

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. Horst Lorenz Fehm

**Metformin hemmt die
Leptinsekretion in Fettzellen**

Inauguraldissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde
Der Universität zu Lübeck

– AUS DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT –

vorgelegt von
Sören Westphal
aus Köln

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Klein

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.09.2006

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Aus dieser Dissertation sind folgende Publikationen hervorgegangen:

Originalartikel

1. **Westphal S (gleichberechtigter Erstautor)**, Klein J, Kraus D, Meier B, Perwitz N, Ott V, Fasshauer M, Klein HH: Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling pathway in brown adipocytes. *Journal of Endocrinology* 183:299-307 (2004).
2. **Westphal S**, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M, Klein J: Expression of the novel angiotensin II signaling modulator ATRAP in adipocytes and negatively regulation by β 3-adrenergic stimulation of JAK/STAT signaling. Eingereicht bei: *European Journal of Endocrinology* (2005)

Wissenschaftliche Beiträge auf nationalen und internationalen Kongressen:

1. **Westphal S**, Perwitz N, Ott V, Schick RR, Fasshauer M, Klein J: β 3-Adrenergic cross-talk with JAK/STAT signaling downregulates angiotensin II. (2005) *87th Annual Meeting, Endocrine Society, San Diego, USA (aus > 2000 Beiträgen als einer von 125 ausgewählt zur Aufnahme in das Research Summaries Book 2005)*
2. **Westphal S**, Fasshauer M, Kraus D, Meier B, Ott V, Klein HH, Klein J: Differentiation-independent inhibition of leptin secretion by metformin in brown adipocytes. (2002) *37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Diabetes und Stoffwechsel 11:S2 (ausgewählt als Präsidentenposter und ausgezeichnet mit dem Posterpreis der DDG)*
3. **Westphal S**, Kraus D, Meier B, Fasshauer M, Ott V, Klein HH, Klein J: Differentiation-independent inhibition of leptin secretion and MAP Kinase activation by metformin in brown adipocytes. (2002) *84th Annual Meeting, Endocrine Society, San Francisco, USA*

Die Arbeiten wurden zusätzlich ausgezeichnet und unterstützt durch Stipendien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, der Studienstiftung des deutschen Volkes und der Freunde und Förderer der Universität Lübeck.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	3
1.1 ADIPOSITAS UND INSULINSENSITIVITÄT	3
1.2 KLASSISCHE UND NEU ENTDECKTE FUNKTIONEN DES FETTGEWEBES.....	4
1.2.1 Insulinsensitivität.....	5
1.2.2 Thermogenese.....	6
1.2.3 Hormonsekretion	7
1.3 ROLLE DES METFORMINS IN DER THERAPIE DES DIABETES UND DER ADIPOSITAS	8
1.4 FRAGESTELLUNG	10
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	12
2.1 MATERIAL	12
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	12
2.1.2 Zelllinie.....	14
2.1.3 Radioaktive Substanzen.....	14
2.1.4 Antikörper und Inhibitoren.....	14
2.1.5 Geräte	14
2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....	15
2.1.7 Lösungen und Gele.....	18
2.2 METHODEN.....	19
2.2.1 Zellmodel.....	19
2.2.2 Zellkultur	19
2.2.3 Differenzierung der Präadipozyten.....	20
2.2.4 Zellstimulation.....	21
2.2.5 Spezifischer Nachweis von Zellproteinen	21
2.2.6 Glukoseaufnahme-Assay	23
2.2.7 Echtzeit-RT-PCR.....	23
2.2.8 Oil-red-O-Färbung.....	24
2.2.9 Bestimmung der Leptinsekretion und der Laktat- bzw. Glukosekonzentration.....	24
2.2.10 Statistische Auswertung	25

3	ERGEBNISSE	26
3.1	METFORMIN INHIBIERT DIE LEPTINSEKRETION	26
3.1.1	Die Metformin-vermittelte Hemmung der Leptinsekretion ist reversibel	27
3.2	DIE METFORMIN-VERMITTELTE HEMMUNG DER LEPTINSEKRETION IST DIFFERENZIERUNGSUNABHÄNGIG	28
3.2.1	Chronische Metforminbehandlung beeinträchtigt nicht die intrazelluläre Lipidakkumulation	28
3.2.2	Subakute Metforminbehandlung beeinträchtigt nicht die Boten-RNS-Expression des späten Differenzierungsmarkers UCP-1	30
3.3	DIE METFORMIN-VERMITTELTE HEMMUNG DER LEPTINSEKRETION ERFOLGT UNABHÄNGIG VON WIRKUNGEN AUF DEN INTRAZELLULÄREN GLUKOSEHAUSHALT	30
3.3.1	Metformin hemmt die Glukoseaufnahme	30
3.3.2	Metformin und intrazellulärer Glukosemetabolismus	33
3.4	METFORMIN AKTIVIERT DIFFERENZIELL INTRAZELLULÄRE SIGNALWEGE	34
3.4.1	Wachstumsfaktor-Signalwege: Metformin stimuliert die p44/p42 MAP-Kinase	34
3.4.2	Stresskinase-, Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase-abhängige und JAK/STAT-Signalwege: Metformin beeinträchtigt nicht p38 MAP-Kinase, Akt und STAT3	36
3.4.3	Metformin beeinträchtigt nicht die Genexpression von Leptin	36
3.4.4	Hemmung des p44/p42 MAP-Kinase-Signalweges verhindert die Metformin-vermittelte Inhibition der Leptinsekretion	37
4	DISKUSSION	39
4.1	METFORMIN UND LEPTINSEKRETION	39
4.2	METFORMIN UND FETTZELLDIFFERENZIERUNG	42
4.3	METFORMIN UND GLUKOSEHAUSHALT	43
4.4	METFORMIN UND INTRAZELLULÄRE SIGNALWEGE	45
4.5	GEWONNENE ERKENNTNISSE UND AUSBLICK	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	48
6	GLOSSAR	49
7	LITERATURVERZEICHNIS	51
8	DANKSAGUNG	62
9	CURRICULUM VITAE	63

1 EINLEITUNG

1.1 ADIPOSITAS UND INSULINSENSITIVITÄT

Insulinsensitivität bezeichnet die Fähigkeit von Organen, auf Stimulation durch Insulin adäquat zu reagieren, im Fall von Skelettmuskel- und Fettgewebe beispielsweise durch Glukoseaufnahme. Verminderung oder Verlust dieser Eigenschaft stellen das zentrale pathogenetische Prinzip einer gestörten Glukosetoleranz und - nach Versagen kompensatorischer Mechanismen im weiteren Verlauf des Krankheitsprozesses - des manifesten Diabetes mellitus Typ II dar (Reaven 2005). Im Rahmen einer Gegenregulation kommt es zunächst zu gesteigerter Insulinsekretion und erhöhten Insulinspiegeln im Blut. Diese Veränderungen kennzeichnen die Insulinresistenz. Verglichen mit gesunden Individuen kann die maximale Glukoseverwertung um 40-60 % reduziert sein. Im Verlauf kommt es zum zunehmenden sekretorischen Versagen der Insulin sezernierenden β -Zelle und zur Manifestation des Diabetes. Die Mechanismen, die zu Insulinresistenz und Diabetes führen, sind nur ungenügend verstanden. Ein wichtiger Risikofaktor ist die Adipositas (Schulze und Hu 2005). Unter Adipositas wird ein krankhaftes Übergewicht, insbesondere ein Übermaß des Fettgewebes, verstanden, welches zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen kann. Kaukasische Individuen, deren „*Body mass index*“ (*BMI: Körpergewicht in kg/(Körpergröße in m)²*) einen Wert von 24,9 kg/m² überschreitet, gelten als adipös. Adipositas und Insulinresistenz bilden die zentralen Komponenten des so genannten Metabolischen Syndroms, welches durch das zusätzliche Auftreten von Lipidstörungen und arterieller Hypertonie gekennzeichnet ist (Hauner 2002). Weltweit sind gegenwärtig schon 143 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Man rechnet bis zum Jahre 2025 mit einer Verdopplung dieser Zahl. Alarmierend ist auch die Tatsache, dass bereits Kinder und Jugendliche in zunehmendem Maße sowohl unter Adipositas als auch unter Diabetes mellitus Typ II leiden (Strauss und Pollack 2001). Diese Störungen gelten als Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Myokardinfarkt und zerebraler Insult, welche die Mortalitätsstatistiken der industrialisierten Länder anführen (Reaven 1988; DeFronzo und Ferrannini 1991; Laakso 1999). In der Bundesrepublik Deutschland ist aktuell jeder fünfte Bundesbürger adipös, in den Vereinigten Staaten von Amerika ist bereits etwa die Hälfte der Bevölkerung betroffen (Kuczmarski *et al.* 1994; Yanovski und Yanovski 2002).

Adipositas scheint nach neusten Erkenntnissen ein unabhängiger Risikofaktor für eine signifikant verminderte Lebenserwartung zu sein (Peeters *et al.* 2003). Die Physiologie des Fettgewebes spielt für die Ausbildung des Metabolischen Syndroms und seiner Komplikationen eine entscheidende Rolle. Daher soll darauf im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2 KLASSISCHE UND NEU ENTDECKTE FUNKTIONEN DES FETTGEWEBES

Unter dem Fettgewebe wird ein durch Bindegewebe locker zusammengehaltener Verbund unterschiedlich differenzierter, d. h. lipidgefüllter Fettzellen, so genannter Adipozyten, verstanden. Fettgewebe tritt ubiquitär im Körper auf und ist stark vaskularisiert. Das gesamte Fettgewebsorgan eines jungen, normalgewichtigen Mannes macht etwa 15 % des Körpergewichtes aus, das einer Frau circa 25 %. Dieser Anteil nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Rechnerisch ergibt dies bei einem mittleren Energieverbrauch von 8400 kJ pro Tag ein Energiereservoir für 37 Tage. Jede Fettzelle enthält durchschnittlich 0,3 µg Fett, das im ausdifferenzierten Zustand auf 1,6 µg zunehmen kann. Wegen dieses beeindruckenden Energiereservoirs galt das Fettgewebe lange hauptsächlich als Organ zur Speicherung bzw. Verbrennung von Energie in Form von Triglyzeriden. Das zur Energiespeicherung in Form von Fetten notwendige Glycerin-Gerüst gelangt über die insulinsteuerte Aufnahme von Glukose in die Zelle. Umgekehrt werden zur Energieverbrennung durch die sympatho-adrenerg induzierte Lipolyse freie Fettsäuren aus diesem Gerüst hydrolysiert und im Zitratzyklus zu Adenosintriphosphat (ATP) verstoffwechselt. In diesem Zusammenhang stellt die adrenerg gesteuerte thermogenetische Funktion des braunen Fettgewebes ein weiteres besonderes Charakteristikum dar. Durch Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette von der ATP-Synthase wird die im Protonengradienten gespeicherte Energie nicht in ATP überführt, sondern als Wärme direkt abgegeben. Für das inzwischen erweiterte Verständnis der Fettgewebsfunktion ist schließlich die Entdeckung seiner endokrinen Aktivität bedeutsam. Adipozyten sind zur Synthese und Sekretion unterschiedlicher Hormone mit pleiotroper Wirkung auf verschiedene Organsysteme befähigt. Auf diese drei Funktionen, Insulinsensitivität, Thermogenese und endokrine Funktion von Fettzellen, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2.1 Insulinsensitivität

Das Fettgewebe reagiert auf Stimulation durch Insulin mit einer Erhöhung der intrazellulären Glukoseaufnahme sowie einer gesteigerten Lipid- und Proteinsynthese. Wichtige Elemente und Mechanismen der Signalkaskade, die diese Wirkungen vermitteln, sind in den letzten Jahrzehnten entschlüsselt worden. Nach Bindung von Insulin an seinen Rezeptor kommt es durch die intrinsische Rezeptor-Kinase-Aktivität zunächst zu Autophosphorylierung und nachfolgend Bindung sowie Phosphorylierung weiterer Moleküle wie z. B. der Insulinrezeptorsubstrate (IRS) 1 und 2. Diese ermöglichen das Andocken und die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase), einem Schlüsselement des Insulin-signalweges. Biologische Endpunkte, die von der PI 3-Kinase reguliert werden, sind Proteinsynthese, Lipogenese und Glukoseaufnahme. Die Glukoseaufnahme wird über das Transportermolekül Glut4 vermittelt, das als Antwort auf die Insulinstimulation aus dem Zytosol in die Membran transloziert. Ein anderer wichtiger Signalweg, der von den IRS-Molekülen ausgeht, führt zur Aktivierung des *mitogen activated protein (MAP)*-Kinase-Signalweges, der für die Zellproliferation und Gentranskription verantwortlich ist (Saltiel und Kahn 2001). Aufgrund der Tatsache, dass das Fettgewebe im Vergleich z. B. zum Muskel nur einen Bruchteil der Glukose nach Insulinstimulation aufnimmt, wurde der adipozytären Insulinsensitivität keine große physiologische Bedeutung beigemessen. Diese Annahme muss in Anbetracht neuester Studien jedoch revidiert werden. So führt eine fettgewebsspezifische Gendeletion des Insulinrezeptors bei Mäusen dazu, dass diese vor Übergewicht und einer altersbedingten Glukoseintoleranz geschützt sind (Blüher *et al.* 2002). Ebenso unerwartet erscheint die um fast 20 % gesteigerte Lebenserwartung dieser Tiere (Blüher *et al.* 2003). Andere fettspezifische Veränderungen des Insulin-signalweges wie die Deletion des Transportermoleküls Glut4 in der Maus führen jedoch im Gegensatz dazu zu einer Insulinresistenz des Gesamtorganismus (Abel *et al.* 2001). Weiterhin führt die genetische Deletion des Insulinrezeptors im braunen Fettgewebe zu einer Insulinsekretionsstörung, die mit einer progressiven Glukoseintoleranz einhergeht (Guerra *et al.* 2001). Für die Erklärung all dieser Befunde könnte eine veränderte endokrine Aktivität des Fettgewebes ein Schlüssel sein. Die genauen molekularen und funktionellen Zusammenhänge sind derzeit noch kaum verstanden. Diese Befunde verdeutlichen aber die enge Vernetzung der Fettgewebefunktion mit multiplen anderen Organsystemen (Abel *et al.* 2001) und deren beträchtliche Relevanz für Insulinsensitivität, Energiehaushalt und die Lebenserwartung.

1.2.2 Thermogenese

Braunes Fettgewebe zeichnet sich durch eine starke Innervation mit sympathischen Nervenfasern und einen charakteristischen Mitochondrienreichtum aus. Durch diese Eigenschaften wird die spezifische Funktion des braunen Fettgewebes gewährleistet: die Wärmeerzeugung oder Thermogenese. Aktiviert wird die Thermogenese insbesondere durch Stimulation des β 3-adrenergen Rezeptors, der die Expression des *uncoupling protein-1* (*UCP-1*) verstärkt. Durch dieses Protein wird die im transmembranalen Protonengradienten gespeicherte Energie von der ATP-Synthese entkoppelt und direkt in thermische Energie überführt. Unbestritten spielt dieser Mechanismus bei kleinen Säugetieren für das Überleben in der Kälte eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus moduliert die Thermogenese die Energiehomöostase nach der Nahrungszufuhr. Dieser Anpassungsmechanismus wird als „adaptive Thermogenese“ bezeichnet (Lowell und Bachman 2003). Mäuse mit einer gentechnisch erzeugten Deletion aller drei β -adrenergen Rezeptorsubtypen, die die Expression von *UCP-1* steuern, werden unter hochkalorischer Nahrung massiv adipös. Bei übergewichtigen Menschen ist die *UCP-1* Expression in viszeralen Fettdepots vermindert (Oberkofler *et al.* 1997). Darüber hinaus sind Mutationen im *UCP-1* Gen und/oder in dem Gen für den β 3-adrenergen Rezeptor in einigen, aber nicht allen untersuchten Populationen assoziiert mit Übergewicht und Insulinresistenz (Fumeron *et al.* 1996; Strosberg 1997; Fogelholm *et al.* 1998). Eine unlängst veröffentlichte Studie zeigt bei erwachsenen Individuen einen Zusammenhang zwischen einem Mindestmaß einer für braunes Fettgewebe spezifischen Genexpression und einer normalen Insulinsensitivität und Energiehomöostase auf (Yang *et al.* 2003). Braunes Fettgewebe ist im Organismus aller Säugetiere nachgewiesen worden (Cannon und Nedergaard 2004), jedoch finden sich beim Erwachsenen keine umschriebenen braunen Fettgewebsdepots mehr. Braune Adipozyten liegen innerhalb des weißen Fettgewebes disseminiert vor und sind dadurch einer systematischen Untersuchung schwer zugänglich. Dennoch finden sich auch beim erwachsenen Menschen deutliche Hinweise für eine Zunahme von brauner Fettmasse bei Kälteexposition (Huttunen *et al.* 1981) oder als Antwort auf adrenergen Stress, z.B. bei Patienten mit Phäochromozytom (Lean *et al.* 1986). Kürzlich wurde ferner gezeigt, dass menschliches weißes Fettgewebe in braunes Fettgewebe transdifferenziert werden kann (Tiraby und Langin 2003; Tiraby *et al.* 2003). In diesem Kontext ist von besonderer Bedeutung, dass eine Behandlung mit Thiazolidindionen, die den *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (*PPAR γ*)-Rezeptor aktivieren und als *Insulinsensitizer* bezeichnet werden, ebenfalls weißes Fett in braunes

Fett transdifferenziert (Digby *et al.* 1998). Aus pharmakotherapeutischer Sicht ergeben sich damit potenzielle Ansatzpunkte für eine Behandlung von Störungen des Energiehaushalts. Verschiedene Strategien, die eine über braunes Fett induzierte verstärkte Energieabgabe zum Ziel haben, sind in Erprobung.

1.2.3 Hormonsekretion

Auf die funktionelle Bedeutung des Fettgewebes für die Energiehomöostase des Gesamtorganismus wurde bereits hingewiesen. Diese überraschend anmutende Tatsache wird plausibel, wenn man sich die endokrine Aktivität des Fettgewebes vergegenwärtigt. Inzwischen hat man gelernt, dass Fettgewebshormone vielfältige Regelsysteme wie das Immunsystem, das kardiovaskuläre System, die Angiogenese, den Salz-Wasserhaushalt und die Reproduktion beeinflussen (Prins 2002; Kershaw und Flier 2004). Aufgrund der prototypischen Stellung des Leptins für die endokrine Adipozytenfunktion soll im Folgenden auf dieses wichtige Adipokin eingegangen werden:

In den 70er Jahren wurde unter Zugrundelegung von Studien mit hereditär adipösen *ob/ob*- (für engl. *obese*) Mäusen ein für die Energiehomöostase kritisches afferentes Schlüsselsignal postuliert. Mäuse mit homozygoter Deletion des *ob*-Gens wiegen dreimal so viel wie normale Wildtyp-Mäuse und weisen eine Verfünffachung der Fettmasse auf. Die erfolgreiche Identifizierung und Charakterisierung des *ob*-Gens im Jahre 1994 war eine wissenschaftliche Sensation. Das Genprodukt, ein 16 Kilodalton schweres Protein, wurde nach dem griechischen *leptos* (schlank) Leptin genannt. Damit war die Entdeckung eines entscheidenden, die Energiehomöostase beeinflussenden Proteins geglückt. Es zählt mittlerweile zu den am besten charakterisierten Adipokinen. Die Gabe von Leptin führte bei *ob/ob*-Mäusen zu einer drastischen Gewichtsreduktion. Leptin fördert über die Regulation der Neuropeptid Y-Expression hypothalamischer Kerngebiete das Sättigungsgefühl – anorexigene Wirkung – und führt über die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und eine vermehrte Energieabgabe zu einer negativen Energiebilanz. Leptin greift regulierend in eine Reihe von Regelkreisen des Organismus ein. Die weit reichende Bedeutung dieses prototypischen Adipokins für die Energiehomöostase war schnell absehbar (Friedman und Halaas 1998) und erbrachte in der Folge eine deutliche Hinwendung der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit zur Erforschung der Fettgewebsphysiologie und deren Interaktion mit neuronalen Regelkreisen. Es stellte sich heraus, dass bei übergewichtigen Menschen kein Mangel, sondern im Gegenteil eine Erhöhung von Leptinspiegeln im Blut vorliegt, am

ehesten als kompensatorische Folge einer hypothalamischen Resistenz mit inadäquater Suppression des Hungergefühls. Diese so genannte Leptinresistenz ist derzeit nicht ausreichend verstanden. Eine Leptintherapie beim Menschen hat bisher nur in seltenen Ausnahmefällen von Adipositas, wie z.B. bei homozygoten Leptinmutationen, zu signifikanten Therapieerfolgen geführt. (Oral *et al.* 2002; Oral *et al.* 2002). Eine andere Patientengruppe, die von der externen Leptingabe profitiert, stellen interessanterweise Individuen mit hypothalamischer Amenorrhoe dar. Externe Substitution mit humanem Leptin über einen Zeitraum von drei Monaten führte zu einer Verbesserung der reproduktiven und neuroendokrinen Funktion sowie der Schilddrüsen- und Stoffwechselfparameter (Welt *et al.* 2004; Musso *et al.* 2005). Schließlich gibt es eine seltene Sonderform des Diabetes, den lipatropen Diabetes, der mit Fettverteilungsstörungen, Dyslipidämie und oft extrem hohem Insulinbedarf einhergeht. Von eindrucksvollen Verbesserungen der Stoffwechsellage und des Insulinbedarfs durch Leptingabe ist in diesen Fällen berichtet worden.

