie sechs Tage alten Mäusen entnommen. Dazu wurde subkutan Fett aus der Leistengegend verwendet. Eine anschließende Charakterisierung der neuen Zelllinie zeigte, dass auch sie sensitiv auf Insulin reagiert, Adipokine exprimiert und sich vollständig differenzieren ließ. Als einen weiteren Beweis für die Validität dieses Modells, sind die Ergebnisse dieser Arbeit zu werten. Die zwei, in ihrer Wirkung völlig konträren Neuropeptide, rufen in den verwendeten Adipozyten unterschiedliche, oftmals sogar gegenläufige Zellantworten aus. So bewirkt CART als anorexigene Substanz eine erhöhte Thermogenese, also Energieabgabe, wohin gegen WIN 55212.2 in den Fettzellen eine Verminderung der Thermogenese hervorruft. Die verwendeten Zellen reagieren somit selektiv auf die gegebene Stimulation. Der Vorteil in der Verwendung eines Zelllinienmodells gegenüber Primärzellen liegt vor allem in der ständigen Verfügbarkeit der Zellen. Sie sind nicht durch andere Zellpopulationen verunreinigt und ermöglichen eine standardisierte Versuchsdurchführung. Aufgrund ihrer genauen Charakterisierung ist es zudem möglich, gezielt in den Differenzierungsprozess einzugreifen und diesen zu beurteilen. Außerdem sind die beobachteten Effekte direkt, also ohne sekundäre Beeinflussungen und Wechselwirkungen zu bewerten.

6.2. Neuropeptide und Fettzellendifferenzierung

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Fettzellen ist ihre Fähigkeit, Lipide einzulagern. Die Speicherung von Energie in Form von Triglyzeriden geht einher mit einer morphologischen sowie proteinchemischen Veränderung der Fettzelle. Die fibroblastenähnliche Struktur des Präadipozyten rundet im Laufe der Adipogenese ab, und Lipidtropfen lagern sich im Zytoplasma der Zelle ein. Zusätzlich beginnt die Zelle, fettspezifische Marker zu exprimieren. Viele der in dieser Arbeit untersuchten Endpunkte in der Adipozytenfunktion wie z.B. die Glukoseaufnahme, aber auch die Expression von Adipokinen ist abhängig vom Maß der Differenzierung. Die Differenzierung von Adipozyten ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren, die zu bestimmten Zeiten der Adipozyten-Reifung aktiviert oder supprimiert werden müssen.

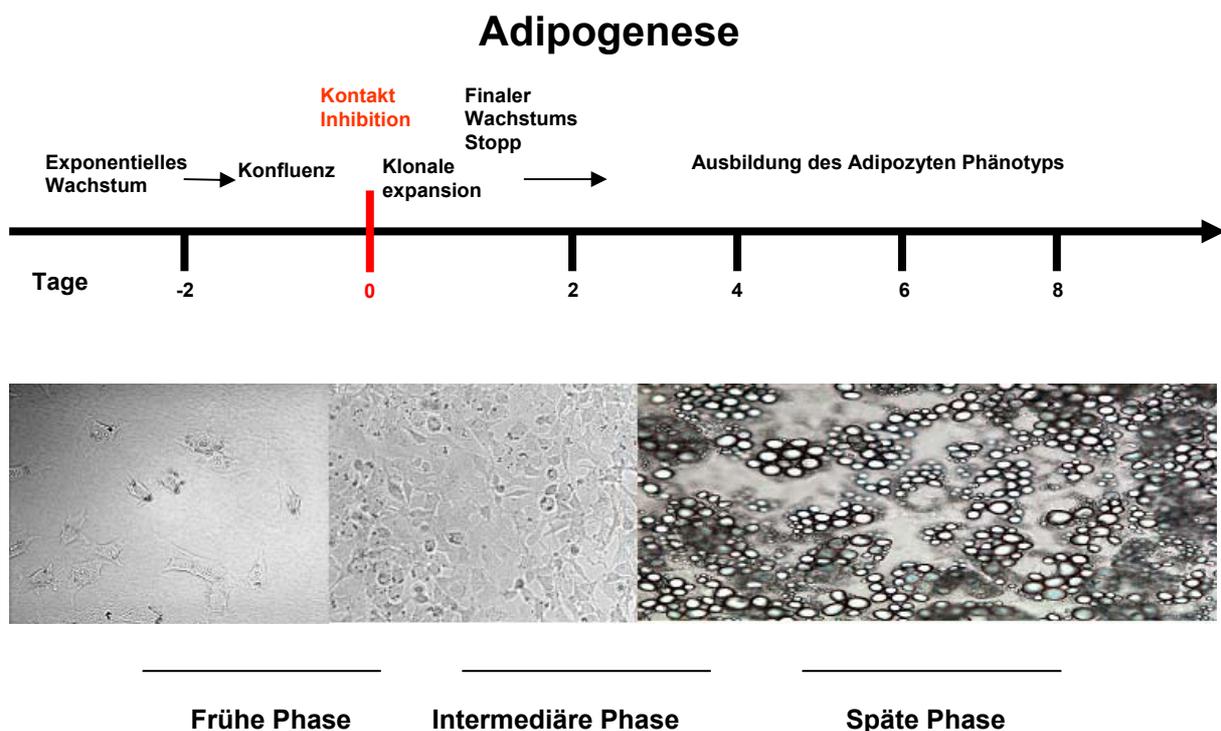


Abbildung 4. Übersicht über den Ablauf der Adipogenese.

Inwieweit die untersuchten Neuropeptide Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung haben, war bislang nicht bekannt. Beobachtungen an Mäusen, die keinen Cannabinoid-Rezeptor exprimieren, haben gezeigt, dass diese Tiere im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren nach der Geburt weniger Fettmasse haben und auch im Laufe ihrer Entwicklung bei normaler

Nahrungsaufnahme stets dünner bleiben. Selbst unter einer *high fat diet* werden diese Tiere nicht übergewichtig (Ravinet Trillou *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen legen nahe anzunehmen, dass die Stimulation der Cannabinoidrezeptoren zu einer Veränderung im Differenzierungsverhalten der Zellen führt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten allerdings zeigen, dass die Behandlung der Zellen in ihrer Differenzierungsphase mit dem CB Agonist WIN 55212.2 keine Veränderung auf die Fettakkumulation hervorruft. Obwohl die Zellen mit hohen CB1R Agonist Konzentrationen chronisch über den gesamten Verlauf der Differenzierung behandelt wurden, ist kein Unterschied im Grad der Proliferierung oder in der Menge des eingelagerten Fettes in die Zellen zu beobachten.

Parallel durchgeführte Untersuchungen mit CART konnten ebenfalls keinen Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung nehmen. Obwohl auch hier bekannt ist, dass weibliche CART-defiziente Mäuse, verglichen mit geeigneten Kontrolltieren, unter einer „*high fat diet*“ mehr Nahrung aufnehmen, größere Fettdepots anlegen und auch signifikant an Körpergewicht zunehmen (Asnicar *et al.*, 2001), ist diese Veränderung „*in vitro*“ nicht nachzuweisen.

Eine mögliche Erklärung für diese konträre Beobachtung ist sicherlich in den unterschiedlichen und nicht immer vergleichbaren Situationen *in vivo* und *in vitro* zu suchen. Natürlich hat das Zusammenspiel vieler Faktoren im Organismus Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zelle, welches in einem isolierten System wie einer kultivierten Zelllinie nicht gegeben ist. Hinzu kommt, dass der Zeitrahmen einer Neuropeptidbehandlung eine wichtige Rolle spielen kann. Die hier untersuchten Zellen waren vollständig konfluent und wurden mit Induktion auch WIN bzw. CART behandelt. Im Stadium der Differenzierungsphase war demnach kein Einfluss der verwendeten Substanzen zu sehen. Anders dagegen in Präadipozyten. Di Marzo *et al.* beschrieben einen Einfluss von Endocannabinoiden auf die Präadipozytenproliferation (Matias und Di Marzo, 2007). Ebenso zeigten Untersuchungen, dass Rimonabant, ein Cannabinoidrezeptor-Antagonist, die Zellproliferation in 3T3 L1 Zellen inhibiert (Gary-Bobo *et al.*, 2006). Ein Einfluss auf die Proliferation der Präadipozyten ist demnach möglich. In der Differenzierungsphase hat, wie hier gezeigt, das Endocannabinoidsystem dann jedoch keinen Einfluss mehr auf die Fetteinlagerung.

Ein wichtiger Stimulus für die Differenzierung ist Insulin (Gregoire *et al.*, 1998). Die hier verwendete Insulinkonzentration ist so gewählt, dass sie optimal die Differenzierung unterstützt und die maximale Fetteinlagerung bewirkt. Geringe Differenzierungsveränderungen durch die verwendeten Neuropeptide könnten daher vielleicht überlagert werden.

Ein direkter Effekt der verwendeten Neuropeptide auf die Fettzellendifferenzierung ist unter den hier gewählten Bedingungen nicht beobachtet worden.

