

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Jens Marquardt

Regulation mitochondrialer Funktionen durch
Triiodthyronin,
3-5-Diiodthyronin und 3-Monoiodthyronin in
braunen Adipozyten

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

vorgelegt von Erich Adrian Schröder
aus Hamburg

Lübeck 2022

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. med. Alexander Iwen
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Jürgen Grabbe
Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2022
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.03.2022

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhalt

Einleitung und Fragestellung.....	4
Stand der Forschung.....	4
Mitochondrien und die Entkopplung der Atmungskette	4
Braunes Fettgewebe (brown adipose tissue = BAT)	5
Thyroxin (T ₄) und 3,3',5'-Triiod-L-Thyronin (T ₃).....	6
3,5-Diiod-L-Thyronin (T ₂)	9
3-Iodothyronamin (T ₁ AM)	10
Fragestellung	11
Material und Methoden.....	12
Material.....	12
Chemikalien.....	12
Antikörper.....	13
Materialien.....	13
Geräte.....	14
Computerprogramme.....	15
Methoden	16
Zellkultur.....	16
Verwendete Zellen.....	16
Verwendete Medien.....	16
Kultivierung der Zellen.....	17
Stimulation der Zellen	19
Test der FBS-Chargen	20
Western Blot.....	21
Puffer	21
Lyse der Zellen für Proteingewinnung.....	22
Messung der Proteinkonzentration.....	22
Berechnung der Verhältnisse der Puffer im Western Blot.....	22
Durchführung:.....	24
Auswertung der Ergebnisse.....	26
Oxygraph	27
Messprinzip.....	27
Vorbereitung der Messung	28
Durchführung.....	29
Auswertung.....	30

Oxoplate.....	31
Messprinzip.....	31
Durchführung.....	31
Auswertung.....	33
FACS.....	34
Elektronenmikroskopie.....	35
Glucoseverbrauchsmessung:.....	35
Statistik.....	35
Ergebnisse.....	37
T ₃	37
Mitochondriale Ultrastruktur und Masse.....	37
Western Blot.....	38
Sauerstoffverbrauch.....	39
Membranpotential (JC-1 Assay).....	40
Glucoseverbrauch.....	40
T ₂	41
Mitochondriale Ultrastruktur und Masse.....	41
Western Blot.....	42
Sauerstoffverbrauch.....	43
Membranpotential (JC-1 Assay).....	44
Glucoseverbrauch.....	44
T ₁ AM.....	45
Mitochondriale Ultrastruktur und Masse.....	45
Western Blot.....	45
Membranpotential (JC-1 Assay).....	50
Diskussion.....	52
T ₃	52
T ₂	55
T ₁ AM.....	56
Zusammenfassung der Diskussion.....	58
Abkürzungsverzeichnis.....	59
Literaturverzeichnis.....	65
Danksagung.....	72

Einleitung und Fragestellung

Stand der Forschung

Diese Dissertation geht der Frage nach, inwiefern die Schilddrüsenhormonderivate Thyronamin 3-Iodothyronamin (T_1AM), 3,5-Diiod-L-Thyronin (T_2) und 3,3',5-Triiod-L-Thyronin (T_3) den Energiehaushalt von braunem Fettgewebe beeinflussen. Schilddrüsenhormone haben einen profunden Einfluss auf verschiedenste physiologische Aspekte wie die embryonale Entwicklung aber auch auf die Regulation des Energiehaushaltes. Das mitochondrienreiche braune Fettgewebe ist wichtig für die Thermoregulation und beeinflusst somit ebenfalls den Energiehaushalt. Bei dieser Betrachtung sollen besonders der mitochondriale Stoffwechsel und die mitochondriale Biogenese im Vordergrund stehen. In der Einleitung soll zunächst der aktuelle Stand der Forschung in Bezug auf die Rolle von Mitochondrien in braunem Fettgewebe umrissen werden, woraufhin die Auswirkungen der Schilddrüsenhormone auf braunes Fettgewebe beschrieben werden, woraus sich die Fragestellung der Doktorarbeit ergeben wird.

Mitochondrien und die Entkopplung der Atmungskette

Mitochondrien sind Träger der Atmungskette und somit die Schlüsselorganellen für den Energiemetabolismus. Sie werden von Schilddrüsenhormonen in ihrer Funktion beeinflusst und liegen in großer Menge in allen Gewebetypen vor, die einen hohen Energieumsatz haben. Die Hauptaufgabe der Mitochondrien besteht bei Eukaryoten in der Bildung von Adenosintriphosphat (ATP), einer energiereichen Substanz, die durch Dephosphorylierung ($ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$) die Energie für viele endotherme biochemische Reaktionen liefert.

Mitochondrien verfügen über eine innere und eine äußere Membran. Die oxidative Phosphorylierung, bei der ATP gebildet wird, findet über die aus fünf Komplexen bestehende Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran statt, die die mitochondriale Matrix umschließt. Für die genaue Darstellung sei auf die entsprechende Lehrbücher verwiesen (1). Kurz zusammengefasst wird unter Verbrauch von NADH über die NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I), die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut, indem Protonen aus der mitochondrialen Matrix transportiert werden. Über die Succinat-Q-Reduktase (Komplex II) kann zudem $FADH_2$ aus dem Citratzyklus auf Höhe der Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase in die Elektronentransportkette eingebracht werden. Dadurch, dass es sich bei den Protonen (H^+) um geladene Teilchen handelt, entsteht ein elektrochemischer Gradient. Der Abbau des Protonengradienten erfolgt für gewöhnlich über die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex V), bei der über Rückfluss von Protonen aus der Matrix in das Cytoplasma und über Oxidation von O_2 zu H_2O aus ADP und P_i wiederum ATP gebildet wird.

Der elektrochemische Gradient, der durch den aktiven Transport geladener Teilchen über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut wird, wird als Membranpotential ψ_m bezeichnet. Dieses ist per Definitionem negativ (innerhalb der mitochondrialen Matrix sind weniger H^+ -Ionen als im Intermembranraum). Zur einfacheren Darstellung und um der Intuition zu folgen, dass das Membranpotential einer potentiellen Energie entspricht wird im Folgenden vereinfacht vom Betrag des Membranpotentials $|\psi_m|$ gleichbedeutend mit dem Membranpotential ψ_m gesprochen. Wenn in der Diskussion von einem „Einbruch“ oder „Abfall“ des Membranpotentials die Rede ist, handelt es sich streng physikalisch eigentlich um einen Anstieg des negativen Membranpotentials.

Eine Möglichkeit zur Messung der Aktivität der Atmungskette ist somit die Messung des O₂-Verbrauchs der Mitochondrien. In mehreren Zellreihen konnte zudem gezeigt werden, dass der elektrische Teil des Membranpotentials ψ_m bei einem erhöhten Energieumsatz der Zelle ebenfalls erhöht ist. Dieses geschieht, um auch bei erhöhtem Verbrauch die Funktion der Cytochrom-c-Oxidase aufrecht erhalten zu können (beispielhaft in Ostoblasten: (2)) Das Membranpotential kann photometrisch durch polarisationsabhängige Farbstoffe gemessen werden (3). Diese Farbstoffe sind fluoreszente, lipophile Kationen, deren Akkumulation in den Mitochondrien abhängig vom Membranpotential der Mitochondrien ist. Bei stärker polarisierten Mitochondrien (einem hohen $|\psi_m|$) lagern sich mehr Kationen im Mitochondrium ab. Einer dieser Farbstoffe ist JC-1, das gegenüber anderen Farbstoffen den Vorteil hat, bei der Aufnahme in das Mitochondrium bei hohem $|\psi_m|$ ein Dimer zu bilden, das mit einer anderen Wellenlänge fluoresziert, so dass der Grad der Polarisierung des Mitochondriums über den Quotienten aus der Fluoreszenz von JC-1 in Monomer- und Dimer-Form evaluiert werden kann. Somit ist die Aussagekraft des Farbstoffes im Gegensatz zu den anderen Farbstoffen nicht von anderen Einflüssen wie der mitochondrialen Dichte abhängig.

Eine zweite Möglichkeit des Abbaus des Protonengradienten entsteht über eine Entkopplung der Komplexe I-IV von der Cytochrom-c-Oxidase über die *uncoupling proteins* (UCPs), von denen mehrere gewebsspezifische Isoformen bekannt, sind (4).

UCPs sind Protonophore, die es den Protonen aus dem Cytoplasma ermöglichen, ohne chemiosmotische Kopplung an die Cytochrom-c-Oxidase in die Matrix zurückzufließen. Hierbei wird die potentielle Energie der Protonen in thermische Energie umgewandelt. Dies geschieht insbesondere in braunem Fettgewebe. Die Expression von UCP1 wird durch mehrere Reize und Proteine moduliert, eine gemeinsame Endstrecke vieler Modulatoren (u.a. cAMP, PPAR γ , PPAR α , Retinoide) ist die Induktion der PGC-1 α Expression. PGC-1 α wiederum bindet an eine Enhancer-Region für die Transkription von UCP1 (5,6), und ist darüberhinaus maßgeblich an der mitochondrialen Biogenese, und der Entwicklung von Insulinsensitivität von braunem Fettgewebe beteiligt.

Mitochondrien unterliegen einem steten Auf- und Abbau, der durch mehrere Proteine gesteuert wird. Von BNIP3 (BCL2-interacting protein 3), einem Protein auf der externen mitochondrialen Membran konnte gezeigt werden, dass es bei Hypoxie der Zelle oder bei Verlust des Membranpotentials phosphoryliert wird und in phosphorylierter Form die Affinität des Mitochondriums für LC3 erhöht, das wiederum die Sequestrierung des Mitochondriums einleitet und den Transport in Autophagosomen initiiert. Auf diese Weise wird u.a. durch BNIP3 die mitochondriale Autophagie eingeleitet (7).

Als Biomarker für die Masse des Mitochondriums verwenden wir je ein auf der äußeren und inneren Membran des Mitochondriums lokalisiertes Protein: TOMM20, ein auf der äußeren Membran des Mitochondriums lokalisierte Untereinheit der outer membrane mitochondrial translocase (8) und ATP β , einer Untereinheit der ATP-Synthase, eines auf der inneren Membran lokalisierten Proteins (9).

Braunes Fettgewebe (brown adipose tissue = BAT)

Braunes Fettgewebe (BAT) ist ein spezialisiertes Fettgewebe, das sich funktionell und morphologisch deutlich von weißem Fettgewebe unterscheidet. Die braunen Fettgewebszellen sind im Gegensatz zu den univakuolären weißen Fettzellen mit einer Vielzahl von Triglycerid-gefüllten Fettvakuolen

bestückt, was ihnen bereits lichtmikroskopisch ohne Hilfsmittel wie spezielle Färbungen ein spezifisches Aussehen verleiht anhand dessen sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten die Differenzierung gut ablesen lassen kann. Zudem findet sich eine große Anzahl von Mitochondrien in diesem Gewebe, was ihm makroskopisch seine charakteristische braune Farbe verleiht.

Die Rolle von BAT für die zitterfreie Thermogenese bei kleinen Säugetieren und Neugeborenen ist seit etwa 50 Jahren bekannt. In den letzten 30 Jahren konnte gezeigt werden, dass Störungen der Funktion von braunem Fettgewebe metabolische Ineffizienz mit sich bringen (10). Ähnlich alt ist das Wissen um die Existenz von UCP₁ als Entkoppler der Atmungskette, der die zitterfreie Thermogenese in braunem Fettgewebe ermöglicht. Als zentralnervöse Steuereinheit für die Funktion des braunen Fettgewebes gilt der ventromediale hypothalamische Nucleus (VMN), der die metabolischen Informationen (insb. hohe Energiereserven des Körpers, eine vorangegangene Mahlzeit oder eine niedrige Körperkerntemperatur) integriert und über das sympathische Nervensystem norepinephrinvermittelt das braune Fettgewebe stimuliert (11). Dieser Reiz wird über die α - und β_{1-3} -Rezeptoren des braunen Fettgewebes aufgenommen, wobei insbesondere die β_3 Rezeptoren eine herausragende Rolle spielen. Über eine Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-Aktiviertem Receptor gamma Coactivator 1 α (PGC1 α), die durch die o.g. adrenerge Stimulation erfolgt (12), die wiederum als Antwort auf Kältereiz erfolgt (13), werden die Triglyceride abgebaut und stehen als Energielieferant für die Wärmeproduktion zur Verfügung. Zudem aktiviert PGC-1 α über eine Erhöhung der Transkription von PPAR γ und Schilddrüsenhormonrezeptoren in braunem Fettgewebe die Expression von UCP₁.

Die Existenz von BAT und seine Relevanz beim adulten Menschen wurden lange in Frage gestellt. Durch die Einführung des Fluorodeoxyglucose Positron Emissions Tomographie konnten 2007 erstmals signifikante Ansammlungen von braunem Fettgewebe im Menschen nachgewiesen werden, die beim Erwachsenen zitterfreie Thermogenese, adrenerge Thermogenese und ernährungsabhängige Thermogenese bewirken (14). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Menge von nachweisbarem BAT beim Erwachsenen mit dem Energieverbrauch in Ruhe korreliert und mit Body-Mass-Index und Körperfett invers korreliert (15). Dieser Zusammenhang lässt das braune Fettgewebe in den Fokus für mögliche therapeutische Ausnutzbarkeit bezüglich einer Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren und dem metabolischen Syndrom rücken. Mögliche Modulatoren der Aktivität des braunen Fettgewebes, die einen positiven Effekt auf das metabolische Syndrom bewirken könnte, sind Schilddrüsenhormone.

Thyroxin (T4) und 3,3',5-Triiod-L-Thyronin (T3)

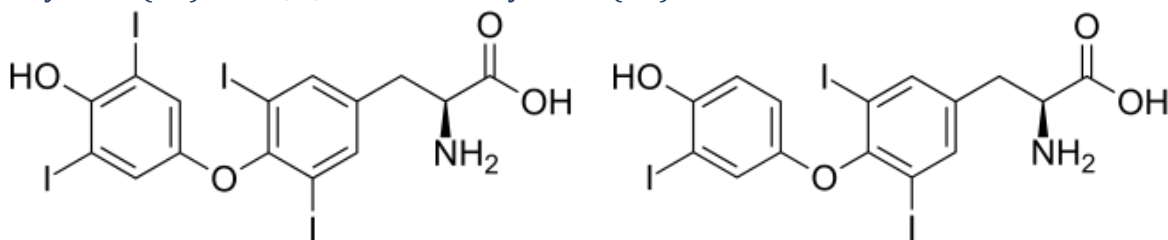


Abbildung 1: Strukturformeln Thyroxin und 3,3',5-Triiod-L-Thyronin

Schilddrüsenhormone sind essentielle Regulatoren u.a. für eine ungestörte Ontogenese, Energiehaushalt und Wärmeregulation und für das kardiovaskuläre System (16–18). Sie haben sowohl direkte Effekte auf verschiedenste Gewebearten als auch indirekte, zumeist zentralnervös vermittelte Effekte. Das von der Schilddrüse freigesetzte Hormon Thyroxin (T_4) gilt allgemein als Prohormon, entfaltet aber auch selbst thyreotrope Effekte, was insbesondere im zentralen Nervensystem eine Rolle zu spielen scheint (19). Durch die Deiodinasen D_1 , D_2 und D_3 werden Schilddrüsenhormone deiodiniert und zu anderen Metaboliten umgewandelt. Die bekannteste und als erstes beschriebene Deiodinierung ist die von T_4 zum aktiven Metaboliten 3,3',5-Triiod-L-Thyronin (T_3). In unterschiedlichen Gewebearten liegen unterschiedliche Deiodinasen vor. Insbesondere von den Isoformen D_2 , das in braunem Fettgewebe die wichtigste Rolle spielt, und D_3 konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Expression der Deiodinasen im Gewebe maßgeblich von der T_4 -Konzentration im peripheren Blut abhängt, so dass angenommen wird, dass eine lokale Regulation des im Gewebe vorhandenen T_3 über diesen Weg stattfindet (20).

Da sie lange bekannt sind, werden T_4 und T_3 als „klassische“ Schilddrüsenhormone bezeichnet. Von T_3 ist lange bekannt, dass es den metabolischen Grundumsatz erhöht (21). In der thyreotoxischen Krise indes ist der metabolische Grundumsatz um etwa 50% erhöht (22). T_3 erhöht die myokardiale Kontraktilität und Herzfrequenz und reduziert den peripheren Gefäßwiderstand (23). Hierfür sind überwiegend genomische Effekte verantwortlich, wobei auch nongenomische, da im Minutenbereich nach Injektion auftretende Effekte existieren (24). Klinisch ist eine nicht oder unzureichend behandelte Hyperthyreose mit Gewichtsverlust, Tremor, Osteoporose, neuropsychiatrischen Symptomen, Tachykardie und Vorhofflimmern bis hin zum kardiovaskulärem Schock assoziiert (25).

Bei Versuchen, T_3 in niedrigen Dosen zur Behandlung von Übergewicht einzusetzen, konnte indes kein positiver Effekt auf das Körpergewicht erreicht werden, zudem ist der Einsatz durch die erhöhte Rate von Herzrhythmusstörungen bei Einsatz von T_3 bei gesunden Patienten limitiert (26).

In hypothyreoten Patienten ist der Grundumsatz um etwa 50% erniedrigt (22). Klinisch äußert sich ein hypothyreoter Zustand unter anderem durch eine Gewichtszunahme, Kälteintoleranz, trockener Haut, Fatigue-Syndrom, geistiger Verlangsamung und einer mentalen Trägheit. Zudem steigt bei einer manifesten chronischen Hypothyreose das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Unter anderem zeigen sich eine gestörte Endothelfunktion und eine verminderte Herzleistung bei Belastung, es konnte eine vermehrte Atherosklerose und erhöhte Lipidkonzentration im Blut nachgewiesen werden (27). Studien zeigen, dass selbst eine latente Hypothyreose bereits Fettstoffwechsel und Blutdruck negativ beeinflussen kann und mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose und somit für Herz-Kreislauf-Erkrankungen einhergehen kann (28). Selbst bei subklinischer Hypothyreose zeigt sich ein erhöhtes Risiko für Herzversagen (29).

Vor dem Hintergrund, dass die Funktion der Schilddrüse maßgeblich für das Verhindern eines metabolischen Syndroms ist (30,31), hat das Verständnis der Stoffwechselwege von Schilddrüsenhormonen eine hohe klinische Relevanz und der Einsatz von T_3 und seinen Metaboliten wird bereits verschiedentlich im Einsatz gegen das metabolische Syndrom erprobt (32). Obwohl die Hypothese, dass T_3 den metabolischen Grundumsatz deutlich erhöht, bereits 1895 aufgestellt wurde

und viele Stoffwechselwege beschrieben sind (6,33), ist bis heute nicht klar, welcher Stoffwechselweg für diesen Effekt von T₃ physiologisch hauptausschlaggebend ist.

Ein Effekt von T₃, der für die vorliegende Arbeit besondere Bedeutung erhalten wird, ist die Erhöhung der mitochondrialen Masse nach einem bis mehreren Tagen (33). Dieser Effekt beruht auf einer erhöhten nukleären und mitochondrialen Transkription von DNA, die über Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) vermittelt wird. Es sind zwei TR-Gene bekannt (TR α und TR β), die über alternatives Splicing wiederum unterschiedliche Isoformen des TR codieren (TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2, TR β 3). Mit Ausnahme von TR α 2 konnte bei allen Isoformen Bindungsaktivität zu T₃ nachgewiesen werden. Eine gewebsspezifische Expression und Regulierung der Isoformen gibt einen Hinweis auf ihre unterschiedliche Funktionalität.

Demgegenüber ist ein Effekt von T₃, der innerhalb von Minuten bis Stunden auftritt und nongenomisch vermittelt wird, die Stimulation der Atmungskette von Mitochondrien. Dieser ist von den TR unabhängig, schnell und wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Pathways vermittelt. Auszugsweise seien genannt MAPK, AMPK, Akt/Proteinkinase B, PI3K (33).

Sowohl der genomische als auch der nichtgenomische Pathway führen zu einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität. Darüber hinaus existieren sowohl direkte Bindungsstellen für T₃ in den Mitochondrien, die eine Transkription von mtDNA initiieren, als auch indirekte Wege des Einflusses von T₃ auf die mitochondriale Biogenese über diverse Transkriptionsfaktoren, u.a. die Modulation der Konzentration von NRF-1, NRF-2, PPAR γ , PGC-1 α und PGC-1 β (6). Von PGC-1 α konnte nach T₃-Administration von T₃ in Leberzellen von Ratten transkriptional eine 13-fache und auf Proteinebene eine dreifache Erhöhung der Konzentration von RNA- / Proteinkonzentration gezeigt werden (34).

Unter anderem beruht die Steigerung des Grundumsatzes auf einer Induktion der Thermogenese in braunem Fettgewebe. Die Thermogenese wird zu einem großen Teil durch das sympathische Nervensystem reguliert, dessen Synapsen in BAT reichlich vorhanden sind und dessen Botenstoffe insbesondere die α - und β ₁₋₃-Rezeptoren der Fettzellen anregen, die synergistisch Lipolyse induzieren, mitochondriale Wärmeproduktion initiieren und durch Induktion (35) und Deubiquitinierung von D2 (36) die gewebespezifische Konversion von T₄ zu T₃ erhöhen (37). Auf diese Weise steigt die lokale T₃-Konzentration wenige Stunden nach Kälteexposition auf das 4- bis 5-fache an (38). Durch die intravenöse Gabe von CL-316,243, einem selektiven β ₃-Agonisten, konnte zudem bei der Ratte eine Zunahme der BAT-Fettdepots und eine erhöhte Konzentration von UCP1 bei erhöhtem metabolischen Grundumsatz und vermehrter Thermogenese sowie eine Abnahme der Masse von weißem Fettgewebe gezeigt werden (39). Der Synergismus aus einer T₃ Stimulation und noradrenerger Stimulation bewirkt in vivo und in vitro eine überproportionale Erhöhung der Wärmeproduktion. Dies geschieht unter anderem durch die Induktion des in der Inneren Mitochondrienmembran lokalisierten UCP1 (16,40,41).

3,5-Diiod-L-Thyronin (T2)

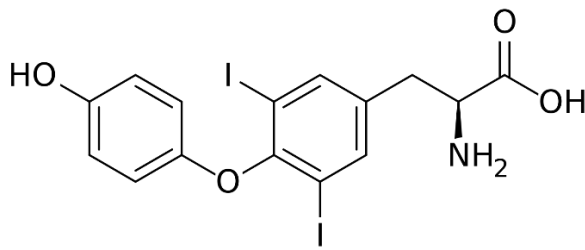


Abbildung 2: Strukturformel 3,5-Diiod-L-Thyronin

Es ist nicht weiter verwunderlich, dass bei weltweit wachsender Zahl von Patienten mit metabolischem Syndrom nach einer Substanz gesucht wird, die einige der positiven Effekte von T₃ auf das metabolische Syndrom, namentlich die Erhöhung des Grundumsatzes und den Gewichtsverlust bewirkt, ohne die negativen psychotropen und kardiotropen Effekte einer Hyperthyreose zu bewirken. Hierzu fiel das Augenmerk insbesondere auf die Deiodinierungsformen von T₃. Das aus der Deiodinierung entstehende 3-3'-Diiod-L-Thyronin ist eine Inaktivierungsform von T₃ ohne nennenswerte physiologische Effekte. Auch weitere Abbauprodukte wie ToAM, T₁A oder N- und O-acetyliertes T₁AM zeigten keine relevanten physiologischen Effekte (42–44).

Ein Hoffnungsträger für positive metabolische Effekte ist allerdings 3,5-Diiod-L-Thyronin (im Folgenden vereinfacht als T₂ bezeichnet), das ebenfalls aus T₃ durch Deiodinierung entsteht (45–47) und erstmals nach Entwicklung einer neuartigen radioaktiven Markierungsmethode 1977 in menschlichem Serum nachgewiesen werden konnte (48). Die Serumkonzentration von T₂ beträgt bei der Ratte ca. 5 pmol/l (45), beim gesunden Menschen etwa 16,2 pmol/l (49).

Von T₂ sind viele T₃-ähnliche Wirkungen bekannt, so dass die beiden Hormone gemeinsam mit T₄ zu den „heißen“ Schilddrüsenhormonen gezählt werden. Die meisten Studien zu T₂ wurden bis dato an Leberzellen und Skelettmuskelzellen durchgeführt. T₂ bewirkt ähnlich wie T₃ eine Abnahme von hepatischer Fetteinlagerung bei Ratten (50) und bewirkt eine erhöhte Insulinausschüttung in Zellmodellen von pankreatischen beta-Zellen der Ratte und des Menschen (51). T₂ wirkt auf Mitochondrien stimulierend und erhöht in vivo den Sauerstoffverbrauch in Skelettmuskelzellen (52). Zudem wird in hypothyreoten Ratten in vivo die Thermogenese angeregt. In vivo steigert T₂ den Sauerstoffverbrauch der Tiere. Ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs ist nach T₂-Administration von perfundierten Lebern und Zellsuspensat von braunem Fettgewebe nachweisbar, das zuvor hypothyreot gehaltenen Tieren entnommen wurde (53). 1h nach Injektion von T₂ in Ratten konnte zudem ein Anstieg von nukleär vorhandenem PGC1 α nachgewiesen werden, der nach 24h bereits nicht mehr nachweisbar war. Es konnte eine vermehrte Neovaskularisierung im braunen Fettgewebe von hypothyreoten Ratten, die 24h mit T₂ behandelt worden waren gezeigt werden, auch die sympathische Innervation nahm zu. Zudem kann T₂ ein „browning“, d.h. eine Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe induzieren (54).