Für den Typ II Diabetes und das Metabolische Syndrome ist jedoch das Biguanid Metformin das Medikament der ersten Wahl. Hierauf soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

1.3 ROLLE DES METFORMINS IN DER THERAPIE DES DIABETES UND DER ADIPOSITAS

In der Pharmakotherapie des Diabetes mellitus Typ II haben sich unterschiedliche Medikamente etabliert, die den dargelegten pathologischen Veränderungen der Energiehomöostase entgegenwirken sollen, darunter innerhalb der Gruppe der Biguanide das Medikament Metformin. Bei Typ II Diabetes-Patienten wirkt sich die Gabe von Metformin insbesondere bei stark übergewichtigen Patienten positiv auf den Glukosestoffwechsel aus (UKPDS-Group 1998). Die Rate an Neuerkrankungen an Diabetes mellitus Typ II kann durch seinen Einsatz um über 30 % gesenkt werden (Fujimoto 2000). Metformin ist ein insulinsensitivierendes Agens. Weiterhin zeichnet sich Metformin im Gegensatz zu anderen oralen Antidiabetika durch seine Eigenschaft aus, einen Gewichtsverlust zu begünstigen. Klinische Studien haben eine kleine, aber signifikante Reduktion der Körpergewichts (DeFronzo *et al.* 1991; DeFronzo und Goodman 1995) oder eine signifikant kleinere Gewichtszunahme im Vergleich zu anderen Therapieformen gezeigt (Makimattila *et al.* 1999). Die Ursache hierfür ist umstritten. Sie wird entweder auf eine verminderte Kalorienaufnahme zurückgeführt (Lee und Morley 1998; Makimattila *et al.* 1999) oder als Aus-

druck einer erhöhten Energieabgabe aufgefasst (Leslie *et al.* 1987; Perriello *et al.* 1994; Stumvoll *et al.* 1995).

Die Mechanismen der Metforminwirkung sind trotz seines jahrzehntelangen Einsatzes noch nicht vollständig verstanden (Bailey und Turner 1996; Matthaei *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2001). In der Leber bewirkt Metformin eine Hemmung der Glykogensynthese und der Glukoneogenese. Begleitet werden diese Effekte von einer reduzierten Expression von Genen, welche in die Fettsäureoxidation und die Glukoneogenese involviert sind (Fulgencio *et al.* 2001). Im Darm bewirkt Metformin eine gesteigerte Aktivität des Glut2-Transporters und somit eine gesteigerte Glukoseresorption (Klip *et al.* 1990; Matthaei *et al.* 1993; Walker *et al.* 2005). Die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) scheint ein Schlüsselsignal für alle genannten Wirkungen zu sein. Sie wurde in Hepatozyten (Zhou *et al.* 2001) sowie in β -Zellen des Pankreas beschrieben (Leclerc *et al.* 2004). Ferner ist eine gesteigerte Insulinrezeptortyrosinkinaseaktivität durch Metformin bekannt (Rossetti *et al.* 1990; Stith *et al.* 1996). Darüber hinaus wird über einen Einfluss der lipophilen Substanz Metformin auf die Funktion der Zellmembran spekuliert (Wiernsperger 1999). In Rattenhepatozyten ist eine Inhibition der Glykogensynthese und Glukoneogenese beschrieben worden (Otto *et al.* 2003). Über direkte Wirkungen von Metformin auf die Fettgewebefunktion ist wenig bekannt. In Rattenadipozyten ist eine Steigerung der Glukoseaufnahme beschrieben worden (Matthaei *et al.* 1991; Matthaei *et al.* 1993), während die Glukoseaufnahme in humanen Zellen unbeeindruckt zu bleiben scheint (Ciaraldi *et al.* 2002). Eine systematische Untersuchung von potentiellen direkten Metforminwirkungen auf Adipozyten unter Berücksichtigung der endokrinen Funktion ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

1.4 FRAGESTELLUNG

Im Vorangehenden wurde ausgeführt, dass das Fettgewebe inzwischen als ein Schlüsselorgan für die Entstehung von Adipositas, Diabetes und den assoziierten kardiovaskulären Komplikationen angesehen wird. Dabei spielt die Sekretion von Hormonen wie Leptin eine entscheidende Rolle. Das Verständnis der Fettgewebsphysiologie kann einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung therapeutischer Strategien leisten. Ein seit Jahren in der Therapie des Diabetes etabliertes Medikament stellt Metformin dar, das wegen seiner günstigen Effekte auf die Energiehomöostase heute als Substanz der ersten Wahl in der Behandlung des Metabolischen Syndroms eingesetzt wird. Metformin-Wirkungen auf das Fettgewebe und daran beteiligte Mechanismen sind nur ungenügend bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte daher die Bearbeitung folgender Fragen zum Ziel (siehe Abb.1):

- I. Beeinflusst Metformin die Leptinsekretion?**
- II. Sind diese Wirkungen abhängig vom Differenzierungsgrad der Adipozyten?**
- III. Sind diese Wirkungen abhängig vom intrazellulären Glukosestoffwechsel?**
- IV. Welche intrazellulären Signaltransduktionswege vermitteln die Metformin-Wirkungen?**

Unklare Wirkungen von Metformin auf die Fettgewebsphysiologie

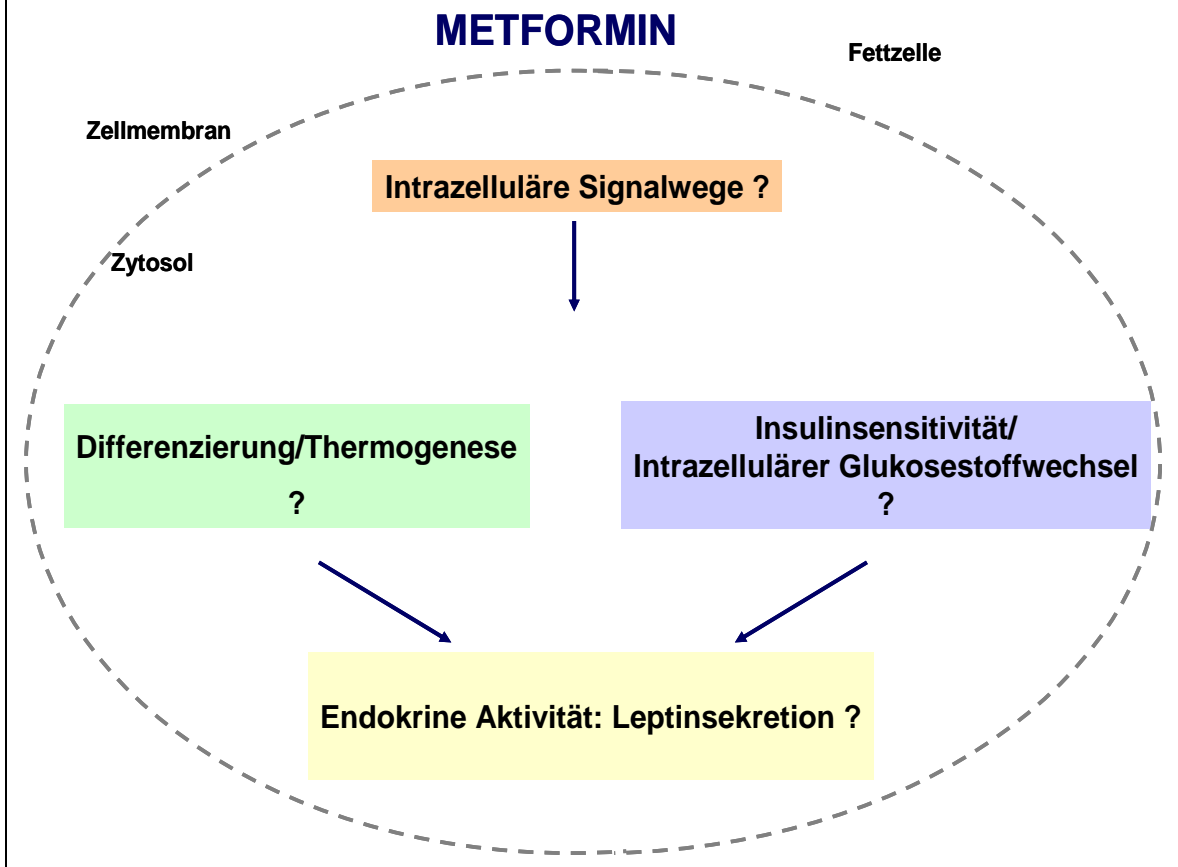


Abb. 1: Fettgewebsphysiologie.

Schematische Darstellung. Dargestellt sind die drei Kernkomponenten der Fettgewebsfunktion, auf die Metformin potentiell Einfluss nimmt. Insulinsensitivität / intrazellulärer Glukosestoffwechsel, Thermogenese / Differenzierung sowie die endokrine Aktivität.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1	
CHEMIKALIEN	HERSTELLER
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Adenosintriphosphat	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Amphotericin B	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Aprotinin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
BM-Cyclin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bovines Serumalbumin	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Bradford-Protein-Assay	BioRad (München, Deutschland)
Bromphenolblau 0.01%	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chemolumineszenz-Kit (Maus-Kaninchen)	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
Chromatographiepapier 3MM	Whatman (Maidstone, England)
Dexamethason	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
DTT (1-4-Dithiothreitrol)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>Ethylendiamine-tetra-acidic acid</i>	
Ethylendiamintetraessigsäure	
<i>ECL (Enhanced-Chemolumineszenz)-Filme</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
FBS (Fötale Bovines Serum)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
G153 Developer	AGFA (Hamburg, Deutschland)
G354 Fixierer	AGFA (Hamburg, Deutschland)
GeneAmp 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Glukose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol 85 %	Apotheke der Universität zu Lübeck
Glycin	Biomol (Hamburg, Deutschland)
HCl 25%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES 1mol/l (N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	Biomol (Hamburg, Deutschland)

IGEPAL CA-630	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Indomethazin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Insulin (<i>bovin</i>)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Insulin (<i>human</i>) 1mg/ml	Nordisk (Baegsvard, Dänemark)
IBMX (Isobutylmethylxanthin)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kulturschalen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Laemmli	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Leupeptin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat 7×H ₂ O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumfluorid	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumorthovanadat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumpyrophosphat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumvanadat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nitrozellulose-Membran Protran BA85	Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland)
Oligo p(DT)15 Primer	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	BioWhittaker (Verviers, Belgien)
PMSF (Phenylmethylsufonylfluorid)	Boehringer (Mannheim, Deutschland)
Propranolol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Protein-Molekulargewichtsmarker RPN 800	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
QuantiTect SYBR Green PCR-Mix	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNase Inhibitor	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
Rneasy Kit und Rnase Dnase Set	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Superscript	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Szintillationsflüssigkeit; Ready Safe	Beckmann (Fullerton, USA)
T3 (3,5-Triiod-L-Thyroxin)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIzol Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Western Blot Chemilumineszenz	NEN (Dreieich, Deutschland)

2.1.2 Zelllinie

Für alle durchgeführten Experimente wurden immortalisierte braune Adipozyten von Mäusen des Stamms FVB genutzt. Dieses Modell ist für die Untersuchung aller funktionellen Adipozytenebenen sehr sensitiv und eingehend charakterisiert (Klein *et al.* 2002; Ott *et al.* 2002).

2.1.3 Radioaktive Substanzen

Tabelle 2	
SUBSTANZ	HERSTELLER
2-Deoxy-[³ H]Glukose, 5 µCi/ml	NEN (Dreieich, Deutschland)
Leptin – Radioimmunassay (Maus)	Linco Research (St. Louis, USA)

2.1.4 Antikörper und Inhibitoren

Tabelle 3	
ANTIKÖRPER / INHIBITOREN	HERSTELLER
Anti-STAT3 p-Tyr ⁷⁰⁵ -AK; Polyklonal	Cell Signalling Technology (Beverly, USA)
Anti-Akt p-Ser ⁴⁷³ -Antikörper; Polyklonal	Cell Signalling Technology (Beverly, USA)
Anti-C/EBPα-Antikörper	Cell Signalling Technology (Beverly, USA)
Anti-PPARγ-Antikörper	Cell Signalling Technology (Beverly, USA)
Anti-p44/p42 MAP-Kinase-Antikörper	Cell Signalling Technology (Beverly, USA)
Anti-p38 MAP-Kinase-Antikörper	Cell Signalling Technology (Beverly, USA)
MEK-1/2-Inhibitor PD98059	Cell Signalling Technology (Beverly, USA)
Anti-UCP-1-Antikörper	Alpha Diagnostic (San Antonio, USA)

2.1.5 Geräte

Tabelle 4	
GERÄT	HERSTELLER
Analysenwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Γ-Zähler LKB1219	LKB (Freiburg, Deutschland)
B-Zähler 1409	Wallac (Turku, Finnland)
Gelgießvorrichtung	BioRad (München, Deutschland)
Gelelektrophorese Mini-Protean 3	BioRad (München, Deutschland)
Mikroskop Olympus CK2 mit	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Okular CWHK 10x/18	
Mikrotiterplatten-Photometer	BioRad (München, Deutschland)
Netzgerät für Elektrophorese, E-802	VWR (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland)
Rundschüttelwasserbad	Infors (Schweiz)

Fortsetzung Tabelle 4

GERÄT	HERSTELLER
Biophotometer mit Thermodrucker	Eppendorf (München, Deutschland)
Spektralphotometer	Milton Roy (USA)
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)
ZENTRIFUGEN	HERSTELLER
Minifuge RF/Rotor BS4402/A	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Biofuge fresco/Rotor 3765	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Mikro 22R/Rotor 1154	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5	
<u>Grundmedium</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration</i>
DMEM mit	
Glukose	4,5 g/l
Pyridoxin und Glutamax®	
Fötales Kälberserum (FBS)	20 %
Amphotericin B	1 µg/ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
BM1 oder BM2	1 ml

Tabelle 6	
<u>Differenzierungsmedium</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration</i>
DMEM mit	
Glukose	4,5 g/l
Pyridoxin und Glutamax®	
Fötales Kälberserum (FBS)	20 %
Insulin	20 nM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
BM1 oder BM2	1 ml
Trijodthyronin (T3)	1 nM

Tabelle 7	
<u>Induktionsmedium</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration</i>
Differenzierungsmedium <i>plus</i>	
Indomethacin	250 µM
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	500 µM
Dexamethason	2 µg/ml

Tabelle 8	
<u>Starvingmedium</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration</i>
DMEM mit	
Glukose	4,5 g/l
Pyridoxin	
Glutamax®	

Tabelle 9	
<u>Krebs-Ringer-HEPES Puffer (pH 7,4)</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration</i>
HEPES	20 mM
Natriumchlorid	136 mM
Kaliumchlorid	4,7 mM
Kalziumchlorid	1,25 mM
Magnesiumsulfat	1,25 mM

Tabelle 10	
<u>Lysepuffer (pH 7,4; 4°C)</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration</i>
HEPES	50 mM
Natriumchlorid	137 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
Kalziumchlorid	1 mM
Natriumpyrophosphat	10 mM
Natriumfluorid	10 mM
EDTA	2 mM
Natriumorthovanadat	2 mM
Glycerol	10 %
IGEPAL CA-630	1 %
Leupeptin	10 µg/ml
Aprotinin	10 µg/ml
PMSF	2 mM

Tabelle 11	
<u>Transferpuffer</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Stoffmenge</i>
Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
<i>ergänzt um</i>	
20% Methanol	
<i>cum aqua destillata ad 1 Liter (l)</i>	

Tabelle 12		
<u>Waschpuffer</u>		
<i>bestehend aus</i>	<i>Stoffmenge</i>	
Tris	10 ml	einer 2 molaren Lösung
NaCl	120 ml	einer 2,5 molaren Lösung
Tween	1 ml	einer 20% igen Lösung
<i>cum aqua dest.</i>		
<i>ad 2 Liter (l)</i>		
und bei 4°C auf einen pH-Wert von 7.4 einstellen		

Tabelle 13		
<u>Elektrophoresepuffer</u>		
<i>bestehend aus</i>	<i>Stoffmenge</i>	
Tris	6,06	g
Glycin	28,5	g
EDTA	0,67	g
SDS	1,0	g
<i>cum aqua destillata ad 1 Liter (l)</i>		

Tabelle 14	
<u>Blockpuffer</u>	
<i>bestehend aus</i>	
Waschpuffer	
<i>plus</i>	
3 % BSA	

Tabelle 15	
<u>Laemmli-Auftragspuffer (pH 6,8)</u>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Stoffmenge bzw. Konzentration</i>
Bromphenolblau	0,002 %
Glycerol	0,2 g/ml
SDS	4 %
Tris	50 mM
DTT	100 mM

2.1.7 Lösungen und Gele

Tabelle 16

Natriumorthovanadat-Stammlösung (pH 10,0)

Natriumorthovanadat 200 mM in destilliertem Wasser lösen, den pH-Wert einstellen und kochen, bis die Lösung farblos erscheint. Auf Raumtemperaturabkühlen, pH-Wert erneut einstellen und wieder aufkochen. Prozedur wiederholen bis die Lösung nach pH-Einstellung farblos bleibt.

Tabelle 17

10 x PBS (pH 7,4 bei Raumtemperatur)

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration</i>
Natriumchlorid	80 g/l
Kaliumchlorid	2 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g/l
di-Natriumhydrogenphosphat x 2H ₂ O	14,4 g/l

Tabelle 18

Oil Red O-Färbelösung

<i>bestehend aus</i>	<i>Stoffmenge</i>
Oil red O	0,5 g
Isopropylalkohol	100 ml

Tabelle 19

Acrylamidgele

	Trenngel:			Sammelgel:
	8 %	10 %	12 %	
<i>aqua destillata</i>	7 ml	6 ml	5ml	3,4 ml
1,5 mM Tris (pH = 8,8)	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	625 µl
Acrylamid	4 ml	5 ml	6 ml	850 µl
10 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl	50 µl
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

2.2 METHODEN

2.2.1 Zellmodel

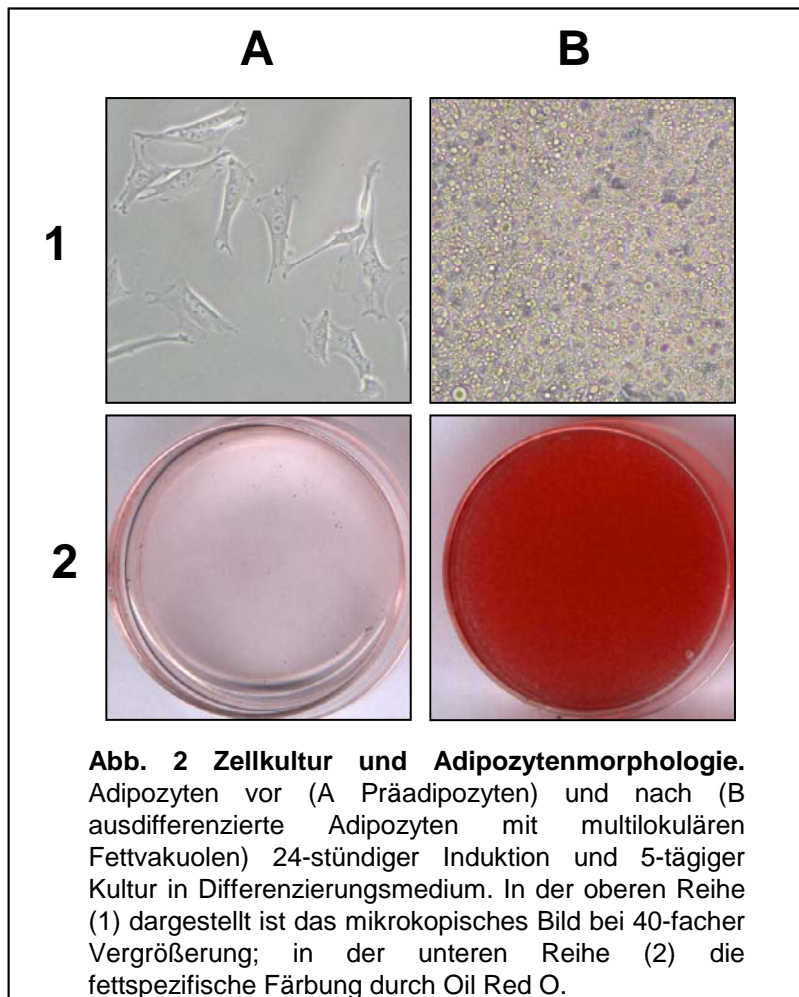
Braune Adipozyten wurden aus dem interskapularen Fettdepot einer neugeborenen Wildtyp-Maus gewonnen. Im Verlauf der nachfolgenden Kultur wurden die Präadipozyten durch Transformation mit dem retroviralen Vektor *pBabe* infiziert. Dieser enthält neben einer Gensequenz für Puromycin-Resistenz auch die für das *Simian virus-40* T-Antigen kodierenden Gensequenzen. Durch Zugabe von Puromycin in das Zellmedium konnten die immortalisierten Zellen im Anschluss selektiert und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

2.2.2 Zellkultur

Die Zellkulturarbeit fand in keimarmer Umgebung unter einer Sicherheitswerkbank statt. Im flüssigen Stickstoff gelagerte Präadipozyten wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad innerhalb von ein bis zwei Minuten aufgetaut und auf eine Stammpatte (15 cm) ausgesät und ab diesem Zeitpunkt in Grundmedium (siehe Tabelle 5) in einer Atmosphäre von fünf Prozent Kohlendioxid (CO₂) und 95 % Sauerstoff (O₂) kultiviert. Die Präadipozyten erreichten nach drei bis vier Tagen eine Konfluenz von circa 70 %, so dass sie für die weiteren Experimente herangezogen werden konnten. Hierfür wurde die Stammpatte zweimal mit 37 °C warmem *PBS* (siehe Tabelle 17) gewaschen und die Adipozyten durch 2,5 ml Trypsin von der Platte gelöst. Nach einer kurzen Einwirkzeit von maximal drei Minuten wurden die Zellen mit Grundmedium resuspendiert und anschließend in die entsprechenden Zellkulturschalen oder Sechs- bzw. Zwölf-Loch-Platten verteilt (ca. $1-2 \times 10^5$ Zellen/Petrischale), in denen bereits Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 6) in entsprechender Menge vorgelegt war. Auf die Stammpatte selbst wurden jedes Mal ca. 2×10^5 Zellen (zehn Prozent) zurückgegeben, so dass der Teilungsrhythmus erneut drei bis vier Tage betrug. Zur Kontaminationsprophylaxe, v. a. gegen Mycoplasmen, wurde die antibiotische Substanz Tetracyclin verwendet. Für die Bestimmung der Glukoseaufnahme wurden Zwölf-Loch-Platten verwendet, zur Untersuchung der Leptinfreisetzung in das Medium Sechs-Loch-Platten und für alle weiteren Experimente (Immunoblotverfahren, Färbeversuche und Echtzeit RT-PCR) Ein-Loch Petrischalen.

