

**Isolierung und Identifizierung
lipolytischer Substanzen und ihre Charakterisierung
in 3T3-L1 Adipozyten**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Apothekerin Katrin Fricke
geboren am 13.04.1976 in Bremen

2004

Referent: Prof. Dr. Walter Müller
Korreferent: PD Dr. Erik Maronde
Tag der Promotion: 09. November 2004

Zusammenfassung: Unter Verwendung eines Lipolyseassays mit 3T3-L1 Adipozyten wurden die Melanocortine β -MSH-(1-22) und γ -LPH-(33-56), nachfolgend als VA- β -MSH bezeichnet, als zirkulierende, Lipolyse auslösende Faktoren aus einer humanen Hämofiltrat-Peptidbank mittels RP- und Kationenaustausch-Chromatographie isoliert. Die pharmakologische Charakterisierung dieser Peptide zeigt eine konzentrationsabhängige Glycerolfreisetzung in 3T3-L1 Adipozyten mit EC_{50} -Werten von 17 nM für β -MSH-(1-22) und 24 nM für VA- β -MSH, die etwa der EC_{50} von ACTH entsprechen. Beide Peptide führen zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, und eine Beteiligung der Proteinkinase A an der Lipolyse wurde durch den Einsatz der spezifischen PKA-Inhibitoren Rp-8-CPT-cAMPS und H89 bestätigt. Zwei regulatorische PKA-Untereinheiten, $R\alpha$ und $R\beta$, werden in 3T3-L1 Adipozyten exprimiert und tragen beide zu der PKA-vermittelten Lipolyse bei. Die Beteiligung der PKA wird zudem durch die Phosphorylierung von Perilipin durch VA- β -MSH bestätigt. RT-PCR- und Immunoblotanalysen ergaben, dass in 3T3-L1-Adipozyten von den derzeit bekannten fünf Melanocortin-Rezeptor-Isoformen nur der MC5-R und der ausschließlich ACTH bindende MC2-R exprimiert werden. Untersuchungen zur möglichen Beteiligung des MC5-R an der lipolytischen Wirkung von VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) in 3T3-L1 Adipozyten führten jedoch zu keinem Ergebnis. Die isolierten Peptide wirken in humanen, den MC5-R nicht exprimierenden Adipozyten übergewichtiger Spender nicht lipolytisch. Die physiologische Relevanz von β -MSH-(1-22) und VA- β -MSH wird diskutiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Zusammenhang verschiedener Signaltransduktionswege, die in 3T3-L1 Adipozyten zur Lipolyse führen, untersucht. Neben dem bekannten cAMP/PKA-Signalweg existiert ein zweiter, durch PMA aktivierter PKC/MAPK-Signalweg. Parallel aktiviert, liegt keine gegenseitige Beeinflussung vor, was durch Immunoblotanalysen, cAMP-Messungen und den Einsatz spezifischer PKA- und MEK-Inhibitoren gezeigt wird. Bei gleichzeitiger Aktivierung beider Signalwege ist ein synergistischer Effekt auf die Glycerolfreisetzung zu beobachten, der nicht auf eine Beteiligung der MAPK, der intrazellulären cAMP-Bildung oder der HSL-Phosphorylierung zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung von Perilipin, die durch Aktivierung des PKC/MAPK-Signalweges nicht erfolgt, wird im Zusammenhang mit diesem Synergismus und dem unterschiedlichen lipolytischen Effekt dieser beiden Signalwege diskutiert.

Schlagerworte: 3T3-L1 Adipozyten, Lipolyse, Melanocortine

Abstract: Using a bioassay monitoring lipolytic activity in 3T3-L1 adipocytes, two melanocortins, β -MSH-(1-22) and γ -LPH-(33-56), here named VA- β -MSH, were isolated from human hemofiltrate as circulating lipolytic peptides. Alternating RP- and cationexchange chromatography was used. Both peptides are lipolytically active in a dose-dependent manner in 3T3-L1 adipocytes with EC₅₀-values of 17 nM and 24 nM for β -MSH-(1-22) and VA- β -MSH, respectively, which is similar to that observed for ACTH. Both peptides lead to an increase in intracellular cAMP, and involvement of PKA in the lipolytic effect was confirmed using the selective PKA inhibitors Rp-8-CPT-cAMPS and H89. The regulatory PKA subunits RI α and RII β are expressed in 3T3-L1 adipocytes and both contribute to the lipolytic effect mediated via PKA. Phosphorylation of perilipin also substantiates the participation of PKA in VA- β -MSH-stimulated lipolysis. Using RT-PCR and immunoblot analysis, it is demonstrated that among all five known melanocortin receptor isoforms, only MC5-R and MC2-R, of which the latter only shows affinity for ACTH, are expressed in 3T3-L1 adipocytes. Experiments focusing on the involvement of MC5-R in the lipolytic effect of VA- β -MSH in these cells did not show any results. However, no lipolysis is observed in human adipocytes derived from overweight donors after application of VA- β -MSH, and no MC5-R protein expression is detected in these cells. The physiological relevance of the isolated melanocortins is further discussed.

In the second part of this work, the coherence of signaling pathways leading to lipolysis in 3T3-L1 adipocytes was investigated. Two linear signaling pathways are observed: one well-known, acting via cAMP/PKA activation, and a second one induced by PMA treatment involving PKC/MAPK. Use of specific PKA- and MEK-inhibitors, cAMP ELISA, and immunoblot analysis does not indicate any cross-talk between these pathways when only one is activated. However, when both are activated, they act synergistically on glycerol release. Further experiments focusing on this synergy showed no involvement of MAPK phosphorylation, cAMP formation and phosphorylation of HSL. Perilipin phosphorylation, which is not observed upon activation of the PKC/MAPK pathway, is further discussed in terms of the synergy and the observed different maximal lipolytic effects of both signaling pathways.

Keywords: 3T3-L1 adipocytes, lipolysis, melanocortins

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Å	Angström (10^{-10} m)
A	Absorption
ACN	Acetonitril
ATCC	American Type Culture Collection
BMI	<i>body mass index</i>
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CE	Kapillarzonenelektrophorese
CEC	<i>cation-exchange-chromatography</i> , Kationenaustauschchromatographie
Da	Dalton
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleid acid</i> (Desoxyribunukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	et altera
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HF	Hämofiltrat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HSL	Hormon-sensitive Lipase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
l	Liter
IgG	Immunglobulin G
Ko	Kontrolle
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>

MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MeOH	Methanol
M	Molar
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
m/z	Masse/Ladungsquotient
n. b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (definierte Einheiten)
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren

Zur Abkürzung von Aminosäuren und Nukleotiden wurde die Einbuchstaben-Nomenklatur verwendet.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	5
1.1 DAS FETTGeweBE ALS ENDOKRINES ORGAN	6
1.2 REGULATION DER AUSBILDUNG DES WEIßEN FETTGeweBES	8
1.2.1 Differenzierung zu reifen Adipozyten	9
1.3 FREISETZUNG UNVERESTERTER FETTSÄUREN AUS ADIPOZYTEN (LIPOLYSE)	10
1.3.1 Hormon-sensitive Lipase (HSL)	15
1.3.2 Perilipin	16
1.4 PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DES FETTSÄURESTOFFWECHSELS	18
1.5 GEWEBE- UND HÄMOFILTRATPEPTIDBANKEN ALS QUELLE ZUR ISOLIERUNG REGULATORISCHER SUBSTANZEN	20
1.6 AUFGABENSTELLUNG	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 VERWENDETE MATERIALIEN	22
2.1.1 Geräte und Apparaturen	22
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	22
2.1.3 Verwendete Peptidbanken	23
2.1.4 Genutzte Datenbanken, Software und Statistik	23
2.2 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	24
2.2.1 Umkehrphasen HPLC (Reversed-Phase HPLC, RP-HPLC)	24
2.2.2 Kationenaustausch-HPLC	25
2.2.3 Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie	25
2.3 ANALYTISCHE METHODEN	26
2.3.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie	26
2.3.2 Elektrospray-Quadrupol-Massenspektrometrie	26
2.3.3 Kapillarzonenelektrophorese	27
2.3.4 Peptidsequenzierung	27
2.4 CHEMISCHE SYNTHESE VON PEPTIDEN	28
2.5 HYDROLYSE VON PEPTIDEN MIT DER PROTEASE SUBTILISIN	28
2.6 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN	29
2.6.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	29
2.6.2 Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten	30
2.6.3 Stimulation von Zellen	32
2.7 CYTOCHEMISCHE METHODEN	33
2.7.1 Fixierung von Zellen	33
2.7.2 Färbung von Lipidvesikeln	33
2.7.3 Kernfärbung	33
2.8 BIOTESTS	34
2.8.1 Glycerol Bioassay	34
2.8.2 cAMP Bioassay	35
2.9 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	36
2.9.1 Isolation von RNA aus Zellen	36
2.9.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung	36
2.9.3 Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen	37
2.9.4 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)	37

2.9.5	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	38
2.9.6	Gelelektrophoretische Trennung von DNA	39
2.10	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	40
2.10.1	Probenvorbereitung	40
2.10.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	40
2.10.3	Immunoblot Analyse (Western Blot)	41
2.10.4	Antikörper	43
2.10.5	Immunopräzipitation	44
3.	ERGEBNISSE	45
3.1	ETABLIERUNG EINES BIOASSAYS ZUR DETEKTION GLYCEROL FREISETZENDER SUBSTANZEN	45
3.1.1	Anpassung an das 96-Loch-Mikrotiterplattenformat	46
3.2	DETEKTION LIPOLYTISCHER SUBSTANZEN IN PEPTIDBANKEN	47
3.2.1	Primäres Screening einer Schweinemagenpeptidbank	47
3.2.2	Primäres Screening einer Schweinehirnpeptidbank	47
3.2.3	Primäres Screening einer humanen Hämofiltratpeptidbank	48
3.2.4	Verifizierung der biologischen Aktivität	49
3.3	ISOLIERUNG VON LIPOLYTISCHEN FAKTOREN AUS HÄMOFILTRAT	50
3.4	IDENTIFIZIERUNG DER ISOLIERTEN LIPOLYTISCHEN FAKTOREN AUS HÄMOFILTRAT	57
3.4.1	Bestätigung der biologischen Aktivität durch synthetische Peptide	58
3.5	EXPRESSION VON MELANOCORTIN-REZEPTOR-ISOFORMEN IN 3T3-L1 ZELLEN	59
3.5.1	Untersuchungen zur Beteiligung des MC5-R an der lipolytischen Wirkung von VA- β -MSH	61
3.6	PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN PEPTIDE	62
3.6.1	Beteiligung des cAMP/PKA-Signalweges an der Lipolyse	62
3.6.2	Vergleich der biologischen Wirkung der isolierten Peptide mit verwandten Peptiden	69
3.7	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR-FUNKTIONS-BEZIEHUNG	70
3.8	EFFEKT LIPOLYTISCH AKTIVER HÄMOFILTRATFRAKTIONEN IN HUMANEN ADIPOZYTEN	71
3.9	UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DER PROTEINKINASE C UND DER MAPK-KASKADE IN DER LIPOLYSE	72
3.9.1	Beteiligung der Proteinkinase C an der PMA-vermittelten Lipolyse	73
3.9.2	Induktion der MAP Kinase Kaskade durch Aktivierung der PKC	73
3.9.3	Beteiligung der MAPK Kaskade an der Lipolyse	75
3.9.4	Beteiligung des cAMP/PKA-Signalweges an der Lipolyse durch PMA und SpcAMPS	76
4.	DISKUSSION	80
4.1	IDENTIFIZIERUNG VON β -MSH-(1-22) UND VA- β -MSH ALS ZIRKULIERENDE LIPOLYTISCH AKTIVE PEPTIDE	80
4.2	BIOLOGISCHE EFFEKTE DER ISOLIERTEN PEPTIDE	83
4.3	PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN DES MELANOCORTINSYSTEMS	89
4.4	AKTIVIERUNG DER LIPOLYSE DURCH PKA UND PKC	90
5.	ZUSAMMENFASSUNG	97
6.	LITERATURVERZEICHNIS	99

1. Einleitung

Traditionell gilt das Fettgewebe in erster Linie als Organ von anabolen und katabolen Vorgängen des Lipidstoffwechsels. Bei Säugetieren differenziert man zwischen weißem und braunem Fettgewebe. Das braune Fettgewebe dient vor allem der Wärmeproduktion und ist besonders wichtig bei kleinen Säugetieren wie Mäusen und Ratten, die aufgrund eines ungünstigen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses im Vergleich zu großen Säugern sehr viel Körperwärme verlieren. Durch das braune Fettgewebe können diese Tiere den Wärmeverlust kompensieren. Beim Menschen findet man braunes Fettgewebe nur bei Neugeborenen, denn es atrophiert bereits im Kindesalter.

Das weiße Fettgewebe hingegen fungiert vorwiegend als Speicher für Triglyceride. Diese stellen aus zweierlei Gründen ein ideales Energiedepot dar: der Fettsäureanteil ist extrem energiereich, und die Fette benötigen im Gegensatz zum Glykogen keine Hydrathülle, weshalb sie ein vergleichsweise geringes Volumen und Gewicht einnehmen. Der Körper ist darauf eingestellt, in Zeiten des Nahrungsüberschusses die aufgenommene Energie vor allem in Form von Triglyceriden zu speichern und diese bei Nahrungsmangel wieder abzugeben, wodurch das Fettdepot das Überleben in Phasen des Nahrungsmangels sichert. Die nachstehend verwendete Bezeichnung der Adipozyten bezieht sich ausschließlich auf weiße Fettzellen.

Im Durchschnitt nimmt ein erwachsener Mensch täglich 45 bis 140 g Triglyceride auf, von denen mehr als 95 % im weißen Fettgewebe gespeichert werden. Die Triglyceride werden im Dünndarm durch intestinale Lipasen zu Monoacylglycerol und zu freien Fettsäuren hydrolysiert und in dieser Form resorbiert. Im Darmepithel werden die Fettsäuren erneut zu Triglyceriden verestert und bilden zusammen mit Cholesterol die Chylomikronen, die von der Darmwand auf dem Lymphweg ins Blut gelangen. Chylomikronen geben nach Spaltung der Triglyceride durch die membrangebundene endotheliale Lipoproteinlipase (LPL) freie Fettsäuren an das Blut ab, die von den Adipozyten aufgenommen werden. Dies kann entweder mittels Diffusion oder durch aktive Transporter wie den FAT/CD36-Transporter (LUIKEN *et al.*, 2002) geschehen. Nach Aufnahme der freien Fettsäuren in die Adipozyten folgt die Veresterung zu Triglyceriden, welche die Speicherform der Fettsäuren im Fettgewebe darstellen und einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen. Die Adipozyten tragen durch die Abgabe freier Fettsäuren maßgeblich zur Steuerung des Fettsäureplasmaspiegels bei (1.3).

Die verbleibenden Überreste der Chylomikronen (*Remnants*), die einen hohen Gehalt an Cholesterol aufweisen, gelangen über den nur in Leberzellen vorhandenen *Remnant*-Rezeptor in die Leber. Dort wird das aufgenommene Cholesterol in Gallensäuren umgewandelt, die dann mit der Galle in den Darm abgegeben werden, oder zusammen mit Apoproteinen, Phospholipiden und Triglyceriden in Form von *very low density lipoproteins* (VLDL) wieder in

den Kreislauf eingeschleust. Auch die VLDL geben nach Spaltung der Triglyceride durch die Lipoproteinlipase Fettsäuren an das Blut ab, die schließlich von den Adipozyten aufgenommen werden.

Neben Adipozyten nehmen auch Leber- und Muskelzellen die durch die LPL freigesetzten Fettsäuren aus Chylomikronen und VLDL auf. In diesen Geweben erfolgt ebenfalls eine Veresterung zu Triglyceriden. Im Vergleich zum Fettgewebe sind in Leber- und Muskelgewebe nur sehr begrenzte Mengen an Triglyceriden gespeichert, die bei Bedarf kurzfristig freie Fettsäuren als Energiequelle bereitstellen. Bei hohem Fettsäureangebot im Blutplasma werden von den Hepatozyten vor allem Ketonkörper erzeugt, die ausschließlich der Energieversorgung anderer Gewebe dienen.

Eine Übersicht über den Fettsäure- und Triglyceridstoffwechsel ist in Abbildung 1 gegeben.

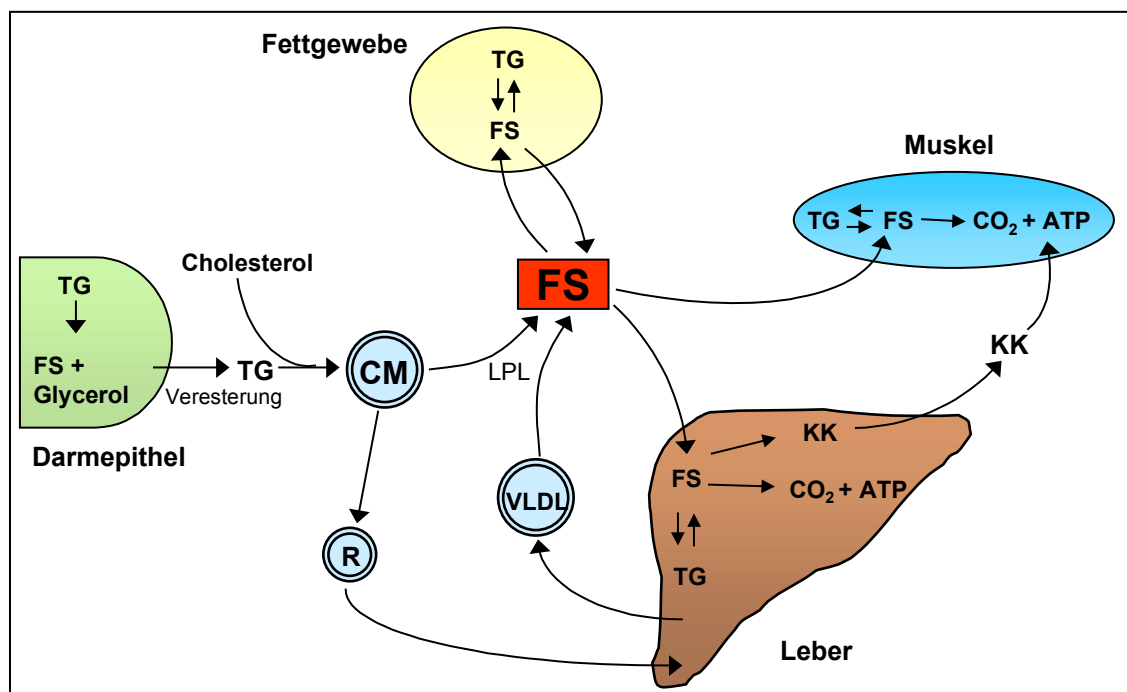


Abbildung 1 Vereinfachtes Schema des Fettsäure- und Triglyceridstoffwechsels. Aus dem Darmepithel werden nach der Triglycerid (TG)-Hydrolyse freie Fettsäuren (FS) resorbiert und nach erneuter Veresterung zusammen mit Cholesterol in die Chylomikronen (CM) eingebaut. Diese setzen in der Zirkulation ebenso wie die aus der Leber stammenden *very low density lipoproteins* (VLDL) unter Einwirkung der Lipoproteinlipase (LPL) Fettsäuren frei. Die FS werden in das Fettgewebe, in die Leber und die Skelettmuskulatur aufgenommen. Dort werden sie entweder gespeichert oder über die β -Oxidation zu energiereichem Phosphat (ATP) oder in der Leber zu Ketonkörpern (KK) abgebaut, die als Energiequelle für andere Gewebe dienen. Die verbleibenden Reste der Chylomikronen (*remnants*; R) werden von der Leber aufgenommen und verstoffwechselt. [Quelle: eigene Erstellung]

1.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe reguliert die dem Körper zur Verfügung stehende Menge freier Fettsäuren, deren Freisetzung von den Adipozyten kontrolliert wird. Im Plasma liegen freie Fettsäuren an Albumin gebunden vor (TERESI UND LUCK, 1952). Das Fettgewebe fungiert jedoch nicht, wie

lange Zeit angenommen, ausschließlich als Speicherort für Triglyceride, sondern es nimmt eine sehr viel komplexere Rolle als sekretorisches Organ ein, welches Faktoren sezerniert, die u.a. in Zusammenhang mit der Appetitregulation, vaskulären Krankheiten und Immunreaktionen stehen. Auf einige dieser Faktoren wird im folgenden näher eingegangen.

Das Polypeptid Leptin (ZHANG *et al.*, 1994) wird hauptsächlich in Adipozyten exprimiert. Innerhalb der Adipozyten findet auch der Umbau der Proform zum bioaktiven Hormon statt, das anschließend ausgeschleust und vom Blutstrom zum Zielgewebe abtransportiert wird. Leptin bindet an den Leptinrezeptor im *Nucleus arcuatus* des Hypothalamus (MERCER *et al.*, 1996) und spielt dort eine wichtige Rolle bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energieumsatz. Die Leptinausschüttung ist der Masse an Fettgewebe proportional. So bewirkt eine Zunahme des Fettdepots eine vermehrte Leptinausschüttung der Adipozyten, was im Hypothalamus zur Senkung des den Appetit steigernden Neuropeptid Y-Spiegels und damit zur Verringerung der Nahrungsaufnahme führt (HALAAS *et al.*, 1995). Genetisch bedingter Leptinmangel oder ein Leptinrezeptordefekt führen zu starkem Übergewicht (MONTAGUE *et al.*, 1997; CLEMENT *et al.*, 1998). Bei der Mehrheit der übergewichtigen Menschen findet man allerdings statt eines Gendefektes einen erhöhten Plasmaleptinspiegel, der auf eine Leptinresistenz hindeutet und dementsprechend nicht mit der Substitution durch rekombinantes Leptin behandelbar ist (MAFFEI *et al.*, 1995). Leptinrezeptoren finden sich auch in peripheren Geweben wie in Leber- und Fettzellen, und weitere physiologische Funktionen, u.a. bei der sexuellen Entwicklung und der Wachstumshormonsekretion (CLEMENT *et al.*, 1998), wurden für dieses Polypeptid beschrieben.

Auch Resistin ist ein von Adipozyten sezerniertes Signalmolekül. Der Zusammenhang zwischen dem Resistin-Serumspiegel und der Fettmasse wird bislang kontrovers diskutiert. STEPPAN *et al.* (2001) zeigten, dass der Resistin-Serumspiegel in fettleibigen Mäusen erhöht ist und dass die Gabe von Resistin in gesunden Mäusen zu einer Verschlechterung von Glucosetoleranz und Insulineffekt führt. Im Gegensatz dazu fanden WAY *et al.* (2001) eine stark erniedrigte Genexpression von Resistin in adipösen Mäusen, die in Zusammenhang mit verschlechterter Insulinsensitivität steht.

Als weitere Substanz, die ausschließlich von Adipozyten in die Zirkulation abgegeben wird, ist Adiponectin (Acrp30; *adipocyte complement-related protein*) zu nennen (SCHERER *et al.*, 1995). Es ähnelt in seiner Struktur der TNF α Zytokinfamilie. Neben anti-inflammatorischen Eigenschaften konnten vor allem den Lipidstoffwechsel beeinflussende Funktionen von Adiponectin gezeigt werden. So existiert eine negative Korrelation zwischen BMI und Adiponectin-Plasmaspiegel (ARITA *et al.*, 1999), und eine Gewichtsreduktion hat einen Anstieg des Adiponectin-Plasmaspiegels zur Folge. Weiterhin bewirkt die Gabe von Adiponectin in diabetischen Mäusen eine gesteigerte β -Oxidation von Fettsäuren in der Skelettmuskulatur, eine Erniedrigung des Triglyceridspiegels in Plasma, Leber- und Muskelgewebe sowie eine

Reduktion des Plasmaspiegels an freien Fettsäuren (BERG *et al.*, 2002). Insgesamt führt die Erhöhung des Adiponectin-Plasmaspiegels in diesen Tieren zu verbesserter Insulinempfindlichkeit.

Die Vielfalt der Substanzen, die von Adipozyten in die Zirkulation abgegeben werden, und die große Anzahl der damit verbundenen physiologischen Funktionen machen deutlich, dass die Adipozyten neben der Speicherung von Fettsäuren als Energiereserve auch eine wichtige Funktion als endokrines Organ besitzen.

1.2 Regulation der Ausbildung des weißen Fettgewebes

In den meisten Spezies beginnt die Bildung von weißem Fettgewebe vor der Geburt (POISSONNET *et al.*, 1983). Nach der Geburt expandiert das weiße Fettgewebe aufgrund der steigenden Anzahl von Adipozyten und zunehmender Fettzellgröße sehr schnell. Auch im Erwachsenenalter bleibt die Fähigkeit erhalten, neue Fettzellen zu bilden, was von MILLER *et al.* (1984) in adulten, mit fettreicher Nahrung gefütterten Ratten gezeigt wurde. Zudem können die im weißen Fettgewebe vorhandenen Adipozytenvorläuferzellen aus diversen Spezies einschließlich des Menschen nach Isolierung *in vitro* zu Adipozyten differenzieren (DESLEX *et al.*, 1987; LITTHAUER UND SERRERO, 1992).

Die genauen Ursprünge weißer Fettzellen und des Fettgewebes sind bislang nicht völlig aufgeklärt, und auch die Verbindung zu embryonalen Stammzellen als Fettzellvorläufer ist noch unzureichend charakterisiert. Diskutiert wird die Entstehung von Adipozyten aus embryonalen Stammzellen, die in verschiedene mesenchymale Vorläuferzelllinien übergehen, die wiederum in Adipozyten, Chondrozyten und Myozyten differenzieren können (KONIECZNY UND EMERSON, 1984).

Sehr viel mehr bekannt ist über die *in vitro* Differenzierung fibroblastärer Adipozyten-Vorläuferzellen, den sogenannten Präadipozyten, zu reifen Fettzellen. Sowohl primäre Präadipozyten als auch Präadipozyten-Zelllinien sind direkte Vorläufer reifer Adipozyten, besitzen also keine Multipotenz mehr. Es existieren diverse präadipozytäre Zelllinien, von denen 3T3-L1- und 3T3-F442A- Fibroblasten die am häufigsten verwendeten sind. Sie stammen von Swiss 3T3-Zellen ab, die aus Mausembryonen isoliert wurden (vgl. GREGOIRE *et al.*, 1998). Aufgrund der Ähnlichkeit von *in vitro* differenzierten Adipozyten mit Fettzellen *in vivo* dienen diese Zelllinien als Modell für die Differenzierung zu reifen Fettzellen und wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Konfluente 3T3-L1 Präadipozyten, die ihre Zellteilung eingestellt haben, differenzieren über einen Zeitraum von mehreren Wochen in serumhaltigem Medium zu Adipozyten. Durch Zugabe von Substanzen, die den cAMP-Spiegel erhöhen, sowie Glucocorticoiden und Insulin kann dieser Vorgang beschleunigt werden (GREEN UND MEUTH, 1974). Auf den Prozess, der

während der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten abläuft, wird im folgenden näher eingegangen.

1.2.1 Differenzierung zu reifen Adipozyten

Präadipozyten besitzen noch die Fähigkeit zur Zellteilung. Bevor der Differenzierungsprozess zu Adipozyten beginnen kann, muss zunächst eine Einstellung des Wachstums erfolgen. Während der Adipogenese kommt es dann durch chronologische Veränderungen in der Expression diverser Gene zur Ausbildung des adipozytären Phänotyps, was durch frühe und späte mRNA- bzw. Proteinmarker und die Akkumulation von Triglyceriden charakterisiert ist. Der Wachstumseinstellung muss nicht unbedingt Zell-Zell-Kontakt bzw. Konfluenz der Zellen in Kultur vorausgehen. Die relativ geringe Expression von CCAAT/*enhancer binding protein* α (C/EBP α) und *peroxisome-proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) sind möglicherweise bereits ausreichend, um die Einstellung des Wachstums auszulösen (LIN UND LANE, 1994; ALTIOK *et al.*, 1997). Beide Gene werden zudem schon in der frühen Phase der Differenzierung verstärkt exprimiert (JANDEROVÁ *et al.*, 2003). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der zu Beginn des Differenzierungsprozesses induziert wird, ist das *sterol regulatory element binding protein-1c/adipocyte determination and differentiation factor 1* (SREBP-1c/ADD1)-Protein (INOUE *et al.*, 2001). Neben der Expressionsverstärkung verschiedener Faktoren stellt der in Präadipozyten stark exprimierte Präadipozytenfaktor-1 (pref-1) einen der wenigen Faktoren dar, der nach Abschluss der Differenzierung zu Adipozyten komplett verschwindet (SMAS UND SUL, 1993). Den extremen morphologischen Veränderungen von der fibroblastären zur nahezu kugelförmigen Gestalt der Zellen geht schließlich eine starke Verminderung der Aktin- und Tubulin-Expression voraus (SPIEGELMAN UND FARMER, 1982).

In der späteren Differenzierungsphase kommt es dann zu einer Verstärkung der *de-novo* Lipogenese. Weiterhin werden Expression und Aktivität von Enzymen, die am Triglycerid-Metabolismus beteiligt sind, erhöht. Zu diesen gehören u. a. die Acetyl-Co-A-Carboxylase, Stearyl-Co-A-Desaturase, Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase und -Dehydrogenase sowie die Fettsäure-Synthase (vgl. GREGOIRE *et al.*, 1998). Die Insulinsensitivität wird durch einen Anstieg der Insulinrezeptorzahl erhöht, und auch die Anzahl der Glucose-Transporter steigt an. Während es im Verlauf der Differenzierung zu Adipozyten zu einer Verminderung der Expression von β_1 -adrenergen Rezeptoren kommt, werden β_2 - und β_3 -Rezeptoren in reifen Fettzellen verstärkt exprimiert (FÈVE *et al.*, 1990; FÈVE *et al.*, 1991). Im Verlauf dieser späten Differenzierungsphase beginnt auch die Ausbildung größerer, Triglycerid speichernder Fettvakuolen und die Bildung von Fettsäuretransportern wie dem FAT/CD36 (GREGOIRE *et al.*, 1998) sowie Perilipin (GREENBERG *et al.*, 1993; 1.3.2). Zudem beginnt die Sezernierung einer

Reihe adipozytenspezifischer Substanzen, die in Kap. 1.1 näher erläutert sind. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht der Differenzierungsphasen zu reifen Adipozyten.

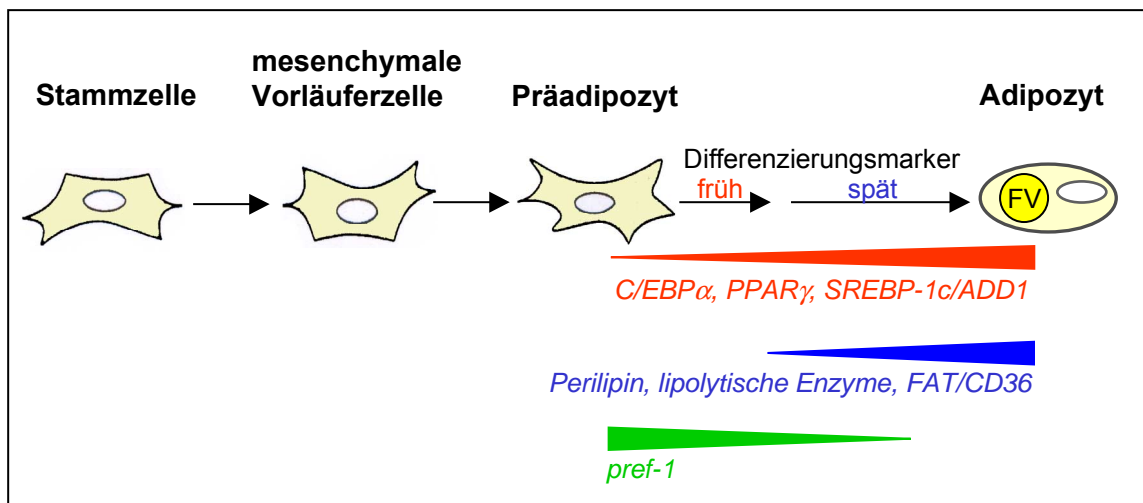


Abbildung 2 Schematische Übersicht über die Phasen der Adipogenese. Präadipozyten entstehen wahrscheinlich aus mesenchymalen Vorläuferzellen, die wiederum aus embryonalen Stammzellen hervorgehen. Während der Differenzierung kommt es zur verstärkten Expression verschiedener früher und später Differenzierungsmarker. In reifen Adipozyten ist keine Genexpression des Präadipozytenfaktor-1 (pref-1) mehr nachweisbar. C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein α ; PPAR γ : peroxisome proliferator activated receptor γ ; SREBP-1c/ADD1: sterol regulatory element binding protein 1c/adipocyte determination and differentiation factor 1; FAT/CD36: Fettsäuretransporter; FV: Fettvakuole. [modifiziert nach: GREGOIRE et al., 1998]

1.3 Freisetzung unveresterter Fettsäuren aus Adipozyten (Lipolyse)

Die Menge freier Fettsäuren, die dem Körper zur Verfügung stehen, wird durch die Lipolyse im Fettgewebe bestimmt. Der Prozess der Lipolyse beinhaltet die Hydrolyse von Triglyceriden über Di- und Monoglyceride zu freien Fettsäuren und Glycerol. Dieser Vorgang spielt sich größtenteils in Adipozyten ab, von denen freie Fettsäuren in die Zirkulation abgegeben und an Albumin gebunden werden. Die Lipolyse findet jedoch auch in Leber- und Muskelzellen statt, wo freie Fettsäuren zur lokalen Energiebereitstellung oxidiert werden. Über den Blutkreislauf gelangen die freien Fettsäuren in die Peripherie und stehen als Energiequelle zur Verfügung. In sehr geringem Ausmaß findet die Hydrolyse von Triglyceriden auch in anderen Zelltypen statt, in denen jedoch im Gegensatz zu Adipozyten nur äußerst begrenzte Mengen an gespeicherten Triglyceriden vorliegen. Dort werden die unveresterten Fettsäuren vorwiegend als zelleigene Energiereserve und zur Membran- und Eicosanoidbiosynthese genutzt.

Die Lipolyse in Adipozyten wird von Hormonen, Neurotransmittern und weiteren Effektormolekülen reguliert. Die akute Stimulation der Lipolyse durch die sogenannten lipolytischen Hormone beruht auf der Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die über stimulatorische G-Proteine (G_s) an die Adenylatzyklase gekoppelt sind. Zu diesen Rezeptoren

gehören speziesabhängig u.a. der durch Bindung von Katecholaminen aktivierte β -adrenerge Rezeptor (LAFONTAN UND BERLAN, 1993), der Thyrotropinrezeptor (JANSON *et al.*, 1998) und der Adrenocorticotropin-Rezeptor (OELOFSEN UND RAMACHANDRAN, 1983). Die Adenylatzyklase als Effektor katalysiert die Bildung von 3'-5'-zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP), welches als *second messenger* ein weit verbreitetes Signalmolekül darstellt und vorwiegend über die Aktivierung von Proteinkinasen wirkt. Über den intrazellulären cAMP-Spiegel wird die Aktivität einer ubiquitär vorkommenden Serin/Threonin-Kinase, der Proteinkinase A (PKA), kontrolliert. In Abwesenheit von cAMP liegt die PKA als inaktives tetrameres Holoenzym vor, das aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (*catalytic*; C) Untereinheiten als C_2R_2 besteht. In diesem Holoenzym ist die katalytische Aktivität durch ein inhibitorisches Strukturelement der regulatorischen Untereinheit blockiert. Ein ansteigender cAMP-Spiegel hat die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten und die Dissoziation der beiden einzelnen katalytischen Untereinheiten vom inhibitorischen R-Dimer zur Folge. Die so aktivierten C-Untereinheiten phosphorylieren unterschiedliche intrazelluläre Zielproteine. In Säugern sind die folgenden PKA-Untereinheiten bekannt: RI α , RI β , RII α , RII β , C α , C β und C γ (DØSKELAND *et al.*, 1993).

Die beiden wichtigsten Zielproteine, die nach lipolytischer Stimulation in Adipozyten von der PKA phosphoryliert werden, sind die Hormon-sensitive Lipase (HSL; 1.3.1) und Perilipin (1.3.2). Die Phosphorylierung der HSL bewirkt ihre Translokation aus dem Zytosol an die Oberfläche der Lipidtröpfchen. Die Phosphorylierung von Perilipin führt zu physikalischen Veränderungen auf der Oberfläche der Lipidvesikel. Dadurch werden die Tri- und Diglyceride für die HSL besser verfügbar und unter Mitwirkung der Monoglyceridlipase (FREDRIKSON *et al.*, 1986) zu freien Fettsäuren und Glycerol hydrolysiert, welche an das Plasma abgegeben werden.

Der Abbau von cAMP zu 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) erfolgt durch Phosphodiesterasen. In Adipozyten bewirkt die Stimulation des Insulinrezeptors eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase und der cGMP-inhibierten cAMP Phosphodiesterase Kinase (cGI PDE IK), was zur Aktivierung der cGMP-inhibierten Phosphodiesterase 3B führt (RAHN *et al.*, 1994). Somit stellt Insulin durch Verringerung des cAMP-Spiegels einen wichtigen Gegenspieler der Hormon-induzierten Lipolyse in Adipozyten dar (ERIKSSON *et al.*, 1995). Neben der Wirkung von Insulin auf den cAMP-Spiegel, die auch eine Dephosphorylierung der HSL zur Folge hat, werden weitere, durch Insulin aktivierte Proteinphosphatasen diskutiert, die cAMP-unabhängig den Phosphorylierungszustand der HSL (STRALFORS UND HONNOR, 1989) und von Perilipin (EGAN *et al.*, 1990) beeinflussen.

Im Gegensatz zu der Aktivierung der Lipolyse durch die Stimulation G_s-Protein-gekoppelter Rezeptoren können auch Rezeptoren aktiviert werden, die an inhibitorische G_i-Proteine gekoppelt sind und die Adenylatzyklase inhibieren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren durch Bindung entsprechender Liganden führt zur Inhibition der Katecholamin-induzierten Lipolyse. Zu diesen zählen adrenerge α_2 -Rezeptoren (LAFONTAN UND BERLAN, 1980), der Adenosin-A1-Rezeptor (WAHRENBERG *et al.*, 1989) und der Prostaglandin E₂-Rezeptor (RICHELSEN *et al.*, 1984).

Neben der PKA-vermittelten Lipolyse existieren weitere Mechanismen, die in Adipozyten zur Freisetzung von Fettsäuren und Glycerol führen. So lösen natriuretische Peptide, zu denen das atriale natriuretische Peptid (ANP) zählt, primatenspezifisch in humanen Adipozyten Lipolyse aus (SENGENÈS *et al.*, 2000). Diese Peptide aktivieren den Guanylatzyklaserzeptor A, was zu einer Erhöhung des intrazellulären 3'-5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) -Spiegels führt. cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I). Ebenso wie die durch cAMP aktivierte PKA phosphoryliert PKG I die beiden an der Lipolyse beteiligten Proteine HSL und Perilipin. Die PKA ist an der durch natriuretische Peptide ausgelösten Lipolyse nicht beteiligt (SENGENÈS *et al.*, 2003).

Weiterhin wird die Beteiligung des ERK 1/2 (extrazellulär regulierte Kinase)-Signalweges an der Lipolyse diskutiert. Die extrazellulär regulierten Kinasen gehören zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Diese besteht aus drei Subfamilien: (1) der auch als p42/44 MAPK bezeichneten extrazellulär regulierten Kinase, (2) den Jun aminoterminalen Kinasen/Stress-aktivierten Kinasen (JNKs/SAPKs) und (3) den p38 MAP-Kinasen, die alle einer Kaskade aus drei Proteinkinasen angehören und in ähnlich strukturierte Signalwege eingebunden sind. Am Anfang der Signalübertragung durch MAPK-Proteine stehen Raf-Kinasen, von denen u.a. die Isoformen c-Raf (Raf-1) und B-Raf bekannt sind. Die Aktivierung der Raf-Kinase kann zum einen über Ras-Proteine erfolgen, die Signale von Rezeptor-Tyrosinkinasen, Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen sowie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren empfangen und diese an die MAPK weiterleiten. Zum anderen kann die Raf-Kinase Ras-unabhängig über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden. Eine dritte Möglichkeit, über die es zum Ansprechen des MAPK-Signalweges kommen kann, ist die Ras-unabhängige Signalübertragung über den cAMP/PKA-Signalweg in Abhängigkeit von der B-Raf-Kinase.

Die aktivierten Raf-Kinasen gehören zu den sogenannten MAPK-Kinasen-Kinasen (MAPKKK), die zur Phosphorylierung der MAPK-Kinasen (MAPKK) führen, die auch als MAPK/ERK-Kinasen (MEK) bezeichnet werden. MEK wiederum aktiviert die MAPK-Proteine. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die MAPK-Signalwege.

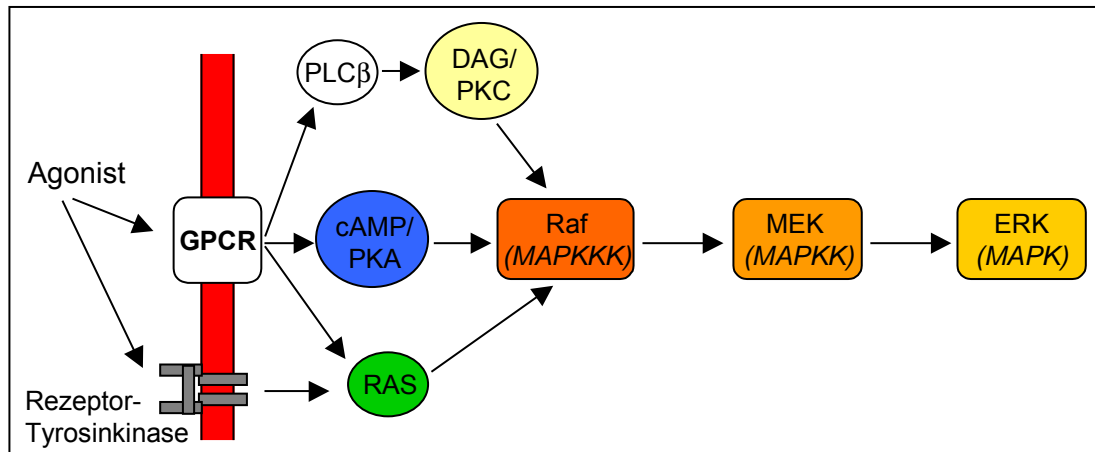


Abbildung 3 Vereinfachtes Schema der Aktivierung der MAPK-Kaskade. Die Phosphorylierung der Raf-Kinase kann durch Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren über die Ras, durch Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges oder durch Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) mit nachfolgender Stimulation der PKC durch Diacylglycerol (DAG) erfolgen. Die aktivierte Raf-Kinase führt über Aktivierung der MAPK/ERK-Kinasen (MEK) zur Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK). GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor. [Quelle: eigene Erstellung]

Die zentrale physiologische Funktion der MAPK-Signalwege besteht in der Phosphorylierung und Aktivierung von genregulatorischen Proteinen oder von Enzymen, die wichtige Rollen u.a. bei der Zellproliferation (PAGES *et al.*, 1993) und bei der Differenzierung von Zellen wie der Adipogenese (PRUSTY *et al.*, 2002) spielen.