6.3. Insulinsensitivität

Ein klassischer biologischer Endpunkt der Insulinsignalkaskade ist die Glukoseaufnahme. Die Glukoseaufnahme wird im Fettgewebe über das Transportermolekül Glut 4 vermittelt, welches als Antwort auf die Insulinstimulation aus dem Zytosol in die Membran transloziert. Wird dieses Transportermolekül zerstört, kommt es zum Auftreten einer systemischen Insulinresistenz (Abel *et al.*, 2001). Veränderungen in der Glukoseaufnahme haben demnach beträchtliche Auswirkungen auf den gesamten Organismus. Wie die hier vorgestellten Untersuchungen mit dem Neuropeptid CART zeigen, bewirkt eine Stimulation der Zellen über einen Zeitraum von 8 Stunden eine Verstärkung der Insulin induzierten Glukoseaufnahme. Dies scheint auf den ersten Blick verwunderlich, da es sich bei CART um eine anorexigen wirkende Substanz handelt. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine andere Wirkung von CART auf die braune Fettzelle. Durch eine erhöhte Thermogenese-Aktivität während einer CART Stimulation, wird Energie in Form von Wärme abgegeben. Dieser Prozess erfordert seinerseits wiederum eine Zufuhr von neuer Energie. Um diesen „Brennstoff“ bereitzustellen, erhöht die Zelle ihre Glukosesaufnahme. Vom biologischen Standpunkt aus könnte die erhöhte Insulinsensitivität der Zellen, gemessen an ihrer gesteigerten Glukoseaufnahme, nötig sein, um die Energie für eine vermehrte Thermogenese bereit zustellen. Untersuchungen mit dem Cannabinoidrezeptor-Agonisten WIN 55212.2 dagegen zeigten keine Unterschiede in der Aufnahme von Glukose, verglichen mit nicht behandelten Kontrollzellen. Obwohl Endocannabinoide die Nahrungsaufnahme steigern, spiegelt sich diese Beobachtung nicht in der Menge der aufgenommenen Glukose wieder. Interessanterweise ist die Thermogenese bei WIN behandelten Zellen reduziert. Vermehrte Glukoseaufnahme zur Bereitstellung von Energie ist demnach nicht notwendig. Physiologisch kann Übergewicht natürlich nicht nur durch die Aufnahme von zu viel Nahrung entstehen, sondern auch bei gleich bleibender Nahrungszufuhr, aber verminderte Energieabgabe.

6.4. Signalweiterleitung

Die Stimulation mit CART führt, wie oben beschrieben, zu einer vermehrten Aufnahme von Glukose. Voraussetzung dafür ist die Aktivierung von Schlüsselproteinen der Insulinsignalkaskade. Eine akute Insulinstimulation sorgt für eine Translokation des Glukosetransporters 4 aus intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran.

Durch seine intrinsische Rezeptor-Kinase-Aktivität kann der Insulinrezeptor, nach Insulinanlagerung autophosphorylieren. Nachfolgend werden weiter Signalproteine wie z. B. die Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2 gebunden und phosphoryliert. Eine Tyrosinphosphorylierung am IRS-1 gilt dabei als Zeichen für eine weitere Aktivierung der Insulinsignalkaskade.

Die Stimulation mit CART erhöht genau diese Tyrosinphosphorylierung am Insulinrezeptorsubstrat 1. Durch welches Signal die Phosphorylierung von IRS1 vermittelt wird, bleibt dabei allerdings ungeklärt, da es bisher noch nicht gelungen ist, einen spezifischen Rezeptor für CART zu ermitteln. Bekannt ist aber, dass dieses Signal zur Phosphorylierung nicht nur vom Insulinrezeptor ausgehen muss, sondern dass auch andere Stoffe wie z.B. Wachstumsfaktoren aktivierend wirken. CART bedient sich demnach der Insulinsignalwege zur Weiterleitung seines Signals. Distal vom Insulinrezeptor und der Insulinrezeptorsubstrate liegt ein weiteres Schlüsselmolekül der Insulinsignalweiterleitung. Die Proteinkinase B (AKT). Ihre Phosphorylierung gilt als ein klassischer Weg die insulininduzierte Glukoseaufnahme zu initiieren (Hernandez *et al.*, 2001). Auch hier konnte gezeigt werden, dass eine akute Stimulation mit CART die AKT-Phosphorylierung erhöht und damit eine direkte Signalweiterleitung auf dem Insulinsignalweg fördert. Obwohl AKT als wichtiger Bestandteil der Insulinsignalweiterleitung gefestigt ist, ist seine Rolle für die Glukoseaufnahme kontrovers. Experimente mit einer dominant negativen AKT Mutante, zeigten entweder eine Inhibierung der Insulin induzierten GLUT4 Translokation oder aber hatten gar keinen Effekt (Kitamura *et al.*, 1998).

Da also die Rolle von AKT in der Insulin-induzierten Glukoseaufnahme noch nicht abschließend geklärt ist, wurde zusätzlich untersucht, ob ein gleichzeitiger Stimulus mit CART und Insulin die Phosphorylierung von AKT noch verstärken kann. Dazu wurden die Zellen nicht nur akut sondern auch chronisch mit beiden Substanzen gleichzeitig behandelt. Um einen direkten Vergleich zu den erhobenen Glukoseaufnahmedaten führen zu können, wurden die Zellen chronisch für 1 oder 2 Stunden mit CART und Insulin stimuliert. Dabei konnte allerdings kein synergistischer Effekt von CART und Insulin auf die AKT

Phosphorylierung gefunden werden. Ein möglicher Grund für diese Beobachtung könnte sicherlich bei der verwendeten Insulinkonzentration zu suchen sein. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 100 nM Insulin stimuliert. Da die Zellen bei dieser Konzentration eine maximale Antwort geben, könnten geringfügige Unterschiede bei der Stimulation mit beiden Substanzen überlagert werden. Weiterhin ist es möglich, dass die beobachteten Veränderungen der Glukoseaufnahme durch einen alternativen, von AKT unabhängigen Weg vermittelt werden. Wie bekannt ist, konvergiert der Signalweg zur Glukoseaufnahme oberhalb von Akt. Dabei sind alternative Wege über Signalmoleküle wie PDK1, PKC lambda und c-cbl beschrieben worden, die ihrerseits Einfluss auf die GLUT 4 Transporter nehmen.

Dass die Aktivierung von AKT nicht notwendig mit der Vermittlung der Glukoseaufnahme verknüpft ist, zeigen die Stimulationen von Adipozyten mit dem Cannabinoidrezeptor Agonisten WIN 55212.2. Obwohl die Glukoseaufnahme nicht verändert ist, findet sich eine erhöhte AKT Phosphorylierung. Akt ist ein wichtiges Signalprotein innerhalb des Insulinsignalweges mit Einfluss auf multiple Endpunkte wie z.B. die Proteinsynthese. Bei dem Cannabinoidrezeptor 1 handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der bevorzugt an Gi Proteine bindet (Lauckner *et al.*, 2005). Dabei kommt es, wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, nicht nur zu einer direkten Aktivierung des p44/42 MAP Kinase Signalweges (Bouaboula *et al.*, 1995), sondern auch zu einer Transaktivierung von Tyrosinkinase Rezeptoren, vermittelt über die Phospholipase C (Lauckner *et al.*, 2005). Dabei wird sowohl AKT (Galve-Roperh *et al.*, 2002; Gavi *et al.*, 2006) aktiviert als auch distal gelegene Signalproteine wie p70S6 und GSK 3. Als Endpunkt dieses Signalweges steht die Veränderung der Translation und Transkription der Zelle. Eine Aktivierung von AKT muss also nicht immer einhergehen mit einer Veränderung der Glukoseaufnahme.