2.2.3 Differenzierung der Präadipozyten

Die Präadipozyten wurden für durchschnittlich vier Tage in Differenzierungsmedium kultiviert, bevor der Zellrasen die Platte vollständig bedeckt hatte. Für den weiteren Differenzierungsprozess ist dieser Zeitpunkt bedeutsam, da sowohl ein zu früher als auch ein zu später Beginn der anschließenden Induktionsphase zu einem Differenzierungsdefizit führt. Konfluente Zellen wurden für 24 Stunden mit Isobutylmethylxanthin, Dexamethason und Indomethazin (siehe Tabelle 7) behandelt. Nach 24 Stunden wurde diese Induktionsphase beendet. Die Zellen wurden für vier bis fünf weitere Tage in das Differenzierungsmedium zurückgewechselt, bis der vollständig differenzierte Phänotyp mit multilokulären Fetttröpfchen ausgebildet war. Zu beachten war hierbei, dass die mitochondrienreichen, sehr stoffwechselaktiven Zellen zu keiner Zeit in eine katabole Stoffwechsellage gerieten und



konsekutiv freie Fettsäuren, Laktat und andere Stoffwechselprodukte in das Medium abgaben. Das für die Medien verwendete *Dulbecco's modifizierte Eagle-medium (DMEM)* war hierfür in besonderer Weise geeignet, da es einen Indikator enthält, der bei Vorhandensein eines sauren pHs von rubinrot nach gelb umschlägt. Physiologische Kulturbedingungen wurden durch ein- bis zweitägigen Wechsel des Mediums gewährleistet. Der Erfolg der voll-

ständigen Differenzierung wurde abschließend mikro- und makroskopisch kontrolliert (siehe Abbildung 2).

2.2.4 Zellstimulation

Die ausdifferenzierten Adipozyten wurden vor Durchführung der Immunblotexperimente und Funktionsassays zunächst für 48 Stunden in serum- und insulinfreiem Kulturmedium (*DMEM*) gehalten. Hierdurch konnte die Sensitivität der Zellen auf die Pharmaka und anderen Versuchsreagenzien erhöht werden. Ein morphologischer Unterschied konnte vor und nach dieser Behandlung sowohl mikro- als auch makroskopisch nicht nachgewiesen werden. Für alle Experimente wurden Zellen in den Passagen zehn bis 30 verwendet. Die Stimulationen wurden bei 37 °C und fünf Prozent Kohlendioxid (CO₂) durchgeführt.

2.2.5 Spezifischer Nachweis von Zellproteinen

Proteinisolation und Quantifizierung

Adipozyten wurden im Anschluss an die Stimulation umgehend mit vier Grad Celsius kaltem *PBS* zweimal gewaschen. Die Isolation der Proteinfraction wurde begonnen, indem die Zellen durch Zusatz von 450 µl Lysepuffer (siehe Tabelle 10) fraktioniert wurden. Der Zellrasen wurde abgehoben und in Mikroküvetten überführt und bei vier Grad Celsius für zehn Minuten geschwenkt. Zur Isolierung der zytosolischen Fraktion wurden die Lysate bei 12.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) und vier Grad Celsius insgesamt zehn Minuten zentrifugiert. Fettanteil und die Kernfraktion wurden verworfen, und die Proteinmenge des Zellrasens wurde photometrisch modifiziert nach Bradford bestimmt (Bradford 1976 und Sapan 1999). Kurz zusammengefasst wurde hierfür ein Mikroliter der gewonnenen Proteinlysate in spezielle Photometerküvetten pipettiert, welche eine Lösung enthielten, deren Blaufärbung proportional zu der Proteinkonzentration anstieg. Ermittelte Proteinkonzentrationen wurden dann in Relation zu einer im gleichen Ansatz erstellten Eichkurve gesetzt. Durch Bestimmung von Doppelwerten wurde zufälligen Fehlern beim Pipettieren entgegengewirkt. Innerhalb eines Experimentes wurden Variationsbreiten der Proteinmengen von maximal 20 Prozent toleriert. Proteinmengen des Zellrasens einer Ein-Loch Petrischale lagen üblicherweise bei um die zehn Milligramm pro Milliliter (mg/ml). Durch Verdünnung mit Lysepuffer wurden die Proteinkonzentrationen dann zueinander standartisiert. Mit Laemmlipuffer (siehe Tabelle 15) versetzt wurden die Proteine im Anschluss bei 95 °C fünf Minuten denaturiert und dann bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

Proteintrennung

Vor Beginn der Gelelektrophorese wurden die Proben erneut bei 95 °C fünf Minuten erhitzt und geschüttelt um eine adäquate Durchmischung der Proteinfraction zu erreichen. Zwischen 20 µg und 200 µg wurden dann auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Um eine eindeutige Größenordnung der Proteine zu ermöglichen, wurde in eine separate Geltasche zehn Mikroliter eines Protein-Molekularmarkers pipettiert. Für die Elektrophorese wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidsystem nach Laemmli verwendet. Das Trenngel hatte hierbei je nach Fragestellung einen Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Anteil von acht bis zwölf Prozent. Je größer das zu untersuchende Protein war, desto niedriger war der Prozentsatz des zugesetzten Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisches (siehe Tabelle 19). Das Sammelgel besaß einen Acrylamid/Bisacrylamid-Anteil von 4,5 %. Die anschließende Proteinauftrennung im elektrischen Feld wurde in einem speziellen Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 13) durchgeführt. Sie wurde mit einer Spannung von 80 Volt (V) begonnen und nach circa 20 Minuten mit 100 Volt (V) fortgeführt.

Transfer

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine in eiskaltem Transferpuffer (siehe Tabelle 11) bei 110 Volt (V) Spannung auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Transferzeiten zwischen 45 Minuten und einer Stunde und 20 Minuten gewählt. Je größer das Protein war, desto länger mussten für ein optimales Ergebnis die Transferzeiten gewählt werden. Nach dem Transfer der Proteine wurden die Membranen über Nacht in Blockpuffer (siehe Tabelle 14) bei vier Grad Celsius inkubiert, um freie Nitrocellulose unspezifisch an Albumin zu binden. Hierdurch wurde im weiteren Verlauf des Experimentes eine unspezifische Bindung von Primärantikörper an Nitrozellulose verhindert.

Spezifische Proteindetektion nach dem Western Blot Verfahren

Transferierte Proteine wurden in einem ersten Schritt für ein bis zwei Stunden mit dem für das zu untersuchende Protein spezifischen Primärantikörper inkubiert. Die jeweilig günstigsten Inkubationszeiten zur Detektion eines eindeutigen Signals wurden im Vorfeld ausgetestet. Danach wurden die Nitrocellulosemembranen dreimal fünf Minuten mit Waschpuffer (siehe Tabelle 12) gewaschen. Anschließend wurde für 30 Minuten bis eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der mit seinem F_{ab} Teil an den Primärantikörper spezifisch bindet und an seiner F_c-Region an eine Peroxidase gekoppelt ist. Auch hierbei wurde die günstigste Inkubationszeit für den zweiten Antikörper durch Vorversuche erar-

beitet. Reste der Antikörperlösung wurden erneut durch dreimal fünfminütiges Waschen entfernt. Anschließend wurde die Membran für eine Minute in ein Reagenz gelegt, das durch die Peroxidaseaktivität zur Fluoreszenz angeregt wird. Diese wurde dann mit entsprechenden Filmen detektiert. Die Auswertung der Signale erfolgte densitometrisch.

2.2.6 Glukoseaufnahme-Assay

Als Grundlage für diese Untersuchung diente ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll. Radioaktiv markierte 2-Desoxyglukose diente zur Ermittlung der Glukoseaufnahme in die Adipozyten. 2-Desoxyglukose wird innerhalb der Zelle durch die Hexokinase nicht weiter verstoffwechselt (Garcia de Herreros und Birnbaum 1989).

Stimulation

Zellen wurden in Zwölf-Lochplatten ausgesät und bis zur vollständigen Differenzierung kultiviert. Anschließend wurden sie für zwei Tage im Starvingmedium (siehe Tabelle 8) belassen und daraufhin zweimal mit jeweils einem Milliliter Krebs–Ringer–Hepes–Lösung (KRH, siehe Tabelle 9) gewaschen, wodurch das Medium und die in diesem Überstand befindlichen Stoffwechselprodukte vollständig entfernt wurden. Nach diesem Waschvorgang wurde 450 µl KRH in die Buchten zugesetzt. Anschließend wurde der Zellrasen mit Metformin in den angegebenen Konzentrationen und Zeiten inkubiert. Danach erfolgte 30 Minuten lang eine Stimulation mit 100 nM Insulin.

Glukoseaufnahme

Danach wurden 50 µl einer ein millimolaren 2-Desoxyglukose – Lösung mit 5 µCi/ml ³H-2-Desoxyglukose (Endkonzentration 500 nCi/ml bzw. Endaktivität 18,5 kBq/ml) hinzugefügt. Nach vier Minuten wurde der Versuch durch Eintauchen der Platten in vier Grad Celsius kaltes *PBS* (siehe Tabelle 17) und durch Lysebehandlung mit 500 µl SDS (0,1 %) beendet. Die Radioaktivität der Lysate wurde in einem β-Szintillationszähler gemessen. Für jede Versuchsbedingung wurde der Mittelwert aus drei gleichen Versuchsansätzen gebildet, um auch minimale Schwankungen der Zellzahl zwischen den Buchten und Konditionen auszugleichen.

2.2.7 Echtzeit-RT-PCR

Zur Analyse der Boten-RNS-Expression von Leptin und *UCP-1* wurde die Methode der Echtzeit Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) genutzt. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in serumfreiem Medium kultiviert. Initial wurde die gesamte RNS unter Verwendung des TRIZOL Reagenz isoliert. Anschließend wurde sie

zur Optimierung der RNS-Qualität mittels RNeasy Kit und Rnase Dnase Set aufgereinigt. Die Qualität wurde dann photometrisch und durch eine Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Zwei Mikrogramm der gesamten RNS wurden daraufhin mit Hilfe von Superscript, einem Oligo p(DT)15 Primer und mit einem Rnase Inhibitor revers transkribiert. Ein Mikroliter einer jeden RT-Reaktion wurde mittels 1X QuantiTect SYBR Green PCR-Mix und 250 nM des jeweiligen Primers unter Zuhilfenahme des GeneAmp 7000 Sequence Detection System amplifiziert. Folgende Primer wurden verwendet: Leptin: 5'-GTG CCT ATC CAG AAA GTC CAG GAT G-3' (*sense*) und 5'-CTG GTG AGG ACC TGT TGA TAG AC-3' (*anti-sense*), *UCP-1*: ATG GTG AAC CCG ACA ACT TCC GAA GTG (*sense*) und GTA CTG GAA GCC TGG CCT TCA CCT TGG (*antisense*). Die PCR-Reaktion für die Zielgene wurde wie folgt durchgeführt: Erst-Denaturierung 95 °C für 900 Sekunden, 40 Zyklen bestehend aus 95 °C für zehn Sekunden, 56 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 30 Sekunden. Die Fluoreszenz-Emission wurde von Zyklus zu Zyklus gemessen und mittels eines computergestützten Algorithmus quantifiziert, bei dem die ersten Wendepunkte der Fluoreszenzkurven identifiziert werden. Diese korrelieren invers mit den eingesetzten RNS-Ausgangsprodukten. Die Amplifikation spezifischer Transkripte wurde durch Schmelzkurvenprofile am Ende jeder Messung überprüft.

2.2.8 Oil-red-O-Färbung

Die Zellkulturschalen wurden mit *PBS* (siehe Tabelle 17) zweimal gewaschen und in zehnprozentigem Formaldehyd über eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Nach Abgießen der Fixierungslösung wurde der fettspezifische Farbstoff *Oil red O* (siehe Tabelle 18) auf die Zellen gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Zellkulturschalen mehrmals mit Wasser gewaschen.

2.2.9 Bestimmung der Leptinsekretion und der Laktat- bzw. Glukosekonzentration

Um die Sekretion des Adipokins Leptin in das Kulturmedium bzw. darin enthaltene Laktat- und Glukosekonzentration zu bestimmen, wurden Adipozyten in Sechs-Loch Platten ausgesät. Der Nährstoffbedarf des Zellrasens konnte hierdurch auf ein Milliliter Differenzierungsmedium pro 24 Stunden begrenzt werden und der Überstand komplett zur Analyse herangezogen werden. Nach abgeschlossener Induktion wurde die Inkubation mit Metformin durchgeführt und der Überstand zur Analyse der Leptinsekretionsmengen bzw. Glukose- und Laktatkonzentrationen gewonnen. Der Zellrasen wurde anschließend mit neuem

Diffenzierungsmedium mit entsprechender Metforminkonzentration versorgt. Die Zellkultur wurde bis zum zehnten Tag nach abgeschlossener Induktion fortgesetzt.

2.2.10 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten *Student-t*-Test berechnet oder im Falle mehrerer Stichproben mittels der ANOVA (*,analysis of variance'*) - Analyse. p-Werte $\leq 0,05$ gelten als statistisch signifikant, p-Werte $\leq 0,01$ als statistisch hoch signifikant. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm *Sigma Plot 7.101* der Firma *SPSS Science*, Chicago, USA.

3 ERGEBNISSE

3.1 METFORMIN INHIBIERT DIE LEPTINSEKRETION

Das Adipokin Leptin ist das prototypische Hormon des Fettgewebes. Die Untersuchung der Metforminwirkungen auf die Leptinsekretion stellte den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar. Wurden Adipozyten während ihres Differenzierungsprozesses chronisch mit Metformin inkubiert, so zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition der Leptinsekretion.

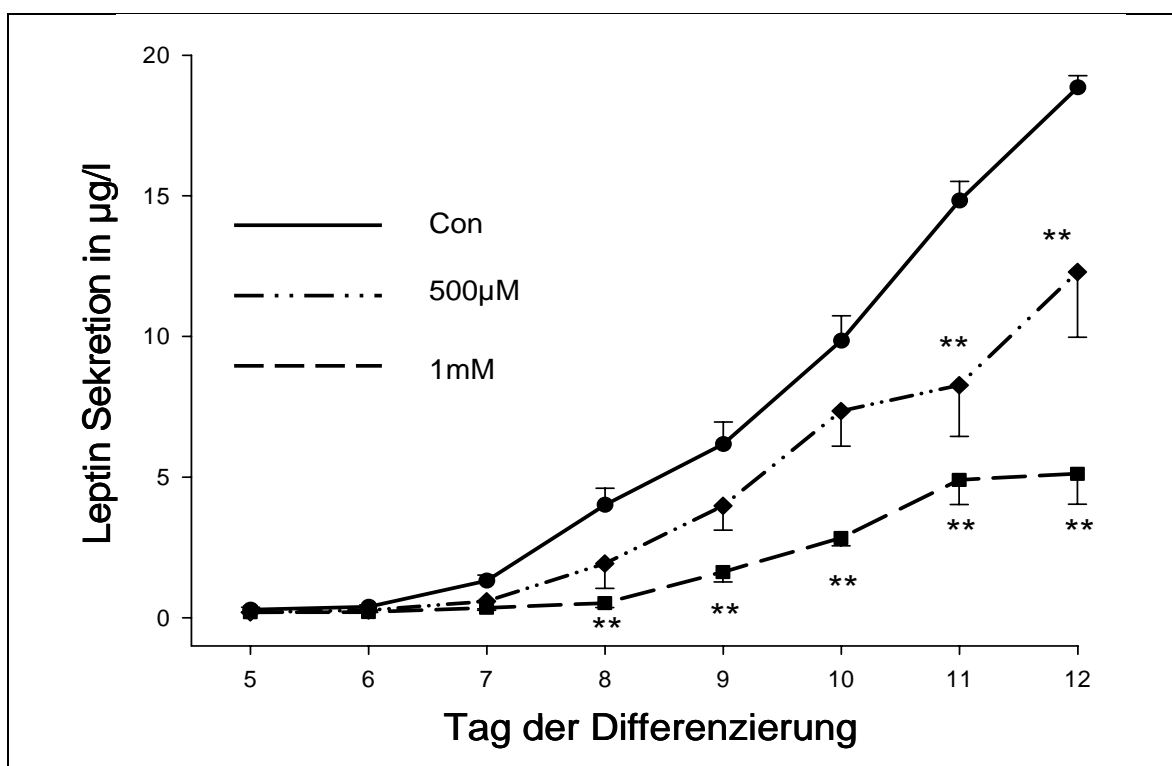


Abb. 3 Chronische Metforminstimulation hemmt direkt die Leptinsekretion von Fettzellen.

Adipozyten wurden während ihres Differenzierungsvorganges chronisch mit Metformin (500 µM und 1 mM) inkubiert. Der Mediumsüberstand wurde alle 24 Stunden gewonnen. Dargestellt sind Liniengraphen mit Mittelwerten und Standardfehlern von mindestens drei unabhängigen Experimenten. ** Der doppelte Asteriskus kennzeichnet hoch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Con); berechnet mittels der ANOVA („analysis of variance“) - Analyse.

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, welche zu Beginn des zwölf-tägigen Differenzierungskurses weniger als 0,2 µg/l Leptin und am Ende circa 20 µg/l in das Medium abgaben, führte chronische Metforminbehandlung zu einer Inhibition dieses Sekretionsanstieges um 35 % bei 500 µM Metformin, bzw. um 75 % bei 1mM Metformin (siehe Abbildung 3). Bei 100 µM Metformin fand sich keine signifikante Inhibition der Leptinsekretion (Daten nicht gezeigt).