Eine Phosphorylierung von ERK konnte in Adipozyten durch Stimulation des G-Protein-gekoppelten β_3 -adrenergen Rezeptors gezeigt werden (MIZUNO *et al.*, 1999), es wurde aber kein Zusammenhang zu der lipolytischen Wirkung des verwendeten β_3 -Rezeptoragonisten gefunden. Die Aktivierung der PKC durch ein Diacylglycerolderivat in 3T3-L1 Adipozyten führt jedoch über die Raf-Kinase zur Aktivierung von ERK und zu einer erhöhten Glycerolfreisetzung, was mit einer HSL-Phosphorylierung durch die MAPK in Zusammenhang gebracht wird (FRICKE *et al.*, 2004; GREENBERG *et al.* 2001).

Zu weiteren Faktoren, welche die Aktivierung des MAPK-Signalweges induzieren, zählen die Zytokine TNF- α und Interleukin-6, die neben anderen physikalischen Funktionen auch eine lipolytische Wirkung auf Fettzellen ausüben (VAN HALL *et al.*, 2003), die mit der ERK-Aktivierung in Zusammenhang gebracht wird (RYDEN *et al.*, 2002).

Eine schematische Übersicht der hier beschriebenen Signaltransduktionsmechanismen, die in die Regulation der Lipolyse in Adipozyten eingebunden sind, ist in Abbildung 4 dargestellt.

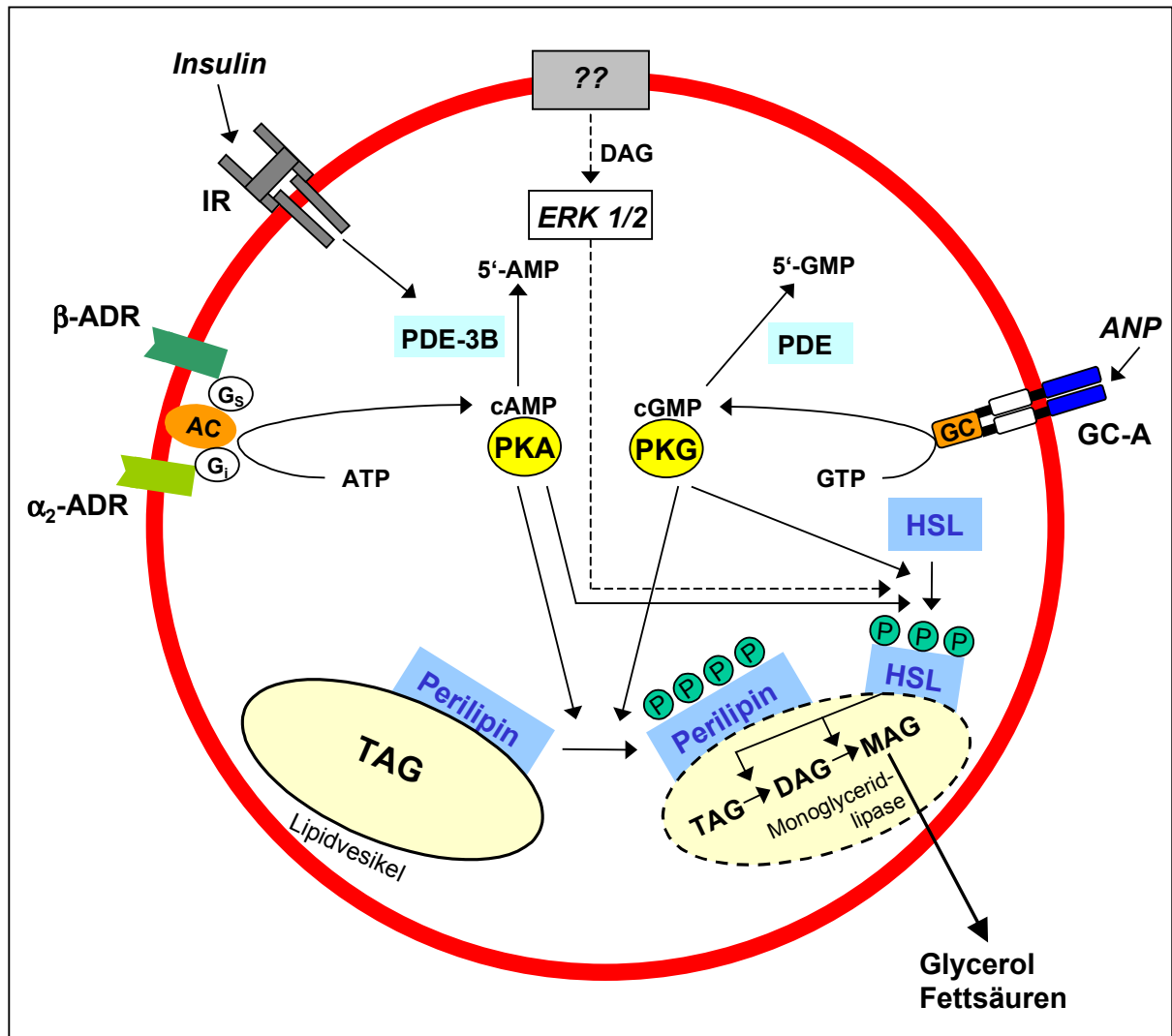


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Regulation der Lipolyse in Adipozyten. Die Bindung von Agonisten an β -adrenerge Rezeptoren (ADR), die über ein stimulatorisches G-Protein (G_s) an die Adenylatzyklase (AC) gekoppelt sind, führt zu einem ansteigenden cAMP-Spiegel. Durch die daraus resultierende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kommt es zur Phosphorylierung von Perilipin und der Hormon-sensitiven Lipase (HSL), die aus dem Zytosol zur Oberfläche der Lipidvesikel transloziert. Die Perilipin-Phosphorylierung hebt die durch unphosphoryliertes Perilipin vermittelte Suppression der Lipolyse auf. Phosphorylierte HSL katalysiert die Hydrolyse von Triacyl- und Diacylglycerolen (TAG und DAG). Der Abbau von cAMP zu 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) wird durch die Phosphodiesterase 3B (PDE 3B) katalysiert, die durch Stimulation des Insulinrezeptors (IR) aktiviert wird. Ein vergleichbarer, zur Lipolyse führender Mechanismus wird durch Bindung von atrialem natriuretischen Peptid (ANP) an den Guanylatzyklase A-Rezeptor (GC-A) eingeleitet, was über die Guanylatzyklase (GC) die Erhöhung des cGMP-Spiegels und Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) sowie Phosphorylierung von HSL und Perilipin zur Folge hat. Die Aktivierung des extrazellulär regulierten Kinase (ERK)-Signalweges führt, möglicherweise durch Phosphorylierung von HSL, ebenfalls zur Lipolyse. $G_{i/s}$: inhibitorisches/stimulatorisches G-Protein; 5'-GMP: 5'-Guanosin-monophosphat; MAG: Monoacylglycerol.

1.3.1 Hormon-sensitive Lipase (HSL)

Die Hormon-sensitive Lipase (HSL) ist ein wichtiges Enzym im Prozess der Hormon-induzierten Lipolyse. Durch die lipolytische Stimulation von Fettzellen kommt es zur HSL-Phosphorylierung an Serinresten und zur Translokation der aktivierten HSL aus dem Zytosol an die Oberfläche der Lipidtröpfchen, wo sie die Hydrolyse von Acylglycerolen katalysiert.

Neben Acylglycerolen werden von der HSL auch Cholesterol-, Retinol-, Steroid- und wasserlösliche p-Nitrophenylester hydrolysiert (COOK *et al.*, 1982; WEI *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1988; TSUJITA *et al.*, 1989). Das Enzym besitzt jedoch keine Phospholipaseaktivität. Bis heute sind mehrere HSL-Isoformen bekannt, deren Molekulargewichte zwischen 84 und 130 kDa liegen (HOLM, 2003). Die in Adipozyten vorkommende Isoform besitzt ein Molekulargewicht von 84 kDa und ist mit der Isoform aus Nebenniere, Herz- und Skelettmuskel identisch (COOK *et al.*, 1982; LANGFORT *et al.*, 1999). Weiterhin gibt es eine Testis-spezifische Isoform mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa (HOLST *et al.*, 1996) und eine dritte Isoform in den Inselzellen des Pankreas (MULDER *et al.*, 1999). Es liegen jedoch keine Homologien zu Pankreaslipasen wie der Lipoproteinlipase vor.

Im Gegensatz zu anderen Lipasen wird die Hydrolyseaktivität der HSL durch reversible Phosphorylierung reguliert. Verändert wird dadurch nur das Ausmaß der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Cholesterolestern; die Hydrolyse von Di- und Monoacylglycerolen und wasserlöslichen Substraten bleibt unverändert (KHOO *et al.*, 1974).

Lange Zeit wurde angenommen, dass es in der katalytischen Domäne der HSL eine einzige PKA-Phosphorylierungsstelle am Serinrest 563 gibt. Die Mutation dieses Serinrestes durch Austausch gegen Alanin führte jedoch nicht, wie vermutet, zu einer signifikanten Veränderung der Aktivierbarkeit der HSL durch PKA-Phosphorylierung. ANTHONSEN *et al.* (1998) zeigten im HSL Molekül der Ratte an den Serinresten an Position 659 und 660 weitere PKA-Phosphorylierungsstellen. Der Austausch dieser Serinreste gegen Alanin bewirkte in beiden Fällen einen Verlust der Aktivierbarkeit der HSL *in vitro* (ANTHONSEN *et al.*, 1998) sowie die Inhibition der HSL-Translokation *in vivo* (SU *et al.*, 2003). Die PKA-vermittelte Aktivierung und Translokation der HSL wird folglich vor allem durch Phosphorylierung der Serinreste 659 und 660 beeinflusst. Die HSL besitzt weiterhin eine Phosphorylierungsstelle für extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) am Serinrest 600, deren Aktivierung zu erhöhter HSL-Aktivität führt (GREENBERG *et al.*, 2001).

Durch lipolytische Stimulation von Adipozyten kommt es zu einer Translokation der phosphorylierten HSL aus dem wässrigen Zytosol zur Oberfläche der Lipidtröpfchen. Dies wurde durch subzelluläre Fraktionierung nach Zentrifugation von EGAN *et al.* (1992) gezeigt.

Während die HSL in unstimulierten Adipozyten nach Zentrifugation im Überstand vorliegt, ist sie in Katecholamin-stimulierten Adipozyten ausschließlich in der Lipidfraktion detektierbar.

Der Phänotyp HSL-defizienter Mäuse zeigt eine nahezu unbeeinflusste Basallipolyse der Adipozyten gegenüber Wildtyptieren, was darauf hindeutet, dass es eine oder mehrere zusätzliche Lipasen gibt, welche die fehlende HSL-Wirkung diesbezüglich kompensieren. Aufgrund der Akkumulation von Diacylglycerolen in den Adipozyten dieser Tiere wird davon ausgegangen, dass diese zusätzlichen Triglyceridlipasen nur in geringem Maße Diacylglycerole hydrolysieren (HAEMMERLE *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur wenig veränderten Basallipolyse in diesen Adipozyten bleibt die erhöhte Glycerolfreisetzung nach Stimulation mit Katecholaminen nahezu aus, und die Freisetzung unveresterter Fettsäuren ist vermindert (OSUGA *et al.*, 2000). HSL-defiziente Mäuse entwickeln interessanterweise keine Anzeichen von Übergewicht. Männliche Tiere entwickeln jedoch Infertilität, da aufgrund einer stark verringerten Cholesterolesteraseaktivität in ihren Testes eine verminderte Steroidbiosynthese erfolgt und sich Cholesterolester, die als Ausgangsstoffe zur Steroidsynthese dienen, anreichern (OSUGA *et al.*, 2000). Dies weist darauf hin, dass die HSL neben der Rolle in der Regulation der Lipolyse auch weitere wichtige physiologische Funktionen besitzt.

1.3.2 Perilipin

Neben der Hormon-sensitiven Lipase sind die Perilipine wichtige Proteine, die nach lipolytischer Stimulation von Adipozyten durch die PKA phosphoryliert werden und eine weitere Schlüsselrolle im Prozess der Lipolyse einnehmen. Perilipine werden in hohem Maße in Adipozyten exprimiert (GREENBERG *et al.*, 1991). Dort befinden sie sich an der Oberfläche bzw. in der Peripherie der Lipidtröpfchen (BLANCHETTE-MACKIE *et al.*, 1995), wonach sie auch benannt wurden. Außer in Adipozyten konnten Perilipine in höherem Ausmaß nur in Zellen, in denen die Synthese von Steroiden aus Cholesterolestern erfolgt, wie z.B. in den Leydigzellen des Hodens, nachgewiesen werden (SERVETNICK *et al.*, 1995). Auch in diesen Zellen liegen Lipidtröpfchen vor, und die Cholesterolester werden von einer mit der HSL identischen Lipase hydrolysiert (COOK *et al.*, 1982).

Bisher sind drei Perilipin-Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen einer mRNA entstehen. Perilipin A wird hauptsächlich in Adipozyten und steroidsynthetisierenden Zellen exprimiert. Perilipin B kommt ebenfalls in Adipozyten vor, während Perilipin C ausschließlich in steroidsynthetisierenden Zellen nachgewiesen wurde (SERVETNICK *et al.*, 1995). Perilipin A und B besitzen ähnliche N-Termini, jedoch unterschiedliche C-terminale Domänen (GREENBERG *et*

al., 1993). Die Molekulargewichte von Perilipin A und B betragen etwa 57 bzw. 46 kDa, und das Protein besitzt sechs PKA-Phosphorylierungsstellen (GREENBERG *et al.*, 1993).

Aufgrund des hohen Vorkommens von Perilipin in Adipozyten und seiner Phosphorylierung durch die PKA nach lipolytischer Stimulation lag bereits kurz nach der Entdeckung des Perilipins die Vermutung nahe, dass dieses Protein eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel spielt. Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass erst die Perilipin-Phosphorylierung nach Stimulation zur Auslösung der maximalen lipolytischen Aktivität führt, während Perilipin im unphosphorylierten Zustand als Suppressor der Basallipolyse fungiert, indem es die Hydrolyserate von Triacylglycerolen vermindert. Untersucht wurde dies in fibroblastären 3T3-L1 Präadipozyten, die selbst kein Perilipin exprimieren und im Gegensatz zu ausgereiften Adipozyten sehr kleine Lipidtröpfchen besitzen. In diesen Adipozyten-Vorläuferzellen wurde ektopisch Perilipin A exprimiert (BRASAEMLE *et al.*, 2000). Perilipin fand sich daraufhin ausschließlich an den Lipidtröpfchen, deren Anzahl ebenso wie die Menge an gespeicherten Triglyceriden im Gegensatz zu Kontrollzellen höher war.

SZTALRYD *et al.* (2003) zeigten, dass die Expression von Perilipin notwendig für die PKA-induzierte Translokation der HSL aus dem Zytosol zur Oberfläche der Lipidtröpfchen (1.3.1) ist. Diese ist in Adipozyten von Perilipin-defizienten Mäusen unterbunden, und eine nur schwache Erhöhung der Glycerolfreisetzung nach Stimulation mit Isoproterenol ist die Folge. Auch eine Verringerung der Perilipinexpression, hervorgerufen durch TNF- α nach längerer Stimulation, führt zur Lipolyse, was durch eine Überexpression von Perilipin A und B unterbunden werden kann (SOUZA *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur Katecholamin-induzierten Lipolyse, die bereits nach wenigen Stunden messbar ist, setzt der Eingriff in die Proteinexpression durch TNF- α erst nach langfristiger Stimulation ein.

Auch die Rolle von Perilipin *in vivo* wurde durch die Generierung Perilipin-defizienter Mäuse näher untersucht (TANSEY *et al.*, 2001). Trotzdem die aufgenommene Nahrungsmenge im Vergleich zu Wildtypmäusen gleich ist, bilden Perilipin-defiziente Mäuse nur etwa 30 % der Masse an Fettgewebe von Wildtypmäusen aus. Im Gegensatz dazu ist der Plasma-Leptinspiegel, der mit der Fettmasse korreliert, trotz der verringerten Fettmasse höher. Weiterhin bewirkt das Fehlen von Perilipin *in vivo* zwar eine Resistenz gegen ernährungsbedingtes Übergewicht, doch ist die Tendenz zu Glucoseintoleranz und peripherer Insulinresistenz erhöht.

1.4 Physiologische Bedeutung des Fettsäurestoffwechsels

Der Fettsäurestoffwechsel im Körper unterliegt einer komplexen Steuerung, in die, wie bereits beschrieben, eine Vielzahl verschiedener Regulationsmechanismen eingreift. Da die Fettsäuren maßgeblich das dem Körper zur Verfügung stehende Energiedepot ausmachen, steht der Fettsäurestoffwechsel in engem Zusammenhang zum Energiehaushalt des Körpers. Dieser wiederum ist eng mit dem Ausmaß der Nahrungsaufnahme verbunden.

Das Essverhalten wird vom Gehirn mitreguliert. Es erhält einerseits Sättigungssignale, z.B. durch Cholecystokinin (CCK) oder Gastrin, vom Gastrointestinaltrakt und verarbeitet andererseits von Adipozyten ausgehende Signale wie das Leptin, die in Nahrungsaufnahme und Appetitregulation eingreifen (Abbildung 5). Hier kommt es auch zur Bildung des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons (α -MSH), die durch Leptin gesteuert wird (Thornton *et al.*, 1997). Die zentrale Applikation eines α -MSH-Derivates führt in Nagern zur Verringerung der Nahrungsaufnahme und zu einer Steigerung des Energieverbrauchs (HWA *et al.*, 2001).

Weiterhin wird über die Nahrungsaufnahme und den damit verbundenen Insulinspiegel die Lipolyse der Adipozyten mitgesteuert (1.3). Diese ist auch im basalen, unstimulierten Zustand der Adipozyten in geringem Maße vorhanden, da die in den Fettzellen gespeicherten Triglyceride einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen (Basallipolyse).

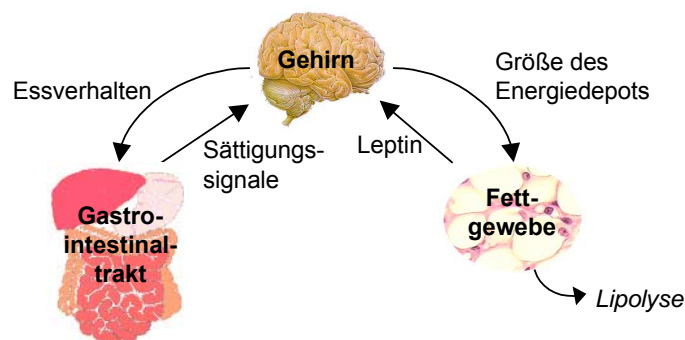


Abbildung 5 Zentrale und periphere Regulierung der Nahrungsaufnahme und des Energiedepots. Während das vom Fettgewebe sezernierte Leptin im Gehirn zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme führt, steuert das Gehirn auch über postprandiale Sättigungssignale aus dem Gastrointestinaltrakt den Energiehaushalt. [Quelle: eigene Erstellung]

Ist die Menge an Fettgewebe und damit das Körpergewicht krankhaft erhöht und somit ein Ungleichgewicht von Energieaufnahme und -verbrauch vorhanden, spricht man von Fettsucht oder Adipositas. Während Übergewicht sich durch einen *Body Mass Index* (BMI) von 25 bis 30 kg/m² auszeichnet, ist ein BMI von über 30 kg/m² ein Kriterium für Adipositas. Sowohl das Zustandekommen von Adipositas auf molekularer Ebene als auch mögliche Behandlungsstrategien sind derzeit Gegenstand der Forschung, da Adipositas inzwischen

nicht mehr nur als kosmetisches, sondern als globales gesundheitliches Problem eingestuft wird. Liegt Adipositas vor, ist die Basallipolyse des Fettgewebes erhöht, wobei die catecholamin-stimulierte Lipolyse nahezu ausbleibt (HOROWITZ UND KLEIN, 2000). Zu den weiteren pathologischen (Folge-) Erscheinungen zählen Insulinresistenz und damit verbunden Typ II Diabetes sowie kardiovaskuläre Erkrankungen, die als metabolisches Syndrom zusammengefasst werden. Die Insulinresistenz hat ihre Ursache meist in der durch einen stark erhöhten Insulinspiegel hervorgerufenen verminderten Insulinrezeptordichte. Da der Anteil stark übergewichtiger bzw. adipöser Patienten unter den Typ II-Diabetikern besonders hoch ist, spielt die Verminderung des Körpergewichtes bei der Behandlung von Typ II-Diabetes eine wichtige Rolle.

Mögliche Strategien zur Behandlung von Adipositas befassen sich mit der Verringerung der Nahrungs- bzw. Fettaufnahme und der Steigerung des Energieverbrauchs. Die beiden einzigen derzeit für diese Indikation zur Verfügung stehenden Arzneimittel sind Xenical[®] mit dem Wirkstoff Orlistat sowie Reductil[®], dessen wirksamer Bestandteil Sibutramin ist. Orlistat ist ein spezifischer Inhibitor gastrointestinaler Lipasen und verhindert damit die Hydrolyse der mit der Nahrung aufgenommenen Triglyceride. Sibutramin ist ein Noradrenalin-, Serotonin- und Dopaminwiederaufnahmehemmer, dessen pharmakologischer Effekt sich durch eine Verstärkung des Sättigungsgefühls und eine Verringerung der Nahrungsaufnahme auszeichnet.

Aufgrund der bereits gesteigerten Basallipolyse in adipösen Patienten wird der Einsatz von lipolytischen Substanzen in Verbindung mit der Gewichtsreduktion kontrovers diskutiert. Allerdings könnte eine Induktion der Lipolyse bei gleichzeitigem Energieverbrauch, d. h. bei gleichzeitiger Fettsäureoxidation, eine wichtige Behandlungsstrategie der Adipositas darstellen. Verschiedene β_3 -adrenerge Rezeptoragonisten wie CL 316,243 und BRL 26830A mit derartigen Eigenschaften (WEYER *et al.*, 1998; CONNACHER *et al.*, 1988) wurden bereits in klinischen Studien am Menschen getestet, doch teilweise aufgrund von ausbleibender Wirkung, des Auftretens von starken Nebenwirkungen und strategischer Überlegungen nicht weiterentwickelt.

Das Auffinden weiterer körpereigener Substanzen, die eine Rolle im Energiehaushalt spielen, indem sie z.B. die Freisetzung unveresterter Fettsäuren aus Adipozyten beeinflussen, eröffnet somit eine Möglichkeit, einen tieferen Einblick in die komplexe Steuerung des körpereigenen Fettsäurestoffwechsels zu gewinnen.

1.5 Gewebe- und Hämofiltratpeptidbanken als Quelle zur Isolierung regulatorischer Substanzen

Peptide spielen in der Diagnose und Therapie menschlicher Erkrankungen eine wichtige Rolle und werden bereits zur Behandlung vieler Krankheiten eingesetzt. Als Beispiel seien rekombinantes Insulin gegen Diabetes mellitus, Faktor VIII zur Therapie der Hämophilie A, Wachstumshormon gegen Kleinwuchs oder Parathormon zur osteoanabolen Therapie genannt. Bisher erfolgt die Behandlung derartiger Krankheiten in erster Linie durch die Substitution von Substanzen, die den körpereigenen Peptiden analog sind. Die Entwicklung solcher neuer Arzneistoffe auf der Basis von endogenen Peptiden beginnt mit der Suche nach derartigen Stoffen in z. B. Blutplasma oder bestimmten Geweben und der Identifizierung ihrer Primärstruktur und Funktion.

Die größte Quelle zur Isolierung humaner regulatorischer Peptide ist das menschliche Blut (FORSSMANN *et al.*, 1993). Alle zirkulierende Peptide werden als endokrine Faktoren in den Blutstrom sezerniert, oder sie gelangen durch Diffusion vom interstitiellen in den vaskulären Raum (FORSSMANN, 1996). Ein Großteil regulatorischer Peptide ist deshalb zwar im Plasma zu finden, jedoch zirkulieren diese zumeist nur in pikomolaren Konzentrationen. Dies und auch das ungünstige Verhältnis zwischen regulatorischen Peptiden und anderen, in viel größeren Mengen vorkommenden Plasmaproteinen wie z. B. Albumin bedeutet, dass für die Isolierung solcher bioaktiver Substanzen große Mengen an Blut bzw. Plasma benötigt werden, die der Forschung nur in sehr begrenzten Mengen zur Verfügung stehen. Von FORSSMANN *et al.* (1986) konnte jedoch gezeigt werden, dass humanes Hämofiltrat (HF) eine dem Plasma vergleichbare Quelle zur Identifizierung und Isolierung bioaktiver Substanzen ist, indem es gelang, α -atriales natriuretisches Peptid (α -ANP) aus Hämofiltrat zu isolieren. Dieses Konzept zur Isolierung von Peptiden aus Hämofiltrat wurde bei der IPF PharmaCeuticals GmbH in größerem Maßstab realisiert und Extraktionsverfahren sowie Analysemethoden etabliert (FORSSMANN *et al.*, 1993). Hämofiltrat entsteht als Abfallprodukt bei der Blutwäsche chronisch niereninsuffizienter Patienten in nephrologischen Kliniken und ist dadurch in großen Mengen erhältlich. Es enthält Peptidhormone in ähnlichen Konzentrationen wie sie auch im Blutplasma vorhanden sind (SCHEPKY *et al.*, 1994). Dabei sind hochkonzentrierte Blutproteine wie z. B. Hämoglobin nur noch in sehr geringen Konzentrationen enthalten. Routinemäßig werden bei der IPF PharmaCeuticals GmbH Hämofiltrat-Chargen von 10.000 l aufgearbeitet und daraus durch zwei Kationenaustauschchromatographien und eine nachfolgende Reversed-Phase-Chromatographie Peptidbanken generiert. Diese setzen sich aus etwa 300 bis 450 Fraktionen zusammen, denen Aliquots für die Untersuchung auf verschiedene biologische Aktivitäten entnommen werden (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997).

Des Weiteren wurde die Herstellung von Peptidbanken aus Gewebekomponenten wie Gehirn, Plazenta, Thymus und Sperma bei der IPF PharmaCeuticals GmbH entwickelt, so dass nicht

nur zirkulierende Formen bioaktiver Peptide aus Hämofiltrat, sondern auch gewebsspezifische biologisch aktive Substanzen isoliert werden konnten (SEILER *et al.*, 1999).

Die Vielzahl von Substanzen wie z. B. zirkulierendes Guanylin und Uroguanylin (KUHNS *et al.*, 1993; HESS *et al.*, 1995), Chemokine (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1996) sowie TIG-2 (*tazarotene-induced gene-2*) und Hämorphine als Orphanrezeptorliganden (MEDER *et al.*, 2004; LAMMERICH *et al.*, 2003), die aus derartigen Peptidbanken isoliert wurden, zeigt deren breite Verwendbarkeit auf diesem Gebiet.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue endogene Peptide zu isolieren, die in Adipozyten eine lipolytische Wirkung besitzen. Dazu sollte zunächst ein Lipolyse-Test im 96-Loch Mikrotiterplattenformat entwickelt werden, der zur effizienten, systematischen Suche nach lipolytischen Substanzen in etablierten Peptidbanken geeignet ist. Aufgrund der beschriebenen Beeinflussung von Energiehaushalt und Fettstoffwechsel durch Faktoren, die im Gehirn, im Magen-Darm-Trakt und in der Zirkulation vorliegen, sollten für das initiale Screening etablierte Peptidbanken aus Schweinehirn, Schweinemagen und humanem Hämofiltrat verwendet werden. Nach Verifizierung sollten mit diesem Test detektierte lipolytische Aktivitäten mittels präparativer Chromatographie gereinigt und anschließend identifiziert werden. Die isolierten Substanzen sollten näher pharmakologisch charakterisiert und die durch sie ausgelöste Signaltransduktion in dem verwendeten Testsystem untersucht werden. In einem zweiten Teil der Arbeit sollten Untersuchungen zu weiteren Signalwegen, deren Aktivierung in Fettzellen mit einer erhöhten Glycerolfreisetzung in Zusammenhang gebracht wird, in 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt werden. Hierzu sollte zunächst eine Identifizierung solcher die Lipolyse beeinflussender Substanzen stattfinden und anschließend ihre Signalweiterleitung untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Thermostabile wässrige Lösungen und Gebrauchsgegenstände (Glaswaren, Polypropylen-Pipettenspitzen) wurden 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3.021001, Schütt Labortechnik, Göttingen) sterilisiert. Lösungen, die nicht mit feuchter Hitze behandelt werden konnten, wurden über Cellulose-Acetat-Phthalat (CAP)-Membranfilter sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, Porengröße 0,22 µm). Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore, Eschborn) angesetzt. Glas-, Keramik- und Metallwaren wurden für 4 h bei 180 °C trockener Hitze entkeimt.

2.1.1 Geräte und Apparaturen

Für die experimentellen Arbeiten wurden autoklavierte Polypropylen-Einwegartikel (z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) bzw. Glasmaterialien verwendet. Neben laborüblichen Standardgeräten wie Präzisionspipetten, Heizplatten, Magnetrührern u.ä. wurden, soweit nicht anders angegeben, folgende Geräte verwendet:

Inkubationsschrank	IG150 CO ₂ Inkubator der Fa. Jouan, Winchester, VA, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot der Fa. Zeiss, Oberkochen
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 der Fa. Christ, Osterode
Mikroskop	Invertoskop ID03 der Fa. Zeiss, Oberkochen
Mikrotiterplatten-Reader	MRX-II MTP-Reader, in Verbindung mit der Revelation Software Version 4.22 der Fa. Dynex Tech., Chantilly, VA, USA
pH-Meter	CE 804 der Fa. Schott, Mainz
Proteingelelektrophorese	Xcell SureLock Elektrophoresezellen der Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Sterilbank	Sterilbank 8511 der Fa. Köttermann, Uetze/Häningsen
Ultraschallgerät	Vibra cell der Fa. Sonics & Materials, Newtown, CT, USA
Waagen	Laborwaage LC 2200 S der Fa. Sartorius, Göttingen Analytikwaage AC 120 S der Fa. Sartorius, Göttingen Feinwaage Supermicro der Fa. Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K der Fa. Hettich, Henningen Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS der Fa. Heraeus, Hanau Kühlzentrifuge Rotixa/RP der Fa. Hettich, Henningen Vakuum-Zentrifuge Univapo 150H der Fa. Uni-Equip, Martinsried

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Handschuhe, Pipettenspitzen, Glaswaren u. ä. wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Nürnberg), Nunc (Wiesbaden), Roth (Karlsruhe) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Die für die Reagenzienherstellung und Chromatographie benötigten Lösungsmittel und Feinchemikalien besaßen Analysequalität und

wurden, soweit nicht anders angegeben, ausschließlich von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.3 Verwendete Peptidbanken

Für das initiale Screening nach lipolytischen Faktoren wurden eine humane Hämofiltratbank, eine Peptidbank aus Gesamthirn vom Schwein sowie eine Schweinemagen-Peptidbank verwendet, die von der Abteilung für präparative Peptidchemie der IPF PharmaCeuticals GmbH zur Verfügung gestellt wurden.

Die Herstellung der humanen Hämofiltrat-Peptidbank erfolgte aus 20.000 l Hämofiltrat nach Ultrafiltration über ein 50.000 kDa-Modul (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997). Die Peptidbank aus Gesamthirn vom Schwein wurde aus 20 kg Material gewonnen, welches wie beschrieben aufgearbeitet wurde (SEILER *et al.*, 1999). Nach diesem Verfahren wurde auch die Schweinemagen-Peptidbank aus 120 Mägen hergestellt.

2.1.4 Genutzte Datenbanken, Software und Statistik

Für die Recherche in öffentlichen Internetdatenbanken wurde der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)-Server und dessen BLAST-Algorithmus (*Basic Local Alignment Search Tool*, ALTSCHUL *et al.*, 1997) genutzt. Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm Protein Prospector (Version 3.2.1, University of California, San Francisco, USA) mit den aktuellen Datenbanken abgeglichen. Daten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit mindestens drei Replika wurden statistisch mit dem Programm GraphPad Prism (Version 3.0 for Windows; GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Die im Ergebnisteil dargestellten Fehlerbalken stellen Standardabweichungen (SD) dar, die nach folgender Formel berechnet wurden:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2}{n - 1}}$$

(y_i = Einzel-Messwerte; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Summe der Einzel-Messwerte, n = Anzahl der Replika)

Statistische Signifikanzen wurden durch ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni-Posthoc-Test für multiple Vergleiche erhoben. Als Kriterium für Signifikanz wurde $p < 0,05$ als Grenze definiert. Die planimetrische Auswertung der aus Immunoblotanalysen erhaltenen spezifischen Proteinsignale erfolgte mit Hilfe des Programms QuantiScan (Biosoft, Cambridge, GB).

Zur Erstellung der Arbeit fanden weiterhin das Microsoft Office Paket, CorelDraw 6 und Adobe Photoshop 5.0 Verwendung.

2.2 Chromatographische Methoden

Die gefriergetrockneten Peptidbankfraktionen wurden für den ersten Isolierungsschritt in entionisiertem Wasser gelöst und die unlöslichen Bestandteile mittels Filtration durch einen Membranfilter (Porengröße 0,45 µm; Schleicher & Schuell, OE 520 a, Dassel) abgetrennt. Die Elutionsmittel wurden vor der Verwendung für 10 min im Heliumstrom entgast. Die Trennung der Peptidgemische erfolgte sowohl bei der Reversed-Phase-Chromatographie (2.2.1) als auch bei der Kationenaustauschchromatographie (2.2.2) ausschließlich über Gradientenelution durch einen linearen Anstieg von Eluent B im Elutionsmittel. Gradient und Detektionswellenlänge sind bei den jeweiligen Chromatogrammen angegeben. Die Fraktionierung der Eluate erfolgte mit den Fraktionssammlern 2110 und 2128 der Fa. BioRad (München). Nach Verwendung wurden die Chromatographiesäulen in 30 % (v/v) Methanol gelagert.

2.2.1 Umkehrphasen HPLC (Reversed-Phase HPLC, RP-HPLC)

Für die Isolierung verwendete Fraktionen der vorangegangenen Chromatographieschritte wurden im Verhältnis 1:5 mit dem entsprechenden Eluenten A verdünnt und auf die stationäre Phase aufgetragen. Alle für die Trennung verwendeten Säulen sowie die Chromatographieanlagen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Elutionsmittel für die RP-Chromatographie ist in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 1 Verwendete RP-Chromatographiesäulen und HPLC-Anlagen.

Säulenmaterial	Flussrate	Chromatographieanlage
Fineline RPC Polymer, 100 x 155 mm, Å n. b., 15 µm, Amersham (Braunschweig)	150 ml/min	BioCad 250, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Bakerbond Prep Pak RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15-30 µm, Waters (Milford, USA)	30 ml/min	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Source RP C-15, 20 x 150 mm, 300 Å, 5 µm, Pharmacia (Freiburg)	4 ml/min	Kontron 420 (Neufahrn)
Protein & Peptides C-18, 10 x 250 mm, 300Å, 5 µm, Vydac (Hesperia, CA, USA)	1,8 ml/min	Kontron 420 (Neufahrn)
YMC ODS AQ C-18, 10 x 250 mm, 300Å, 3 µm, YMC Europe (Scherbeck)	1,2 ml/min	Kontron 420 (Neufahrn)
Protein & Peptides C-18, 4,6 x 250 mm, 100 Å, 5 µm, Vydac (Hesperia, CA, USA)	0,7–0,8 ml/min	Kontron 420 (Neufahrn)

Tabelle 2 Fließmittelzusammensetzung für die RP-Chromatographie. Alle Angaben entsprechen Volumenprozenten (v/v) in wässriger Lösung.

Eluent A	Eluent B
1 mM HCl	1 mM HCl / 80 % ACN
10 mM HCl	10 mM HCl / 80 % ACN
10 mM HCl	10 mM HCl / 80 % MeOH
10 mM HCl	10 mM HCl / 90 % MeOH
0,1 % TFA	0,1% TFA / 80 % ACN

2.2.2 Kationenaustausch-HPLC

Für die Kationenaustausch-Chromatographie (CEC) erfolgte die Verdünnung der weiter aufzureinigenden Fraktionen mit Eluent A im Verhältnis 1:1 bis 1:2. Es wurden folgende Säulen und Chromatographieanlagen verwendet (Tabelle 3):

Tabelle 3 Verwendete CEC-Säulen und Chromatographieanlagen.

Säulenmaterial	Fließgeschwindigkeit	Chromatographieanlage
TSK SP 650 (S), 60 x 270 mm, Å n. b., 20-50 µm, Merck (Darmstadt)	50 ml/min	BioCad 250, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
PepKat, 20 x 150 mm, 1000 Å, 7 µm, Biotek (Östringen)	6 ml/min	Kontron 420 (Neufahrn)
PepKat, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm, Biotek (Östringen)	1,8 ml/min	Kontron 420 (Neufahrn)
PepKat, 4 x 125 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek (Östringen)	1 ml/min	Kontron 420 (Neufahrn)

Als Fließmittel dienten die in Tabelle 4 angegebenen Puffer.

Tabelle 4 Elutionspuffer für die Kationenaustauschchromatographie.

Puffer A	Puffer B
50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,5	1,5 M KCl / 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,5
50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 4,5	1,5 M NaCl / 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 4,5

2.2.3 Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie

Die Entsalzung der Proben erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie. Verwendet wurde eine 96-Loch-Extraktionsplatte (3M Empore™ 96 Well Extraction Disks, 3M Filtration Products, St. Paul, MN, USA), die zwischen zwei Fritten RP C-18 Material enthielt. Zum Entsalzen wurden entsprechende Aliquots der HPLC- Fraktionen mit Eluent A (0,1 % TFA) auf ein Volumen von 300 µl verdünnt und in die einzelnen Kavitäten pipettiert. Das gelöste Salz wurde durch Spülen mit 600 µl Eluent A von den gebundenen Peptiden abgetrennt.

Anschließend wurden die Peptide mit 600 µl Eluent B (0,1 % TFA / 80 % ACN) eluiert und das Eluat lyophilisiert. Die Extraktionsplatten wurden nach ihrer Verwendung mit 100 % ACN regeneriert und in 30 % Methanol gelagert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Aufnahme von MALDI-Massenspektren zur Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden erfolgte mit dem Flugzeit-Massenspektrometer Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Darmstadt), welches mit einem Stickstofflaser (337 nm) ausgestattet ist.

Durch Laserbeschuß erfolgt die Ionisierung der Proben. Die positiv geladenen Analytionen werden im angelegten Hochspannungsfeld (25 kV) beschleunigt und treten in die evakuierte Flugröhre ein. Nach der Detektion wird über die Flugzeit der Masse/Ladungsquotient (m/z) der Ionen berechnet, woraus das exakte Molekulargewicht der Analyten bestimmt wird.

Für die Messungen wurden jeweils 1 µl Matrixlösung und 1 µl salzfreie Probe auf den Probenträger pipettiert, gemischt und an der Luft getrocknet. Als Matrixsubstanz diente eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHC) und Fucose im Verhältnis 1:1, gelöst in 50 % ACN in 0,05 % TFA (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997).

Die Steuerung des Spektrometers sowie die Auswertung der Massenspektren erfolgten mit der zugehörigen Software des Herstellers (Voyager Biospectrometry Workstation 5.1).

2.3.2 Elektrospray-Quadrupol-Massenspektrometrie

Für die Aufnahme von Elektrospray-Massenspektren wurde das PE Sciex API 100 Single Quadrupol Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet.

Die Ionisation der Analytmoleküle aus der flüssigen Phase heraus erfolgt durch ein Hochspannungsfeld mit einer zwischen Nadel und Eintrittskapillare angelegten Potentialdifferenz von 4-5 kV. Durch einen Stickstoffstrom wird die Vernebelung der flüssigen Phase unterstützt. Die entstandenen positiv geladenen Ionen werden anschließend in dem mit Polypropylenglycol geeichten Quadrupol getrennt und auf einen Photomultiplier geleitet. Die Signale der Analytionen werden in Form ihres m/z -Wertes dargestellt.

Die lyophilisierte Probe wurde in 100 µl 50 % ACN in H₂O mit 0,2% Ameisensäure gelöst und in eine 100 µl-Spritze (Hamilton, Reno, NV, USA) aufgezogen. Die Lösung wurde dann über eine Kapillare ("fused silica", Ø 75 µm) mit einem Fluss von 5 µl/min in die Elektrospray-Ionenquelle eingebracht.

Die Durchführung der Messungen erfolgte mit dem Programm LC2-TUNE (Applied Biosystems), für die Auswertung der Spektren wurde das Programm BioMultiView (Applied Biosystems) verwendet.

2.3.3 Kapillaronenelektrophorese

Die Kapillaronenelektrophorese (CZE) wurde als hochauflösende Analysenmethode zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden eingesetzt. Die Trennung der Analytionen erfolgt dabei aufgrund von Mobilitätsunterschieden, die durch Größen- und Ladungsunterschiede der Ionen in einem angelegten Spannungsfeld entstehen.

Als Elektrophoresesystem wurde ein Gerät der Firma Beckman (P/ACE 2000, Beckman, München) verwendet. Zur Trennung der Peptide wurde eine 57 cm lange, unbeschichtete "fused silica" Kapillare (Typ TSP 075375, Composite Metal Services Ltd., UK) verwendet. Die Detektionswellenlänge betrug 214 nm.

Die Probe wurde durch Anlegen eines geringen Überdruckes für 30 s in die Kapillare injiziert. Die Messung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 20 kV, wobei die Kapillartemperatur mit einer Flüssigkühlung auf 25 °C eingestellt war. Als Puffer wurde 100 mM NaH₂PO₄ mit 0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose (pH 2,5) verwendet.

Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der P/ACE System MDQ Software (Beckman).

2.3.4 Peptidsequenzierung

Die Peptidsequenzierung erfolgte durch die klassische Aminosäuresequenzanalyse auf der Basis des Edman-Abbaus. Als Sequenziergerät diente ein automatischer Edman-Sequencer (Procise™ 494, Applied Biosystems, Darmstadt). Zur Sequenzierung wurde die Probe zwischen zwei Filterplättchen aus BioPren™ appliziert. In diesen Reaktionsraum wurden anschließend die verwendeten Reagenzien (Phenylisothiocyanat, TFA, Chlorbutan) gegeben. Die Detektion und Analyse der entstandenen Phenylthiohydantoinderivate der einzelnen Aminosäuren erfolgte mittels automatisierter RP-Chromatographie bei einer Wellenlänge von 256 nm. Die so getrennten Aminosäurederivate wurden durch Vergleich mit einem externen Standard, der die Phenylthiohydantoinderivate der natürlichen Aminosäuren enthielt, identifiziert.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mittels der "Model 610A Data Analysis Software" (Version 1.2.1, Applied Biosystems, Darmstadt).