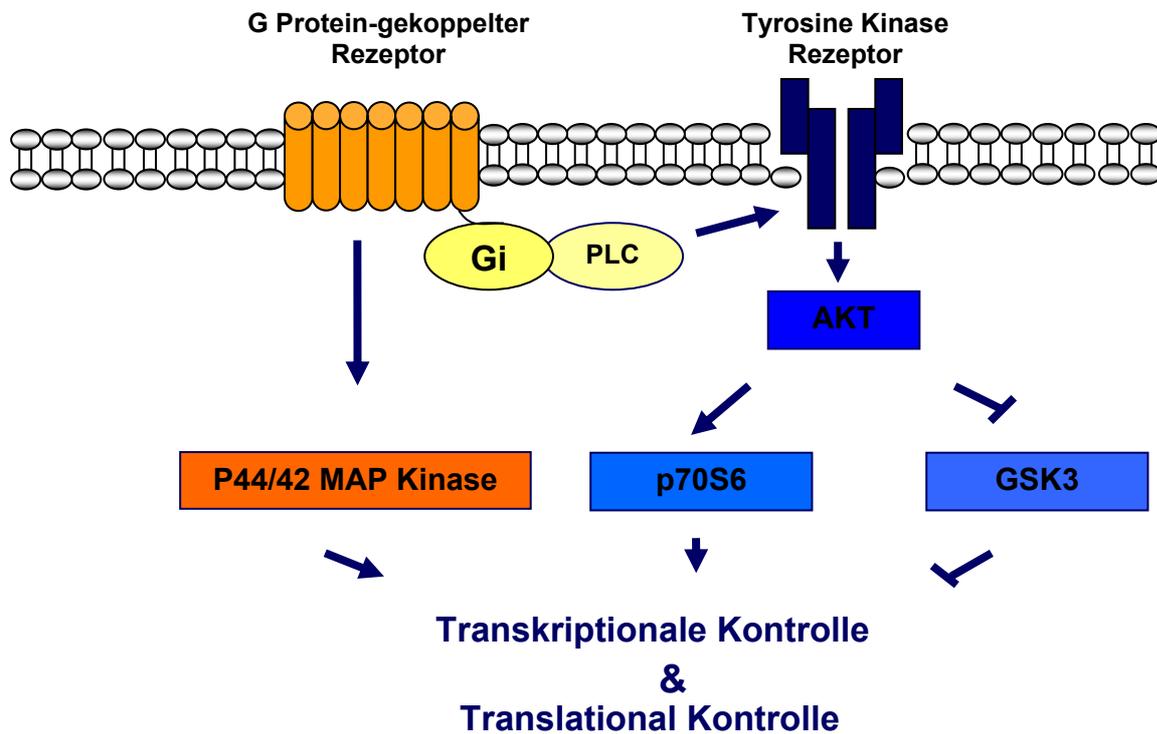


Abbildung 5: . Transaktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

6.5. Energieabgabe/ Energiehaushalt

Neben der Aufnahme und Speicherung von Energie ist eine weitere Funktion der Fettzelle die Abgabe von Energie. Eine besondere Form der Energieabgabe, die exklusiv von braunen Adipozyten vermittelt wird, ist die Thermogenese. Hier wird die Energie nicht in Form von ATP dem Organismus zur Verfügung gestellt, sondern in Form von Wärme abgegeben. Das Schlüsselprotein für die Vermittlung dieses Prozesses ist das *uncoupling protein-1* (UCP-1). UCP-1 oder auch Thermogenin liegt in der inneren Mitochondrienmembran und bildet einen Nebenweg für den Protonenfluss vom Zytosol zur Matrix (Nicholls und Locke, 1984). Dadurch wird die protonenmotorische Kraft an der inneren Mitochondrienmembran zerstört. Der Elektronentransport von NADH zum O₂ verläuft zwar normal, die mitochondriale ATPase erzeugt jedoch kein ATP. Die Thermogenese ist demnach ein potentieller Regulator für die Energiehomöostase.

Wie erwartet, sind die Wirkungen der beiden verwendeten Neuropeptide auf die braunen Adipozyten vollkommen unterschiedlich. Während CART die Expression von UCP-1 sowohl auf RNA Ebene als auch auf Proteinebene verstärkt, findet sich bei dem Cannabinoidrezeptor Agonist WIN 55212.2 eine drastische Reduktion der UCP-1 Protein und RNA Menge. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Funktionen der Neuropeptide. CART wirkt im zentralen Nervensystem orexigen, d.h. appetithemmend und fördert somit eine negative Energiebilanz im Organismus. Die erhobenen Daten zeigen, dass CART direkt und peripher die Energieabgabe durch die Erhöhung der Thermogenese steigert. Dabei könnte es sich um eine Ergänzung zur zentralnervösen Wirkung handeln. Über das sympathische Nervensystem vermittelt diese ebenfalls eine Steigerung der Thermogeneseaktivität (Kong *et al.*, 2003) und sorgt somit ihrerseits für eine negative Energiebilanz. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass nach einer Injektion von CART in die *arcuate-* (Kong *et al.* 2002) und *paraventriculären Nuclei* (Wang *et al.*, 2000) die UCP-1 Expression gesteigert ist. Die hier gezeigten Untersuchungen komplementieren diese Ergebnisse durch einen zusätzlichen direkten Effekt von CART auf das braune Fettgewebe. Im Gegensatz dazu sind die Proteinmengen und RNA Expressionsmuster von UCP-1 durch die Behandlung mit dem CB1-Agonisten WIN 55121.2 stark vermindert. Auch diese Beobachtungen lassen sich in einen physiologischen Kontext einordnen. Bereits 1975 wurde von Abel berichtet, dass die Einnahme von Cannabis Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat (Abel, 1975). Bis heute sind zahlreiche Studien erhoben worden, die sowohl an Mäusen, aber auch an Menschen zeigen, dass Cannabinoide vor allem die Lust auf wohlschmeckende Nahrungsmittel erhöht (Di Marzo *et al.*, 2005). Auch Ratten, deren CB-1 Rezeptoren stimuliert wurden, aßen weit über ihren Sättigungspunkt hinaus. Interessanterweise sind auch besonders hohe Endocannabinoidkonzentrationen in der Muttermilch zu finden. Sie gelten als wichtiger Stimulus für das Saugen des Neugeborenen. Eine selektive Blockade der CB1 Rezeptoren in Mäusen am ersten Tag nach der Geburt verhindert die Nahrungsaufnahme und führt zum Tod dieser Tiere (Fride *et al.*, 2001; Fride *et al.*, 2003). Endocannabinoide sorgen dafür, dass die Energieaufnahme und Speicherung favorisiert wird, also eine positive Energiebilanz aufgebaut wird. Zur Unterstützung wird gleichzeitig die Energieabgabe, durch Inhibierung der Thermogeneseaktivität, vermindert. Vermittelt wird die Thermogenese durch die hohe Anzahl an Mitochondrien in braunem Fett. Neuste Untersuchungen zeigen, dass die Behandlung mit dem selektiven CB1-Rezeptorantagonisten Rimonabant die Expression von NADH-Ubiquinon-Oxireductase, Ubiquinol-Cytochrome c Reductase und F1F0-ATP Synthase erhöht. Alle drei sind wichtige

Mitglieder des oxidativen Phosphorylierungssignalweges. Zusätzlich induziert Rimonabant die Expression von HSP10, welches die mitochondriale Biogenese reguliert (Jbilo *et al.*, 2005). Demnach führt die Blockade von CB1 Rezeptoren zu einer vermehrten Bildung von Mitochondrien und steigert ebenso ihre Aktivität. Im Gegenzug ist daher anzunehmen, dass die Stimulation des Cannabinoidsystems sich negativ auf die Aktivität und Mitochondrienzahl auswirkt. Ein direkter Hinweis für die Wirkung von Endocannabinoiden auf die Thermogenese liefert wiederum der Rezeptorantagonist Rimonabant. *ob/ob* Mäuse, die 7 Tage mit dem Antagonisten behandelt wurden, zeigten ihre erhöhte Thermogeneseaktivität durch einen um 37 % erhöhten basalen Sauerstoffverbrauch. (Liu *et al.*, 2005). Somit sorgen Endocannabinoide und die Stimulation ihrer Rezeptoren durch die Verminderung der Energieabgabe für eine positive Energiebilanz. Die Reduktion der Thermogenese ist ein weiterer Baustein dieser Erkenntnis.

6.6. Adipozyten-Sekretion

Lange galt das Fettgewebe als reines Speicherorgan im Zusammenschluss der Komponenten des Energiehaushaltes. Erst mit der Entdeckung von Leptin im Jahre 1994 wurde seine Rolle als aktives endokrines Organ ausgebaut. Fettgewebe sezerniert so genannte Adipokine, die ihrerseits Einfluss auf den Energiestoffwechsel und die Vermittlung der Insulinsensitivität nehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von CART und WIN 55212.2 auf die Expression von Adiponektin, Visfatin und Leptin untersucht. Sie spielen vor allem eine dominante Rolle in der Regulation der Energiehomöostase.

6.6.1. Adiponektin

Adiponektin ist ein essenzieller Regulator des Lipid- und Glucosestoffwechsels. Es wurde 1995 kloniert und gilt als endogener Insulinsensitizer. In Adiponektin defizienten Mäusen wurde eine Diät induzierte Insulinresistenz beobachtet (Maeda *et al.*, 2002), wohingegen die Gabe von Adiponektin in Tiermodellen für Typ-II-Diabetes und Insulinresistenz die Insulinsensitivität erhöht (Yamauchi *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu anderen Adipokinen finden sich bei übergewichtigen Menschen und Tieren vermindert Adiponektinspiegel, die allerdings durch eine Gewichtsreduktion wieder erhöht werden können (Hu *et al.*, 1996; Statnick *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Niedrige

Adiponektinspiegel gelten als Risikofaktor für die Entwicklung eines Typ-II-Diabetes (Spranger *et al.*, 2003).

Die direkte Behandlung von Fettzellen mit dem Neuropeptid CART, hat geringfügige, allerdings nicht signifikant erhöhte Adiponektin-Expressionsmuster zur Folge. Adiponektinmengen lassen sich eher mit Hyperinsulinämie und Insulinresistenz korrelieren als mit der Regulation der Nahrungsaufnahme. Daher steht die unveränderte Adiponektinmenge während einer CART-Stimulation nicht im Kontrast zu der beschriebenen anorexigenen Wirkung des Neuropeptides.