3-Iodothyronamin (T₁AM)

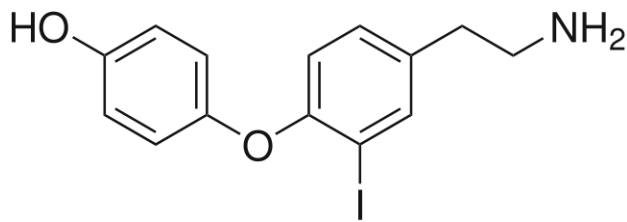


Abbildung 3: Strukturformel 3-Iodothyronamin

Ein weiteres Schilddrüsenhormonderivat ist das durch Decarboxylierung und wiederholte Deiodination durch die Deiodinasen Dio₁, Dio₂ und Dio₃ (55) aus T₄ entstehende Thyronamin 3-Iodothyronamin (T₁AM), das 2004 beschrieben wurde. T₁AM gehört chemisch zur Gruppe der Phenethylaminderivate und ist den klassischen Schilddrüsenhormonen zumeist in der Wirkung entgegengesetzt (56,57).

T₁AM kann an mehrere membranständige Rezeptoren binden (u.a. TAAR-1, mehrere TRP-Kanäle, beta-adrenerge Rezeptoren (58)) und reduziert nach intravenöser Gabe den Sauerstoffverbrauch, die Temperatur und die Herzfrequenz bei Nagern und führt zu einer Hyperglykämie und Anergie (59). Der Temperaturabfall nach intraperitonealer Gabe von 50 mg pro kg Körpergewicht erreicht nach 90 Minuten mit einem Gesamtabfall von 7,5°C sein Maximum und normalisiert sich nach 6-8 Stunden komplett. Die Herzfrequenz sinkt wenige Minuten nach der Injektion von T₁AM um 20-30% und erreicht ihren Ausgangswert nach etwa 8 Stunden wieder. In einem explantierten und denervierten Rattenherz zeigt T₁AM ebenfalls einen mindestens einstündigen Abfall der Herzfrequenz um 63%, was darauf hinweist, dass T₁AM auch einen vom zentralen Nervensystem unabhängigen Wirkmechanismus aufweisen muss. Zudem ändert sich der respiratorische Quotient bei Hamstern und Mäusen nach einer einmaligen T₁AM Gabe von einem gemischten Verbrauch von Kohlenhydraten und Lipiden zur Energieerzeugung (0,9 bei Hamstern, 0,83 bei Mäusen) hin zu einem reinen Lipidverbrauch (ca. 0,7) (60).

Die Signaltransduktionswege von Schilddrüsenhormonen sind gewebespezifisch und insbesondere für die neuen Schilddrüsenhormonderivate T₂ und T₁AM wenig erforscht. Vor allem für Fettgewebe liegen nur wenige Daten vor. Für eine detaillierte Auflistung der bekannten Signaltransduktionswege sei auf entsprechende Übersichtsartikel verwiesen (6). Hervorzuheben ist hierbei, dass T₁AM über Monocarboxylattransporter (MCT) nach intrazellulär aufgenommen werden kann, wobei insbesondere MCT₈ und MCT₁₀ hierfür eine Rolle spielen könnten, an denen ein kompetitiver Antagonismus für die Aufnahme von T₃ und T₄ besteht (61).

Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, ein weiteres Verständnis für die direkte Wirkweise von T₃, T₂ und T₁AM auf braune Adipozyten zu erhalten. Insbesondere wird hierbei durch den Aufbau der Versuche als reine Zellkulturmodelle ermöglicht, direkte Vergleiche der drei Schilddrüsenderivate untereinander aufzustellen und aufzuzeigen, welche der in vivo festgestellten Wirkungen der Schilddrüsenhormone auf direkten Effekten auf das braune Fettgewebe basieren.

Die bislang in der Einleitung beschriebenen Arbeiten an Gewebesuspensaten oder lebenden Tieren haben nur bedingt Aussagekraft über die direkten Einflüsse der Schilddrüsenhormone auf BAT, da indirekte, z.B. zentralnervös vermittelte Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Von T₃ gibt es zuverlässige Daten aus Zellkulturen. Zu T₁AM liegen hierzu bislang keine Daten vor. Die besten Daten zu T₂ und braunem Fettgewebe liefert eine Studie von Lombardi, Senese et al. (54), die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht erschienen war (s.o.). Diese ist allerdings limitiert dadurch, dass sie an Gewebesuspensaten durchgeführt wurde, so dass in dieser Studie nicht zwischen Effekten unterschieden werden kann, die den braunen Fettzellen selber inhärent sind und solchen, die durch indirekte T₂-Effekte bei hypothyreoten Ratten ausgelöst worden sein könnten, (Neovaskularisierung, erhöhte Innervation etc.).

Daher soll in dieser Arbeit der Einfluss von T₃, T₂ und T₁AM auf unterschiedliche Marker der mitochondrialen Aktivität gemessen werden, namentlich den Sauerstoffverbrauch der Zellen und die Änderung des Membranpotentials als Ausdruck eines Zusammenspiels der Komplexe I-VI der Atmungskette und der Entkopplung durch UCP₁. Zur Deutung dieser Ergebnisse wird die Menge von UCP₁ als Marker für Entkopplung, TOMM20 und ATPβ als Marker für mitochondriale Masse, PCG1α als Marker für mitochondriale Biogenese und BNIP3 als Marker für mitochondriale Autophagie auf Proteinebene erfasst und zudem die Änderung des Glucoseverbrauchs bestimmt. Ergänzt werden die Marker durch eine elektronenmikroskopische Betrachtung der Mitochondrien in Bezug auf ihre Masse und Struktur nach Stimulation mit den Schilddrüsenhormonderivaten. Durch die gleichzeitige Erhebung dieser Marker ist es möglich, ein vollständiges Bild über die metabolische Aktivität der Zelle in Bezug auf Thermogenese zu erhalten.

Um sowohl kurze als auch langanhaltende Effekte erfassen zu können, wurde zunächst in Vorexperimenten eine zeitabhängige Wirkung der untersuchten Hormone für verschiedene Zeitpunkte von 30 Minuten bis 24 Stunden in Bezug auf UCP₁-Expression, Glucoseverbrauch und Sauerstoffverbrauch untersucht, wobei sich für T₃ und T₂ für alle Parameter ein Anstieg bereits nach 2-stündiger Stimulation zeigte, der über 24 Stunden weiter anhielt, so dass für die weiteren Untersuchungen die Stimulationszeitpunkte 2 Stunden und 24 Stunden gewählt wurden.

Da T₁AM möglicherweise über einen kompetitiven Effekt (z.B. am MCT8-Transporter) den Effekt von T₃ behindern könnte (61), wird im Rahmen der T₁AM-Stimulation zudem eine Vorstimulation mit T₃ über 72h durchgeführt, um mögliche kompetitive Effekte zu erfassen.

Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese ist, dass T₃ und T₂ den Sauerstoffverbrauch in der Zellkultur steigern, wohingegen T₁AM ihn senken sollte. Mögliche Pathways wären die Regulation von Entkopplung der Atmung nongenomisch oder über UCP₁-Expression sowie die Veränderung der mitochondrialen Masse und Struktur.

Material und Methoden

Material

Chemikalien

Substanz	Hersteller
3,5-Diiod-L-thyronin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
3',5'-Triiodo-L-thyronine sodium salt (Lösungsmittel: 1M NaOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
3-Iod-L-thyronamin	Geschenk von Prof. Dr. Josef Köhrle, Charité Berlin
Acrylamide/Bis Solution 29:1	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Ammoniak	Merck KGaA (Darmstadt)
Amonium persulfate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Charcoal, dextran coated	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Dexametason	Geyer Th. GmbH (Hamburg)
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Dulbecco's Modified Eagle Medium w/4.5g/l glucose w/pyridoxine w/glutamax	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Ethanol	Apotheke UK S-H Campus Lübeck (Lübeck)
Fetal bovine serum	Live Technologies (Darmstadt)
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
HCl	Merck KGaA (Darmstadt)
Indometacin	Geyer Th. GmbH (Hamburg)
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Isobuthylmethylxanthin	Geyer Th. GmbH (Hamburg)
JC-1	Biomol GmbH (Hamburg)
Kaliumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Milchpulver (blotting grade, pulv., fettarm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
MitoTracker Green	Invitrogen (Karlsruhe)
MitoTracker Red	Invitrogen (Karlsruhe)
MycoZap Prophylactic	Lonza Cologne AG (Köln)
NaCl	Merck KGaA (Darmstadt)
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Sodium fluoride (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Natrium-Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA (Pasching, Österreich)
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology (Bonn)
Phenylmethanesulfonyl fluoride solution (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Rockford, USA)
cComplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Sodium dodecyl sulfate solution (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (Rockford, USA)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)
CL 316243 hydrate (β-CL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

Tabelle 1: Chemikalien

Antikörper

Antikörper	Hersteller
Akt Antibody	Cell Signaling – New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
GAPDH	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
pAKT (Ser473)	Cell Signaling – New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
PGC-1α	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching)
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching)
Rabbit anti-mouse uncoupling protein 1 Affinity Purified polyclonal Antybody	Merck KGaA (Darmstadt)
TOMM-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
UCP1 (Cat. No. AB3036)	Merck Millipore, Merck KGaA (Darmstadt)

Tabelle 2: Antikörper

Materialien

Material	Name	Hersteller
	Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
24-well-Platte	Tissue Culture Plate 24-Well Flat Bottom	Sarstedt (Nürnbrecht)
6-well-Platte	Tissue Culture Plate 6-Well Flat Bottom	Sarstedt (Nürnbrecht)
Filter für Medien	Stericup Filter Unit (Membrane Type: Milipore Express PLUS(PES), Pore Size Rating: 0.22 µm)	Merck KGaA (Darmstadt)
Oxoplate	OxoPlate® OP6gU: round bottom	PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg)
Pasteur-Pipetten		Brand GmbH + CO KG (Wertheim)
Pipettenspitzen		Sarstedt (Nürnbrecht)
Sarstedt-Röhrchen	Röhre (5 ml, 15 ml und 50 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Spitzen für Multipette	Combitips plus 5ml	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf)
Stabpipette	Serologische Pipette (2ml,	Sarstedt (Nürnbrecht)

	5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	
Transferringpipetten	Transferringpipetten	Sarstedt (Nürnbrecht)
Whatman-Paper	Blot Absorbent Filter Paper - Thin	BioRad (Hercules, USA)
Zählkammer	Assistent Neubauer Improved 0,100 mm	Glaswarenfabrik Hecht (Sondheim v. d. Rhön)
Zellkulturschalen	TC-Schale 100 x 20 mm, TC-Schale 150 x 20 mm	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellschaber	Zellschaber 25cm	Sarstedt (Nürnbrecht)

Tabelle 3: Materialien

Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Analysenwaage (fein)	Atilon	Acculab Sartorius (Göttingen)
Analysenwaage (grob)	440-47N	KERN & SOHN GmbH (Balingen)
Clark-Sauerstoff-Messgerät	Oxygraph System	Hansatech Instruments (Norfolk, England)
Eismaschine	AF 80	Scotsman®, HiBU Eismaschinen GmbH & Co. KG (Sprockhövel)
Elektronische Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
FACS-Gerät	BD FACSAria III	BD LIFE SCIENCES (Heidelberg)
Fluoreszenzmesser	FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech (Almendgrün)
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Inkubator	HERA cell 240	Heraeus GmbH (Hanau)
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph Instruments (Schwabach)
Mikroskop	ID 03	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Multipipette	Eppendorf multipipette plus	Eppendorf (Hamburg)
Netzgerät	Power Pack P25 T	Biometra GmbH (Göttingen)
pH-Meter	PB-11	Sartorius AG (Göttingen)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe	Eppendorf research	Eppendorf (Hamburg)
Plate-Reader für Protein-Assay	MRX Microplate Reader	Dynex Technologies (Chantilly, USA)
Roller für Sarstedt-Röhrchen	Assistent RM 5	Glaswarenfabrik Hecht (Sondheim v. d. Rhön)
Rüttler	Shaker 3006 (Pat 1716)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Stickstofftank	Locator JR	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Ultraschallbad	RK 100 H	Bandelin electronic (Berlin)
Vortexer	VF2	Jahnke & Kunkel IKA® Labortechnik (Staufen im Breisgau)
Wasserbad	OLS 200	Grant Instruments Ltd, (Cambridge, UK)
Werkbank (steril)	VFR 1206 GS	Clan LAF, (Humblebaek, DK)
Western Blot Belichtungskammer	Universal Hood II ?!?	BioRad (Hercules, USA)
Western Blotgerät	IKA-KMO	IKA®-Werke GmbH & CO. KG

		(Staufen)
Western Gellaufgerät	Mighty Small II Se 250	Hofer Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Mikro 2.2 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG (Tuttlingen, Deutschland)
Microplate Reader	Dynex MRX Revelation	Dynex Technologies (Chantilly, USA)

Tabelle 4: Geräte

Computerprogramme

Programm	Hersteller
Microsoft Office 2013	Mircrosoft (Redmont, USA)
Image J	NIH (Bethesda, USA)
Mendeley	Mendeley Ltd (RELX Group, London)
Adobe Photoshop CC	Adobe Systems (San José, USA)
Oxygraph Plus	Hansatech Instruments (Norfolk, UK)
Dynex Revelation 4.22	Dynex Technologies (Chantilly, USA)
FACS Diva Version 7.0	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)

Tabelle 5: Computerprogramme

Methoden

Zellkultur

Verwendete Zellen

Die verwendeten Zellen sind durch eine Transfektion mit dem simian virus 40 (SV40) immortalisierte braune Fettgewebszellen der Maus, hierzu sei auf entsprechende Paper verwiesen (62). Die braunen Adipozyten liegen bei Beginn der Kultivierung (in eingefrorenem Zustand) als Präadipozyten vor, die in ihrer Morphologie mikroskopisch Fibrozyten ähneln und durch ein unten aufgeführtes Protokoll zur Ausreifung gebracht werden müssen. Dieses Protokoll ist für zahlreiche Arbeiten verwendet worden. In den Arbeiten wurde qualitätssichernd gezeigt, dass die Zellen im ausgereiften Zustand als Reifemarker für braunes Fettgewebe Leptinsekretion, UCP1-Expression und Insulinsensitivität aufweisen. Da in dieser Arbeit auch der Einfluss von Triiodothyronin auf das braune Fettgewebe gezeigt werden sollte, musste das Protokoll insoweit verändert werden, dass die letzten 72 Stunden vor Beginn der Messungen ein weitestgehend T₃-depletiertes Medium verwendet werden musste. Hierfür wurde das normalerweise verwendete Differenzierungsmedium durch ein modifiziertes Präparationsmedium ersetzt, das sich von ersterem durch die Abwesenheit von T₃ und durch die Verwendung von aktivkohlegefiltertem fetalem Bovinem Serum unterscheidet. Durch diese Behandlung wird Schilddrüsenhormon zuverlässig aus fetalem Bovinem Serum filtriert (Reduktion von gebundenem T₄ um 96%, von freiem T₄ um >95%, von gebundenem T₃ um 77% und von freiem T₃ um >91% (63)). Unter dieser Behandlung fand weiterhin eine gute Ausdifferenzierung der Zellen statt. Lichtmikroskopisch unterschied sich die Morphologie der Zellen leicht – es lagen etwas weniger Zellen mit vielen Fettvakuolen vor. Im Western Blot zeigte sich weiterhin Expression von UCP-1 als Differenzierungsmarker für braunes Fettgewebe.

Verwendete Medien

Die folgenden Medien wurden zur Kultivierung der Zellen verwendet:

Grundmedium (GM)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium w/4.5 g/l glucose w/pyridoxine w/glutamax (DMEM)
- 20% fetal bovine serum (FBS)
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

Zur Herstellung dieses Mediums werden 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) in eine autoklavierte Glasflasche vorgelegt. Dazu werden 400 ml DMEM high glucose und 100 ml FBS durch eine vakuumbetriebene Stericup Filter Unit filtriert.

Differenzierungsmedium (DM)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium w/4.5g/l glucose w/pyridoxine w/gluta max(DMEM)
- 20% fetal bovine serum (FBS)
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 20 nM Insulin
- 1 nM T₃

Zur Herstellung dieses Mediums werden 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) in eine autoklavierte Glasflasche vorgelegt. Dazu werden 400 ml DMEM high glucose und 100ml FBS, sowie 50 µl T₃ (10 µM) und 10 µl Insulin (1 mM) durch eine vakuumbetriebene Stericup Filter Unit filtriert.

Induktionsmedium (IM)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium w/4.5g/l glucose w/pyridoxine w/glutamax(DMEM)
- 20% fetal bovine serum (FBS)
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 20 nM Insulin
- 1 nM T₃
- 250 µM Indometacin
- 500 µM Isobuthylmethylxanthin
- 2 µg/ml Dexamethason

Isobuthylmethylxanthin und Indometacin werden im Heizblock bei 89°C erwärmt, bis die Inhalte klar und flüssig sind. Pro 1 ml DM werden 1 µl Dexamethason (2 mg/ml), 1 µl Indometacin (0.25 M) und 2 µl Isobuthylmethylxanthin (0.25 M). Das Induktionsmedium ist am Tag der Herstellung zu verwenden.

filtered Fetal Bovine Serum (fFBS)

Zur Herstellung des Präparationsmediums wird aktivkohlegefiltertes FBS verwendet. 20 g Aktivkohle werden zu 1 l FBS gegeben und über Nacht bei 1-5°C auf einen Rüttler gestellt. Am nächsten Morgen wird das Aktivkohle-FBS-Suspensat bei 2000 x g 15 Minuten lang zentrifugiert und daraufhin mithilfe einer Stericup Filter Unit filtriert.

Präparationsmedium (PM)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium w/4.5g/l glucose w/pyridoxine w/glutamax(DMEM)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium w/o glucose w/pyridoxine w/glutamax(DMEM)
- 20% fetal bovine serum (FBS)
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 20 nM Insulin

Zur Herstellung dieses Mediums werden 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) in eine autoklavierte Glasflasche vorgelegt. Dazu werden 266 ml DMEM mit 4,5 g Glucose/l und 133 ml glucosefreies DMEM sowie 100ml fFBS, 50 µl T₃ (1 M) und 10 µl Insulin (1 mM) durch eine vakuumbetriebene Stericup Filter Unit filtriert.

Kultivierung der Zellen

Auftauen der Zellen

Die bei -80°C in gefrorener Form vorliegenden Zellen werden zunächst aufgetaut, indem sie im Eppendorf-Gefäß im Wasserbad bei 37°C geschwenkt werden und dann, wenn sie fast aufgetaut sind, in einigen ml Grundmedium aufgenommen werden und in eine Petrischale (Ø 15 cm) mit 25 ml Grundmedium überführt werden. Die Schale wird ausgiebig geschwenkt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert

Kultivierung der Grundplatte

Die Schale wird täglich auf Zelldichte kontrolliert und bei ca. 80 % Konfluenz gesplittet. Dazu wird das Grundmedium abgekippt und die Schale wird dreimal mit PBS gewaschen. Dann wird das PBS abgekippt und es werden 2,5 ml Trypsin auf die Schale gegeben um die Zellen in Suspension zu bringen. Die Schale wird 3 Minuten lang bei 37°C inkubiert und die letzten eventuell noch anhaftenden Zellen werden durch leichtes Schlagen auf den Schalenrand abgelöst. Der Erfolg der

Ablösung wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Daraufhin werden die Zellen mit 31 ml Grundmedium aufgenommen. 3 ml des Zellsuspensats werden in die Schale zurückgegeben und je 3 ml in eine neue Petrischale (Ø 10 cm) zu 7 ml Differenzierungsmedium gegeben. In diesen Zellschalen werden die Zellen zu reifem braunem Fettgewebe ausdifferenzieren, das für die Experimente genutzt werden kann. Die Grundplatte wird mit 25 ml Grundmedium aufgefüllt und alle Schalen werden ausgiebig geschwenkt um die Zellsuspension zu homogenisieren. Die erste Woche nach dem Auftauen der Zellen wird dem Grundmedium MycoZap zugesetzt, um eine Mycoplasmen-Kontamination zu verhindern. Die ersten zwei Wochen nach dem Auftauen werden beim Zellsplitting noch keine Zellen für Experimente ausgesät, um sicher zu gehen, dass der Stress, der den Zellen durch das Auftauen verursacht wurde, keinen Einfluss mehr auf den Rest der Kultivierung hat.

Wird eine 100%ige Konfluenz erreicht, beginnen die Zellen einen Ausdifferenzierungsprozess und können nicht mehr für die weitere Kultivierung verwendet werden, so dass die Grundplatte verworfen werden muss. Ebenso wird die Grundplatte bei Erreichen einer hohen Passage seit ihrer Immortalisierung (wenn etwa 32-35 Mal gesplittet wurde) verworfen, da Vorexperimente bei zu hoher Passage ein erratic Verhalten der Zellen gezeigt haben.

Die Zellen im DM erfahren alle 2 Tage einen Mediumwechsel, solange bis sie nach ca. 5 Tagen vollständige Konfluenz erreicht haben. Dann werden sie für 24 Stunden auf IM gesetzt. Ab diesem Tag beginnen die Fetteinlagerung und die Differenzierung der Zellen von Präadipozyten zu Adipozyten. Die Zellen werden nach der Induktion 4 Tage lang auf DM gehalten. Mit dem ersten Mediumwechsel auf DM beginnt der Tag 1 post inductionem (im Folgenden als p.i. bezeichnet). Das Medium wird gewechselt, sobald die Farbe von rosarot ins gelbliche umschlägt. Das geschieht meist am 3. und 4. Tag p.i.. An Tag 5 und Tag 6 p.i. werden die Zellen auf PM gesetzt. In diesem ist kein T₃ enthalten. Zudem ist das bovine Serum aktivkohlegefiltert um sicherzugehen, dass in den folgenden Experimenten kein dem Medium geschuldeter T₃-Effekt mit den gewünschten Substraten interferiert. An Tag 7 p.i. werden die Zellen für 24 Stunden auf DMEM mit 150 mg Glucose pro dl gesetzt. Jeweils zu definierten Zeitpunkten vor der Messung/Ernte der Zellen erfolgt der Zusatz der entsprechenden Stimulantien, indem die Kulturschale leicht angekippt wird und das Stimulans in das Medium hineingegeben wird. Dann wird die Schale etwa zehn Sekunden lang geschwenkt.

Nach Ablauf der 24h werden die Zellen der jeweiligen Messung oder zugeführt oder lysiert.

Jedes n in den folgenden Experimenten entspricht einer zeitgleich aus der Grundplatte entnommenen Charge Zellen, die jeweils über die gesamte Länge des Differenzierungsprozesses in separaten Zellkulturschalen aufgezogen wurden und erst am Ende der Differenzierung im Rahmen der Stimulation mit den Schilddrüsenhormonen unterschiedlich behandelt werden.

Da diese Zellen einige fundamentale Eigenschaften gemeinsam haben, die ihre Reaktionen auf hormonelle Stimulation beeinflussen können (Alter, Passagezeitpunkt, Zeitpunkt der Wechsel der Medien, Temperatur im Brutschrank, Zusammensetzung des Mediums etc), wird in den statistischen Tests (siehe Statistik) von abhängigen Variablen ausgegangen.

Aussaat der Zellen und Bebrütung bis zur Konfluenz: 4-6 Tage



Induktion der Differenzierung: 24 Stunden



Differenzierung der Zellen: 4 Tage



Halten der Zellen auf gefiltertem Medium: 2 Tage



Halten der Zellen auf DMEM: 24 Stunden - Beginn der Stimulation



Abbildung 4: Schema der Zellkultur

Vorexperimente

Dem oben genannten Schema sind Vorexperimente vorangegangen, bei denen das ursprüngliche Ausreifungsschema verwendet wurde, das sich von dem oben genannten in zwei Punkten unterschied: Die Differenzierung dauerte statt vier Tagen fünf Tage an, dafür entfiel der Schritt der Aufzucht auf PM. Dazu kommt, dass das DMEM nicht mit der Glucosekonzentration 150 mg/dl sondern mit der Konzentration 450 mg/dl verwendet wurde. Die Stimulation erfolgte mit den Hormonen zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 4h, 8h und 24h zur Ermittlung einer Zeit-Wirkungs-Kurve.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorexperimente insb. der Sauerstoffmessungen im Oxographen und der UCP1-Expression hatten sich die Stimulationszeiten von 2h und 24h als vielversprechend erwiesen, da sich hier stabil erhöhte Werte für den Sauerstoffverbrauch gezeigt hatten, so dass die Stimulationen im Hauptteil zu diesen Zeiten durchgeführt wurden.