2.4 Chemische Synthese von Peptiden

Die Herstellung der verwendeten Peptide wurde in der Abteilung Peptidsynthese bei der IPF PharmaCeuticals GmbH durchgeführt. Die Synthese der linearen Peptide erfolgte nach dem Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (MERRIFIELD, 1986) unter Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenchemie auf einem automatischen Peptidsynthesizer 433A (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Darmstadt). Ausgegangen wurde dabei von 0,1 mmol des vorbeladenen Fmoc-Asp(OtBu)-Harzes. Die zu koppelnden, Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden in zehnfachem Überschuss eingesetzt. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgte mit HBTU [2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat]. Für die Kopplungen wurden Standardsynthesesyklen in N-Methylpyrrolidinon (NMP) als Lösungsmittel angewendet.

Zur Abspaltung des Peptides vom Harz und zur Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde das harzgebundene Peptid mit einer frisch angesetzten Abspaltmischung, bestehend aus Trifluoressigsäure, Ethandithiol und Wasser (94:3:3, v/v/v), für drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension über eine Glasfritte filtriert und das Peptid durch Zugabe von eisgekühltem tert-Butylmethylether aus dem Filtrat ausgefällt. Das Harz wurde mit wenig TFA gewaschen und das ausgefallene Rohpeptid durch Zentrifugation pelletiert und lyophilisiert. Für die Aufreinigung des Rohpeptids wurde eine präparative RP-Chromatographie unter Verwendung einer Waters Prep Pak C-18 Chromatographiesäule (47 x 300 mm, Tabelle 1) mit 0,07 % TFA als Eluent A und 80 % ACN in 0,07 % TFA als Eluent B und einem (Gradient: 20-45 % B in 50 min; Flussrate: 40 ml/min) durchgeführt. Die einzelnen manuell gesammelten Eluatfraktionen wurden mittels analytischer RP-Chromatographie über eine Vydac C-18 Chromatographiesäule (4,6 x 250 mm, Tabelle 1) mit den oben angegebenen Eluenten (Gradient: 10-70 % B in 30 min; Flussrate 0,8 ml/min) sowie mittels ESI-MS (2.3.2) auf ihre Reinheit überprüft. Fraktionen, die das gewünschte Peptid mit entsprechender Reinheit enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

2.5 Hydrolyse von Peptiden mit der Protease Subtilisin

Zur enzymatischen Hydrolyse von Peptiden wurden lyophilisierte Aliquots von zu untersuchenden Fraktionen aus den Peptidbanken in DMEM, das 3 mM Kalziumchlorid enthielt, gelöst. Subtilisin (Sigma), eine Protease aus *Bacillus subtilis*, die Peptidbindungen unspezifisch spaltet, wurde der Lösung mit 2,9 µg pro 100 µl Reaktionsansatz zugesetzt. Die Proben wurden für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch zehninütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.6 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.6.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Für die Arbeiten mit Zellkulturen wurden die von LINDL (2000) zusammengefassten allgemeinen Empfehlungen befolgt. Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um adhärenz, als einschichtiger Zellrasen wachsende 3T3-L1 Fibroblasten (ATCC-Nr: CRL-173) murinen Ursprungs, die nach Kontaktinhibition eine Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten durchlaufen. Es wurden ausschließlich die in Tabelle 5 aufgelisteten Agenzien und Materialien verwendet. Die für die beschriebenen Stimulationsexperimente genutzten Arbeitskulturen wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. In flüssigem Stickstoff gelagerte Dauerkulturen wurden bei Bedarf vorsichtig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 25 ml Kulturmedium überführt.

Zum Passagieren 70-80 % konfluenten Kulturen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 3-5 min bei 37 °C mit 1 ml 1 x Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Die Ablösereaktion wurde durch Zugabe von 3-4 Volumen FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen je nach Zelldichte 1:8 bis 1:20 in 25 ml frischem Kulturmedium suspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt.

Zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, für 5 min bei 120 x g sedimentiert, bei einer Dichte von 1,5 x 10⁶ Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert und in geeignete Einfriergefäße (Cryovial[®], Roth, Karlsruhe) überführt.

Einfriermedium:

	DMEM mit Phenolrot
10 %	FCS
4 mM	L-Glutamin
200 µg/ml	Penicillin/Streptomycin
5 %	DMSO

Nach langsamer Abkühlung mit Hilfe von Isopropanol um 1 °C/min auf -80 °C in einem Cryo-Einfriergerät (Nalgene[™], Wessington Cryogenics, Houghton-le Spring, UK) wurden die Zellen innerhalb von 24 h in flüssigen Stickstoff eingebracht.

Fettzellen humanen Ursprungs, die ebenfalls für einige Experimente verwendet wurden, wurden von der Firma BioCat (Heidelberg) bezogen. Die Lieferung der bereits differenzierten Adipozyten erfolgte in 96-Loch-Zellkulturplatten mit entsprechendem Zellkulturmedium. Die Zellen wurden ohne Wechsel des Zellkulturmediums nach Erhalt für 1 bis 2 Tage unter den oben genannten Standardbedingungen gehalten und dann für Stimulationsexperimente (2.6.3) verwendet. Der *Body Mass Index* (BMI) der Spender betrug etwa 26 kg/m².

Tabelle 5 **Verwendete Agenzien zu Kultivierung von Zellen.**

Medien, sonstiges Zellkulturmaterial	Anbieter, Bestellnummer
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose, mit Phenolrot	Bio Whittaker (Apen), BE12-614F
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose, ohne Phenolrot	Invitrogen (Karlsruhe), 31053-028
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin), S0215
L-Glutamin 200 mM (100 x)	Invitrogen (Karlsruhe), 25030-024
Penicillin/Streptomycin 10.000 µg/ml (100 x)	Invitrogen (Karlsruhe), 15140-122
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x)	Invitrogen (Karlsruhe), B5400-027
PBS Dulbecco´s	Invitrogen (Karlsruhe), 14190-094
Zellkulturflaschen und -platten	Anbieter, Bestellnummer
75 cm ² Zellkulturflaschen, Filterdeckel	Sarstedt (Nümbrecht), 83.1813.002
25 cm ² Zellkulturflaschen, Filterdeckel	Sarstedt (Nümbrecht), 83.1810.002
96-Loch-Zellkultur-Platten	Corning Costar (Wiesbaden), 3699

2.6.2 Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten

Nach Erreichen der Konfluenz beginnen 3T3-L1-Fibroblasten (Präadipozyten), nach Kontaktinhibition ihre Zellteilung einzustellen und zu Adipozyten zu differenzieren (GREEN UND MEUTH, 1974). Dabei kommt es zu einer Akkumulation von Mono-, Di- und Triglyceriden in Form von Lipidtröpfchen. Durch Zusatz von Stimulanzien ist es möglich, diesen Prozess zu beschleunigen. Hierzu wurden die Präadipozyten 1-2 Tage nach dem Erreichen von 90-100 % Konfluenz mit frischem Zellkulturmedium versetzt, das Zusätze von Dexamethason, Insulin und 8-Br-cAMP enthielt (Tag 0). An Tag 3 wurde frisches Kulturmedium mit Insulinzusatz gegeben. Die Differenzierung zu Adipozyten, die mikroskopisch an der Formveränderung der Zellen sowie der Bildung von ringförmig angeordneten Fettvesikeln verfolgt wurde, war zwischen Tag 6 und Tag 8 abgeschlossen. Die genaue Zusammensetzung von Fibroblasten-, Differenzierungs- und Adipozytenerhaltungsmedium ist in Tabelle 6 angegeben (REUSCH *et al.*, 2000). Für die Differenzierung in 96-Loch-Zellkulturplatten betrug das Mediumvolumen 100 µl pro Kavität.

Tabelle 6 Zusammensetzung von Fibroblasten-, Differenzierungs- und Adipozytenerhaltungsmedium.

Art des Kulturmediums	Zusammensetzung
Fibroblastenmedium	DMEM High Glucose mit Phenolrot 10% FCS 4 mM L-Glutamin Penicillin/Streptomycin 200 µg/ml
Differenzierungsmedium	DMEM High Glucose ohne Phenolrot 10 % FCS 1 mM L-Glutamin 300 µM 8-Br-cAMP (BioLog, Bremen) 1 µM Dexamethason (Sigma) 1 µg/ml Insulin (Huminsulin Normal 40, Lilly Deutschland, Giessen)
Adipozytenerhaltungsmedium	DMEM High Glucose ohne Phenolrot 10 % FCS 1 mM L-Glutamin 1 µg/ml Insulin

2.6.2.1 Differenzierung unter Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden

Bei der Antisense-Technologie handelt es sich um eine Methode, mit der spezifisch die Biosynthese bestimmter Proteine temporär gehemmt werden kann. Dabei hybridisieren Antisense-Oligonukleotide mit der entsprechenden Ziel-mRNA, was zu einer sterischen Hinderung der Translation an den Ribosomen führt und bewirkt, dass das Ziel-Protein nicht oder nur noch vermindert synthetisiert wird. Für *in vitro*-Systeme wird des Weiteren der Abbau der Hybride durch Endoribonukleasen wie die RNase H diskutiert.

Für Antisense-Experimente wurde ein Antisense-Kit der Firma Biognostik (Göttingen) verwendet, welches neben den phosphorothioat-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden auch phosphorothioat-modifizierte, randomisierte Kontrolloligonukleotide und ein ebenso modifiziertes, an FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppeltes, randomisiertes Fluoreszenzkontrolloligonukleotid enthält. Die Phosphorothioat-Modifikation führt zu einer erhöhten Stabilität der Oligonukleotide in serumhaltigem Zellkulturmedium, zu einer verbesserten Aufnahme in die Zelle und birgt eine verhältnismäßig geringe Zelltoxizität.

Die Stammlösungen der Oligonukleotide wurden mit dem im Kit gelieferten Puffer entsprechend angesetzt und bei -20 °C gelagert. Die Antisenseoligonukleotide wurden dem Zellkulturmedium ab Tag 0 des Differenzierungsprotokolls (2.6.2) in einem Volumen von 5 µl pro Kavität einer 96-Loch-Zellkulturplatte in 25- bzw. 30- facher Konzentration alle 24 oder 48 h zugegeben. Ebenso wurde mit den randomisierten Kontrolloligonukleotiden verfahren. Zusätzlich wurden Kontrollzellen mit einer Vehikelkontrolle behandelt, und es wurde mikroskopisch überprüft, ob der Differenzierungsprozess in den mit Oligonukleotiden behandelten Zellen und in unbehandelten Zellen vergleichbar ablief.

2.6.3 Stimulation von Zellen

Für das initiale Screening der Peptidbanken und die Isolation lipolytischer Faktoren sowie für die Untersuchungen der an der Lipolyse beteiligten Signaltransduktionswege wurden die Präadipozyten in einer Dichte von 8×10^3 bis 9×10^3 Zellen pro Kavität in 96-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert und nach Erreichen von 90-100 % Konfluenz zu Adipozyten differenziert (2.6.2). Für die Inkubation mit den entsprechenden Stimulanzen wurde das Kulturmedium der einzelnen Kavitäten abgenommen. Die Stimulanzen bzw. Aliquots von HPLC-Fraktionen wurden in frischem, zusatzfreiem, auf RT äquilibriertem DMEM Kulturmedium ohne Phenolrot verdünnt und mit einem Volumen von 100 μ l in die einzelnen Kavitäten pipettiert. Für Inhibitionsexperimente wurden die Inhibitoren in einem Volumen von 80 μ l auf die Zellen gegeben und für 35-40 min bei 37 °C / 5 % CO₂ vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Stimulanzen in fünffacher Konzentration in einem Volumen von 20 μ l Medium. Die Stimulanzen wurden in einer Verdünnung von mindestens 1:10, für in DMSO gelöste Substanzen mindestens 1:100, eingesetzt. Der maximale DMSO-Gehalt von 0,1 % führte, wie durch Vehikelkontrollen überprüft, in keinem Experiment zu unerwünschten Effekten. Bei jeder Stimulation diente die Inkubation mit zusatzfreiem DMEM Kulturmedium als Negativkontrolle, während Isoproterenol in einer Konzentration von 1×10^{-6} M als Positivkontrolle eingesetzt wurde.

Für die Stimulation von Zellen genutzte Substanzen sowie die Inhibitoren sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 angegeben. Alle Substanzen wurden in Wasser (ACS-grade, Sigma) oder DMSO (Sigma) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7 Verwendete Stimulanzen.

Stimulans	Anbieter	Konzentration der Stammlösung/Lösungsmittel	Best.-Nr.
Isoproterenol	Sigma	10 mM / H ₂ O	I-6504
Noradrenalin	Sigma	10 mM / H ₂ O	A7256
Forskolin	Sigma	10 mM / DMSO	F-6886
PMA	Sigma	1 mM / DMSO	P-8139
ACTH (1-39) human	Bachem, Weil am Rhein	10 mM / H ₂ O	H-1160.0500
NDP- α -MSH	Bachem	10 mM / H ₂ O	H-1100.0001
ANP (99-126)	in unserem Hause synthetisiert	0,1 mM / H ₂ O	
Sp-cAMPS	Biolog, Bremen	10 mM / H ₂ O	A0003-10S
Sp-5,6-DCI-cBIMPS	Biolog	10 mM / H ₂ O	D014-05
6-MBC-cAMP	Biolog	100 mM / H ₂ O	QM012-05
8-AHA-cAMP	Biolog	100 mM / H ₂ O	A011-25
8-PIP-cAMP	Biolog	10 mM / H ₂ O	P002-10

Tabelle 8 **Verwendete Inhibitoren.**

Inhibitor	Anbieter	Konzentration der Stammlösung/Lösungsmittel	Best-Nr.
Bisindolylmaleimid I	Calbiochem, Bad Soden	10 mM / DMSO	203290
Chelerythrin	QBiogene-Alexis, Grünberg	10 mM / DMSO	350-008
Diltiazem	Sigma	40 mM / H ₂ O	D2521
H89	Biomol, Hamburg	10 mM / DMSO	EI-196
Nifedipin	Sigma	40 mM / DMSO	N7634
PD98059	QBiogene-Alexis	100 mM / DMSO	385-023
Ro-31-8220	Calbiochem	1 mM / DMSO	557520
Rp-8-CPT-cAMPS	Biolog, Bremen	100 mM / H ₂ O	C011
U0126	Calbiochem	10 mM / DMSO	662005
Verapamil	Sigma	40 mM / H ₂ O	V4629

2.7 Cytochemische Methoden

2.7.1 Fixierung von Zellen

Nach Entfernung der Zellkulturüberstände wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Lösung aus 4 % Paraformaldehyd (m/v; BioRad) in PBS für 10 min fixiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellschicht mit wässrigen Lösungen mit aufsteigendem Isopropanolgehalt (70 % bis 100 %) für jeweils 1 min getrocknet. Die an der Luft vollständig getrockneten Präparate wurden bis zur Untersuchung in der Dunkelheit bei 4 °C gelagert.

2.7.2 Färbung von Lipidvesikeln

Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen für 15 min mit einer 3 %igen (m/v) Oil-Red-O-Lösung (Sigma) in 65 % Isopropanol behandelt. Anschließend wurde überschüssige Färbelösung durch zweimaliges Waschen mit 65 % Isopropanol, gefolgt von einem Waschschrift mit Wasser, entfernt. Bis zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Zellpräparate in Wasser bei 4 °C gelagert.

2.7.3 Kernfärbung

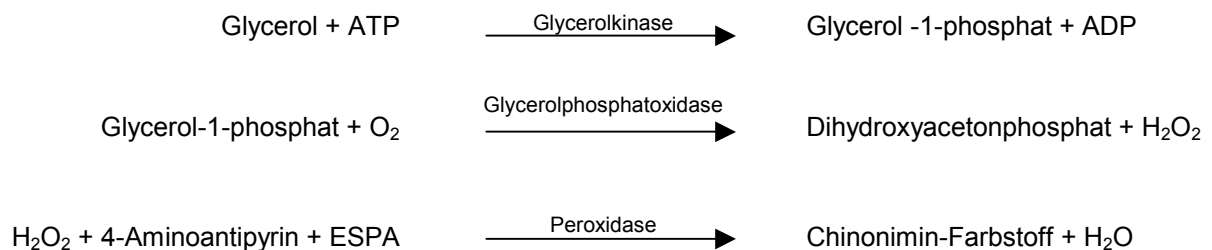
Die Färbung von Zellkernen wurde mittels Eisenhämatoxylin nach Weigert vorgenommen. Auf die fixierten Zellen wurde kurz je einmal Isopropanol (100 %) und Ethanol (96 %) gegeben. Die Kernfärbung erfolgte für 3,5 min in der Färbelösung. Überschüssiges Färbereagenz wurde durch zehnminütiges Waschen unter fließendem Leitungswasser entfernt. Anschließend

wurde das Präparat mit Lösungen steigenden Isopropanolgehaltes getrocknet, in Xylol gegeben und eingedeckelt.

2.8 Biotests

2.8.1 Glycerol Bioassay

Zur quantitativen Bestimmung des von den Adipozyten freigesetzten Glycerols wurde das Triglycerid-Reagenz A (Sigma) verwendet. Der Test beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Glycerol in drei Schritten, wobei im letzten Schritt ein Chinonimin-Farbstoff entsteht:



Glycerol wird mittels Glycerokinase (GK) durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) phosphoryliert, wobei Glycerol-1-phosphat sowie Adenosin-5'-diphosphat (ADP) entstehen. Glycerol-1-phosphat wird durch die Glycerolphosphat-Oxidase (GPO) zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Im letzten Schritt wird durch Peroxidase-Katalyse durch die Kopplung von 4-Aminoantipyrin und Natrium-N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)m-anisidin (ESPA) mit Wasserstoffperoxid ein Chinonimin-Farbstoff gebildet, der ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge von 540 nm besitzt. Der Absorptionsanstieg bei 540 nm ist der Glycerolkonzentration der Probe direkt proportional.

Für die Messungen wurden die differenzierten Adipozyten in 96-Loch-Zellkulturplatten mit den Stimulanzen bzw. Aliquots der HPLC-Fractionen stimuliert (2.6.3). Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurden 80 µl des Kulturüberstands pro Kavität entnommen und in die korrespondierenden Kavitäten einer zweiten 96-Loch-Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Plate, Nunc, Wiesbaden) überführt. Pro Kavität wurden 75 µl des auf RT äquilibrierten GPO-Trinder Reagenz A zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 10 min bei RT wurde die Absorption in jeder Kavität mit einem Mikrotiterplattenreader bestimmt.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit, u. a. für das initiale Screening von Peptidbanken, sowie für die einzelnen Schritte der Isolation lipolytischer Faktoren ist die freigesetzte Menge an Glycerol jeweils in Prozent des Effektes der Positivkontrolle Isoproterenol angegeben. In allen anderen Fällen sind Absolutwerte gezeigt oder ist die Glycerolfreisetzung in Bezug auf die Negativkontrolle DMEM angegeben.

2.8.2 cAMP Bioassay

Zur quantitativen Bestimmung von zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) diene ein spezifischer ELISA der Firma IHF (Hamburg). Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Die differenzierten Adipozyten wurden mit den entsprechenden Stimulanzien inkubiert (2.6.3). Nach der Inkubation wurden die Kulturüberstände entfernt, jeweils 100 µl 70% EtOH auf die Zellen pipettiert und diese bei -20°C tiefgefroren, was zur Lyse der Zellen führte. Anschließend wurden die aufgetauten Zellsuspensionen in Eppendorfgeläße überführt und die Überstände unter Vakuum zur Trockne eingedampft. Die Rückstände wurden in 100 µl E-PBS-Puffer (IHF) aufgenommen, zentrifugiert ($3000 \times g$, 3 min) und die Überstände im Verhältnis 1:10 mit E-PBS-Puffer verdünnt. Jeweils 100 µl der verdünnten Proben wurden mit 5 µl Acetylierungsreagenz versetzt und sofort gut gemischt. Hierbei kommt es zur Acetylierung des cAMP an der 2'-Position, wodurch die Erkennung durch den Antikörper verbessert wird.

Acetylierungsreagenz:
1 Volumen Essigsäureanhydrid
2 Volumen Triethylamin

In einer 96-Loch-Platte, deren Kavitäten mit Goat-Anti-Rabbit-Gamma-Globulin beschichtet sind, wurden jeweils 50 µl der acetylierten Probe mit 50 µl cAMP-Biotin und 100 µl cAMP-Antiserum gemischt und für 18-24 h bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Das in der Probe enthaltene cAMP konkurriert mit dem cAMP-Biotin um die Bindungsstelle des zugesetzten cAMP-Antikörpers. Die entstehenden cAMP- und cAMP-Biotin-Antikörperkomplexe werden über den zweiten Antikörper an die Kavitäten gebunden. Es folgte eine Inkubation mit HRP-Streptavidinlösung für 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss, bei der über das Streptavidin die Meerrettichperoxidase selektiv an den biotinhaltigen Immunokomplex gebunden wird. Anschließend wurden die Kavitäten mit Waschpuffer gewaschen und mit HRP Substratlösung versetzt. Während der 40-minütigen Inkubation setzt die über den Immunokomplex an die Kavitäten gebundene Meerrettichperoxidase das farblose Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff um, der nach Zugabe von 2 M H_2SO_4 -Lösung eine gelbe Farbe annimmt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Die Farbentwicklung ist umgekehrt proportional zu der gesuchten cAMP-Konzentration in der Probe.

HRP Streptavidinlösung: 150 µg/l in E-PBS-Puffer

HRP-Substratlösung:
50 Volumen H_2O
1 Volumen 0,2 % H_2O_2 Lösung
1 Volumen 0,5 % TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) in DMSO
1 Volumen Substratpuffer

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Isolation von RNA aus Zellen

Die Arbeiten mit RNA wurden unter besonderen Schutzmaßnahmen (Verwendung von sterilen gestopften Pipettenspitzen, Verwendung von RNase-freien Eppendorfgefäßen und Lösungen) durchgeführt, um eine Hydrolyse der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen zu vermeiden.

Alle zur RNA-Isolierung verwendeten Materialien und Lösungen waren Bestandteil des RNA-Isolierungskits RNeasy MiniKit (Qiagen, Düsseldorf). Zur Isolierung von RNA aus Zelllinien wurde jeweils eine 75 cm² Zellkulturflasche mit konfluenten Zellen verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 600 µl Lysis-Puffer aufgenommen, die Suspension zum Zellaufschluss auf QIA-Shredder-Säulchen pipettiert und bei 8000 x g für 2 min zentrifugiert. Das resultierende Lysat wurde mit 1 Volumenteil 70 % Ethanol gemischt, wobei die Anwesenheit von β-Mercaptoethanol im Lysispuffer die Denaturierung der anwesenden Proteine und RNasen bewirkte. Das Lysat wurde anschließend auf RNA-bindende, silikahaltige RNeasy-Säulen pipettiert und diese bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert. Der für die Säulenbindung benötigte hohe Salzgehalt sowie weitere Verunreinigungen wurden durch Waschen mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl ethanolischem RPE-Puffer bei 8000 x g für 15 s entfernt. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde die Säule für 2 min bis zur Trocknung zentrifugiert und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Es folgte die Elution der RNA mit zweimal 40 µl RNase-freiem ddH₂O mittels Zentrifugation für jeweils 1 min bei 8000 x g und 4 °C. Ein Aliquot dieser RNA-Lösung wurde zur photometrischen Analyse abgenommen. Die RNA wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.9.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in Lösung wurde die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Dazu wurden die Proben in ddH₂O verdünnt und in eine Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm überführt. Die Nukleinsäurekonzentration c ergibt sich aus der im Spektralphotometer bestimmten optischen Dichte (OD_{260}) durch folgende Gleichung:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times \epsilon \times V$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ beträgt für RNA 0,04. V stellt den Verdünnungsfaktor der Nukleinsäure in der Lösung dar.

Zusätzlich lässt sich anhand der UV-Absorption die Reinheit der Nukleinsäurepräparation ermitteln. Hierzu wird der Quotient von OD_{260}/OD_{280} herangezogen, der angibt, inwieweit die Lösung durch Proteine verunreinigt ist. Dabei weisen reine RNA-Lösungen einen Quotienten von 2,0 auf.

2.9.3 Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen

Zur Entfernung verunreinigender genomischer DNA wurden die RNA-Präparationen mit DNase-I verdaut, bevor sie für die Generierung von cDNA eingesetzt wurden. Dazu wurden 2 µg lyophilisierte RNA in 7 µl RNase-freiem Wasser gelöst und nacheinander je 1 µl RNasin (Promega), 10 x DNase-Reaktionspuffer und DNase-I (Invitrogen) hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach 15 min bei RT durch Zugabe von 1 µl 25 mM $MgCl_2$ gestoppt und die beteiligten Enzyme durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

2.9.4 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Zur Untersuchung der Transkriptionsrate von verschiedenen RNAs in unterschiedlichen Geweben wurde die RNA mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Durch diese indirekte Vervielfältigung der RNA können auch geringe Mengen RNA spezifisch nachgewiesen werden.

Für die Reaktion wurden je 2 µg DNase-verdaute RNA (2.9.3) eingesetzt, der 500 ng *random hexamer primer* und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) zugesetzt wurden. Nach 5-minütiger Denaturierung bei 65 °C wurde der Ansatz schnell im Eisbad abgekühlt, um ein Anlagern der Hexamere zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 µl 5 x Erststrangsynthesepuffer und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT). Nach dem Mischen wurde der Reaktionsansatz für 2 min bei 42 °C temperiert, die reverse Transkription in komplementäre DNA durch Zugabe von 200 U SuperScript II RNase H⁻ (Invitrogen) gestartet und für weitere 50 min bei 42 °C inkubiert. Durch 15-minütiges Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 70 °C wurde die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms abgestoppt. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Die Berechnung der cDNA-Konzentration erfolgte aus der eingesetzten RNA-Äquivalentmenge.

Die cDNA aus HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten) sowie cDNA aus den Nebenhoden der Maus, welche bei Genexpressionsanalysen als Kontrollen verwendet wurden, wurden freundlicherweise von der Abteilung Molekularbiologie der IPF-PharmaCeuticals GmbH zur Verfügung gestellt. Die ebenfalls als Kontrolle verwendete cDNA aus humanem Gehirn wurde von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen.

2.9.5 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR; SAIKI *et al.*, 1985) wird zur selektiven Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten *in vitro* genutzt.

DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges kurze, doppelsträngige Sequenzbereiche. Für die PCR verwendet man zwei synthetische Oligonukleotide (*Primer*, Tabelle 9), die jeweils zu einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die gewünschte Sequenz (Amplikon) einschließen (*Sense-* und *Antisenseprimer*). Ein Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion beinhaltet die temperaturgesteuerte Reaktionsfolge von Denaturierung, Oligonukleotidanlagerung und Extension.

Zunächst wurde die zu untersuchende Probe zusammen mit den weiteren Bestandteilen des Reaktionsansatzes bei 94 °C denaturiert. Während der sich anschließenden Oligonukleotidanlagerung erfolgt die Ausbildung von Hybriden zwischen den Einzelsträngen des Amplikons und den entsprechenden Primern. Diese doppelsträngigen DNA-Bereiche dienen der hitzestabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Startpunkte für die Synthese des komplementären Stranges (Extension). Die Extension der Primer wurde bei einer Temperatur durchgeführt, die über der Schmelztemperatur der Primer lag und die Oligonukleotidanlagerung beendete (72 °C). Um sicherzustellen, dass begonnene Polymerisationen vollständig abgeschlossen wurden, wurde die End-Extension durchgeführt.

In dieser Arbeit verwendete PCR Protokolle wurden durch Variation der Temperatur zur Oligonukleotidanlagerung sowie durch Verwendung von Taq-DNA-Polymerasen unterschiedlicher Hersteller (Invitrogen, Invitex) optimiert. Alle Reaktionen wurden im Gen-Amp Cycler 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt.

Pro PCR-Reaktionsansatz wurden in 25 µl Endvolumen verwendet:

- 1 x PCR-Reaktionspuffer
- 200 µM dNTP-Mix (200 µM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 400 nM je Oligonukleotid
- 25 ng DNA-Matrize (*Template*) der entsprechenden DNA
- 3 mM 50 mM MgCl₂
- 1-2 U DNA-Polymerase

Zur Analyse wurden folgende Temperaturprogramme angewandt:

1.	Erst-Denaturierung	94 °C	1 min	1 Zyklus
2.	Denaturierung	94 °C	30 s	
3.	Oligonukleotidanlagerung	56-60 °C	30 s	
4.	Extension (Verlängerung)	72 °C	1 min	35 Zyklen
5.	End-Extension	72 °C	7 min	1 Zyklus
6.	Kühlen	4 °C		

Die für die hier beschriebenen PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 **Verwendete Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Richtung	Basensequenz (5' → 3')
Oligo für mMC1-R	<i>forward</i>	GACCGCTACATCTCCATCTTCTA
"	<i>reverse</i>	AGGAGGAGGAAGAGGTTGAAGTT
Oligo für mMC2-R	<i>forward</i>	AACTCCGATTGTCCTGATGTAG
"	<i>reverse</i>	CTTTTGAATGCATCTCTGAGCTC
Oligo für mMC3-R	<i>forward</i>	GAGGACCAGTTTATCCAGCACAT
"	<i>reverse</i>	GGTCGATGACGGAGTTGCACA
Oligo für mMC4-R	<i>forward</i>	ATCCATTTGCAGCCTGCTTT
"	<i>reverse</i>	ATGAGACATGAAGCACACGC
Oligo für mMC5-R	<i>forward</i>	CATGTTCCCTCTGGCCCGGAA
"	<i>reverse</i>	TTAATACCCGCCAAGGAGCC

2.9.6 Gelelektrophoretische Trennung von DNA

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht wurde je nach Trennungsziel in 0,8-1,5 %igen (w/v) horizontalen Agarosegelen durchgeführt. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können, wurden der Agaroselösung vor der Polymerisation 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 60-120 V. Den zu untersuchenden Proben wurde 0,2 Volumen Auftragspuffer zugesetzt, dessen Glycerolanteil eine bessere Sedimentation der Proben in die Geltaschen ermöglichte und dessen Bromphenolblauzusatz die Lauffront im Gel erkennen ließ. Die Abschätzung der relativen Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines ebenfalls aufgetragenen DNA-Größenstandards (1 kbp- bzw. 100 bp-Leiter, jeweils 0,5 µg/ml, Invitrogen). Die fertigen Gele wurden mit dem Kodak EDAS 290-Dokumentationssystem fotografiert und archiviert.

<u>5 x Auftragspuffer:</u>	40 %	Glycerol
	20 mM	Tris-HCl (pH 8)
	2 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
<u>50 x TAE-Puffer (Stammlösung):</u>	2 M	Tris
	100 mM	EDTA
	1 M	Essigsäure
<u>Ethidiumbromidstammlösung:</u>	1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH ₂ O	

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Probenvorbereitung

Experimente zum Nachweis von intrazellulären Proteinen wie Transkriptionsfaktoren (z.B. pCREB) oder Proteinkinasen (z.B. pMAPK) sowie von Rezeptoren erfolgten über SDS-PAGE mit anschließender Immunoblot Analyse. Dazu wurden die differenzierten Adipozyten in 96-Loch-Zellkulturplatten für das jeweilige Experiment stimuliert. Nach der Behandlung wurde der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von 50 µl 2 x Lithiumdodecylsulfat-haltigem Probenpuffer (Invitrogen) aufgeschlossen.

<u>2 x Probenpuffer:</u>	4,5 ml	NuPAGE LDS-Sample buffer (NP0007)
	4,5 ml	ddH ₂ O
	1 ml	0,5 M Dithiothreitol

Die durch den hohen Gehalt an DNA zähe Zell-Lysis-Flüssigkeit wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal über 3 s bei 10-12 W mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 70 °C denaturiert und bei 4°C für 5 min bei ca. 12.000 x g zentrifugiert. Bis zum Auftrag auf das Gel wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.10.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Bereich von 1-100 kDa kamen Bis-Tris gepufferte Polyacrylamid-Gradientengele (Invitrogen, NP0321, NP0323) zum Einsatz. Die Verwendung von 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure-haltigem Laufpuffer (MES; NP0002) ermöglichte die Trennung von Proteinen im Bereich zwischen 2,5-200 kDa unter reduzierenden Bedingungen. War eine bessere Auftrennung von Proteinen der Größe zwischen 36 und 55 kDa erwünscht, wurde ein 4-(N-Morpholino)-propansulfonsäure-haltiger Laufpuffer (MOPS; NP0001) verwendet. Als Gelapparatur diente eine *XCell Sure Lock*-Gelkammer (Invitrogen).

Nach dem Einbringen der Gele in die Kammer wurde das innenliegende Reservoir mit 400 µl Antioxidans (NP0005, Invitrogen) und ca. 200 ml Laufpuffer gefüllt. Jeweils 10 µl der zu untersuchenden, denaturierten Proben wurden in die mit Laufpuffer gespülten Geltaschen überführt und für 45–60 min bei einer Spannung von 200 V gelelektrophoretisch getrennt. Dabei diente der *Prestained Protein Marker* (New England Biolabs) als Größenmarker. Anschließend wurden die Gele nach Entfernung aus ihren Rahmen bis zur Durchführung des Immunoblots in Transferpuffer gelagert.

Laufpuffer: 50 ml 20 x NuPAGE Running Buffer (NP0001 bzw. NP0002)
950 ml ddH₂O

2.10.3 Immunoblot Analyse (Western Blot)

Die Überführung der mittels PAGE (RITTENHOUSE UND MARCUS, 1984) aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte durch elektrophoretischen Transfer im *XCell II Blot Module* (Invitrogen). In diesem *Wet-Blot*-Verfahren erfolgte die Anordnung von PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße) und Polyacrylamidgel zwischen je drei transferpuffergetränkten Schwammtüchern und Filterkartons (Whatman 3 MM, Roth) in dem Blotmodul so, dass die Membran näher zur Anode und das Gel näher zur Kathode lag. Dieses *Blot-Sandwich* wurde in die Blotkammer eingebracht und das Blotmodul vollständig mit Transferpuffer gefüllt. Die umgebende Blotkammer wurde mit entionisiertem Wasser gefüllt. Der Transfer erfolgte bei konstant 23 V für 60 min.

Transferpuffer: 50 ml 20 x NuPAGE Transfer Buffer (NP0006-1)
1 ml NuPAGE Antioxidans
200 ml Methanol
ad 1000 ml ddH₂O

Zur Entfernung methanolischer Rückstände aus dem Transferpuffer wurde die Membran anschließend zweimal für 5 min in TBS-Tween gewaschen. Vor der Zugabe des primären Antikörpers wurden überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abgesättigt, indem die Membran für 1 h mit 1 x Roti-Block-Lösung (Roth) inkubiert wurde. Anschließend wurde der gleichfalls in Roti-Block verdünnte Primär-Antikörper (Tabelle 10) hinzugegeben und bei leichtem Schütteln über Nacht bei 4 °C gebunden. Nach Entfernung der Antikörperlösung durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween wurde in 1 x Roti-Block verdünnter sekundärer Antikörper (Tabelle 10) aufgebracht und für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit reichlich TBS-Tween entfernt. Die Visualisierung der Zweitantikörper-Bindung erfolgte über ein Chemilumineszenz-Signal. Dabei katalysiert die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase die Oxidation von Luminol zu einem

2.10.4 Antikörper

Für Immunoblotanalysen und für die Immunopräzipitation (2.10.5) verwendete primäre und sekundäre Antikörper sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10 **Verwendete Antikörper.**

Primär-Antikörper	Verdünnung	Spezies	Anbieter
Phospho-CREB	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling / New England Biolabs, Frankfurt
CREB	1:2000	Kaninchen	
Phospho-p42/44 MAP Kinase	1:2000	Kaninchen	
p42/44 MAP Kinase	1:2000	Kaninchen	
MCR2 (Antiserum)	1:5000	Kaninchen	Alpha Diagnostic / BioTrend, Köln
MCR5 (affinitätsgereinigt)	1:1000	Kaninchen	
Perilipin	1:10.000	Meerschwein	Progen, Heidelberg
PKA RI α/β	1:1000	Maus	BD Biosciences Pharmingen Transduction Labs, Erembodegem, Belgien
PKA RI α	1:500	Maus	
PKA RII α	1:1000	Maus	
PKA RII β	1:1000	Maus	
PKA C α/β	1:1000	Maus	
Phosphoserin	1:1000	Kaninchen	Zymed / Zytomed, Berlin
Hormon-sensitive Lipase (HSL)	1:5000	Maus	im Hause generiert, siehe unten
Phospho-PKA Substrat (RRXS* / T*)	1:5000	Kaninchen	Cell Signaling
Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Spezies	Anbieter
Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	1:50.000	Ziege	Cell Signaling
Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	1:50.000	Ziege	
Anti-Meerschwein IgG, HRP-gekoppelt	1:50.000	Maus	Sigma

Polyklonale, HSL-spezifische Antikörper wurden von Dr. Aleksandra Heitland zur Verfügung gestellt. 1 mg des synthetisch hergestellten Peptides (2.4) der Aminosäuresequenz KDLSFKGNSEPSDSEPMC, die auf der Aminosäuresequenz des HSL-Proteins der Ratte beruht, wurde an 1 mg Maleimid-aktiviertes mCKLH (*keyhole limpet hemocyanin*, Perbio Science, Bonn) nach Anweisung des Herstellers gekoppelt. Jeweils 100 μ g des gekoppelten Antigens wurden nach Mischen mit 25 μ l GERBU-Adjuvans 100 (GERBU, Gaiberg) pro Tier für die Immunisierung weiblicher, 8 Wochen alter Balb-c Mäuse verwendet. Die Booster-Injektionen wurden im Abstand von 3 Wochen mehrmals wiederholt. Jeweils eine Woche nach der Immunisierung wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen und daraus das Serum gewonnen. Der Antigentiter wurde im direkten Elisa unter Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers, der gegen murines IgG gerichtet war (Sigma; Verdünnung

1:60.000), überprüft. Mittels Immunoblotanalyse erfolgte ein weiterer Test des gewonnenen Antiserums auf Spezifität und Sensitivität.

2.10.5 Immunopräzipitation

Experimente zur Untersuchung posttranslationaler Modifizierungen wie der Phosphorylierung von Proteinen wurden mittels Immunopräzipitation durchgeführt. Verwendet wurden Bestandteile des IMMUNOCatcher Kits der Firma CytoSignal (Irvine, CA, USA).

Nachdem 3T3-L1 Adipozyten in 96-Loch-Zellkulturplatten für 15 min mit den entsprechenden Stimulanzen inkubiert wurden, wurden die Zellkulturüberstände entfernt und die Zellen nach einem Waschschrift mit zusatzfreiem DMEM mit 150 µl kaltem, milden Lysispuffer (CytoSignal), der einen Proteinaseinhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim) enthielt, versetzt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min bei 4 °C wurden die Zellsuspensionen in Eppendorfgefäße überführt und jede Probe bei 4 °C dreimal für je 3 s sonifiziert. Anschließend wurden Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt bei ca. 12.000 x g für 10 min bei 4 °C abgetrennt, und die Überstände wurden in frische Eppendorfgefäße überführt. Es wurden 1,2 µl der entsprechenden Antikörperlösung zu jeder Probe gegeben und bei 4 °C unter Schütteln für 1 h inkubiert. Zur Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in Abhängigkeit von der Antikörperspezies 5 µl (Kaninchen bzw. Meerschwein) oder 11,5 µl (Maus) Protein A/G Resin (CytoSignal) in jeden Ansatz pipettiert und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Proben wurden für 10 min bei ca. 12.000 x g zentrifugiert und das Pellet dreimal mit jeweils 150 µl Lysispuffer, der mit Proteinaseinhibitor versetzt war, gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Überstände möglichst restlos entfernt und die Pellets in jeweils 40 µl 2 x Lithiumdodecylsulfat-haltigem Probenpuffer (Invitrogen) aufgenommen. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70 °C und Zentrifugation bei 4°C für 5 min bei ca. 12.000 x g erfolgte die Auftrennung und Untersuchung der präzipitierten Proteine mittels SDS-Page (2.10.2) und anschließender Immunoblotanalyse (2.10.3).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Bioassays zur Detektion Glycerol freisetzender Substanzen

In dieser Arbeit sollten Peptide, die in weißen Fettzellen eine lipolytische Wirkung entfalten, aus etablierten Peptidbanken isoliert werden. Voraussetzung dafür war ein stabiles und zuverlässiges standardisiertes biologisches Testsystem, welches die Detektion einer Veränderung der lipolytischen Aktivität ermöglichte. Die Menge an freigesetztem Glycerol im Überstand der adhärennten Adipozyten sollte dabei als Maß für die lipolytische Aktivität dienen. Gegenüber primären Zellen sind die aus einer permanenten Zelllinie stammenden Zellen besser verfügbar. Die Eigenschaften primärer Zellen sind zudem von Faktoren wie dem Gewinnungsprotokoll und dem Zustand der unterschiedlichen Spender der Zellen abhängig, was eine Standardisierung schwierig gestaltet. Aus diesen Gründen wurde für die Etablierung des Lipolyseassays die 3T3-L1 Zelllinie gewählt, deren Präadipozyten nach einem Differenzierungsprotokoll (2.6.2) zu Adipozyten differenziert wurden. Zur Bestätigung des Charakters der Lipidvesikel der differenzierten Adipozyten wurden diese mit dem Farbstoff Oil-Red-O angefärbt (Abbildung 6).

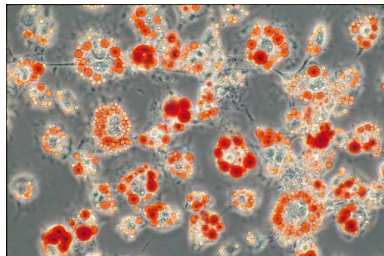


Abbildung 6 Färbung der Lipidvesikel in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten mit Oil-Red-O (Vergrößerung 40 x).

Die Höhe der Basallipolyse differenzierter 3T3-L1 Adipozyten und die Glycerolfreisetzung nach Gabe lipolytischer Substanzen hängen sowohl von der Zellzahl pro Kavität als auch von der Zellpassagezahl und somit von der Differenzierungsfähigkeit der Zellen ab. Diese war nach etwa 12 bis 16 Passagen reduziert, was mikroskopisch anhand der Ausbildung von Lipidvesikeln verfolgt wurde. Zellen, die an Tag 9 nach Initiierung der Differenzierung (2.6.2) keine gleichmäßige Ausbildung von Lipidtröpfchen aufwiesen, wurden verworfen. Zudem ist nicht bei jeder Tochterkultur nach Auftauen der Zellen mit einer identischen Differenzierbarkeit und Stimulierbarkeit des Systems zu rechnen. Um derartige Unterschiede abgleichen zu können, wurde für die durchgeführten Stimulationen eine Positivkontrolle benötigt, die möglichst über einen anderen Rezeptor einen lipolytischen Effekt auslöst als die zu

isolierenden Substanzen. Hierzu wurde mit dem beta-adrenergen Rezeptor-Agonisten Isoproterenol eine Substanz ohne Peptidcharakter verwendet.

3.1.1 Anpassung an das 96-Loch-Mikrotiterplattenformat

Aufgrund der hohen Anzahl der zu untersuchenden Proben in Peptidbanken mit bis zu 450 Fraktionen war eine Anpassung des Testsystems an das 96-Loch-Mikrotiterplattenformat sinnvoll. Undifferenzierte 3T3-L1 Fibroblasten wurden in 96-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert und innerhalb von 6 bis 8 Tagen zu Adipozyten differenziert. Die optimale Zellzahl lag zwischen 8000 und 9000 Zellen pro Kavität. So waren die 3T3-L1-Fibroblasten, die eine Verdopplungszeit von 18 h aufweisen, etwa 30 h nach der Passage zu 90 bis 100 % konfluent und konnten mit Differenzierungsmedium versetzt werden.