3.1.1 Die Metformin-vermittelte Hemmung der Leptinsekretion ist reversibel

In einem nächsten Schritt wurde die Kinetik des inhibitorischen Einflusses von Metformin auf die Leptinsekretion charakterisiert. Es wurden Inkubationszeiten zwischen einer und 24

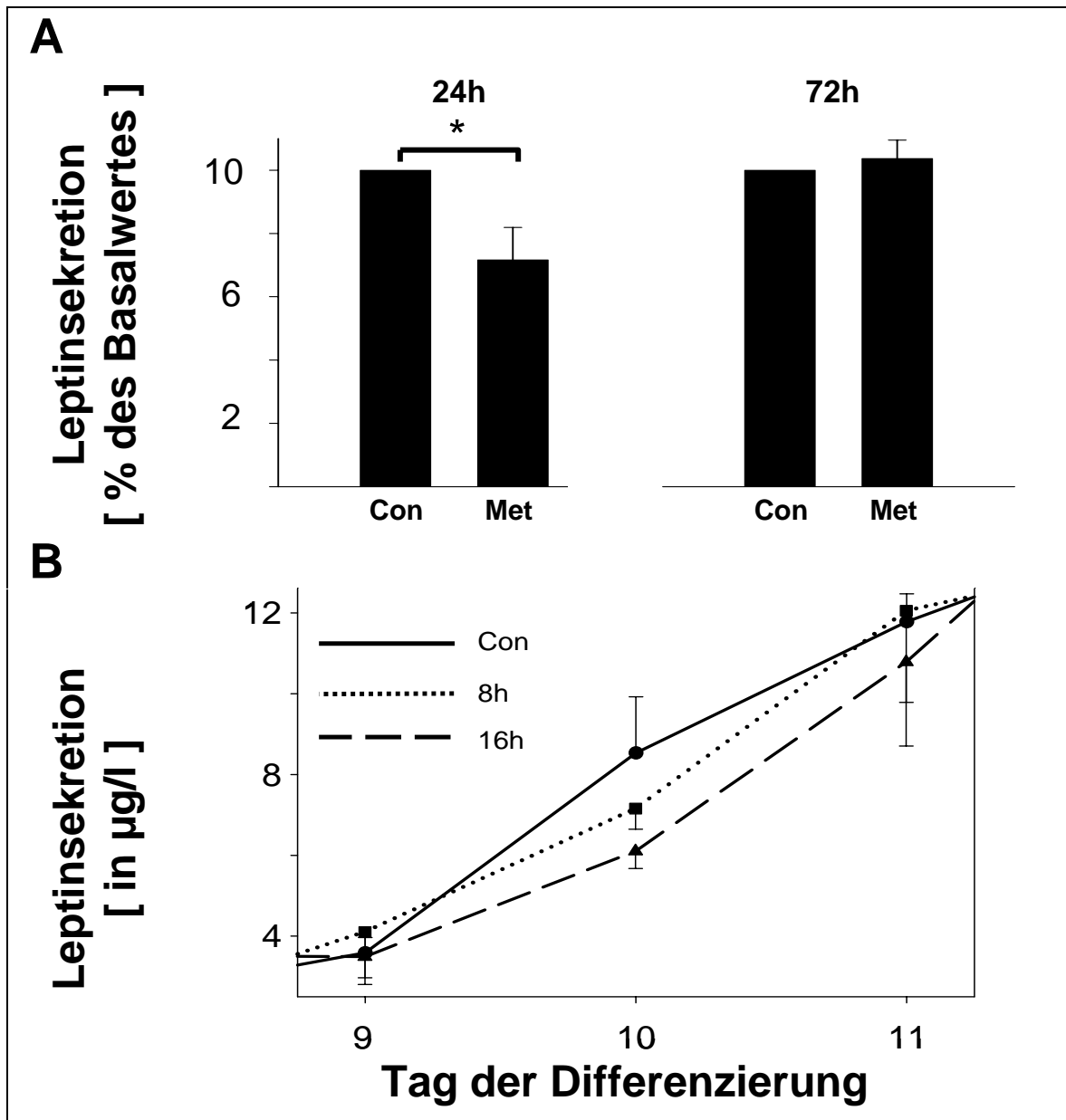


Abb. 4 Die Metforminwirkung setzt subakut ein und ist reversibel.

Am Tag acht ihres Differenzierungskurses wurden Adipozyten für 8, 16 (**B**) bzw. 24 Stunden (h) (**A**) mit Metformin (Met, 1 mM) inkubiert. Das Medium wurde im weiteren Verlauf der Differenzierung alle 24 Stunden (h) gewonnen. In der Graphik **A**, links, ist die Leptinsekretion in den ersten 24 Stunden (h) nach Beendigung der Metforminbehandlung (Met), in der Graphik **A**, rechts, im Zeitraum 48 bis 72 Stunden (h) nach Beendigung der Metforminbehandlung jeweils im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Con) dargestellt. Graphik **B** zeigt diesen Zusammenhang mittels eines Liniengraphen für die Inkubationszeiten von 8 und 16 Stunden (Met, 1 mM) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Con). * Der einfache Asteriskus kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrolle.

Stunden (1 mM Metformin) mit Beginn des achten Tages der Zellkultur getestet. Gewonnen wurde das Medium in der Folge alle 24 Stunden bis zum Ende des zehnten Tages des Differenzierungskurses. Eine 24-stündige Metforminbehandlung führte zu einer signifikanten 30 %igen Reduktion der Leptinsekretion während der folgenden 24 Stunden (Siehe Abb. 4 A, linker Graph). Dieser Effekt zeigte sich 72 Stunden nach Beendigung der Metforminbehandlung als vollständig reversibel (Siehe Abb. 4 A, rechter Graph). Zusätzlich wiesen Inkubationszeiten zwischen acht und 16 Stunden einen zeitlichen Trend in Richtung einer Inhibition der Leptinsekretion auf (Siehe Abb. 4 B). Kürzere Inkubationszeiten resultierten in keiner messbaren Beeinflussung der Leptinsekretion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (nicht dargestellt).

3.2 DIE METFORMIN-VERMITTELTE HEMMUNG DER LEPTINSEKRETION IST DIFFERENZIERUNGSUNABHÄNGIG

3.2.1 Chronische Metforminbehandlung beeinträchtigt nicht die intrazelluläre Lipidakkumulation

Die Leptinsekretion der Adipozyten nimmt mit fortschreitender Differenzierung der Fettzellen zu. Somit wäre eine potentielle Erklärung für den hemmenden Einfluss von Metformin auf die endokrine Funktion der Adipozyten ein Metformin-vermitteltes Differenzierungsdefizit. Um diese Frage zu klären, wurden chronisch mit Metformin behandelte Adipozyten im Vergleich zu unbehandelten Fettzellen am Tag vier, sieben, zehn und dreizehn ihres Differenzierungskurses auf ein potentielles Differenzierungsdefizit untersucht. Auf drei unterschiedliche Weisen wurde die Differenzierung untersucht: Erstens wurde versucht mit einer fettspezifischen *Oil Red O*-Färbung makroskopisch ein Differenzierungsdefizit nachzuweisen. Zweitens wurde mit Hilfe von Immunblotverfahren die Proteinexpression früher und später Differenzierungsmarker wie *peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)*, *CCAAT enhancer-binding protein alpha (C/EBP α)* und *uncoupling Protein-1 (UCP-1)* in unbehandelten Adipozyten mit behandelten Fettzellen verglichen. Drittens wurden die Zellen während des gesamten Differenzierungskurses mikroskopisch auf ein Differenzierungsdefizit untersucht. Mit der fettspezifischen *Oil Red O*-Färbung konnte von Tag vier bis Tag dreizehn der Differenzierung zu keinem Zeitpunkt ein durch Metformin verursachtes Differenzierungsdefizit nachgewiesen werden (Abb. 5, A). Die untersuchten Differenzierungsmarker *PPAR γ* , *C/EBP α* und *UCP-1* wurden wäh-

rend des untersuchten Zeitraumes im Vergleich zu Kontrollzelllinien in gleicher Menge nachgewiesen (Abb. 5, B). Mikroskopisch zeigte sich ebenfalls zu keinem Zeitpunkt eine veränderte Zellmorphologie unter Metforminbehandlung (Daten nicht gezeigt).

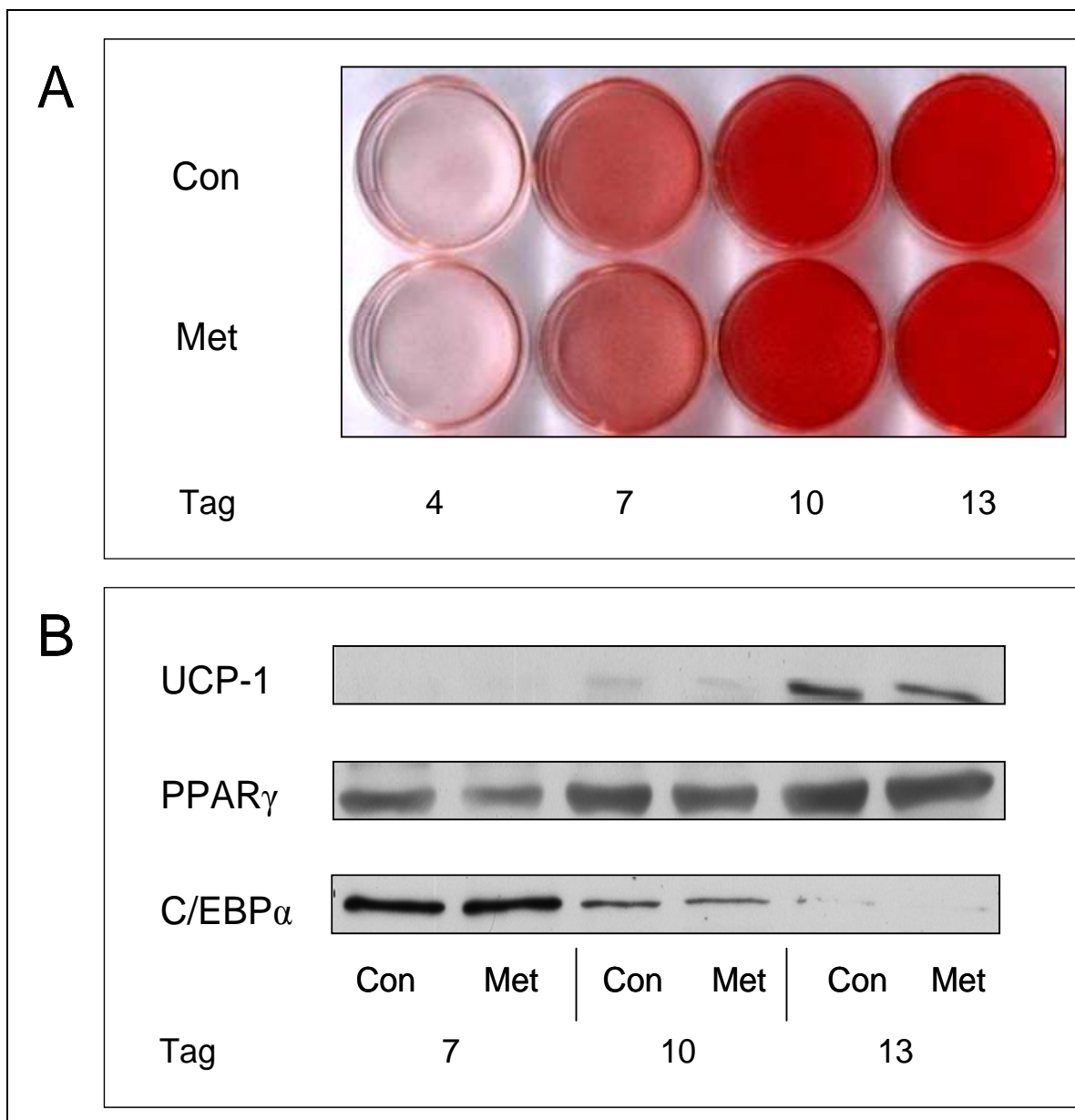
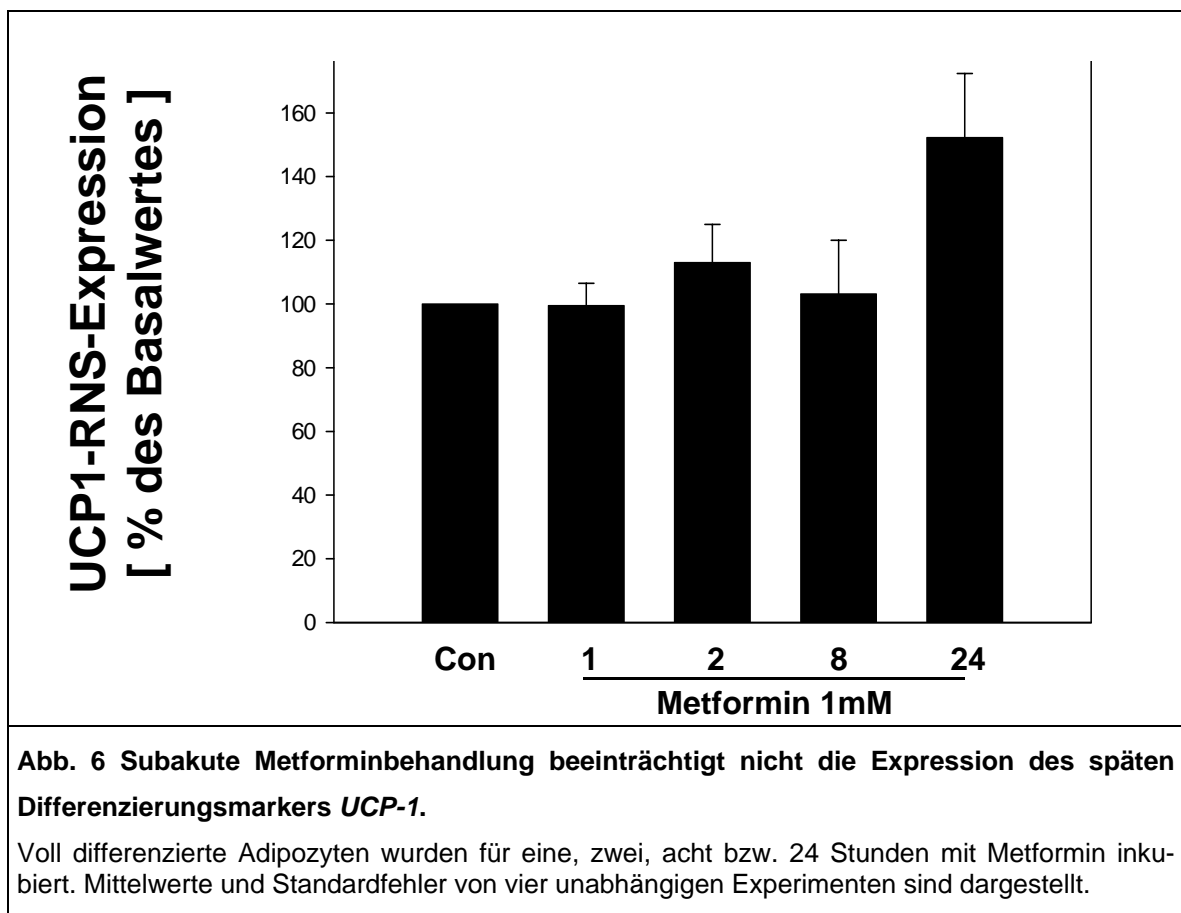


Abb. 5 Metformin hat keinen Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung.

Chronisch mit Metformin (Met, 1 mM) behandelte und unbehandelte (Con) Adipozyten wurden mit dem fettspezifischen *Oil Red O* gefärbt (**A**). Die Proteinexpression von Differenzierungsmarkern wurde am Tag vier, sieben, zehn und dreizehn untersucht (**B**). Repräsentative Färbungen und Westernblots von zumindest zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

3.2.2 Subakute Metforminbehandlung beeinträchtigt nicht die Boten-RNS-Expression des späten Differenzierungsmarkers *UCP-1*

Die Expression von *UCP-1* als spätem Differenzierungsmarker wurde auch unter subakuter Metforminexposition untersucht. Adulte Adipozyten wurden zwischen einer und 24 Stunden mit Metformin in einer Konzentration von 1 mM behandelt. Die Analyse mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR ergab keine signifikante Hemmung der *UCP-1*-Expression bei behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, sondern allenfalls im Gegenteil einen Trend zu vermehrter Expression nach 24 Stunden (Abb. 6).



3.3 DIE METFORMIN-VERMITTELTE HEMMUNG DER LEPTIN-SEKRETION ERFOLGT UNABHÄNGIG VON WIRKUNGEN AUF DEN INTRAZELLULÄREN GLUKOSEHAUSHALT

3.3.1 Metformin hemmt die Glukoseaufnahme

Der intrazelluläre Glukosemetabolismus wird als möglicher regulierender Faktor für die Leptinexpression diskutiert. Zunächst wurde daher dem Einfluss von Metformin auf die

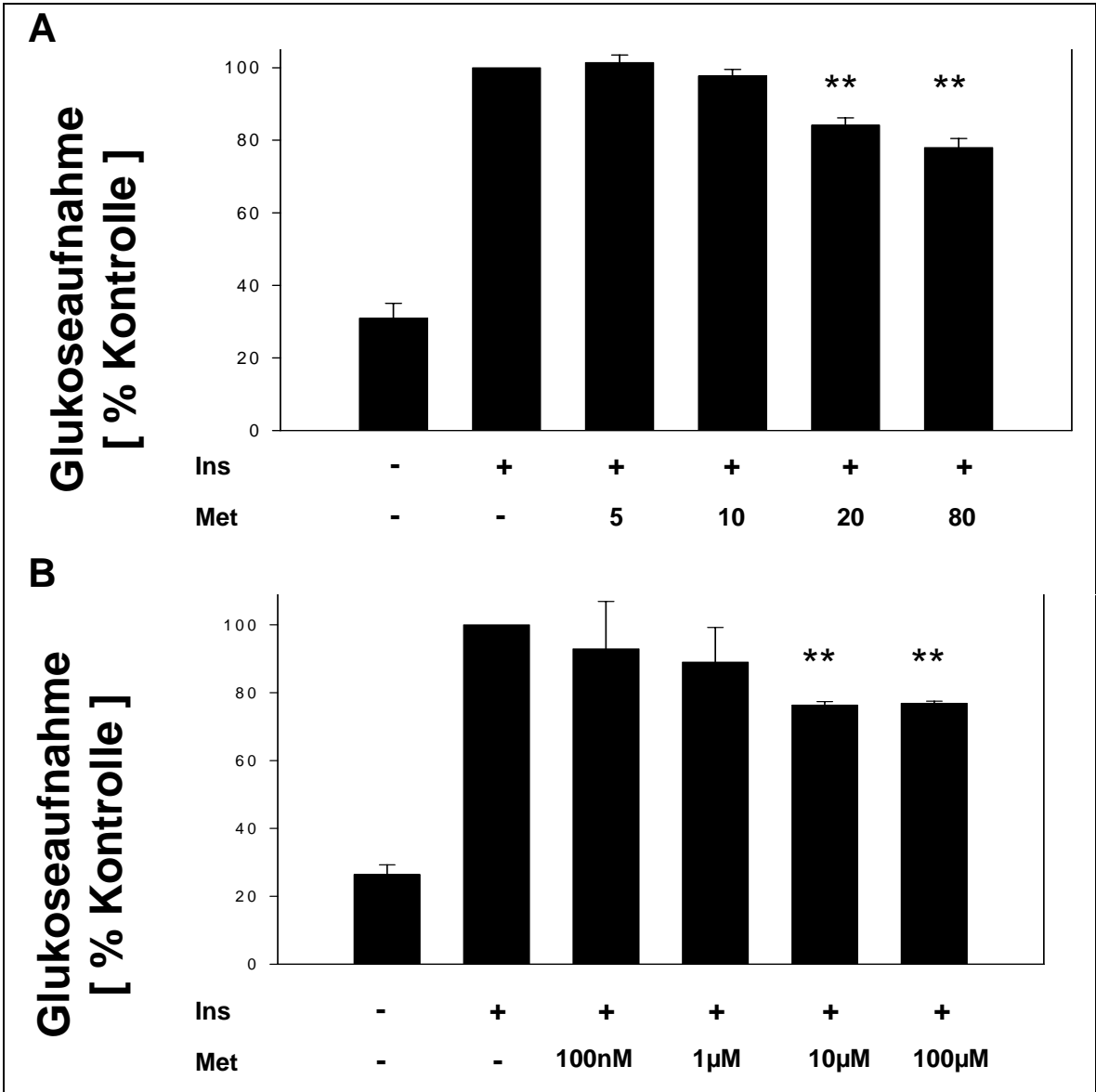


Abb. 7 Metformin hemmt die Insulin-induzierte zelluläre Glukoseaufnahme.

A) Adipozyten wurden für fünf, zehn, 20 bzw. 80 Minuten vor Insulinstimulation (Ins; 100 nM; 30 Minuten) mit Metformin (Met, 1 mM) inkubiert. **B)** Adipozyten wurden vor Insulinstimulation (Ins; 100 nM; 30 Minuten) für 80 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin inkubiert. Die Glukoseaufnahme ist in Prozent des Insulineffektes dargestellt. Mittelwert und Standardfehler von zwei bis vier unabhängigen Experimenten. * Der einfache Asteriskus kennzeichnet signifikante, der ** doppelte Asteriskus hoch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Insulinsensitivität nachgegangen. In Vorversuchen zeigte sich, dass Adipozyten nach 30-minütiger Insulininkubation (100 nM) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzelllinien mit einem vier- bis fünffachen Anstieg der Glukoseaufnahme reagieren. Einem potentiellen Einfluss von Metforminbehandlung auf die insulinvermittelte Glukoseaufnahme wurde

folgendermaßen nachgegangen: In einer ersten Versuchsreihe wurden Adipozyten zwischen fünf und 80 Minuten mit einer Metforminkonzentration von 1 mM vorinkubiert. Es zeigte sich ab einer Stimulationszeit von 20 Minuten eine Reduktion der insulinvermittelten Glukoseaufnahme um circa 20 %. (Siehe Abb. 7, A). In einem Folgeversuch wurde Dosisabhängigkeit dieses Hemmeffektes untersucht. Es wurden Konzentrationen zwischen 100 nM und 10 mM bei einer konstanten Inkubationszeit von 80 Minuten eingesetzt. Es zeigte sich eine Reduktion der Insulin-induzierten Glukoseaufnahme ab einer Konzentration von 10 μ M auf 80 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Eine stärkere Reduktion als um 20 % konnte aber auch für höhere Konzentrationen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 7, B).