Stimulation der Zellen

Die Lösungsmittel liegen in folgenden Lösungsmitteln vor:

Stimulans	Lösungsmittel
T ₁ AM (10mM)	DMSO 100%
T ₂ (10mM)	10% Ammoniaklösung, 50mM Methanol
T ₃ (10mM)	NaOH 0,1 M
βCL (100μM)	H ₂ O

Die Stimulation der Zellen verläuft in den 10cm Zellkulturschalen nach folgendem Schema:

Name des	Stimulans	Stimulans-	Lösungsmittel-	Zeitpunkt der
----------	-----------	------------	----------------	---------------

Experiments		konzentration im Medium	konzentration im Medium	Stimulation vor Experiment
T ₁ AM C	Lösungsmittel	-	DMSO (0,1%)	24h
T ₁ AM 2h	T ₁ AM	10µM	DMSO (0,1%)	2h
T ₁ AM 24h	T ₁ AM	10µM	DMSO (0,1%)	24h
T ₁ AM C v T ₃	Lösungsmittel / T ₃	- / 300nM	DMSO (0,1%) / NaOH (30µM)	24h / 72h ¹
T ₁ AM 2h v T ₃	T ₁ AM / T ₃	10µM / 300nM	DMSO (0,1%) / NaOH (30µM)	2h / 72h ¹
T ₁ AM 24h v T ₃	T ₁ AM / T ₃	10µM / 300nM	DMSO (0,1%) / NaOH (30µM)	24h / 72h ¹
T ₁ AM C v βCL	Lösungsmittel / βCL	- / 10nM	DMSO (0,1%)	24h / 24h
T ₂ C	Lösungsmittel	-	Methanol (15mM), Ammoniak (0,003%)	24h
T ₂ 2h	T ₂	300nM	Methanol (15mM), Ammoniak (0,003%)	2h
T ₂ 24h	T ₂	300nM	Methanol (15mM), Ammoniak (0,003%)	24h
T ₃ C	Lösungsmittel	-	NaOH (30µM)	24h
T ₃ 2h	T ₃	300nM	NaOH (30µM)	2h
T ₃ 24h	T ₃	300nM	NaOH (30µM)	24h

Tabelle 6: Stimulationsschema

Test der FBS-Chargen

Im Verlauf der Experimente musste die FBS-Charge zweimal gewechselt werden. Die Verträglichkeit der Zellen mit den entsprechenden neuen Chargen von FBS wurde vor deren Verwendung getestet, indem die Differenzierung sowohl optisch (multivakuoläre Struktur, wenige fibrozytisch anmutende Zellen) als auch durch Western Blotting der UCP-1 Konzentration und durch Färbung mit Oil-Red-O als Marker für den Fettgehalt der Zellen getestet wurden. Hierbei war die Differenzierung der Adipozyten unter Verwendung der neuen FBS-Charge der Differenzierung bei Verwendung der alten Charge jeweils nicht unterlegen.

¹Für die Stimulation mit T₃ über 72h wird dem Medium beim Mediumwechsel auf PM und DMEM bereits 300nM T₃ zugegeben.

Western Blot

Puffer

Laufpuffer(10x)

- 0,25M Tris (Trisma base)
- 1,92M Glycin
- 1% SDS

30,3g Tris werden in 1l aqua dest. gelöst, dann werden 144,1g Glycin und 10g SDS hinzugefügt. Vor der Verwendung wird der Laufpuffer zehnfach mit aqua dest. verdünnt.

Transferpuffer (10x)

- 0,25M Tris (Trisma base)
- 1,92M Glycin
- 20% Methanol

15,1g Tris werden in 0,5l aqua dest. gelöst, dann werden 72,1g Glycin hinzugefügt. Vor der Verwendung wird der Laufpuffer zehnfach verdünnt, indem zu 200ml der (10x)-Lösung 1,4l aqua dest. und 400ml Methanol hinzugefügt werden.

TBS (10x)

- 100mM Tris (Trisma base)
- 1,5M NaCl

12,1g Tris werden in ca. 900ml aqua dest. gelöst. Daraufhin werden 87,7g NaCl hinzugefügt und durch Zugabe von HCl der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Dann wird die Menge der Lösung mit aqua dest. auf 1l aufgefüllt.

TBST

200ml TBS (10x) werden mit 1800ml aqua dest. aufgefüllt und unter Rühren 2ml TWEEN zugesetzt.

Tris(pH=8,8)

- 1,5M Tris

45,4g Tris werden in 230ml aqua dest. gelöst und durch Zugabe von HCl der pH-Wert auf 8,8 eingestellt. Dann wird die Menge der Lösung mit aqua dest. auf 250ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Tris(pH=6,8)

- 0,5M Tris

15,1g Tris werden in 230ml aqua dest. gelöst und durch Zugabe von HCl der pH-Wert auf 6,8 eingestellt. Dann wird die Menge der Lösung mit aqua dest. auf 250ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Probenpuffer (inaktiv)

In 10ml Glycerol werden 2g SDS gelöst. Dann werden 6,25ml Tris(pH=6,8) zugegeben und eine Spatelspitze Bromphenolblau darin gelöst, bevor die Lösung mit Glycerol auf 20ml aufgefüllt sind. Die Lagerung erfolgt aliquotiert bei -20°C.

Lysispuffer

- 50mM Tris-HCl, pH 7.4
- 1% NP-40
- 0.25% Na-Deoxycholat
- 150mM NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM PMSF
- 1 Roche Tablette / 10 ml
- 1mM Na-Orthovanadat
- 1mM NaF

790mg Tris und 900mg NaCl werden in 75ml aqua dest. gelöst und der pH durch Zugabe von HCl auf 7,4 eingestellt. Der Lösung werden 10ml 10% NP-40 und 2,5ml 10% Natrium-Deoxycholat zugegeben und gerührt, bis die Lösung klar ist. Dann werden 200µl 500mM EDTA zugegeben und die Lösung mit aqua dest. auf 100ml aufgefüllt.

Pro 10ml Lysispuffer werden eine Tablette cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack sowie 20 µml NaF (500mM) und 50µl Natrium-Orthovanadat (200mM) hinzugegeben. Die Lagerung erfolgt bei -20°C. Erst kurz vor Gebrauch (<30 Minuten) werden pro 990µl Lysispuffer 10µl PMSF (100mM) hinzugefügt und kurz gevortext.

Lyse der Zellen für Proteingewinnung

Die gesamte Lyse der Zellen erfolgt auf Eis. Die Zellschalen werden zunächst mit eiskaltem PBS dreimal gewaschen. Das PBS wird abgeklopft und in die Zellschale werden 250µl Lysispuffer gegeben. Dann werden die Zellen abgeschabt und mit einer Pipette gemeinsam mit dem Lysmedium in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Dann werden die Röhrchen mehrmals einige Sekunden lang gevortext und für drei Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Daraufhin werden die Proben erneut kurz gevortext und für fünf Minuten langsam bei 4°C geschwenkt. Dann werden die Röhrchen 10 Minuten lang bei 4°C mit 16,060x g zentrifugiert. Anschließend wird die Fettschicht, die sich auf der wässrigen Proteinfraction gebildet hat mit einem Wattestäbchen abgezogen und die Proteinfraction in ein neues Röhrchen überführt.

Messung der Proteinkonzentration

Zunächst werden Albuminstandards in Lysispuffer mit fixen Konzentrationen in einer 1:1 Verdünnungsreihe bis 12 M und ein Nullwert in RIPA Puffer angesetzt. Daraufhin werden sowohl von den Standards als auch von den zu messenden Proben nach gutem vortexen jeweils in Doppelwerten 10µl in eine durchsichtige 96-well Sarstedt-Platte pipettiert. Dann wird eine ausreichende Menge der Lösung des Pierce® BCA Protein Assay Kits gemäß der Anleitung aktiviert und in jedes Loch mit Protein 200µl der Lösung gegeben. Die Platte wird mit Steristrip abgedeckt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert bevor die Platte für zehn Minuten bei 8°C in den Kühlschrank gestellt wird. Der Assay verändert die Absorption bei 540 nm proportional zur Proteinmenge. Die Absorption wird durch das Gerät Dynex MRX Revelation mit der Software Dynex Revelation 4.22 gemessen.

Berechnung der Verhältnisse der Puffer im Western Blot

Über die bekannten Proteinkonzentrationen der Albuminstandards und die gemessene mittlere Absorption der Doppelwerte kann eine Eichkurve erstellt werden, in der die Proteinkonzentration als Funktion der Absorption dargestellt wird. Dazu werden die Werte von Konzentration und Absorption

des Albuminstandards in einem Excel-Diagramm dargestellt und eine lineare Eichkurve hindurchgelegt, deren Formel sich in der Form

$c := \text{Konzentration}$ $a := \text{Absorption}$ $b := \text{Steigung}$ $y := y \text{ Achsenabschnitt}$

$$c = f(a) = b * a + y$$

darstellen lässt. Da die durch Excel extrapolierte Formel der Eichkurve die Werte b und y liefert, kann man im Folgenden aus der bekannten Absorption der Lysate a auf ihre Proteinkonzentration c schließen.

Im Folgenden wird eine Proteinmenge m gewählt, die in die einzelnen Lanes des Western-Blots eingebracht wird. Diese sollte für optimale Ergebnisse über 100 µg liegen. Da die einzelnen Lysate unterschiedliche Proteinkonzentrationen haben, müssen sie jeweils mit Lysepuffer verdünnt werden, damit sie die gleiche Konzentration erhalten. Das Volumen L , das vom Lysat in das Probenröhrchen für den Western Blot überführt wird. Aus dem Volumen V an Lysat, das pro Lane eingebracht werden kann und dem Faktor f , der angibt, das Wievielfache von V angesetzt werden soll (z.B. um später weitere Western laufen zu lassen), können die weiteren benötigten Volumina errechnet werden: Das Volumen P des hinzuzugebenden Probenpuffers (dieses beträgt $\frac{1}{4}$ des Gesamtvolumens) und das Volumen des Lysispuffers N zur Verdünnung.

Somit ergibt sich für die einzelnen Volumina:

$$L = \frac{m}{c} * f$$

$$P = \frac{V * f}{4}$$

$$N = V * f - (L + P)$$

Sollte N bei einer Probe einen negativen Wert erreichen, ist m zu hoch oder V zu niedrig gewählt und muss für alle Proben angepasst werden.

Durchführung:

Gießen der Gele

Zunächst werden die Reagenzien für die Herstellung der Gele nach folgendem Schema in einem 50 ml Sarstedt-Röhrchen zusammengegossen:

	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Sammelgel
aqua dest.	11,75ml	9,75ml	6,9ml
Tris (pH=8,8)	6ml	6ml	-
Tris (pH=6,8)	-	-	3ml
Acrylamid	6ml	8ml	2ml
10% SDS	250µl	250µl	100µl
10% Ammoniumpersulfat	96µl	96µl	48µl
TEMED	48µl	48µl	24µl

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für Western Blots

Hierbei ist zu beachten, dass TEMED erst kurz vor dem eingießen in den Gelhalter zugegeben wird, da ab diesem Schritt die Polymerisierung des Gels beginnt.

Der Transferpuffer wird einige Stunden vor Beginn des Western Blottings auf Eis gestellt. Dann werden die benötigten Proben, der Probenpuffer und die Marker langsam auf Eis aufgetaut. Die Platten zur Herstellung des Gels werden mit Ethanol fett- und staubfrei abgewischt, in den Schichten Plastikplatte, Teflonplatte, Spacer, Glasplatte angeordnet und daraufhin in die Gelgießkammer eingespannt. Dann werden die Gele hergestellt und direkt nach der Zugabe des TEMEDs zunächst das Trenngel und dann das Sammelgel bis kurz unter den Rand der Platten eingegossen, wobei für die Bestimmung der Proteine mit kleinerer Molmasse (UCP₁, TOMM20 und GAPDH als Ladekontrolle) das 10%ige Trenngel und für die Proteine mit größerer Molmasse (PGC1 α , pAKT, AKT, ATP β und GAPDH als Ladekontrolle) das 7,5%ige Trenngel verwendet wurde. Nach einer 20-30-minütigen Wartezeit ist das Gel komplett auspolymerisiert. Das sich am oberen Rand des Gels angesammelte Wasser wird abgegossen, TEMED zum Sammelgel hinzugefügt, dieses in die Kammer auf das Trenngel gegossen und der Kamm mit den Taschen für das Protein eingeführt. Nach 30 Minuten sind die Gele fertig. Sollten sie erst am nächsten Tag gebraucht werden, werden sie in feuchtes Papier eingeschlagen und im Kühlschrank gelagert.

Vorbereiten der Proben

In der Zwischenzeit wird der Probenpuffer auf 98°C erhitzt und zu 400µl Probenpuffer werden unter dem Abzug 100µl β -Mercaptoethanol zugegeben. Die Proben werden gemäß der vorher berechneten Konzentration von Lysispuffer, Probenpuffer und Protein zusammengemischt (siehe Seite 22). Eine ausreichend große Menge Leerpuffer wird durch das Mischen von drei Teilen Lysispuffer und einem Teil Probenpuffer hergestellt. Die Proben werden 10min lang bei 98°C erhitzt, kurz anzentrifugiert, gevortext und auf Eis gestellt.

Elektrophorese

Die Gelplatten werden in die Elektrophoresekammer eingespannt und die dafür vorgesehenen Reservoirs mit Laufpuffer befüllt. Daraufhin werden die Proteingemische mit einer gelben

Pipettenspitze vorsichtig in die Taschen gefüllt. Die leeren Taschen werden mit dem Leerpuffer befüllt. In die erste Tasche werden als Marker für die Proteingröße 3,5µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder gefüllt. Daraufhin wird der Raum hinter den Platten wieder mit Laufmedium aufgefüllt, die Elektrophoresekammer wird geschlossen und die Elektrophorese wird bei 125V durchgeführt. Durch das Bromphenolblau im Probenpuffer entsteht ein blaues Band, das zum unteren Rand des Gels wandert. Wenn dieses unten angekommen ist, ist die Elektrophorese beendet.

Blotting

Es werden aus der PVDF Membran zwei 6,5cm x 9cm große Rechtecke ausgeschnitten. Durch unterschiedliches Abschneiden der oberen linken Ecke werden sowohl die Ausrichtung der Membranen festgelegt als auch die beiden Membranen untereinander unterschieden. Daraufhin werden sie etwa eine Minute lang in Methanol eingelegt und leicht geschwenkt und danach so lange mit aqua dest. gespült, bis das Wasser nicht mehr abperlt. Dann wird das Wasser abgeschüttet und die Membranen in Transferpuffer überführt.

Es werden zur Herstellung des Blotting Sandwich zunächst die Klemmen für den Blotting Apparat in geöffnetem Zustand in eine Schale mit Transferpuffer gelegt und auf jeden Flügel der Klemme eine Schwammscheibe gelegt. Auf diese wiederum wird je mittig ein Whatman-Paper gelegt und auf dieses mittig die vorbereitete PVDF Membran. Nun werden die Gele aus ihren Kammern geholt, das Sammelgel, das sich durch eine feine Linie demarkiert, wird abgetrennt, die Gele werden mittig auf die PVDF Membranen gelegt und das Sandwich wird geschlossen. Bei allen Schritten wird darauf geachtet, dass sich in keiner der Schichten der Sandwiches Luftblasen befinden. Dann wird die Transferkammer mit TBST befüllt und die Sandwiches werden in die Transferkammer überführt, wobei der membranseitige Teil zur Anode und der gelseitige Teil zur Kathode zeigt. Die Kühlung und der Rührer der Transferkammer werden angestellt, der Spannungsgeber angeschlossen und eine Stunde lang auf 100V eingestellt. Dann werden die Membranen aus der Transferkammer geholt.

Aufbringen der Antikörper und Belichtung

Zum Blocken werden die Membranen in zwei Schalen mit 5% Milch in TBST (2,5g Milchpulver auf 50ml TBST) überführt. Diese werden eine Stunde lang auf einem Shaker langsam (40/min) geschüttelt und danach dreimal je einige Minuten lang mit TBST gewaschen. Daraufhin wird der Blot mit der proteintragenden Seite nach innen in ein 50ml-Sarstedt-Röhrchen mit Primärantikörper in 5 ml Milch überführt und dieses über Nacht bei 4°C auf einen Roller gestellt. Das Verhältnis der Primärantikörper zur Milch ist für alle Antikörper 1:1.000. Nur GAPDH wird im Verhältnis 1:10.000 verwendet.

Am nächsten Morgen wird der Blot in eine Schale mit TBST auf einen Shaker überführt und bei schnellem Schütteln (ca.140/min) eine Stunde lang gewaschen. Dabei wird alle zehn Minuten das TBST gewechselt. In 5% Milch in TBST werden pro 50ml 10µl HRP-Zweitantikörper gegen den bereits gebundenen Antikörper (Kaninchen oder Maus) gegeben, das TBST wird aus der Schale mit der Membran abgegossen und die Zweitantikörperlösung wird auf den Blot gegeben, der auf dem Shaker eine Stunde lang langsam (40/min) weitergeschüttelt wird. Daraufhin wird die Antikörperlösung abgegossen und der Blot wiederum eine Stunde lang unter schnellem Rütteln (140/min) in TBST gewaschen, das alle zehn Minuten gewechselt wird. Daraufhin wird pro Blot ca. 1ml der Entwicklerlösung SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate unter Vermeidung von langem Lichteinfall gemäß der Anleitung zusammengemischt, der Blot wird in eine farblose Schale überführt, gleichmäßig mit SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate benetzt

und in die Entwicklerkammer überführt, wo zunächst ein normales Lichtbild gemacht wird, um die Proteinleiter abzubilden und danach mithilfe der Funktion „Auto Acquire“ regelmäßig ein Bild gemacht wird, wobei die Länge der Belichtung von der Stärke des Signals des Antikörpers abhängt.

Nach dem Speichern des Bildes auf dem die Banden am stärksten gefärbt sind ohne absolutes Schwarz zu erreichen, wird der Blot aus der kurz mit TBST gespült und entweder zur Verwahrung in TBST eingeschweißt oder vom Antikörper gestrippt um ein weiteres Protein zu messen.

Stripping von Antikörpern

Sollte ein weiteres Protein gemessen werden sollen, wird Stripping Lösung Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer auf die Membran gegossen, so dass sie gerade bedeckt ist. Daraufhin wird der Blot 15 Minuten lang unter schnellem Rütteln (200/min) in der Lösung gewaschen. Dann wird die Lösung abgegossen und die Membran wird einige Minuten lang mit TBST gewaschen, das dreimal erneuert wird. Dann wird der Schritt „Aufbringen der Antikörper und Belichtung“ wiederholt.

Auswertung der Ergebnisse

Die Bilder werden mit ImageJ geöffnet und mithilfe des „Rectangular“-Tools ein Bereich ausgewählt, der gerade eben so groß sein muss, dass jede Bande der einzelnen Proben in ihn hineinpasst. Dieser Bereich wird dann auf den Hintergrund gezogen. Dann wird die mittlere Helligkeit des Bereichs mit dem Befehl „Measure“ gemessen. Da das Programm mit einer Farbtiefe von 8 Bit S/W arbeitet, erfasst dieser Befehl die Helligkeit mit einem Wert zwischen 0 und 255. Da für die Auswertung des Western Blots nicht die Helligkeit sondern die Dunkelheit der Banden interessiert, wird der erfasste Wert von 255 abgezogen. Dann wird der markierte Bereich auf die jeweiligen Banden der Proben gezogen und für jede auf gleiche Weise die mediale Dunkelheit ermittelt. Die einzelnen Werte werden jetzt wiederum durch die Dunkelheit der Kontrolle dividiert um die relative Dunkelheit zu errechnen, die proportional zur relativen Proteinmenge ist. Um schließlich Fehler durch unregelmäßiges Auftragen zu nivellieren, werden die relativen Dunkelheiten des zu untersuchenden Proteins durch die relativen Dunkelheiten des Housekeeping Proteins GAPDH geteilt. Dieser Quotient der relativen Dunkelheiten ist gleichbedeutend mit der relativen Proteinkonzentration.

Oxygraph

Messprinzip

Bei bekannter Zellzahl, die in Suspension in einer konstanten Menge Medium vorliegt, kann in einem geschlossenen System über die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Medium pro Zeit auf die respiratorische Aktivität dieser Zellen geschlossen werden.

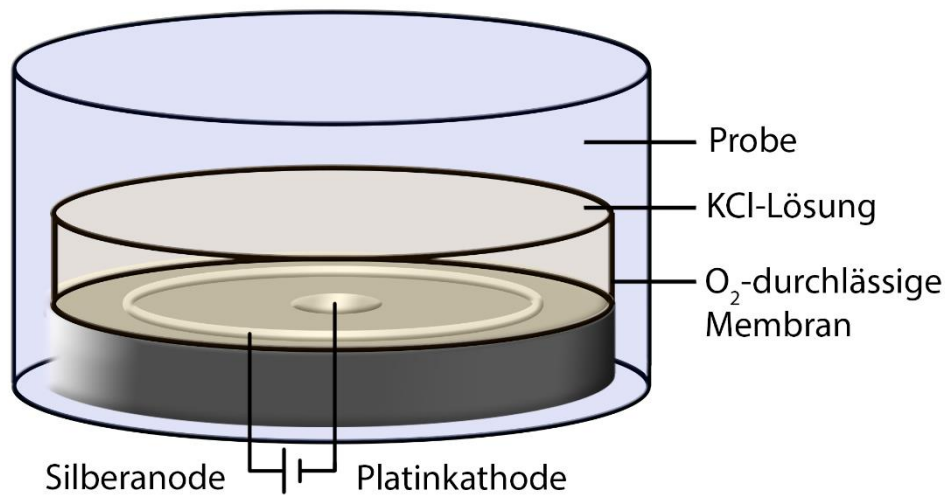


Abbildung 5: Aufbau der Clark-Elektrode

Der Oxygraph besteht aus einer Probenkammer variablen Volumens, die gegenüber der Umwelt gasundurchlässig abgedichtet ist und deren Temperatur durch Einbettung in ein Wasserbad reguliert ist. Unter der Probenkammer befindet sich ein Magnetrührer, so dass die Zellsuspension mithilfe eines Rührstäbchens stets in homogenem Zustand gehalten wird. Der Boden der Probenkammer besteht aus einer gasdurchlässigen Membran unter der sich in einer 50% gesättigten Kaliumchloridlösung eine Silberanode und eine Platinkathode befinden. Bei Vorhandensein von elementarem Sauerstoff wird dieser an der Platinkathode zunächst zu Wasserstoffperoxid und dann weiter zu Hydroxidionen reduziert. Der Elektronendonator für diese Reaktion ist das elementare Silber der Anode, das zu Silberchlorid oxidiert wird. Über die durch die Kaliumchloridlösung zur Verfügung gestellte Elektronenbrücke fließt so ein Strom, dessen Höhe aufgrund der übermäßig vorhandenen Silbermenge und der hochkonzentrierten Kaliumchloridlösung weitestgehend proportional zu der Sauerstoffkonzentration im Medium ist. Über eine Kalibrierung der Sonde mit sauerstofffreiem Wasser und Wasser, dessen Sauerstoffkonzentration bei bekanntem atmosphärischem Druck (1013,2 hPa) und bekannter Temperatur (37°C) mit der Umgebung äquilibriert ist, kann durch diese Proportionalität für jeden Stromfluss die dazugehörige Sauerstoffkonzentration ermittelt werden. Die Auswertung geschieht mithilfe des Programms Oxygraph Plus der Firma Hansatech Instruments.

Vorbereitung der Messung

Aufbau

Das die Messkammer temperierende Wasserbad wird auf 37°C erwärmt.

Der Boden der Messkammer hat die Form eines flachen Zylinders, besteht aus Plastik und lässt sich vom Rest der Kammer trennen. In die Mitte der Oberseite ragt ein Knopf, in dessen Mitte wiederum die Platinkathode eingelassen ist. Dieser Knopf ist von einem ringförmigen Graben umgeben, in den die kreisrunde Silberanode eingelassen ist. Zunächst wird ein großer Tropfen der Kaliumchloridlösung auf die Kathode und vier kleinere Tropfen im regelmäßigen Abstand zueinander auf die Anode aufgebracht. Dann wird ein Stück Zigarettenpapier zu einem Quadrat mit 2cm Seitenlänge zurechtgeschnitten, auf den Tropfen auf der Kathode gelegt und mit einem etwa gleich großen Stück PTFE-Membran zugedeckt, das sich aufgrund der Kapillarwirkung luftdicht an das Zigarettenpapier anlegt. Ein Gummiring wird dann über den Knopf geschoben und versiegelt ihn zum Graben hin. Bei diesen Schritten wird stets darauf geachtet, dass keine Luftblase unter die Membran gelangt. Daraufhin werden überstehende Membran und Zigarettenpapier mit einer Schere abgeschnitten, ein Gummiring um den Graben gelegt, dieser mit Kaliumchloridlösung befüllt und der ganze Boden an dem Rest der Messkammer befestigt. Alle Flüssigkeiten, die von nun an mit der Elektrode in Kontakt kommen, sind ebenfalls auf 37°C erwärmt um die Kammer nicht auszukühlen.

Die Kammer wird mehrmals mit aqua dest. gespült und bei eingeschaltetem Magnetrührer etwa eine halbe Stunde lang stehen gelassen, hierbei bilden sich Luftblasen an der Membran, die nach zehn Minuten abpipettiert werden. Nach einigen weiteren Minuten wird die Membran auf weitere Luftblasen untersucht. Ihr Auftreten spricht für eine Undichtigkeit der Membran und macht einen Neuaufbau der Messkammer notwendig. Wenn keine Luftblasen Auftreten kann der nächste Schritt erfolgen.

Kalibrierung der Elektrode

Aqua dest. wird offen in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt, um bezüglich des Sauerstoffgehalts in ein Äquilibrium mit der Luft zu treten. Daraufhin wird 1 ml des Wassers in die Messkammer gegeben. Nach zwei Minuten wird die Kammer verschlossen und die Kalibrierung automatisiert gestartet, wobei das Gerät den Ausgangswert für die Sauerstoffsättigung ermittelt. Methodenbedingt wird dieser Wert nicht sofort erreicht, sondern der gemessene Wert nähert sich asymptotisch dem Endwert an. Wenn die Steigung des gemessenen Werts im methodenbedingten Grundrauschen untergeht, ist die Kalibrierung für den Ausgangswert abgeschlossen.