Für die Glycerolbestimmung in Zellkulturüberständen wurde das Triglyceridreagenz A (Sigma) verwendet. Um mögliche Interferenzen durch Mediumzusätze weitgehend zu vermeiden, wurden dem für die Inkubationen verwendeten phenolrotfreien DMEM neben den Stimulanzen bzw. Inhibitoren weder FCS noch sonstige Substanzen zugesetzt. Entsprechend wurden auch Kalibriergeraden für Glycerol mit zusatzfreiem DMEM erstellt. Nach Herstellerangaben dient das Triglyceridreagenz A (Sigma) der quantitativen Bestimmung von Glycerol in Serum oder Plasma im 1 ml Küvettenformat, was eine Anpassung an das 96-Loch-Mikrotiterplattenformat notwendig machte. Das optimale Verhältnis von Proben- zu Reagenzvolumen betrug 80 µl zu 75 µl. Bei einem geringeren Reagenzvolumen konnte keine deutliche Farbreaktion gemessen werden. Die Linearität der Kalibriergeraden war in dem Bereich zwischen 0 und 300 nmol Glycerol pro Kavität gegeben.

Um eine optimale Inkubationsdauer der 3T3-L1 Adipozyten mit entsprechenden Stimulanzen für einen messbaren lipolytischen Effekt zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem beta-adrenergen Agonisten Isoproterenol in steigender Konzentration (10^{-7} bis 3×10^{-6} M) über verschiedene Zeiträume (1-6 h) inkubiert. Wie in Abbildung 7 dargestellt, erwies sich eine Stimulationsdauer von 5-6 h als günstig, um eine veränderte Glycerolfreisetzung in den Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte zu detektieren. Des Weiteren ist für diese Stimulationszeiträume eine Abhängigkeit der Glycerolfreisetzung von der Isoproterenolkonzentration gegeben. Für die Experimente wurde daher eine Stimulationsdauer von 5 h gewählt.

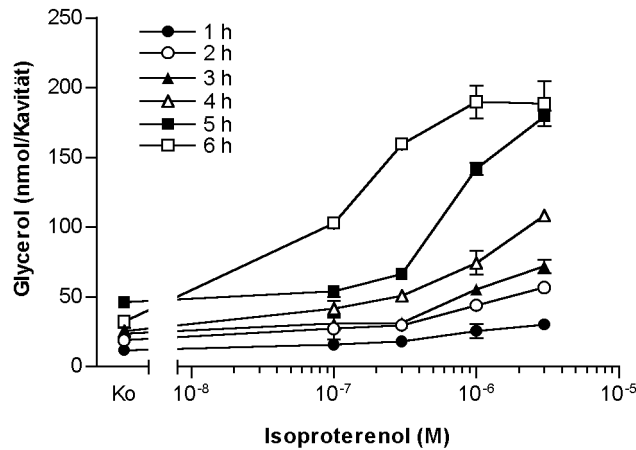


Abbildung 7 Isoproterenol-induzierte Glycerolfreisetzung in 3T3-L1 Adipozyten in Abhängigkeit von Stimulationsdauer und Isoproterenolkonzentration. Als Kontrolle diente DMEM. Der Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2 Detektion lipolytischer Substanzen in Peptidbanken

Für das initiale Screening nach lipolytischen Substanzen wurden Peptidbanken aus humanem Hämofiltrat sowie aus Gesamthirn und Magen vom Schwein verwendet. Wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben, wurden Stimulationen mit entsprechenden Aliquotmengen der einzelnen Fraktionen einer Peptidbank durchgeführt.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden beim Primärscreening die lipolytischen Effekte der einzelnen Peptidbankfraktionen in Prozent des lipolytischen Effektes von Isoproterenol (1×10^{-6} M) angegeben. Der Wert der basalen Glycerolfreisetzung wurde dabei gleich Null Prozent gesetzt.

3.2.1 Primäres Screening einer Schweinemagenpeptidbank

Für das initiale Screening nach lipolytischen Substanzen in einer Schweinemagenpeptidbank mit 310 Fraktionen wurden von jeder Fraktion Gewebeäquivalentmengen, die 0,024 Schweinemägen entsprachen, eingesetzt. Die Messungen erfolgten in Duplika. Mit diesem Aufbau des Experiments konnte keine lipolytische Aktivität detektiert werden.

3.2.2 Primäres Screening einer Schweinehirnpeptidbank

Das initiale Screening der Schweinehirnpeptidbank mit 322 Fraktionen im Lipolyseassay wurde mit einer Menge jeder Fraktion, die 8 g Gewebeäquivalent entsprach, in Duplika durchgeführt. Es wurden zahlreiche lipolytische Aktivitäten in den pH-Pools 2-6 detektiert. Die biologische Aktivität fand sich in pH-Pool 2 in den Fraktionen 15-20, in pH-Pool 3 in den

Fraktionen 18-21 und im pH-Pool 4 in den Fraktionen 23-27. Weiterhin wurde lipolytische Aktivität in den Fraktionen 24 und 25 sowie 28 und 29 in den pH-Pools 5 und 6 gemessen.

Da die lipolytische Aktivität in Fraktion 25 aus pH-Pool 5, gemessen an der Positivkontrolle, am stärksten war, wurde diese Fraktion für eine Isolierung der lipolytischen Substanz herangezogen. Nach Verifizierung der biologischen Aktivität mittels Behandlung der aktiven Fraktion mit Subtilisin (2.5) und Überprüfung auf eine Dosisabhängigkeit des biologischen Effektes wurden acht Rechromatographieschritte mit den jeweils lipolytisch aktiven Fraktionen durchgeführt, nach denen die Aktivität stets erneut detektierbar war. Die Substanz konnte jedoch nicht rein dargestellt und abschließend analysiert und identifiziert werden, was möglicherweise auf eine zu geringe Substanzmenge zurückzuführen ist.

3.2.3 Primäres Screening einer humanen Hämofiltratpeptidbank

Für das primäre Screening der humanen Hämofiltratpeptidbank (450 Fraktionen) nach lipolytischen Substanzen wurden lyophilisierte 5 l Aliquots verwendet, in denen jeweils fünf aufeinander folgende HPLC-Fraktionen vereinigt waren (5-Fraktionenspool). Dieses Vorgehen reduzierte die Anzahl der zu untersuchenden Fraktionen von 450 auf 92. Die Messungen wurden mit 1 l Äquivalenten jeder Fraktion in Duplika durchgeführt (Abbildung 8).

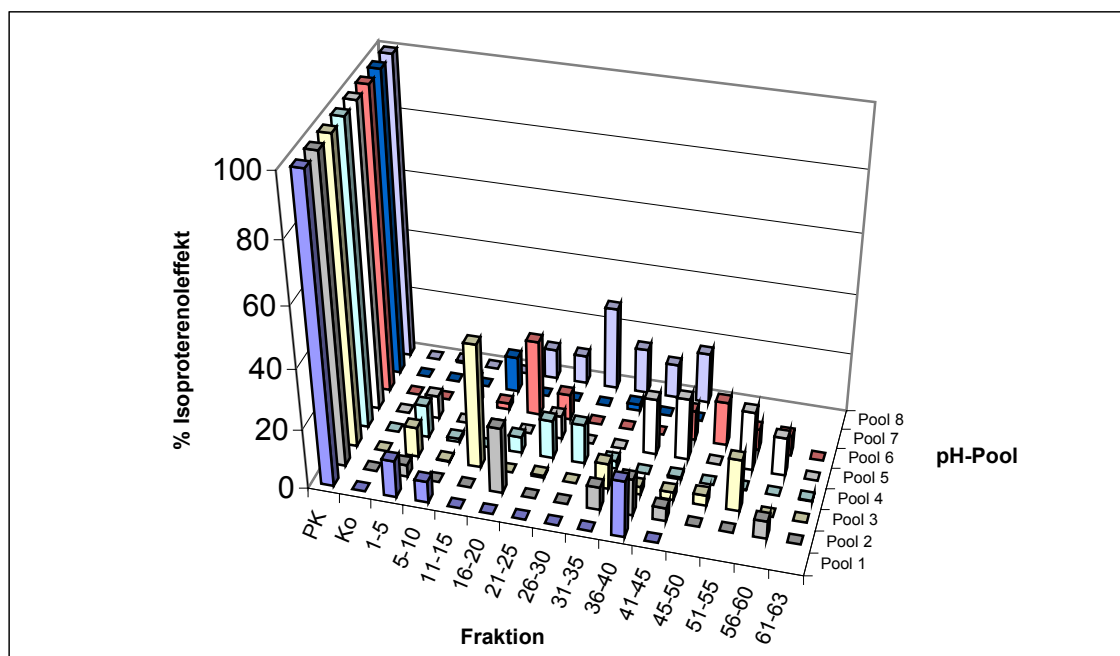


Abbildung 8 Verteilung der biologischen Aktivitäten im Primärscreening der humanen Hämofiltratpeptidbank. Dargestellt ist die durch 1 l HF Äquivalente ausgelöste Glycerolfreisetzung nach 5 h. Als Kontrolle diente DMEM. Die Ergebnisse sind in Prozent des lipolytischen Effektes von Isoproterenol (1×10^{-6} M) angegeben. (PK: Positivkontrolle)

Die stärkste lipolytische Aktivität wurde in den vereinigten Fraktionen 11-15 im pH-Pool 3 detektiert. Weiterhin wurden neben einigen schwach aktiven Fraktionen auch lipolytische Aktivitäten in den Fraktionen 16-20 im pH-Pool 2, in den Fraktionen 36-45 sowie 51-60 im pH-Pool 5, in den Fraktionen 16-20 im pH-Pool 6 und in den Fraktionen 26-30 im pH-Pool 8 gemessen.

Um eine genauere Charakterisierung der stark lipolytischen Fraktionen durchzuführen, wurden die Einzelfractionen des pH-Pools 3 nochmals getestet. Es wurden 1 l Äquivalente jeder Fraktion verwendet und die Messungen in Doppelbestimmung durchgeführt. Abbildung 9 zeigt das Chromatogramm und die Verteilung der lipolytischen Aktivität in pH-Pool 3. Die aktiven Substanzen eluieren in den Fraktionen 12 bis 17 bei einem Acetonitrilanteil im Elutionsmittel von etwa 18-22 %. Die höchsten Aktivitäten waren in den Fraktionen 12 und 13 zu detektieren, die für die nachfolgende Isolierung der lipolytischen Substanzen ausgewählt wurden.

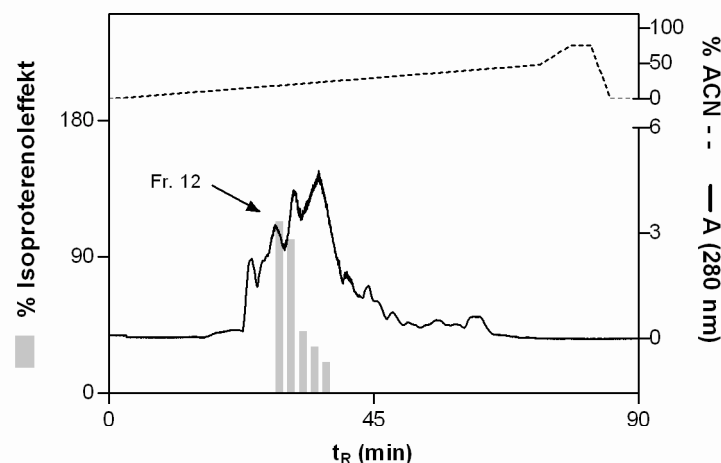


Abbildung 9 Lipolytische Aktivität der einzelnen Peptidbankfraktionen aus pH-Pool 3. Es wurden 1 l HF-Äquivalente pro Fraktion eingesetzt. Als Kontrolle diente DMEM. Die Resultate aus Doppelbestimmungen sind in Prozent des lipolytischen Effektes von Isoproterenol (1×10^{-6} M) angegeben. Der gestrichelt abgebildete Graph stellt den ACN-Anteil am Elutionsmittel im Verlauf der Chromatographie dar. (t_R = Retentionszeit)

3.2.4 Verifizierung der biologischen Aktivität

Zur Überprüfung einer spezifischen Aktivität wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt, um experimentell bedingte Artefakte auszuschließen und erste Hinweise auf die biologisch-chemische Struktur der aktiven Substanzen zu erhalten. Die Spezifität der detektierten Aktivität wurde durch Reproduzierbarkeit und Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des Effektes verifiziert.

Zusätzlich wurde der Peptidcharakter der aktiven Substanzen überprüft. Dazu wurden Peptidbankfraktionen, die im primären Screening eine hohe lipolytische Aktivität aufwiesen,

ausgewählt und eine Äquivalentmenge von 2 l HF mit der Endoprotease Subtilisin hydrolysiert. Subtilisin spaltet Peptidbindungen unspezifisch in kurze, nicht aktive Fragmente. Sollte die im Lipolyseassay nachgewiesene Aktivität durch Peptide hervorgerufen werden, dürfte diese auf Grund der Degradation dieser Peptide durch die Protease nicht mehr nachweisbar sein (ZUCHT *et al.*, 1995).

Für die im primären Screening der Hämofiltratpeptidbank gefundene biologische Aktivität in pH-Pool 3 konnte eine Dosisabhängigkeit des Effektes gezeigt werden (Abbildung 10A), was auf einen rezeptorvermittelten Effekt deutet. Des weiteren zeigte die enzymatische Hydrolyse mit Subtilisin, die nach dem dritten Chromatographieschritt durchgeführt wurde (siehe auch 3.3), einen vollständigen Aktivitätsverlust, was auf den Peptidcharakter der biologisch aktiven Substanz hinweist (Abbildung 10B).

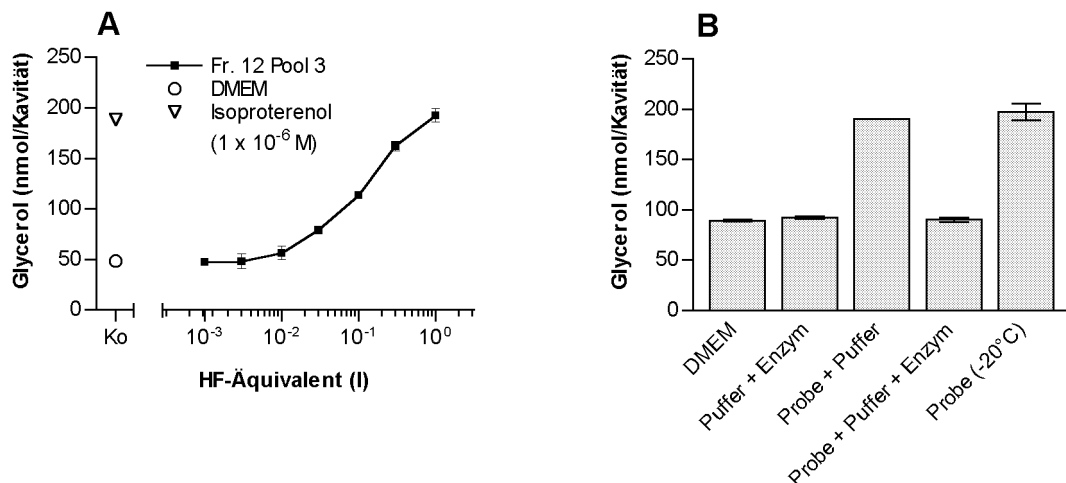


Abbildung 10 Verifizierung der biologischen Aktivitäten aus Fraktion 12 im pH-Pool 3 der humanen Hämofiltratpeptidbank. (A) Dosis-Wirkungskurve der Aktivität. Der Test wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (B) Lipolytische Aktivität nach Hydrolyse durch die Protease Subtilisin. Als Negativkontrolle diente DMEM. Um zu überprüfen, ob das degradierte Enzym selbst die Lipolyse verändert, wurde ein Ansatz, der nur Reaktionspuffer mit Subtilisin enthielt, getestet. Zudem wurde die Probe ohne Subtilisin bei -20°C eingefroren, um einen möglichen Effekt durch das Einfrieren und Auftauen auszuschließen. Die angegebenen Werte errechnen sich aus Zweifachbestimmungen.

3.3 Isolierung von lipolytischen Faktoren aus Hämofiltrat

Zur Reinigung der biologisch aktiven Peptide aus Hämofiltrat war es notwendig, die aktiven Substanzen von inaktiven Bestandteilen abzutrennen. Für eine erste Einschätzung über die chemischen Eigenschaften der Peptide wurde ihr Elutionsverhalten in der Peptidbank untersucht. Die Elution der aktiven Peptide von der Kationenaustauschersäule erfolgte in pH-Pool 3 mit 0,1 M Maleinsäure (pH 5,0), was darauf hindeutet, dass sie einen neutralen bis

leicht sauren p_i aufweisen. In der nachfolgenden RP-Chromatographie eluierten die Peptide bei einem Acetonitrilanteil von 18-22 %. Dies deutet auf eher hydrophile Eigenschaften hin.

Das Trennverfahren für die Isolierung bestand aus der Kombination von konsekutiven RP- und Kationenaustausch-Chromatographieschritten. Den resultierenden Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte wurden Aliquots entnommen, diese lyophilisiert und im Lipolyseassay eingesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten die Fraktionen 12 und 13 aus pH-Pool 3 (Abbildung 9), die im Screening ein Maximum an lipolytischer Aktivität aufwiesen.

Für den ersten Reinigungsschritt wurden die einzelnen Fraktionen in 600 ml 10 mM HCl gelöst und auf eine präparative RP C-18-Säule aufgetragen. Gebundene Peptide wurden durch einen linearen Anstieg von ACN im Elutionsmittel (Eluent A: 10 mM HCl; Eluent B: 80 % ACN in 10 mM HCl) separiert (Abbildung 11A). Es konnte ein Maximum lipolytischer Aktivität in Fraktion 12 detektiert werden, welche weiter gereinigt wurde.

Im zweiten Chromatographieschritt wurde eine Kationenaustauschersäule verwendet. Die ausgewählte Fraktion 12 des ersten Reinigungsschrittes wurde auf einer Kationenaustauschersäule mit einem Natriumphosphat-Puffersystem bei einem pH-Wert von 4,5 gebunden und durch linearen Anstieg von NaCl im Elutionspuffer eluiert, wobei ein Großteil inaktiver Substanzen abgetrennt werden konnte (Abbildung 11B). Aufgrund des resultierenden hohen Salzgehaltes in den Fraktionen wurden die entnommenen Aliquots entsalzt (2.2.3), damit sie im Lipolyseassay eingesetzt werden konnten. Die stärksten lipolytischen Aktivitäten wurden in den Fraktionen 26-34 detektiert, die vereint und einer weiteren Trennung unterzogen wurden.

Im dritten Reinigungsschritt mittels RP Chromatographie (Abbildung 11C) dienten 10 mM HCl (Eluent A) und Methanol (Eluent B) als Elutionsmittel. Der lineare Anstieg von Eluent B im Elutionsmittel betrug 1 % pro Minute. Die Fraktionen 22 und 23, in denen die höchste lipolytische Aktivität nachzuweisen war, wurden vereinigt und rechromatographiert.

Für den vierten Reinigungsschritt auf einer Kationenaustauschersäule wurde erneut ein Natriumphosphat-Puffersystem bei pH 4,5 gewählt. Gebundene Peptide wurden durch einen linearen Anstieg von NaCl im Elutionsmittel eluiert (Abbildung 11D). Nach dem Entsalzen der zu testenden Äquivalentmengen wurden die Fraktionen auf lipolytische Aktivität untersucht. Es erfolgte erneut eine Abtrennung eines Großteils inaktiver Substanzen, wobei das Maximum lipolytischer Aktivität in den Fraktionen 25-30 vorlag.

Diese Fraktionen wurden vereinigt und in einem fünften Schritt über eine RP C-15 Phase chromatographiert. Als Elutionsmittel dienten 10 mM HCl (Eluent A) sowie 80 % Methanol in 10 mM HCl (Eluent B). Um eine bessere Trennleistung zu erzielen, wurde ein Gradient von 0,85 % B pro Minute gewählt, wodurch die aktiven Fraktionen 40-43 von einem großen Teil lipolytisch inaktiver Substanzen getrennt wurden (Abbildung 11E).

Im folgenden sechsten Chromatographieschritt wurden diese vereinigten Fraktionen erneut einer Kationenaustauschchromatographie unterzogen. Zur Erzielung eines besseren Trenneffektes wurde ein Kaliumphosphat-Puffersystem bei pH 4,5 verwendet. Die Elution erfolgte mit KCl in Puffer B (1 % B pro Minute). Nach Entsalzung der zu testenden Aliquotmengen zeigte sich nach diesem Trennschritt die lipolytische Aktivität in zwei benachbarten Bereichen (Abbildung 11F). Deshalb wurden die Fraktionen 21-22 (1. Maximum; Aktivität A) und die Fraktionen 24-25 (2. Maximum; Aktivität B) separat, jedoch unter identischen chromatographischen Bedingungen der weiteren Reinigung unterzogen.

Abbildung 11 zeigt die Chromatogramme der ersten sechs Reinigungsschritte.

Für den siebten Reinigungsschritt wurde eine RP-Chromatographiesäule gewählt. Durch die Verwendung von 90 % MeOH in 10 mM HCl im Eluenten B wurde eine verbesserte Trennleistung erzielt. Lipolytische Aktivität wurde in den Fraktionen 21-23 (Aktivität A) sowie 31-33 (Aktivität B) detektiert (Abbildung 12A bzw. Abbildung 13A). Beide Aktivitäten eluierten jeweils bei einem Anteil von etwa 38 % Eluent B im Elutionsmittel, was einem Methanolanteil von etwa 34,2 % entsprach. Die unterschiedlichen Fraktionsnummern sind auf die ungleichen Startzeitpunkte der Fraktionssammlung zurückzuführen.

Auch für den achten Reinigungsschritt wurde eine RP-Chromatographiesäule verwendet. Als Eluenten dienten 1 mM HCl (A) und 80 % ACN in 1 mM HCl (B). Aufgrund des geringen Partikeldurchmessers des Säulenmaterials konnte ein flacher Gradient mit einer Steigung von 0,5% B pro Minute verwendet werden. Die Fraktionen 15-16 (Aktivität A, Abbildung 12B) bzw. 16-17 (Aktivität B, Abbildung 13B) wurden als biologisch aktiv identifiziert.

Der neunte Chromatographieschritt fand unter Verwendung einer analytischen Kationenaustauschersäule statt. Es wurde erneut ein Kaliumphosphat-Puffersystem bei pH 4,5 verwendet, wobei mit einem steigenden Anteil von KCl (1 % pro Minute) eluiert wurde. Die Fraktionen 19-20 (Aktivität A) bzw. 21-23 (Aktivität B) erwiesen sich als lipolytisch aktiv (Abbildung 12C bzw. Abbildung 13C).

Um ein sauberes und salzfreies Produkt zu erhalten, wurden die vereinten aktiven Fraktionen jeweils in einem zehnten und letzten Reinigungsschritt einer abschließenden analytischen RP-Chromatographie unterzogen. Als Elutionsmittel wurden 0,1 % TFA (Eluent A) sowie 0,1 % TFA in 80 % ACN (Eluent B) bei einem Gradienten von 0,5 % B pro Minute verwendet. Nach diesem Chromatographieschritt wurde ein Maximum an lipolytischer Aktivität in den Fraktionen 50-51 (Aktivität A, Abbildung 12D) und 25-26 (Aktivität B, Abbildung 13D) detektiert. Die ungleichen Fraktionsnummern beruhen auf unterschiedlichen Startzeitpunkten der Fraktionssammlung. Beide aktiven Substanzen eluierten bei einem Gehalt an Eluent B im Elutionsmittel, der zwischen 28 und 30 % lag, was einem Acetonitrilanteil von 23 bis 24 % entsprach.

Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen die separaten letzten vier Reinigungsschritte von Aktivität A und B.

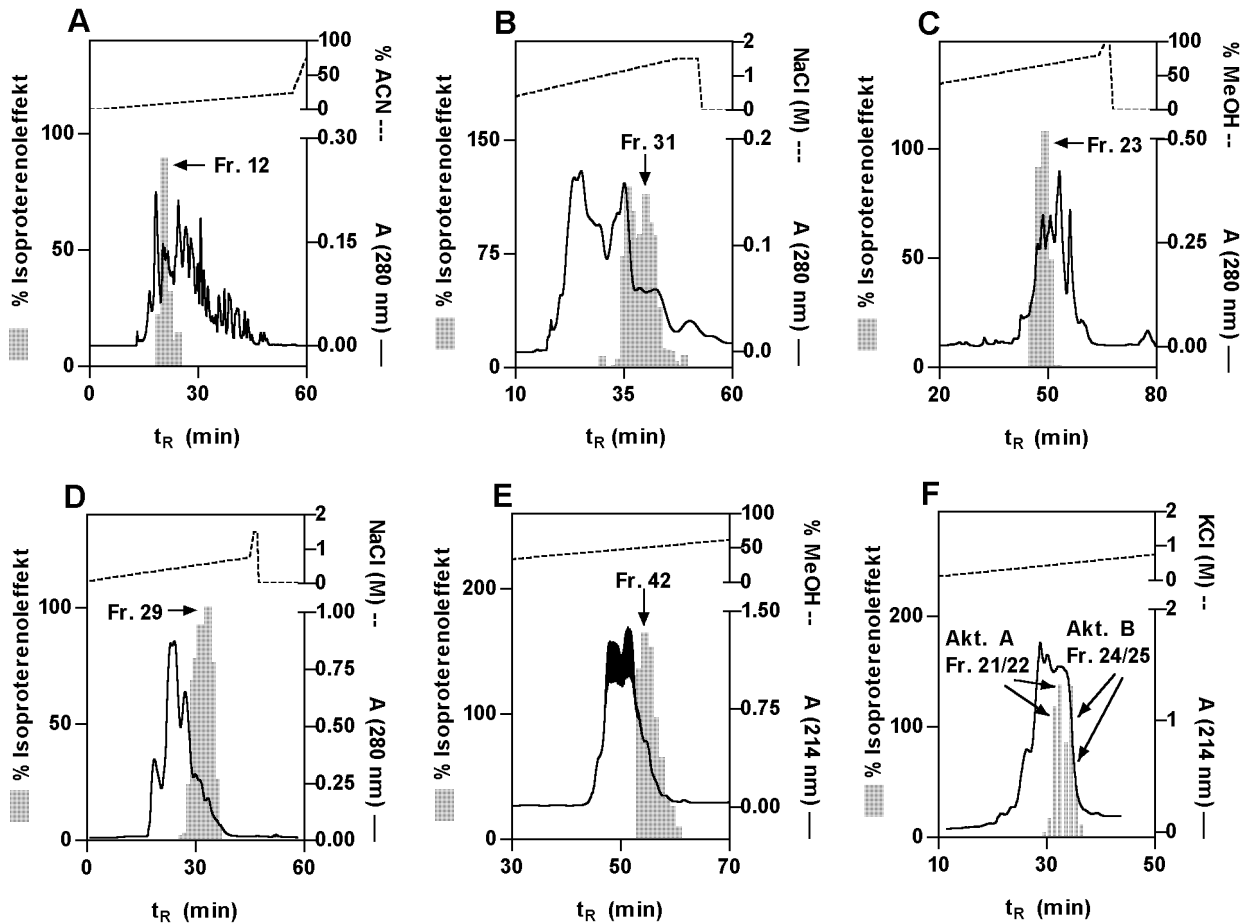


Abbildung 11 Isolierungsschritte 1-6 der Reinigung lipolytischer Substanzen aus der Hämofiltrat-Peptidbank. Die grauen Balken stellen die lipolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen dar, und die gestrichelt abgebildeten Graphen zeigen den Gradientenverlauf. Die chromatographischen Bedingungen finden sich in der Legende (siehe auch 2.2). Alle Aktivitätsbestimmungen wurden in zwei separaten Experimenten durchgeführt. (t_R = Retentionszeit)

- A:** Isolierungsschritt 1. RP-Chromatographie der Fraktionen 12-13, pH-Pool 3, der HF-Peptidbank. Säule: Fineline RPC Polymer, 100 x 155 mm; Gradient: 0-30 % B in 53 min; Eluent A: 10 mM HCl; B: 80% ACN in 10 mM HCl (v/v). Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 1,18 l.
- B:** Isolierungsschritt 2. CEC-Chromatographie von Fraktion 12 des ersten Trennschrittes. Säule: Merck TSK SP 650 (S), 60 x 270 mm; Gradient: 10-100 % B in 45 min; Eluent A: 50 mM NaH_2PO_4 , pH 4,5; B: 50 mM NaH_2PO_4 mit 1,5 M NaCl, pH 4,5. Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 6,8 l.
- C:** Isolierungsschritt 3. RP-Chromatographie der Fraktionen 26-34 des zweiten Trennschrittes. Säule: Bakerbond Prep Pak C_{18} , 47 x 300 mm; Gradient: 20-80 % B in 63 min; Eluent A: 10 mM HCl; B: MeOH. Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 2 l.
- D:** Isolierungsschritt 4. CEC-Chromatographie der Fraktionen 22-23 des dritten Trennschrittes. Säule: Biotek PepKat, 20 x 150 mm; Gradient: 5-50 % B in 45 min; Eluent A: 50 mM NaH_2PO_4 , pH 4,5; B: 50 mM NaH_2PO_4 mit 1,5 M NaCl, pH 4,5. Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 9,5 l.
- E:** Isolierungsschritt 5. RP-Chromatographie der Fraktionen 25-30 des vierten Trennschrittes. Säule: Pharmacia Source C_{15} , 20 x 250 mm; Gradient: 20-80 % B in 70 min; Eluent A: 10 mM HCl; B: 80 % MeOH in 10 mM HCl (v/v). Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 4 l.
- F:** Isolierungsschritt 6. CEC-Chromatographie der Fraktionen 40-43 des fünften Trennschrittes. Säule: Biotek PepKat, 10 x 125 mm; Gradient: 0-70 % B in 70 min; Eluent A: 50 mM KH_2PO_4 , pH 4,5; B: 50 mM KH_2PO_4 mit 1,5 M KCl, pH 4,5. Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 16 l. (Akt.: Aktivität)

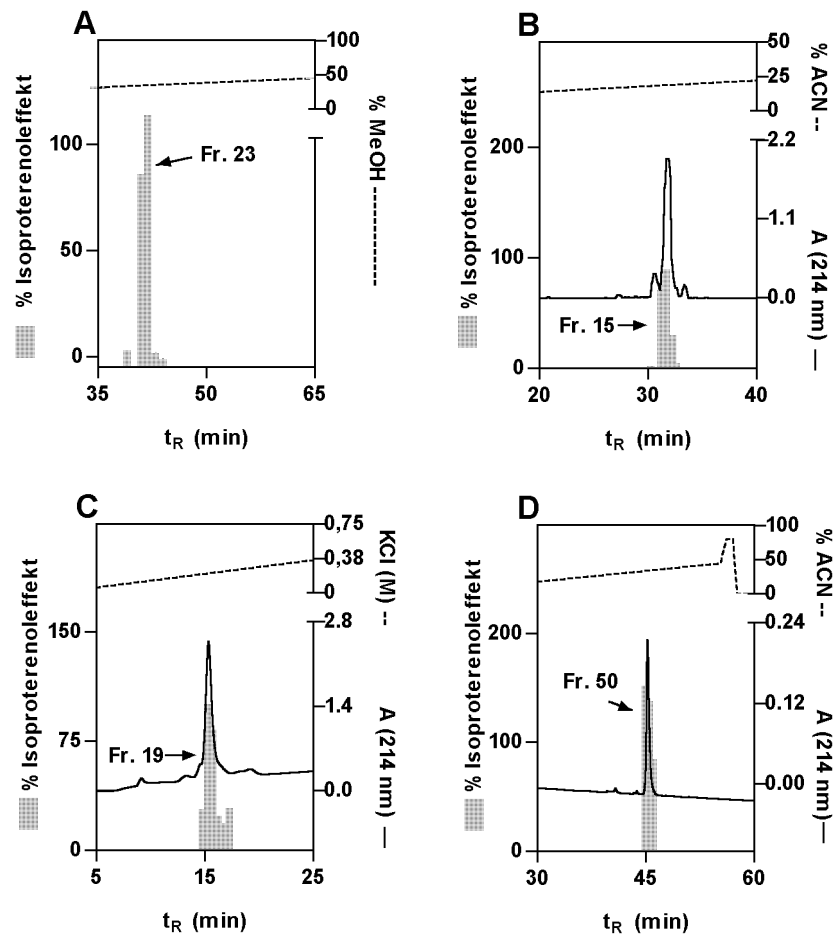


Abbildung 12 Isolierungsschritte 7-10 von Aktivität A aus der Hämofiltrat-Peptidbank. Die grauen Balken stellen die lipolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen dar. Die gestrichelt abgebildeten Graphen zeigen den Gradientenverlauf. Die chromatographischen Bedingungen finden sich in der Legende (siehe auch 2.2). Alle Aktivitätsbestimmungen wurden in zwei separaten Experimenten durchgeführt. Aus technischen Gründen liegt für Abbildung 12a keine Aufzeichnung des Absorptionsverlaufes vor. (t_R = Retentionszeit)

- A:** Isolierungsschritt 7. RP-Chromatographie der Fraktionen 21-22 des sechsten Trennschrittes (Abbildung 11).
Säule: Vydac Protein and Peptides C_{18} , 10 x 250 mm; Gradient: 20-80 % B in 80 min;
Eluent A: 10 mM HCl; B: 90 % MeOH in 10 mM HCl.
Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 6 l.
- B:** Isolierungsschritt 8. RP-Chromatographie der Fraktionen 21-23 des siebten Trennschrittes.
Säule: YMC ODS AQ C_{18} , 10 x 250 mm; Gradient: 10-40 % B in 60 min;
Eluent A: 1 mM HCl; B: 80% ACN in 1 mM HCl (v/v).
Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 7 l.
- C:** Isolierungsschritt 9. CEC-Chromatographie der Fraktionen 15-16 des achten Trennschrittes.
Säule: Biotek PepKat, 4 x 125 mm; Gradient: 0-30 % B in 30 min;
Eluent A: 50 mM KH_2PO_4 , pH 4,5; B: 50 mM KH_2PO_4 mit 1,5 M KCl, pH 4,5.
Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 35 l.
- D:** Isolierungsschritt 10. RP-Chromatographie der Fraktionen 19-20 des neunten Trennschrittes.
Säule: Vydac Protein and Peptides C_{18} , 4 x 250 mm; Gradient: 10-40 % B in 60 min;
Eluent A: 0,1% TFA; B: 80% ACN in 0,1% TFA (v/v).
Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 30 l.

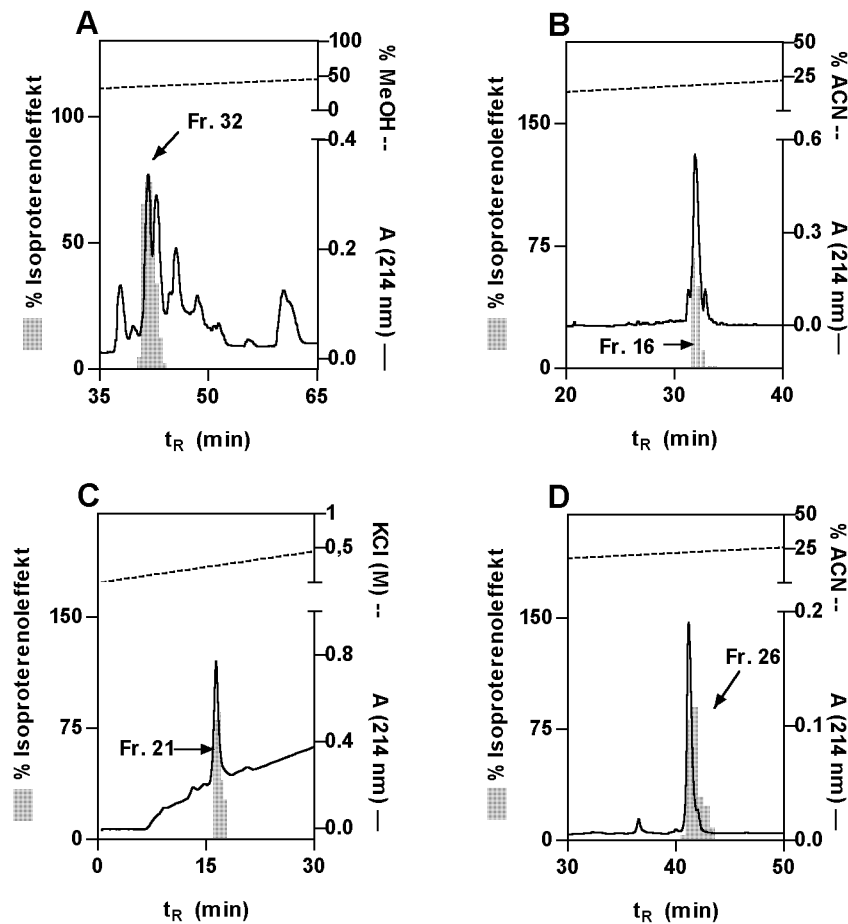


Abbildung 13 Isolierungsschritte 7-10 von Aktivität B aus der Hämofiltrat-Peptidbank. Die grauen Balken stellen die lipolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen dar, und die gestrichelt abgebildeten Graphen zeigen den Gradientenverlauf an. Die jeweiligen chromatographischen Bedingungen sind in der Legende angegeben (siehe auch 2.2). Die Resultate der Aktivitätsbestimmungen zeigen eines von zwei unabhängigen Experimenten. (t_R = Retentionszeit)

- A:** Isolierungsschritt 7. RP-Chromatographie der Fraktionen 24-25 des sechsten Trennschrittes (Abbildung 11). Säule: Vydac Protein and Peptides C_{18} , 10 x 250 mm; Gradient: 20-80 % B in 80 min; Eluent A: 10 mM HCl; B: 90 % MeOH in 10 mM HCl. Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 6 l.
- B:** Isolierungsschritt 8. RP-Chromatographie der Fraktionen 31-33 des siebten Trennschrittes. Säule: YMC ODS AQ C_{18} , 10 x 250 mm; Gradient: 10-40 % B in 60 min; Eluent A: 1 mM HCl; B: 80% ACN in 1 mM HCl (v/v). Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 8 l.
- C:** Isolierungsschritt 9. CEC-Chromatographie der Fraktionen 16-17 des achten Trennschrittes. Säule: Biotek PepKat, 4 x 125 mm; Gradient: 0-30 % B in 30 min; Eluent A: 50 mM KH_2PO_4 , pH 4,5; B: 50 mM KH_2PO_4 mit 1,5 M KCl, pH 4,5. Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 40 l.
- D:** Isolierungsschritt 10. RP-Chromatographie der Fraktionen 21-23 des neunten Trennschrittes. Säule: Vydac Protein and Peptides C_{18} , 4 x 250 mm; Gradient: 10-40 % B in 60 min; Eluent A: 0,1% TFA; B: 80% ACN in 0,1% TFA (v/v). Im Lipolyseassay eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 50 l.

Der Reinheitsgrad der aus dem jeweiligen zehnten Reinigungsschritt erhaltenen Fraktionen wurde durch Kapillaronoelektrophorese überprüft (Abbildung 14). Nach Anwendung des dargestellten chromatographischen Trennverfahrens war im Elektropherogramm eine

Substanz mit einer Reinheit von 93,5 % (Aktivität A) detektierbar. Die Aktivität (B) beinhaltete eine Substanz mit einem Reinheitsgrad von 90 %.

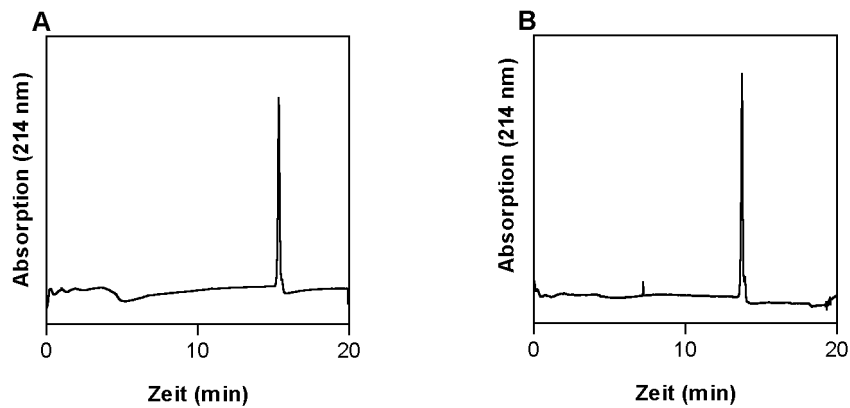


Abbildung 14 Kapillarzonenelektrophorese zur Reinheitsüberprüfung der isolierten Peptide. (A) Elektropherogramm des gereinigten Peptides aus Aktivität A. Der berechnete Reinheitsgrad betrug 93,5%. (B) Elektropherogramm des gereinigten Peptides aus Aktivität B mit einem berechneten Reinheitsgrad von 90%.

3.4 Identifizierung der isolierten lipolytischen Faktoren aus Hämofiltrat

Zur weiteren Charakterisierung wurden die isolierten Peptide massenspektrometrisch analysiert. Die durch MALDI-Messungen bestimmten molekularen Massen der isolierten Peptide betragen für die Substanz aus Aktivität A 2831 Da sowie für die Substanz aus Aktivität B 2661 Da (Abbildung 15).

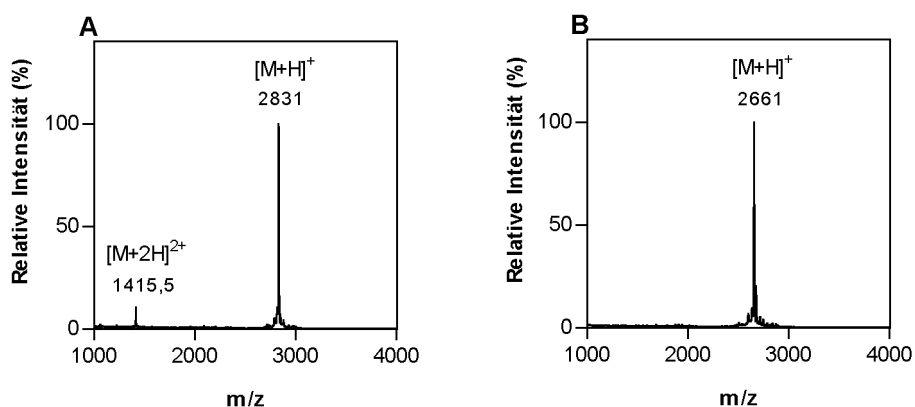


Abbildung 15 MALDI-MS-Analyse der gereinigten lipolytischen Peptide. (A) MALDI-Massenspektrum des gereinigten Peptides aus Aktivität A. Die molekulare Masse des Peptides betrug 2831 Da. Weiterhin wurde das Signal des doppelt geladenen Moleküliens bei m/z 1415,5 detektiert. (B) MALDI-Massenspektrum des gereinigten Peptides aus Aktivität B. Die molekulare Masse des Peptides betrug 2661 Da.

Durch die anschließende Aufklärung der Primärstruktur der isolierten Peptide mittels Edman-Abbau wurden die vollständigen Aminosäuresequenzen der beiden isolierten Substanzen bestimmt (Abbildung 16).