Im Gegensatz dazu verändert eine Stimulation des Cannabinoidsystems mit WIN 55121.2 die Expression dieses Adipokins in Adipozyten deutlich. Nach 4h Stunden ist die Menge der Adiponektinexpression um 30% vermindert. Diese Entdeckung geht konform mit Untersuchungen von Cota *et al.* Hier wurde bereits beschrieben, dass die Aktivierung des EC-Systems zu einer Aktivierung der Lipoproteinlipase in Fettzellen führt. Interessanterweise spielt Adiponektin eine entscheidende Rolle bei der Verringerung der Expression einiger Enzyme, die an der Lipogenese beteiligt sind. Geringere Adiponektinmengen unterstützen demnach die Wirkung des Endocannabinoidsystems (Cota *et al.*, 2003b). Hinzukommt, dass Bensaid in seiner Arbeit eine erhöhte Adiponektinexpression in Rattenadipozyten und murinen 3T3-L1 Zellen nach Blockade des CB-1 Rezeptors durch Rimonabant nachweisen konnte (Bensaid *et al.*, 2003). Dabei ist besonders anzumerken, dass Adiponektinrezeptoren auch im paraventriculären Nucleus zu finden sind (Qi *et al.*, 2004). Die zentrale und periphere Regulation des Energiehaushalts durch Endocannabinoide sind scheinbar eng verbunden und stehen im gegenseitigen Austausch (Di Marzo und Matias, 2005).

6.6.2. Visfatin

Visfatin ist ein relativ neu entdecktes Adipokin, welches bevorzugt im viszeralen Fett exprimiert wird (Fukuhara *et al.*, 2005). Seine Plasmakonzentrationen korrelieren mit der viszeralen Fettmasse des Menschen (Kralisch *et al.*, 2005). Bei Adipositas sind die Visfatinmengen demnach deutlich erhöht. Funktionell ähnelt es dem Insulin und nutzt auch dessen Rezeptor zu Signalaktivierung. Hier bedient es sich allerdings einer anderen Bindungsstelle als Insulin.

Im Gegensatz zur Stimulaiton der Adipozyten mit CART, welcher keinen Effekt auf die Visafatin Expression zeigt, führt eine Behandlung der Fettzellen mit dem

Cannabinoidrezeptoragonisten WIN 55212.2 zu einer gesteigert Visfatin Expression um 60 %. Damit konnte zum ersten Mal ein direkter Effekt des Cannabinoidsystems auf die Visfatinexpression gezeigt werden. Im Einklang mit der orexigenen Wirkung der Cannabinoide ist die erhöhte Visfatinexpression ein weiterer Baustein dafür, im Organismus eine positive Energiebilanz aufzubauen, die zu Insulinresistenz und Übergewicht führt.

6.6.3. Leptin

Leptin ist das erste Adipokin, das entdeckt wurde, und gilt bis heute als eines der wichtigsten, da seine Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme sehr weitreichend ist. Obwohl Leptin ausschließlich vom Fettgewebe gebildet wird, wirkt es sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Peripherie. Leptin-Defizite gehen einher mit vermehrtem Appetit, einem reduzierten metabolischen Umsatz und daraus resultierend mit einem adipösen Phänotyp (Prins, 2002). Zentral sorgt Leptin dafür, dass es aktivierend auf die Neuronen wirkt, die von POMC abgeleitete Peptide und CART freisetzen. Gleichzeitig inhibiert es Neuronen, die für die Ausschüttung von orexigen wirkenden Proteinen wie NPY oder AgRP verantwortlich sind (Larsen und Hunter, 2006). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist Leptin aber nicht nur ein Regulator im zentralen Nervensystem, sondern wird auch selber durch Neuropeptide beeinflusst.

Im Gehirn stimuliert das Fettgewebshormon Leptin die Expression von CART, was im Organismus zu einer negativen Energiebilanz führt. Um diesen Status aufrecht zu erhalten, bleibt die Expression von Leptin erhöht.

Anders als bei CART stehen die Endocannabinoide im Hypothalamus unter einer negativen Kontrolle von Leptin. So zeichnen sich *fa/fa*-Zucker Ratten und *ob/ob*-Mäuse durch verminderte Leptinspiegel und eine geringere Anzahl an Leptinrezeptoren aus. Zusätzlich sind besonders hohe hypothalamische Endocannabinoidlevel zu messen (Pagotto *et al.*, 2005). Ergänzend dazu führt die Behandlung mit Leptin zu einer Reduktion der Endocannabinoide (Jbilo *et al.*, 2005).

Eine direkte Stimulation der Fettzelle mit dem Cannabinoidrezeptoragonisten WIN senkt die Leptinexpression um etwa 40 %. Auch hier kann, wie schon im Regulationsmechanismus von CART, ein ähnlicher Regelkreis aufgezeichnet werden. Durch das fehlende Leptinsignal im Gehirn werden dort die bis dahin unterdrückten orexigenen Substanzen freigesetzt. Diese sorgen dann im Organismus für eine diesmal positive Energiebilanz. Unterstützend dazu wird

im Fettgewebe die Expression von Leptin weiter unterdrückt. Demnach nutzen sowohl die anorexigenen als auch die orexigen wirkenden Substanzen *in vivo* die gleichen Strategien und Mechanismen ihren Status bei der Regulation der Nahrungsaufnahme aufrecht zu erhalten. Kontrovers wurden allerdings Effekte von Rimonabant auf die Fettzelle *in vitro* beschrieben. Hier wird die Leptinexpression in HDF-Mäusen durch die Gabe des Cannabinoidrezeptorantagonisten Rimonabant um ca. 53% reduziert (Pagotto *et al.*, 2005). Damit würde sowohl der hier verwendete Agonist als auch der Antagonist für den Cannabinoidrezeptor gleiche Effekte hervorrufen. Um eine schlüssige Einigung für beide Erkenntnisse zu bekommen, müssen die verschiedenen Versuchssysteme beleuchtet werden. Die Experimente dieser Arbeit mit dem CB-1 Rezeptor Agonisten wurden in einem *in vitro* Zellsystem durchgeführt, in welchem es keine Wechselwirkungen mit „Fremdstoffen“ gab. Anders dagegen die Rimonabantstudie, hier wurde ein Tiermodell gewählt, welches durch die Gabe einer *High Fat Diet* übergewichtig war. In so einem *in vivo*-Modell sind Beeinflussungen von anderen Faktoren nicht ausgeschlossen.

Die direkte Stimulation des Fettgewebes mit Neuropeptiden führt also zu einer veränderten Adipokinexpression. Wie von einer anorexigenen Substanz erwartet, verschiebt CART das Adipokinprofil zugunsten einer negativen Energiebilanz, wohingegen der orexigen wirkende CB-1 Rezeptor Agonist WIN 55212.2 eher eine positive Energiebilanz favorisiert.

7. Gewonnene Erkenntnisse

Das Fettgewebe spielt neben dem zentralen Nervensystem eine dominante Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase. Dass zwischen diesen beiden Zentren eine rege Kommunikation herrschen muss, war die Grundthese dieser Arbeit. Das Ziel hier war, eine neue Ebene der Regulation durch direkte Interaktionen aufzudecken. Folgende Fragen dazu konnten beantwortet werden:

1. **Gibt es eine direkte funktionelle Interaktion orexigener und anorexigener Neuropeptide mit der Fettzelle?**

Ja, es gibt direkte Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Neuropeptiden und dem Fettgewebe. Durch die Verwendung eines neu entwickelten Fettzellmodells können indirekte Interaktionen durch andere Systeme als Grund für die Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen werden.

2. **Was sind die funktionellen Konsequenzen auf die Schlüsselebenen, der Fettzellbiologie, die relevant sind für die Steuerung der Energiehomöostase?**

Alle Schlüsselebenen der Fettzellbiologie sind durch die Behandlung mit orexigenen und anorexigenen Neuropeptiden beeinflusst. Dabei modulieren die Substanzen die Energieaufnahme, die Energieabgabe und die endokrine Funktion des Adipozyten. Nach Stimulation mit CART, einem anorexigenen Neuropeptid, stellte die Fettzelle ihren Metabolismus auf Energieabgabe ein, das Gegenteil war nach Behandlung mit dem orexigen wirkenden CB1 Rezeptor Agonist WIN 55212.2 zu beobachten. Stoffwechselprozesse zur Energieaufnahme wurden unterstützt.

3. **Welche Mechanismen liegen den Veränderungen zu Grunde?**

Zur Umsetzung der durch die Neuropeptide verursachten Veränderungen sind multiple Signalwege und Endpunkte der Fettzellbiologie beteiligt. CART verstärkt die Glukoseaufnahme, um später diese „gesammelte Energie“ in Form von Wärme über eine gesteigerte Thermogeneseaktivität zu verlieren. Dabei werden die klassischen Insulinsignalkaskadenproteine wie z.B. AKT aktiviert. Gleichzeitig konnten veränderte Adipokinexpressionsmuster gezeigt werden. So wird Leptin vermehrt unter CART-Stimulation gebildet und beeinflusst seinerseits im zentralen Nervensystem, die Ausschüttung solcher Substanzen, die im Organismus eine verminderte Energiehomöostase vermitteln.