3.3.2 Metformin und intrazellulärer Glukosemetabolismus

Die anaerobe Glykolyse ist in Abhängigkeit von unterschiedlichen Metforminkonzentrationen als regulatives Element zur Steuerung der Leptinexpression beschrieben worden

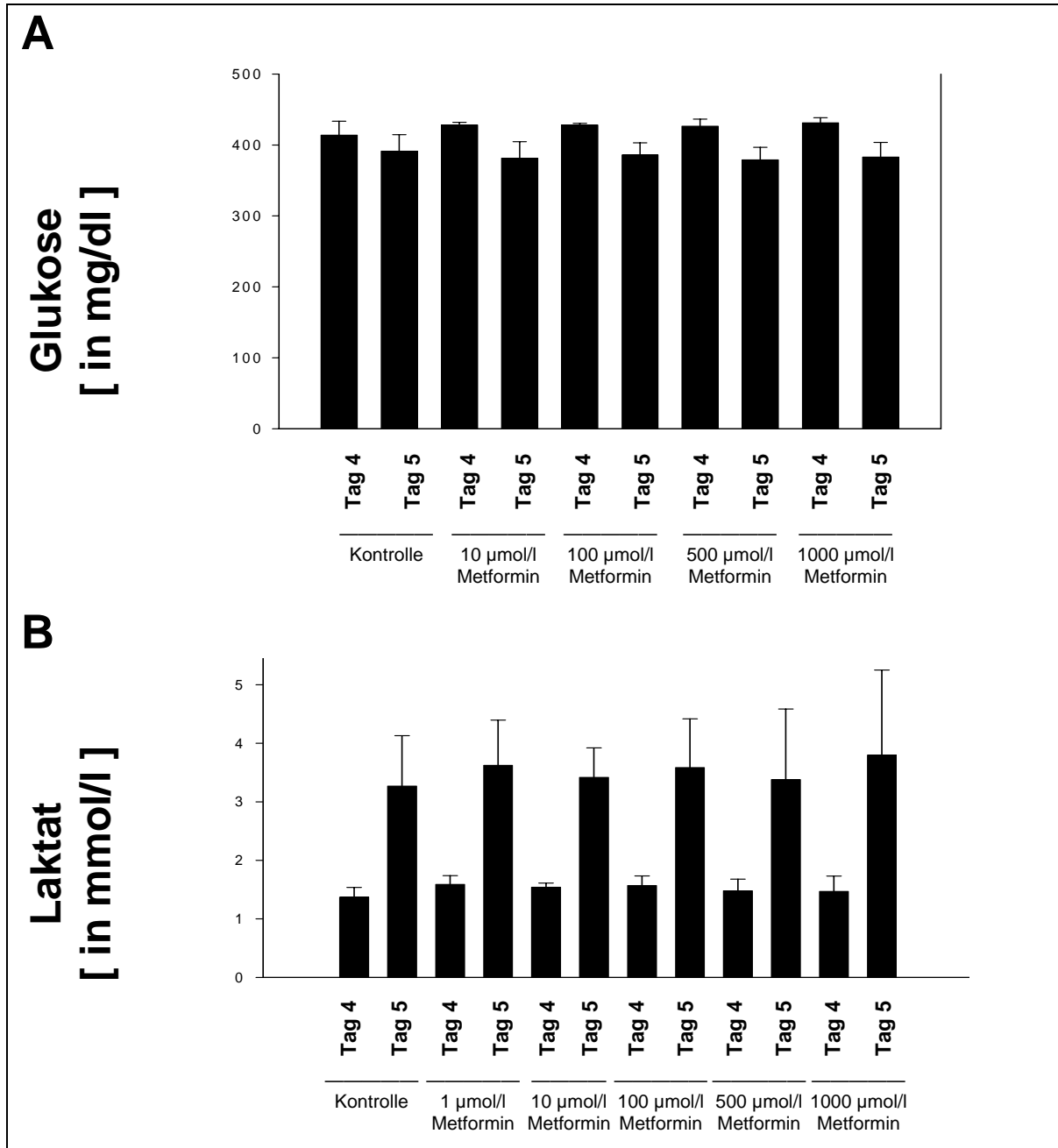


Abb. 8 A und B. Metforminbehandlung führt nicht zu einer Beeinflussung des intrazellulären Glukosehaushaltes und auch zu keiner Akkumulation von Laktat.

Die Glukosekonzentration (A) in mg/dl bzw. die Laktatkonzentration (B) in mmol/l des Zellkulturmediums wurde an Tag vier und Tag fünf des Differenzierungskurses bei angegebenen Metforminkonzentrationen gemessen. Die Grafiken zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten.

den (Mueller *et al.* 1998; Mueller *et al.* 2000). Daher wurden die Glukose- und Laktatkonzentrationen im Medium zwischen Tag vier und fünf des Differenzierungskurses unter dem Einfluss von Metforminkonzentrationen zwischen einem 1 μ M und einem 1 mM gemessen und mit unbehandelten Kontrollzelllinien verglichen. Metforminbehandlung übte keinen signifikanten Einfluss auf den Glukoseverbrauch aus (Abb. 8 A). Trotz regelmäßig höherer Laktatkonzentration am Tag fünf des Differenzierungskurses im Vergleich zu Tag vier zeigten sich bei unterschiedlichen Metforminkonzentrationen jeweils dieselben Laktatkonzentrationen (Abb. 8 B).

3.4 METFORMIN AKTIVIERT DIFFERENZIELL INTRAZELLULÄRE SIGNALWEGE

Die subakuten, dosisabhängigen und voll reversiblen Wirkungen von Metformin auf die Leptinsekretion legten die Beteiligung intrazellulärer Signalwege an der Vermittlung dieses Effektes nahe. In weiteren Experimenten wurden daher wichtige intrazelluläre Signalwege auf ihre Aktivierung oder Suppression durch Metformin untersucht. Es wurden Schlüsselmoleküle der Wachstumsfaktor-, Stressfaktor- und Zytokin-Signaltransduktion studiert. Nach Metforminstimulation erfolgte mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper die Analyse von p44/p42 *MAP*-Kinase, Akt, p38 *MAP*-Kinase und *signal transducer and activator of transcription (STAT)* 3.

3.4.1 Wachstumsfaktor-Signalwege: Metformin stimuliert die p44/p42 *MAP*-Kinase

Voll differenzierte braune Adipozyten zeigten nach Stimulation mit Metformin eine akute Aktivierung der p44/p42 *mitogen activated protein (MAP)*-Kinase. Der Anstieg der p44/p42 *MAP*-Kinase-Phosphorylierung durch Behandlung mit Metformin zeigte eine zeit- und dosisabhängige Charakteristik. Die Stimulation war nach fünf Minuten bei einer Konzentration von 1mM maximal (Abb. 9 A) und erreichte, verglichen mit dem Basalwert, einen 3,5-fachen Anstieg. Eine erste fast zweifache Stimulation war bereits bei einer Metforminkonzentration von 100 nM zu detektieren (Abb. 9 B).

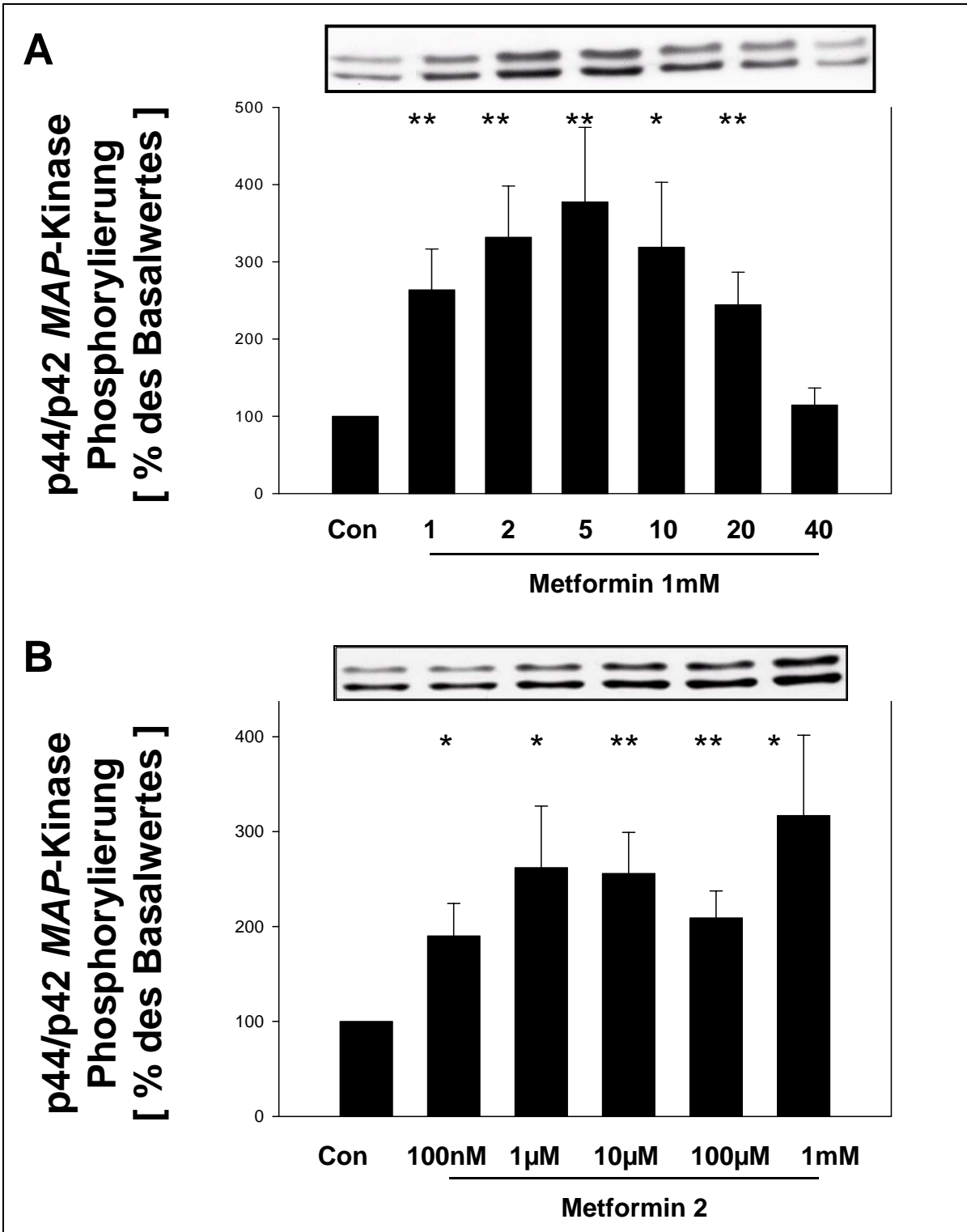


Abb. 9. Metformin aktiviert die p44/p42 MAP-Kinase.

Differenzierte Adipozyten wurden für eine, zwei, fünf, zehn, 20 und 40 Minuten mit 1 mM Metformin (A) bzw. mit 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM Metformin für zwei Minuten (B) inkubiert. Dargestellt sind ein repräsentativer Westernblot und Mittelwerte und Standardfehler von mindestens sechs unabhängigen Experimenten. * Der einfache Asteriskus kennzeichnet signifikante, der ** doppelte Asteriskus hoch signifikante Unterschiede, jeweils die angegebene Bedingung mit unbehandelten Zellen vergleichend.

3.4.2 Stresskinase-, Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase-abhängige und JAK/STAT-Signalwege: Metformin beeinträchtigt nicht p38 MAP-Kinase, Akt und STAT3

Metforminbehandlung führte weder zu einer Aktivierung der p38 MAP-Kinase noch zu einer Beeinflussung der Serin-/Threonin-Kinase Akt oder von *signal transducer and activator of transcription (STAT)3* (Abb. 10).

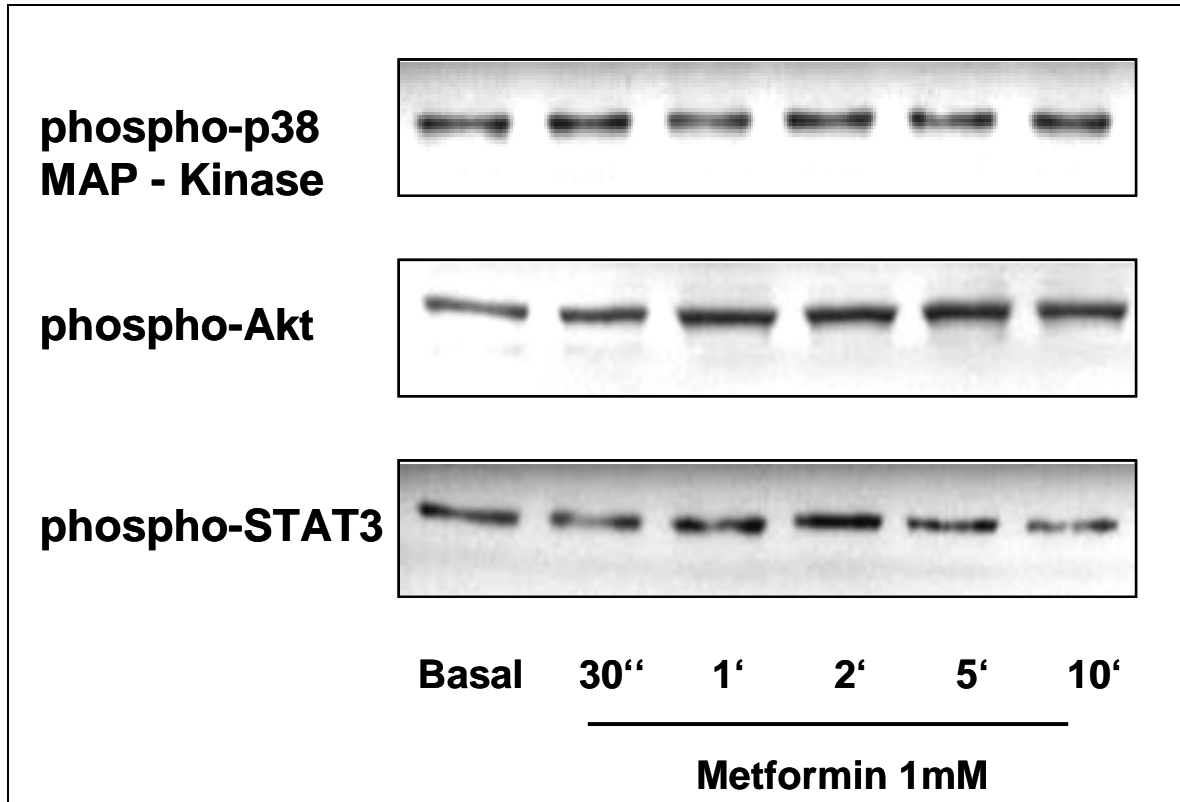


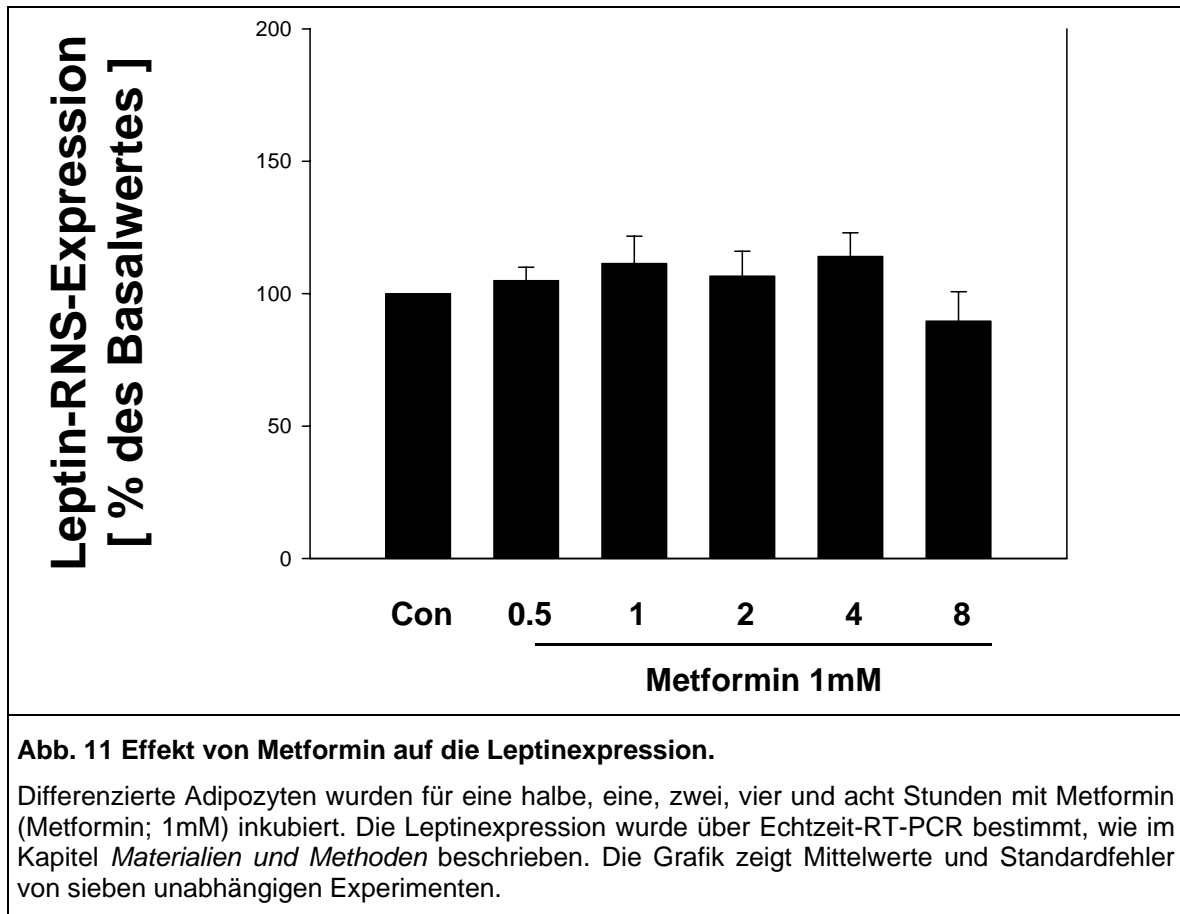
Abb. 10 Metforminwirkung auf andere adipozytäre Signalwege.

Differenzierte Adipozyten wurden für eine halbe, eine, zwei, fünf und zehn Minuten mit Metformin inkubiert. Die Aktivierung der angegebenen Signalmoleküle wurde mit phosphospezifischen Antikörpern gemessen wie in *Materialien und Methoden* beschrieben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot von mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

3.4.3 Metformin beeinträchtigt nicht die Genexpression von Leptin

Die Metforminhemmung der Leptinsekretion kann über eine Veränderung der Transkription des Leptingens oder posttranskriptionell z. B. über eine Einwirkung auf Translations- oder Sekretionsmechanismen erfolgen. Tatsächlich sind präformierte Leptinvesikel vorbeschrieben worden (Rose *et al.* 2002; Bates *et al.* 2003). In Kenntnis der Metformin-Stimulation des Signalmoleküls p44/42 MAP-Kinase, das die Gentranskription reguliert, wurden Genexpressionsanalysen des Adipokins Leptin durchgeführt. Vollständig differenzierte Adipozyten wurden für Zeiten zwischen einer halben und acht Stunden mit Metformin inkubiert. Anschließend wurde eine Expressionsanalyse der Leptin-Boten-RNS mit

Hilfe der Echtzeit-RT-PCR durchgeführt, wie in *Material und Methoden* beschrieben. Metforminbehandlung induzierte keine signifikante Veränderung der Leptinexpression (siehe Abb. 11).



3.4.4 Hemmung des p44/p42 MAP-Kinase-Signalweges verhindert die Metformin-vermittelte Inhibition der Leptinsekretion

Die reversible Inhibition der Leptinsekretion zusammen mit der akuten Aktivierung der p44/p42 MAP-Kinase durch Metforminstimulation legte eine Beteiligung dieses wichtigen Signaltransduktionsmoleküls bei der Steuerung der Leptinsekretion nahe. In einer neuen Versuchsreihe wurde der Einfluss einer Inhibition der p44/p42 MAP-Kinase durch den pharmakologischen Inhibitor PD98059 auf die Metformin-induzierte Beeinträchtigung der Leptinsekretion untersucht. 24 Stunden nach Beendigung der Metforminbehandlung kam es wiederum zu einem signifikanten 30 %igen Abfall der Leptinsekretion. Wurden die Zellen jedoch eine Stunde mit PD98059 vorstimuliert, so verhinderte die Inhibition der p44/p42 MAP-Kinase diesen negativen Metformineffekt (Siehe Abb. 12). Eine Behandlung

mit dem pharmakologischen Inhibitor allein zeigt keine Änderung der Leptinsekretion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Siehe Abb. 12).