Wird dieser nicht innerhalb von drei Minuten erreicht, muss ein fehlerhafter Aufbau angenommen werden und die Messkammer muss erneut aufgebaut werden. Bei korrektem Aufbau wird nach der Kalibrierung für den Ausgangswert die Kammer geöffnet und reiner Stickstoff in das Wasser eingeleitet, so dass der Sauerstoff aus dem Wasser diffundiert. Der Reststrom, der nun nach dem Erreichen des Äquilibriums fließt, wird vom Gerät dem Wert für 0% Sauerstoffsättigung zugeordnet und programmintern von allen anderen Werten abgezogen. Als letzter Qualitätstest des Aufbaus wird nun das Medium, in dem später die Zellen gemessen werden, in unserem Fall DMEM mit einer Glucosekonzentration von 150mg/dl (im Folgenden als DMEM(150) bezeichnet), in die Messkammer gegeben, diese nach zwei Minuten verschlossen und die Messung begonnen. Hier sollte – analog zum ersten Kalibrierungsschritt eine asymptotische Annäherung an einen Wert erfolgen, die bestenfalls nach kurzer Zeit im Grundrauschen untergehen sollte. Allenfalls ein minimaler linearer

Abfall kann geduldet werden, für den in der Auswertung der Ergebnisse aufwändig korrigiert werden muss (s.u.). Wenn die Änderung der Sauerstoffsättigung über die Zeit innerhalb von drei Minuten nach Beginn der Messung kein akzeptables Maß erreicht, muss die Elektrode erneut aufgebaut werden.

Durchführung

Die Durchführung der Vereinzelung der Zellen hat sich im Verlauf der Experimentreihe geändert, weil Vorexperimente den Verdacht nahelegten, das standardmäßig zur Ablösung der Zellen von der Zellschale verwendete Trypsin könne einen Einfluss auf den Effekt von T₁AM haben. Daher sind die Zellen für die zeitlich früheren Experimente zu der Wirkung von T₂ und T₃ mit Trypsin abgelöst, die Zellen für die T₁AM Experimente hingegen mit einem Cell-Scraper von der Platte gelöst worden. Im Folgenden werden beide Schritte beschrieben. Sofern nicht anders angegeben, sind alle in den folgenden Schritten aufgeführten Medien und Flüssigkeiten zuvor in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt worden.

Trypsinierung

Die in ø10 cm-Schalen wachsenden Zellen werden dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen, wonach möglichst das gesamte PBS abgekippt wird. Dann werden 500 µl Trypsin auf die Zellen gegeben und die Schale 2 Minuten lang im Brutschrank inkubiert, bevor die Reaktion mit 5 ml PM abgestoppt wird. Dann werden die Zellen in ein 15 ml-Sarstedt-Röhrchen überführt und die Zellsuspension wird bei 2500rpm über drei Minuten zentrifugiert, wobei sich ein Zellpellet bildet. Das Medium im Überstand wird vorsichtig abgekippt, der Flüssigkeitsrest wird abpipettiert. Daraufhin wird das Zellpellet in 250 µl DMEM (150) aufgenommen und mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert. Hierbei ist ebenso wie für alle Schritte, in der die Zellen vereinzelt werden sollen, eine Pipettenspitze mit weitem Lumen (für ein Volumen von min. 1 ml) zu wählen, da die Fettzellen über eine vergleichsweise labile Membran verfügen, was die Resuspendierung und Vereinzelung der Zellen zu einem kritischen Schritt macht.

Scraping (T₁AM Experimente)

Die in ø10cm-Schalen wachsenden Zellen werden dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen, wonach möglichst das gesamte PBS abgekippt wird. Dann werden 250 µl DMEM(150) auf die Zellen gegeben, woraufhin die Zellen unter Schräghalten der Schale mit einem Cell-Scraper vom Untergrund gelöst werden und anschließend mit einer Pipette mehrfach durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden.

Messung

100 µl dieser Zellen werden in die Messkammer gegeben, wo bereits seit zwei Minuten 900 µl DMEM(150) vorgelegt sind. Um eine gleichmäßige Verteilung von Zellen und Sauerstoff zu erzielen wird der Magnetrührer auf 50 eingestellt, die Messkammer verschlossen und die Messung über 8 Minuten gestartet. Für die spätere Auswertung wird der Sauerstoffverbrauch nach 180 Sekunden und 480 Sekunden gemessen. Während dieser Zeit fällt der Sauerstoffgehalt im Medium bei richtig gewählter Zellkonzentration linear ab. In seltenen Fällen, wenn die Zellatmung zu schnell war und der lineare Bereich der Atmung aufgrund von Sauerstoffdepletion innerhalb von 480 Sekunden verlassen wurde, wurde der Endzeitpunkt der Messung in den linearen Bereich vorgezogen und die nachfolgenden Berechnungen dementsprechend adjustiert. Über das Steigungsdreieck der Sauerstoffkonzentration zwischen der 180. und 480. Sekunde kann der Sauerstoffverbrauch in nmolO₂/ml/min angegeben werden. Alle Proben müssen im gleichen zeitlichen Abstand zueinander gemessen werden. In demselben Abstand vor der ersten und nach der letzten Messung wird eine

Messung von DMEM(150) ohne Zellen durchgeführt ($DMEM_{Anfang}$ und $DMEM_{Ende}$). Diese Werte sind notwendig, da die berechnete Sauerstoffkonzentration im Medium auch ohne Zellen leicht abnimmt. Aus diesen Nullwerten, die am Anfang und am Ende gemessen werden, kann der von den Zellen unabhängige systembedingte Abfall der Sauerstoffkonzentration für die dazwischen liegenden Messungen approximiert werden.

Nach den einzelnen Messungen werden einige Mikroliter aus der Messkammer in eine Neubauer-Zählkammer überführt und dort gemessen. Die Zellzahl pro Milliliter sei Z .

Auswertung

Es soll die relative respiratorische Aktivität pro Zelle bezogen auf nichtstimulierte Zellen ermittelt werden. Das geschieht wie folgt:

Es sei $\Delta[\text{Name der Messung}]$ die gemessene Abnahme des Sauerstoffs im Medium im beobachteten Zeitintervall t . Zudem sei n die Gesamtzahl der Messungen in einem Experiment, $DMEM_{Anfang}$ und $DMEM_{Ende}$ mitgezählt. Weiterhin gebe i an, an welcher Stelle die entsprechende Messung durchgeführt wurde: $[i(DMEM_{Anfang}) = 0, i(\text{Messung 1}) = 1, i(\text{Messung 2}) = 2, \dots, i(\text{Messung } n - 1) = n - 1, i(DMEM_{Ende}) = n]$.

Da sich $\Delta DMEM_{Anfang}$ und $\Delta DMEM_{Ende}$ unterscheiden (typischerweise ist das Δ zu Beginn des Messzyklus höher), ist es notwendig, muss jede Einzelmessung mit einem für sie spezifischen Δ -Wert korrigiert werden, der von der Stelle im Messzyklus i abhängt. Dieser systembedingte, zellunabhängige Sauerstoffabfall sei $\Delta_0(i)$. Für eine kleine Anzahl n ist $\Delta_0(i)$ im Verlauf des Experiments näherungsweise linear.

$\Delta_0(i)$ lässt sich dann berechnen als:

$$\Delta_0(i) = \Delta(DMEM_{Anfang}) + \frac{(\Delta(DMEM_{Ende}) - \Delta(DMEM_{Anfang})) \cdot i}{n}$$

Aus dem gemessenen Abfall der Sauerstoffkonzentration der Messung i in der betrachteten Zeit $\Delta(i)$ lässt sich durch Abzug von $\Delta_0(i)$ der bereinigte Abfall der Sauerstoffkonzentration $\delta(i)$ berechnen:

$$\delta(i) = \Delta(i) - \Delta_0(i)$$

Der bereinigte Abfall pro gemessener Zeit t sei $\dot{\delta}(i)$ und berechnet sich dementsprechend als:

$$\dot{\delta}(i) = \frac{\delta(i)}{t}$$

Der Sauerstoffkonzentrationsabfall pro Zeit pro Zelle $\delta_Z(i)$ errechnet sich bei der gemessenen Zellzahl Z aus

$$\delta_Z(i) = \dot{\delta}(i) / Z$$

Für die relativen Änderungen $\dot{\delta}_R(i)$ werden alle erhaltenen Werte durch die jeweilige Kontrolle mit dem Lösungsmittel des Stimulans $\delta_Z(C)$ geteilt.

$$\delta_R(i) = \frac{\delta_Z(i)}{\delta_Z(C)}$$

Zur statistischen Auswertung werden der Mittelwert \bar{x} , der Standardfehler **SE** und der **p**-Wert mittels eines zweiseitigen gepaarten T-Tests errechnet.

Oxoplate

Messprinzip

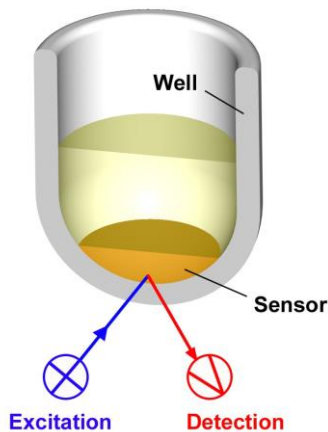


Abbildung 6: Messprinzip der Oxoplate

Die Oxoplate ist eine 96-Well Platte, in deren Boden ein Sensor eingelassen ist, der den Sauerstoffgehalt über eine enzymatische Reaktion misst. Der Sensor besteht aus einem dünnen Polymerfilm, in dem sich zwei verschiedene Farbstoffe befinden, der Indikatorfarbstoff und der Referenzfarbstoff. Die Phosphoreszenz des Indikatorfarbstoffs I_{ind} (Anregung bei 540nm, Emission bei 650nm) ist abhängig vom Sauerstoffgehalt im Medium, die Phosphoreszenz des Referenzfarbstoffs I_{ref} (Anregung bei 540nm, Emission bei 590nm) ist unabhängig vom Sauerstoffgehalt. Aus dem Verhältnis der beiden Intensitäten I_R kann so ein Wert gebildet werden, mit dessen Hilfe der Sauerstoffgehalt im Medium errechnet werden kann.

$$I_R = \frac{I_{ind}}{I_{ref}}$$

Die Intensität von I_R korreliert linear mit dem Sauerstoffgehalt im Medium, so dass eine Zweipunktkalibration durch Medium mit 0% und 100% Sauerstoffsättigung es ermöglicht, die Sauerstoffsättigung in den anderen Wells der Platte zu errechnen.

Durchführung

Herstellung der Kalibrationslösungen

Zunächst werden die Kalibrationslösungen mit 100% gesättigtem Wasser (cal_{100}) und 0% gesättigtem Wasser (cal_0) hergestellt. Für die Herstellung von cal_{100} werden 20ml aqua dest. in ein 50ml Sarstedt-Röhrchen gegeben, dieses verschlossen und zwei Minuten lang kräftig geschüttelt. Dann wird die Kappe abgeschraubt, das Röhrchen eine Minute lang stehen gelassen um eine Übersättigung zu vermeiden und dann wieder verschlossen. Für die Herstellung von cal_0 werden 0,15g Natriumsulfit (Na_2SO_3) in 15ml aqua dest. in ein 15ml Sarstedt-Röhrchen gegeben und dieses verschlossen, bevor das Natriumsulfit darin vollständig gelöst wird. Über eine chemische Reaktion wird dem Wasser so der Sauerstoff vollständig entzogen. Übermäßig vorhandenes Natriumsulfit kann zudem auch eine gewisse Menge von im Verlauf des Experimentes in das Wasser gelangendem Sauerstoff binden, so dass eine 0%ige Sättigung bei der Messung auch nach Überführen des Wassers auf die Platte gewährleistet ist.

Vorbereitung

Alle ab diesem Zeitpunkt verwendeten Medien sind auf 37°C erwärmt. Auch sobald sie in andere Gefäße überführt werden ist darauf zu achten, dass sie nur so kurz wie möglich der Raumtemperatur ausgesetzt sind und bei Nichtgebrauch in den Brut- oder Wärmeschrank zurückgestellt werden.

In Eppendorf-Gefäße werden 950µl DMEM(150) gefüllt. Aus diesen Röhrcchen erfolgt später die Zellzählung (Im Folgenden wird das Röhrcchen als *Zählröhrcchen bezeichnet*).

Es werden Medien angesetzt, die so zusammengesetzt sind wie die Medien, die zu dem Zeitpunkt auch in den zu messenden Zellschalen sind (DMEM(150) + jeweiliges Stimulans). In Eppendorf-Gefäße werden je 750µl des jeweiligen Mediums vorgelegt. Diese Röhrcchen werden im Folgenden als *Lagerröhrcchen* bezeichnet.

Das Medium wird aus den Zellschalen abgegossen, diese abgeschraped und das Zellsuspensat in die jeweiligen *Lagerröhrcchen* überführt, wo sie mit einer blauen Eppendorfpipette (1000µl) durch fünfmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt werden. Aus den *Lagerröhrcchen* werden nun je 50µl Zellsuspensat entnommen und in die *Zählröhrcchen* mit 950µl DMEM(150) überführt. Dort wird die Suspension durch behutsames Anschnappen des *Zählröhrcchens* gemischt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer gemessen.

Aus der in einem Quadranten der Zählkammer gemessenen Zahl Z kann die Zellkonzentration c in den *Lagerröhrcchen* nun mithilfe der Formel

$$c = Z * 20 * 10.000 * ml^{-1}$$

berechnet werden. In die Oxoplate werden später 500.000 Zellen eingefüllt, wobei in ein einzelnes Well 280µl Zellsuspension eingefüllt werden. Zum Herstellen der richtigen Konzentration für das Oxoplate-Well werden 1600µl einer Zellsuspension wie folgt in einem neuen Röhrcchen (*Oxoplate-Röhrcchen*) angelegt:

Das benötigte Volumen Zellsuspension, die aus dem *Lagerröhrcchen* in das *Oxoplate-Röhrcchen* überführt wird (V_L), errechnet sich aus:

$$V_L = \frac{1600\mu l * 500.000}{c * 280\mu l}$$

Das *Oxoplate-Röhrcchen* wird daraufhin mit $1600\mu l - V_L$ des entsprechenden Mediums aufgefüllt.

Messung

Am Fluoreszenzmesser werden dann jeweils Fünffachwerte gemessen, wobei in die Probenwells je 280µl aus dem *Oxoplate-Röhrchen* eingefüllt werden.

Daraufhin wird die Platte 15 Minuten lang bei 37°C im Messgerät bei offenem Deckel inkubiert. Dann werden in zwei Wells 250µl *cal100* und in zwei weitere Wells 300µl *calo* pipettiert und der Deckel wird geschlossen. Nun wird die Messung mit folgenden Einstellungen gestartet:

Programm	FLUOSTAR Optima
Temperature	37°C
Microplate	GREINER 216002 g6
Positioning delay	0.2
No. of kinetic windows	1
No. of cycles	120 (oder so viele, wie für 50min Messung benötigt)
Measurement start time	0
No. of flashes per well and cycle	1
Cycle time	40s (oder so gering wie möglich)
Filters and Integration	Fluorescence Intensity
No. of multichromatics	2
Excitation filter	540
Emission filter 1	640
Emission filter 2	590
Well Scanning	None
Pause before cycle	0
Gain	1801

Tabelle 8: Einstellungen für die Fluoreszenzmessung

Auswertung

Zunächst wird der Quotient ϵ aus der Emission der O₂-Spezifischen Wellenlänge und der Emission der Normalisierungswellenlänge für jeden Zeitpunkt gebildet.

$$\epsilon(t) = \frac{\epsilon_{ind}(t)}{\epsilon_{ref}(t)}$$

Um nun aus $\epsilon(t)$ die prozentuale Sauerstoffsättigung $S(t)$ zu errechnen, wird zunächst für jeden Zeitpunkt t mithilfe der o.g. Formel das $\epsilon(t)$ für *calo* und *cal100* errechnet. Aus diesen werden dann für jeden Zeitpunkt die Mittelwerte $\epsilon_0(t)$ und $\epsilon_{100}(t)$ gebildet.

Dann wird zur Berechnung von $S(t)$ für die Proben die folgende Formel verwendet:

$$S(t) = \left[\left(\frac{\epsilon_0(t)}{\epsilon(t)} - 1 \right) / \left(\frac{\epsilon_0(t)}{\epsilon_{100}(t)} - 1 \right) \right] * 100\%$$

Daraufhin wird für jeden Zeitpunkt der Sauerstoffsättigungsabfall über 6 Minuten errechnet. Die Länge von 6 Minuten wurde gewählt, weil sie in etwa der Messzeit des Oxographen entspricht, ausreichend lang ist, um im Folgenden nicht zu sehr durch artifizielle Sauerstoffkonzentrationschwankungen beeinflusst zu werden und gleichzeitig kurz genug ist, um Unterschiede im Sauerstoffverbrauch am Wendepunkt der Sauerstoffkonzentrationskurve zu zeigen.

Es sei $\Delta(t)$ die gemessene Abnahme des Sauerstoffs im Medium vom Zeitpunkt t an über 6 Minuten. Es berechnet sich als

$$\Delta(t) = S(t) - S(t + 6min).$$

Um die Streuung der Einzelmessungen zu minimieren, wird nun ein geglätteter Wert $\Delta_G(t)$ aus jedem $\Delta(t)$ dadurch gebildet, dass der Median aus $\Delta(t)$ und seinen beiden angrenzenden Zyklen gebildet wird. Es sei c die Zykluslänge. Dann ist $\Delta_G(t)$:

$$\Delta_G(t) := \text{MEDIAN}(\Delta(t - c), \Delta(t), \Delta(t + c))$$

Der Wendepunkt einer Funktion $f(t)$ ist erreicht, wenn $\ddot{f}(t) = 0$ ist, was bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt $|\dot{f}(t)|$ sein Maximum erreicht hat. Da die Abstände zwischen den einzelnen Zyklen konstant sind, ist der Wendepunkt in guter Näherung also zu dem Zeitpunkt erreicht, an dem $|\Delta_G(t)|$ sein Maximum erreicht hat. Um nun den Wert von $\Delta_G(t)$ am Wendepunkt zu ermitteln, wird für jede Probe das Maximum von $|\Delta_G(t)|$ über die gesamte Messzeit ermittelt. Um sicher zu gehen, dass keine Verfälschungen durch Artefakte aufgetreten sind, wird der ermittelte Zeitpunkt mit dem optischen Eindruck des Graphen abgeglichen. Dann wird der Median der Mehrfachwerte δ von $|\Delta_G(t)|$ gebildet.

Zuletzt werden alle Werte auf ihre Kontrollen normiert, um den relativen Sauerstoffverbrauch (δ_{rel}) zu erhalten.

$$\delta_{rel} = \frac{\delta_{Probe}}{\delta_{Kontrolle}}$$

Zur statistischen Auswertung werden der Mittelwert \bar{x} , der Standardfehler SE und der p -Wert mittels eines zweiseitigen gepaarten T-Tests errechnet.

FACS

Nachdem die Zellen in üblicher Weise differenziert und stimuliert wurden, werden die Zellen mit 500µl Trypsin abgelöst. Daraufhin werden die Zellen in 4,5 ml Grundmedium aufgenommen. Die Konzentration der Zellen wird mittels Neubauer Zählkammer ermittelt und über einen Dreisatz werden daraufhin 100.000 Zellen in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Dieses wird bei 595 G 3 Minuten lang zentrifugiert. Daraufhin wird das Pellet in einer JC-1 / DMEM Mischung der Konzentration 10 µg/ml resuspendiert. Hierdurch werden die Zellen gefärbt, wozu man sie bei 37°C 7 Minuten lang inkubiert. Dann wird das Suspensat mit einem Zellfilter der Porengröße 100 µm filtriert und mit PE- und FITC-Filter am FACS-Gerät gemessen.

Die Messung erfolgte mit einem FACS Aria III und der Nozzle-Größe 100µm mit einem Druck von 20 psi.

Die Signale, die im Forward-Sideward-Scatter einen niedrigen Wert haben, entsprechen am ehesten Zelldetritus und werden aus der Messpopulation ausgeschlossen. Der FITC-Kanal entspricht dem JC-1 Monomer (erhöht bei mitochondrialer Depolarisation) und der PE-Kanal dem JC-1 Polymer (erhöht bei mitochondrialer Polarisation). Der Quotient des Mittelwerts von PE und FITC ist also ein Maß für die Polarisation des Mitochondriums. In der weiteren Berechnung werden alle PE/FITC-Quotienten auf die Kontrolle bezogen, die auf 100% gesetzt wird.

Zur statistischen Auswertung werden der Mittelwert \bar{x} , der Standardfehler **SE** und der **p**-Wert mittels eines zweiseitigen gepaarten T-Tests errechnet.

Elektronenmikroskopie

Zur Erfassung einer möglichen strukturellen Änderung in der Morphologie der Mitochondrien, die sich auf rein quantitativer Proteinebene nicht beschreiben ließe, erfassten wir die Mitochondrien von BAT elektronenmikroskopisch.

Um einen maximalen Effekt auf die Zellen zu beobachten, wurden die Zellen einen Tag vor der Fixierung supramaximal mit T₃ (300nM), T₂ (300nM) und T₁AM (10µM) stimuliert. Daraufhin erfolgte eine Fixierung nach „Monti-Graziadei“, hierzu wurden die Zellen zunächst eine halbe Stunde in 0,06 molarem Natrium-Cacodylatpuffer (2% Glutaraldehyd, 0,6% Paraformaldehyd, 0,03 Calciumchlorid) gespült, für etwa zwei Stunden in 2% Osmiumtetroxid osmiert, daraufhin wieder eine halbe Stunde in Natrium-Cacodylatpuffer gespült und daraufhin stufenweise in Wasser mit steigendem Ethanolanteil entwässert (30,40,50,60,70,80,90,100,100,100%), wobei die Zellen jeweils etwa eine halbe Stunde in jeder Stufe verblieben. Die Zellen wurden daraufhin für eine Stunde auf Propylenoxid (als Zwischenmedium) gesetzt und daraufhin zwei Tage bei 60°C auf Araldit, einem 2-Komponenten Epoxydharz zum Aushärten gebracht. Daraufhin wurde der ausgehärtete Block am „Ultracut E“ der Firma Leica mit einem Diamantmesser in der Schnittdicke ca 70-90nm geschnitten. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit dem Kontrastierautomat EM AC20 der Firma Leica (Kontrastierzeiten: 0,5% Uranylacetat 30 min. bei 40°C, 3% Bleicitrat 7 min. bei 20°C), das Auswerten der Schnitte erfolgte am Elektronenmikroskop JEM-1011 der Firma Jeol mit einer Vergrößerung von 1:50.000 und 1:20.000. Die Einbettung wie oben beschrieben erfolgte freundlicherweise durch die Kollegen des Instituts für Anatomie.

Es handelt sich bei der Auswertung der Bilder explizit nur um eine qualitative optische Kontrolle von Struktur und Anzahl der Mitochondrien. Aufgrund der niedrigen Probenzahl ist eine quantitative Auswertung wenig zielführend, so dass durch unsere Messungen bestenfalls sehr deutliche Veränderungen von mitochondrialer Struktur oder Menge offenbar geworden wäre.

Glucoseverbrauchsmessung:

Für T₃ und T₂ wurde in DMEM Medium mit einer Glucosekonzentration von 9,95 mmol/l jeweils in der Konzentration von 300 nM eine Stimulation über 2 und 24 Stunden durchgeführt. Daraufhin wurden 2,5 ml des Überstands der Zellschale in ein Fluorid-Röhrchen von Sarstedt überführt und im Zentrallabor des UKSH Campus Lübeck auf die Glucosekonzentration untersucht. Über die Formel

$$\frac{9,95 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} - \text{Endkonzentration}(\text{Analyt})}{9,95 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} - \text{Endkonzentration}(\text{Kontrolle})}$$

kann der Glucoseverbrauch relativ zur Kontrolle ermittelt werden.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme Microsoft Excel und R Studio. Es wurde bei normalverteilten Daten eine univariate Varianzanalyse mit repeated measure ANOVA Test durchgeführt. Die post-hoc Analyse erfolgte mithilfe des Tukey-Reichweitentests. Die angegebenen p-Werte entsprechen den Überschreitungswahrscheinlichkeiten für den Tukey-Test im Vergleich zur

Kontrolle. Wenn nicht explizit in den Ergebnissen angegeben, erreichen die p-Werte für den Vergleich vom 2h zum 24h Wert kein Signifikanzniveau von $\alpha < 0.05$.

Jedes n entspricht einer unabhängigen Charge Zellen, die jeweils in separaten Zellkulturschalen aufgezogen wurden und erst am Ende der Differenzierung im Rahmen der Stimulation mit den Schilddrüsenhormonen unterschiedlich behandelt werden. Es finden keine Messwiederholungen statt. Da jede Charge gemeinsam aufgezogen wurde und sich gegenüber den anderen Chargen in einigen Eigenschaften unterscheiden kann (unterschiedliche Grundplatte, Alter, Passagezeitpunkt, Zeitpunkt der Wechsel der Medien, Temperatur im Brutschrank, Zusammensetzung des Mediums etc), werden die Ergebnisse innerhalb einer Charge als abhängige Variablen betrachtet, so dass bei der Durchführung von t-Tests ein gepaarter Test verwendet wird.

Die Oxoplate-Auswertung für T₁AM mit jeweils nur Kontrollkondition und 2h Kondition erfolgte mithilfe eines zweiseitigen gepaarten t-Tests.

Die Darstellung der Werte erfolgt über den Median mit Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse sind definiert durch einen p-Wert von < 0.05 , hochsignifikante Ergebnisse ab einem p-Wert < 0.01 .