Ähnliche Mechanismen, aber andere Auswirkungen in der Fettzelle lassen sich durch die Behandlung mit dem CB-1 Rezeptor-Agonist WIN 55212.2 beschreiben. Hier wird die positive Energiebilanz durch eine Verminderung der Thermogeneseleistung sowie einer veränderten Adipokinexpression vermittelt. Neben einer verminderten Adiponektin- und Leptin Expression ist eine signifikant erhöhte Visfatin-Menge nachgewiesen worden. Damit gelingt es auch hier durch das fehlende Leptinsignal aus der Peripherie im Gehirn, die vermehrte Synthese von orexigen wirkenden Substanzen zu verstärken.

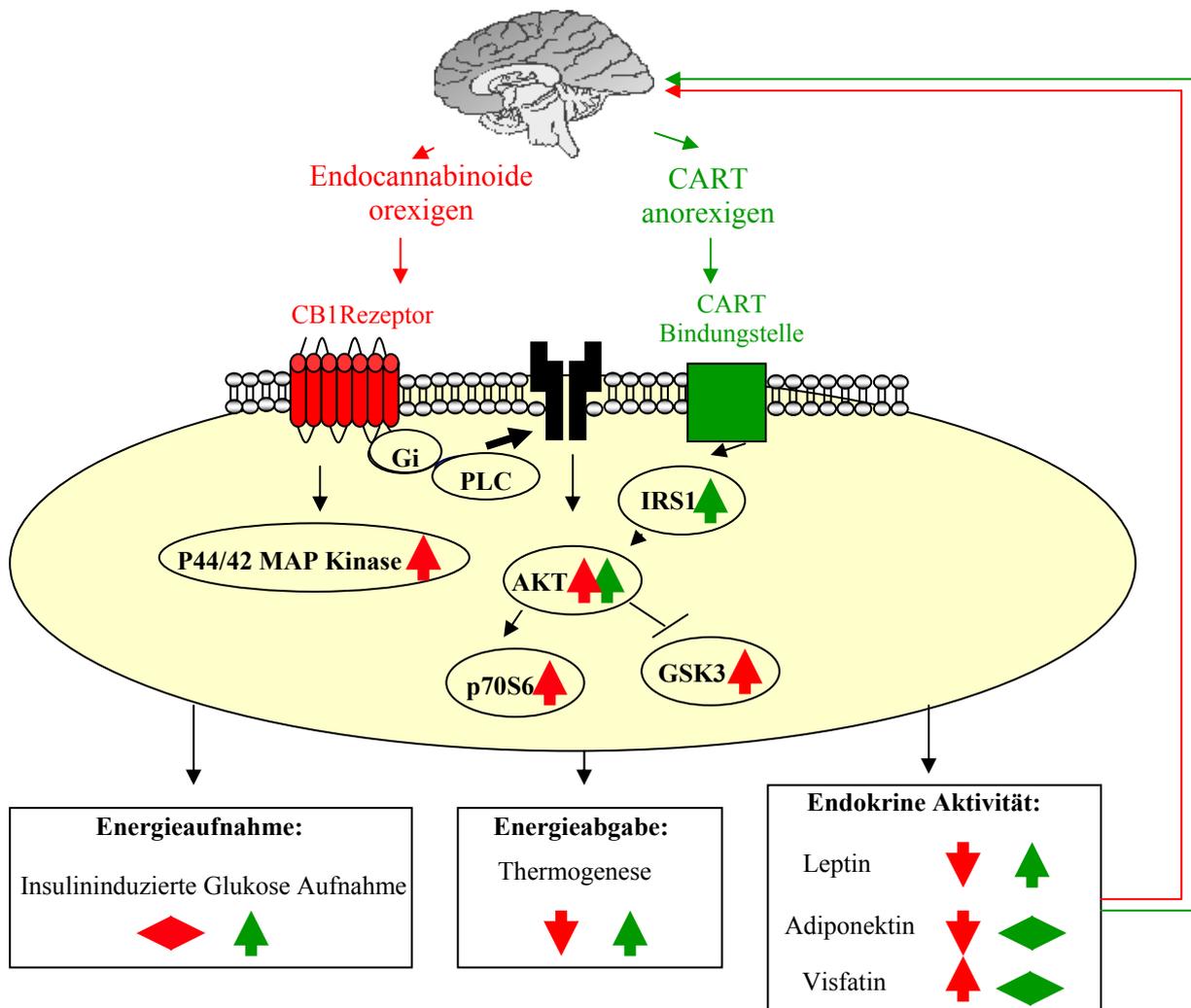


Abb.6. Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen zentralem Nervensystem und dem Fettgewebe. ● Effekt des Cannabinoidsystems im Adipozyten ● Beeinflussung durch CART. Negative Regulation ↓; positive Regulation ↑, keine Regulation ↔

8. Zusammenfassung

Adipositas, Insulinresistenz und die damit verbundenen Folgeerkrankungen sind die größten Gesundheitsrisiken dieses Jahrhunderts in der industrialisierten Welt. Sie entstehen durch ein Ungleichgewicht von Energieaufnahme und Energieabgabe. Der Körper verfügt über ein sensibles System, um Energiereserven aufzubauen, sie zu erfassen und zu verwalten. Dies verläuft über zwei regulatorische Zentren. Das zentrale Nervensystem verarbeitet die afferenten Signale, die Auskunft über vorhandene Energiereserven geben und efferente Signale, die die Energieabgabe im Organismus übermitteln. Gesteuert wird dieser Informationskreis durch die Ausschüttung orexigen und anorexigen wirkender Neuropeptide. Neben dem zentralen Nervensystem spielt das Fettgewebe eine bedeutende Rolle im Energiestoffwechsel. Neben seiner Depotfunktion zur Speicherung von Energie ist es auch ein dynamisches endokrines Organ. Die von ihm produzierten und sezernierten Adipokine wirken vielseitig an verschiedenen Organen, aber auch im ZNS. Die vorliegende Arbeit konnte erstmals beweisen, dass es neben der Kommunikation über Adipokine auch direkte Interaktionen orexigener und anorexigender Neuropeptide mit dem Fettgewebe gibt. Als Modellsubstanzen wurden das anorexigen wirkende Neuropeptid CART und ein Agonist für den Cannabinoidrezeptor 1, welcher Appetit anregend wirkt, verwendet. Um indirekte Wechselwirkungen mit anderen Systemen auszuschließen, wurde eine selbst generierte Adipozytenzelllinie verwendet. Die Stimulation dieser Linie mit CART zeigte direkte Effekte auf allen Schlüsselebenen der Fettzellbiologie. So wurde mehr Glukose in die Zelle aufgenommen, diese wurde durch eine signifikant erhöhte Thermogenese, also Energieabgabe in Form von Wärme wieder verbrannt. Leptin wurde unter Behandlung mit dem appetithemmenden CART vermehrt gebildet und schließt so den Regelkreis mit dem zentralen Nervensystem. Erhöhte Leptinspiegel im Serum signalisieren dem Gehirn volle Energiespeicher, die Expression von anorexigenen Substanzen wird verstärkt. Auch der CB1 Rezeptoragonist WIN 55212.2 wirkt direkt auf das Fettgewebe. Hier verstärkt er Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Energiereservoirs. So wird die Expression von UCP1, also dem Vermittler der Thermogenese und Vermittler der Energieabgabe, signifikant vermindert. Zusätzlich wird die Expression von Visfatin erhöht. Dieses geht einher mit der Verminderung der Adiponektin- und Leptinmenge. Das Fehlen des Leptinsignals wiederum weist im Gehirn auf fehlende Energievorräte im Organismus hin. Neuropeptide wie NPY, die Appetit fördernd wirken, werden gebildet. Zwischen beiden Systemen herrscht demnach eine

rege Kommunikation, die direkt vermittelt wird. Das Fettgewebe rückt immer mehr in den Fokus der pharmazeutischen Forschung. Mit der Blockade des CB1 Rezeptors durch das kürzlich auf dem europäischen Markt zugelassene Rimonabant (Acomplia®) sind erste erfolgreiche Schritte zur Reduktion des Körpergewichts gelungen. Die Modulation der Fettgewebefunktionen ist also ein neuer, erfolgreicher Ansatz zur Behandlung von Übergewicht und dessen Folgeerkrankungen. Die vorliegende Arbeit hat dazu beigetragen, die zugrunde liegenden Mechanismen im Adipozyten aufzuklären und neue Ansatzpunkte zur Beeinflussung der Fettzellfunktionen aufzuzeigen.