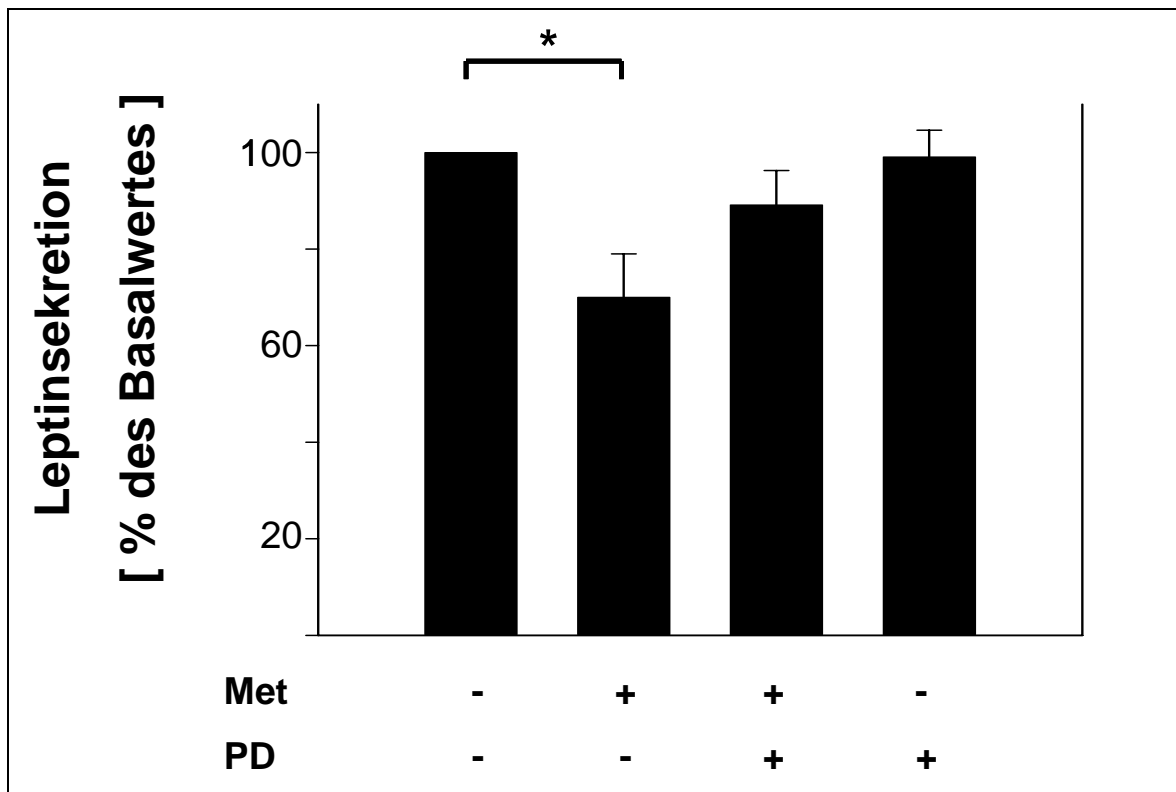


Abb. 12 Vorinkubation mit dem MEK 1/2-Inhibitor PD98059 verhindert die Metformin-vermittelte Inhibition der Leptinsekretion.

Am Tag acht ihres Differenzierungskurses wurden Adipozyten für 24 Stunden mit Metformin (Met, 1 mM) mit und ohne Vorinkubation durch den MEK 1/2-Inhibitor PD98059 (PD, 50 μ M) inkubiert. Das Medium wurde 24 Stunden später gewonnen und die Leptinsekretion wie im Kapitel *Materialien und Methoden* dargestellt bestimmt. Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardfehler von fünf unterabhängigen Experimenten. * Der einfache Asteriskus kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrolle.

4 DISKUSSION

Adipositas und Insulinresistenz sind die Kernkomponenten des metabolischen Syndroms (Riccardi *et al.* 2004). Die endokrine Fettgewebefunktion hat sich als kritisch für die Ausbildung dieser Störungen und der damit verbundenen kardiovaskulären Komplikationen erwiesen. Das orale Antidiabetikum Metformin, Medikament der ersten Wahl bei Patienten mit Metabolischem Syndrom, wirkt auch auf das Fettgewebe. Eine Beeinflussung der metabolischen und endokrinen Fettzellfunktionen und die daran potentiell beteiligten Mechanismen waren bisher unzureichend untersucht. Die Kenntnis solcher Mechanismen hat aber, wie zunehmend deutlich wird, weit reichende biologische und potentiell therapeutische Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Metforminwirkung auf die Fettzellfunktion am Beispiel der Leptinsekretion zu untersuchen. Verwendet wurde ein von PD Dr. med. J. Klein erstelltes und eingehend charakterisiertes Fettzellmodell (Klein *et al.* 2002; Ott *et al.* 2004). Adipozyten dieses Modells zeigen sich hochgradig insulinsensitiv und besitzen die Fähigkeit zur Thermogenese. Ferner sind diese Adipozyten endokrin aktiv. Insbesondere findet sich, für die vorliegende Studie relevant, eine starke Leptinsekretion (Kraus *et al.* 2002). Meine Arbeit charakterisiert erstmals direkte Effekte des anorexigenen Biguanids Metformin auf die endokrine Funktion. Sie weist eine dosisabhängige, subakute und reversible Inhibition der Leptinsekretion durch Metformin nach, die nicht von der Zelldifferenzierung oder dem intrazellulären Glukosehaushalt abhängig ist. Vielmehr legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die Metformin-induzierte direkte Hemmung der Leptinsekretion über eine Aktivierung der p44/p42 MAP-Kinase vermittelt wird. Im Folgenden werde ich dementsprechend zunächst die Metformineffekte auf die Leptinsekretion (siehe Abschnitt 4.1) und anschließend die für sie potentiell ursächlichen Mechanismen wie Einflüsse auf die Zelldifferenzierung (siehe Abschnitt 4.2), den intrazellulären Glukosestoffwechsel (siehe Abschnitt 4.3) und die Signaltransduktion (siehe Abschnitt 4.4) diskutieren.

4.1 METFORMIN UND LEPTINSEKRETION

Leptinsekretion

Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist in Rattenadipozyten *in vitro* eine Inhibition der Leptinsekretion durch Metformin, allerdings erst ab einer Konzentration von 1

mM, beschrieben worden (Mueller *et al.* 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen eine molekulare Grundlage für die Erklärung einer Reihe klinischer Beobachtungen dar. So wurde in mehreren humanen Studien *in vivo* eine Verminderung der Leptinspiegel unter Metforminbehandlung sowohl in normalgewichtigen als auch in adipösen Individuen beschrieben (Freemark und Burse 2001; Glueck *et al.* 2001; Ozata *et al.* 2001; Fruehwald-Schultes *et al.* 2002; Komori *et al.* 2004). Auch bei einer Patientin mit lipoatrophem Diabetes führte Metforminbehandlung zu einem Absinken der Leptinspiegel (Iglesias *et al.* 2004). Dies ist bemerkenswert, da diese Erkrankung ohnehin mit reduzierten Leptinserumspiegeln einhergeht. In keiner bisher veröffentlichten Studie wurde von einem Ansteigen der Leptinspiegel berichtet. In weiteren Studien wurde jedoch kein Effekt beobachtet (Guler *et al.* 2000; Mannucci *et al.* 2001; Uehara *et al.* 2001; Ciaraldi *et al.* 2002; Sivitz *et al.* 2003). Erklärungen für die unterschiedlichen Studienbefunde stehen derzeit aus, am ehesten kommen Unterschiede in der Dauer der Metforminbehandlung und in der Zusammensetzung der Studienpopulationen in Betracht. Analog zu anderen Metforminwirkungen erscheint es plausibel anzunehmen, dass die Hemmung der Leptinsekretion *in vivo* auch abhängig ist von Dauer und Ausmaß der Komorbidität, insbesondere im Hinblick auf Diabetes und Adipositas. Die Metforminwirkungen auf die Glukosehomöostase sind weiterhin von den erreichten Serumspiegeln abhängig (Lee und Kwon 2004). Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die vorliegende Arbeit Effekte auf die endokrine Fettgewebefunktion mit Metforminkonzentrationen nachweist, welche den klinisch eingesetzten entsprechen (Mughal *et al.* 2000).

Leptinexpression

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen überraschend eine Dissoziation von Leptinsekretion und –expression unter Metforminbehandlung. Während die Leptinsekretion vermindert wird, bleibt die Genexpression unverändert. Insgesamt sind die transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulationsmechanismen der Leptinexpression bzw. –sekretion nur unzureichend verstanden. Es gibt eine Reihe bekannter positiver und negativer Regulatoren der Leptinbiosynthese und Leptinsekretion. Zu den stimulierenden Effektoren gehören Insulin, Glukokortikoide, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , Prolaktin, A1-Adenosin-Rezeptoragonisten und Östrogene (Mohamed-Ali *et al.* 1998; Casanueva und Dieguez 1999; Gualillo *et al.* 1999; Rice *et al.* 2000), zu den negativen Katecholamine, Androgene, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-Agonisten und *peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)*-Agonisten (Mohamed-Ali *et al.* 1998; Casanueva und

Dieguez 1999). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass Fettgewebe bezüglich seiner Leptinbiosynthese bzw. -sekretion je nach seiner Lokalisation unterschiedlich auf genannte Mediatoren reagiert. Beispielsweise reagiert subkutanes Fett eher auf Insulinreize, während viszerale Adipozyten eher auf Glukokortikoide reagieren (Casanueva und Dieguez 1999). Systematische Studien fokussierten bisher auf Insulin und Glukokortikoide, um deren Einfluss auf die Leptinhomeostase zu untersuchen. Mit seltenen Ausnahmen zeigten Glukokortikoide sowohl in humanen (De Vos *et al.* 1995; Larsson und Ahren 1996; Papaspyrou-Rao *et al.* 1997) als auch in Zellkulturstudien (Halleux *et al.* 1998; Bradley und Cheatham 1999) einen stimulierenden Einfluss auf das Leptingen. Insulin stimuliert dagegen hauptsächlich die Sekretion (Saladin *et al.* 1995; Bradley und Cheatham 1999). In primären Rattenadipozyten führte die Inkubation mit Insulin zu einem zweifachen Anstieg der Leptinsekretion, jedoch zu keiner Veränderung der RNS-Level (Bradley und Cheatham 1999). Diese Daten führten zu der Hypothese, dass Insulin zu einer Exozytose von kleinen, präformierten intrazellulären leptinhaltigen Vesikeln führt. Dieser Sekretionsapparat wurde in Rattenadipocyten von Roh *et al.* identifiziert (Roh *et al.* 2000) und weiter charakterisiert (Roh *et al.* 2001). Brefeldin A, ein Stressor des endoplasmatischen Retikulums, inhibiert sowohl die basale als auch die insulinstimulierte Leptinsekretion und führt zu einer Akkumulation von Leptin in Kompartimenten des endoplasmatischen Retikulums (Bradley *et al.* 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu adipozytären Metforminwirkungen sprechen wie im Fall von Insulin für eine akute und subakute Regulation von Leptin auf posttranskriptioneller Ebene.

Physiologie

Über die biologische Bedeutung einer Hemmung der Leptinsekretion unter Metformintherapie bei Diabetes und Adipositas können derzeit nur Mutmaßungen angestellt werden. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten legen nahe, dass es sich dabei nicht um einen sekundären Begleiteffekt der Metforminwirkung *in vivo* nach möglichem Gewichtsverlust mit Fettgewebsverminderung handelt. Vielmehr belegen die hier präsentierten Daten im Sinne eines „*proof of principle*“, dass Metformin direkt in vollständig differenzierten Adipozyten eine Abnahme der Leptinsekretion bewirkt. Interessanterweise zeigen auch andere in der Therapie von Diabetes und Adipositas eingesetzte oder in klinischer Erprobung befindliche Substanzen wie Thiazolidindione (Fasshauer und Paschke 2003) und *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) (Ott *et al.* 2004) einen direkt hemmenden Einfluß auf die Leptinsekretion.

Es mag spekuliert werden, dass dieser Effekt über eine Resensitivierung von Leptinsignalwegen *in vivo* dazu beiträgt, die Leptin- und Insulinresistenz zu vermindern.

4.2 METFORMIN UND FETTZELLDIFFERENZIERUNG

Der Umfang der Fettdepots korreliert bei Mensch (Considine *et al.* 1996; Havel *et al.* 1996) und Tier (Maffei *et al.* 1995; Ahren *et al.* 1997) mit dem Leptinspiegel. Je ausgeprägter die Fettgewebssmasse ist, desto höher ist die Konzentration des zirkulierenden Leptins. Die Leptinsekretion nimmt mit fortschreitender Differenzierung der Fettzellen zu (Kraus *et al.* 2002). Ein toxischer Einfluss auf die kultivierten Adipozyten oder ein hemmender Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung wäre somit eine plausible Erklärung für die Modulation der endokrinen Funktion durch Metformin. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die Metformin-vermittelten Effekte auf die Leptinsekretion unabhängig von Veränderungen der Differenzierung sind, und belegen dies auf dreierlei Weise:

Die Expression früher und später Differenzierungsmarker auf Protein- und RNS-Ebene bleibt unter chronischer und akuter Metforminbehandlung unverändert, und die Fettakkumulation sowie die mikroskopische Morphologie werden durch Metformin nicht beeinträchtigt. Zusätzlich gestützt durch die Reversibilität der Effekte und durch den Nachweis selektiv aktivierter intrazellulärer Signalwege, schließen diese Ergebnisse einen toxischen Zellschaden durch Metforminexposition als Erklärung für die Hemmwirkung auf die Leptinsekretion nahezu aus. In diesem Zusammenhang ist weiterhin zu bedenken, dass in der vorliegenden Studie Effekte bei sehr niedrigen Metformin-Konzentrationen beobachtet wurden, die den physiologischen Wirkkonzentrationen entsprechen. Die vorliegende Arbeit befasst sich als erste in der bisher veröffentlichten Literatur eingehend mit Metformineffekten auf die Fettzellendifferenzierung und –morphologie.

In diesem Zusammenhang sei auf braunes Fettgewebe und die Regulation des thermogenetischen *UCP-1*, eines späten Markers der Zelldifferenzierung brauner Adipozyten, eingegangen: Die physiologische Bedeutung von braunem Fett beim erwachsenen Menschen ist unklar. Braune Fettzellen liegen beim Erwachsenen zwischen weißen Fettzellen eingestreut. Sie sind durch physiologische und pharmakologische Stimuli zu Proliferation und Thermogenese aktivierbar (Lowell und Flier 1997; Lowell und Bachman 2003). Eine Transdifferenzierung von weißen in braune Fettzellen ist ebenso induzierbar, eine eindeutige morphologische und funktionelle Trennung zwischen weißem und braunem Fettgewebe in frühen Differenzierungsphasen erscheint immer schwieriger (Klaus 2004), und alle

Funktionen weißer Adipozyten einschließlich der Hormonsekretion sind auch bei braunen Fettzellen zu finden (Klein *et al.* 2002; Kraus *et al.* 2002; Ott *et al.* 2002; Ott *et al.* 2004; Kraus *et al.* 2005). Eine für differenziertes braunes Fettgewebe bisher als spezifisch angenommene Genexpression erscheint für die Aufrechterhaltung von Insulinsensitivität und ausgeglichener Energiehomöostase beim Erwachsenen bedeutsam zu sein (Yang *et al.* 2003). Für die Fragestellungen zu Effekten des den Energiehaushalt beeinflussenden Antidiabetikums Metformin erscheint daher ein Modell brauner Adipozyten attraktiv. In den hier vorgestellten Experimenten zeigt sich weder auf Protein- noch auf RNS-Ebene eine Veränderung von *UCP-1*-Mengen unter Metforminbehandlung. Dies steht im Einklang mit den wenigen in der Literatur publizierten Studien zur *UCP-1*-Regulation durch Metformin (Keates und Bailey 1993; Rouru *et al.* 1993; Papaspyrou-Rao *et al.* 1997; Savontaus *et al.* 1998). Der in einigen Studien gefundene negative Effekt von Metformin auf die Energiebilanz wird also sehr wahrscheinlich nicht durch die Stimulation der Thermogenese im braunen Fett vermittelt. Ein Schlüsselmolekül für Thermogenese und Fettsäureoxidation, die AMP-aktivierte Proteinkinase, wird jedoch interessanterweise durch Metformin aktiviert und könnte Wirkungen dieses Antidiabetikums auf den Energiehaushalt vermitteln (Ruderman *et al.* 2003).

4.3 METFORMIN UND GLUKOSEHAUSHALT

Glukoseaufnahme und -metabolismus sind nach klinischen Beobachtungen potentiell wesentliche Faktoren der Leptinregulation. In der vorliegenden Arbeit werden direkt hemmende Effekte von Metformin auf die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme, jedoch ein unveränderter intrazellulärer Glukosemetabolismus nachgewiesen.

Eine Hemmung der adipozytären Glukoseaufnahme durch ein antidiabetisch wirksames Medikament mag paradox erscheinen. Direkte gewebsspezifische Effekte müssen jedoch nicht gleichgerichtet mit physiologischen Effekten sein. In diesem Zusammenhang seien Beobachtungen bei Mäusen mit einer fettspezifischen Deletion des Insulinrezeptors angeführt. Diese Tiere sind vor altersbedingter Glukoseintoleranz und Übergewicht geschützt und haben eine gesteigerte Lebenserwartung (Bluher *et al.* 2002; Bluher *et al.* 2003). Es erscheint verlockend, hier eine Analogie zu fettspezifischen Metforminwirkungen zu sehen. Die Zusammenhänge zwischen gewebsspezifischer Regulation und systemischen pathophysiologischen Veränderungen sind generell jedoch komplex und kaum vorhersagbar. Im Mausmodell zeigen sich z. B. bei fettgewebsspezifischer Veränderung der Insulin-

signaltransduktion auf verschiedenen Ebenen der Signalkette gegensätzliche Effekte mit einerseits Induktion von und andererseits Schutz vor einer gestörten Glukosehomöostase (Minokoshi *et al.* 2003). In Humanstudien konnte eine Veränderung des Glukosetransportes nach chronischer Metforminbehandlung über drei Monate für subkutane Adipozyten nicht nachgewiesen werden (Ciaraldi *et al.* 2002). Akute Veränderungen *in* oder *ex vivo*, die mit einer Modulation der endokrinen Fettzellfunktion einhergehen, sind unseres Wissens nicht untersucht.

Humanstudien konnten einen Zusammenhang zwischen Nahrungszufuhr und Leptinspiegeln im Blut beweisen. So sinken die Leptinspiegel während Hungerperioden und Verminderung der Nahrungszufuhr (Boden *et al.* 1996; Dubuc *et al.* 1998). Im Umkehrschluss steigen diese nach Nahrungszufuhr (Kolaczynski *et al.* 1996; Kolaczynski *et al.* 1996). Eine nahe liegende Hypothese für diesen Zusammenhang ist, dass Insulin- und Glukosespiegel die Leptinsekretion der Adipozyten mitregulieren. Intravenöse Gabe von Glukose unter Nahrungskarenz verhindert ein Absinken der Leptinspiegel im Blut (Boden *et al.* 1996). Auch eine orale Kohlenhydratzufuhr läßt die Leptinspiegel ansteigen (Havel *et al.* 1999). Weiterhin führt die Gabe von Insulin nach vier bis sechs Stunden zu erhöhten Leptinspiegeln (Saad *et al.* 1998). Auch *in vitro* wurde für humane und murine Adipozyten nachgewiesen, dass Insulin zu einer Steigerung der Leptinsekretion führt (Leroy *et al.* 1996; Wabitsch *et al.* 1996). Dieser Effekt könnte entweder über eine direkte Stimulation der Insulinsignalwege oder indirekt über Insulineffekte auf den Glukosemetabolismus vermittelt sein. Wird die Glukoseaufnahme in die Zelle blockiert, oder wird die Glykolyse inhibiert, so sinkt die Leptinexpression und -sekretion in kultivierten Rattenadipozyten (Mueller *et al.* 1998). Eine genauere Untersuchung dieses Sachverhaltes kam zu dem Schluss, dass nicht die Glukoseaufnahme *per se* entscheidend für die Regulation der Leptinsekretion ist, sondern primär der Stoffwechselstatus der Zelle. Postuliert wurde, dass innerhalb des Glukosemetabolismus das regulative Element zur Steuerung des Leptingens die anaerobe Glykolyse ist (Mueller *et al.* 1998) und dass unterschiedliche Metforminkonzentrationen zu differentiellen Wirkungen auf anaerobe Glykolyse führen könnten. Diesen Zusammenhang können die hier vorgelegten Daten nicht bestätigen. Über einen weiten Konzentrationsbereich zeigte sich keine direkte Veränderung von Glukose und Lactat-Spiegeln durch Metforminbehandlung. Auch dieses Ergebnis steht daher im Einklang mit der aus den vorliegenden Arbeiten abgeleiteten Vorstellung, dass Metformin über direkte und selektive Aktivierung von Signalwegen die endokrine Fettzellfunktion reguliert.