Ergebnisse

T₃

Mitochondriale Ultrastruktur und Masse

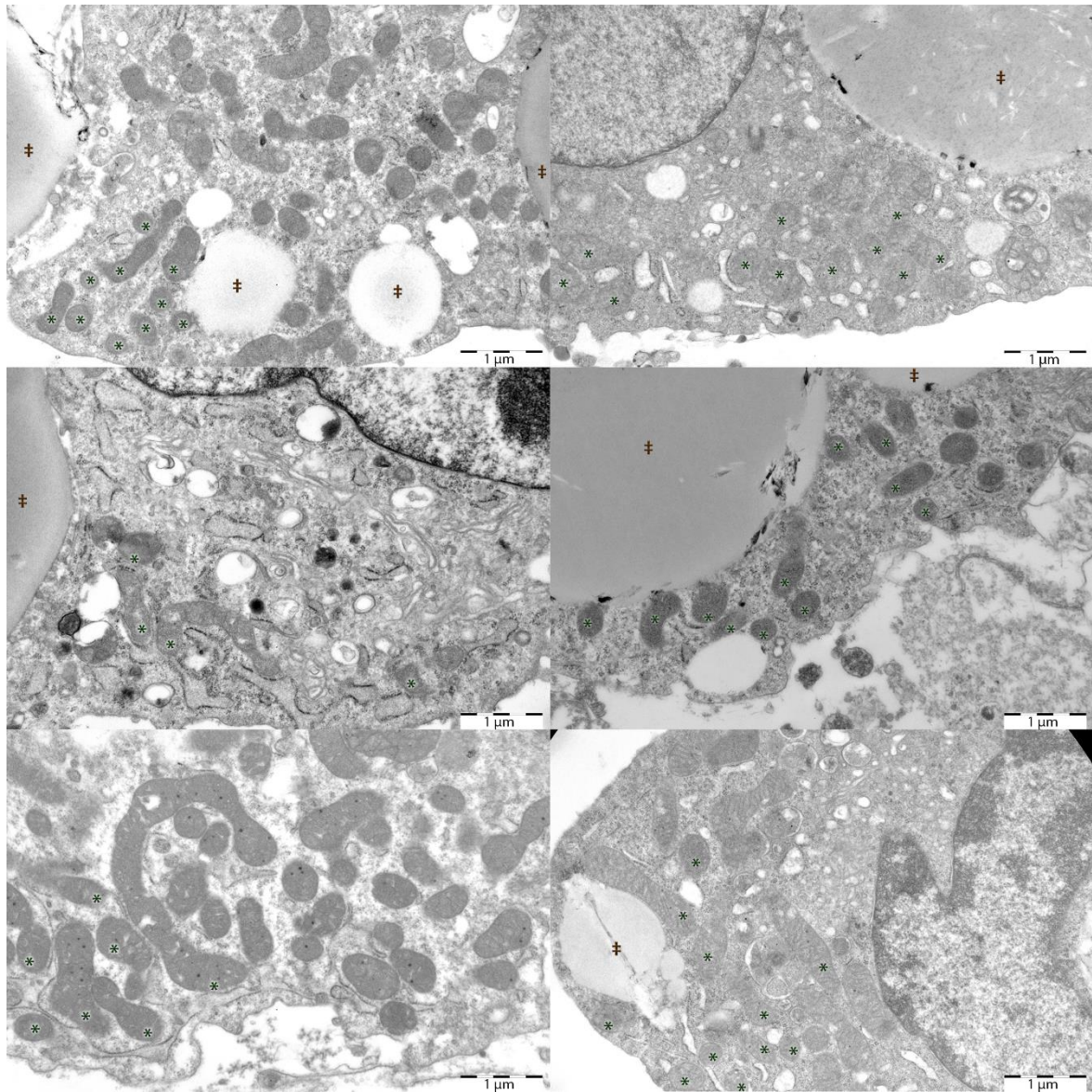


Abbildung 7: T₃ – EM-Bilder (links: Kontrollen, rechts: Stimulation mit 300 nmol T₃ über 24h, * Mitochondrien, Fettvakuolen, jeweils exemplarisch.)

#

Es lässt sich weder in Bezug auf Dichte, Größe und Form der Mitochondrien, noch bei der Betrachtung ihrer Ultrastruktur ein Unterschied zwischen der Kontrolle und den über 24 Stunden mit T₃ (300 nM) stimulierten Zellen ausmachen. Aufgrund der bereits optisch hohen Varianz der Anzahl der Mitochondrien in den einzelnen Schnitten sowohl was Form als auch Anzahl betrifft, selbst innerhalb der gleichen Charge wurde auf eine weitere quantitative Auswertung verzichtet.

Western Blot

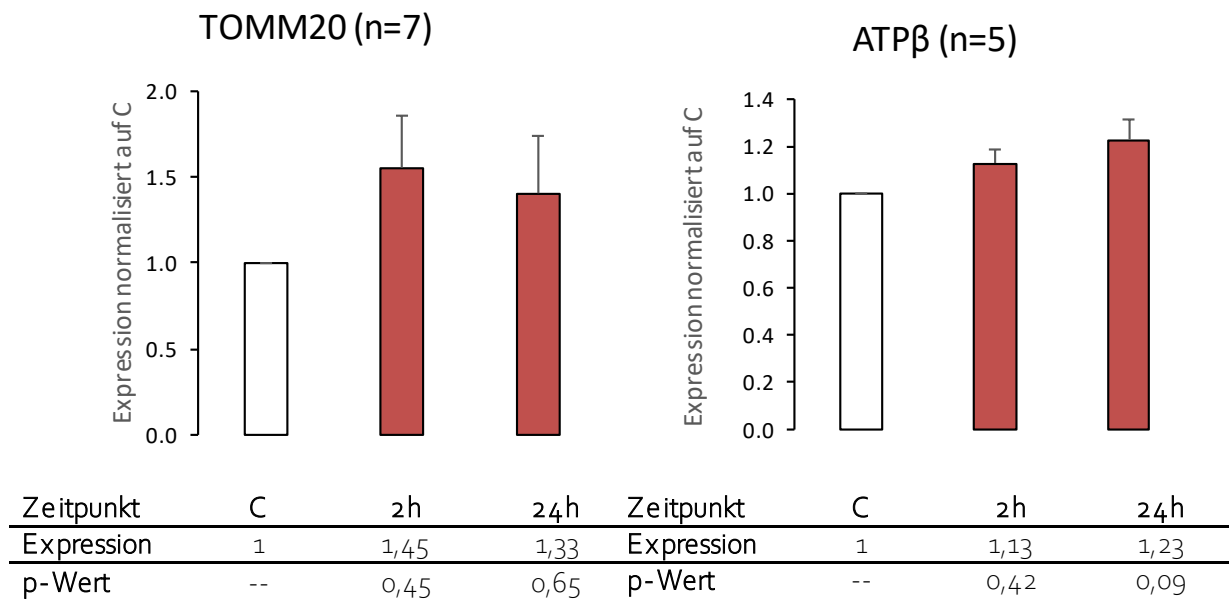


Abbildung 8: TOMM20 Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Abbildung 9: ATPβ Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Passend zu der bildmorphologisch unveränderten Masse und Struktur zeigt sich auch in der Konzentration der Marker für mitochondriale Masse TOMM20 und ATPβ keine signifikante Änderung im Beobachtungszeitraum von 2 und 24 Stunden.

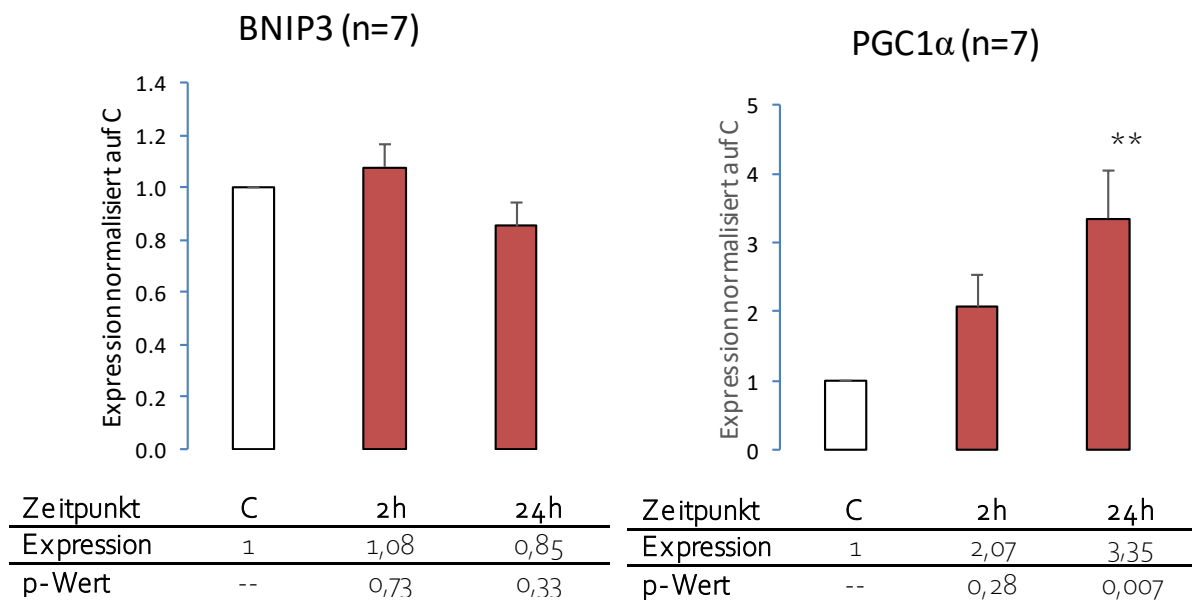
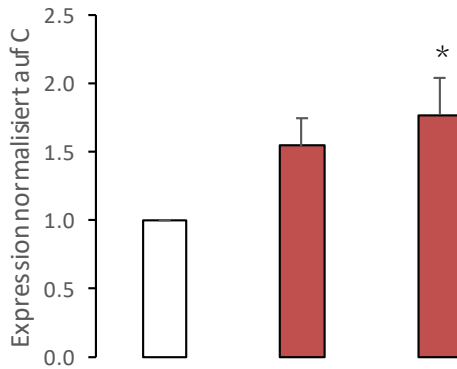


Abbildung 10: BNIP3 Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Abbildung 11: PGC1α Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Eine Regulation der mitochondrialen Autophagie durch T₃ kann im Beobachtungszeitraum nicht festgestellt werden. Konkordant zu Vorexperimenten zeigt sich nach 24 Stunden Stimulation eine Regulation von PGC1α durch T₃. Die Konzentration steigt hochsignifikant auf die über dreifache Konzentration an, was eine nachfolgende Regulierung von UCP1 vermuten lässt. Bereits nach 2 Stunden zeichnet sich ein Trend zum Anstieg ab.

UCP1 (n=9)



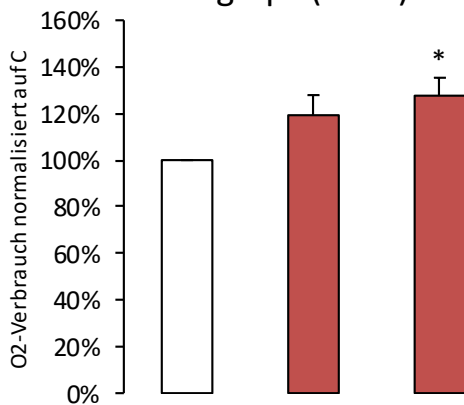
Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	1,54	1,77
p-Wert	--	0,086	0,011

Abbildung 12: UCP1 Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Die Expression von UCP-1 steigt nach 24h signifikant auf 177% an. Bereits nach 2h lässt sich ein Trend zum Anstieg beobachten.

Sauerstoffverbrauch

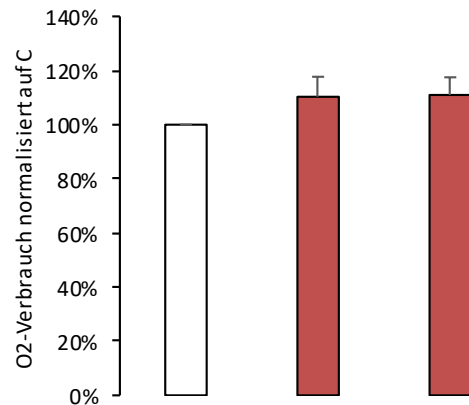
Oxograph (n=10)



Zeitpunkt	C	2h	24h
O ₂ -Verbrauch	100%	119%	128%
p-Wert	--	0.12	0.018

Abbildung 13: Sauerstoffverbrauch im Oxograph nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Oxoplate (n=11)



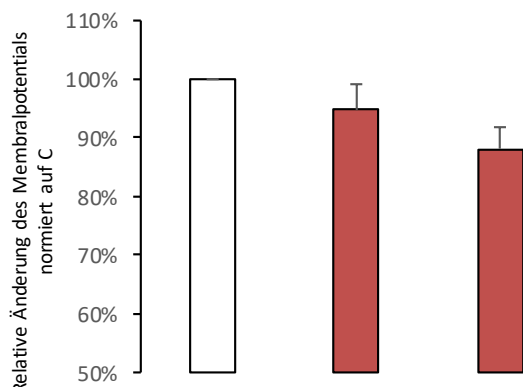
Zeitpunkt	C	2h	24h
O ₂ -Verbrauch	100%	110%	111%
p-Wert	--	0.35	0.30

Abbildung 14: Sauerstoffverbrauch in der Oxoplate nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Der Sauerstoffverbrauch steigt nach Stimulation im Oxographen (Methode nach Clark) nach einer 24-stündigen Stimulation mit T₃ signifikant auf 128% an. Es zeigt sich bereits nach 2h ein leichter Trend zum Anstieg. Bei der Messung mithilfe der Oxoplate wurden aufgrund hoher Streuung der Einzelwerte keine Signifikanzen erreicht, die Messwerte zeigen aber etwa eine ähnliche Tendenz wie bei Messung mit Clark-Elektrode.

Membranpotential (JC-1 Assay)

JC-1 (n=6)



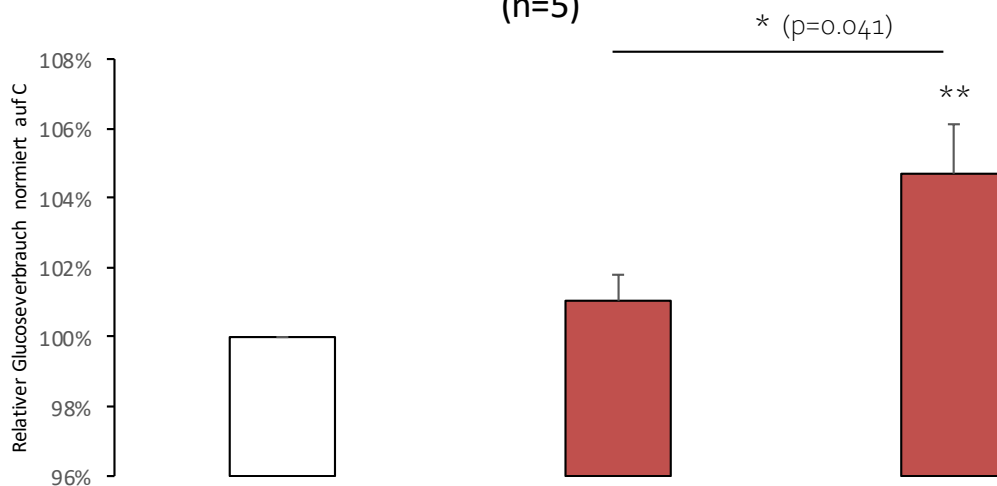
Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	0.97	0.88
p-Wert	--	0.37	0.06

Abbildung 15: relative Änderung des Membranpotentials im JC-1-Assay nach Stimulation mit 300 nmol T₃ nach 2h und 24h

Im JC-1 Assay zeigt sich nach 24h ein tendenziell sinkendes Membranpotential.

Glucoseverbrauch

Rel. Glucoseverbrauch (n=5)



Zeitpunkt	C	2h	24h
Glucoseverbrauch	1	101%	105%
p-Wert	--	0.23	0.0097

Abbildung 16: Glucoseverbrauchsmessung nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Nach 24h Stimulation mit T₃ lässt sich eine Zunahme des Glucoseverbrauchs sowohl im Verhältnis zur nicht stimulierten Kontrolle (hochsignifikant) als auch zur Stimulation mit T₃ über 2h nachweisen.

T₂

Mitochondriale Ultrastruktur und Masse

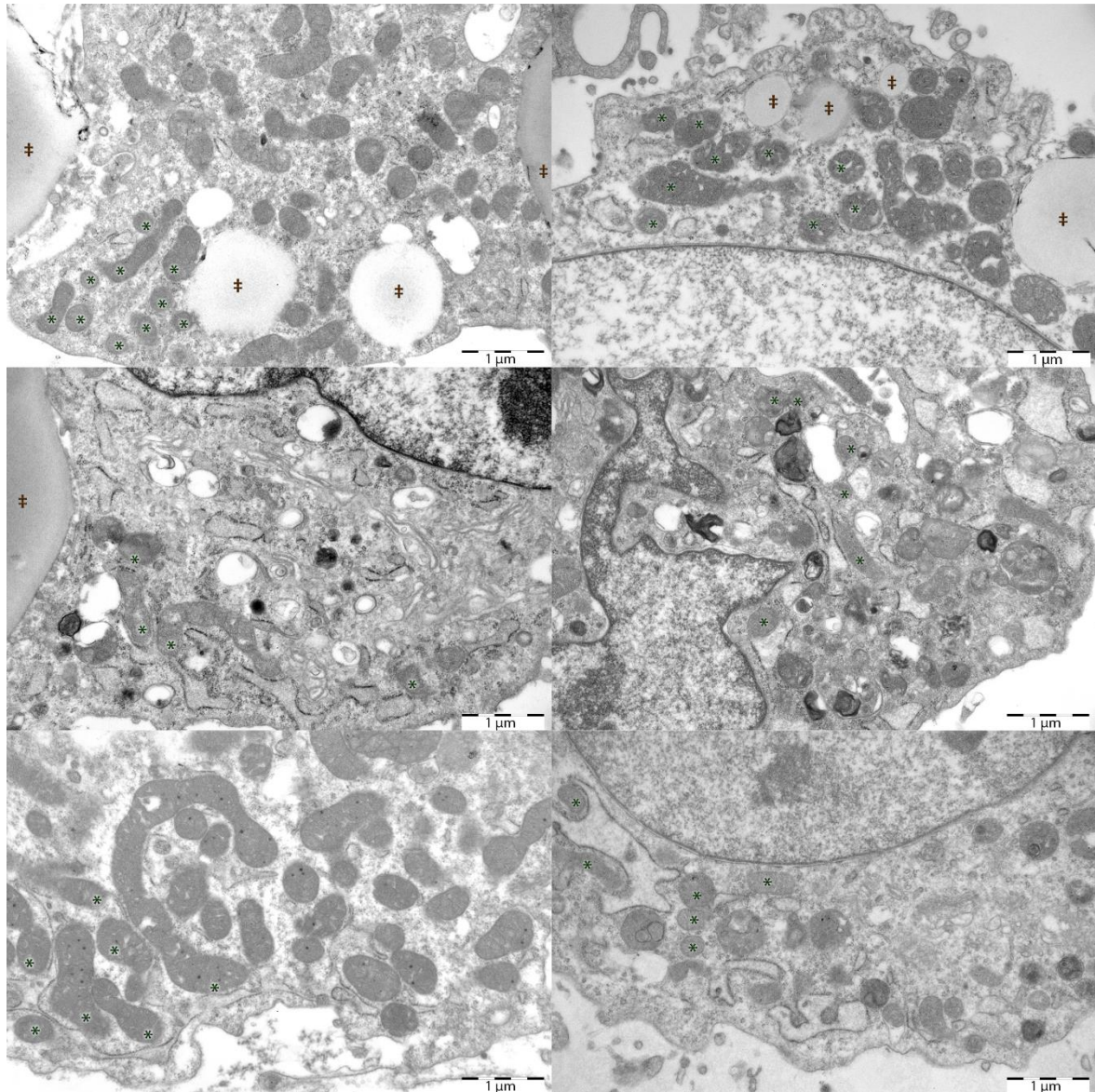


Abbildung 17: T₂ –EM-Bild (links: Kontrollen, rechts: Stimulation mit 300 nmol T₂ über 24h, * Mitochondrien, Fettvakuolen, jeweils exemplarisch.)

#

Es lässt sich weder in Bezug auf Dichte, Größe und Form der Mitochondrien, noch bei der Betrachtung ihrer Ultrastruktur ein Unterschied zwischen der Kontrolle und den über 24 Stunden mit T₂ (300nM) stimulierten Zellen ausmachen. Aufgrund der bereits optisch hohen Varianz der Anzahl der Mitochondrien in den einzelnen Schnitten sowohl was Form als auch Anzahl betrifft, selbst innerhalb der gleichen Charge wurde auf eine weitere quantitative Auswertung verzichtet.

Western Blot

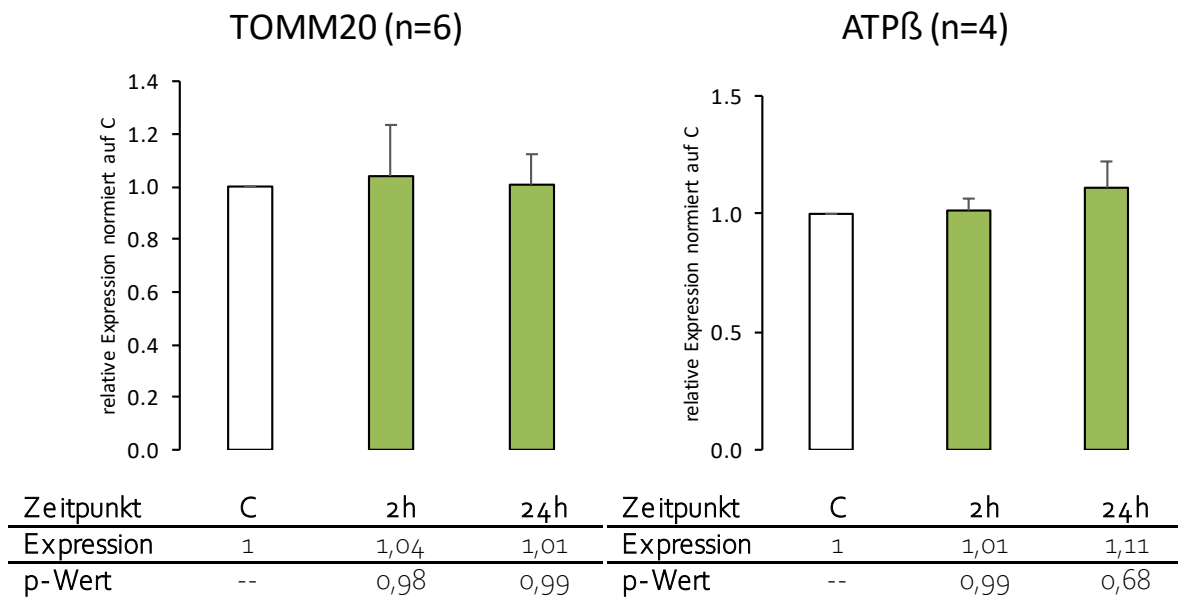


Abbildung 18: TOMM20 Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₂ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Abbildung 19: ATPβ Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₂ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Analog zur elektronenmikroskopischen Betrachtung und ebenso wie nach Stimulation mit T₃ lässt sich auch nach Stimulation mit T₂ kein signifikanter Anstieg der mitochondrialen Masse, erhoben anhand der Proteinmenge von TOMM20 und ATPβ, nach 2 oder 24 Stunden nachweisen.

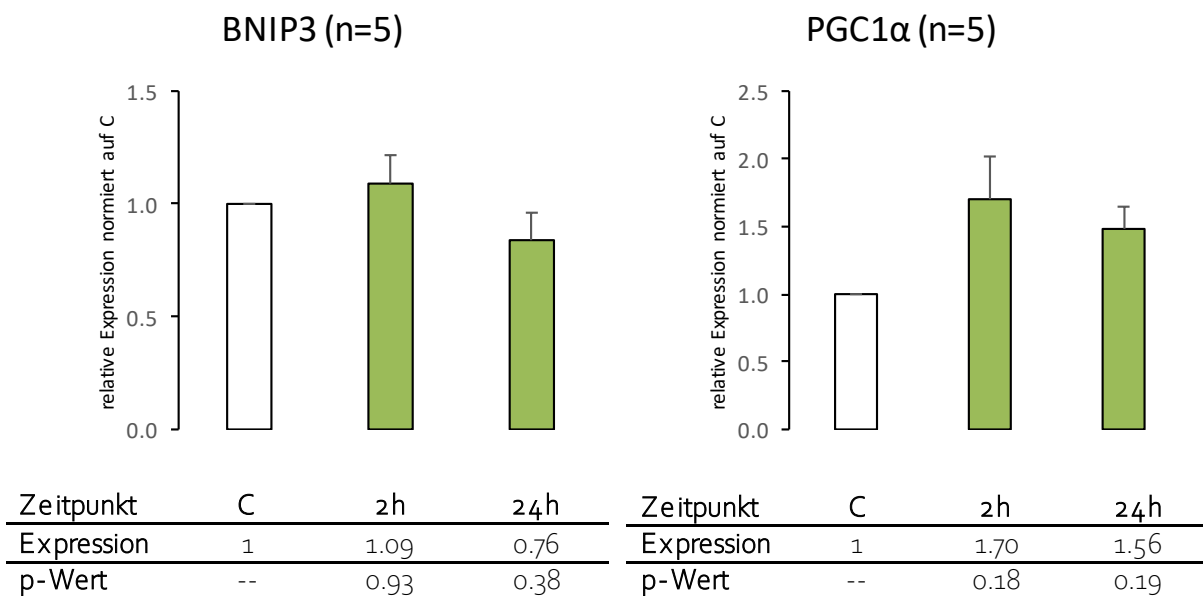
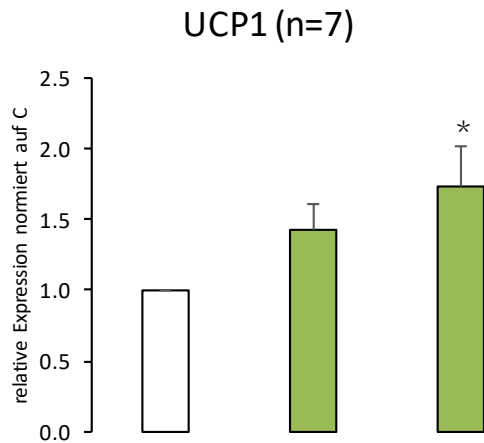


Abbildung 20: BNIP3 Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₂ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Abbildung 21: PGC1α Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₂ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Ebenso wie nach Stimulation mit T₃ ist die Expression des mitochondrialen Autophagiemarkers BNIP3 nicht signifikant verändert. Für die Expression von PGC1α zeigt sich 2 und 24 Stunden Stimulation ein positiver Trend, der insbesondere nach 24 Stunden aber weniger stark ausgeprägt ist als bei Stimulation mit T₃.