9. Literatur

1. **Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB:** Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733 (2001).
2. **Abel EL:** Cannabis: effects on hunger and thirst. *Behav Biol* 15:255-281 (1975).
3. **Anand BK, Brobeck JR:** Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 77:323-324 (1951).
4. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83 (1999).
5. **Asnicar MA, Smith DP, Yang DD, Heiman ML, Fox N, Chen YF, Hsiung HM, Koster A:** Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 142:4394-4400 (2001).
6. **Balkan B, Koylu E, Pogun S, Kuhar MJ:** Effects of adrenalectomy on CART expression in the rat arcuate nucleus. *Synapse* 50:14-19 (2003).
7. **Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV:** Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 10:89-97 (1995).
8. **Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrie P:** The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63:908-914 (2003).
9. **Blucher M, Kahn BB, Kahn CR:** Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572-574 (2003).
10. **Blucher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR:** Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25-38 (2002).
11. **Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P:** Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 (Pt 2):637-641 (1995).
12. **Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P:** Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 214:173-180 (1993).
13. **Broberger C, Holmberg K, Kuhar MJ, Hokfelt T:** Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13506-13511 (1999).
14. **Cannon B, Nedergaard J:** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359 (2004).
15. **Christensen CR, Clark PB, Morton KA:** Reversal of hypermetabolic brown adipose tissue in F-18 FDG PET imaging. *Clin Nucl Med* 31:193-196 (2006).
16. **Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U:** Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:289-301 (2003a).

17. **Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U:** The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423-431 (2003b).
18. **Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH:** Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9371-9376 (2001).
19. **Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB:** Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87 (1996).
20. **del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, D'Urso L, Di Toro R, Perrone L:** Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes* 50:2157-2160 (2001).
21. **Devane WA, Breuer A, Sheskin T, Jarbe TU, Eisen MS, Mechoulam R:** A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 35:2065-2069 (1992).
22. **Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC:** Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613 (1988).
23. **Dey A, Xhu X, Carroll R, Turck CW, Stein J, Steiner DF:** Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J Biol Chem* 278:15007-15014 (2003).
24. **Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T:** The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 147-185 (2005).
25. **Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G:** Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410:822-825 (2001).
26. **Di Marzo V, Matias I:** Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 8:585-589 (2005).
27. **Dinh TP, Freund TF, Piomelli D:** A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121:149-158 (2002).
28. **Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P:** PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15:2471-2481 (1995).
29. **Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK:** Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21:1375-1385 (1998).
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* 341:879-884 (1999).
31. **Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Paschke R:** Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 558:27-32 (2004).
32. **Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R:** Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507:142-146 (2001).

33. **Fogelholm M, Valve R, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Hakkarainen V, Laakso M, Uusitupa M:** Additive effects of the mutations in the beta3-adrenergic receptor and uncoupling protein-1 genes on weight loss and weight maintenance in Finnish women. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4246-4250 (1998).
34. **Fride E, Foox A, Rosenberg E, Faigenboim M, Cohen V, Barda L, Blau H, Mechoulam R:** Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur J Pharmacol* 461:27-34 (2003).
35. **Fride E, Ginzburg Y, Breuer A, Bisogno T, Di Marzo V, Mechoulam R:** Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup suckling and growth. *Eur J Pharmacol* 419:207-214 (2001).
36. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF:** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010 (2001).
37. **Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA:** The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-847 (2001).
38. **Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I:** Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307:426-430 (2005).
39. **Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulcier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M:** Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta 3 adrenoreceptor genes in obese people submitted to a low calorie diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:1051-1054 (1996).
40. **Galve-Roperh I, Rueda D, Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M:** Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 62:1385-1392 (2002).
41. **Gaoni Y, Mechoulam R:** The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc* 93:217-224 (1971).
42. **Gary-Bobo M, Elachouri G, Scatton B, Le Fur G, Oury-Donat F, Bensaid M:** The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol* 69:471-478 (2006).
43. **Gavi S, Shumay E, Wang HY, Malbon CC:** G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab* 17:48-54 (2006).
44. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS:** Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809 (1998).
45. **Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Bruning J, Kozak LP, Kahn CR, Benito M:** Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108:1205-1213 (2001).
46. **Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ:** Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R47-52 (2000).

47. **Haney M, Rabkin J, Gunderson E, Foltin RW:** Dronabinol and marijuana in HIV(+) marijuana smokers: acute effects on caloric intake and mood. *Psychopharmacology (Berl)* 181:170-178 (2005).
48. **Havel PJ:** Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53 Suppl 1:S143-151 (2004).
49. **Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M:** Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett* 494:225-231 (2001).
50. **Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y:** Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-1599 (2000).
51. **Howlett AC:** The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:619-631 (2002).
52. **Hu E, Liang P, Spiegelman BM:** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703 (1996).
53. **Hunter RG, Kuhar MJ:** CART peptides as targets for CNS drug development. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2:201-205 (2003).
54. **Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Kuhar MJ:** CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 15:454-459 (2004).
55. **Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Peleraux A, Penarier G, Soubrie P, Le Fur G, Galiegue S, Casellas P:** The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *Faseb J* 19:1567-1569 (2005).
56. **Jensen PB, Kristensen P, Clausen JT, Judge ME, Hastrup S, Thim L, Wulff BS, Foged C, Jensen J, Holst JJ, Madsen OD:** The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans. *FEBS Lett* 447:139-143 (1999).
57. **Kask A, Pahkla R, Irs A, Rago L, Wikberg JE, Schioth HB:** Long-term administration of MC4 receptor antagonist HS014 causes hyperphagia and obesity in rats. *Neuroreport* 10:707-711 (1999).
58. **Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Heath MM, Stanley SA, Seal LJ, Bhatti JR, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR:** Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49:177-182 (2000).
59. **Kirkham TC:** Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. *Behav Pharmacol* 16:297-313 (2005).
60. **Kirkham TC, Williams CM:** Endocannabinoid receptor antagonists: potential for obesity treatment. *Treat Endocrinol* 3:345-360 (2004).
61. **Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V:** Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 136:550-557 (2002).
62. **Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, Hino Y, Kuroda S, Takata M, Matsumoto M, Maeda T, Konishi H, Kikkawa U, Kasuga M:** Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol* 18:3708-3717 (1998).

63. **Klein J, Fasshauer M, Klein HH, Benito M, Kahn CR:** Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays* 24:382-388 (2002).
64. **Kong WM, Stanley S, Gardiner J, Abbott C, Murphy K, Seth A, Connoley I, Gbatei M, Stephens D, Bloom S:** A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *Faseb J* 17:1688-1690 (2003).
65. **Kowalski TJ, Houpt TA, Jahng J, Okada N, Liu SM, Chua SC, Jr., Smith GP:** Neuropeptide Y overexpression in the preweanling Zucker (fa/fa) rat. *Physiol Behav* 67:521-525 (1999).
66. **Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, Fasshauer M:** Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 185:R1-8 (2005).
67. **Kraus D, Fasshauer M, Ott V, Meier B, Jost M, Klein HH, Klein J:** Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes. *J Endocrinol* 175:185-191 (2002).
68. **Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S:** Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-76 (1998).
69. **Kuhar MJ, Adams LD, Hunter RG, Vechia SD, Smith Y:** CART peptides. *Regul Pept* 89:1-6 (2000).
70. **Kuhar MJ, Dall Vechia SE:** CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends Neurosci* 22:316-320 (1999).
71. **Kuhar MJ, Yoho LL:** CART peptide analysis by Western blotting. *Synapse* 33:163-171 (1999).
72. **Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ:** Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett* 384:198-202 (2005).
73. **Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ:** CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29:293-298 (1998).
74. **Larsen PJ, Hunter RG:** The role of CART in body weight homeostasis. *Peptides* 27:1981-1986 (2006).
75. **Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P:** Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 8:590-596 (2000).
76. **Lauckner JE, Hille B, Mackie K:** The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19144-19149 (2005).
77. **Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ:** Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 29:183-187 (2005).
78. **Lonnqvist F, Krief S, Strosberg AD, Nyberg S, Emorine LJ, Arner P:** Evidence for a functional beta 3-adrenoceptor in man. *Br J Pharmacol* 110:929-936 (1993).
79. **Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa**

- Y:** Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737 (2002).
80. **Matias I, Di Marzo V:** Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 18:27-37 (2007).
81. **Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V:** Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3171-3180 (2006).
82. **Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T:** Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* 892:146-154 (1999).
83. **Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al.:** Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90 (1995).
84. **Mechoulam R, Gaoni Y:** Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21:1223-1229 (1965).
85. **Mendizabal VE, Adler-Graschinsky E:** Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol* 151:427-440 (2007).
86. **Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M:** Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65 (1993).
87. **Murphy KG:** Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4:95-111 (2005).
88. **Murphy KG, Bloom SR:** Are all fats created equal? *Nat Med* 12:32-33 (2006).
89. **Nicholls DG, Locke RM:** Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64:1-64 (1984).
90. **Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F, Patsch W:** Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38:2125-2133 (1997).
91. **O'Rahilly S:** Insights into obesity and insulin resistance from the study of extreme human phenotypes. *Eur J Endocrinol* 147:435-441 (2002).
92. **Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertaler L, Wang L, Kunos G:** Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115:1298-1305 (2005).
93. **Pagotto U, Vicennati V, Pasquali R:** The endocannabinoid system and the treatment of obesity. *Ann Med* 37:270-275 (2005).
94. **Petit F, Donlan M, Michel A:** GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des* 67:252-253 (2006).
95. **Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L:** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36 (2002).
96. **Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS:** Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89:447-452 (2004).
97. **Plasse TF:** Clinical use of dronabinol. *J Clin Oncol* 9:2079-2080 (1991).
98. **Prins JB:** Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16:639-651 (2002).