4.4 METFORMIN UND INTRAZELLULÄRE SIGNALWEGE

Die Charakterisierung des Metformineffektes in der hier präsentierten Arbeit erbrachte, dass der inhibierende Einfluss von Metformin auf die Leptinsekretion dosisabhängig, schon bei subakuten Inkubationszeiten nachweisbar und vollständig reversibel ist. Dies legt nahe, einen zellulären Signalweg zu postulieren, über den Metformin Einfluss auf die endokrinen Fettgewebsphysiologie nimmt.

Metformin stimuliert die p44/p42 *MAP*-Kinase direkt. Der Effekt ist zeit- und dosisabhängig. Nach unserem Kenntnisstand ist dies der erste Bericht, der eine Aktivierung dieses für die Gentranskription wichtigen Signalmoleküls nachweist. Abgesehen von diesem Befund wurde eine direkte Metforminstimulation bisher für die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und für die p38 *MAP*-Kinase nachgewiesen. Zhou *et al.* haben eine Aktivierung der AMPK durch chronische Metforminbehandlung in Hepatozyten von Ratten beschrieben (Zhou *et al.* 2001). Im Skelettmuskel wurde eine Aktivierung der p38 *MAP*-Kinase durch Metformininkubation gezeigt (Kumar und Dey 2002). Interessanterweise zeigen sich in der vorliegenden Studie andere Signalmoleküle wie die p38 *MAP*-Kinase sowie die Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase und der Januskinase (JAK) / *signal transducer and activator of transcription (STAT)*-Signalweg unverändert durch Metforminbehandlung. Diese Unterschiede könnten auf gewebe- bzw. zellspezifische Effekte hindeuten. Die selektive Aktivierung von Signalmolekülen durch Metformin kann als Hinweis auf einen rezeptorvermittelten Effekt interpretiert werden. Bislang ist ein solcher Rezeptor jedoch in keinem Gewebe identifiziert worden. Vielmehr könnte die lipophile Substanz Metformin ihre Effekte auch über eine Beeinflussung der zellulären Membranstrukturen vermitteln (Meuillet *et al.* 1999). Die Veränderungen der Leptinsekretion sind in der vorliegenden Arbeit bereits innerhalb der ersten 24 Stunden der Metforminbehandlung zu beobachten. Es liegt daher nahe, einen Zusammenhang mit der Aktivierung der p44/p42 *MAP*-Kinase anzunehmen. In der Tat zeigt sich, dass eine Inhibition der p44/p42 *MAP*-Kinase die Reduktion der Leptinsekretion durch Metformin verhindern kann. Damit weist diese Arbeit erstmals einen selektiv aktivierten Signalmechanismus nach, der für eine direkte Modulation der endokrinen Fettzellfunktion durch das Antidiabetikum Metformin bedeutsam ist.

4.5 GEWONNENE ERKENNTNISSE UND AUSBLICK

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Erkenntnisse zu den am Ausgangspunkt der Arbeit ungeklärten Fragen gewonnen:

1. **Beeinflusst Metformin die Leptinsekretion?**

Metformin hemmt direkt und reversibel die Leptinsekretion der Fettzelle.

2. **Sind diese Wirkungen abhängig vom Differenzierungsgrad der Adipozyten?**

Fettzelldifferenzierung und -morphologie bleiben durch Metforminbehandlung unbeeinträchtigt und erklären diesen Hemmeffekt nicht.

3. **Sind diese Wirkungen abhängig vom intrazellulären Glukosestoffwechsel?**

Metformin hemmt die insulininduzierte Glukoseaufnahme, eine Veränderung der anaeroben Glykolyse in der Fettzelle zeigt sich jedoch nicht.

4. **Welche intrazellulären Signaltransduktionswege vermitteln die Metformin-Wirkungen?**

Eine akute und selektive Aktivierung des p44/p42 *MAP*-Kinase-Signalweges durch Metformin ist für den inhibitorischen, am ehesten posttranskriptionell vermittelten Effekt auf die Leptinsekretion bedeutsam. Stresskinase-, PI3-Kinase- und *JAK/STAT*-Signalwege bleiben unverändert.

Das Fettgewebe wird zunehmend als ein entscheidender Regulator der Energiehomöostase erkannt. Über seine Sensitivität gegenüber Insulin und sympatho-adrenergen Stimuli einerseits und die Sekretion von Hormonen andererseits kommuniziert es mit dem zentralen Nervensystem und peripheren Organen. Diese endokrine Funktion trägt zur Regulation vieler physiologischer Regelkreise bei, ihre Modulation ist eng in die Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms und seiner kardiovaskulären Komplikationen verwoben. Umgekehrt kann diese Vernetzung auch therapeutisch genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wird eine direkte Beeinflussung der endokrinen Fettzellfunktion durch das Antidiabetikum Metformin anhand des prototypischen Fettzellhormons Leptin molekular und funktionell eingehend charakterisiert.

Neue Fragen werden durch die gewonnenen Ergebnisse aufgeworfen: Wie wird die Aktivierung des p44/p42 *MAP*-Kinase-Signalweges vermittelt? Erlaubt ein solcher Mechanismus eventuell Rückschlüsse auf den noch immer unzureichend verstandenen generellen Wirkmechanismus von Metformin und ermöglicht die Entwicklung therapeutisch wirksa-

mer neuer Substanzen? Ist die selektive Modulation der endokrinen Fettzellfunktion beim metabolischen Syndrom eine aussichtsreiche therapeutische Strategie?

Der Beantwortung dieser Fragen an der Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und Klinik darf angesichts der immensen Bedeutung von Insulinresistenz und Adipositas für die moderne Welt hohe Relevanz vorausgesagt werden.

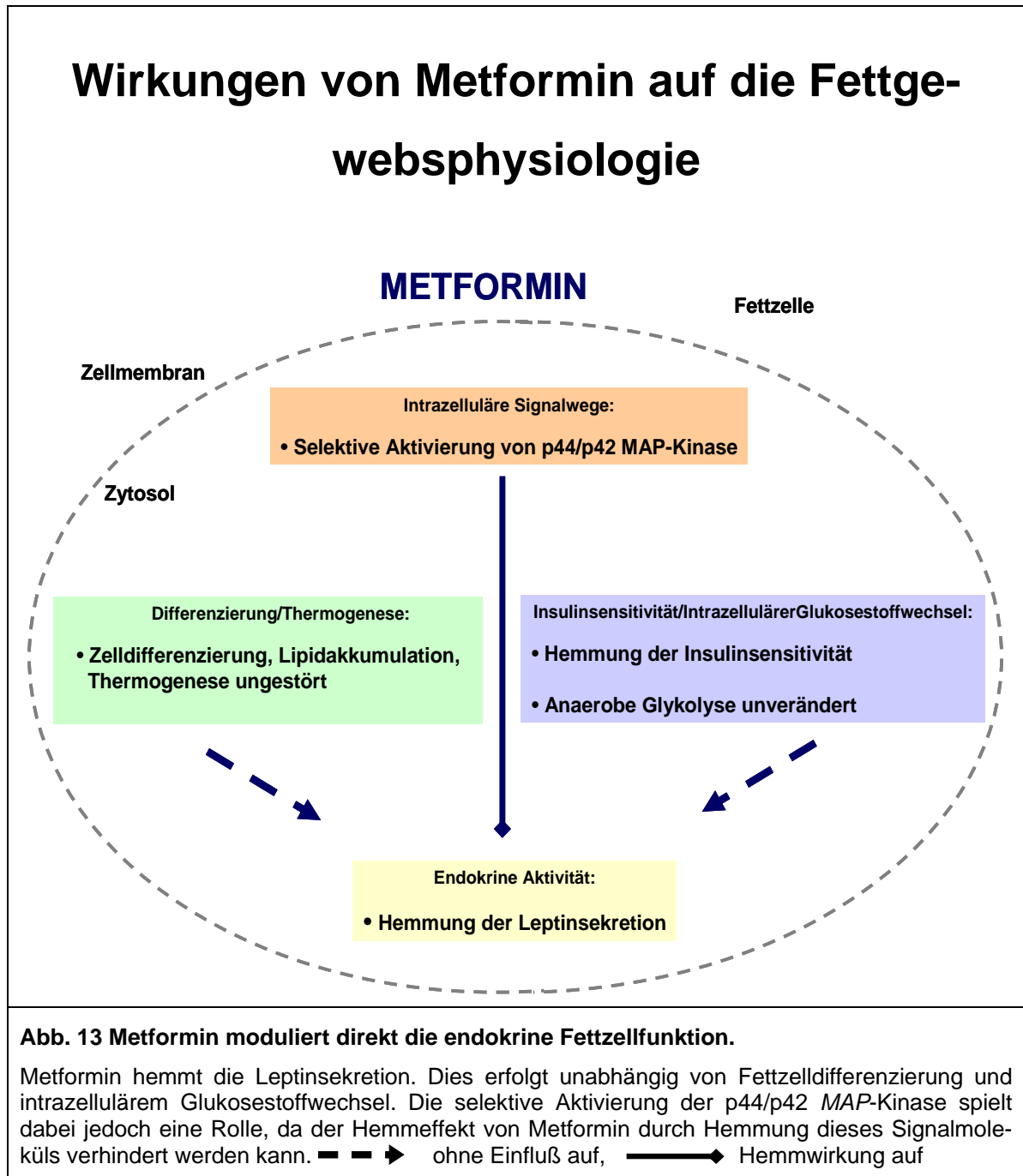


Abb. 13 Metformin moduliert direkt die endokrine Fettzellfunktion.

Metformin hemmt die Leptinsekretion. Dies erfolgt unabhängig von Fettzelldifferenzierung und intrazellulärem Glukosestoffwechsel. Die selektive Aktivierung der p44/p42 MAP-Kinase spielt dabei jedoch eine Rolle, da der Hemmeffekt von Metformin durch Hemmung dieses Signalmoleküls verhindert werden kann. - - - - -> ohne Einfluß auf, ———> Hemmwirkung auf

5 ZUSAMMENFASSUNG

Insulinresistenz und Adipositas stellen Kernkomponenten des metabolischen Syndroms dar, welches durch seine kardiovaskulären Komplikationen für einen Großteil der Morbidität und Mortalität in modernen Industriegesellschaften verantwortlich ist. An der Regulation dieser Kernkomponenten haben Fettgewebefunktionen entscheidenden Anteil. Neben Energiespeicherung und –abgabe in Form von Lipidakkumulation und Lipolyse bzw. Thermogenese zeichnet sich das Fettgewebe durch die Sekretion von Hormonen aus. Metformin ist ein seit Jahren in der Therapie des Diabetes und des metabolischen Syndroms etabliertes Medikament. Im Gegensatz zu anderen oralen Antidiabetika begünstigt es nicht die Gewichtszunahme. Seine genauen Wirkmechanismen, insbesondere im Fettgewebe, sind jedoch bis heute nur unzureichend verstanden. In der vorliegenden Arbeit wird daher der direkte Einfluss von Metformin auf die Fettgewebsphysiologie anhand der Regulation des prototypischen, eine negative Energiebilanz induzierenden Fettzellhormons Leptin untersucht. Mit Hilfe eines sensitiven Zellmodells muriner brauner Adipozyten wird gezeigt, dass Metforminbehandlung direkt eine Hemmung der Leptinsekretion erzeugt. Diese Inhibition zeigt sich bereits nach einer Inkubationszeit von einigen Stunden, hält über mehrere Tage an und ist vollständig reversibel. Der negative Metformin-Effekt auf die Leptinsekretion wird nicht verursacht durch eine Beeinträchtigung der Fettzellendifferenzierung, wie morphologische Untersuchungen, die Analyse der Lipidakkumulation sowie die Bestimmung früher und später Differenzierungsmarker belegen. Die Expression des thermogenetisch wirksamen späten Differenzierungsmarkers *UCP-1* bleibt dabei ebenso unverändert. Wie die vorliegenden Ergebnisse weiterhin zeigen, spielt für diesen Effekt auch eine Veränderung des intrazellulären Glukosehaushalts keine Rolle, da Metformin zwar direkt die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme vermindert, aber den anaeroben Glukosemetabolismus nicht beeinträchtigt. Dagegen belegt die vorgestellte Arbeit erstmals, dass Metformin akut und selektiv den p44/p42 *MAP*-Kinase-Signalweg stimuliert. Dieser Effekt ist zeit- und dosisabhängig, jedoch nicht assoziiert mit einer Veränderung der Leptin-Genexpression. Schließlich decken die hier präsentierten Untersuchungen auf, dass die Metformin-induzierte Hemmung der Leptinsekretion durch Inhibition der p44/p42 *MAP*-Kinase aufgehoben wird.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eine direkte Modulation der endokrinen Fettzellfunktion durch Metformin. Sie deckt eine posttranskriptionelle Hemmung der Leptinsekretion auf, die unabhängig von Fettzellendifferenzierung und Glukosestoffwechsel akut über intrazelluläre Signalmoleküle vermittelt wird. Dieser Mechanismus stellt eine molekulare Grundlage für klinische Beobachtungen unter Metforminbehandlung dar und erweitert das Verständnis der Wirkmechanismen dieses oralen Antidiabetikums, das als bisher einziges seiner Klasse eine negative Energiebilanz begünstigt. Eine weitere Erforschung des hier aufgezeigten Mechanismus könnte zur Entwicklung neuer Strategien in der Therapie von Insulinresistenz und Adipositas beitragen.

6 GLOSSAR

Akt: Serin-/Threonin-Protein-Kinase (auch Protein-Kinase B genannt); eines der wichtigen Signalmoleküle im über die Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase vermittelten Signalweg. Es ist bedeutsam für Zellregulation von Glukoseaufnahme, Glykogen- und Proteinstoffwechsel sowie von apoptotischen Prozessen.

AMPK: Adenosin 5'-monophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase; Proteinkinase mit weit reichender regulativer Funktion des zellulären Stoffwechsels; sie wird als Sensor des Energiezustandes der Zelle angesehen. In der Leber aktiviert sie Schlüsselmoleküle der Ketogenese, der Cholesterinsynthese, der Lipogenese und der Triglyceridsynthese. In Fettzellen reguliert sie die Lipolyse und in Muskelzellen die Fettsäureoxidation.

Glut4: Glukose-Transport-Molekül, das nach Insulin-Stimulation zur Zellmembran wandert und den Glukosetransport verstärkt. Es wird im Herzmuskel-, im quergestreiften Muskel- und im Fettgewebe exprimiert. Es hat entscheidenden Anteil an der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase.

IRS: Insulin-Rezeptor-Substrate; Gruppe zytoplasmatischer Proteine, die über eine Tyrosinkinase-Aktivität des Insulinrezeptors phosphoryliert werden und die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege vermitteln; sie sind zentrale Moleküle in der Regulation funktioneller Antworten auf Insulin-Stimulation.

MAP-Kinase: *mitogen activated protein kinase*; Familie von Serin-Threonin-Kinasen, die durch Insulin und viele andere Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Sie besitzen zentrale Bedeutung in der Regulation anderer Proteinkinasen und einer Reihe von Transkriptionsfaktoren. Die von der *MAP*-Kinase ausgehende Signalkaskade nimmt Einfluss auch Wachstum und Differenzierung.

PI 3-Kinase: Phosphatidylinositol-3-Kinase; Enzym, von dem mehrere Isoformen bekannt sind. Es wird durch Bindung an IRS-Moleküle aktiviert. Durch Bildung von Phospholipiden steht es im Zentrum der Vermittlung vielfältiger zellulärer biologischer Antworten.

STAT: *signal transducers and activators of transcription*; Familie von Signalmolekülen, die nach Phosphorylierung durch aktivierte Januskinasen (JAK) dimerisieren und in den Zellkern wandern. Dort wirken sie direkt auf die Regulation der Gentranskription ein. *STATs* modulieren eine Reihe biologischer Funktionen des Gesamtorganismus, u.a. nehmen sie Einfluss auf die Inflammation, die Apoptose und das Zellüberleben. Interessanterweise sind *STAT3 knock-out*-Mäuse übergewichtig und haben eine diabetische Stoffwechsellege. Leptin aktiviert den JAK/*STAT*-Signalweg.

UCP-1: *uncoupling protein-1*; Protein der inneren Mitochondrienmembran. Es transportiert anionische Fettsäuren an die äußere Seite der inneren Membran, wo sie protoniert werden und als neutrale Moleküle an die innere Seite zurückkehren können. Dadurch wird der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran abgebaut, ohne als treibende Kraft für die ATP-Produktion fungieren zu können. Stattdessen wird in diesem exothermischen Prozess Wärme frei. Das seit langem bekannte *UCP-1* wird im Gegensatz zu in den letzten Jahren entdeckten weiteren Homologen nur in braunem Fett exprimiert.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abel, E. D., O. Peroni, J. K. Kim, Y. B. Kim, O. Boss, E. Hadro, T. Minnemann, G. I. Shulman, B. B. Kahn:** Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409: 729-733 (2001).
- Ahren, B., S. Mansson, R. L. Gingerich, P. J. Havel:** Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol* 273: R113-120 (1997).
- Bailey, C. J., R. C. Turner:** Metformin. *N Engl J Med* 334: 574-579 (1996).
- Bates, S. H., W. H. Stearns, T. A. Dundon, M. Schubert, A. W. Tso, Y. Wang, A. S. Banks, H. J. Lavery, A. K. Haq, E. Maratos-Flier, B. G. Neel, M. W. Schwartz, M. G. Myers, Jr.:** STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421: 856-859 (2003).
- Bluher, M., B. B. Kahn, C. R. Kahn:** Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299: 572-574 (2003).
- Bluher, M., M. D. Michael, O. D. Peroni, K. Ueki, N. Carter, B. B. Kahn, C. R. Kahn:** Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3: 25-38 (2002).
- Boden, G., X. Chen, M. Mozzoli, I. Ryan:** Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3419-3423 (1996).
- Bradley, R. L., B. Cheatham:** Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* 48: 272-278 (1999).
- Bradley, R. L., K. A. Cleveland, B. Cheatham:** The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. *Recent Prog Horm Res* 56: 329-358 (2001).
- Cannon, B., J. Nedergaard:** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359 (2004).
- Casanueva, F. F., C. Dieguez:** Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 20: 317-363 (1999).
- Ciaraldi, T. P., A. P. Kong, N. V. Chu, D. D. Kim, S. Baxi, M. Loviscach, R. Plodkowski, R. Reitz, M. Caulfield, S. Mudaliar, R. R. Henry:** Regulation of glucose

transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51: 30-36 (2002).

Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295 (1996).

De Vos, P., R. Saladin, J. Auwerx, B. Staels: Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 270: 15958-15961 (1995).

DeFronzo, R. A., N. Barzilai, D. C. Simonson: Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1294-1301 (1991).

DeFronzo, R. A., E. Ferrannini: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14: 173-194 (1991).

DeFronzo, R. A., A. M. Goodman: Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med* 333: 541-549 (1995).

Digby, J. E., C. T. Montague, C. P. Sewter, L. Sanders, W. O. Wilkison, S. O'Rahilly, J. B. Prins: Thiazolidinedione exposure increases the expression of uncoupling protein 1 in cultured human preadipocytes. *Diabetes* 47: 138-141 (1998).

Dubuc, G. R., S. D. Phinney, J. S. Stern, P. J. Havel: Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism* 47: 429-434 (1998).

Fasshauer, M., R. Paschke: Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46: 1594-1603 (2003).

Fogelholm, M., R. Valve, K. Kukkonen-Harjula, A. Nenonen, V. Hakkarainen, M. Laakso, M. Uusitupa: 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).

Freemark, M., D. Bursey: The effects of metformin on body mass index and glucose tolerance in obese adolescents with fasting hyperinsulinemia and a family history of type 2 diabetes. *Pediatrics* 107: E55 (2001).