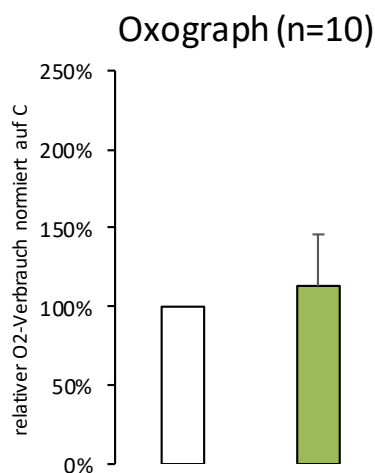


Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	1.43	1.73
p-Wert	--	0.31	0.038

Abbildung 22: UCP1 Expression nach Stimulation mit 300 nmol T₂ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

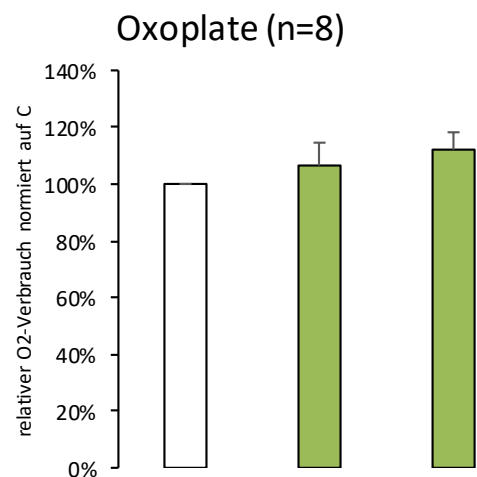
Die Expression von UCP₁ steigt (in etwa analog zum T₃ Effekt) nach 24h signifikant auf 187% an. Nach 2 Stunden Stimulation mit T₂ zeigt sich ebenso wie in den T₃-Experimenten bereits ein positiver Trend.

Sauerstoffverbrauch



Zeitpunkt	C	2h	24h
O ₂ -Verbrauch	100%	113%	100%
p-Wert	--	0.51	1.00

Abbildung 23: Sauerstoffverbrauch im Oxograph nach Stimulation mit 300 nmol T₂ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle



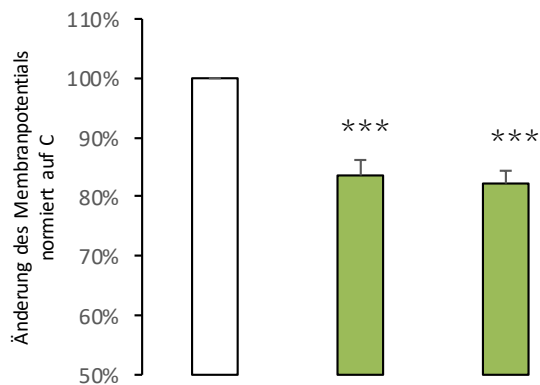
Zeitpunkt	C	2h	24h
O ₂ -Verbrauch	100%	106%	112%
p-Wert	--	0.69	0.42

Abbildung 24: Sauerstoffverbrauch in der Oxoplate nach Stimulation mit 300 nmol T₂ über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Es lässt sich weder im Oxographen noch in der Oxoplate eine signifikante Änderung des Sauerstoffverbrauchs zeigen.

Membranpotential (JC-1 Assay)

JC-1 (n=6)



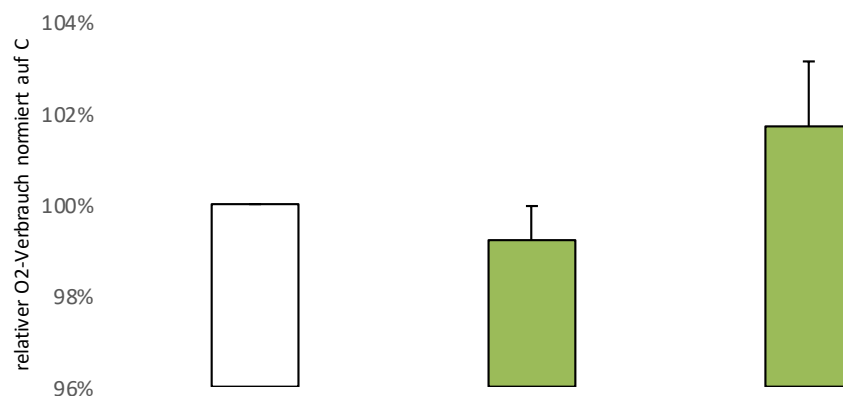
Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	0.84	0.82
p-Wert	--	< 0.0001	< 0.0001

Abbildung 25: relative Änderung des Membranpotentials im JC-1-Assay nach Stimulation mit 300 nmol T₂ nach 2h und 24h

Im JC-1 Assay lässt sich ein früher, hochsignifikanter Abfall des Membranpotentials nachweisen, der über die gesamte Beobachtungsdauer von 24 Stunden anhält und gemeinsam mit dem erhöhten Wert für PGC1 α und UCP1 auf eine Entkopplung der Atmungskette hinweist.

Glucoseverbrauch

Rel. Glucoseverbrauch (n=5)



Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	0.99	1.02
p-Wert	--	0.78	0.33

Es lässt sich analog zu dem nicht signifikant erhöhten Sauerstoffverbrauch auch keine signifikante Änderung des Glucoseverbrauchs durch die Stimulation mit T₂ nachweisen.

Abbildung 26: Glucoseverbrauchsmessung nach Stimulation mit 300 nmol T₃ über 2h und 4h, normiert auf die Kontrolle.

T₁AM

Mitochondriale Ultrastruktur und Masse

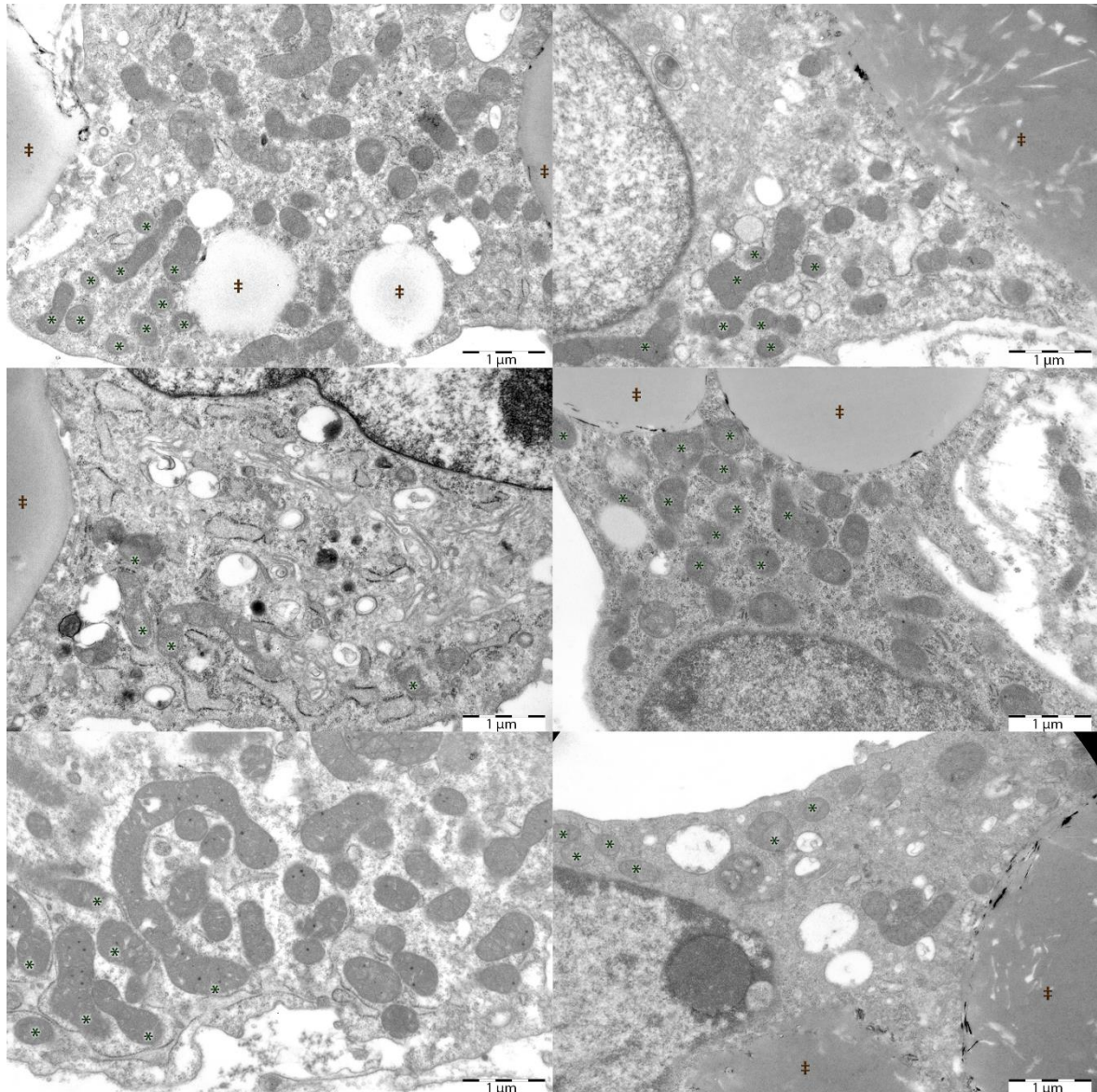


Abbildung 27: T₁AM – EM-Bild (links: Kontrollen, rechts: Stimulation mit 10 μmol T₁AM über 24h, * Mitochondrien, # Fettvakuolen, jeweils exemplarisch.)

Es lässt sich weder in Bezug auf Dichte, Größe und Form der Mitochondrien, noch bei der Betrachtung ihrer Ultrastruktur ein Unterschied zwischen der Kontrolle und den über 24 Stunden mit T₁AM (10 μM) stimulierten Zellen ausmachen. Aufgrund der bereits optisch hohen Varianz der Anzahl der Mitochondrien in den einzelnen Schnitten sowohl was Form als auch Anzahl betrifft, selbst innerhalb der gleichen Charge, wurde auf eine weitere quantitative Auswertung verzichtet.

Western Blot

Es sei darauf hingewiesen, dass in den folgenden Experimenten jeweils eine Kondition nur mit T₁AM behandelt ist. Die andere Kondition erfuhr eine Vorstimulation durch T₃ 300 nM über 72 Stunden um einen möglichen kompetitiven Effekt von T₃ auf T₁AM untersuchen zu können. Um den T₁AM-Effekt beurteilen zu können, sind beide Untersuchungsmodalitäten jeweils auf eine eigene Kontrolle normiert. Analog zum T₃-Effekt unterscheiden sich die Kontrollen, wenn untereinander verglichen

selbstverständlich ebenso bezüglich der bereits für T₃ nachgewiesenen Effekte, PGC1 α -Expression etc. ebenso wie später beim Sauerstoffverbrauch. Zur Darstellung des T₁AM Effektes sind indes beide Kontrollen jeweils auf 1 normiert.

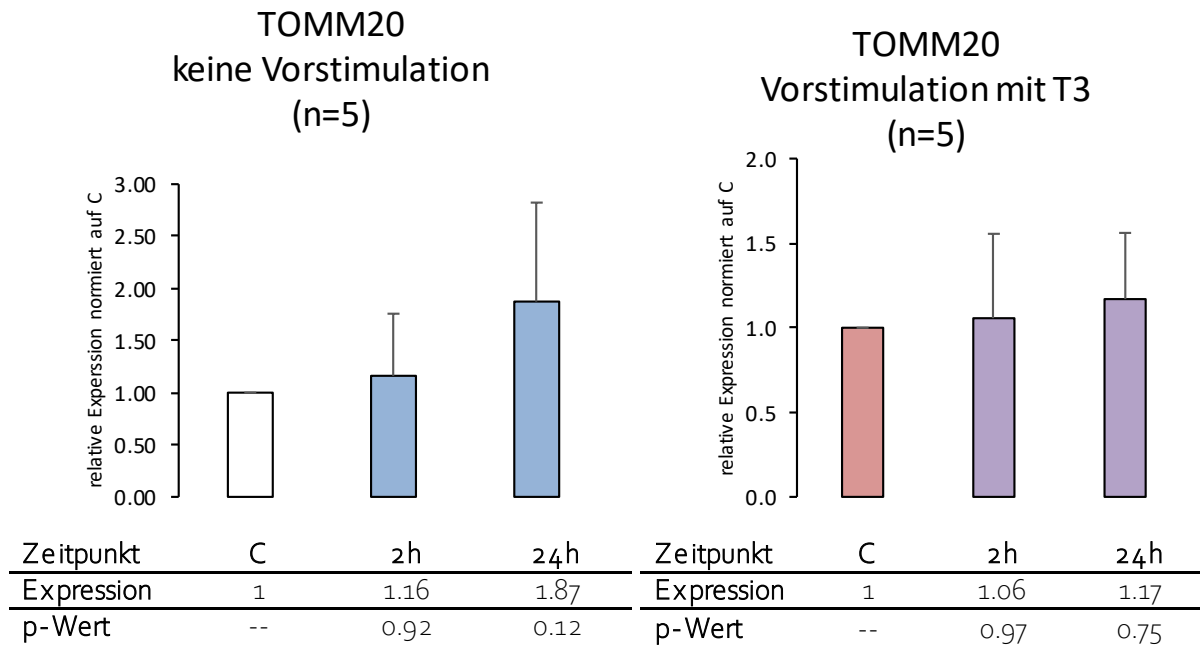


Abbildung 28: TOMM20 Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

10 Abbildung 29: TOMM20 Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle

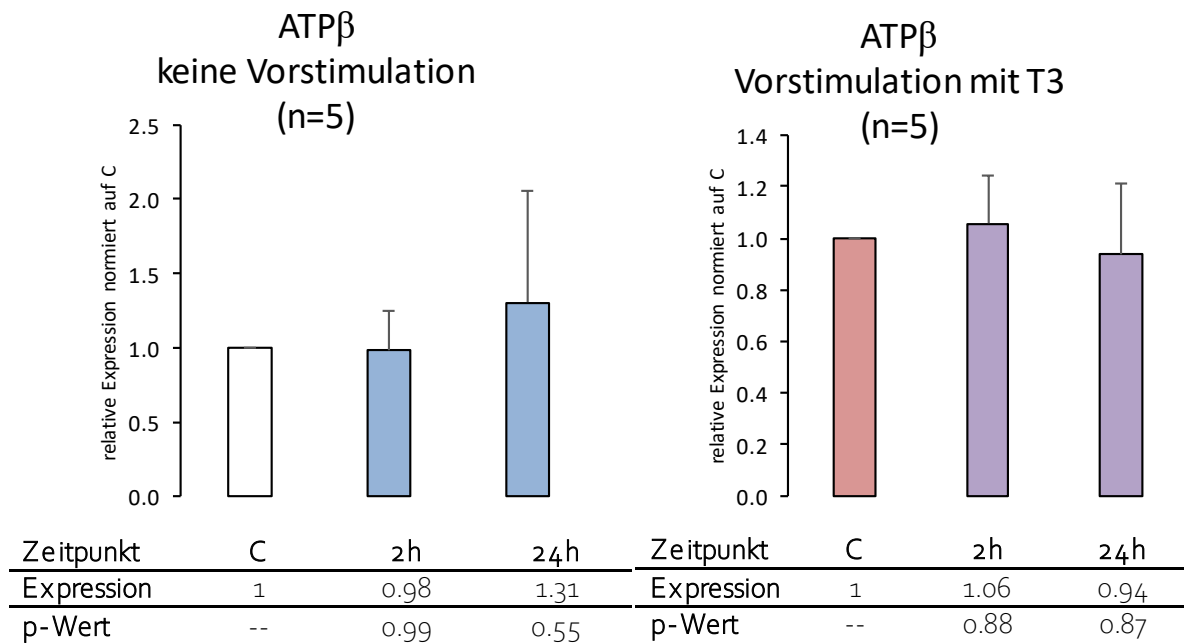


Abbildung 30: ATP β Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Abbildung 31: ATP β Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle

Analog zu dem elektronenmikroskopisch

unveränderten Befund zeigten sich auch in den Markern für mitochondriale Masse TOMM 20 und ATP β nach T₁AM-Stimulation keine signifikanten Änderungen. Unter Vorstimulation mit T₃ über 72 Stunden zeigen sich keine neuen Aspekte.

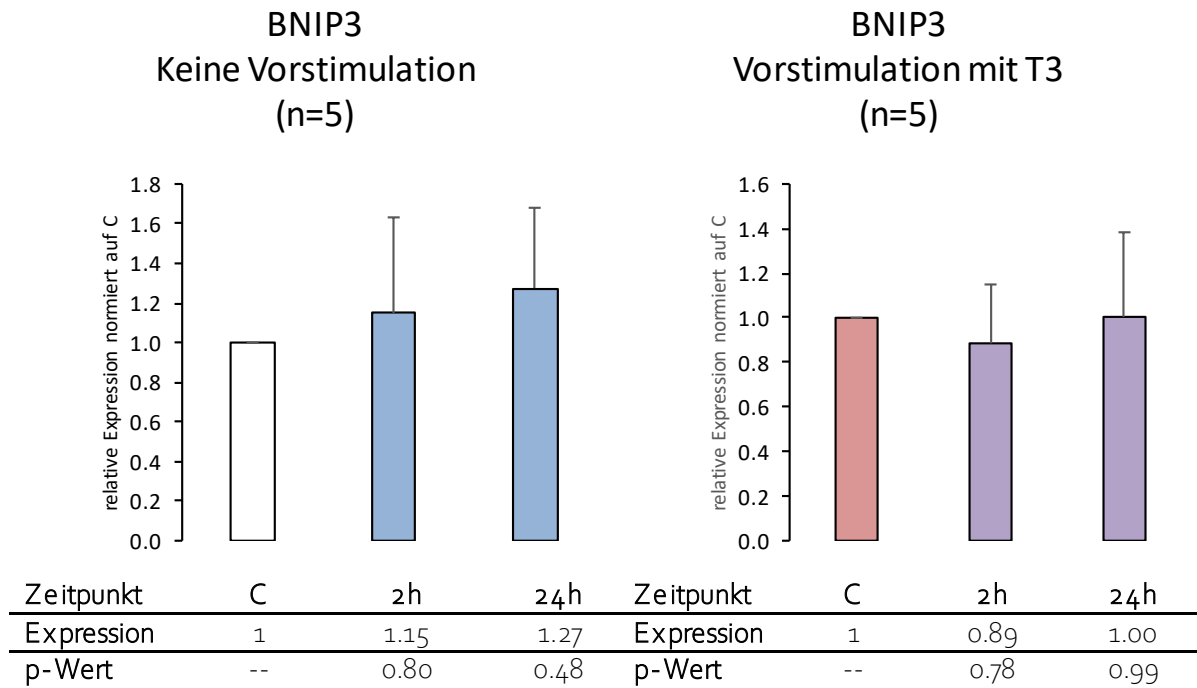
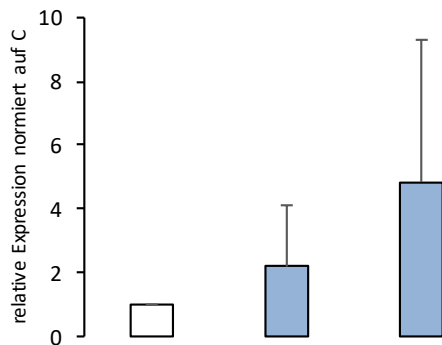


Abbildung 32: BNIP₃ Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

Abbildung 33: BNIP₃ Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle

Auch der Marker für mitochondriale Autophagie BNIP₃ wird durch T₁AM weder nativ noch nach Vorstimulation mit T₃ reguliert.

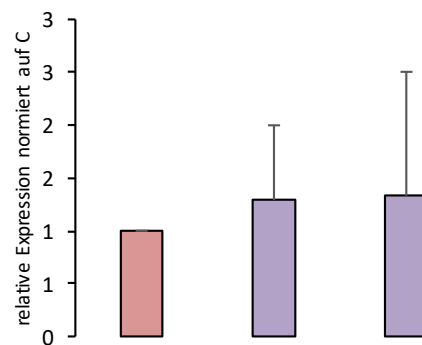
PGC1 α
Keine Vorstimulation
(n=4)



Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	2.19	4.85
p-Wert	--	0.82	0.18

Abbildung 34: PGC1 α Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

PGC1 α
Vorstimulation mit T₃
(n=4)

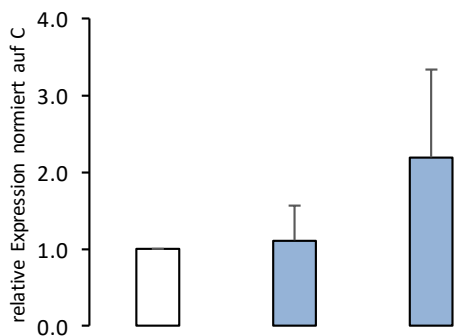


Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	1.29	1.33
p-Wert	--	0.86	0.83

Abbildung 35: PGC1 α Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle

Die Konzentration von PGC1 α steigt ebenfalls weder nativ noch unter Vorstimulation mit T₃ signifikant an.

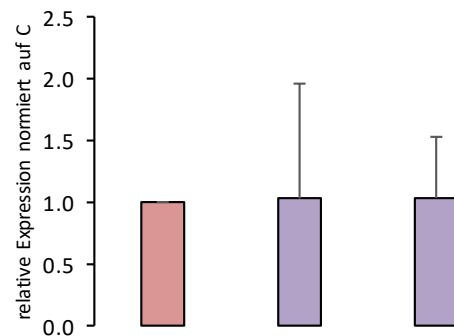
UCP1
keine Vorstimulation
(n=5)



Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	1.11	2.19
p-Wert	--	0.96	0.051

Abbildung 36: UCP1 Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

UCP1
Vorstimulation mit T₃
(n=5)

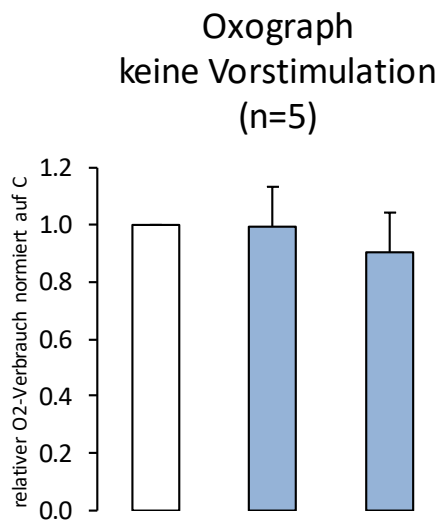


Zeitpunkt	C	2h	24h
Expression	1	1.03	1.03
p-Wert	--	0.99	0.99

Abbildung 37: UCP1 Expression nach Stimulation mit 10 μ mol T₁AM über 2h und 24h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle

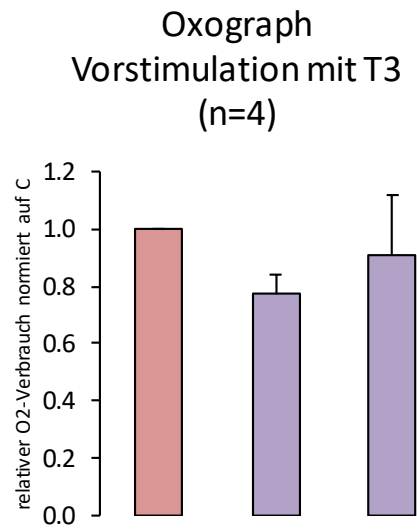
Es zeigt sich analog zur fehlenden Änderung in der PGC1 α -Expression auch keine signifikante Änderung der Konzentration von UCP1, wengleich sich nach 24h Stimulation nativ ein positiver Trend zeigt. Allerdings zeigt sich nach 24h auch eine hohe Streuung der Einzelwerte.