99. **Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS:** Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10:524-529 (2004).
100. **Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P:** CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:640-648 (2004).
101. **Rohner-Jeanrenaud F, Craft LS, Bridwell J, Suter TM, Tinsley FC, Smiley DL, Burkhart DR, Statnick MA, Heiman ML, Ravussin E, Caro JF:** Chronic central infusion of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART 55-102): effects on body weight homeostasis in lean and high-fat-fed obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:143-149 (2002).
102. **Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J:** Obesity. *N Engl J Med* 337:396-407 (1997).
103. **Saltiel AR, Kahn CR:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806 (2001).
104. **Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I:** Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 14:1431-1437 (1994).
105. **Shirakami A, Toyonaga T, Tsuruzoe K, Shirotani T, Matsumoto K, Yoshizato K, Kawashima J, Hirashima Y, Miyamura N, Kahn CR, Araki E:** Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 174:309-319 (2002).
106. **Smith Y, Kieval J, Couceyro PR, Kuhar MJ:** CART peptide-immunoreactive neurones in the nucleus accumbens in monkeys: ultrastructural analysis, colocalization studies, and synaptic interactions with dopaminergic afferents. *J Comp Neurol* 407:491-511 (1999).
107. **Spiegelman BM, Flier JS:** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543 (2001).
108. **Spieß J, Vale W:** Multiple forms of somatostatin-like activity in rat hypothalamus. *Biochemistry* 19:2861-2866 (1980).
109. **Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF:** Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812-817 (2003).
110. **Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF:** Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7:1189-1192 (1986).
111. **Statnick MA, Beavers LS, Conner LJ, Corominola H, Johnson D, Hammond CD, Rafaeloff-Phail R, Seng T, Suter TM, Sluka JP, Ravussin E, Gadski RA, Caro JF:** Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* 1:81-88 (2000).
112. **Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K:** 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97 (1995).
113. **Tiraby C, Langin D:** Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 14:439-441 (2003).

114. **Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D:** Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278:33370-33376 (2003).
115. **Trayhurn P, Bing C, Wood IS:** Adipose tissue and adipokines--energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 136:1935S-1939S (2006).
116. **Valve R, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa M:** Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and beta3-adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns [see comments]. *Diabetologia* 41:357-361 (1998).
117. **Vicentic A, Jones DC:** The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *J Pharmacol Exp Ther* 320:499-506 (2007).
118. **Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ:** Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 12:913-919 (1997).
119. **von Eynatten M, Schneider JG, Humpert PM, Kreuzer J, Kuecherer H, Katus HA, Nawroth PP, Dugi KA:** Serum adiponectin levels are an independent predictor of the extent of coronary artery disease in men. *J Am Coll Cardiol* 47:2124-2126 (2006).
120. **Wang C, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM:** Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport* 11:3251-3255 (2000).
121. **Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA:** Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935 (2001).
122. **Weyer C, Gautier JF, Danforth E, Jr.:** Development of beta 3-adrenoceptor agonists for the treatment of obesity and diabetes--an update. *Diabetes Metab* 25:11-21 (1999).
123. **Weyer C, Tataranni PA, Snitker S, Danforth E, Jr., Ravussin E:** Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes* 47:1555-1561 (1998).
124. **White MF, Kahn CR:** Cascade of autophosphorylation in the beta-subunit of the insulin receptor. *J Cell Biochem* 39:429-441 (1989).
125. **Wierup N, Richards WG, Bannon AW, Kuhar MJ, Ahren B, Sundler F:** CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regul Pept* 129:203-211 (2005).
126. **Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ, Batt RA, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR:** Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 132:1939-1944 (1993).
127. **Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ:** Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52:1355-1363 (2003).
128. **Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W, Makita Z:** Sequencing of the putative promoter region of the cocaine- and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:132-136 (2002).
129. **Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa**

- S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T:** Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769 (2003).
130. **Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM:** Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3815-3819 (2001).
131. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM:** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432 (1994).

10. Abkürzungsverzeichnis

µl	Microliter
µM	Micromolar
2-AG	2- Arachidonyl-Glycerol
AgRP	Agouti Related Peptide
AKT/ PKB	AKT/ Proteinkinase B
alpha MSH	alpha Melanocyten-Stimulierendes-Hormon
APS	Ammonium peroxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CART	Cocain-und Amphetaminreguliertes Transkript
CB1R	Cannabinoid Rezeptor 1
CCK	Cholecystokinin
cDNA	komplementäre Desoxiribonucleinsäure
CNR	Cannabinoid Rezeptor
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
DEPC	Diethylpyrocabonat
DMEM	Dulbecco´s Eagle Modified Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitrol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase
FIRKO	Fat-Specific Insulin Receptor Knockout
g	Gram
Glut 4	Glukosetransporter 4
GSK-3	Glukogen Synthase Kinase-3
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HSP 10	Hitzeschockprotein 10
IASO:	International Association for the Study of Obesity
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
KCL	Kalziumchlorid

kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KO	knockout
l	Liter
LTR	Long Terminal Repeats
M	Molar
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MC4R	Melanocortin 4-Rezeptor
MCH	Melanin-Concentrating Hormone
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NCBI	National Center for Biotechnology
nm	Nanometer
NPY	Neuropeptid Y
O ₂	Sauerstoff
p110	katalytische Untereinheit der PI 3-Kinase
p85	regulatorische Untereinheit der PI 3-Kinase
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBEF	Pre-cell-colony-enhancing factor
PBS	Phosphat-buffered Salin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEN	Penicillin
PET	Positronen Emission
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI	Phosphatidylinositol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTX	Pertussis-Toxin
PYY	Peptid Y
RAS	Renin-Angiotensin System
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
STREP	Streptomycin
SV-40	Simian vacuolating virus-40
T3	3,3',5-Triiod-L-Thyronin-Natriumsalz
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Umdrehungen

UCP-1	Uncoupling Protein-1 (entkoppelndes Protein)
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralesnervensystem

Wenn ich weiter blicken konnte als andere, dann aufgrund der Tatsache, dass ich auf den Schultern von Riesen stand.

Sir Isaac Newton

Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein gilt mein besonderer Dank. Mit kompetenter und freundschaftlicher Unterstützung stand er mir bei allen Fragen und Diskussionen zur Seite. Sein unerschütterliches Vertrauen in meine Arbeit und sein Forschungsdrang waren für mich immer eine große Motivation. Danke für die Möglichkeit, dass ich ein so interessantes und spannendes Thema nicht nur in Lübeck, sondern auch in den USA und in Kanada bearbeiten durfte.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Rohwedel danke ich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens und die damit verbundenen Mühen.

Herr Prof. Dr. med. Horst Harald Klein hat mich in der ersten Phase meiner Arbeit in Lübeck begleitet und mir die Faszination und die Möglichkeiten der Fettzellforschung näher gebracht.

Meine wichtigsten Wegbegleiter im Labor waren Frau Britta Meier und Frau Maren Drenckhan. Auf ihre Hilfe und Freundschaft konnte ich mich immer verlassen. Ein Labortag ohne Euch war ein Tag ohne Sonne. Danke!

Für die Abwechslung im Laboralltag möchte ich mich bei allen Studenten bedanken, die ihre Doktorarbeit oder Masterarbeit im Labor bearbeitet haben. Sie haben jeden Tag zu einem neuen Erlebnis gemacht.