- Friedman, J. M., J. L. Halaas:** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770 (1998).
- Fruehwald-Schultes, B., K. M. Oltmanns, B. Toschek, S. Sopke, W. Kern, J. Born, H. L. Fehm, A. Peters:** Short-term treatment with metformin decreases serum leptin concentration without affecting body weight and body fat content in normal-weight healthy men. *Metabolism* 51: 531-536 (2002).
- Fujimoto, W. Y.:** Background and recruitment data for the U.S. Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 23 Suppl 2: B11-13 (2000).
- Fulgencio, J. P., C. Kohl, J. Girard, J. P. Pegorier:** Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 62: 439-446 (2001).
- Fumeron, F., I. Durack-Bown, D. Betoulle, A. M. Cassard-Doulcier, S. Tuzet, F. Bouillaud, J. C. Melchior, D. Ricquier, M. Apfelbaum:** 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).
- Garcia de Herreros, A., M. J. Birnbaum:** The regulation by insulin of glucose transporter gene expression in 3T3 adipocytes. *J Biol Chem* 264: 9885-9890 (1989).
- Glueck, C. J., R. N. Fontaine, P. Wang, M. T. Subbiah, K. Weber, E. Illig, P. Streicher, L. Sieve-Smith, T. M. Tracy, J. E. Lang, P. McCullough:** Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. *Metabolism* 50: 856-861 (2001).
- Gualillo, O., F. Lago, M. Garcia, C. Menendez, R. Senaris, F. F. Casanueva, C. Dieguez:** Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 140: 5149-5153 (1999).
- Guerra, C., P. Navarro, A. M. Valverde, M. Arribas, J. Bruning, L. P. Kozak, C. R. Kahn, M. Benito:** Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108: 1205-1213 (2001).
- Guler, S., B. Cakir, B. Demirbas, G. GURSOY, R. Serter, Y. Aral:** Leptin concentrations are related to glycaemic control, but do not change with short-term oral antidiabetic therapy in female patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2: 313-316 (2000).

- Halleux, C. M., I. Servais, B. A. Reul, R. Detry, S. M. Brichard:** Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 902-910 (1998).
- Hauer, H.:** Insulin resistance and the metabolic syndrome-a challenge of the new millennium. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 1: S25-29 (2002).
- Havel, P. J., S. Kasim-Karakas, W. Mueller, P. R. Johnson, R. L. Gingerich, J. S. Stern:** Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4406-4413 (1996).
- Havel, P. J., R. Townsend, L. Chaump, K. Teff:** High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes* 48: 334-341 (1999).
- Huttunen, P., J. Hirvonen, V. Kinnula:** The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 46: 339-345 (1981).
- Iglesias, P., P. Alvarez Fidalgo, R. Codoceo, J. J. Diez:** Lipoatrophic diabetes in an elderly woman: clinical course and serum adipocytokine concentrations. *Endocr J* 51: 279-286 (2004).
- Keates, A. C., C. J. Bailey:** Metformin does not increase energy expenditure of brown fat. *Biochem Pharmacol* 45: 971-973 (1993).
- Kershaw, E. E., J. S. Flier:** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556 (2004).
- Klaus, S.:** Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets* 5: 241-250 (2004).
- Klein, J., M. Fasshauer, H. H. Klein, M. Benito, C. R. Kahn:** Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays* 24: 382-388 (2002).
- Klip, A., T. Ramlal, P. J. Bilan, G. D. Cartee, E. A. Gulve, J. O. Holloszy:** Recruitment of GLUT-4 glucose transporters by insulin in diabetic rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 728-736 (1990).
- Kolaczynski, J. W., R. V. Considine, J. Ohannesian, C. Marco, I. Opentanova, M. R. Nyce, M. Myint, J. F. Caro:** Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45: 1511-1515 (1996).

- Kolaczynski, J. W., M. R. Nyce, R. V. Considine, G. Boden, J. J. Nolan, R. Henry, S. R. Mudaliar, J. Olefsky, J. F. Caro:** Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45: 699-701 (1996).
- Komori, T., F. Yoshida, J. Nakamura, S. Miyazaki, H. Miura, A. Iguchi:** Metformin ameliorates treatment of obese type 2 diabetic patients with mental retardation; its effects on eating behavior and serum leptin levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112: 422-428 (2004).
- Kraus, D., M. Fasshauer, V. Ott, B. Meier, M. Jost, H. H. Klein, J. Klein:** Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes. *J Endocrinol* 175: 185-191 (2002).
- Kraus, D., J. Jager, B. Meier, M. Fasshauer, J. Klein:** Aldosterone inhibits uncoupling protein-1, induces insulin resistance, and stimulates proinflammatory adipokines in adipocytes. *Horm Metab Res* 37: 455-459 (2005).
- Kuczmarski, R. J., K. M. Flegal, S. M. Campbell, C. L. Johnson:** Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *Jama* 272: 205-211 (1994).
- Kumar, N., C. S. Dey:** Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br J Pharmacol* 137: 329-336 (2002).
- Laakso, M.:** Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 937-942 (1999).
- Larsson, H., B. Ahren:** Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4428-4432 (1996).
- Lean, M. E., W. P. James, G. Jennings, P. Trayhurn:** Brown adipose tissue in patients with pheochromocytoma. *Int J Obes* 10: 219-227 (1986).
- Leclerc, I., W. W. Woltersdorf, G. da Silva Xavier, R. L. Rowe, S. E. Cross, G. S. Korbitt, R. V. Rajotte, R. Smith, G. A. Rutter:** Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E1023-1031 (2004).

- Lee, A., J. E. Morley:** Metformin decreases food consumption and induces weight loss in subjects with obesity with type II non-insulin-dependent diabetes. *Obes Res* 6: 47-53 (1998).
- Lee, S. H., K. I. Kwon:** Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling for the relationship between glucose-lowering effect and plasma concentration of metformin in volunteers. *Arch Pharm Res* 27: 806-810 (2004).
- Leroy, P., S. Dessolin, P. Villageois, B. C. Moon, J. M. Friedman, G. Ailhaud, C. Dani:** Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* 271: 2365-2368 (1996).
- Leslie, P., R. T. Jung, T. E. Isles, J. Baty:** Energy expenditure in non-insulin dependent diabetic subjects on metformin or sulphonylurea therapy. *Clin Sci (Lond)* 73: 41-45 (1987).
- Lowell, B. B., E. S. Bachman:** Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* 278: 29385-29388 (2003).
- Lowell, B. B., J. S. Flier:** Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med* 48: 307-316 (1997).
- Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan:** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161 (1995).
- Makimattila, S., K. Nikkila, H. Yki-Jarvinen:** Causes of weight gain during insulin therapy with and without metformin in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 406-412 (1999).
- Mannucci, E., A. Ognibene, F. Cremasco, G. Bardini, A. Mencucci, E. Pierazzuoli, S. Ciani, G. Messeri, C. M. Rotella:** Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 24: 489-494 (2001).
- Matthaei, S., A. Hamann, H. H. Klein, H. Benecke, G. Kreymann, J. S. Flier, H. Greten:** Association of Metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. *Diabetes* 40: 850-857 (1991).

- Matthaei, S., J. P. Reibold, A. Hamann, H. Benecke, H. U. Haring, H. Greten, H. H. Klein:** In vivo metformin treatment ameliorates insulin resistance: evidence for potentiation of insulin-induced translocation and increased functional activity of glucose transporters in obese (fa/fa) Zucker rat adipocytes. *Endocrinology* 133: 304-311 (1993).
- Matthaei, S., M. Stumvoll, M. Kellerer, H. U. Haring:** Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 21: 585-618 (2000).
- Meillet, E. J., N. Wiernsperger, B. Mania-Farnell, P. Hubert, G. Cremel:** Metformin modulates insulin receptor signaling in normal and cholesterol-treated human hepatoma cells (HepG2). *Eur J Pharmacol* 377: 241-252 (1999).
- Minokoshi, Y., C. R. Kahn, B. B. Kahn:** Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem* 278: 33609-33612 (2003).
- Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney, S. W. Coppack:** Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 1145-1158 (1998).
- Mueller, W. M., F. M. Gregoire, K. L. Stanhope, C. V. Mobbs, T. M. Mizuno, C. H. Warden, J. S. Stern, P. J. Havel:** Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 139: 551-558 (1998).
- Mueller, W. M., K. L. Stanhope, F. Gregoire, J. L. Evans, P. J. Havel:** Effects of metformin and vanadium on leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Obes Res* 8: 530-539 (2000).
- Mughal, M. A., M. Jan, W. M. Maheri, M. Y. Memon, M. Ali:** The effect of metformin on glycemic control, serum lipids and lipoproteins in diet alone and sulfonylurea-treated type 2 diabetic patients with sub-optimal metabolic control. *J Pak Med Assoc* 50: 381-386 (2000).
- Musso, C., E. Cochran, E. Javor, J. Young, A. M. Depaoli, P. Gorden:** The long-term effect of recombinant methionyl human leptin therapy on hyperandrogenism and menstrual function in female and pituitary function in male and female hypoleptinemic lipodystrophic patients. *Metabolism* 54: 255-263 (2005).
- Oberkofler, H., G. Dallinger, Y. M. Liu, E. Hell, F. Krempler, W. Patsch:** Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38: 2125-2133 (1997).

- Oral, E. A., E. Ruiz, A. Andewelt, N. Sebring, A. J. Wagner, A. M. Depaoli, P. Gorden:** Effect of leptin replacement on pituitary hormone regulation in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3110-3117 (2002).
- Oral, E. A., V. Simha, E. Ruiz, A. Andewelt, A. Premkumar, P. Snell, A. J. Wagner, A. M. DePaoli, M. L. Reitman, S. I. Taylor, P. Gorden, A. Garg:** Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 346: 570-578 (2002).
- Ott, V., M. Fasshauer, A. Dalski, H. H. Klein, J. Klein:** Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. *J Endocrinol* 173: R1-8 (2002).
- Ott, V., M. Fasshauer, A. Dalski, B. Meier, N. Perwitz, H. H. Klein, M. Tschop, J. Klein:** Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 34: 640-645 (2002).
- Ott, V., M. Fasshauer, B. Meier, A. Dalski, D. Kraus, T. W. Gettys, N. Perwitz, J. Klein:** Ciliary neurotrophic factor influences endocrine adipocyte function: inhibition of leptin via PI 3-kinase. *Mol Cell Endocrinol* 224: 21-27 (2004).
- Otto, M., J. Breinholt, N. Westergaard:** Metformin inhibits glycogen synthesis and gluconeogenesis in cultured rat hepatocytes. *Diabetes Obes Metab* 5: 189-194 (2003).
- Ozata, M., C. Oktenli, N. Bingol, I. C. Ozdemir:** The effects of metformin and diet on plasma testosterone and leptin levels in obese men. *Obes Res* 9: 662-667 (2001).
- Papaspyrou-Rao, S., S. H. Schneider, R. N. Petersen, S. K. Fried:** Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1635-1637 (1997).
- Peeters, A., J. J. Barendregt, F. Willekens, J. P. Mackenbach, A. Al Mamun, L. Bonneux:** Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med* 138: 24-32 (2003).
- Perriello, G., P. Misericordia, E. Volpi, A. Santucci, C. Santucci, E. Ferrannini, M. M. Ventura, F. Santeusano, P. Brunetti, G. B. Bolli:** Acute antihyperglycemic mechanisms of metformin in NIDDM. Evidence for suppression of lipid oxidation and hepatic glucose production. *Diabetes* 43: 920-928 (1994).
- Prins, J. B.:** Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16: 639-651 (2002).
- Reaven, G. M.:** Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607 (1988).

- Reaven, G. M.:** The Metabolic Syndrome: Requiescat in Pace. *Clin Chem* (2005).
- Riccardi, G., R. Giacco, A. A. Rivellese:** Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 23: 447-456 (2004).
- Rice, A. M., J. N. Fain, S. A. Rivkees:** A1 adenosine receptor activation increases adipocyte leptin secretion. *Endocrinology* 141: 1442-1445 (2000).
- Roh, C., R. Roduit, B. Thorens, S. Fried, K. V. Kandror:** Lipoprotein lipase and leptin are accumulated in different secretory compartments in rat adipocytes. *J Biol Chem* 276: 35990-35994 (2001).
- Roh, C., G. Thoidis, S. R. Farmer, K. V. Kandror:** Identification and characterization of leptin-containing intracellular compartment in rat adipose cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E893-899 (2000).
- Rose, D. P., E. M. Gilhooly, D. W. Nixon:** Adverse effects of obesity on breast cancer prognosis, and the biological actions of leptin (review). *Int J Oncol* 21: 1285-1292 (2002).
- Rossetti, L., R. A. DeFronzo, R. Gherzi, P. Stein, G. Andraghetti, G. Falzetti, G. I. Shulman, E. Klein-Robbenhaar, R. Cordera:** Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: in vivo and in vitro correlations. *Metabolism* 39: 425-435 (1990).
- Rouru, J., K. Isaksson, E. Santti, R. Huupponen, M. Koulu:** Metformin and brown adipose tissue thermogenetic activity in genetically obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol* 246: 67-71 (1993).
- Ruderman, N. B., A. K. Saha, E. W. Kraegen:** Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 144: 5166-5171 (2003).
- Saad, M. F., A. Khan, A. Sharma, R. Michael, M. G. Riad-Gabriel, R. Boyadjian, S. D. Jinagouda, G. M. Steil, V. Kamdar:** Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 47: 544-549 (1998).
- Saladin, R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels, J. Auwerx:** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-529 (1995).
- Saltiel, A. R., C. R. Kahn:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806 (2001).
- Savontaus, E., J. Rouru, O. Boss, R. Huupponen, M. Koulu:** Differential regulation of uncoupling proteins by chronic treatments with beta 3-adrenergic agonist BRL

35135 and metformin in obese fa/fa Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 899-904 (1998).

Schulze, M. B., F. B. Hu: Primary prevention of diabetes: what can be done and how much can be prevented? *Annu Rev Public Health* 26: 445-467 (2005).

Sivitz, W. I., S. M. Wayson, M. L. Bayless, L. F. Larson, C. Sinkey, R. S. Bar, W. G. Haynes: Leptin and body fat in type 2 diabetes and monodrug therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1543-1553 (2003).

Stith, B. J., M. L. Goalstone, R. Espinoza, C. Mossel, D. Roberts, N. Wiernsperger: The antidiabetic drug metformin elevates receptor tyrosine kinase activity and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in *Xenopus* oocytes. *Endocrinology* 137: 2990-2999 (1996).

Strauss, R. S., H. A. Pollack: Epidemic increase in childhood overweight, 1986-1998. *Jama* 286: 2845-2848 (2001).

Strosberg, A. D.: Towards the development and use of human-selective agonists for the pharmacologic treatment of obesity and diabetes. *J Endocrinol* 155: 221-222 (1997).

Stumvoll, M., N. Nurjhan, G. Perriello, G. Dailey, J. E. Gerich: Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 333: 550-554 (1995).

Tiraby, C., D. Langin: Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 14: 439-441 (2003).

Tiraby, C., G. Tavernier, C. Lefort, D. Larrouy, F. Bouillaud, D. Ricquier, D. Langin: Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278: 33370-33376 (2003).

Uehara, M. H., N. E. Kohlmann, M. T. Zanella, S. R. Ferreira: Metabolic and haemodynamic effects of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Diabetes Obes Metab* 3: 319-325 (2001).

UKPDS Group: Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352: 854-865 (1998).

Wabitsch, M., P. B. Jensen, W. F. Blum, C. T. Christoffersen, P. Englaro, E. Heinze, W. Rascher, W. Teller, H. Tornqvist, H. Hauner: Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 45: 1435-1438 (1996).

- Walker, J., H. B. Jijon, H. Diaz, P. Salehi, T. Churchill, K. L. Madsen:** 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK. *Biochem J* 385: 485-491 (2005).
- Welt, C. K., J. L. Chan, J. Bullen, R. Murphy, P. Smith, A. M. DePaoli, A. Karalis, C. S. Mantzoros:** Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 351: 987-997 (2004).
- Wiernsperger, N. F.:** Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab* 25: 110-127 (1999).
- Yang, X., S. Enerback, U. Smith:** Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res* 11: 1182-1191 (2003).
- Yanovski, S. Z., J. A. Yanovski:** Obesity. *N Engl J Med* 346: 591-602 (2002).
- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, D. E. Moller:** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-1174 (2001).

8 DANKSAGUNG

Sehr dankbar bin ich Johannes Klein für die Möglichkeit, mich seiner Arbeitsgruppe anschließen zu dürfen. In den Jahren meiner Promotion habe ich stets wohlwollende, kompetente und freundschaftliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten erfahren.

Dem Direktor der Medizinischen Klinik I, Herrn Prof. Dr. med. Horst Lorenz Fehm, danke ich dafür, dass ich in seinem Hause Forschung betreiben konnte.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Britta Meier, Nina Lotta Perwitz, Dr. med. Daniel Kraus, Dr. med. Volker Ott und Dr. med. Petra Jost, die mich sehr offen und freundschaftlich in die Laborgruppe integriert haben, und denen ich stets zum richtigen Zeitpunkt wohlwollend kritische Worte verdanke. Für die hervorragende Zusammenarbeit und die wertvollen Impulse danke ich ferner den weiteren Mitarbeitern der beiden Arbeitsgruppen PD Dr. Johannes Klein und Prof. Dr. Hans Harald Klein: Nina Christensen, Dr. Andreas Dalski, Maren Drenckhan, Alexandra Eirich, Birgit Filsinger, Jessika Jäger, Dr. Marco Jost und Dr. Petra Jost. Herzlich gedankt sei auch Frau Maria Schümann vom endokrinologischen Labor der Universitätsklinik Lübeck, für die große Hilfe bei der Messung der Leptinkonzentrationen.

Für die ideelle und materielle Förderung durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes möchte ich mich bedanken. Auch gilt mein Dank denjenigen Menschen, denen ich während meines Studiums zu begegnen das Glück hatte und die mich persönlich nachhaltig geprägt haben.

Meiner Lebensgefährtin Johanna Schubart danke ich für ihre stets geduldige und wertvolle Unterstützung, für die Durchsicht des Manuskripts und die vielen kreativen Anregungen. Schließlich gilt mein herzlicher Dank meinen Schwestern Kaja und Ronja Westphal und denen, die mir meine akademische Ausbildung möglich gemacht haben: meinen Eltern Ilse und Dr. Klaus Westphal.

9 CURRICULUM VITAE

Sören Westphal

Geburtsdatum: 25. September 1976
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Anschrift: Fischergasse 6, 89073 Ulm



Schulabschluss

1996 Abitur am Städtischen Gymnasium, Bad Segeberg, Note 1.2

Universität

1997-2003 Medizinstudium an der Universität Lübeck

1999 Ärztliche Vorprüfung 1.6

2000 1. Staatsexamen 2.0

2002 2. Staatsexamen 1.6

2003 3. Staatsexamen 2.0

Auslandsaufenthalte

2001 Imperial College School of Medicine, National Heart and Lung Institute, London, England

2001 Marienkrankenhaus, Bozen, Italien

2002/2003 University of The Witwatersrand, Chis Hani Baragwanath Hospital, Johannesburg, Republik of South Africa

2003 Veterans Affairs Hospital and Children's Hospital, University of California, Campus San Diego, California, USA

2003 Kantonsspital Luzern, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich, Schweiz

Förderungen/Auszeichnungen

1997-2003 Stipendiat der „Studienstiftung des deutschen Volkes“

2002-2005 Stipendiat der e-fellows.net – Stiftung

2002 Reisestipendium „Freunde und Förderer“ Universität Lübeck

2002 Präsidentenposterpreis der Deutschen Diabetes-Gesellschaft

2003 Reisestipendium der „Studienstiftung des deutschen Volkes“

2005

Research Summaries Book der Endocrine Society

Wissenschaftlicher Werdegang

2000-2003

Forschung im Rahmen der Dissertation im Labor PD Dr. med. Johannes Klein, Medizinische Klinik I, Universität Lübeck

2003-2005

Arzt im Praktikum (seit 1. Oktober 2004 Assistenzarzt) in der Abteilung für Innere Medizin, BWK, Ulm

Wissenschaftliche Veröffentlichungen in chronologischer Reihenfolge

2002 Westphal S, Fasshauer M, Kraus D, Meier B, Ott V, Klein HH, Klein J: Differentiation-independent inhibition of leptin secretion by metformin in brown adipocytes. (2002) *37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Diabetes und Stoffwechsel 11:S2 (ausgewählt als Präsidentenposter und ausgezeichnet mit dem Posterpreis der DDG)*

2002 Westphal S, Kraus D, Meier B, Fasshauer M, Ott V, Klein HH, Klein J: Differentiation-independent inhibition of leptin secretion and *MAP* Kinase activation by metformin in brown adipocytes. (2002) *84th Annual Meeting, Endocrine Society, San Francisco, USA*

2004 Westphal S (gleichberechtigter Erstautor), Klein J, Kraus D, Meier B, Perwitz N, Ott V, Fasshauer M, Klein HH: Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling pathway in brown adipocytes. *Journal of Endocrinology* 183:299-307

2005 Westphal S, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M, Klein J: The Novel Angiotensin II Signaling Modulator ATRAP is Expressed in Adipocytes and Negatively Regulated by β 3-Adrenergic Stimulation of JAK/STAT Signaling. Eingereicht bei: *European Journal of Endocrinology*.

2005 Westphal S, Perwitz N, Ott V, Schick RR, Fasshauer M, Klein J: β 3-Adrenergic crosstalk with JAK/STAT signaling downregulates angiotensin II. (2005) *87th Annual Meeting, Endocrine Society, San Diego, USA (aus > 2000 Beiträgen als einer von 125 ausgewählt zur Aufnahme in das Research Summaries Book 2005)*

Fremdsprachen

Englisch

Französisch