A	VAAEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
B	AEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD

Abbildung 16 Aminosäuresequenzen der gereinigten Peptide aus Aktivität A und aus Aktivität B.

Die Datenbankrecherche ergab, dass es sich bei dem Peptid aus Aktivität A um ein Fragment von Lipotropin Gamma (γ -LPH) handelt [γ -LPH-(33-56)]. Die gereinigte Substanz aus Aktivität B stellt ebenfalls ein γ -LPH-Fragment dar [γ -LPH-(35-56)] und wird auch als β -Melanozyten-stimulierendes Hormon [β -MSH-(1-22), Synonyme: β -Melanotropin, β -Melanocortin] bezeichnet. Sowohl die Sequenzen als auch die mit MALDI-Massenspektrometrie analysierten Massen der gereinigten Peptide stimmten mit den rechnerisch ermittelten Massen der Proteinfragmente überein. Die rechnerisch ermittelten isoelektrischen Punkte (p_i) betragen 7,73 [γ -LPH-(33-56)] bzw. 7,77 [β -MSH-(1-22)]. Aufgrund des Fehlens von Cysteinresten in den Aminosäuresequenzen sind beide Peptide linear und unverbrückt. Im folgenden wird das Peptid aus Aktivität A als VA- β -MSH und das Peptid aus Aktivität B als β -MSH-(1-22) bezeichnet.

3.4.1 Bestätigung der biologischen Aktivität durch synthetische Peptide

Zur Bestätigung der biologischen Aktivität der isolierten Peptide wurde VA- β -MSH mittels Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese hergestellt (2.4). β -MSH-(1-22) wurde von der Firma Bachem erworben. Für beide Peptide wurde die Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeit bestimmt. Sowohl synthetisiertes VA- β -MSH als auch synthetisches β -MSH-(1-22) riefen in 3T3-L1 Adipozyten dosisabhängig Lipolyse hervor (Abbildung 17). Die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) für VA- β -MSH betrug $2,4 \pm 1 \times 10^{-8}$ M, diejenige für β -MSH-(1-22) $1,7 \pm 0,5 \times 10^{-8}$ M. Für den ebenfalls getesteten Adenylatzyklaseaktivator Forskolin betrug die EC_{50} $1,3 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ M unter denselben experimentellen Bedingungen (nicht gezeigt).

Damit wurde bestätigt, dass es sich bei den aus Hämofiltrat isolierten Peptiden um die lipolyseauslösenden Substanzen handelt.

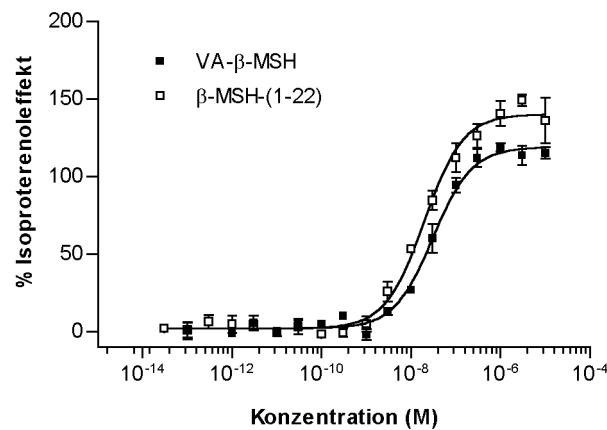


Abbildung 17 Bestätigung der biologischen Aktivität durch synthetische Peptide. Gezeigt sind Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeiten von VA-β-MSH und β-MSH-(1-22) im Lipolyseassay nach fünfstündiger Inkubation. Beide Graphen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, die in Triplika durchgeführt wurden.

3.5 Expression von Melanocortin-Rezeptor-Isoformen in 3T3-L1 Zellen

Die isolierten Peptide gehören der Familie der Melanocortine an. Bisher sind fünf Isoformen von Melanocortinrezeptoren (MCR) bekannt, bei denen es sich um sieben-transmembranäre G-Protein gekoppelte Rezeptoren handelt (vgl. GANTZ UND FONG, 2003). In differenzierten 3T3-L1 Adipozyten wurde die Genexpression der Melanocortin-Rezeptor-Isoformen MC2-R und MC5-R, die beide nicht in undifferenzierten Präadipozyten exprimiert werden, beschrieben, während die übrigen Isoformen nicht detektiert wurden (NORMAN *et al.*, 2002).

Die Genexpression aller fünf bekannten MCR-Isoformen wurde in den vorliegenden 3T3-L1 Zellen mittels RT-PCR überprüft. Weiterhin sollte mit Hilfe von Immunoblotanalysen untersucht werden, ob die auf transkriptionaler Ebene nachgewiesenen Isoformen auch auf Proteinebene nachweisbar waren. Die Proteinexpression wurde zudem in humanen Adipozyten untersucht.

Weder 3T3-L1 Präadipozyten noch 3T3-L1 Adipozyten exprimierten den MC1-R bzw. den MC4-R. Die Transkription des MC3-R-Gens konnte nur in Präadipozyten nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebene mRNA-Expression des MC2-R und des MC5-R wurde in den vorliegenden Zellen bestätigt, da beide Rezeptorisoformen in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten exprimiert wurden. In Präadipozyten wurden keine Transkriptionssignale des MC5-R-Gens und nur schwache Signale des MC2-R-Gens detektiert (Abbildung 18). Dies wurde auch auf Proteinebene gezeigt (Abbildung 19). In humanen Adipozyten konnte die Proteinexpression des MC2-R nachgewiesen werden, wogegen in diesen Zellen auch nach längerer Exposition des Filmes kein Signal für den MC5-R erhalten wurde.

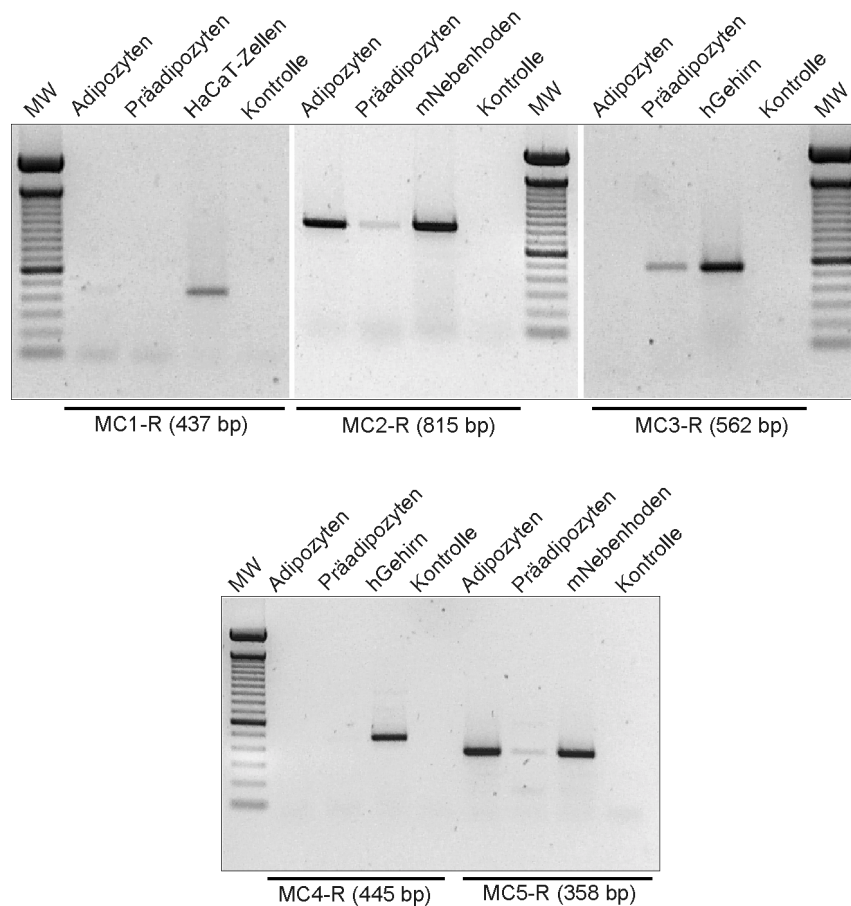


Abbildung 18 Expressionsanalyse der Melanocortin-Rezeptor-Isoformen in 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten mittels RT-PCR. Die Bezeichnung der verwendeten Primer der jeweiligen Isoform ist mit der Größe des zu erwartenden Produktes angegeben. Als Positivkontrollen wurde cDNA aus Nebenhoden der Maus (m), aus HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten) sowie aus humanem (h) Gehirn (Clontech, Heidelberg) verwendet. Die als Kontrollen bezeichneten Proben stellen Wasserkontrollen dar. (MW: 100 bp-DNA-Leiter, Invitrogen)

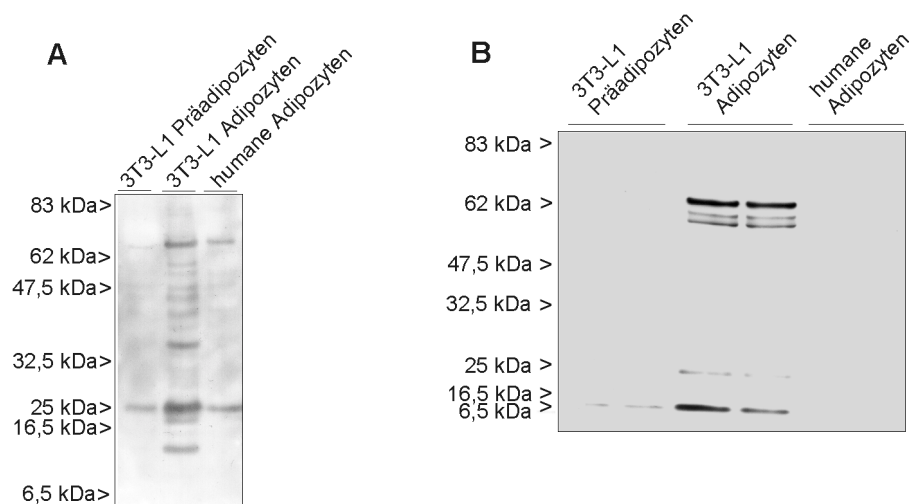


Abbildung 19 Proteinexpressionsanalyse der Melanocortinrezeptoren MC2-R und MC5-R mittels Immunoblot in 3T3-L1 Präadipozyten, 3T3-L1 Adipozyten und humane Adipozyten. Verwendet wurden Lysate unbehandelter Zellen. (A) Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen den MC2-R. (B) Verwendung eines affinitätsgereinigten, spezifischen Antikörpers gegen den MC5-R.

3.5.1 Untersuchungen zur Beteiligung des MC5-R an der lipolytischen Wirkung von VA- β -MSH

Mit Hilfe der Antisense-Technik ist es möglich, die Proteintranslation zu hemmen, so dass die Synthese eines bestimmten Proteins temporär inhibiert wird. Dies ist auch auf Rezeptorebene möglich (ZHENG *et al.*, 1989). Dabei können Interaktionen mit der Expression anderer Gene weitgehend ausgeschlossen werden. Von allen bekannten Melanocortin-Rezeptor-Isoformen werden nur der MC2-R und der MC5-R im Verlauf des Differenzierungsprozesses in 3T3-L1 Adipozyten exprimiert (3.5), wobei sich der MC2-R von den anderen MC-Rezeptorisoformen unterscheidet, da er nur von ACTH aktiviert wird und keine Affinität für α -, β -, und γ -MSH besitzt (SCHIÖTH *et al.*, 1996). Ausgehend von diesen Befunden sollte versucht werden, die Proteinexpression des MC5-R während des Differenzierungsprozesses von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten spezifisch mittels Antisense-Technik zu unterbinden. Nachfolgend wurde untersucht, ob es in 3T3-L1 Adipozyten, die unter Zugabe der entsprechenden Antisense-Oligonukleotide differenziert wurden (2.6.2), nach Stimulation mit VA- β -MSH zu einer erhöhten Glycerolfreisetzung kam.

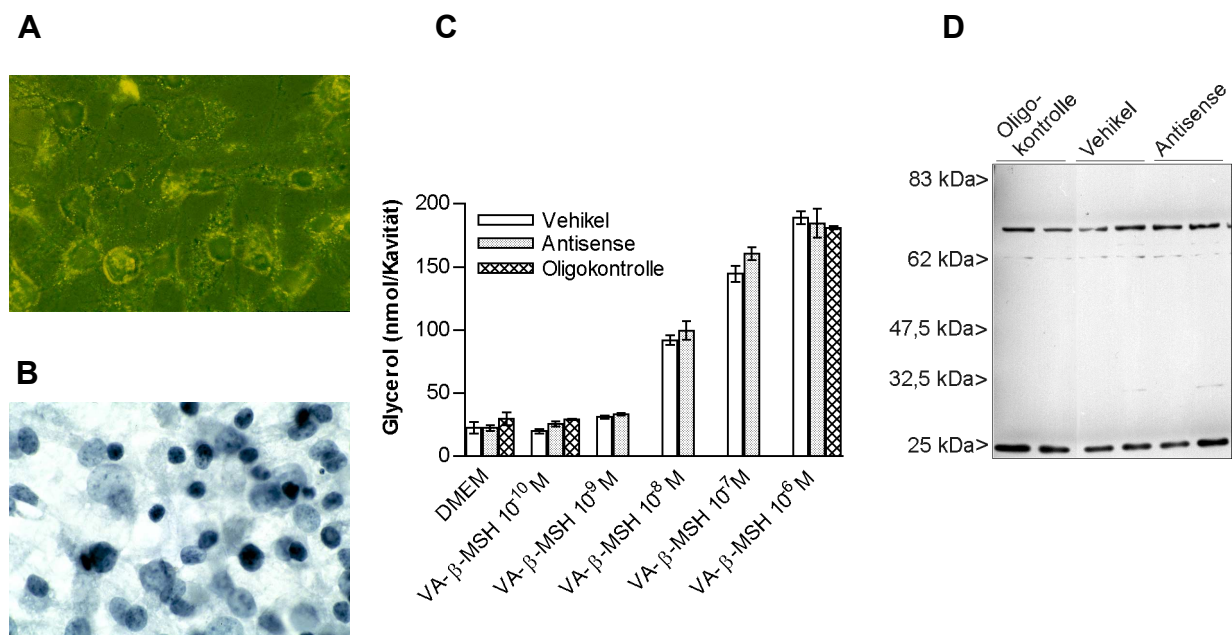


Abbildung 20 Effekt der Gabe von Antisense-Oligonukleotiden zur Unterbindung der Proteinexpression des MC5-R während der Differenzierung zu 3T3-L1 Adipozyten. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von 3T3-L1 Adipozyten, die während der Differenzierung mit einem fluoreszierenden Kontrolloligonukleotid (24 h; 6×10^{-6} M) behandelt wurden. Vergrößerung 250 x. (B) Kernfärbung in Zellen aus (A) mit Eisenhämatoxylin nach Weigert; Vergrößerung 250 x. (C) Lipolyse in 3T3-L1 Adipozyten, die während der Differenzierung mit MC5-R-Antisenseoligonukleotiden (2×10^{-6} M alle 48 h) behandelt wurden. Nach fünfständiger Inkubation mit den gezeigten Stimulanzen wurde die Glycerolfreisetzung gemessen. (D) Immunoblotanalyse zur Detektion des MC5-Rezeptorproteins in 3T3-L1 Adipozyten aus (C).

Mit Hilfe des Kontrollelements, welches die Behandlung von differenzierenden 3T3-L1 Adipozyten mit einem an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten Kontrolloligonukleotid beinhaltete, wurde gezeigt, dass dieses in die Zellen aufgenommen wurde (Abbildung 20A). In den mikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Bereiche innerhalb der Zellen, in denen sich fluoreszierende Substanz befindet, um Kompartimente herum angeordnet sind, bei denen es sich wahrscheinlich um die Zellkerne handelt, in denen keine Fluoreszenz vorhanden ist. Die Kernfärbung (Abbildung 20B) bestätigt, dass die Größe der nicht fluoreszierenden Bereiche derjenigen der Zellkerne entspricht. Dies deutet darauf hin, dass es grundsätzlich zu einer Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen gekommen ist, diese jedoch nicht in den Nukleus gelangt sind.

In 3T3-L1 Adipozyten, die während der Differenzierung mit Antisense-Oligonukleotiden, welche die Expression des MC5-Rezeptorproteins unterbinden sollten, behandelt worden waren, entfaltete VA- β -MSH dieselbe lipolytische Wirkung wie in unbehandelten Zellen (Abbildung 20C). Die Immunoblotanalyse mit spezifischem Nachweis des MC5-R-Proteins ergab, dass es nach Anwendung der Antisense-Technik nicht zu der erwünschten messbaren Reduktion der MC5-R-Expression kam (Abbildung 20D). Gezeigt sind die Resultate der Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden einer Konzentration von 2×10^{-6} M in einem Intervall von 48 h. Eine Dosissteigerung und Intervallverkürzung auf 6×10^{-6} M alle 24 h führte zu demselben Ergebnis. Aufgrund dieser Resultate lässt sich keine weiterführende Aussage darüber treffen, ob die lipolytische Wirkung von VA- β -MSH über den MC5-R vermittelt wird.

3.6 Pharmakologische Charakterisierung der isolierten Peptide

Es wurde bereits gezeigt, dass die beiden isolierten Peptide in 3T3-L1 Adipozyten einen dosisabhängigen lipolytischen Effekt hervorriefen (3.4.1). Zur näheren pharmakologischen Charakterisierung der Peptide wurden weitere Untersuchungen zur Signalweiterleitung durchgeführt.

3.6.1 Beteiligung des cAMP/PKA-Signalweges an der Lipolyse

Eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges führt in Fettzellen zu einer erhöhten Freisetzung von Glycerol. Durch die Aktivierung der Adenylatzyklase kommt es zur verstärkten Bildung des *second messengers* cAMP, welcher wiederum zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und damit zur Phosphorylierung verschiedener Proteine führt. Zu den wichtigsten, für die lipolytische Wirkung verantwortlichen Proteinen in

Fettzellen, die von der PKA phosphoryliert werden, zählen die Hormon-sensitive Lipase (HSL) und Perilipin.

Zur näheren Analyse, ob es nach Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels kommt, wurden die Zellen mit beiden Peptiden zunächst zeitabhängig und in einem weiteren Experiment mit VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) in steigender Konzentration (10^{-9} M bis 10^{-5} M) stimuliert.

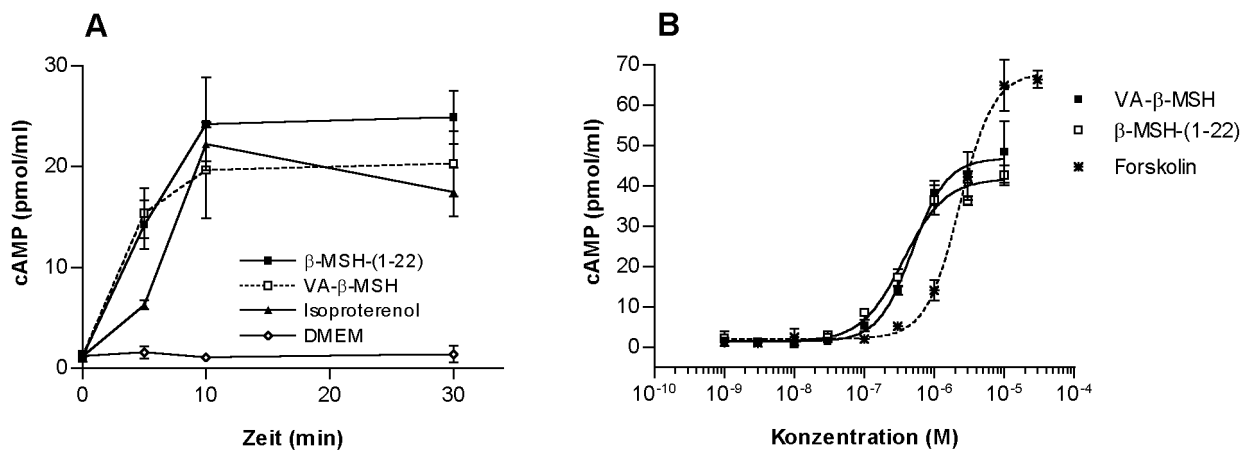


Abbildung 21 Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22). (A) Zeitabhängigkeit der cAMP-Erhöhung. 3T3-L1 Adipozyten wurden mit 10^{-5} M VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22) über die angegebenen Zeiträume stimuliert. Isoproterenol (1×10^{-6} M) diente als Positivkontrolle, und die Stimulation mit DMEM repräsentiert den Basalwert. (B) Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären cAMP-Erhöhung. 3T3-L1 Adipozyten wurden für 30 min mit den Peptiden stimuliert. Als Kontrolle diente die Stimulation mit Forskolin. Den Basalwert zeigt die Inkubation mit DMEM. Die Ergebnisse repräsentieren eines von drei (A) bzw. zwei (B) separaten Experimenten mit jeweils $n=3$.

Nach Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) erfolgte nach 5 min ein starker Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, der nach etwa 10 min ein Maximum erreichte, welches auch nach 30 min erhalten blieb. Zudem war eine Dosisabhängigkeit der cAMP-Erhöhung nach Gabe beider Peptide gegeben (Abbildung 21). Der EC_{50} -Wert für VA- β -MSH betrug $5,1 \pm 1,1 \times 10^{-7}$ M und derjenige für β -MSH-(1-22) $5,0 \pm 1,5 \times 10^{-7}$ M. Beide Werte lagen damit um etwa eine Zehnerpotenz höher als die EC_{50} -Werte der Peptide im Lipolyseassay. Die EC_{50} von Forskolin lag bei $2,3 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ M und damit im korrespondierenden Größenbereich zum Lipolyseassay. Die Ergebnisse lassen auf die Aktivierung der Adenylatzyklase nach Stimulation mit den isolierten Peptiden schließen.

Um festzustellen, ob die Proteinkinase A durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels aktiviert wird und an der Vermittlung des lipolytischen Effektes von VA- β -MSH und

β -MSH-(1-22) in 3T3-L1 Adipozyten beteiligt ist, wurden die selektiven Proteinkinase A Inhibitoren Rp-8-CPT-cAMPS (GJERTSEN *et al.*, 1995) und H89 (CHIJIWA *et al.*, 1990) verwendet. Für die Experimente wurde eine Peptidkonzentration von 2×10^{-8} M aus dem Bereich der EC_{50} -Werte gewählt.

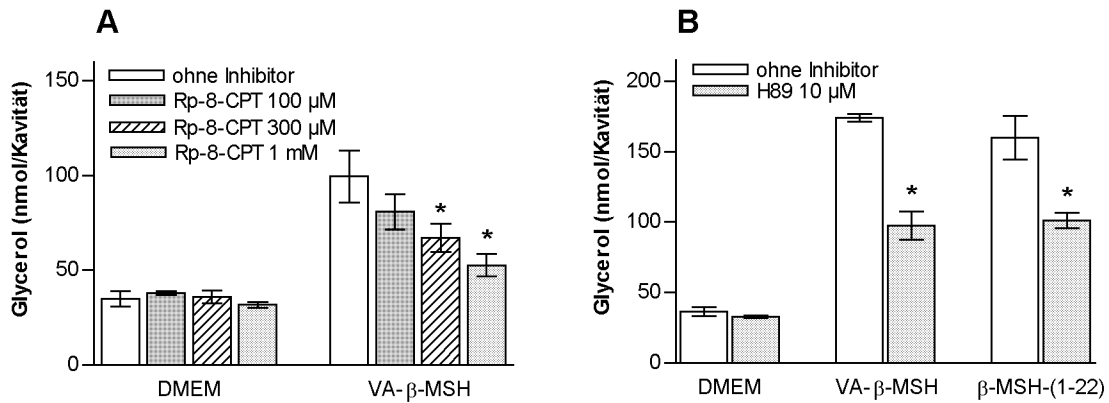


Abbildung 22 Einfluss von Proteinkinase A Inhibitoren auf die lipolytische Wirkung von VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22) in 3T3-L1 Adipozyten. Nach 40-minütiger Vorinkubation mit dem Inhibitor wurde für 5 h mit VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22) (jeweils 20 nM) stimuliert. (A) Einfluss von Rp-8-CPT-cAMPS auf die VA- β -MSH-induzierte Lipolyse. (B) Einfluss von H89 auf die VA- β -MSH- bzw. β -MSH-(1-22)-induzierte Lipolyse. Die angegebenen Fehlerbalken errechnen sich aus drei Einzelwerten. Gezeigt sind die Resultate eines von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ gegenüber der Stimulation ohne Inhibitor. (Rp-8-CPT: Rp-8-CPT-cAMPS)

Beide Proteinkinase A Inhibitoren verringerten die lipolytische Wirkung von VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22) (Abbildung 22). Die durchschnittliche Inhibition der VA- β -MSH-induzierten Lipolyse, berechnet aus allen durchgeführten Experimenten, betrug bei Verwendung von 1 mM Rp-8-CPT-cAMPS 61 ± 13 % und nach Vorinkubation mit H89 47 ± 10 %. Die von β -MSH-(1-22) vermittelte Glycerolfreisetzung wurde durch H89 zu 42 ± 8 % inhibiert. Konzentrationen von H89, die unter der relativ hohen Dosis von 1×10^{-5} M lagen, zeigten keinen inhibitorischen Effekt. Die Ergebnisse zeigen eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A an der lipolytischen Wirkung beider isolierter Peptide.

3.6.1.1 Phosphorylierung von Perilipin, CREB und weiteren Substraten

Die sehr stark in Adipozyten exprimierte Perilipine werden neben der Hormon-sensitiven Lipase ebenfalls als Zielprotein von der durch lipolytische Stimulation aktivierten cAMP-abhängigen Proteinkinase A phosphoryliert (GREENBERG *et al.*, 1991). Es wurde daher untersucht, ob eine Stimulation mit VA- β -MSH in 3T3-L1 Adipozyten eine Perilipin-Phosphorylierung nach sich zog, was im Immunoblot anhand einer Größenzunahme des

Perilipinsignals zu erkennen sein sollte. Abbildung 23 zeigt die Größenzunahme des Perilipinsignals nach 15-minütiger Stimulation der Zellen mit VA- β -MSH, was auf eine Phosphorylierung von Perilipin hinweist. Als Vergleichssubstanz wurde Isoproterenol eingesetzt, welches ebenfalls zu einem veränderten Migrationsverhalten von Perilipin führte. Auch dieses Resultat zeigt eine durch VA- β -MSH hervorgerufene PKA-Aktivierung in 3T3-L1 Adipozyten.

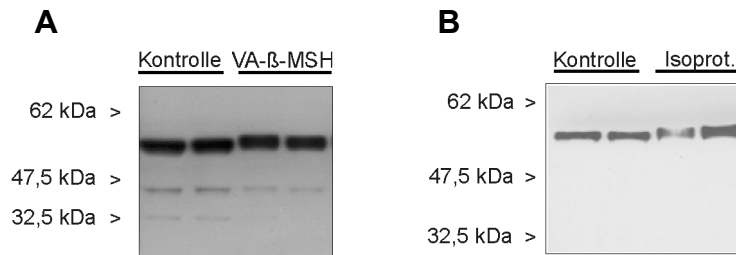


Abbildung 23 Größenzunahme des Perilipinsignals im Immunoblot durch VA- β -MSH und Isoproterenol in 3T3-L1 Adipozyten. Die Zellen wurden für 15 min mit VA- β -MSH (3×10^{-7} M; A) oder Isoproterenol (1×10^{-6} M; B) behandelt. DMEM diente als Kontrolle. Die erwartete Größe für das Perilipinsignal liegt bei etwa 56 kDa und 46 kDa für Perilipin A und B (Mus musculus). Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, die jeweils in Duplika durchgeführt wurden. (Isoprot.: Isoproterenol)

Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Produktion kann über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie dem *cAMP response element binding* Protein führen (*CRE binding protein*; CREB; GONZALEZ UND MONTMINY, 1989). Da eine Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) eine Aktivierung der PKA nach sich zog, wurde untersucht, ob die Inkubation mit VA- β -MSH eine erhöhte Phosphorylierung von CREB zur Folge hatte. Die Stimulation von zuvor über Nacht serumfrei gehaltenen 3T3-L1 Adipozyten mit VA- β -MSH führte bereits nach einer Inkubationsdauer von 15 min zu einer erhöhten Phosphorylierung von CREB im Vergleich zur Kontrolle. Zeitabhängig nahm diese Erhöhung der CREB-Phosphorylierung wieder ab, bis zu den Zeitpunkten 120 min und 300 min kein Unterschied gegenüber der Kontrolle mehr zu verzeichnen war (Abbildung 24). Dies lässt auf eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A durch VA- β -MSH schließen.

Vergleichend wurde die CREB-Phosphorylierung nach Stimulation mit Isoproterenol gemessen. Diese dauerte kürzer an als die VA- β -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung (Abbildung 24B). Bereits nach 60 min konnte kein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle mehr detektiert werden. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung der Spuren im Gel wurde ein Antikörper gegen Gesamt-CREB verwendet.

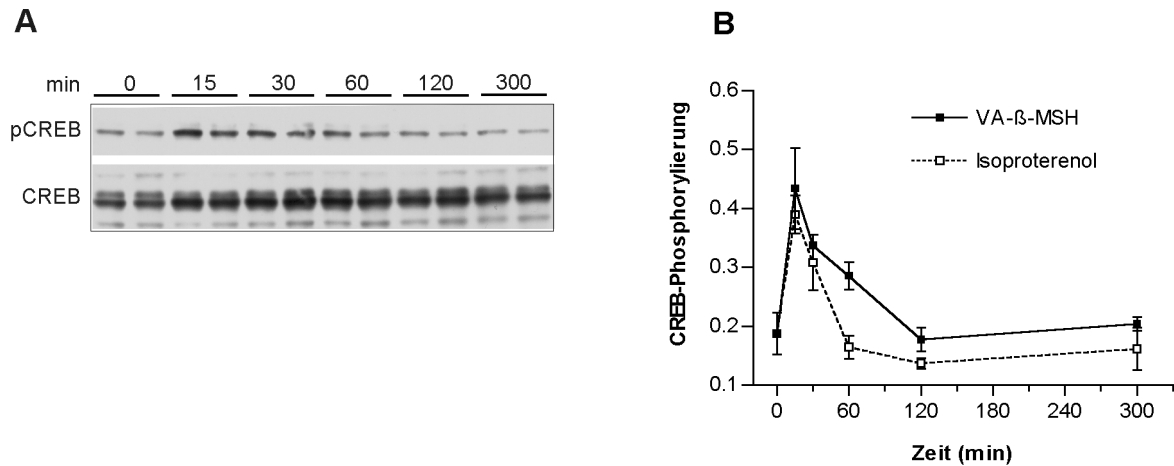


Abbildung 24 CREB-Phosphorylierung durch VA-β-MSH und Isoproterenol. 3T3-L1 Adipozyten wurden nach 15-stündiger Inkubation mit serumfreiem DMEM mit VA-β-MSH (3×10^{-7} M; A) bzw. Isoproterenol (1×10^{-6} M; nicht gezeigt) über die angegebenen Zeiträume stimuliert. Als Kontrolle diente DMEM. (B) Densitometrische Auswertung der pCREB- und CREB Signalstärke aus (A) und aus der Stimulation mit Isoproterenol. Als Ausmaß der CREB-Phosphorylierung ist das Verhältnis der relativen Flächen von pCREB zu CREB angegeben. Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für drei unabhängige, jeweils in Duplika durchgeführte Experimente. (pCREB: phosphoryliertes CREB)

Bei den sogenannten *Arginine-directed kinases* handelt es sich um eine Klasse von Kinasen, die eine gemeinsame Substratspezifität gegenüber Substraten, die an Position 3 relativ zu einem phosphorylierbaren Serin- bzw. Threoninrest einen Argininrest aufweisen. Dieser Klasse von Kinasen gehören PKA, PKG und PKC (3.9) an. Die Aktivierung der PKA erfolgte durch Forskolin, und die PKC wurde durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; CASTAGNA *et al.*, 1982; 3.9) aktiviert. Mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen das beschriebene Motiv gerichtet ist, wurde qualitativ mittels Immunoblotanalyse untersucht, inwieweit sich das Muster phosphorylierter Substrate nach Stimulation mit VA-β-MSH mit dem Phosphorylierungsmuster, welches durch Applikation von Forskolin bzw. PMA entstand, gleicht (Abbildung 25).

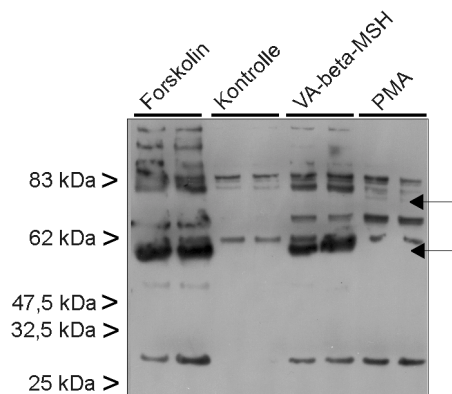


Abbildung 25 Phosphorylierung von Substraten durch die *Arginine-directed kinases* PKA, PKG und PKC. 3T3-L1 Adipozyten wurden für 30 min mit 1×10^{-6} M Forskolin, 3×10^{-7} M VA-β-MSH, 3×10^{-6} M PMA oder DMEM als Kontrolle stimuliert. Die Pfeile deuten auf fehlende bzw. zusätzliche Banden nach PMA-Stimulation im Vergleich zur Applikation von Forskolin bzw. VA-β-MSH hin.

Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, dass alle phosphorylierten Substrate, die nach Stimulation mit VA- β -MSH vorlagen, auch in den mit Forskolin behandelten Proben vorhanden waren. Unterschiede im Phosphorylierungsmuster waren hingegen nach PMA-Applikation erkennbar, die sich im Fehlen von Banden im Immunoblot, aber auch durch zusätzliche Banden auszeichneten. Dies ist in Abbildung 25 durch Pfeile angedeutet.

3.6.1.2 Untersuchung der Proteinkinase A-Untereinheiten in 3T3-L1 Adipozyten

Die RII β Isoform ist von den existierenden PKA-Untereinheiten RI α , RI β , RII α , RII β , C α , C β und C γ die dominierende Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A im Fettgewebe (CUMMINGS *et al.*, 1996). Bisher wurden die speziell in 3T3-L1 Adipozyten exprimierten PKA-Untereinheiten in der Literatur jedoch noch nicht beschrieben.

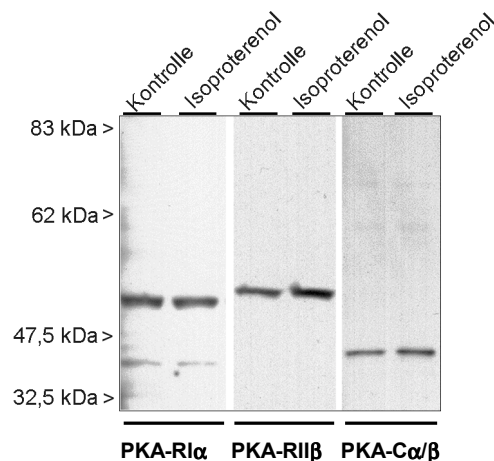


Abbildung 26 Proteinexpression der PKA-Untereinheiten in 3T3-L1 Adipozyten. Die über einen Zeitraum von 5 h mit DMEM (Kontrolle) oder Isoproterenol (1×10^{-6} M) inkubierten Zellen wurden in Lysispuffer aufgenommen und einer Immunoblotanalyse unterzogen.

Nach Optimierung der Antikörperkonzentrationen waren bereits nach kurzer Expositionszeit (20 s) die Banden der PKA-RII β Untereinheit bei der erwarteten Größe von 52 kDa zu erkennen. Erst nach längerer Filmexpositionszeit (70 min) zeigten sich ebenfalls Banden der RI α -Untereinheit (erwartete Größe: etwa 52 kDa) sowie der katalytischen Untereinheiten C α / β (40 kDa; Abbildung 26). Weder PKA-RI β noch RII α konnten nachgewiesen werden. Weiterhin wird gezeigt, dass die Inkubation der Zellen mit einem beta-adrenergen Agonisten in dem getesteten Zeitraum keinen Einfluss auf die Proteinexpression der PKA-Untereinheiten hatte, da diese auch nach fünfstündiger Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit Isoproterenol unverändert blieb.

Durch die Verwendung von modifizierten cAMP Analoga, die selektiver als cAMP mit unterschiedlicher Affinität an die A- und B- Bindungsstellen der regulatorischen PKA-Untereinheiten binden, können Aussagen darüber getroffen werden, ob die entsprechende regulatorische Untereinheit am lipolytischen Effekt nach Aktivierung der PKA beteiligt ist. Hierzu wurden cAMP-Analogpaare verwendet, die bevorzugt dasselbe Isoenzym, jedoch jeweils an der entgegengesetzten Bindungsstelle aktivieren.

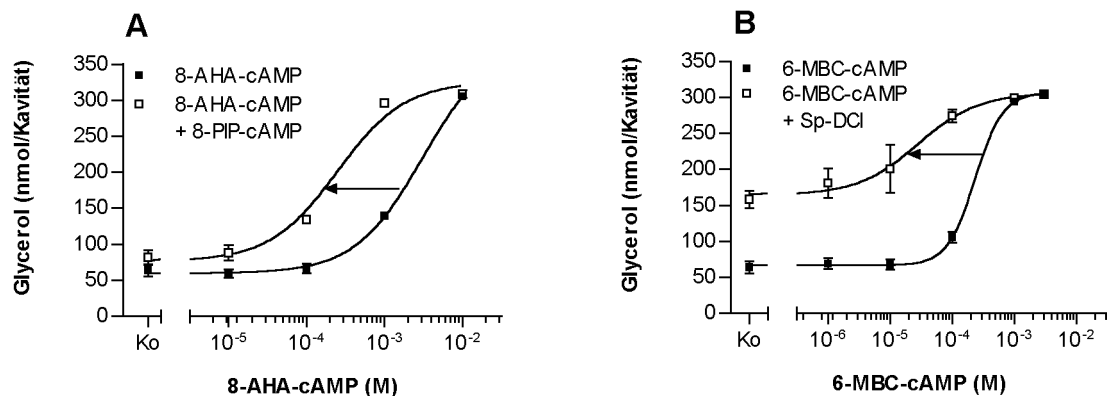


Abbildung 27 Glycerolfreisetzung nach 5-stündiger Inkubation durch selektive Aktivierung der PKA-Isoenzyme I und II. (A) Bevorzugte Aktivierung der A- bzw. B-Bindungsstelle der PKA Typ I durch 8-PIP-cAMP bzw. 8-AHA-cAMP. (B) Selektive Aktivierung der A- bzw. B-Bindungsstelle der PKA Typ II durch 6-MBC-cAMP bzw. Sp-5,6-DCI-cBIMPS, abgekürzt durch Sp-DCI. Gezeigt ist jeweils eines von drei in Triplika durchgeführten Experimenten.

Die Stimulation mit dem cAMP Analogpaar 8-Aminohexylamino-cAMP (8-AHA-cAMP) und 8-Piperidino-cAMP (8-PIP-cAMP), die bevorzugt die B- bzw. die A-Bindungsstelle der PKA Typ I aktivieren, zeigte einen synergistischen Effekt bei der induzierten Glycerolfreisetzung. Verglichen mit der alleinigen Inkubation mit 8-AHA-cAMP ist die Dosis-Wirkungskurve um etwa eine Zehnerpotenz nach links verschoben (Abbildung 27A). N⁶-Mono-t.-butylcarbamoyle-cAMP (6-MBC-cAMP) und Sp-5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol-3',5'-zyklisches Monophosphorothioat (Sp-5,6-DCI-cBIMPS), die bevorzugt die A- bzw. die B-Bindungsstelle der PKA Typ II aktivieren, zeigten bei einer Kostimulation ebenfalls einen synergistischen Effekt und eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve um etwa eine Zehnerpotenz nach links gegenüber der alleinigen Stimulation mit 6-MBC-cAMP. Dabei übte Sp-5,6-DCI-cBIMPS in einer Konzentration von 5 μM bereits selbst einen lipolytischen Effekt aus (Abbildung 27B). Beide PKA-Untereinheiten R1α und R11β sind folglich an der durch PKA-Aktivierung stimulierten Lipolyse beteiligt.

3.6.2 Vergleich der biologischen Wirkung der isolierten Peptide mit verwandten Peptiden

Neben β -MSH sind in der Literatur weitere, aus Proopiomelanocortin prozessierte Peptide beschrieben, die in Fettzellen Lipolyse auslösen. Zu diesen Peptiden gehören humanes ACTH (1-39) sowie α -MSH (RICHTER UND SCHWANDT, 1987). Beide Peptide wurden in 3T3-L1 Adipozyten auf ihre lipolytische Aktivität getestet und mit dem isolierten VA- β -MSH verglichen. Dabei wurde für α -MSH stellvertretend ein als α -MSH-Agonist beschriebenes Peptid, (Nle⁴, D-Phe⁷)- α -MSH (NDP- α -MSH), eingesetzt (SAWYER *et al.*, 1980). Zum Vergleich wurde mit dem Adenylatzyklaseaktivator Forskolin und mit den adrenergen Agonisten Isoproterenol und Noradrenalin stimuliert (Abbildung 28).

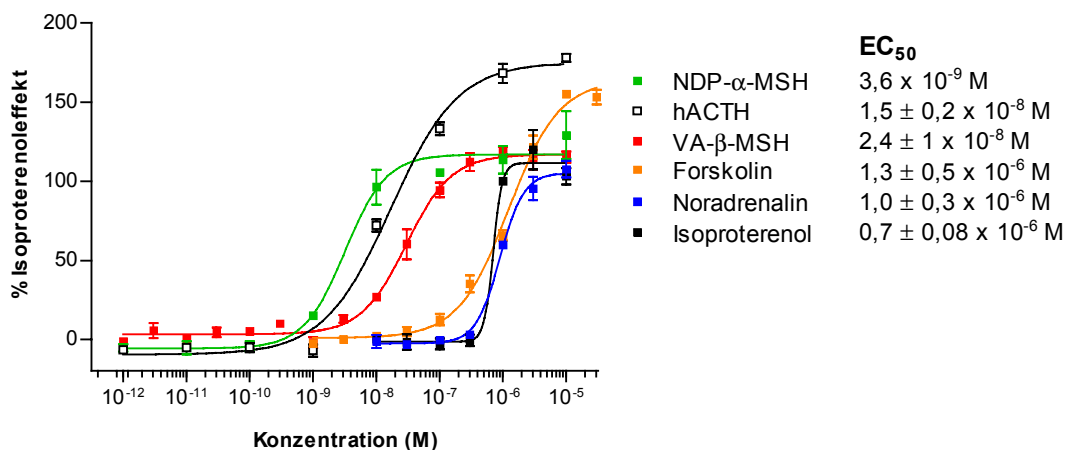


Abbildung 28 Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit EC₅₀-Werten von VA- β -MSH, hACTH (1-39) und (Nle⁴, D-Phe⁷)- α -MSH sowie Forskolin, Noradrenalin und Isoproterenol im Lipolyseassay nach fünfständiger Inkubation. Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente mit drei Einzelbestimmungen (Ausnahme: NDP- α -MSH, siehe Text).