Ohne die Unterstützung und Liebe meiner Familie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Ihnen gehört mein innigster Dank.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

- Geburtsdatum: 2. September 1972
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr
Familienstand: ledig
- 1992: Abitur am Gymnasium Essen-Werden, Essen,
1993-2000: Biologiestudium an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
Studienabschluss: Diplom im Fachbereich Biologie; Johannes Gutenberg Universität Mainz, Prüfungsfächer: Immunologie, Molekulargenetik, Physiologische Chemie, Zoologie
Thema der Diplomarbeit: „Analyse eines differentiell in Langerhans-Zellen exprimierten Gens.“ Angefertigt in der „klinischen Forschergruppe Allergie“; Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Reske-Kunz, Hautklinik; Universitätsklinikum Mainz
- 2001-2002: wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.H. Klein am Universitätsklinikum Lübeck
- seit 2003: wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. J. Klein am Universitätsklinikum Lübeck

Auslandsaufenthalte:

- Aug./Sep. 2003: „*Visiting Scientist*“ Pennington Biomedical Research Center; Louisiana State University Baton Rouge, LA, USA; Arbeitsgruppe Prof. Thomas W. Gettys
- Juli-Nov. 2005: „*Visiting Scientist*“ Banting and Best Diabetes Centre; Toronto, Ontario, Canada. Arbeitsgruppe Prof. Daniel Drucker

Projektförderung:

2002: Anschubförderung durch die Deutsche Diabetes Gesellschaft

Zusatzqualifikationen:

2002: Fortbildung für Projektleiter und Beauftragte für die biologische Sicherheit nach §15 Gentechniksicherheitsverordnung

2003 Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz im nichtmedizinischen Bereich, (Fachkundegruppen 2.1,2.2,4.2,5,6,7.1; gemeinsames Ministerblatt Nr. 29 vom 17.09.1982)

Publikationen:

1. Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, **Perwitz N**, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein HH. (2002) Troglitazone treatment increases protein kinase B phosphorylation in skeletal muscle of normoglycemic subjects at risk for the development of type 2 diabetes. Diabetes 51:2691-7.
2. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, **Perwitz N**, Klein HH, Tschop M, Klein J (2002) Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. Horm Metab Res. 34:640-645 (Special Issue on Endocrinology of Adipose Tissue)
3. Ott V, Fasshauer M, Meier B, Dalski A, Kraus D, Gettys TW, **Perwitz N**, Klein J. (2004) Ciliary neurotrophic factor influences endocrine adipocyte function: inhibition of leptin via PI 3-kinase. Mol Cell Endocrinol. 30:224:21-7.
4. Klein J, Westphal S, Kraus D, Meier B, **Perwitz N**, Ott V, Fasshauer M, Klein HH. (2004) Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinasesignalling pathway in brown adipocytes. J Endocrinol. 183:299-307
5. **Perwitz N**, Fasshauer M, Klein J. (2004) Die neue Sicht des Fettgewebes: „Master Mind“ hinter Pathogenese und Therapie des Metabolischen Syndroms. Focus (Universität zu Lübeck) 21 14-21

6. **Perwitz N**, Klein J. Neue Konzepte gegen das Metabolische Syndrom (2004) Medical Tribune 39: 10
7. **Perwitz N**, Sievert H, Meier B, Drenckhan M, Fasshauer M, Klein J (2005) Cocaine – and amphetamine-related transcript (CART) directly stimulates UCP-1 expression and enhances insulin-induced glucose uptake. Adipocytes Vol. 1, No. 3, pp. 145-150
8. Klein J, **Perwitz N**, Kraus D, Fasshauer M (2006) Adipose tissue as source and target for novel therapies. Trends Endocrinol Metab 17,1:26-32
9. **Perwitz N**, Fasshauer M, Klein J (2006) Cannabinoid Receptor Signaling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin. Horm. Metab. Res. 38:356-358
10. Iwen KA, **Perwitz N**, Kraus D, Fasshauer M, Klein J (2006) Putting fat cells onto the road map to novel therapeutic strategies. Discovery Medicine 6:75-81
11. Mäuser W, **Perwitz N**, Meier B, Fasshauer M, Klein J.: Direct adipotropic actions of atorvastatin: differentiation state-depedent induction of apaptosis, modulation of endocrine function and inhibition of glucose uptake. Eur J Pharmacol. 2007 Jun 14;564(1-3):37-46. Epub 2007 Feb 22
12. Westphal S, **Perwitz N**, Iwen A, Kraus D, Fasshauer M, Klein J (2008) Expression of ATRAP in adipocytes and negative regulation by beta3-adrenergic stimulation of JAK/STAT. Horm. Metab. Res. (in press)

Abstracts

1. Jäger J, **Perwitz N**, Ott V, Meier B, Fehm HL, Fasshauer M, Klein J (2003) Aldosterone directly modulates adipocyte metabolism and adipokine expression in a brown adipocyte model. 85th Annual Meeting der Endocrine Society 2003, Philadelphia, PA USA
2. Jäger J, **Perwitz N**, Ott V, Dalski A, Meier B, Klein HH, Fasshauer M, Klein J (2003) Aldosterone crosstalk with insulin induces insulin resistance and alters endocrine function in a brown adipocyte model. Diabetes und Stoffwechsel 12:S29

3. Westphal S, **Perwitz N**, Ott V, Kraus D, Schick RR, Fasshauer M, Klein J (2005) b3-adrenergic crosstalk with JAK/STAT signaling downregulates expression of angiotensin II. (selected for Research Summary Book, 125 abstracts from > 2000) 87th Annual Meeting der Endocrine Society, St. Diego, CA USA
4. Ott V, Wenzel E, **Perwitz N**, Kraus D, Wellhoener P, Fasshauer M, Dodt C, Klein J (2005) Acute activation of the sympathetic nervous system induces expression and secretion of adipokines implicated in inflammation and insulin resistance in humans. 87th Annual Meeting der Endocrine Society, St. Diego, CA USA
5. Ott V, Wenzel E, **Perwitz N**, Kraus D, Wellhoener P, Fasshauer M, Dodt C, Klein J (2005) Akute Sympathikoexzitation induziert ein proinflammatorisches und insulinresistenz begünstigendes Adipokin-Profil beim Menschen. Diabetes und Stoffwechsel 14:S45; 40. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Berlin
6. **Perwitz N.**, Sievert H. , Meier B., Fasshauer M., Klein J. (2005) Cocaine-and Amphetamine-Related Transcript (CART) directly alters adipose tissue thermogenesis, insulin sensitivity, and leptin expression. Exp Clin Endocrinol Diabetes 113:S21 49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Bremen
7. Christiansen N, Kraus D, **Perwitz N**, Meier B, Fasshauer M, Klein J (2005) Direct actions of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on brown adipose tissue include stimulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Angiotensin II, and Leptin. Exp Clin Endocrinol Diabetes 113:S5, 49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Bremen
8. **Perwitz N**, Meier B, Drenckhan M, Fasshauer M, Klein J (2006) Cannabinoid Cb1 receptor-mediated effects on white and brown adipocytes. Exp Clin Endocrinol Diabetes 114:S9; 50. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) und der 23. Jahrestagung der Niederländischen Gesellschaft für Endokrinologie (NVE), Essen
9. Senyaman O, Schwartz A, Iwen KA, Papenfuss K, Drenckhan M, Meier B, **Perwitz N**, Fasshauer M, Klein J (2006) Melanocortin crosstalk with metabolic and endocrine adipose functions: ACTH directly induces insulin resistance, promotes a proinflammatory adipokine profile, and stimulates UCP-1 in white and brown adipocytes. 88th Annual Meeting, Endocrine Society, Boston, USA
10. Mäuser W, **Perwitz N**, Meier B, Fasshauer M, Klein J (2006) Direct interaction of atorvastatin with white and brown adipocytes: induction of apoptosis and modulation of

- endocrine function. 41. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Leipzig Diabetologie und Stoffwechsel 1:S161-162
11. **Perwitz N**, Drenckhan M, Klein J (2007) Depotspezifische direkte Effekte einer Cannabinoid-(Cb)1-Rezeptor-Blockade in Fettzellen: Induktion von Insulinsensitivität und negativer Energiebilanz. 42. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Hamburg Diabetologie und Stoffwechsel 2:S22
 12. Klein J, **Perwitz N**, Meier B, Drenckhan M, Sievert H, Baggio LL, Seino Y, Drucker DJ (2007) Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Receptor-/- white and brown preadipose lines fail to differentiate: a direct role for the GIP Receptor in adipogenesis. 89th Annual Meeting der Endocrine Society ,Toronto, ON, Canada
 13. Hoppmann J, **Perwitz N**, Fasshauer M, Hadaschik D, Schutz G; Lehnert HL, Klein J (2008) The mineralocorticoid receptor induces pro-inflammatory effects in white adipocytes and is essential for adipocyte differentiation. European Congress of Endocrinology, Berlin
 14. Westphal S, Kuchler S, Drenckhan M, **Perwitz N**, Klein J, Schick RR (2008) Arginine-Vasopressin directly induces a pro-inflammatory, insulin resistance-promoting, and anti-thermogenic response in adipocytes. 90th Annual Meeting der Endocrine Society ,San Francisco, CA, USA

Vorträge

1. "Pathogenic Mechanisms of the Metabolic Syndrome: Studies using a Brown Adipocyte Model" (2003) Pennington Biomedical Research Center; Louisiana State University Baton Rouge, LA, USA
2. "Cocaine-and Amphetamine-Related Transcript (Cart) Directly Alters Adipose Tissue Thermogenesis, Insulin Sensitivity, and Leptin Expression" (2005) 49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Bremen
3. "Cannabinoid Cb1 receptor-mediated effects on white and brown adipocytes" (2006) 50. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) und der 23. Jahrestagung der Niederländischen Gesellschaft für Endokrinologie (NVE), Essen

4. “The Endocannabinoid-System: Molecular and Clinical Target for Controlling Metabolic & Endocrine Fat Cell Function” (2006), Sanofi-Aventis
5. „Depotspezifische direkte Effekte einer Cannabinoid-(Cb)1-Rezeptor-Blockade in Fettzellen: Induktion von Insulinsensitivität und negativer Energiebilanz.“ (2007) 42. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Hamburg

13. Erklärung

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

Lübeck, den

(Nina Perwitz)