Sauerstoffverbrauch



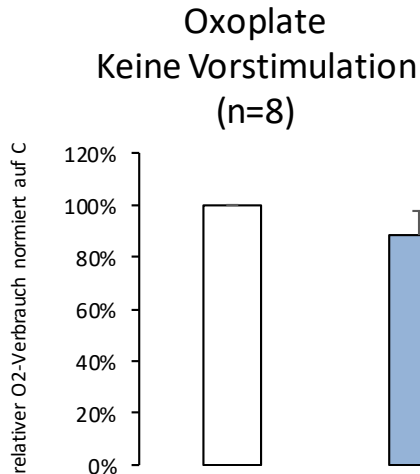
Zeitpunkt	C	2h	24h
O ₂ -Verbrauch	1	0.99	0.90
p-Wert	--	1	0.40

Abbildung 38: Sauerstoffverbrauch im Oxograph nach Stimulation mit 10 μmol T₁AM über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle



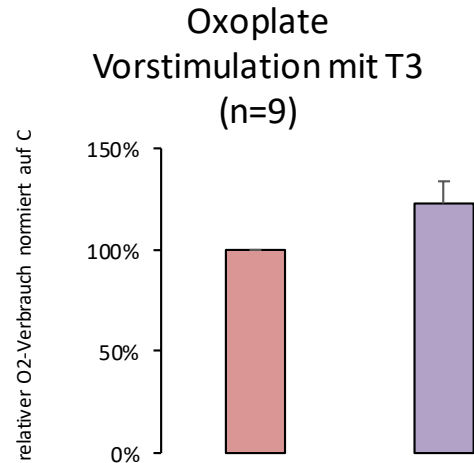
Zeitpunkt	C	2h	24h
O ₂ -Verbrauch	1	0.77	0.91
p-Wert	--	0.075	0.58

Abbildung 39: Sauerstoffverbrauch im Oxograph nach Stimulation mit 10 μmol T₁AM über 2h und 24h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle



Zeitpunkt	C	2h
O ₂ -Verbrauch	1	88%
p-Wert	--	0.25

Abbildung 40: Sauerstoffverbrauch in der Oxoplate nach Stimulation mit 10 μmol T₁AM über 2h und 24h, normiert auf die Kontrolle

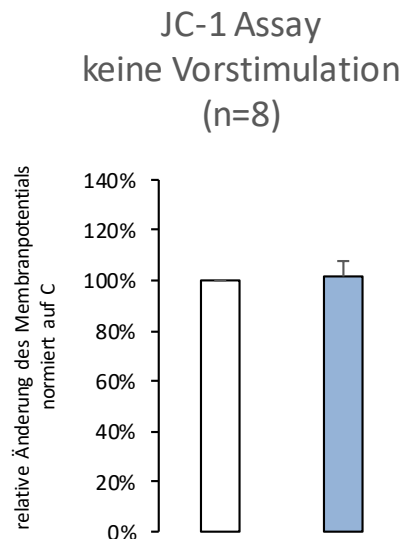


Zeitpunkt	C	2h
O ₂ -Verbrauch	1	123%
p-Wert	--	0.06

Abbildung 41: Sauerstoffverbrauch in der Oxoplate nach Stimulation mit 10 μmol T₁AM über 2h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle

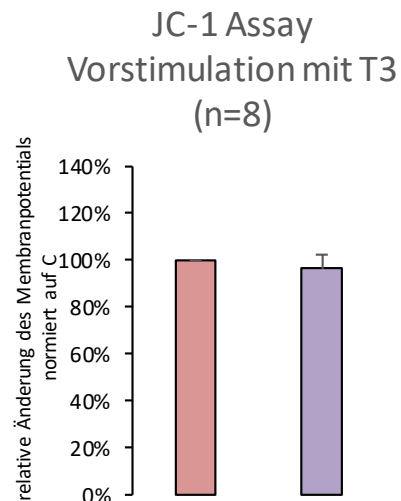
Es lässt sich für T₁AM keine signifikante Veränderung der Zellatmung nachweisen.

Membranpotential (JC-1 Assay)



Zeitpunkt	C	2h	24h
JC1-Quotient	1	102%	111%
p-Wert	--	0.92	0.028

Abbildung 42: relative Änderung des Membranpotentials im JC-1-Assay nach Stimulation mit 10 μmol T₁AM nach 2h und 24h



Zeitpunkt	C	2h	24h
JC1-Quotient	1	96%	106%
p-Wert	--	0.79	0.58

Abbildung 43: relative Änderung des Membranpotentials im JC-1-Assay nach Stimulation mit 10 μmol T₁AM über 2h und Vorstimulation mit 300 nmol T₃ über 72h, normiert auf die ebenfalls T₃-vorstimulierte Kontrolle

Nach 24 Stunden Stimulation mit T₁AM steigt das Membranpotential signifikant an. Nach Vorstimulation mit T₃ zeigt sich kein signifikanter Effekt durch T₁AM auf das Membranpotential.

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Nachfolgend eine schematische Darstellung der Ergebnisse normiert auf die jeweilige Kontrolle nach 2h bzw. 24h.

	T3 (2h/24h)	T2 (2h/24h)	T1AM (nativ) (2h/24h)	T1AM (Vorstim. T3) (2h/24h)
Elektronen- mikroskopie	Optisch keine Änderung	Optisch keine Änderung	Optisch keine Änderung	NA
TOMM20	1.45/1.33	1.04/1.01	1.16/1.87	1.06/1.17
ATPβ	1.13/1.23	1.01/1.11	0.98/1.31	1.06/0.94
BNIP3	1.08/0.85	1.09/0.76	1.15/1.27	1.89/0.99
PGC1α	2.07/3.35**	1.70/1.56	2.19/4.85	1.29/1.33
UCP1	1.54/1.77*	1.43/1.73*	1.11/2.19	1.03/1.03
Oxograph	1.19/1.28*	1.13/1.00	0.99/0.90	0.77/0.91
Oxoplate	1.10/1.11	1.06/1.12	0.88/NA	1.23/NA
Membranpotential (JC1)	0.97/0.88	0.84***/0.82***	1.02/1.11*	0.96/1.06
Glucose-Verbrauch	1.01/1.05**	0.99/1.02	NA	NA

Methode:

- Elektronenmikroskopie
- Western-Blot
- Sauerstoffmessung (Oxograph/Oxoplate)
- Durchflusszytometrie
- Glucoseverbrauch (Klinische Laborchemie)

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse

Diskussion

T3

Als Äquivalent in der Zellkultur zu entsprechenden Tierexperimenten, die einen erhöhten Grundumsatz und eine erhöhte Thermogenese nach Administration von T₃ gezeigt hatten (16), zeigt sich nach Gabe von T₃ ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, wobei sich ein Trend zu einem fallenden mitochondrialen Membranpotential zeigt, was mit einer erhöhten Thermogenese vereinbar ist. Am ehesten kompensatorisch zeigt sich eine Erhöhung des Glucoseverbrauchs auf 104% nach 24 Stunden.

Der Sauerstoffverbrauch steigt nach 24 Stunden auf 361% in Experimenten mit dem Oxographen (Methode nach Clark) an. Bereits nach 2h lässt sich der Beginn eines Anstiegs vermuten, so dass möglicherweise ein früher Effekt von T₃ auf eine Änderung des Sauerstoffverbrauches vorliegen könnte, weitere Experimente hierzu können möglicherweise einen Effekt zeigen, der für T₃ auch einen nongenomischen Pathway für die schnelle Änderung des Sauerstoffverbrauches implizieren würde. In den Vorexperimenten zu dieser Arbeit hatte sich ein früher Anstieg des Sauerstoffverbrauches mit Signifikanz auch für 2h und 8h nach T₃-Gabe nachweisen lassen. In diesen Vorexperimenten war allerdings während der gesamten Inkubationszeit das Originalprotokoll zur Ausreifung der braunen Fettzellen verwendet worden, das sich von dem hier verwendeten Protokoll insbesondere dadurch unterschied, dass kein aktivkohlefiltriertes Serum verwendet worden war und das Medium auch noch bis 24h vor dem Beginn der Sauerstoffmessung noch T₃ enthielt, was – auch in Konkordanz zu o.g. Tierexperimenten – suggeriert, dass der T₃-Effekt einigen Vorlauf benötigt, um volle Wirkung auf die zelluläre Atmung zu erreichen. Die Abwesenheit von adrenergen Substanzen und T₃ mehrere Tage vor dem Experiment scheint die Fähigkeit der Zellen, eine schilddrüsenhormonabhängige Steigerung des Sauerstoffverbrauches zu entwickeln einzuschränken. Hierfür spricht auch der im Vergleich zu Vorexperimenten relativ geringe Anstieg des relativen Sauerstoffverbrauchs nach 24 Stunden (128% vs. 160%), wobei in beiden Konditionen Signifikanz erreicht wurde.

In beiden Konditionen (ursprüngliches Protokoll und modifiziertes Protokoll) konnten die etablierten Reifemarker für braunes Fettgewebe nachgewiesen werden (Einlagerung von Lipiden in multilokularen Fettvakuolen, Expression von UCP₁), so dass eine schlechte Differenzierung alleine nicht für die weniger ausgeprägte Änderung des Sauerstoffverbrauches verantwortlich sein kann. Vielmehr scheint durch die Anwesenheit von T₃ und weiteren lipophilen durch die Filterung des Serums extrahierten Substanzen die Antwort des braunen Fettgewebes auf T₃ gebahnt zu werden. Möglicherweise hat die mitochondriale Biogenese nach 24h zudem noch nicht ihr Maximum erreicht – worauf das Fehlen einer signifikanten Erhöhung der Konzentration der Marker für mitochondriale Masse TOMM20 und ATP β nach 24h hinweist. Zudem sind in Vorexperimenten mit längerer Differenzierung unter Anwesenheit von T₃ bereits nach zwei Stunden stärkere T₃-Effekte auf den Sauerstoffverbrauch zu sehen, die sich in den hier durchgeführten Experimenten nicht mehr nachweisen lassen, was für dafür spricht, dass eine längere Behandlung mit T₃ wahrscheinlich über genomische Pathways (z.B. über mitochondriale Biogenese oder UCP₁-Induktion) einen nichtgenomischen, schnellen T₃-Effekt erst ermöglicht.

Für UCP 1 lässt sich nach zwei Stunden T₃-Stimulation ein Trend zum Konzentrationsanstieg auf 135% beobachten, der nach 24h mit 177% Signifikanz erreicht. Es zeigt sich zudem nach 24 Stunden ein Trend zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials auf 88% des Initialwertes. Es sind

bisher keine Experimente mit Membranpotentialsmessung an braunen Adipozyten durchgeführt wurden, so dass die Etablierung dieser Methode für braune Adipozyten neue Erkenntnisse über den Zusammenhang von metabolischer Aktivität und dem Membranpotential bei dieser speziellen Zellart bringt.

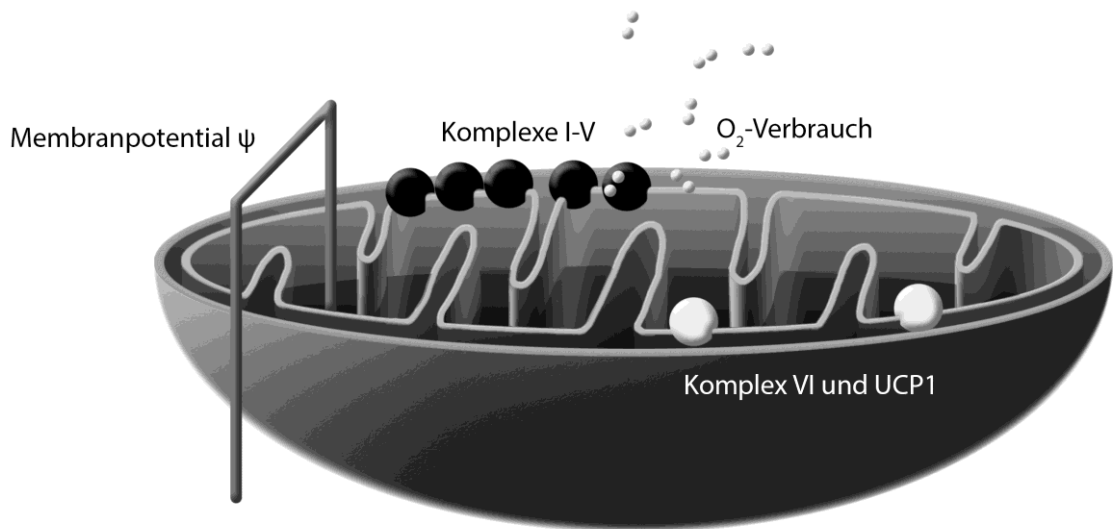


Abbildung 44: Schema Auf- und Abbau des mitochondrialen Membranpotentials

Üblicherweise – bei anderen Zelllinien – ist ein stark negatives Membranpotential Ausdruck einer hohen metabolischen Aktivität des Mitochondriums (64). Das Mitochondrium stellt bei einem erhöhten Energiebedarf der Zelle über eine Aktivierung der Komplexe I-V der Atmungskette Protonen in der mitochondrialen Matrix bereit, die gleichsam „batterieartig“ gespeichert werden, so dass es zu einer Erhöhung des Protonengradienten kommt, über den Energie für die Funktion der ATP-Synthase bereitgestellt wird. Diese nutzt den Protonengradienten, baut ihn aber physiologischerweise nicht signifikant ab, da der membranpotential-aufbauende Schenkel der Atmungskette analog zum Verbrauch aktiver wird. Daher zeigt sich z.B. durch Stimulation mit dem den Metabolismus aktivierenden T_3 in anderen Geweben sogar eher ein weiterer Aufbau des Membranpotentials (z.B. (65)). Braunes Fettgewebe scheint hierbei insofern einen Sonderstatus einzunehmen, dass der stimulierende Effekt auf die potentialaufbauenden Komplexe der Atmungskette von dem entkoppelnden Effekt durch die Synthese von UCP1 aufgehoben wird, über welches das Membranpotential wieder abgebaut wird. Hierfür spricht das im Vergleich zu anderen Zellreihen/Geweben vergleichsweise weniger negative mitochondriale Membranpotential (andere Zellreihen ca. -240 mV (58), braunes Fettgewebe ca. -50 mV (66)). Diese Arbeit zeigt, dass der Effekt von UCP1 das Membranpotential schneller abbaut, als es durch die zuführenden Komplexe der Atmungskette wieder aufgebaut werden kann, obwohl die intrazelluläre Atmung signifikant angeregt wird. Dieser Effekt ist in den vorliegenden Experimenten nach 24 Stunden (zumindest als Trend) nachzuweisen, passend zur signifikanten Erhöhung der UCP1 Konzentration zu diesem Zeitpunkt. In unseren Experimenten mit einem maximalen Beobachtungszeit von 24 Stunden ist zudem davon auszugehen, dass der Höhepunkt der UCP1 Expression nach 24 Stunden noch nicht erreicht ist. Einen indirekten Beleg für diese These sowie für eine weiter und längerfristig erhöhte metabolische Aktivität mit dem Ziel der Thermogenese ist neben dem niedrigen Membranpotential und dem

erhöhten Sauerstoffverbrauch zudem der Anstieg von PGC1 α , über das z.B. die UCP1 Expression aber auch die mitochondriale Biogenese angeregt wird, nach 24 Stunden auf das über dreieinhalbfache des Ausgangswertes. Für eine länger anhaltende Konzentrationserhöhung von UCP1 durch T₃ sprechen auch Zellkultur Experimente mit anderen BAT-Zellreihen, in denen auch nach längerer Zeit (z.B. in nach je sechs und acht Tagen (67)) einer Kostimulation von T₃ und Noradrenalin noch eine gegenüber einer Monostimulation mit Noradrenalin deutlich erhöhte UCP1-Konzentration messbar war. Auch in diesen Experimenten war nach 24 Stunden der Höhepunkt der UCP1 Expression noch nicht erreicht.

Für einen erst später einsetzenden maximalen Effekt von T₃ spricht auch die beschriebene Latenzzeit einer T₄-Administration bei thyreoidektomierten Ratten auf den Ruheenergiebedarf (das Plateau des Ruheenergiebedarfs wird erst nach ca. 50 Stunden erreicht (6,68)). Das komplett schilddrüsenhormondepletierte Serum der Tiere ist möglicherweise in Analogie zum aktivkohlegetriebenen Medium für die lange Latenzzeit verantwortlich, zumal die Zugabe von T₃ in unseren Vorexperimenten bereits zu einem früheren und stärkeren Anstieg der Atmung geführt hatte.

Aufgrund des schnellen Trends zum Anstieg der UCP1 Konzentration nach zwei Stunden ist es auch möglich, dass ein – im Vergleich zum langfristigen Effekt wahrscheinlich wenig signifikanter – nongenomischer Pathway für die frühe Erhöhung der UCP1 Konzentration zuständig ist. Denkbar wäre über eine Transkription des Proteins hinaus z.B. eine nongenomische Herabregulierung der Degradation von UCP1, die im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu einer erhöhten Verfügbarkeit führen könnte. Diese würde sich, da nongenomisch, ebenfalls nicht in einer Konzentrationsänderung z.B. von dem in dieser Studie getesteten BNIP3 niederschlagen – eine Funktionstestung dieses oder anderer nongenomischer Pathways ging über die Zielsetzung dieser Studie hinaus.

Hinweise auf eine Modulation der mitochondrialen Gesamtmasse ließen sich weder auf Proteinebene über die mitochondrialen Proteine (ATP β und TOMM20) oder Promotoren der mitochondrialen Autophagie noch elektronenmikroskopisch finden, wobei auch hier wahrscheinlich der positive Effekt von T₃ auf die mitochondriale Biogenese möglicherweise noch nicht seinen Höhepunkt erreicht hat. Die Autophagie, wie sie über BNIP3 gemessen wird, wird maßgeblich über einen Abfall des Membranpotentials oder Hypoxie initiiert, so dass möglicherweise der Stimulus für eine Aktivierung von BNIP3 zu gering war, um eine signifikante Änderung zu zeigen. Im Laufe dieser Arbeit konnte durch andere Arbeitsgruppen im Zellmodell ein erhöhter mitochondrialer Umsatz mit nach 24 h erhöhter mitochondrialer Autophagie und erhöhter mitochondrialer Biogenese (u.a. über TOMM20 gemessen) gezeigt werden (69) – diese Effekte lassen sich in dieser Arbeit nicht signifikant nachweisen, möglicherweise da insbesondere die Messwerte für den Western Blot von TOMM20 eine hohe Streuung aufweisen.

Das insgesamt niedrigere Ansprechen der Zellen, die nach dem neuen Protokoll aufgezogen wurden, auf Schilddrüsenhormon schlägt sich auch bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen nieder. So zeigt sich optisch oftmals auch nach abgeschlossenem Protokoll zur Differenzierung ein unterschiedlich großer Teil an undifferenzierten Zellen, die in Größe und Binnenstruktur eine höhere Ähnlichkeit zu Präadipozyten als zu ausdifferenzierten braunen Fettgewebszellen aufwies. Die heterogene Differenzierung musste in Kauf genommen werden, da für einen methodisch reinen Versuchsaufbau kein Zusatz von T₃ im Medium vorhanden sein durfte. Diese Voraussetzung wurde durch eine Filtrierung des Mediums durch Aktivkohle erreicht, hierbei musste in Kauf genommen

werden, dass über Schilddrüsenhormone hinaus auch Triglyceride, Steroidhormone und Peptidhormone sowie weitere lipophile Substanzen aus dem Medium filtriert wurden (63). Durch den Mangel an jenen Substanzen kann möglicherweise (additiv zum Mangel an T₃) eine heterogenere Differenzierung zustande kommen.

Der Versuch, die Oxoplate als Methode für die Sauerstoffverbrauchsmessung bei braunem Fettzellen zu etablieren, scheiterte leider am ehesten an der Fragilität der braunen Fettzellen bei physikalischem Stress, so dass in keinem der folgenden Experimente signifikante Änderungen des Sauerstoffverbrauches gezeigt werden konnten, wenngleich die mithilfe der Oxoplate erhobenen Werte zumeist eine Tendenz in die gleiche Richtung wie die mittels Clark-Elektrode gemessenen Werte aufzeigen. Die hohe Streuung bei dieser Methode verhindert allerdings das Erreichen von Signifikanz.

T₂

Für T₂ lässt sich kein signifikant erhöhter Glucoseverbrauch nachweisen, ebenso wenig konnte in den Experimenten mit Clark-Elektrode oder Oxoplate ein erhöhter Sauerstoffverbrauch gezeigt werden. Konkordant zu einer in-vivo Studie im Zeitraum der Doktorarbeit (53) lässt sich dennoch nach 24 Stunden eine erhöhte PGC1 α Konzentration (184% des Kontrollwerts) nach Stimulation mit T₂ nachweisen, ebenso wie eine mutmaßlich durch denselben Pathway erhöhte UCP₁ Konzentration nach 24 Stunden auf 187% des Kontrollwertes, was für eine Aktivierung der Entkopplung der Atmungskette von der ATPase hin zu Thermogenese sprechen würde. Die Ergebnisse implizieren, dass die vollständige Umstellung des Stoffwechsels hin zur Thermogenese erst nach 24h ihren funktionellen Höhepunkt erreicht. Bereits früher beginnend findet sich ein Abfall des Membranpotentials als Zeichen einer Entkopplung, der nach 2 Stunden Stimulation einsetzt (84% des Kontrollwerts) und über 24 Stunden anhält (82% des Kontrollwerts). Der Abfall des Membranpotentials nach T₂-Administration über 24 Stunden Wert liegt noch unter dem Wert für die T₃-Stimulation nach 24 Stunden (s.o. 88% des Kontrollwerts).

T₂ scheint also in Teilen einen T₃-ähnlichen Effekt zu vermitteln, der die Konzentration von PGC1 α und UCP₁ erhöht und auf diese Weise eine Umstellung des zellulären Metabolismus auf die Thermogenese bewirkt. Im Unterschied zu T₃ ist aber kein erhöhter energetischer Umsatz der Zelle (Glucoseverbrauch, Sauerstoffverbrauch) nachweisbar, was bedeutet, dass T₃ einen Effekt haben muss, der über den T₂-vermittelten Effekt hinausgeht. Um diesen zu verstehen, muss erneut das Augenmerk auf die Energie-Homöostase der Mitochondrien gerichtet werden. Wie bereits zuvor ausgeführt, steigert T₃ in nicht-BAT Zelllinien das mitochondriale Membranpotential. Die Zelle scheint also gewissermaßen eine erhöhte metabolische Aktivität dadurch zu ermöglichen, dass der mitochondriale Protonenspeicher in der Matrix gefüllt wird. Wir haben bereits dargelegt, dass dieser Effekt bei braunen Adipozyten nach T₃-Stimulation nicht gegenüber dem der Entkopplung überwiegt, sondern dass das Membranpotential dennoch fällt, da ja ebendies, nämlich die Entkopplung des Membranpotentials zur Thermogenese und nicht die Bereitstellung von Energie für andere Zellfunktionen, das primäre Ziel der Zelle ist.

In Kenntnis der Ergebnisse für T₂-Stimulation lässt sich die Überlegung anstellen, dass T₃ scheinbar auch in BAT einen positiven Effekt auf den Schenkel der Atmungskette, der den Protonengradienten aufbaut (Komplexe I-V), und die Zyklen, die die Substrate der Atmungskette bereitstellen, haben muss. Die erhöhte Aktivität derselben spiegelt sich im erhöhten Glucose- und Sauerstoffverbrauch wider. Obwohl T₂ auf die Entkopplung quantitativ ähnliche Effekte zu haben scheint wie T₃

(Membranpotentialabfall und PGC1 α - sowie UCP1-Konzentration) fehlt der energiezuführende Effekt auf den Membranpotential-aufbauenden Schenkel der Atmungskette. Das erklärt – über den fehlenden T₂-Effekt auf Glucoseverbrauch und Sauerstoffverbrauch hinaus – das sogar noch niedrigere Membranpotential nach T₂-Stimulation im Gegensatz zur T₃-Stimulation (82% bei T₂ gegenüber 88% bei T₃). Diese Hypothese wird zudem gestützt durch den frühen Abfall des Membranpotentials bereits nach zwei Stunden, der nach T₃-Stimulation noch nicht zu sehen ist. Mutmaßlich, weil die zeitgleich / antizipierend einsetzenden Effekte von T₃ das Membranpotential zunächst noch stabilisieren können, solange die UCP1-Expression und -Aktivität noch nicht zu stark angestiegen ist.

Es lässt sich daraus ableiten, dass die *in vivo* gesehenen Effekte von T₂ eines bereits nach zwei Stunden erhöhten Sauerstoffverbrauchs von hypothyreoten, T₂-stimulierten Ratten nicht auf direkte Effekte von T₂ auf das braune Fettgewebe zurückzuführen ist. Die Tiere scheinen auf eine Induktion der mitochondrialen Entkopplung (nachweisbar u.a. durch analog zu unseren Experimenten erhöhter UCP1 und PGC1 α -Konzentration (53) nach T₂-Gabe) zusätzlich *in vivo* über Kompensationsmechanismen über indirekte Pathways zu verfügen, die sich *in vitro* nicht nachweisen lassen, die die Tiere aber in die Lage versetzen, der Destabilisierung des mitochondrialen Potentials über vermehrte Atmung entgegenzuwirken. Als möglicher Kompensator sei hier ein Effekt auf das sympathische Nervensystem genannt, der durch die *in vitro* in Zellkultur ausgeschlossen wird.

T₁AM

Für T₁AM zeigen sich, anders als für T₂ und T₃, weder nativ noch nach T₃-Vorstimulation Effekte auf PGC1 α oder UCP1. Auch lässt sich weder nativ noch unter Vorstimulation mit T₃ ein Effekt auf den Sauerstoffverbrauch, gemessen mit Clark-Elektrode und Oxoplate zeigen. Dennoch lässt sich nach 24 Stunden ein Effekt von T₁AM auf das mitochondriale Membranpotential der braunen Fettzellen beobachten, der dem Effekt von T₃ entgegengesetzt ist. So erhöht sich das Membranpotential auf 111%. Dies lässt sich durch eine Bindung von T₁AM an die ATP-Synthase erklären, wodurch deren Aktivität gehemmt wird. Auf diese Weise ist der „Abfluss“ der Protonen aus der mitochondrialen Matrix verlangsamt, wodurch das Membranpotential steigt. Dieser Effekt von T₁AM auf die ATP-Synthase ist bereits für Kardiomyozyten beschrieben und spezifisch für hohe Dosen von T₁AM (70). Die hier erhobenen Daten zeigen, dass der gleiche Effekt auch in braunem Fettgewebe stattfinden könnte. Zudem kann – analog zu dem fehlenden Effekt von T₂ auf die Atmung – postuliert werden, dass T₁AM keine Auswirkung auf die das Membranpotential aufbauenden Komplexe der Atmungskette hat. Bezüglich T₁AM und entsprechender Tierexperimente, in denen der Sauerstoffverbrauch der Tiere sinkt, muss also wiederum ein indirekter Pathway angenommen werden. Hierzu passend wären auch Beobachtungen von Scanlan et al. nach denen Ratten, denen T₁AM i.p. injiziert wurde, trotz fallender Körpertemperatur kein kälteevasives Verhalten, Piloarrektion, oder Zittern zeigen, was gemeinsam mit beobachteter Inaktivität und Ptosis der Tiere darauf schließen lässt, dass es sich um zentralnervöse Effekte handeln könnte, die möglicherweise distinkt von den lokalen Effekten sind. Bestätigend für diese These zeigt sich im zentralen Nervensystem, genauer im Hypothalamus eine Vielzahl von Zielproteinen für T₁AM, insb. GPCRs und TRP-Kanalproteine, die über eine peritoneale Gabe von T₁AM in Mäusen im paraventriculären Nucleus (PVN) aktiviert werden können (71). Zudem konnte gezeigt werden, dass einige periphere T₁AM Effekte wie z.B. die periphere Vasodilatation nicht peripheren sondern zentralen Ursprungs sind (72). Insbesondere der Fakt, dass supraphysiologische Dosierungen sowohl das oben beschriebene Verhalten als auch die Antwort im PVN hervorrufen (50 mg T₁AM pro kg

Körpergewicht), wenngleich die Gewebekonzentration von T₁AM im Gewebe 5.6-93 pmol/g beträgt (73) und in Nierenzellen gezeigt werden konnte, dass bereits bei Dosen von 14 nM eine halbmaximale Stimulation der cAMP Akkumulation erreicht werden kann (59), wirft die Frage auf, in wie weit mit den im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Dosen von 10 μmol/l (oder in anderen in der Literatur beschriebenen Experimenten) überhaupt ein physiologischer Effekt abgebildet wird.