Hinsichtlich ihrer Potenz besaßen VA- β -MSH und hACTH (1-39) vergleichbare EC₅₀-Werte bei höherer Effektivität von hACTH (1-39). Der EC₅₀-Wert von NDP- α -MSH lag in einem Experiment um etwa eine Zehnerpotenz unter dem von VA- β -MSH, dieses Resultat konnte jedoch nicht wiederholt werden. Ergebnisse weiterer Versuche, eine Dosis-Wirkungsbeziehung von NDP- α -MSH darzustellen, zeichnen sich durch einen gleichbleibenden lipolytischen Effekt von etwa 75 % des Isoproterenoleffektes im untersuchten Konzentrationsbereich von 1×10^{-12} bis 1×10^{-5} M NDP- α -MSH aus.

Die EC₅₀-Werte von Forskolin, Noradrenalin und Isoproterenol lagen im mikromolaren Bereich und damit deutlich über den EC₅₀-Werten der getesteten Peptide, wobei Forskolin eine höhere Potenz besaß als die adrenergen Agonisten.

3.7 Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung

VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) gleichen sich in ihrer Sequenz mit Ausnahme der N-terminalen Verlängerung von VA- β -MSH um die Aminosäuren Valin und Alanin. Zur Klärung, welche Bereiche der Aminosäuresequenz notwendig für die lipolytische Aktivität sind, wurden verkürzte Formen dieser Peptide, VA- β -MSH-(1-12), VA- β -MSH-(1-19), VA- β -MSH-(13-19), VA- β -MSH-(13-24) und Des-R¹²-VA- β -MSH-(1-19), synthetisiert und im Lipolyseassay getestet.

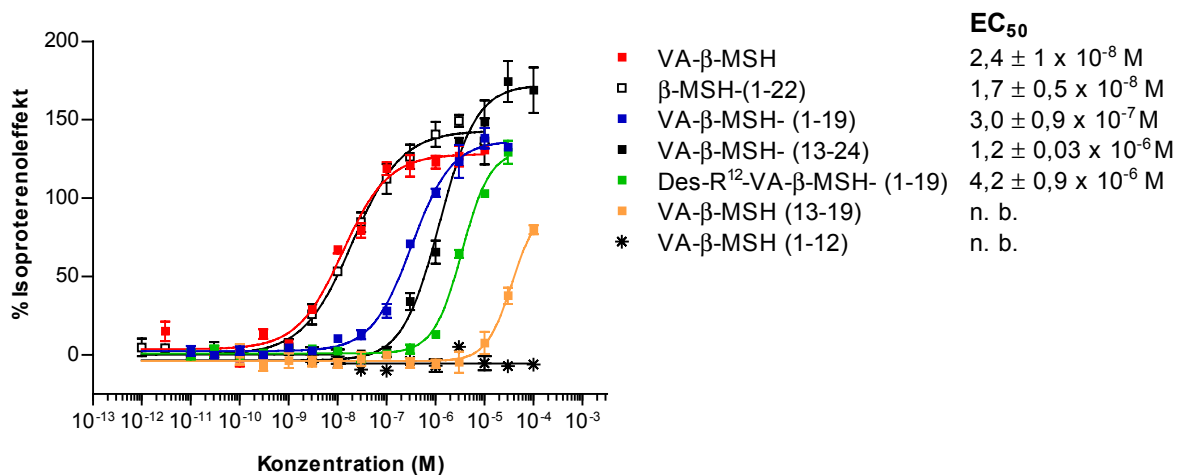


Abbildung 29 Konzentrations-Wirkungskurven mit EC₅₀-Werten von VA- β -MSH, β -MSH-(1-22), VA- β -MSH-(1-12), VA- β -MSH-(1-19), VA- β -MSH-(13-19), VA- β -MSH-(13-24) und Des-R¹²-VA- β -MSH-(1-19) im Lipolyseassay nach fünfständiger Stimulation. Es wurden für jede Substanz drei unabhängige Experimente in Triplika durchgeführt, von denen jeweils eines präsentiert ist.

Das C-terminal verkürzte Peptid VA- β -MSH-(1-19) besaß von allen trunkierten VA- β -MSH-Formen die geringste halbmaximale effektive Konzentration, gefolgt von dem N-terminal verkürzten VA- β -MSH-(13-24). Auch Des-R¹²-VA- β -MSH-(1-19) rief Lipolyse hervor, jedoch besaß es einen EC₅₀-Wert, der um etwa zwei Zehnerpotenzen höher lag als der von VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22). Weiterhin ist ersichtlich, dass die stark N- und C-terminal verkürzte Form VA- β -MSH-(13-19) zwar noch Lipolyse hervorrief, die Höhe des lipolytischen Effektes bei der höchsten getesteten Dosis von 10⁻⁴ M jedoch unter dem oberen Plateau der Dosis-Wirkungskurven der anderen getesteten Peptide lag. Aus diesem Grund war eine genaue Angabe des EC₅₀-Wertes für dieses Peptid nicht möglich. VA- β -MSH-(1-12) zeigte keinen lipolytischen Effekt (Abbildung 29).

3.8 Effekt lipolytisch aktiver Hämofiltratfraktionen in humanen Adipozyten

Im Verlauf der Isolierung von Faktoren, die in murinen 3T3-L1 Adipozyten Lipolyse hervorriefen, wurden lipolytisch aktive Fraktionen auch in humanen Adipozyten (2.6.1) auf ihre glycerolfreisetzende Wirkung untersucht. Als Kontrollpeptid für diese Untersuchungen wurde das in humanen Adipozyten als lipolytisch aktiv beschriebene atriale natriuretische Peptid [ANP-(99-126); SENGENÈS *et al.*, 2000] eingesetzt, welches auch hier die Glycerolfreisetzung um etwa das 4,8- bis 5-fache gegenüber der Kontrolle erhöhte. Isoproterenol hingegen zeigte keinen lipolytischen Effekt. Interessanterweise konnte im ersten Experiment, worin HF-Fraktionen nach dem ersten Isolierungsschritt (3.3) getestet wurden, keine lipolytische Aktivität in humanen Adipozyten detektiert werden. Resultate des zweiten Experiments mit HF-Fraktionen aus dem zweiten Isolierungsschritt zeigen etwa eine Verdopplung der Glycerolfreisetzung gegenüber der Kontrollstimulation, die jedoch auch bei der Fraktion, die in 3T3-L1 Adipozyten ein negatives Signal gab, auftrat. Die Resultate sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Aus Gründen der Verfügbarkeit humaner Adipozyten wurden für jedes Experiment nur Zweifachbestimmungen der HF-Fraktionen durchgeführt, von denen die Einzelwerte angegeben sind.

Tabelle 11 Glycerolfreisetzung von in 3T3-L1 Adipozyten lipolytisch aktiven Hämofiltratfraktionen in humanen Adipozyten nach fünfständiger Inkubation. Werte, zu denen Standardabweichungen angegeben sind, stellen Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen dar. HF (+) / (-) bezeichnet Hämofiltratfraktionen, die in 3T3-L1 Adipozyten ein positives/negatives Signal gaben.

Stimulus	Glycerol (nmol/Kavität)	
	Experiment 1	Experiment 2
DMEM (Kontrolle)	3,2 ± 1,4	4,8 ± 0,8
Isoproterenol (1 x 10 ⁻⁶ M)	1,7 ± 0,6	5,5 ± 0,7
ANP (1 x 10 ⁻⁷ M)	15,3 ± 3,2	24,4 ± 0,7
HF (+) des ersten Isolierungsschrittes (3.3)	Wert 1: 2,8; Wert 2: 2,4	
HF (-) des ersten Isolierungsschrittes (3.3)	Wert 1: 3,6; Wert 2: 3,2	
HF (+) des zweiten Isolierungsschrittes (3.3)		Wert 1: 9,8; Wert 2: 10,9
HF (-) des zweiten Isolierungsschrittes (3.3)		Wert 1: 8,9; Wert 2: 8,0

3.9 Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase C und der MAPK-Kaskade in der Lipolyse

Neben dem bekannten, die Lipolyse auslösenden Signalweg über die cAMP-abhängige Proteinkinase A gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass eine erhöhte Freisetzung von Glycerol auch über andere Signalkaskaden erfolgen kann. Zu diesen gehört der Signalweg, der die Aktivierung der Proteinkinase C und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (p42/44 MAPK = MAPK) involviert. Für einen Vergleich und zur Untersuchung von möglichen Verbindungen zwischen diesen beiden Signaltransduktionswegen, was in dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte, wurden das metabolisch stabile cAMP-Derivat Adenosin-3',5'-monophosphorothioat (Sp-Isomer; SpcAMPS; SCHAAP *et al.*, 1993) als PKA-Aktivator und das Diacylglycerolderivat Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; CASTAGNA *et al.*, 1982) als Aktivator der Proteinkinase C verwendet.

PMA zeigte nach fünfstündiger Stimulation in 3T3-L1 Adipozyten einen lipolytischen Effekt, dessen Ausmaß etwa 50 % der lipolytischen Wirkung von Isoproterenol nicht überschritt. Im Vergleich dazu zeigte das cAMP-Analog SpcAMPS einen lipolytischen Effekt von etwa 200 % des Isoproterenoleffektes. Erfolgte eine gleichzeitige Stimulation mit PMA in aufsteigenden Konzentrationen und 2, 6 oder 10 x 10⁻⁵ M SpcAMPS, wurde der lipolytische Effekt von PMA potenziert (Abbildung 30).

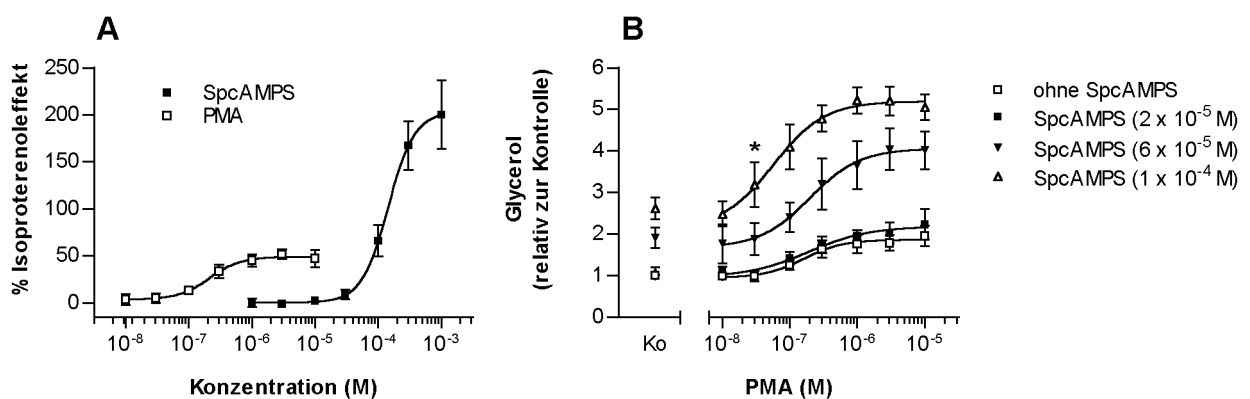


Abbildung 30 PMA- und SpcAMPS-induzierte Lipolyse in 3T3-L1 Adipozyten nach fünfstündiger Inkubation. Konzentrations-Wirkungskurven von PMA und SpcAMPS (A). Die lipolytische Aktivität ist in Prozent des lipolytischen Effektes von Isoproterenol (1 x 10⁻⁶ M) angegeben. (B) Effekt von steigenden PMA-Konzentrationen und der Kostimulation mit SpcAMPS. Die Glycerolfreisetzung ist relativ zur Basallipolyse (DMEM) angegeben. Die Standardabweichungen errechnen sich aus 9 bis 12 Einzelwerten aus 3 bis 4 Experimenten. Die Werte aller PMA-Konzentrationen $\geq 1 \times 10^{-7}$ M waren statistisch signifikant gegenüber dem Effekt von 1 x 10⁻⁸ M ($p < 0,05$). Weiterhin ergab bereits die Kombination von 3 x 10⁻⁸ M PMA mit 1 x 10⁻⁴ M SpcAMPS eine signifikant erhöhte Glycerolfreisetzung im Vergleich zu 1 x 10⁻⁸ M PMA mit 1 x 10⁻⁴ M SpcAMPS (* $p < 0,05$).

3.9.1 Beteiligung der Proteinkinase C an der PMA-vermittelten Lipolyse

Zur Untersuchung, ob die lipolytische Wirkung von PMA durch die Proteinkinase C induziert wird, wurden spezifische Inhibitoren dieser Kinase verwendet. Zu diesen gehören Ro-31-8220 (DIETER UND FITZKE, 1991), Bisindolylmaleimid I (Synonym: Gö6850; TOULLEC *et al.*, 1991) und Chelerythrin (HERBERT *et al.*, 1990). Abbildung 31 zeigt, dass eine signifikante Hemmung der durch PMA induzierten Lipolyse um $95,8 \pm 20,7\%$ durch Bisindolylmaleimid I und eine Inhibition um $61,7 \pm 10,2\%$ durch Ro-31-8220 erreicht werden konnte. Interessanterweise bewirkte Chelerythrin bis zu einer Konzentration von 3×10^{-6} M keine signifikante Inhibition der Lipolyse. Keiner der Inhibitoren veränderte in den angegebenen Konzentrationen die Basallipolyse (nicht gezeigt). Die inhibierende Wirkung von Bisindolylmaleimid I und Ro-31-8220 weist auf eine Beteiligung der Proteinkinase C an der durch PMA hervorgerufenen Glycerolfreisetzung hin.

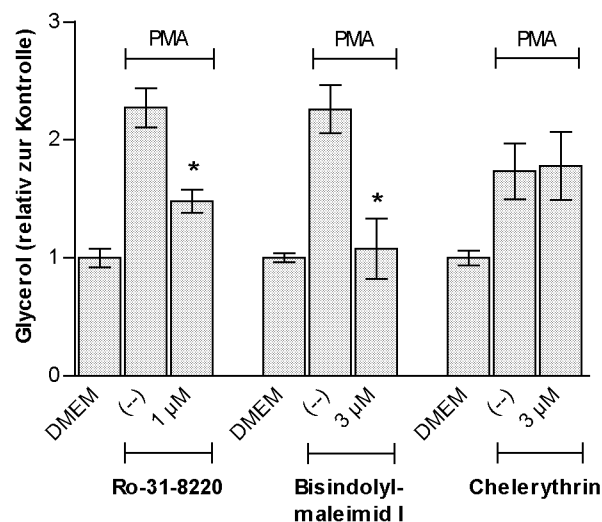


Abbildung 31 Einfluss von Proteinkinase C Inhibitoren auf die PMA-induzierte Lipolyse in 3T3-L1 Adipozyten. Die Inhibitoren wurden in der angegebenen Konzentration 40 min vorinkubiert. Anschließend wurde mit PMA (3×10^{-6} M) für 5 h stimuliert. Die gezeigten Mittelwerte berechnen sich aus $n=9$ Einzelwerten aus drei Experimenten. Die Signifikanzen (* $p < 0,05$) beziehen sich jeweils auf den lipolytischen Effekt ohne Inhibitor.

3.9.2 Induktion der MAP Kinase Kaskade durch Aktivierung der PKC

Eine Aktivierung der Proteinkinase C kann zur Aktivierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signaltransduktionsweges führen. Für den PKC-Aktivator PMA wurde die Aktivierung dieser Signalkaskade bereits beschrieben (MARQUARDT *et al.*, 1994). Die Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit PMA führte erwartungsgemäß zur Phosphorylierung von MAPK, die dosisabhängig ähnlich der lipolytischen Wirkung von PMA erfolgte (Abbildung

32A). Eine Stimulation mit dem PKA- Aktivator SpcAMPS in einer Konzentration, die bereits lipolytische Effekte zeigte, führte hingegen nicht zu einer MAPK-Phosphorylierung (Abbildung 32B; vgl. Abbildung 30). Auch höhere Konzentrationen von SpcAMPS besaßen keinen Effekt (nicht gezeigt). Die Kostimulation mit PMA und SpcAMPS bewirkte keine Veränderung der PMA-induzierten MAPK-Phosphorylierung, was darauf hindeutet, dass die MAPK nicht am Synergismus beider Substanzen in der Glycerolfreisetzung beteiligt ist. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele wurde der Antikörper gegen Gesamt-MAPK verwendet.

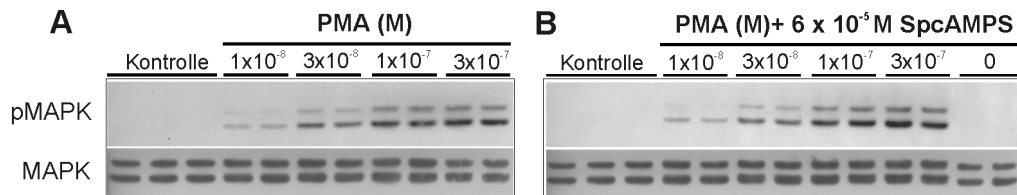


Abbildung 32 Immunoblotanalyse zur Detektion phosphorylierter MAP-Kinase. 3T3-L1 Adipozyten wurden für 30 min mit PMA, SpcAMPS, beiden Substanzen der angegebenen Konzentration oder mit zusatzfreiem DMEM (Kontrolle) stimuliert. (A) Konzentrationsabhängigkeit der MAPK-Phosphorylierung durch PMA. (B) MAPK Phosphorylierung durch Kostimulation mit PMA steigender Konzentration und SpcAMPS (6×10^{-5} M). Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente. (pMAPK: phosphorylierte Form der MAPK)

Im Falle einer der Phosphorylierung von MAPK durch PMA vorangehenden Aktivierung der PKC müsste die MAPK Phosphorylierung durch die PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I, Ro-31-8220 und Chelerythrin (3.9.1) hemmbar sein. Bisindolylmaleimid I sowie Ro-31-8220 bewirkten eine Abnahme der MAPK-Phosphorylierung, während Chelerythrin nicht zu einer Verringerung des pMAPK-Signals führte (Abbildung 33). Die Wirkung der genannten PKC-Inhibitoren entsprach der Verringerung der PMA-induzierten Lipolyse (3.9.1). In beiden Fällen war der stärkste inhibitorische Effekt durch Bisindolylmaleimid I zu verzeichnen, wogegen Chelerythrin weder die durch PMA hervorgerufene MAPK-Phosphorylierung noch die Lipolyse inhibierte.

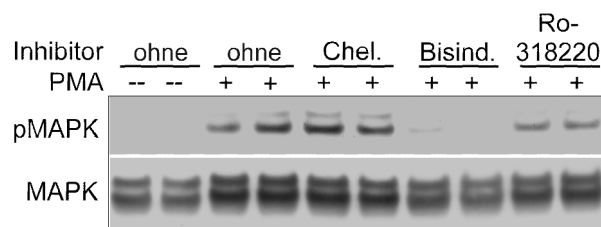


Abbildung 33 Effekt von PKC-Inhibitoren auf die MAPK-Phosphorylierung. 3T3-L1 Adipozyten wurden mit den PKC-Inhibitoren für 40 min vorinkubiert und anschließend für 30 min mit PMA (3×10^{-6} M) stimuliert. Die Inhibitorkonzentrationen betragen 1×10^{-6} M für Ro-31-8220 sowie 3×10^{-6} M für Bisindolylmaleimid I (Bisind.) und Chelerythrin (Chel.). Das gezeigte Resultat stellt eines von zwei separaten, in Duplika durchgeführten Experimenten dar.

3.9.3 Beteiligung der MAPK Kaskade an der Lipolyse

Die Kaskade der MAP-Kinase verläuft über eine Reihe hintereinandergeschalteter Proteinkinasen, welche die Signale von der Zellmembran weiter in das Zellinnere leiten. Sie verläuft Ras-abhängig oder Ras-unabhängig zur Raf- und weiter zur MEK1-Proteinkinase und führt zur Phosphorylierung von MAPK. Durch Behandlung mit den spezifischen MEK1-Inhibitoren PD98059 (ALESSI *et al.*, 1995) und U0126 (FAVATA *et al.*, 1998) kann diese Phosphorylierung blockiert werden. Der inhibierende Effekt von PD98059 auf die MAPK-Phosphorylierung wurde bestätigt und die Wirkung beider Inhibitoren auf die durch PMA induzierte Lipolyse untersucht.

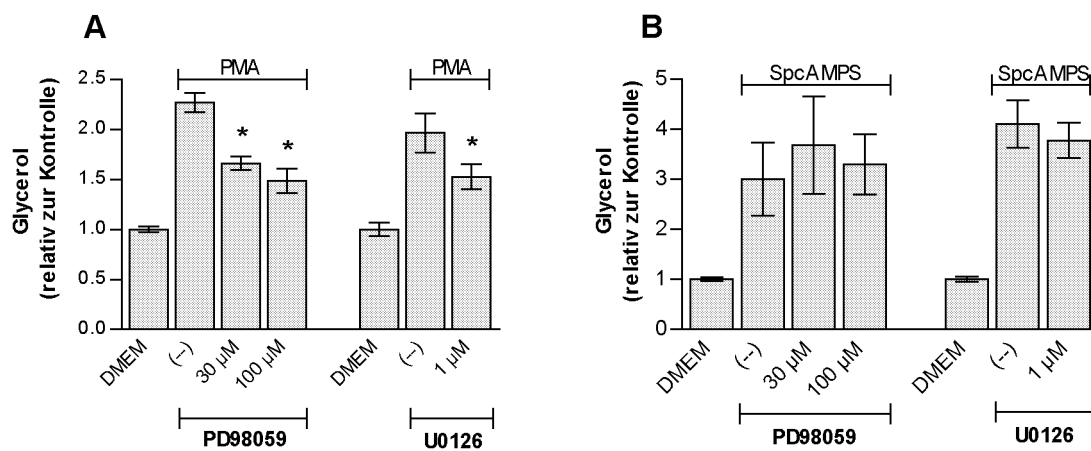


Abbildung 34 Effekt der MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 auf die PMA- (A) und SpcAMPS-induzierte Lipolyse (B). Nach 40-minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor wurden 3T3-L1 Adipozyten mit PMA (3×10^{-6} M), SpcAMPS (1×10^{-4} M) oder zusatzfreiem DMEM (Kontrolle) behandelt. Die Fehlerbalken errechnen sich aus $n=9$ Einzelwerten aus drei Bestimmungen. Die Signifikanzen (* $p < 0,05$) sind bezogen auf die Stimulation ohne Inhibitor.

Inkubierte man 3T3-L1 Adipozyten vor einer Stimulation mit PMA mit PD98059, so zeigte sich eine Verringerung der PMA-induzierten MAPK-Phosphorylierung (nicht gezeigt). Ebenso führte eine Vorinkubation mit PD98059 und U0126 zu einer signifikanten Hemmung der durch PMA-induzierten Lipolyse (Abbildung 34), was für SpcAMPS nicht gezeigt werden konnte. Die Resultate belegen die Beteiligung der MAP-Kinase-Kaskade an der PMA induzierten Lipolyse in 3T3-L1 Adipozyten und zeigen, dass die durch gezielte Aktivierung der PKA über SpcAMPS ausgelöste Lipolyse nicht den Signalweg über die MAPK-Kaskade einschließt.

3.9.4 Beteiligung des cAMP/PKA-Signalweges an der Lipolyse durch PMA und SpcAMPS

Aufgrund der Beobachtung, dass der lipolytische Effekt von PMA durch eine Kostimulation mit SpcAMPS potenziert wurde, besteht die Möglichkeit, dass eine Aktivierung des PKC/MAPK-Signalweges durch PMA auch zu einer Stimulation des cAMP/PKA-Signalweges führt. Deshalb wurde untersucht, ob die Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit PMA eine erhöhte cAMP-Produktion zur Folge hatte und ob es nach einer Kostimulation mit PMA und Forskolin zu einer Verstärkung des durch Forskolin hervorgerufenen cAMP-Anstiegs kam. Da es sich bei SpcAMPS um ein cAMP-Derivat handelt, wurde es in dem vorliegenden Experiment durch den Adenylatzyklaseaktivator Forskolin ersetzt.

Tabelle 12 Einfluss einer 30-minütigen Stimulation mit PMA, Forskolin bzw. beiden Substanzen auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in 3T3-L1 Adipozyten. Die Standardabweichungen errechnen sich aus 9 bis 12 Einzelwerten aus 3 bis 4 Experimenten. (* $p < 0,05$ ist bezogen auf die Inkubation mit DMEM)

Stimulus	cAMP (pmol/ml)	Stimulus	cAMP (pmol/ml)
DMEM (Kontrolle)	2,6 ± 1,2		
Forskolin (1×10^{-6} M)	22,5 ± 9,6 *		
Forskolin (3×10^{-6} M)	43,4 ± 13,8 *		
PMA (1×10^{-8} M)	2,0 ± 0,8	PMA (1×10^{-8} M) + Forskolin (1×10^{-6} M)	20,5 ± 8,2 *
PMA (3×10^{-8} M)	2,0 ± 0,9	PMA (3×10^{-8} M) + Forskolin (1×10^{-6} M)	20,9 ± 9,0 *
PMA (3×10^{-7} M)	1,9 ± 1,0	PMA (3×10^{-7} M) + Forskolin (1×10^{-6} M)	24,0 ± 10,7 *
PMA (3×10^{-6} M)	1,8 ± 1,0	PMA (3×10^{-6} M) + Forskolin (1×10^{-6} M)	25,4 ± 10,2 *

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich ist, führte die Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten mit PMA im Gegensatz zu der Stimulation mit Forskolin nicht zu einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels gegenüber der Kontrolle ($p > 0,05$). Auch die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit Forskolin und aufsteigenden Konzentrationen von PMA führte zu keiner signifikanten Veränderung der cAMP-Bildung gegenüber der alleinigen Stimulation mit Forskolin ($p > 0,05$). Der cAMP/PKA-Signalweg wird also weder durch PMA noch durch die Kostimulation von PMA mit Forskolin beeinflusst, und die intrazelluläre cAMP-Bildung ist nicht am synergistischen Effekt beider Signalwege an der Lipolyse beteiligt.

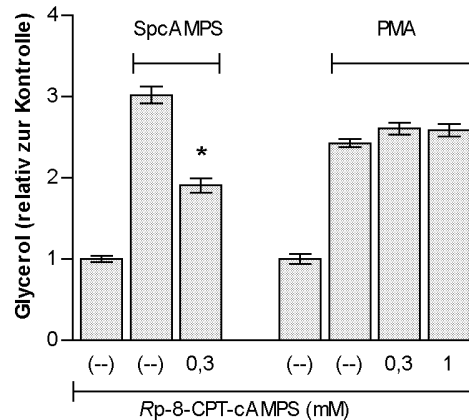


Abbildung 35 Einfluss des PKA-Inhibitors *Rp-8-CPT-cAMPS* auf die PMA- und SpcAMPS vermittelte Lipolyse. Auf die 40-minütige Vorinkubation mit dem Inhibitor folgte die Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit PMA (3×10^{-6} M), SpcAMPS (1×10^{-4} M) oder zusatzfreiem DMEM (Kontrolle). Die Fehlerbalken berechnen sich aus $n=9$ Einzelwerten aus drei Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist bezogen auf die Kontrollinkubation.

Der glycerolfreisetzende Effekt von PMA wurde nicht durch den PKA-Inhibitor *Rp-8-CPT-cAMPS* verringert (Abbildung 35). Es kam jedoch zu einer signifikanten Hemmung des lipolytischen Effektes von SpcAMPS, was zeigt, dass der Inhibitor in dem verwendeten System seine Wirkung entfaltet. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die alleinige Aktivierung des PKC/MAPK-Signalweges durch PMA in 3T3-L1 Adipozyten keine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges zur Folge hat.

3.9.4.1 Phosphorylierung von Perilipin, HSL und CREB

Wie bereits in Kap. 1.3 erläutert, erfolgt nach lipolytischer Stimulation und PKA-Aktivierung eine Phosphorylierung von Perilipin und HSL. Anhand des Migrationsverhaltens wurde mittels Immunoblotanalyse untersucht, ob die durch PKC und MAPK ausgelöste Lipolyse ebenfalls an eine Perilipin-Phosphorylierung gekoppelt ist (Abbildung 36). Der PKA-Aktivator SpcAMPS führte in Lipolyse auslösenden Konzentrationen zum Auftreten der Perilipinbanden bei höheren Molekulargewichten, was auf eine Phosphorylierung dieses Proteins hindeutet. Diese Migrationsverschiebung erfolgte nach Stimulation mit PMA nicht. Dies zeigt, dass die Phosphorylierung von Perilipin erwartungsgemäß an der PKA-vermittelten Lipolyse, nicht jedoch an der durch PMA-induzierten Glycerolfreisetzung beteiligt ist.

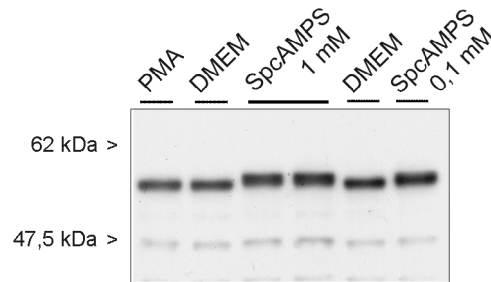


Abbildung 36 Effekt von PMA und SpcAMPS auf die Phosphorylierung von Perilipin. 3T3-L1 Adipozyten wurden mit PMA (3×10^{-6} M), SpcAMPS (1×10^{-4} M bzw. 1×10^{-3} M) oder zusatzfreiem DMEM stimuliert. Die erwartete Größe des Perilipinsignals liegt bei 56 bzw. 46 kDa für Perilipin A und B. Das Resultat zeigt eines von zwei unabhängigen Experimenten.

Mittels Immunopräzipitation und nachfolgender Immunoblotanalyse wurde untersucht, ob die Aktivierung des PKC/MAPK Signalweges durch PMA ebenso wie die Stimulation des PKA-Signalweges zu einer HSL-Phosphorylierung an Serinresten führt. Diese war in beiden Fällen deutlich stärker als die basale HSL-Phosphorylierung in der Kontrollstimulation. Die Kostimulation mit beiden Substanzen führte zu einer ähnlich starken Serinphosphorylierung der HSL wie die alleinige Inkubation mit PMA (Abbildung 37).

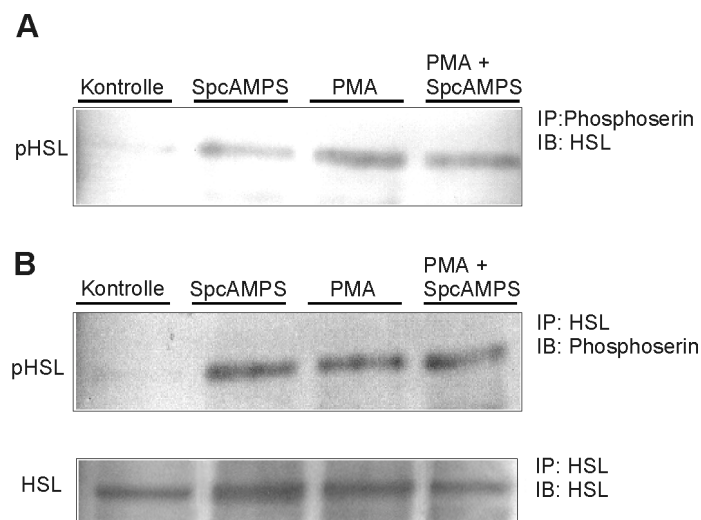


Abbildung 37 Effekt von PMA und SpcAMPS auf die Serinphosphorylierung der HSL. 3T3-L1 Adipozyten wurden mit PMA (3×10^{-6} M), SpcAMPS (1×10^{-3} M), PMA und SpcAMPS (1×10^{-4} M) oder zusatzfreiem DMEM stimuliert. (A) Immunopräzipitation mit einem gegen Phosphoserin gerichteten Antikörper und Immunoblotanalyse mit einem Anti-HSL-Antikörper. (B) Die Resultate aus (A) wurden unter Verwendung des Anti-HSL-Antikörpers zur Immunopräzipitation und des Anti-Phosphoserin-Antikörpers zur Immunoblotanalyse bestätigt. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung der Spuren im Gel wurde nach Immunopräzipitation für die Immunoblotanalyse der Anti-HSL-Antikörper verwendet. (pHSL: phosphorylierte HSL; IP: Immunopräzipitation; IB: Immunoblot)

Unter Verwendung des HSL-Antikörpers für die Immunopräzipitation wurden im Immunoblot zwei Banden detektiert, von denen die größere mit dem Molekulargewicht muriner HSL

korreliert. Die zweite Bande kleineren Molekulargewichtes, möglicherweise ein Abbauprodukt der HSL, besaß eine Größe von etwa 32 kDa und zeigte dieselbe Dynamik wie die größere Bande. Die Immunopräzipitation mit dem gegen Phosphoserin gerichteten Antikörper führte im Immunoblot nur zu der 32 kDa-Bande mit der entsprechenden Dynamik, die in Abbildung 37 gezeigt ist.

Der Transkriptionsfaktor CREB stellt ein Substrat für die cAMP-abhängige Proteinkinase dar (3.6.1.1). Es liegen jedoch Hinweise darauf vor, dass eine CREB-Phosphorylierung auch über die Beteiligung der Proteinkinase C erfolgen kann (THONBERG *et al.*, 2002). Daher wurde untersucht, ob es nach Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit PMA bzw. SpcAMPS sowie nach Kostimulation mit beiden Substanzen zu einer Phosphorylierung von CREB kam (Abbildung 38).

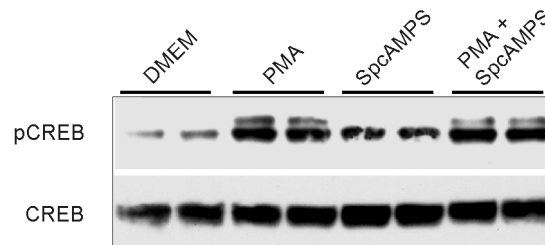


Abbildung 38 Effekt von PMA und SpcAMPS auf die Phosphorylierung von CREB. 3T3-L1 Adipozyten wurden über Nacht in serumfreiem DMEM inkubiert. Anschließend wurde mit PMA (3×10^{-6} M), SpcAMPS (1×10^{-4} M), beiden Stimulanzen der genannten Konzentrationen gemeinsam oder mit DMEM für 30 min stimuliert. Das Ergebnis der gezeigten Immunoblotanalyse ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils $n=2$.

Sowohl die Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit PMA als auch die Behandlung mit SpcAMPS führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von CREB im Vergleich zur Kontrolle. Die Kostimulation mit beiden Substanzen hatte kein stärkeres pCREB-Signal als die alleinige Stimulation mit PMA zur Folge. Interessanterweise war nach Stimulation mit PMA eine zweite Bande mit höherem Molekulargewicht oberhalb der pCREB-Bande zu erkennen. Diese Bande erschien nicht, wenn ausschließlich mit SpcAMPS stimuliert wurde.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung von β -MSH-(1-22) und VA- β -MSH als zirkulierende lipolytisch aktive Peptide

Sowohl β -MSH-(1-22) als auch das N-terminal um zwei Aminosäuren verlängerte VA- β -MSH wurden im Rahmen dieser Arbeit durch eine zehn Schritte umfassende Isolierung aus 20.000 l humanem Hämofiltrat als zirkulierende Peptide identifiziert, die in 3T3-L1 Adipozyten Lipolyse hervorrufen. Im Verlauf der Isolierung fanden sich bereits im zweiten Reinigungsschritt (vgl. Abbildung 11B) zwei Maxima lipolytischer Aktivität, die schließlich ab dem siebten Isolierungsschritt getrennt gereinigt wurden. Eine finale chromatographische Trennung beider Peptide war nur mittels Kationenaustauschchromatographie möglich, da selbst unter Verwendung einer analytischen RP-Chromatographiesäule VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) bei gleichem Acetonitrilgehalt im Elutionsmittel eluierten. Dieser Sachverhalt erscheint aufgrund der Aminosäuresequenzen der beiden Peptide nicht erklärbar, da es sich bei den gegenüber β -MSH-(1-22) zusätzlichen Aminosäuren Valin und Alanin um unpolare Aminosäuren handelt, die den Ladungszustand der Peptide in der Kationenaustauschchromatographie nicht verändern sollten. Dies wird durch fast identische berechnete isoelektrische Punkte [p_i 7,73 für VA- β -MSH bzw. p_i 7,77 für β -MSH-(1-22)] bestätigt. Möglicherweise ist hier die unterschiedliche Molekülmasse und damit die Molekülgröße von Bedeutung, da ionische Interaktionen zwischen dem Säulenmaterial und den zu eluierenden Substanzen mit zunehmender Substanzgröße schwächer werden. In Übereinstimmung damit steht das Elutionsverhalten der beiden Peptide in der Kationenaustauschchromatographie, da VA- β -MSH eine kürzere Retentionszeit besitzt als β -MSH-(1-22).

Auch in den beiden letzten Reinigungsschritten, in denen sich die Aktivität bereits im absorptionsstärksten Peak befand, konnten noch weitere, bei der verwendeten Wellenlänge schwächer absorbierende inaktive Substanzen abgetrennt werden. Die Isolierung der beiden Peptide führte daher zu Produkten mit einer Reinheit von über 90 %.

Bei β -MSH-(1-22) und dem bisher noch nicht beschriebenen VA- β -MSH handelt es sich um Prozessierungsprodukte desselben Vorläuferproteins, dem Proopiomelanocortin (POMC). Das POMC-Gen wird in Hypophyse, Haut, Immunsystem und im Hypothalamus exprimiert (zusammengefasst in PRITCHARD *et al.*, 2002). Das aus 267 Aminosäuren bestehende POMC-Protein wird gewebsspezifisch posttranslational prozessiert, wobei zunächst proACTH und β -Lipotropin entstehen. Während proACTH den Precursor von ACTH, aus dem schließlich α -MSH hervorgeht, darstellt, wird β -Lipotropin (β -LPH) in β -Endorphin und γ -Lipotropin (γ -LPH) gespalten (Abbildung 39). Letzteres wird in verschiedenen Geweben, nicht jedoch in der

Hypophyse, weiter zu β -MSH-(5-22) prozessiert (BERTAGNA *et al.*, 1989). Die Spaltung solcher meist inaktiver Prohormone zu aktiven Peptiden erfolgt durch Endoproteasen, sogenannte Prohormonkonvertasen (*prohormone convertases*; PCs), und findet größtenteils an Paaren basischer Aminosäuren wie Lysin oder Arginin statt. Die basischen Aminosäuren werden aus dem Spaltprodukt durch die Carboxypeptidase E entfernt (FRICKER, 1988), wodurch schließlich die biologisch aktiven Peptide entstehen. Für die Spaltung von POMC sind besonders die PC1 (auch als PC3 bezeichnet) und die PC2 verantwortlich (BENJANNET *et al.*, 1991).

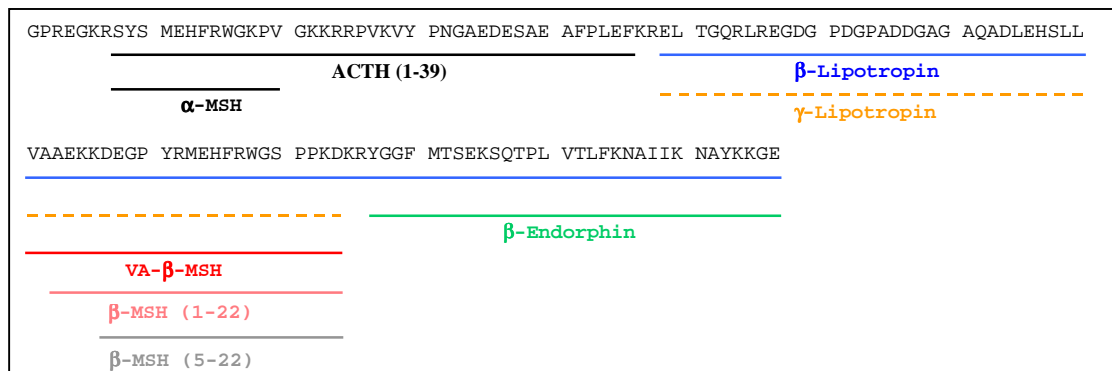


Abbildung 39 Aminosäuresequenzen von humanem Proopiomelanocortin (131-267) und die daraus durch proteolytische Spaltung durch Peptidasen hervorgehenden aktiven Peptide.

Die isolierten Peptide stellen aus POMC hervorgegangene Spaltprodukte dar, deren Entstehung am N-Terminus mit einer eher untypischen, nicht an einer Gruppe basischer Aminosäuren stattfindenden Spaltung verbunden ist. Aus diesem Grund wurde die Existenz von β -MSH-(1-22) in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Der um vier Aminosäuren verlängerte N-Terminus des humanen β -MSH-(1-22)-Moleküls bildet auch im Vergleich mit den β -MSH-Molekülen anderer Spezies eine ungewöhnliche N-terminale Verlängerung (LEE *et al.*, 1961; Abbildung 40). Möglicherweise gibt es weitere, an der Abspaltung biologisch aktiver Peptide aus POMC beteiligte Endopeptidasen, deren Angriffspunkte nicht zwangsläufig an Paaren basischer Aminosäuren liegen.

Schwein	DEGPYKMEHFRWGSPPKD
Rind	DSGPYKMEHFRWGSPPKD
Pferd	DEGPYKMEHFRWGSPPKD
Affe	DEGPYRMEHFRWGSPPKD
Mensch	AEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD

Abbildung 40 Aminosäuresequenzen von β -MSH unterschiedlicher Spezies.

HARRIS (1959) beschrieb erstmals humanes β -MSH-(1-22) im Hypophysengewebe, und Plasmaspiegel dieses Peptidhormons wurden von ABE *et al.* (1967) im Zusammenhang mit

verschiedenen pathologischen Zuständen mittels Radioimmunoassay bestimmt. Diese Resultate wurden jedoch von SCOTT UND LOWRY (1974) in Frage gestellt, deren Befunde darauf hindeuteten, dass es sich bei dem vermeintlich in humanem Hypophysengewebe und Plasma gefundenen β -MSH-(1-22) um ein Artefakt handelt und die gemessene Immunoreaktivität auf β -LPH zurückzuführen ist. Auch die artifizielle Entstehung von β -MSH-(1-22) aus β -LPH und γ -LPH durch zu milde Extraktionsbedingungen wie einem zu schwach sauren pH-Wert wurde diskutiert (BLOOMFIELD *et al.*, 1974). Durch gezielte Zugabe von humanem markierten ^{125}I - γ -LPH vor der Extraktion konnte unter Verwendung verschiedener Extraktionsmethoden allerdings keine Bildung von β -MSH-(1-22) gezeigt werden (BERTAGNA *et al.*, 1989). Die sofortige Einstellung des pH-Wertes des verwendeten Hämofiltrates auf $\text{pH} < 3$ und die Kühlung auf $4\text{ }^\circ\text{C}$ nach der Gewinnung, die bei der Generierung von Hämofiltratpeptidbanken durchgeführt werden (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997), dienen u. a. der weitgehenden Inhibition vorhandener Proteasen und sprechen ebenfalls dafür, dass die hier isolierten Peptide nicht während der Aufarbeitungsprozedur entstanden sind.

BARAT und Mitarbeiter (1979) zeigten, dass die lysosomale Proteinase Cathepsin D die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren Alanin³⁴ und Alanin³⁵ sowie zwischen Leucin⁷⁵ und Phenylalanin⁷⁶ des β -LPH-Moleküls spalten und so zur Entstehung von β -MSH-(1-22) beitragen kann. Es liegen jedoch bisher keine Hinweise darauf vor, dass detektierbare Mengen von Cathepsin D im Hämofiltrat vorliegen. Dies ist damit zu erklären, dass die Blutzellen, in denen dieses Enzym vorliegt, bei der Hämofiltration von dem zu filtrierenden Plasma abgetrennt werden. Des weiteren ist nicht bekannt, ob eventuell auftretende Fragmente von Cathepsin D noch enzymatische Aktivität aufweisen, die ohnehin unter den hier angewandten Bedingungen stark zurückgedrängt sein sollte. Anders dürfte dies bei der Aufarbeitung von Geweben sein, während der größere Mengen lysosomaler Enzyme aus den Zellen freigesetzt werden können.

Das in nicht-hypophysären Geweben wie dem Hypothalamus gefundene β -MSH-(5-22) (BERTAGNA *et al.*, 1989) wurde im Verlauf der Isolierung von β -MSH-(1-22) und VA- β -MSH nicht gefunden. Möglicherweise spielt es in der Zirkulation nur eine untergeordnete Rolle.

4.2 Biologische Effekte der isolierten Peptide

Beteiligung des MC-5-Rezeptors an der lipolytischen Wirkung von VA- β -MSH und β -MSH-(1-22)

Die unterschiedlichen biologischen Effekte aus POMC prozessierter Peptide werden durch Melanocortinrezeptoren (MCR) vermittelt, von denen bisher fünf (MC1-R bis MC5-R) beschrieben wurden (vgl. GANTZ UND FONG, 2003). In Übereinstimmung mit der beschriebenen Genexpression dieser Rezeptoren in 3T3-L1 Adipozyten (NORMAN *et al.*, 2002) wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die beiden einzigen auf transkriptionaler Ebene detektierten Rezeptoren, der MC2-R und der MC5-R, auch auf Proteinebene nachweisbar sind. In den verwendeten humanen Adipozyten wurde im Gegensatz dazu nur das MC2-Rezeptorprotein nachgewiesen.

Aufgrund der cDNA-Sequenzen des MC5-R des Menschen und der Maus sollte das errechnete Molekulargewicht des Proteins bei etwa 36 bis 37 kDa liegen. Die ungefähre Größe des detektierten Signals für den MC5-R im Immunoblot beträgt jedoch etwa 62 kDa (Abbildung 19), was in posttranslationalen Modifikationen dieses Proteins begründet sein dürfte, die bereits von AKBULUT *et al.* (2001) in Rattenlymphozyten beschrieben wurden. Auch der MC2-R lag möglicherweise posttranslational modifiziert, z. B. glykosyliert oder acyliert vor, da das Hauptsignal für den MC2-R im Immunoblot im Gegensatz zur rechnerisch ermittelten Masse von etwa 34 kDa eine Masse von etwa 67 kDa aufwies. Ein Signal für den MC2-R in dem zu erwartenden Größenbereich wurde nur in 3T3-L1 Adipozyten detektiert. Das Ausbleiben eines solchen Signals in humanen Adipozyten könnte mit einer geringeren Menge an Material oder aber mit einer anderen posttranslationalen Modifizierung im Gegensatz zu 3T3-L1 Adipozyten zusammenhängen.

Die pharmakologische Besonderheit des MC2-R ist, dass nur ACTH an diesen Rezeptor bindet und er keine nennenswerte Affinität zu α -, β -, oder γ -MSH besitzt (SCHIÖTH *et al.*, 1996). Da von den übrigen vier Melanocortinrezeptoren nur der MC5-R in 3T3-L1 Adipozyten exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, dass dieser Rezeptor die lipolytische Aktivität der isolierten Peptide vermittelt. Untersuchungen von LABBÉ *et al.* (1994) zeigten bereits eine Bindung von β -MSH an den MC5-R. Mit Hilfe der Antisensetechnik sollte die Proteinexpression des MC5-R, die während der Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten einsetzt, unterbunden werden. So sollte ein Hinweis auf die Beteiligung des MC5-R am lipolytischen Effekt von VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22) erhalten werden. Die Antisensetechnik zeigte jedoch keinen Effekt auf die Proteinmenge an MC5-R (Abbildung 20). Eine ausbleibende Aufnahme der Antisense-Oligonukleotide in die Zellen konnte durch das Kontrollexperiment mit fluoreszierenden Oligonukleotiden ausgeschlossen werden.

Interessanterweise erfolgte offensichtlich keine Aufnahme der Oligonukleotide in den Zellkern. Ob dies für den ausbleibenden Effekt der Antisense-Technik von zentraler Bedeutung ist, ist jedoch unklar, da die eigentliche Proteintranslation am endoplasmatischen Retikulum und nicht im Nukleus stattfindet. Allerdings könnte eine Interaktion zwischen Antisense-Oligonukleotiden, die in den Zellkern gelangen, mit der dort reifenden mRNA stattfinden und so zum Verhindern der Proteintranslation beitragen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die MC5-R-mRNA in so hohem Maße exprimiert wird, dass die verwendete Antisense-Oligonukleotidkonzentration für eine Unterbindung der Translation nicht ausgereicht hat. Eine weitere Möglichkeit wäre eine zu schwache Bindung zwischen Antisense-Oligonukleotiden und der Ziel-mRNA. Um einen indirekten Hinweis auf eine Beteiligung des MC5-R am lipolytischen Effekt von β -MSH-(1-22) und VA- β -MSH zu erhalten, wäre die Transfektion einer Zelllinie, die selbst den MC5-R nicht exprimiert, mit dem MC5-R und anschließender Bestimmung des cAMP-Spiegels nach Stimulation mit den gereinigten Peptiden geeignet (HATTA *et al.*, 2001). Dies setzt allerdings die Anwesenheit der entsprechenden G-Proteine, an die der MC5-R natürlicherweise koppelt, voraus.

Signaltransduktion

Alle fünf Melanocortinrezeptoren vermitteln ihre Effekte über stimulatorische G_s-Proteine und die damit verbundene Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Aktivierung der Adenylatzyklase. Die Signalweiterleitung dieser Rezeptoren wurde aber auch mit anderen Signalwegen wie der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Aktivierung der Phospholipase C (KONDA *et al.*, 1994), mit dem Influx extrazellulärer Kalziumionen (KOJIMA *et al.*, 1985) oder mit der Aktivierung der PKC (KAPAS *et al.*, 1995) oder der MAPK (ENGLARO *et al.*, 1995) in unterschiedlichen Zellsystemen in Verbindung gebracht.

Die in dieser Arbeit gezeigte Signalweiterleitung der isolierten Peptide über cAMP und die Aktivierung der PKA erscheint folglich nicht unerwartet. Auch die Phosphorylierung von Perilipin durch VA- β -MSH deutet auf diesen Signaltransduktionsweg hin. Eine Perilipin-Phosphorylierung wurde auch durch Stimulation mit cAMP-Analoga in 3T3-L1 Adipozyten und durch Einwirkung natriuretischer Peptide speziesspezifisch in humanen Adipozyten gezeigt (FRICKE *et al.*, 2004; SENGENÈS *et al.*, 2003). Auffällig ist jedoch die Tatsache, dass sich aus der dosisabhängigen Stimulation mit β -MSH-(1-22) bzw. VA- β -MSH für die intrazelluläre cAMP-Konzentration EC₅₀-Werte ergeben, die um etwa eine Zehnerpotenz höher liegen als diejenigen aus den Messungen der lipolytischen Aktivität. Dieser Effekt tritt nicht bei Forskolin auf, welches ohne Interaktion mit einem Rezeptor wirkt (SEAMON *et al.*, 1981). Für Forskolin liegt es deshalb nahe, dass die lipolytische Wirkung nur durch die Aktivierung der Adenylatzyklase vermittelt wird. Im Gegensatz dazu könnte angenommen werden, dass dies bei den isolierten Peptiden nicht ausschließlich der Fall ist und weitere Signalwege eine Rolle

spielen. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Konzentration an VA- β -MSH, die für die Inhibitorexperimente mit Rp-8-CPT-cAMPS und H89 verwendet wurde, stets 2×10^{-8} M betrug. Diese Peptidkonzentration führte zu einem deutlichen lipolytischen Effekt, jedoch nicht zu einem signifikanten Anstieg von intrazellulärem cAMP (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 21B). Die signifikante Inhibition der VA- β -MSH-induzierten Lipolyse durch Rp-8-CPT-cAMPS bei dieser Konzentration spricht jedoch dafür, dass auch in diesem Konzentrationsbereich bereits eine erhöhte Produktion von cAMP vorliegen muss, da Rp-8-CPT-cAMPS kompetitiv die cAMP-Bindungsstellen der PKA besetzt. Rp-8-CPT-cAMPS kann nur dann eine inhibitorische Wirkung ausüben, wenn ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels vorliegt. Möglicherweise ist bereits ein sehr geringer, mit dem verwendeten ELISA nicht erfassbarer cAMP-Anstieg für einen deutlich detektierbaren lipolytischen Effekt verantwortlich. Weiterhin ist eine Beteiligung der MAPK an der Signalweiterleitung durch VA- β -MSH auszuschließen, da entsprechende Experimente gezeigt haben, dass eine 10- bzw. 30-minütige Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit VA- β -MSH nicht zu einer MAPK-Phosphorylierung führt (Daten nicht gezeigt). Auch die Mobilisierung von Kalziumionen scheint in dem hier untersuchten Kontext in 3T3-L1 Adipozyten keine Rolle zu spielen, da keiner der verwendeten Kalziumblocker zu einer Hemmung der VA- β -MSH-vermittelten Lipolyse führte (Daten nicht gezeigt).

Die Klasse von Kinasen, welche auch als *Arginine-directed kinases* bezeichnet werden, besitzt eine gemeinsame Substratspezifität gegenüber Proteinen oder Peptiden, die an Position 3 relativ zu einem phosphorylierten Serin- bzw. Threoninrest einen Argininrest aufweisen. Zu diesen Kinasen gehören PKA, PKG und PKC. Das mittels Immunoblotanalyse erhaltene Muster der von diesen Kinasen phosphorylierten Substrate diente dazu, den Signaltransduktionsweg, der durch VA- β -MSH aktiviert wird, mit dem durch Forskolin aktivierten Signalweg über die PKA und dem durch PMA aktivierten PKC-Signalweg qualitativ zu vergleichen. Dieser Vergleich ergab ein identisches Muster phosphorylierter Substrate nach Stimulation mit VA- β -MSH und Forskolin. Das Muster der Substrate, die durch PKC phosphoryliert werden, unterschied sich davon deutlich. Trotzdem im Verlauf dieser Arbeit die Identität dieser Banden im Immunoblot noch nicht ermittelt wurde, kann festgehalten werden, dass VA- β -MSH und Forskolin im wesentlichen denselben Signalweg aktivieren. Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, dass am lipolytischen Effekt der isolierten Peptide nur der cAMP/PKA-Signalweg beteiligt ist.

Die dominante PKA-Untereinheit im Fettgewebe ist RII β (CUMMINGS *et al.*, 1996). Es wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass in 3T3-L1 Adipozyten neben der RII β -Untereinheit auch RI α exprimiert wird. Die Verwendung von cAMP-Analogpaaren, die jeweils bevorzugt nur einen PKA Typ (Typ I oder Typ II) aktivieren (SCHWEDE *et al.*, 2000), belegt, dass beide PKA-Untereinheiten an der Vermittlung der Lipolyse über den cAMP/PKA-Signalweg in 3T3-L1

Adipozyten beteiligt sind. Eine Veränderung der Proteinmenge beider PKA-Untereinheiten bleibt in dem untersuchten Zeitfenster von fünf Stunden mit Isoproterenol aus. Dies entspricht den Befunden im Pinealorgan von Nagern (MARONDE *et al.*, 1999), es wurde jedoch auch von einem Verschwinden von $R\alpha$ durch längere Inkubation mit cAMP-Analoga berichtet (TELGEMANN *et al.*, 1997).

Die Untersuchung der Phosphorylierungsrate des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*), der ein Substrat für die aktivierte PKA darstellt (GONZALEZ UND MONTMINY, 1989), diente als weiterer Parameter, der auf eine Aktivierung der PKA durch VA- β -MSH deutet (Abbildung 24). Ein Zusammenhang mit der Lipolyse wurde für pCREB nicht überprüft. Es liegen in der Literatur bisher keine Hinweise auf die differentielle Regulierung von Lipolyse beeinflussenden Genen in dem untersuchten Inkubationszeitraum von fünf Stunden vor.

Phosphorylierung von CREB kann neben PKA auch durch PKC (THONBERG *et al.*, 2002) oder extrazellulär regulierte Kinasen (SATO *et al.*, 1997) vermittelt werden. Die PMA-induzierte PKC-Aktivierung führte auch in 3T3-L1 Adipozyten zu einer erhöhten CREB-Phosphorylierung. Im Gegensatz zu dem synergistischen Effekt auf die Lipolyse (Abbildung 30) wird durch die Koaktivierung des cAMP/PKA- und des PKC/MAPK-Signalweges das Ausmaß der CREB-Phosphorylierung gegenüber der Aktivierung nur eines Signalweges nicht verändert (Abbildung 38). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die CREB-Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Lipolyse besitzt. Die Suche nach potentiell in die Lipolyse involvierten Zielgenen dürfte einen tieferen Einblick in diesen Sachverhalt vermitteln. Weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang, z.B. der Einsatz von spezifischen Inhibitoren der PKA und der MEK, sollten außerdem zeigen, ob die VA- β -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung allein auf die PKA-Aktivierung zurückzuführen ist und ob nach Aktivierung der PKC auch die pMAPK zur Phosphorylierung dieses Transkriptionsfaktors führt.

Eine Zusammenfassung dieser beschriebenen Ergebnisse ist in Abbildung 42 dargestellt.

Vergleich der isolierten Peptide mit anderen Proopiomelanocortin-Peptiden

Der lipolytische Effekt von Peptiden, die aus POMC prozessiert werden, ist bereits seit längerem bekannt, und eine Vielzahl von β -LPH- und ACTH-Fragmenten wurde in primären Adipozyten von Kaninchen untersucht (RICHTER UND SCHWANDT, 1987). Zu diesen gehörten auch das lipolytisch wirkende β -MSH-(1-22) und VA- β -MSH-(13-24), und ein Heptapeptid mit der Sequenz MEHFRWG, das sowohl im ACTH- als auch im β -LPH-Molekül vorkommt, wurde als für den lipolytischen Effekt notwendiger Bestandteil identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit

wurden weitere β -LPH- bzw. VA- β -MSH-Fragmente auf ihre lipolytische Aktivität in 3T3-L1 Adipozyten untersucht (Abbildung 41, vgl. auch Abbildung 29).

VA- β -MSH-(13-19)		MEHFRWG	lipolytisch ab $\sim 3 \times 10^{-5}$ M
VA- β -MSH-(1-12)	VAAEKKDEGPYR		keine Lipolyse
Des-R ¹² -VA- β -MSH-(1-19)	VAAEKKDEGPY	MEHFRWG	EC ₅₀ = $4,2 \pm 0,90 \times 10^{-6}$ M
VA- β -MSH-(13-24)		MEHFRWGSPPKD	EC ₅₀ = $1,2 \pm 0,03 \times 10^{-6}$ M
VA- β -MSH-(1-19)	VAAEKKDEGPYR	MEHFRWG	EC ₅₀ = $3,0 \pm 0,90 \times 10^{-7}$ M
VA- β -MSH	VAAEKKDEGPYR	MEHFRWGSPPKD	EC ₅₀ = $2,4 \pm 1,90 \times 10^{-8}$ M
β -MSH-(1-22)	AEKKDEGPYR	MEHFRWGSPPKD	EC ₅₀ = $1,7 \pm 0,50 \times 10^{-8}$ M

Abbildung 41 Untersuchte POMC-Peptide, basierend auf der Sequenz von VA- β -MSH, und die im Lipolyseassay bestimmten EC₅₀-Werte.

Es konnte bestätigt werden, dass das von RICHTER UND SCHWANDT (1987) beschriebene Heptapeptid [hier bezeichnet als VA- β -MSH-(13-19)] für eine lipolytische Wirkung im Molekül vorhanden sein muss, da das C-terminal trunkeerte VA- β -MSH-(1-12), das diese Aminosäuresequenz nicht enthält, keinerlei Lipolyse hervorruft. Aufgrund der EC₅₀-Werte wurde für die untersuchten VA- β -MSH-Fragmente folgende Reihe bestimmt: VA- β -MSH = β -MSH-(1-22) < VA- β -MSH-(1-19) < VA- β -MSH-(13-24) < Des-R¹²-VA- β -MSH-(1-19) < VA- β -MSH-(13-19), wobei VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) mit etwa 2×10^{-8} M die niedrigsten EC₅₀-Werte im Lipolyseassay aufweisen. Die vergleichsweise hohe geschätzte EC₅₀ von VA- β -MSH-(13-19) im Gegensatz zu VA- β -MSH und β -MSH korreliert mit den Daten der Bindungsstudien von LABBÉ *et al.* (1994). Sie beschrieben eine um etwa zwei Zehnerpotenzen schwächere Affinität dieses Heptapeptids zu dem in Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) exprimierten MC5-R.

Sowohl die C-terminale Verlängerung des Heptapeptids um die Aminosäuresequenz SPPKD als auch die Verlängerung am N-Terminus um zwölf Aminosäuren führen zu einer starken Verringerung der EC₅₀. Dabei scheint die C-terminale Verlängerung [VA- β -MSH-(13-24)] eine weniger wichtige Rolle zu spielen, da hier die EC₅₀ um etwa eine Zehnerpotenz höher liegt als durch N-terminale Verlängerung [VA- β -MSH-(1-19)] des Heptapeptids. Das Fehlen von Arginin¹² im VA- β -MSH-(1-19)-Molekül bewirkt gegenüber VA- β -MSH-(1-19) eine Erhöhung des EC₅₀-Wertes um etwa eine Zehnerpotenz. Dies deutet darauf hin, dass dieser Ligand durch sterische Behinderung im Vergleich zu VA- β -MSH-(1-19) noch weniger optimal in die Bindungsstelle des entsprechenden Rezeptors passt. Die fast gleichen EC₅₀-Werte für VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) legen nahe, dass die N-terminale Verlängerung von β -MSH-(1-22) um die Aminosäuren Valin und Alanin die Peptid-Rezeptor-Interaktion nicht wesentlich verändert.

Die EC_{50} -Werte der isolierten Peptide liegen um etwa zwei Zehnerpotenzen unter denen der getesteten adrenergen Rezeptoragonisten. Der Vergleich mit ACTH-(1-39) ergab, dass es einen ähnlichen EC_{50} -Wert wie die isolierten Peptide besitzt. Dies steht im Einklang mit den Resultaten von BOSTON UND CONE (1996), die eine ACTH-vermittelte cAMP-Produktion in 3T3-L1 Adipozyten beschrieben. Der lipolytische Effekt von NDP- α -MSH, der ebenfalls auf eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung zurückzuführen ist, widerspricht hingegen den Berichten dieser Arbeitsgruppe, die keine cAMP-Erhöhung detektierten. Im Einklang mit der hier gemessenen Lipolyse wurde von LABBE *et al.* (1994) eine Erhöhung der cAMP-Produktion nach Aktivierung des MC5-R durch NDP- α -MSH gezeigt. Unklar bleibt in diesem Zusammenhang die in dieser Arbeit nicht vorhandene Reproduzierbarkeit des konzentrationsabhängigen Effektes von NDP- α -MSH. Der lipolytische Effekt von NDP- α -MSH lag stattdessen auch bei Peptidkonzentrationen von 1×10^{-12} M auf Höhe des Isoproterenoleffektes. Experimentell konnte eine Wechselwirkung mit dem Glyceroldetektionsreagenz ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass dieser Effekt bei paralleler Inkubation mit VA- β -MSH steigender Konzentrationen nicht auftrat, spricht für einen Peptid-spezifischen Effekt, der möglicherweise in der Ligand-Rezeptor-Interaktion zu suchen ist.

Effekt der isolierten Peptide in humanen Adipozyten

Humane Adipozyten von übergewichtigen Spendern mit einem durchschnittlichen BMI von 26 kg/m^2 zeigten keine erhöhte Lipolyse nach Gabe von HF-Fractionen, die in 3T3-L1 Adipozyten zu einem starken lipolytischen Signal geführt hatten. Auch Isoproterenol zeigte keinen Effekt, was mit der in der Literatur beschriebenen verminderten Katecholamin-stimulierten Lipolyse in Fettzellen übergewichtiger bzw. adipöser Personen korreliert (HOROWITZ UND KLEIN, 2000). Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass der MC5-R tatsächlich den lipolytischen Effekt der isolierten Peptide vermittelt. Dies wird nur aufgrund des Melanocortinrezeptor-Expressionsmusters und der Annahme, dass kein weiterer, bisher unbekannter Melanocortinrezeptor existiert, als wahrscheinlich angesehen. Daher ist es nicht völlig klar, ob die fehlende Expression des MC5-R in den verwendeten humanen Adipozyten eine Begründung dafür ist, dass die während der Isolierung getesteten HF-Fractionen keine lipolytische Aktivität zeigten. Es könnte jedoch ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des MC5-R am lipolytischen Effekt der isolierten Peptide in 3T3-L1 Adipozyten sein.

Die Expression der Melanocortinrezeptoren in Fettgewebe wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits wurde der MC5-R von CHHAJLANI (1996) detektiert, andererseits fanden SMITH *et al.* (2003) keine mRNA-Expression des MC5-R, wohl aber, ebenso wie in dieser Arbeit, MC2-R-mRNA in humanem Fettgewebe. Die letzteren Befunde wurden allerdings durch die Resultate von KIWAKI UND LEVINE (2003) nicht bestätigt. Generell ist zu diesen Daten

anzumerken, dass die unterschiedliche anatomische Herkunft der Fettdepots, aus denen Adipozyten isoliert werden, zu verschiedenen Resultaten zu führen scheint. Auch die Isolierung und *in vitro* Kultur von Fettzellen *per se* kann eine veränderte Genregulation bewirken (RUAN *et al.*, 2003).

Die Expression der verschiedenen MCR-Isoformen und auch die Effektivität verschiedener Melanocortine ist des weiteren speziesabhängig. Während z.B. ACTH in Adipozyten von Nagern einen starken lipolytischen Effekt auslöst (KIWAKI UND LEVINE, 2003), konnte dies bei Fettzellen von Affen nicht gezeigt werden (BOUSQUET-MELOU *et al.*, 1995). Es ist daher nicht auszuschließen, dass der lipolytische Effekt der isolierten Peptide ebenfalls speziesabhängig variiert.

Obwohl kein über cAMP vermittelter lipolytischer Effekt in den humanen Adipozyten detektiert wurde, bewirkte das spezifisch nur in Primaten lipolytisch über cGMP wirkende atriale natriuretische Peptid [ANP (99-126); SENGENÈS *et al.*, 2002] auch in den hier durchgeführten Versuchen einen Anstieg der Lipolyse um etwa das Fünffache gegenüber der Kontrolle. Dies zeigt, dass die verwendeten Zellen grundsätzlich zur Lipolyse befähigt sind.

4.3 Physiologische Funktionen des Melanocortinsystems

Melanocortine sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt. Darunter sind u. a. die Pigmentierung der Haut, Steroidogenese, Entzündungsprozesse und die Funktion exokriner Drüsen zu nennen (zusammengefasst in GANTZ UND FONG, 2003). Die Rolle des Melanocortinsystems im Energiehaushalt ist im Kontext dieser Arbeit besonders hervorzuheben. Der MC3-R und der MC4-R werden vorwiegend im Hypothalamus exprimiert, und vor allem der Aktivierung des MC4-R wird eine Beeinflussung des Körpergewichtes zugeschrieben, was durch die Beschreibung von Mutationen dieses Rezeptorgens, die zu Fettsucht führen, untermauert wurde (VAISSE *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass von allen Melanocortinen α -MSH dasjenige mit dem größten Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt ist. Die Hemmung der zentralen Melanocortinkomponenten in Nagern hat einen steigernden Effekt auf Nahrungsaufnahme und Körpergewicht (HAGAN *et al.*, 1999). Ebenso führt die periphere Applikation des unspezifischen MCR-Agonisten Melanotan II (MT II) zu einer verringerten Fettmasse, für die eine erhöhte Fettmobilisierung verantwortlich gemacht wird (HWA *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2003).

Aufgrund des Effektes von MT II nach intraperitonealer Applikation auf u.a. die Masse des Fettgewebes in Ratten ist es nicht auszuschließen, dass in der Zirkulation befindliche Peptide wie die hier isolierten Substanzen VA- β -MSH und β -MSH Auswirkungen auf den Fettsäurestoffwechsel und somit auf den Energiehaushalt haben. Ein möglicher Weg, auf dem die isolierten Peptide in die Zirkulation gelangen können, ist, vereinfacht dargestellt, die

Freisetzung durch hypothalamische Neuronen, in denen POMC posttranslational modifiziert wird, in den Interstitialraum und die nachfolgende Diffusion in das vaskuläre Kompartiment. In diesem Fall wäre die POMC-Expression im Gehirn entscheidend für die letztlich zirkulierende Menge dieser Peptide. Die POMC-Expression im Gehirn überfütterter Ratten ist im Gegensatz zu Kontrolltieren verstärkt (HAGAN *et al.*, 1999), was auf eine Gegenregulation durch das Melanocortinsystem hinweist. Somit wäre eine Möglichkeit gegeben, dass über die POMC-Expression im Gehirn auch die Menge zirkulierender Melanocortine und deren Mitwirkung im Aufrechterhalten des Energiehaushaltes kontrolliert werden könnte. Weiterführende Experimente zunächst in geeigneten Tiermodellen *in vivo* müssen zeigen, ob diese Hypothese bestätigt werden kann. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass es aufgrund der vielfältigen physiologischen Effekte der Melanocortine durchaus möglich ist, dass die lipolytische Wirkung nicht der eigentlichen physiologischen Rolle von VA- β -MSH und β -MSH entspricht. Dies sollte ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen in diesem Bereich sein.

4.4 Aktivierung der Lipolyse durch PKA und PKC

Die gezielte Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges zur Auslösung der Lipolyse wurde durch das Phosphodiesterase-resistente cAMP-Analog SpcAMPS ausgelöst. Die Inhibition des lipolytischen Effektes durch Rp-8-CPT-cAMPS zeigt die Beteiligung der Proteinkinase A an der SpcAMPS-vermittelten Lipolyse.

Durch das Diacylglycerolderivat PMA kann der Signalweg, der neben der Aktivierung der Proteinkinase C auch c-Raf und den MAPK-Aktivatoren MEK-1 einschließt, gezielt stimuliert werden (MARQUARDT *et al.*, 1994). Die Aktivierung dieses Signalweges in reifen Fettzellen führt neben einer erhöhten Glycerolfreisetzung auch zu einer Insulinresistenz, welche in einer Beeinflussung der Glucosetransporterexpression und der Weiterleitung des Insulinsignals begründet sein könnte (GREENBERG *et al.*, 2001; FUJISHIRO *et al.*, 2003). Als Insulinresistenz bezeichnet man einen stark verminderten Insulineffekt trotz entsprechend hoher Insulinkonzentration.

In 3T3-L1 Adipozyten werden besonders die neuen PKC-Isoformen δ und ϵ sowie die atypischen Isoformen ι und λ exprimiert (KAYALI *et al.*, 2002). Die neuen PKC-Isoformen sind im Gegensatz zu den atypischen Isoformen Diacylglycerol-abhängig und können durch PMA aktiviert werden. Somit kommt eine Beteiligung der PKC δ und ϵ an den PMA-vermittelten Effekten in Frage. Der PKC-aktivierende Effekt von PMA wurde durch die spezifischen PKC-Inhibitoren Ro-31-8220 und Bisindolylmaleimid I bestätigt. Des Weiteren wurde die Beteiligung der MAPK-Kaskade an der PKC-induzierten Lipolyse durch die inhibierende Wirkung der MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 gezeigt (Abbildung 34). MEK-Inhibitoren wirken über unterschiedliche Mechanismen: während PD98059 die MEK-Aktivierung durch Raf hemmt

(ALESSI *et al.*, 1995), inhibiert U0126 MEK 1 und 2, wodurch die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK unterbunden wird (FAVATA *et al.*, 1998; vgl. Abbildung 3).

Interessanterweise zeigte Chelerythrin, ein weiterer spezifischer Inhibitor der PKC, keinen hemmenden Effekt auf die PKC-induzierte Lipolyse und MAPK-Phosphorylierung. Dies entspricht den Befunden, dass für die PKC-induzierte Lipolyse Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAPK-Kaskade notwendig sind. Bei Bisindolylmaleimid I und Ro-31-8220 handelt es sich im Gegensatz zu Chelerythrin um PKC-Inhibitoren, die kompetitiv mit ATP um die ATP-Bindungsstelle konkurrieren (HEMMINGS, 1997). Chelerythrin bindet eine andere PKC-Bindungsstelle, was in 3T3-L1 Adipozyten möglicherweise eine Inhibition verhindert. Aufgrund der Wirkung von Chelerythrin in anderen Systemen wie z.B. in Kolonkarzinomzellen (SAKSENA *et al.*, 2002) dürfte dieser Effekt gewebe- bzw. zellartabhängig sein.

Parallele Aktivierung der PKA und der PKC

Alleinige Aktivierung eines der beiden dargestellten Signalwege zeigt keinen Einfluss auf den jeweils anderen Signalweg. So führen weder Isoproterenol (1×10^{-6} M, nicht gezeigt) noch SpcAMPS in Konzentrationen bis zu 1×10^{-3} M zu einer MAPK-Phosphorylierung. Dementsprechend kommt es auch nicht zu einer Inhibition der Isoproterenol- und SpcAMPS-induzierten Lipolyse durch MEK-Inhibitoren (Abbildung 34; Daten zu Isoproterenol nicht gezeigt). Dies steht in Kontrast zu der beschriebenen MAPK-Phosphorylierung in 3T3-L1 Adipozyten durch eine relativ hohe Isoproterenolkonzentration von 1×10^{-5} M (GREENBERG *et al.* 2001). Es ist hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit mit SpcAMPS ein cAMP-Analog verwendet wurde, welches die PKA direkt und ohne Interaktionen mit einem Rezeptor aktiviert. Dies sollte andere Effekte, die nur durch Rezeptoraktivierung beeinflusst werden, ausschließen. Gerade für den β_2 -adrenergen Rezeptor wurden in der Vergangenheit mehrere Mechanismen, z.B. über Rap1 und B-Raf, beschrieben, über die es zur Aktivierung des MEK/ERK Signalweges kommen kann, wobei die Expression von B-Raf notwendig ist (FUJITA *et al.*, 2002). Eine solche ERK-Aktivierung wurde in HEK293-Zellen bei Gabe von 1×10^{-5} M Isoproterenol detektiert (SCHMITT UND STORK, 2000). Die Befunde, dass weder Isoproterenol noch SpcAMPS in den verwendeten Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten zu einer MAPK-Phosphorylierung führen, lassen vermuten, dass in diesen Zellen B-Raf nicht exprimiert wird. Proteinexpressionsanalysen sollten über diese Fragestellung Aufschluss geben und eventuell einen Zusammenhang zu der ausbleibenden ERK-Aktivierung erkennen lassen.

Umgekehrt wurde bei der alleinigen Aktivierung der PKC keine Auswirkung auf den cAMP/PKA-Signalweg festgestellt. Der PKA-Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPS bewirkt keine Veränderung der PKC-induzierten Lipolyse, und der intrazelluläre cAMP-Spiegel wird durch PMA nicht erhöht. Weiterhin führt die parallele Stimulation der Signalwege zu einer ähnlich starken HSL-Phosphorylierung.

Interessanterweise konnte durch PKC-Aktivierung nicht wie bei PKA eine Perilipin-Phosphorylierung nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit wurden auch in adrenalen Zellen durch Aktivierung der PKC im Gegensatz zur PKA-Stimulation keine Veränderungen in der Perilipindistribution auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen detektiert (FONG *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von Perilipin in Fettzellen ist jedoch notwendig für das Erreichen eines maximalen Effektes eines lipolytischen Stimulus, da sie die Translokation der HSL aus dem Zytosol zur Oberfläche der Lipidtröpfchen bewirkt (SZTALRYD *et al.*, 2003). Daher ist es denkbar, dass durch die PKC-Aktivierung im Gegensatz zum cAMP/PKA-Signalweg die HSL-Translokation und damit die Substratverfügbarkeit für dieses Enzym im Vergleich zum unstimulierten Zustand nur wenig erhöht ist. Dies würde auch erklären, warum bei einem ähnlichen Ausmaß der HSL-Phosphorylierung durch PKA und PKC (Abbildung 37) der maximale lipolytische Effekt von PMA bei nur etwa 50 % des Isoproterenoleffektes liegt, während die Aktivierung der PKA eine lipolytische Wirkung von etwa 200 % des Isoproterenoleffektes zur Folge hat.

Ein Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Signaltransduktionskomponenten der durch PKA- und PKC-Aktivierung induzierten Lipolyse in den verwendeten murinen 3T3-L1 Adipozyten ist zusammenfassend in Abbildung 42 gegeben.

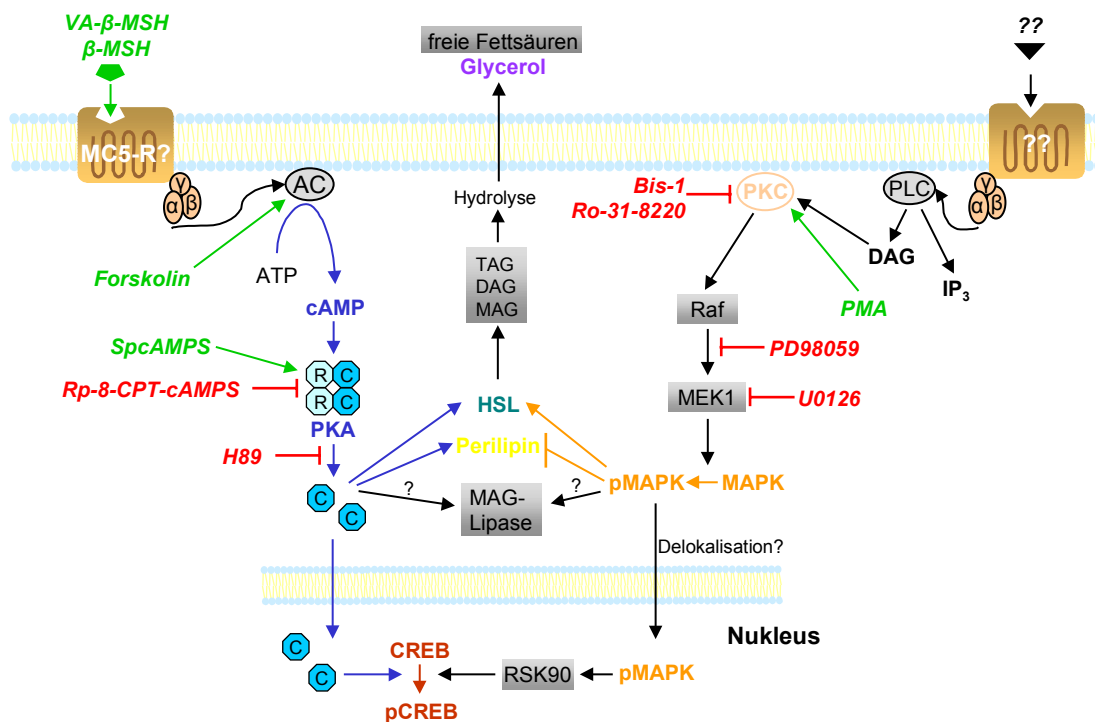


Abbildung 42 Darstellung der untersuchten Elemente der Signalkaskaden, die in 3T3-L1 Adipozyten zur Freisetzung von Glycerol und freien Fettsäuren führen. Die farbig dargestellten Komponenten wurden im Gegensatz zu den schwarz bzw. grau unterlegten Elementen näher untersucht. Abkürzungen: α , β , γ : Untereinheiten des G-Proteins; AC: Adenylatzyklase; Bis-1: Bisindolylmaleimid I; IP₃: Inositoltriphosphat; MAG-Lipase: Monoacylglycerol-Lipase; PLC: Phospholipase C; pCREB: phosphoryliertes CREB; pMAPK: phosphorylierte MAPK; C / R: katalytische / regulatorische PKA-Untereinheit.

Während der Einfluss der PKA- und PKC-Aktivierung auf die HSL und auf Perilipin untersucht wurde, ist noch unklar, ob auch die Monoacylglycerollipase in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt. Nicht untersucht wurde in dieser Arbeit die Translokation der phosphorylierten MAPK in den Nukleus. Dies wird lediglich angenommen, da durch die PKC-Aktivierung eine Phosphorylierung des nukleären Transkriptionsfaktors CREB erfolgt. Das neben Diacylglycerol durch die katalytische Aktivität der Phospholipase C aus Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat gebildete Inosit-1,4,5-triphosphat (IP₃) beeinflusst den intrazellulären Kalziumspiegel, worauf hier nicht näher eingegangen wird. Das als Vergleichssubstanz für die Experimente mit humanen Adipozyten verwendete atriale natriuretische Peptid [ANP (99-126); SENGENÈS *et al.*, 2002] besitzt in murinen 3T3-L1 Adipozyten keinen lipolytischen Effekt und findet sich daher nicht in Abbildung 42 wieder.

Es ist noch unbekannt, welcher Rezeptor und physiologische Ligand an der Aktivierung des beschriebenen, zur Lipolyse führenden PKC/MAPK Signalweges beteiligt sind. Zu diskutieren ist in diesem Kontext der α_1 -adrenerge Rezeptor, dessen Aktivierung durch entsprechende Agonisten die Phospholipase C aktiviert, die zur Bildung von IP₃ und Diacylglycerol führt. Diacylglycerol ist ein Aktivator der PKC. Verschiedene Arbeiten, u. a. eine Publikation von

FAINTRENIE UND GÉLOËN (1998), deuten auf die Expression des α_1 -adrenergen Rezeptors in weißen Fettzellen von Ratten hin. Die Expression des α_1 -Rezeptors wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, die ausbleibende Lipolyse nach Stimulation durch den selektiven α_1 -Rezeptoragonisten Cirazolin deutet, ersten Experimenten nach zu urteilen, jedoch auf ein Fehlen dieses Rezeptors in 3T3-L1 Adipozyten hin. Auch die von THONBERG *et al.* (2002) gezeigte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB in braunen Adipozyten durch Cirazolin über den α_1 -Rezeptor und PKC-Aktivierung konnte nicht in 3T3-L1 Adipozyten nachgewiesen werden (Daten zu Cirazolin nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass der α_1 -adrenerge Rezeptor nicht in 3T3-L1 Adipozyten exprimiert wird. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob sich diese Hypothese erhärten lässt und welche Rezeptoren stattdessen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Synergistischer Effekt der PKA und PKC auf die Lipolyse

Der relativ schwache lipolytische Effekt von PMA konnte durch SpcAMPS potenziert werden. So wurde mit einer Koapplikation der PKA- und PKC- stimulierenden Agenzien bei einer SpcAMPS-Konzentration von 1×10^{-4} M die Basallipolyse bis um etwa den Faktor 5,2 erhöht, während die rechnerische Addition des Effektes der einzelnen Stimulanzen nur eine Erhöhung des Signals um maximal das 3,4-fache erwarten ließ. PMA und SpcAMPS gemeinsam üben folglich einen synergistischen Effekt auf die Lipolyse aus. Es wurde gezeigt, dass dieser Synergismus nicht mit einer potenzierten Phosphorylierung der MAPK einhergeht. Auch ein Zusammenhang durch Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels oder das Ausmaß der HSL-Phosphorylierung konnte ausgeschlossen werden.

Besonders bemerkenswert an diesem Synergismus ist der Befund, dass der erreichte Maximizeffekt durch Kostimulation höher ist als die Addition der einzelnen (Maximal)-Effekte (Abbildung 30B). Ein Zusammenhang dieser Potenzierung mit der durch alleinige PKC-Aktivierung ausbleibenden Perilipin-Phosphorylierung ist deshalb durchaus denkbar. Die HSL-Aktivität und -Translokation durch die PKA sind stark abhängig von der Stimuluskonzentration (HIRSCH UND ROSEN, 1984). Die Stimulation des PKC/MAPK Signalweges führt ebenfalls zu einer Erhöhung der HSL-Aktivität (GREENBERG *et al.*, 2001). Die PKC-Aktivierung durch höhere Konzentrationen PMA ($\geq 3 \times 10^{-7}$ M), die, gemessen an ihrer lipolytischen Aktivität, wahrscheinlich eine maximale Erhöhung der HSL-Aktivität zur Folge hat, besitzt ohne Perilipin-Phosphorylierung nur einen moderaten lipolytischen Effekt im Plateau. Eine zusätzlich gegebene niedrige SpcAMPS-Konzentration, die allein nur zu einer geringen HSL-Aktivierung und -Translokation führt und deshalb nur einen geringen lipolytischen Effekt auslöst, könnte bereits eine derartige Phosphorylierung von Perilipin, dem hauptsächlichen Zielprotein der PKA, zur Folge haben, dass eine Potenzierung der Lipolyse resultiert. Hier

würde das phosphorylierte Perilipin die Substratverfügbarkeit für die HSL um mehr als den additiven Effekt steigern und somit als Schalter ("gate") fungieren.

Denkbar ist jedoch auch die Beteiligung eines weiteren Faktors, der erst bei der Koaktivierung beider Signalwege seine Funktion ändert und dazu führt, dass der maximal erreichte lipolytische Effekt höher ist als die einfache Addition beider Einzeleffekte. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Lipasen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Hier sei die Monoacylglycerollipase genannt (KARLSSON *et al.*, 1997), die für die Hydrolyse von Monoglyceriden zu freiem Glycerol, welches im Lipolyseassay gemessen wird, notwendig ist und bisher relativ wenig untersucht wurde. Kürzlich wurde eine weitere, in die Lipolyse eingebundene Lipase, die Carboxylesterase 3, im Fettgewebe detektiert (SONI *et al.*, 2004). Auch sie könnte in diesem Kontext von Bedeutung sein.

Ebenfalls zu diskutieren ist im Rahmen dieser Fragestellung die HSL-Aktivität. Die Aktivierung der PKA führt zur HSL-Phosphorylierung an Serin⁵⁶³, Serin⁵⁵⁹ und Serin⁵⁶⁰, von denen die beiden letztgenannten Phosphorylierungsstellen entscheidend für die Erhöhung der Hydrolyseaktivität dieses Enzyms sind (ANTHONSEN *et al.*, 1998). Die aktivierte PKC hingegen phosphoryliert die HSL an Serin⁶⁰⁰ (GREENBERG *et al.*, 2001). In beiden Fällen wurde eine Steigerung der HSL-Aktivität um etwa das Zwei- bis Dreifache detektiert (HIRSCH UND ROSEN, 1984; GREENBERG *et al.*, 2001). Unbekannt ist hingegen, ob eine gleichzeitige Phosphorylierung an allen genannten Serinresten möglicherweise zu einer Erhöhung der HSL-Aktivität führt. Inwieweit sich diese Hypothese bestätigen lässt, müssen entsprechende Experimente zeigen.

Die hier diskutierten Befunde werden durch andere Arbeiten unterstützt. Ein ähnlicher Synergismus durch Koaktivierung von PKA und PKC in humanen Hepatomazellen, der nicht mit veränderter CREB- bzw. MAPK-Phosphorylierung zu erklären ist, wurde von MOTZKUS *et al.* (2000) beschrieben. In 3T3-L1 Adipozyten üben weiterhin die gleichzeitig aktivierte PKA und PKC einen synergistischen Effekt auf den Glukosetransport aus, der mit einer veränderten Genregulierung des Glukosetransporters 1 (GLUT1) einhergeht (FONG *et al.*, 2004).

Ausblick

Zu den isolierten Peptiden stellt sich die Frage, welche genaue physiologische Bedeutung sie im Organismus besitzen. Da sie als zirkulierende Peptide isoliert wurden, wäre es interessant, den Plasmaspiegel von VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22) mit dem Auftreten ernährungsbedingten Übergewichtes zu vergleichen. Ein dazu notwendiger Test zu diesem Zweck wird zur Zeit entwickelt und etabliert. Ein weiterer Schritt bei der näheren Charakterisierung dieser Peptide *in vivo* ist es, anhand geeigneter Tiermodelle festzustellen, ob peripher bzw. zentral verabreichtes β -MSH-(1-22) oder VA- β -MSH ebenfalls, wie für den Melanocortinrezeptoragonisten MT-II beschrieben (CHOI *et al.*, 2003), bei ernährungsbedingter

Adipositas einen senkenden Einfluss auf die komplex gesteuerte Nahrungsaufnahme und die Masse des Fettdepots besitzen. Es ist weiterhin zu berücksichtigen, dass das verwendete Hämofiltrat aus Patienten mit schwerem Nierenversagen gewonnen wurde. Es erscheint daher ein Vergleich mit Gesunden sinnvoll, denn ein Zusammenhang von im Hämofiltrat auftretenden Substanzen mit der Niereninsuffizienz kann nicht *per se* ausgeschlossen werden. Des Weiteren stellen die isolierten Peptide aus derzeitiger Sicht eher ungewöhnliche Spaltprodukte von POMC bzw. β - oder γ -LPH dar. Aus diesem Grund sollten der Aufklärung der Prozessierung durch Peptidasen weitere Experimente gewidmet werden. Weitere Erkenntnisse wird auch die Überprüfung, ob die gemessenen lipolytischen Effekte auf primäre humane Adipozyten übertragbar sind, ergeben. Dabei sollte auch ein Nachweis über den daran beteiligten Rezeptor erbracht werden.

Abschließend ist zu bemerken, dass VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) in der vorliegenden Arbeit zwar als lipolytische Faktoren isoliert wurden, es aufgrund der vielfältigen physiologischen Effekte der Melanocortine jedoch sinnvoll erscheint zu untersuchen, ob die Erhöhung der Lipolyse die tatsächliche physiologische Bedeutung dieser Peptide darstellt oder ob VA- β -MSH und β -MSH-(1-22) andere, weitere regulatorische Eigenschaften besitzen.

Ob ein Einsatz der isolierten Peptide als Diagnostikum oder sogar als Arzneimittel in der Zukunft grundsätzlich sinnvoll wäre, werden entsprechende weiterführende Experimente zeigen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Isolierung lipolytischer Substanzen aus verschiedenen, bei der IPF-PharmaCeuticals GmbH generierten Peptidbanken. Zu diesem Zweck wurde ein stabiler, reproduzierbarer und empfindlicher Lipolyseassay mit murinen 3T3-L1 Adipozyten etabliert.

Das Screening einer Schweinemagen-Peptidbank ergab mit diesem angewendeten Assay keine lipolytischen Aktivitäten. In einer Schweinegehirn-Peptidbank wurde eine stark lipolytische Aktivität detektiert, die jedoch nach acht chromatographischen Reinigungsschritten mit den angewendeten Analytikmethoden nicht identifizierbar war. Aus einer Peptidbank von humanem Hämofiltrat wurden mit einem optimierten chromatographischen Reinigungsverfahren mittels konsekutiver RP- und Kationenaustausch-Chromatographie zwei Melanocortine, β -MSH-(1-22) und γ -LPH-(33-56), welches nachfolgend als VA- β -MSH bezeichnet wird, isoliert.

Die pharmakologische Charakterisierung dieser Peptide erfolgte mit synthetisch hergestelltem VA- β -MSH und β -MSH-(1-22). Die Bestimmung der EC_{50} -Werte ergab mit 24 nM bzw. 17 nM für VA- β -MSH bzw. β -MSH-(1-22) eine annähernd äquipotente lipolytische Aktivität beider Peptide, welche der eines anderen Melanocortins, hACTH, entspricht. Untersuchungen zu den an der Lipolyse beteiligten Signaltransduktionsmechanismen zeigen die Beteiligung von intrazellulärem cAMP und die Aktivierung der PKA. In 3T3-L1 Adipozyten werden zwei regulatorische PKA-Untereinheiten, RI α und RII β , exprimiert, die beide eine Rolle in der lipolytischen Wirkung des cAMP/PKA-Signalweges spielen. In diese Signalweiterleitung ist auch die Phosphorylierung von Perilipin einbezogen, die ebenfalls durch das isolierte VA- β -MSH eingeleitet wird. Die Transkriptions- und Proteinexpressionsanalyse zeigte, dass von den derzeit fünf bekannten Melanocortin-Rezeptor-Isoformen nur der ausschließlich ACTH bindende MC2-R sowie der MC5-R in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten exprimiert werden. Die Beteiligung des MC5-R an der lipolytischen Wirkung der isolierten Peptide konnte jedoch bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. In humanen Adipozyten aus übergewichtigen Spendern wird der MC5-R nicht exprimiert, und VA- β -MSH besitzt keinen lipolytischen Effekt. Ausgehend von einer bereits aufgezeigten Sequenz aus sieben Aminosäuren, die für die lipolytische Wirkung von Melanocortinen notwendig ist und welche im Lipolyseassay eine schätzungsweise 1000 mal höhere EC_{50} besitzt als die isolierten Peptide, zeigte sich, dass die N-terminale Verlängerung dieses Heptapeptids die EC_{50} etwa zehnmal stärker herabsetzte als die C-terminale Verlängerung und damit vermutlich zu einer verbesserten Interaktion mit dem Rezeptor führt. Die physiologische Relevanz der beiden

isolierten, in der Zirkulation auftretenden Peptide, die im Vergleich zu anderen β -Melanocortinen ungewöhnliche N-Termini aufweisen, wird diskutiert.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Vergleich des lipolytischen Effektes nach Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges und des PKC/MAPK-Signalweges, der durch das Diacylglycerolderivat Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktiviert wird. Separat stimuliert, beeinflussen sich diese beiden Signalwege gegenseitig nicht, was durch Immunoblotanalyse, Messung von intrazellulärem cAMP sowie durch den Einsatz eines spezifischen PKA-Inhibitors und der beiden MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 gezeigt wurde. Es erfolgt weder eine MAPK-Phosphorylierung durch die Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges noch eine Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch PKC/pMAPK. Werden jedoch beide Signalwege gleichzeitig aktiviert, ist ein synergistischer Effekt auf die Glycerolfreisetzung zu beobachten. Weder die MAPK-Phosphorylierung noch die cAMP-Bildung sind an der Potenzierung des lipolytischen Effektes beteiligt, und auch die HSL-Phosphorylierung scheint in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen. Die Phosphorylierung von Perilipin, die im Gegensatz zum cAMP/PKA-Signalweg durch PKC/MAPK-Aktivierung nicht erfolgt, wird in Zusammenhang mit diesem Synergismus und dem beobachteten Unterschied im Ausmaß der Glycerolfreisetzung durch die untersuchten Signalwege diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- ABE K., NICHOLSON W.E., LIDDLE G.W., ISLAND D.P., ORTH D.N. (1967) Radioimmunoassay of beta-MSH in human plasma and tissues. *J. Clin. Invest.* **46**:1609-1616
- AKBULUT S., BYERSDORFER C.A., LARSEN C.P., ZIMMER S.L., HUMPHREYS T.D., CLARKE B.L. (2001) Expression of the melanocortin 5 receptor on rat lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**:1086-1092
- ALESSI D.R., CUENDA A., COHEN P., DUDLEY D.T., SALTIEL A.R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**:27489-27494
- ALTIOK S., XU M., SPIEGELMAN B.M. (1997) PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev.* **11**:1987-1998
- ALTSCHUL S.F., MADDEN R.L., SCHAFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402
- ANTHONSEN M.W., RONNSTRAND L., WERNSTEDT C., DEGERMAN E., HOLM C. (1998) Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**:215-221
- ARITA Y., KIHARA S., OUCHI N., TAKAHASHI M., MAEDA K., MIYAGAWA J., HOTTA K., SHIMOMURA I., NAKAMURA T., MIYAOKA K., KURIYAMA H., NISHIDA M., YAMASHITA S., OKUBO K., MATSUBARA K., MURAGUCHI M., OHMOTO Y., FUNAHASHI T., MATSUZAWA Y. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**:79-83
- BARAT E., PATTHY A., GRAF L. (1979) Action of cathepsin D on human β -lipotropin: a possible source of human α -melanotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:6120-6123
- BENJANNET S., RONDEAU N., DAY R., CHRETIEN M., SEIDAH N.G. (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3564-3568
- BERG A.H., COMBS T.P., SCHERER P.E. (2002) ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**:84-89
- BERTAGNA X., SEIDAH N., MASSIAS J.F., LENNE F., LUTON J.P., GIRARD F., CHRETIEN M. (1989) Microsequencing evidence for the maturation of human proopiomelanocortin into an 18 amino acid hormone [h β MSH(5-22)] in nonpituitary tissue. *Peptides* **10**:83-87
- BLANCHETTE-MACKIE E.J., DWYER N.K., BARBER T., COXEY R.A., TAKEDA T., RONDINONE C.M., THEODORAKIS J.L., GREENBERG A.S., LONDOS C. (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J. Lipid Res.* **36**:1211-1226
- BLOOMFIELD G.A., SCOTT A.P., LOWRY P.J., GILKES J.J.H., REES L.H. (1974) A reappraisal to human β -MSH. *Nature* **252**:492-493
- BOSTON B.A., CONE R.D. (1996) Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* **137**:2043-2050
- BOUSQUET-MELOU A., GALITZKY J., LAFONTAN M., BERLAN M. (1995) Control of lipolysis in intra-abdominal fat cells of nonhuman primates: comparison with humans. *J. Lipid Res.* **36**:451-461
- BRASAEMLE D.L., RUBIN B., HARTEN I.A., GRUIA-GRAY J., KIMMEL A.R., LONDOS C. (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **275**:38486-38493

- CASTAGNA M., TAKAI Y., KAIBUCHI K., SANO K., KIKKAWA U., NISHIZUKA Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**:7847-7851
- CHHAJLANI V. (1996) Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**:73-80
- CHIJIWA T., MISHIMA A., HAGIWARA M., SANO M., HAYASHI K., INOUE T., NAITO K., TOSHIOKA T., HIDKA H. (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**:5267-5272
- CHOI Y.H., LI C., HARTZELL D.L., LIN J., DELLA-FERA M.A., BAILE C.A. (2003) MTII administered peripherally reduces fat without invoking apoptosis in rats. *Physiol. Behav.* **79**:331-337
- CLEMENT K., VAISSE C., LAHLOU N., CABROL S., PELLOUX V., CASSUTO D., GOURMELEN M., DINA C., CHAMBAZ J., LACORTE J.M., BASDEVANT A., BOUGNERES P., LEBOUIC Y., FROGUEL P., GUY-GRAND B. (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**:398-401
- CONNACHER A.A., JUNG R.T., MITCHELL P.E. (1988) Weight loss in obese subjects on a restricted diet given BRL 26830A, a new atypical beta adrenoceptor agonist. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **296**:1217-1220
- COOK K.G., YEAMAN S.J., STRALFORS P., FREDRIKSON G., BELFRAGE P. (1982) Direct evidence that cholesterol ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue. *Eur. J. Biochem.* **125**:245-249
- CUMMINGS D.E., BRANDON E.P., PLANAS J.V., MOTAMED K., IDZERDA R.L., MCKNIGHT G.S. (1996) Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII β subunit of protein kinase A. *Nature* **382**:622-626
- DESLEX S., NEGREL R., VANNIER C., ETIENNE J., AILHAUD G. (1987) Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int. J. Obes.* **11**:19-27
- DIETER P., FITZKE E. (1991) RO 31-8220 and RO 31-7549 show improved selectivity for kinase C over staurosporine in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**:396-401
- DØSKELAND S.O., MARONDE E., GJERTSEN B.T. (1993) The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase - functionally different or redundant? *Biochim. Biophys. Acta* **1178**:249-258
- EGAN J.J., GREENBERG A.S., CHANG M.K., LONDOS C. (1990) Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* **265**:18769-18775
- EGAN J.J., GREENBERG A.S., CHANG M.K., WEK S.A., MOOS M.C. JR., LONDOS C. (1992) Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8537-8541
- ENGLARO W., REZZONICO R., DURAND-CLÉMENT M., LALLEMAND D., ORTONNE J.P., BALLOTTI R. (1995) Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**:24315-24320
- ERIKSSON H., RIDDERSTRALE M., DEGERMAN E., EKHOLM D., SMITH C.J., MANGANIELLO V.C., BELFRAGE P., TORNQVIST H. (1995) Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1266**:101-107
- FAINTRENIE G., GÉLOËN A. (1998) Alpha-1 adrenergic stimulation of glucose uptake in rat white adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**:607-610

- FAVATA M.F., HORIUCHI K.Y., MANOS E.J., DAULERIO A.J., STRADLEY D.A., FEESER W.S., VAN DYK D.E., PITTS W.J., EARL R.A., HOBBS F., COPELAND R.A., MAGOLDA R.L., SCHERLE P.A., TRZASKOS J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:18623-18632
- FÈVE B., EMORINE L.J., BRIEND-SUTREN M.M., LASNIER F., STROSBURG A.D., PAIRAULT J. (1990) Differential regulation of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *J. Biol. Chem.* **265**:16343-16349
- FÈVE B., EMORINE L.J., LASNIER F., BLIN N., BAUDE B., NAHMIAS C., STROSBURG A.D., PAIRAULT J. (1991) Atypical beta-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. Pharmacological and molecular relationship with the human beta3-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **266**:20329-20336
- FONG J.C., KAO Y.S., TSAI H.Y., CHIOU Y.Y., CHIOU G.Y. (2004) Synergistic effect of endothelin-1 and cyclic AMP on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Cell. Signal.* **16**:811-821
- FONG T.H., YANG C.C., GREENBERG A.S., WANG S.M. (2002) Immunocytochemical studies on lipid droplet-surface proteins in adrenal cells. *J. Cell. Biochem.* **86**:432-439
- FORSSMANN K., HOCK D., HERBST F., SCHULZ-KNAPPE P., TALARTSCHIK J., SCHELER F., FORSSMANN W.G. (1986) Isolation and structural analysis of the circulating human cardiodilatin (alpha ANP). *Klin. Wochenschr.* **64**:1276-1280
- FORSSMANN W.G., SCHULZ-KNAPPE P., MEYER M., ADERMANN K., FORSSMANN K., HOCK D., AOKI A. (1993) in *Proceedings of the 2nd Japan Symposium on Peptide Chemistry* (YANAIHARA, N., Ed.) pp 553-557, Escom, Leiden
- FORSSMANN W.G. (1996) Prinzipien der Informationsausbreitung und Signalübertragung im endokrinen System durch peptiderge Regulatorsubstanzen. *Nova Acta Leopold.* **294**:103-122
- FREDRIKSON G., TORNVIST H., BELFRAGE P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta.* **876**:288-293
- FRICKE K., HEITLAND A., MARONDE E. (2004) Cooperative activation of lipolysis by PKA and PKC pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, im Druck
- FRICKER L.D. (1988) Carboxypeptidase E. *Annu. Rev. Physiol.* **50**:309-321
- FUJISHIRO M., GOTOH Y., KATAGIRI H., SAKODA H., OGIHARA T., ANAI M., ONISHI Y., ONO H., ABE M., SHOJIMA N., FUKUSHIMA Y., KIKUCHI M., OKA Y., ASANO T. (2003) Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **17**:487-497
- FUJITA T., MEGURO T., FUKUYAMA R., NAKAMUTA H., KOIDA M. (2002) New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. *J. Biol. Chem.* **277**:22191-22200
- GANTZ I., FONG T.M. (2003) The melanocortin system. Minireview. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**:E468-E474
- GJERTSEN B.T., MELLGREN G., OTTEN A., MARONDE E., GENIESER H.G., JASTORFF B., VINTERMYR O.K., MCKNIGHT G.S., DØSKELAND S.O. (1995) Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. *J. Biol. Chem.* **270**:20599-20607
- GONZALEZ, G.A., MONTMINY, M.R. (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**:675-680
- GREEN H., MEUTH M. (1974) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**:127-133

- GREENBERG A.S., EGAN J.J., WEK S.A., GARTY N.B., BLANCHETTE-MACKIE E.J., LONDOS C. (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* **266**:11341-11346
- GREENBERG A.S., EGAN J.J., WEK S.A., MOOS M.C. JR., LONDOS C. KIMMEL A.R. (1993) Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:12035-12039
- GREENBERG A.S., SHEN W.J., MULIRO K., PATEL S., SOUZA S.C., ROTH R.A., KRAEMER F.B. (2001) Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**:45456-45461
- GREGOIRE F.M., SMAS C.M., SUL H.S. (1998) Understanding Adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**:783-809
- HAEMMERLE G., ZIMMERMANN R., HAYN M., THEUSSL C., WAEG G., WAGNER E., SATTLER W., MAGIN T.M., WAGNER E.F., ZECHNER R. (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* **277**:4806-4815
- HAGAN M.M., RUSHING P.A., SCHWARTZ M.W., YAGALOFF K.A., BURN P., WOODS S.C., SEELEY R.J. (1999) Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J. Neurosci.* **19**:2362-2367
- HALAAS J.L., GAJIWALA K.S., MAFFEI M., COHEN S.L., CHAIT B.T., RABINOWITZ D., LALLONE R.L., BURLEY S.K., FRIEDMAN J.M. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**:543-546
- VAN HALL G., STEENSBERG A., SACCHETTI M., FISCHER C., KELLER C., SCHJERLING P., HISCOCK N., MOLLER K., SALTIN B., FEBBRAIO M.A., PEDERSEN B.K. (2003) Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**:3005-3010
- HARRIS J.I. (1959) Structure of a melanocyte-stimulating hormone from the human pituitary gland. *Nature* **184**:167-169
- HATTA N., DIXON C., RAY A.J., PHILLIPS S.R., CUNLIFFE W.J., DALE M., TODD C., MEGGIT S., BIRCH-MACHIN M.A., REES J.L. (2001) Expression, candidate gene, and population studies of the melanocortin 5 receptor. *J. Invest. Dermatol.* **116**:564-570
- HEMMINGS H.C. JR. (1997) Protein kinase and phosphatase inhibitors. In: *Neuromethods, Regulatory Protein Modification: Techniques and Protocols*, Humana Press, Editor: H.C. Hemmings, **30**:121-200
- HERBERT J.M., AUGEREAU J.M., GLEYE J., MAFFRAND J.P. (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**:993-999
- HESS R., KUHN M., SCHULZ-KNAPPE P., RAID A., FUCHS M., KLODT J., ADERMANN K., KAEVER V., CETIN Y., FORSSMANN W.G. (1995) GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* **374**:34-38
- HIRSCH A.H., ROSEN O.M. (1984) Lipolytic stimulation modulates the subcellular distribution of hormone-sensitive lipase in 3T3-L1 cells. *J. Lipid Res.* **25**:665-677
- HOLM C. (2003) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Transact.* **31**:1120-1124
- HOLST L.S., LANGIN D., MULDER H., LAURELL H., GROBER J., BERGH A., MOHRENWEISER H.W., EDGREN G., HOLM C. (1996) Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics* **35**:441-447
- HOROWITZ J.F., KLEIN S. (2000) Whole body and abdominal lipolytic sensitivity to epinephrine is suppressed in upper body obese women. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**:E1144-1152

- HWA J.J., GHIBAUDI L., GAO J., PARKER E.M. (2001) Central melanocortin system modulates energy intake and expenditure of obese and lean Zucker rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**:R444-451
- INOUE J., KUMAGAI H., TERADA T., MAEDA M., SHIMIZU M., SATO R. (2001) Proteolytic activation of SREBPs during adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**:1157-1161
- JANDEROVÁ L., MCNEIL M., MURRELL A.N., MYNATT R.L., SMITH S.R. (2003) Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes. Res.* **11**:65-74
- JANSON A., RAWET H., PERBECK L., MARCUS C. (1998) Presence of thyrotropin receptor in infant adipocytes. *Pediatr. Res.* **43**:555-558
- KAPAS S., PURBRICK A., HINSON J.P. (1995) Role of tyrosine kinase and protein kinase C in the steroidogenic actions of angiotensin II, alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin in the rat adrenal cortex. *Biochem. J.* **305**:433-438
- KARLSSON M., CONTRERAS J.A., HELLMAN U., TORNQVIST H., HOLM C. (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J. Biol. Chem.* **272**:27218-27223
- KAYALI A.G., AUSTIN D.A., WEBSTER N.J. (2002) Rottlerin inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes by uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation. *Endocrinology* **143**:3884-3896
- KHOO J.C., AQUINO A.A., STEINBERG D. (1974) The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase in human adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **53**:1124-1131
- KIWAKI K., LEVINE J.A. (2003) Differential effects of adrenocorticotrophic hormone on human and mouse adipose tissue. *J. Comp. Physiol. [B]* **173**:675-678
- KONDA Y., GANTZ I., DELVALLE J., SHIMOTO Y., MIWA H., YAMADA T. (1994) Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J. Biol. Chem.* **269**:13162-13166
- KONIECZNY S.F., EMERSON C.P. JR. (1984) 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* **38**:791-800
- KUHN M., RAID A., ADERMANN K., SCHULZ-KNAPPE P., GERZER R., HEIM J.M., FORSSMANN W.G. (1993) The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). *FEBS Lett.* **318**:205-209
- LABBE O., DESARNAUD F., EGGERICKX D., VASSART G., PARMENTIER M. (1994) Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochem.* **33**:4543-4549
- LAFONTAN M., BERLAN M. (1980) Evidence for the alpha 2 nature of the alpha-adrenergic receptor inhibiting lipolysis in human fat cells. *Eur. J. Pharmacol.* **66**:87-93
- LAFONTAN M., BERLAN M. (1993) Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* **34**:1057-1091
- LAMMERICH H.P., BUSMANN A., KUTZLEB C., WENDLAND M., SEILER P., BERGER C., EICKELMANN P., MEYER M., FORSSMANN W.G., MARONDE E. (2003) Identification and functional characterization of hemorphins VV-H-7 and LVV-H-7 as low-affinity agonists for the orphan bombesin receptor subtype 3. *Br. J. Pharmacol.* **138**:1431-1440
- LANGFORT J., PLOUG T., IHLEMANN J., SALDO M., HOLM C., GALBO H. (1999) Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle. *Biochem. J.* **340**:459-465

- LEE F.T., ADAMS J.B., GARTON A.J., YEAMAN S.J. (1988) Hormone-sensitive lipase is involved in the hydrolysis of lipoidal derivatives of estrogens and other steroid hormones. *Biochim. Biophys. Acta* **963**:258-264
- LEE T.H., LERNER A.B., BUETTNER-JANUSCH V. (1961) The isolation and structure of alpha- and beta-melanocyte-stimulating hormones from monkey pituitary glands. *J. Biol. Chem.* **236**:1390-1394
- LIN F.T., LANE M.D. (1994) CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:8757-8761
- LINDL T. (2000) Zell- und Gewebekultur. 4. überarbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- LITTHAUER D., SERRERO G. (1992) The primary culture of mouse adipocyte precursor cells in defined medium. *Comp. Biochem. Physiol. A* **101**:59-64
- LUIKEN J.J., BONEN A., GLATZ J.F. (2002) Cellular fatty acid uptake is acutely regulated by membrane-associated fatty acid-binding proteins. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **67**:73-78
- MAFFEI M., HALAAS J., RAVUSSIN E., PRATLEY R.E., LEE G.H., ZHANG Y., FEI H., KIM S., LALLONE R., RANGANATHAN S., KERN P.A., FRIEDMAN J.M. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weightreduced subjects. *Nat. Med.* **1**:1155-1161
- MARONDE E., PFEFFER M., VON GALL C., DEGHANI F., SCHOMERUS C., WICHT H., KROEBER S., OLCESE J., STEHLE J.H., KORF H.W. (1999) Signal transduction in the rodent pineal organ. From the membrane to the nucleus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **460**:109-131
- MARQUARDT B., FRITH D., STABEL S. (1994) Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene* **9**:3213-3218
- MEDER W., WENDLAND M., BUSMANN A., KUTZLEB C., SPODSBERG N., JOHN H., RICHTER R., SCHLEUDER D., MEYER M., FORSSMANN W.G. (2003) Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Lett.* **555**:495-499
- MERCER J.G., HOGGARD N., WILLIAMS L.M., LAWRENCE C.B., HANNAH L.T., TRAYHURN P. (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* **387**:113-116
- MERRIFIELD B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* **232**:341-347
- MILLER W.H. JR., FAUST I.M., HIRSCH J. (1984) Demonstration of de novo production of adipocytes in adult rats by biochemical and radioautographic techniques. *J. Lipid Res.* **25**:336-347
- MIZUNO K., KANDA Y., KUROKI Y., TOMIYAMA K., WATANABE Y. (1999) Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in 3T3-L1 adipocytes by stimulation of β_3 -adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* **385**:63-69
- MONTAGUE C.T., FAROOQI I.S., WHITEHEAD J.P., SOOS M.A., RAU H., WAREHAM N.J., SEWTER C.P., DIGBY J.E., MOHAMMED S.N., HURST J.A., CHEETHAM C.H., EARLEY A.R., BARNETT A.H., PRINS J.B., O'RAHILLY S. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**:903-908
- MOTZKUS D., MARONDE E., GRUNENBERG U., LEE C.C., FORSSMANN W.G., ALBRECHT U. (2000) The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett.* **486**:315-319
- MULDER H., HOLST L.S., SVENSSON H., DEGERMAN E., SUNDLER F., AHREN B., RORSMAN P., HOLM C. (1999) Hormone-sensitive lipase, the rate-limiting enzyme in triglyceride hydrolysis, is expressed and active in beta-cells. *Diabetes.* **48**:228-232

- NORMAN D., ISIDORI A. M., FRAJESE V., CAPRIO M., CHEW S.L., GROSSMAN A.B., CLARK A.J., BESSER G.M., FABBRI A. (2002) ACTH and α -MSH inhibit leptin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **200**:99-109
- OELOFSEN W., RAMACHANDRAN J. (1983) Studies of corticotropin receptors on rat adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **225**:414-421
- OSUGA J., ISHIBASHI S., OKA T., YAGYU H., TOZAWA R., FUJIMOTO A., SHIONOIRI F., YAHAGI N., KRAEMER F.B., TSUTSUMI O., YAMADA N. (2000) Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **97**:787-792
- PAGES G., LENORMAND P., L'ALLEMAIN G., CHAMBARD J., MELOCHE S., POUYSSEGUR J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8319-8323
- POISSONNET C.M., BURDI A.R., BOOKSTEIN F.L. (1983) Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum. Dev.* **8**:1-11
- PRITCHARD L., TURNBULL A., WHITE A. (2002) Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J. Endocrinol.* **172**:411-421
- PRUSTY D., PARK B.H., DAVIS K.E., FARMER S.R. (2002) Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* **277**:46226-46232
- RAHN T., RIDDERSTRÅLE M., TORNQVIST H., MANGANIELLO V., FREDRIKSON G., BELFRAGE P., DEGERMAN E. (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced activation and phosphorylation of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in rat adipocytes. *FEBS Lett.* **350**:314-318
- REUSCH J.E.B., COLTON L.A., KLEMM D.J. (2000) CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol. Cell. Biol.* **20**:1008-1020
- RICHELSEN B., ERIKSEN E.F., BECK-NIELSEN H., PEDERSEN O. (1984) Prostaglandin E2 receptor binding and action in human fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**:7-12
- RICHTER W.O., SCHWANDT P. (1987) Lipolytic potency of proopiomelanocorticotropin peptides in vitro. *Neuropeptides* **9**:59-74
- RITTENHOUSE J., MARCUS F. (1984) Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal. Biochem.* **138**:442-448
- RUAN H., ZARNOWSKI M.J., CUSHMAN S.W., LODISH H.F. (2003) Standard isolation of primary adipose cells from mouse epididymal fat pads induces inflammatory mediators and down-regulates adipocyte genes. *J. Biol. Chem.* **278**:47585-47593
- RYDEN M., DICKER A., VAN HARMELEN V., HAUNER H., BRUNNBERG M., PERBECK L., LONNQVIST F., ARNER P. (2002) Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells. *J. Biol. Chem.* **277**:1085-1091
- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354

- SAKSENA S., GILL R.K., SYED I.A., TYAGI S., ALREFAI W.A., RAMASWAMY K., DUDEJA P.K. (2002) Modulation of Cl⁻/OH⁻ exchange activity in Caco-2 cells by nitric oxide. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**:G626-633
- SATO N., KAMINO K., TATEISHI K., SATOH T., NISHIWAKI Y., YOSHIWA A., MIKI T., OGIHARA T. (1997) Elevated amyloid beta protein (1-40) level induces CREB phosphorylation at serine-133 via p44/42 MAP kinase (Erk1/2)-dependent pathway in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**:637-642
- SAWYER T.K., SANFILIPPO P.J., HRUBY V.J., ENGEL M.H., HEWARD C.B., BURNETT J.B., HADLEY M.E. (1980) 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- α -melanocyte-stimulating hormone: a highly potent α -melanotropin with ultralong biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:5754-5758
- SCHAAP P., VAN MENTS-COHEN M., SOEDE R.D., BRANDT R., FIRTEL R.A., DOSTMANN W., GENIESER H.G., JASTORFF B., VAN HAASSTERT P.J. (1993) Cell-permeable non-hydrolyzable cAMP derivatives as tools for analysis of signaling pathways controlling gene regulation in dictyostelium. *J. Biol. Chem.* **268**:6223-6231
- SCHEPKY A.G., BENSCH K.W., SCHULZ-KNAPPE P., FORSSMANN W.G. (1994) Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomed. Chromatogr.* **8**:90-94
- SCHERER P.E., WILLIAMS S., FOGLIANO M., BALDINI G., LODISH H.F. (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **270**:26746-26749
- SCHIÖTH H.B., CHHAJLANI V., MUCENIECE R., KLUSA V., WIKBERG J.E. (1996) Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci.* **59**:797-801
- SCHMITT J.M., STORK J.S. (2000) β_2 -adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein Rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J. Biol. Chem.* **275**:25342-25350
- SCHULZ-KNAPPE P., MÄGERT H.J., DEWALD B., MEYER M., CETIN Y., KUBBIES M., TOMECZKOWSKI J., KIRCHHOFF K., RAIDA M., ADERMANN K., KIST A., REINECKE M., SILLARD R., PARDIGOL A., UGUCCIONI M., BAGGIOLINI M., FORSSMANN W.G. (1996) HCC-1, a novel chemokine from human plasma. *J. Exp. Med.* **183**:295-299
- SCHULZ-KNAPPE P., SCHRADER M., STÄNDKER L., RICHTER R., HESS R., JÜRGENS M., FORSSMANN W.G. (1997) Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J. Chromatogr. A* **776**:125-132
- SCHWEDE F., MARONDE E., GENIESER H., JASTORFF B. (2000) Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacol. Ther.* **87**:199-226
- SCOTT A.P., LOWRY P.J. (1974) Adrenocorticotrophic and melanocyte-stimulating peptides in the human pituitary. *Biochem. J.* **139**:593-602
- SEAMON K.B., PADGETT W., DALY J.W. (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3363-3367
- SEILER P., STÄNDKER L., MARK S., HAHN W., FORSSMANN W.G., MEYER M. (1999) Application of a peptide bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. *J. Chromatogr. A* **852**:273-283
- SENGENÈS C., BERLAN M., DE GLISEZINSKI I., LAFONTAN M., GALITZKY J. (2000) Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* **14**:1345-1351
- SENGENÈS C., BOULOUMIÉ A., HAUNER H., BERLAN M., BUSSE R., LAFONTAN M., GALITZKY J. (2003) Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J. Biol. Chem.* **278**:48617-48626

- SENGENÈS C., ZAKAROFF-GIRARD A., MOULIN A., BERLAN M., BOULOUMIÉ A., LAFONTAN M., GALITZKY J. (2002) Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **283**:R257-265
- SERVETNICK D.A., BRASAEMLE D.L., GRUIA-GRAY J., KIMMEL A.R., WOLFF J., LONDOS C. (1995) Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J. Biol. Chem.* **270**:16970-16973
- SMAS C.M., SUL H.S. (1993) Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**:725-734
- SMITH S.R., GAWRONSKA-KOZAK B., JANDEROVA L., NGUYEN T., MURRELL A., STEPHENS J.M., MYNATT R.L. (2003) Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes. *Diabetes* **52**:2914-2922
- SONI K.G., LEHNER R., METALNIKOV P., O'DONNELL P., SEMACHE M., GAO W., ASHMAN K., PSHEZHETSKY A.V., MITCHELL G.A. (2004) Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J. Biol. Chem.* **279**:40683-40689
- SOUZA S.C., DE VARGAS L.M., YAMAMOTO M.T., LIEN P., FRANCIOSA M.D., MOSS L.G., GREENBERG A.S. (1998) Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **273**:24665-24669
- SPIEGELMAN B.M., FARMER S.R. (1982) Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* **29**:53-60
- STEPHAN C.M., BAILEY S.T., BHAT S., BROWN E.J., BANERJEE R.R., WRIGHT C.M., PATEL H.R., AHIMA R.S., LAZAR M.A. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**:307-312
- STRALFORS P., HONNOR R.C. (1989) Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur. J. Biochem.* **182**:379-385
- SU C.L., SZTALRYD C., CONTRERAS J.A., HOLM C., KIMMEL A.R., LONDOS C. (2003) Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **278**:43615-43619
- SZTALRYD C., XU G., DORWARD H., TANSEY J.T., CONTRERAS J.A., KIMMEL A.R., LONDOS C. (2003) Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* **161**:1093-1103
- TANSEY J.T., SZTALRYD C., GRUIA-GRAY J., ROUSH D.L., ZEE J.B., GAVRILOVA O., REITMAN M.L., DENG C.X., LI C., KIMMEL A.R., LONDOS C. (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:6494-6499
- TELGEMANN R., MARONDE E., TASKEN K., GELLERSEN B. (1997) Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* **138**:929-937
- TERESI J.D., LUCK J.M. (1952) The combination of organic anions with serum albumin. VIII. Fatty acid salts. *J. Biol. Chem.* **194**:823-834
- THONBERG H., FREDRIKSSON J. M., NEDERGAARD J., CANNON B. (2002) A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem. J.* **364**:73-79
- THORNTON J.E., CHEUNG C.C., CLIFTON D.K., STEINER R.A. (1997) Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in *ob/ob* mice. *Endocrinology* **138**:5063-5066

- TOLLEC D., PIANETTI P., COSTE H., BELLEVERGUE P., GRAND-PERRET T., AJAKANE M., BAUDET V., BOISSIN P., BOURSIER E., LORIOLE F., Duhamel L., Charon D., Kirilovsky J. (1991) The bisindolylmaleimide GF109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**:15771-15781
- TSUJITA T., NINOMIYA H., OKUDA H. (1989) p-nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *J. Lipid Res.* **30**:997-1004
- VAISSE C., CLEMENT K., DURAND E., HERCBERG S., GUY-GRAND B., FROGUEL P. (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J. Clin. Invest.* **106**:253-262
- WAHRENBERG H., LONNQVIST F., ARNER P. (1989) Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **84**:458-467
- WAY J.M., GORGUN C.Z., TONG Q., UYSAL K.T., BROWN K.K., HARRINGTON W.W., OLIVER W.R. JR., WILLSON T.M., KLIEWER S.A., HOTAMISLIGIL G.S. (2001) Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* **276**:25651-25653
- WEI S., LAI K., PATEL S., PIANTEDOSI R., SHEN H., COLANTUONI V., KRAEMER F.B., BLANER W.S. (1997) Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1beta adipocytes. *J. Biol. Chem.* **272**:14159-14165
- WEYER C., TATARANNI P.A., SNITKER S., DANFORTH E. JR., RAVUSSIN E. (1998) Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes* **47**:1555-1561
- ZHANG Y., PROENCA R., MAFFEI M., BARONE M., LEOPOLD L., FRIEDMAN J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**:425-432
- ZHENG J., SAHAI B.M., KILGANNON P., FOTEDAR A., GREEN D.R. (1989) Specific inhibition of cell-surface T-cell receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides and its effect on the production of an antigen-specific regulatory T-cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:3758-3762
- ZUCHT H.D., RAID A., ADERMANN K., MÄGERT H.J., FORSSMANN W.G. (1995) Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* **372**:185-188

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde bei der IPF PharmaCeuticals GmbH in Hannover durchgeführt. Für die Überlassung des interessanten Themas, für die sehr guten Arbeitsbedingungen und die großzügige Unterstützung möchte ich daher dem wissenschaftlichen Direktor des Institutes, Herrn Prof. Dr. med Dr. h.c. Wolf-Georg Forssmann herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Erik Maronde für die stets engagierte, kompetente und freundschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferates. Die zahlreichen Diskussionen, die oft aus der Beantwortung "kurzer" Fragen entstanden, die vielen Ideen und Hilfestellungen haben den Verlauf meiner Arbeit oft maßgeblich beeinflusst.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Übernahme des Referates danken.

Den Mitarbeitern der Abteilung Peptidsynthese, Herrn Dr. Axel Schulz und Frau Jessica Babierowski, danke ich für die Unterstützung bei der Synthese von VA- β -MSH sowie für die Bereitstellung der weiteren, in dieser Arbeit verwendeten Peptide.

Frau Dr. Aleksandra Heitland danke ich für die Bereitstellung des HSL-Antikörpers. Mein Dank gilt auch Frau Ilka Uhland für die Unterstützung bei den chromatographischen Arbeiten. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Violetta Dziadek und Frau Valeska Stadie für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten bedanken. Den Mitarbeiterinnen der Abteilung Analytische Peptidchemie danke ich für die Unterstützung bei den analytischen Untersuchungen. Bei Herrn Wolfgang Posselt bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der cytochemischen Untersuchungen.

Außerdem danke ich den Kolleginnen und Kollegen Frau Dr. Susann Baxmann, Herrn Dr. Christian Kutzleb, Herrn Dr. Rudolf Richter, Frau Dr. Cornelia Liepke, Herrn Dr. Harald John, Herrn Abbes Mahouachi und Herrn Rainer Schreeb sowie den ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Herrn Dr. Dirk Motzkus, Herrn Dr. Hans-Peter Lammerich, Frau Dr. Annette Busmann und Herrn Dr. Michael Walden für die stete Diskussionsbereitschaft, die Beantwortung zahlreicher Fragen, die wertvollen praktischen Hilfen im Laboralltag und das stets sehr angenehme Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und die mir während der Erstellung dieser Arbeit in vielfältiger Weise zur Seite standen, sowie bei meinen Freunden und Bekannten, die für das angenehme private Umfeld gesorgt haben.

Publikationsliste

Originalarbeiten

Owens T.S., Dodds H., **Fricke K.**, Hanna S.K., Crews K.R. (2003) High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the simultaneous measurement of carboxylate and lactone forms of irinotecan and three metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B* 788:65-74

Fricke K., Heitland A., Maronde E. (2004) Cooperative activation of lipolysis by PKA and PKC pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 145:4940-4947

Fricke K., Schulz A., Forssmann W.G., Maronde E. (2004) Isolation and characterization of a novel circulating human hormone. *Eingereicht*.

MITROVIC V., LÜSS H., NITSCHKE K., FORSSMANN K., **FRICKE K.**, MARONDE E., FORSSMANN W.G., MEYER M. (2004) Efficacy and safety of the renal natriuretic peptide urodilatin in patients with decompensated chronic heart failure - a double-blind, placebo-controlled, ascending dose trial. *Eingereicht*.

MITROVIC V., LÜSS H., **FRICKE K.**, MARONDE E., FORSSMANN W.G., MEYER M.; Autorenliste noch nicht vollständig festgelegt (2004). Vorläufiger Arbeitstitel: Development of a Urodilatin-specific sandwich ELISA for Urodilatin in human plasma. Correlation with cGMP levels. *In Vorbereitung*.

Kongressbeiträge

GAJJAR A.J., RADOMSKI K.M., BOWERS D.C., CHINTAGUMPALA M.M., **FRICKE K.**, THOMPSON S.J., HOUGHTON P.J., STEWART C.F. (2000) Pharmacokinetics of irinotecan (IRN) and metabolites in pediatric high-grade glioma patients with and without co-administration of enzyme-inducing anticonvulsants. *American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*, New Orleans, LA, USA, 20. - 23. Mai 2000

Mitrovic V., Lüss H., Nitsche K., Forssmann K., **Fricke K.**, Maronde E., Forssmann W.G., Meyer M. (2004) Hemodynamic and neurohumoral effects of the renal natriuretic peptide urodilatin in patients with decompensated congestive heart failure. *European Society of Cardiology Heart Failure Update*, Wroclaw, Polen, 12.-15. Juni 2004

Mitrovic V., Lüss H., Nitsche K., Forssmann K., **Fricke K.**, Maronde E., Forssmann W.G., Meyer M. (2004) Urodilatin induces cGMP-mediated hemodynamic effects in patients with decompensated congestive heart failure. *European Society of Cardiology Congress*, München, 28. August - 01. September 2004

Patentanmeldung

A method (for the induction of triglyceride release from adipose tissue) for the treatment of obesity. DE 103 52 335.9

Lebenslauf

Name: Katrin Fricke
Geburtsdatum: 13.04.1976
Geburtsort: Bremen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1982 - 1986 Grundschule in Beckedorf/Löhnhorst im Landkreis Osterholz
1986 - 1995 Kooperative Gesamtschule in Schwanewede,
Schulabschluss: Abitur

Hochschulausbildung und berufliche Tätigkeiten:

Oktober 1995 - November 1999 Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
Januar 2000 - Juni 2000 Erster Abschnitt der praktischen Ausbildung im Solid Tumor Pharmacology Laboratory des St. Jude Children's Research Hospital in Memphis, Tennessee, USA
Juli 2000 - Dezember 2000 Zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung in der Jakobi-Apotheke in Kiel
29. Januar 2001 Erteilung der Approbation als Apothekerin
Februar - März 2001 Beschäftigung als Apothekerin in der Albert-Schweitzer-Apotheke in Bremen
April 2001 - März 2002 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer Institut für Experimentelle Medizin in Hannover (ehemals: Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung)
seit April 2002 Durchführung der Doktorarbeit bei der IPF PharmaCeuticals GmbH in Hannover (Isolierung und Identifizierung lipolytischer Substanzen und ihre Charakterisierung in 3T3-L1 Adipozyten)
Tag der Promotion: 9. November 2004

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im November 2004

Katrin Fricke