Da auch nach Vorstimulation mit T₃ über 72 Stunden kein signifikanter Abfall des Sauerstoffverbrauchs im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden kann und auch die übrigen erfassten metabolischen Marker keine signifikante Änderung zeigen, legen die Ergebnisse nahe, dass eine Konkurrenz von T₁AM und T₃ um Schilddrüsenhormonrezeptoren oder -transporter (z.B. um den Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8), von dem gezeigt werden konnte, dass er sowohl T₃ (74) als auch T₁AM (75) über die Zellmembran transportieren kann) auf zellulärer Ebene in BAT nicht relevant ist.

Als Positivkontrolle für die Exzitabilität der Zellen lief jeweils eine Kontrolle mit einem spezifischen Agonisten am adrenergen β₃-Rezeptor, βCL (CL-316,243), mit. Hierdurch sollte bei fehlendem Effekt von T₁AM ausgeschlossen werden, dass die Qualität der Zellen hinsichtlich Differenzierung oder Bereitschaft zur Thermogenese nicht geschädigt war, sondern dass T₁AM tatsächlich nativ keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch hatte. Der Nachweis, dass der Sauerstoffverbrauch sich nach Gabe von βCL mehr als verdoppelt, möge für die Qualität der Zellkultur als proof of principle gelten, da eine Entkopplung der Atmungskette in braunem Fettgewebe durch adrenergen Stimulus lange bekannt ist.

Die initial aufgestellte Hypothese, T₁AM würde auch im Zellmodell zu einer verminderten Aktivität der Thermogenese führen, lässt sich durch diese Arbeit dennoch nicht sicher bestätigen. In pharmakologischen Dosen kann T₁AM diesen Effekt möglicherweise über eine Hemmung der ATP-Synthase entfalten. In wie weit dieser Effekt allerdings dem physiologischen Effekt im menschlichen Körper entspricht, ist insbesondere im Licht der deutlichen Hinweise für eine vorwiegend zentrale Regulation einiger T₁AM-Effekte mehr als fraglich. Der T₃-Antagonismus mag sich physiologisch weiterhin – in wahrscheinlich weniger ausgeprägter Weise – entfalten. Für die ATP-Synthase ist allerdings in Kardiomyozyten gezeigt, dass im physiologischen niedrig nanomolaren Bereich, wie er im Gewebe vorkommt, sogar eine Aktivierung der ATP-Produktion stattfindet, so dass die tatsächliche physiologische Funktion von T₁AM mit den in dieser Arbeit gewählten Untersuchungsparametern nicht abschließend beurteilt werden kann.

Zusammenfassung

Die Schilddrüsenderivate T₃, T₂ und T₁AM entfalten in vivo unterschiedliche Effekte. Während T₃ und T₂ als „heiße“ Schilddrüsenhormone Sauerstoffverbrauch und Thermogenese erhöhen, vermindert T₁AM als „kaltes“ Schilddrüsenhormon Sauerstoffverbrauch und Thermogenese.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von T₃, T₂ und T₁AM auf unterschiedliche Marker der mitochondrialen Aktivität gemessen werden, namentlich den Sauerstoffverbrauch der Zellen und die Änderung des Membranpotentials als Ausdruck eines Zusammenspiels der Komplexe I-VI der Atmungskette und der Entkopplung durch UCP₁, die Menge von UCP₁ als Marker für Entkopplung, TOMM20 und ATPβ als Marker für mitochondriale Masse, PGC1α als Marker für mitochondriale Biogenese und BNIP3 als Marker für mitochondriale Autophagie. Zudem wurde die Änderung des Glucoseverbrauchs bestimmt und eine elektronenmikroskopische Betrachtung der Mitochondrien in Bezug auf ihre Masse und Struktur nach Stimulation mit den Schilddrüsenhormonderivaten durchgeführt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass T₃ bezüglich Atmung, PGC1α-Expression, UCP₁-Expression und Glucoseverbrauch das gleiche Verhalten an den Tag legt, wie in zahlreichen in vivo und in vitro Voruntersuchungen. Das Membranpotential sinkt hierbei nicht signifikant ab.

T₂ verhält sich in UCP₁-Expression ähnlich wie T₃, was eine Verwandtschaft der Wirkung suggeriert, wie es für ein ebenfalls als „heißes“, d.h. stoffwechselstimulierendes Schilddrüsenhormon postuliertes Substrat nicht überraschend ist. Das Membranpotential fällt indes bereits früh und deutlich ab, ohne dass in vitro der Sauerstoffverbrauch signifikant steigt, was die Vermutung nahelegt, dass die Energiebereitstellung für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ohne T₃ unzureichend sein könnte. In vivo könnte der Effekt durch andere Kompensationsmechanismen (z.B. über das sympathische Nervensystem) ausgeglichen werden, weswegen sich im Tiermodell durchaus erhöhte Sauerstoffverbräuche messen lassen.

Für T₁AM konnte analog zum postulierten „kalten“ Charakter des Hormons nach 24h ein Anstieg des Membranpotentials gezeigt werden, ohne dass es indes zu einer Erniedrigung des Sauerstoffverbrauches kommt. Diese Ergebnisse sind konkordant zu den bei Kardiomyozyten beschriebenen Effekten ein Hinweis darauf, dass T₁AM in pharmakologischen Dosen die Aktivität der ATP-Synthase hemmt und somit bei unveränderter Aktivität der Komplexe I-V der Atmungskette zu einer Erhöhung des Membranpotentials führt.

Es konnte nach Vorstimulation mit T₃ jeweils keine Änderung der gemessenen metabolischen Marker erfasst werden, was gegen einen relevanten kompetitiven Antagonismus der beiden Hormone in braunen Adipozyten spricht.

Zusammenfassend zeigt T₂ auf einzelne Pathways der Thermogenese ebenso wie von T₃ bekannt eine stimulierende Wirkung, für T₁AM ergeben sich Hinweise auf eine entgegengesetzte Wirkung, allerdings ist sowohl für T₂ als auch für T₁AM anhand der erhobenen Daten zu postulieren, dass in vivo ein weiterer Effekt existieren muss, damit sich die in anderen Arbeiten gemessenen „heißen“ bzw. „kalten“ Effekte der Hormone entfalten können.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATP β	β Untereinheit der ATP-Synthase
BAT	Brown adipose tissue (braunes Fettgewebe)
BNIP ₃	BCL2-interacting protein 3
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CL-316,243	Disodium 5-[(2R)-2-[[[(2R)-2-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate hydrate
D ₁ , D ₂ und D ₃	Deiodinasen 1, 2 und 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FADH ₂	hydrierte Form des Flavinadeninucleotids
FBS	Fetal bovine Serum
fFBS	Filtered fetal bovine Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
LC ₃	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
mtDNA	Mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NRF-1, NRF-2	Nuclear respiratory factor 1, bzw. 1
PBS	phosphate-buffered saline
PGC-1 α	Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha
P _i	Anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPAR α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PTFE-Membran	Polytetrafluorethylen-Membran
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat
ToAM	Thyronamin
T ₁ A	3-iodothyroacetic acid
T ₁ AM	Thyronamin 3-Iodothyronamin
T ₂	3,5-Diiod-L-Thyronin
T ₃	3,3',5-Triiod-L-Thyronin
T ₄	Thyroxin
TAAR-1	Trace amine-associated receptor 1
TBST	Tris buffered saline with Tween [®] 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOMM20	Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20
TR	Schilddrüsenhormonrezeptoren
Tris	Trisma base
TRP-channel	transient receptor potential channel

TWEEN	Polysorbat-20
UCP	Uncoupling proteine
UCP1	Uncoupling Protein 1
VMN	ventromedialer hypothalamischer Nucleus
Ψ_m	Mitochondriales Membranpotential

Western Blot – Einzelergebnisse

T₃

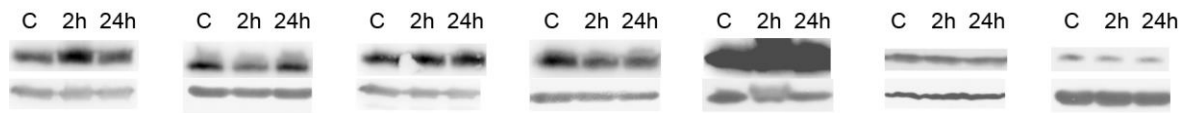


Abbildung 45: oben TOMM20, unten GAPDH

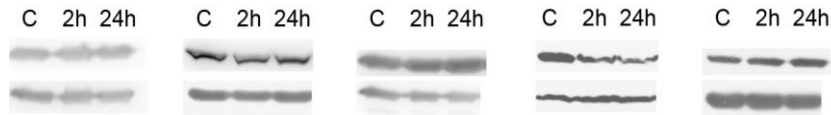


Abbildung 46: oben ATPβ, unten GAPDH

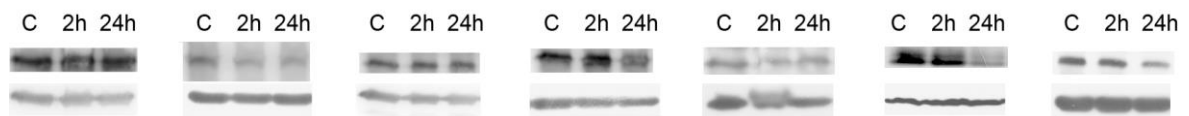


Abbildung 47: oben BNIP3, unten GAPDH

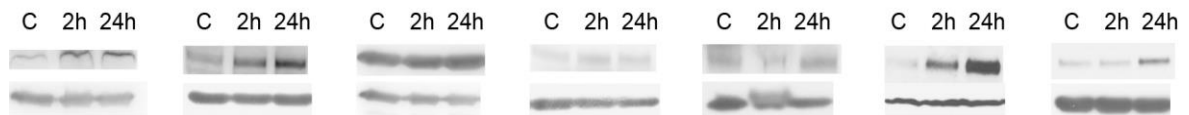


Abbildung 48: oben PGC1α, unten GAPDH

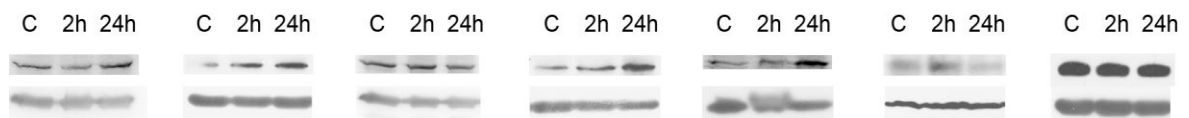


Abbildung 49: oben UCP1, unten GAPDH

T₂

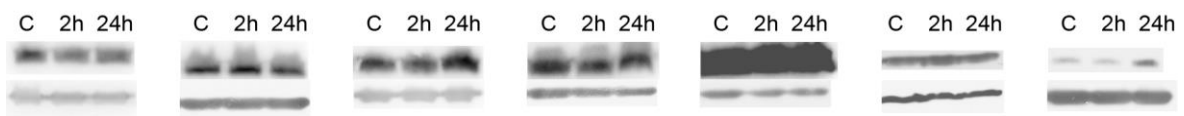


Abbildung 50: Oben TOMM20, unten GAPDH

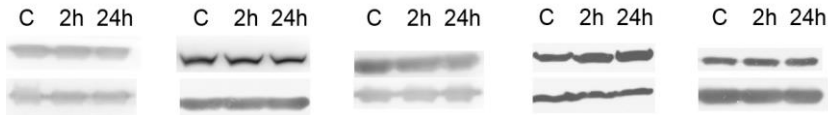


Abbildung 51: oben ATPβ, unten GAPDH

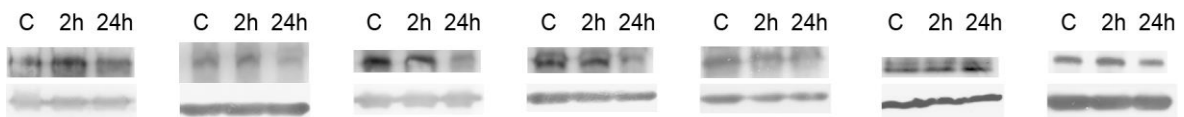


Abbildung 52: oben BNIP3, unten GAPDH

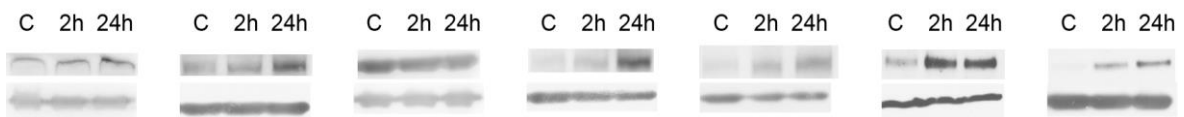


Abbildung 53: oben PGC1α, unten GAPDH

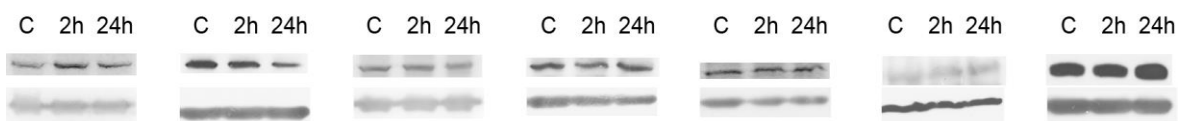


Abbildung 54: oben UCP1, unten GAPDH

T1AM – keine Vorstimulation

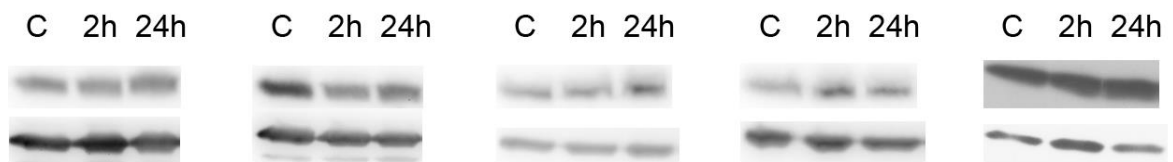


Abbildung 55: Oben TOMM20, unten GAPDH

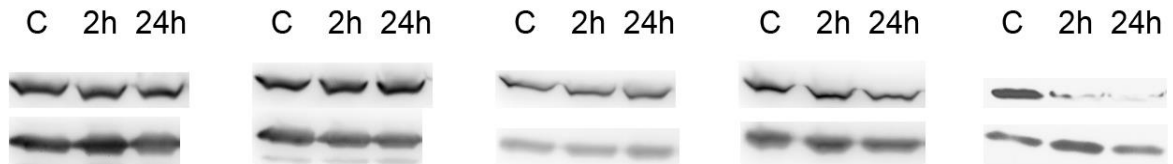


Abbildung 56: Oben ATPβ, unten GAPDH

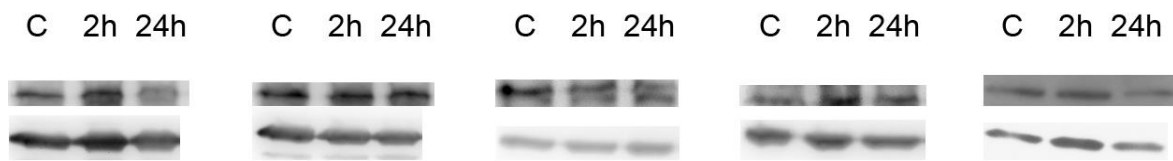


Abbildung 57: Oben BNIP3, unten GAPDH

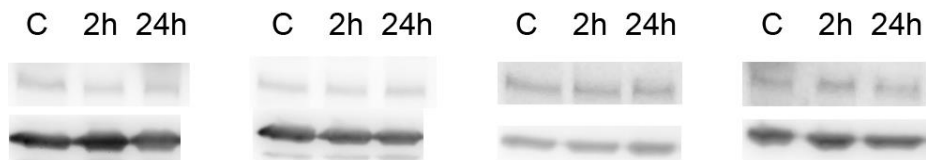


Abbildung 58: Oben PGC1α, unten GAPDH

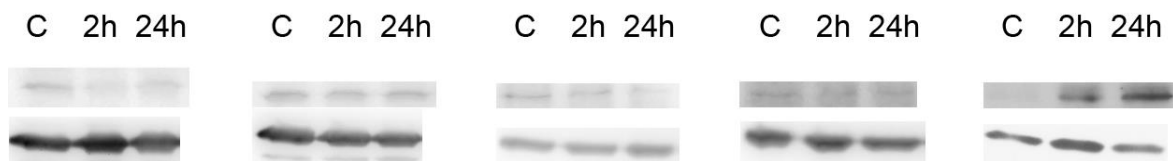


Abbildung 59: Oben UCP1, unten GAPDH

T1AM – Vorstimulation mit T₃

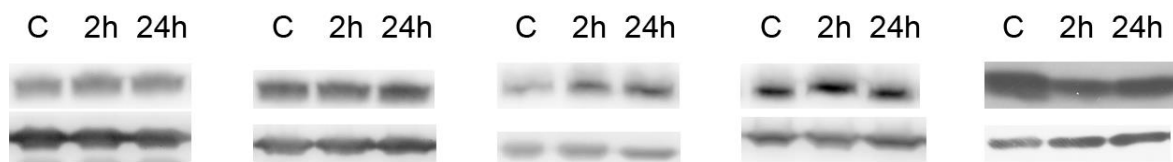


Abbildung 60: Oben TOMM20, unten GAPDH

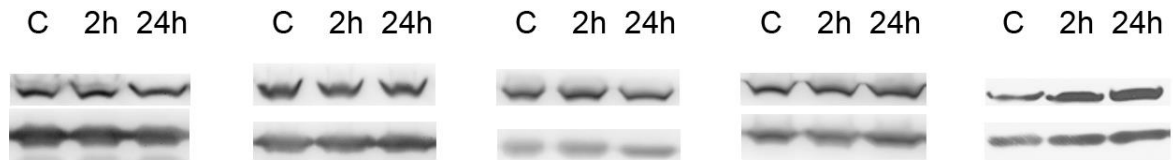


Abbildung 61: Oben ATPβ, unten GAPDH

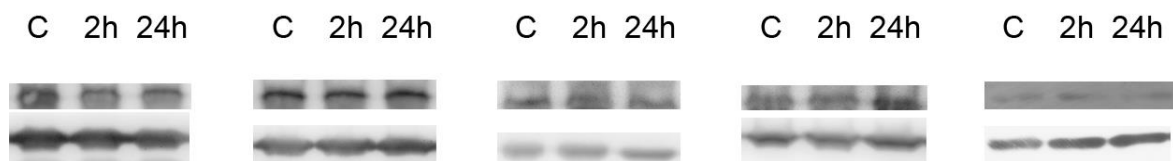


Abbildung 62: Oben BNIP3, unten GAPDH

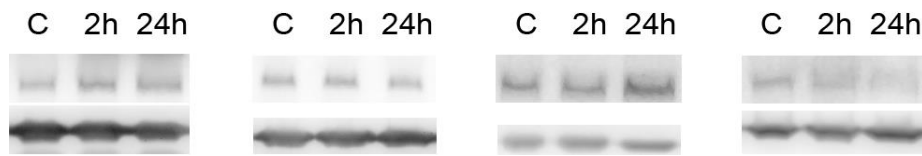


Abbildung 63: Oben PGC1α, unten GAPDH

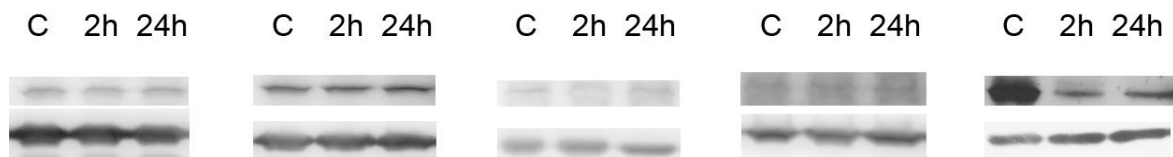


Abbildung 64: Oben: UCP1, unten GAPDH

Literaturverzeichnis

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie [Internet]. Biochemistry textbook. 2007. 1120 p. Available from: <http://books.google.com/books?id=jQKGAAAACAAJ>
2. Komarova SV, Ataullakhanov FI, Globus RK. Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C1220–9.
3. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* [Internet]. 2011 Feb [cited 2015 Jul 8];50(2):98–115. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3115691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2015 Nov 4];1504(1):82–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239487>
5. Villarroya F, Peyrou M, Giralt M. Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie*. 2017 Mar;134:86–92.
6. Weitzel JM, Iwen KA, Alexander Iwen K. Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2011 Aug 6 [cited 2015 Mar 13];342(1–2):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.009>
7. Vigié P, Camougrand N. Mitophagie et contrôle qualité des mitochondries. *Medecine/Sciences*. 2017;33(3):231–7.
8. Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM, Ryan MT. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol*. 2007 Sep;17(9):456–64.
9. Walker JE, Fearnley IM, Gay NJ, Gibson BW, Northrop FD, Powell SJ, et al. Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria. *J Mol Biol* [Internet]. 1985 Aug 20;184(4):677–701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864455>
10. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. 2004;84:277–359.
11. Iwen KA, Oelkrug R, Brabant G. Effects of thyroid hormones on thermogenesis and energy partitioning. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2018.

12. Richard D. Brown fat biology and thermogenesis. *Front Biosci* [Internet]. 2011;16(1):1233. Available from: <http://www.bioscience.org/2011/v16/af/3786/list.htm>
13. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829–39.
14. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Aug [cited 2015 Apr 7];293(2):E444–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473055>
15. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;360(15):1500–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0808718>
16. Ribeiro MO, Bianco SDC, Kaneshige M, Schultz JJ, Cheng SY, Bianco AC, et al. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2010;151(January):432–40.
17. Ueta CB, Olivares EL, Bianco AC. Responsiveness to thyroid hormone and to ambient temperature underlies differences between brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis in a mouse model of diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2011;152(September):3571–81.
18. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 2001 Feb;344(7):501–9.
19. Schroeder AC, Privalsky ML. Thyroid hormones, T₃ and T₄, in the brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5(MAR):1–6.
20. Edward Visser W, Visser TJ, Peeters RP. Metabolism of Thyroid Hormone. 2017;1. Available from: <http://www.thyroidmanager.org/>
21. Magnus-Levy A. Über den respiratorischen gaswechsel unter dem einfluss der thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen zuständen. *Berl Klin Wochenschr*. 1895;32:650–2.
22. Bianco AC, Maia AL, Da Silva WS, Christoffolete M a. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep*. 2005;25(August):191–208.
23. Rutigliano G, Zucchi R. Cardiac actions of thyroid hormone metabolites. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2017;458:76–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720717300035>

24. Schmidt BMW, Martin N, Georgens AC, Tillmann H-C, Feuring M, Christ M, et al. Nongenomic cardiovascular effects of triiodothyronine in euthyroid male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Apr;87(4):1681–6.
25. Ross DS, Burch HB, Cooper DS, Greenlee MC, Laurberg P, Maia AL, et al. 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. *Thyroid* [Internet]. 2016;26(10):1343–421. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2016.0229>
26. Kaptein EM, Beale E, Chan LS. Thyroid hormone therapy for obesity and nonthyroidal illnesses: A systematic review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(10):3663–75.
27. Biondi B, Klein I. Hypothyroidism as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Endocrine* [Internet]. 2004;24(1):001–14. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/ENDO:24:1:001>
28. Suh S, Kim DK. Subclinical Hypothyroidism and Cardiovascular Disease. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea)* [Internet]. 2015;30(3):246–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26248862> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4595347>
29. Biondi B. Mechanisms in endocrinology: Heart failure and thyroid dysfunction. *Eur J Endocrinol.* 2012 Nov;167(5):609–18.
30. Iwen KA, Schröder E, Brabant G. Thyroid Hormones and the Metabolic Syndrome. *Eur Thyroid J* [Internet]. 2013;2(2):83–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3821514&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
31. Iwen KA, Oelkrug R, Kalscheuer H, Brabant G. Metabolic Syndrome in Thyroid Disease. *Front Horm Res.* 2018;49:48–66.
32. Sinha RA, Bruinstroop E, Singh BK, Yen PM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hypercholesterolemia: Roles of Thyroid Hormones, Metabolites, and Agonists. *Thyroid.* 2019 Sep;29(9):1173–91.
33. Cioffi F, Senese R, Lanni A, Goglia F. Thyroid hormones and mitochondria: With a brief look at derivatives and analogues. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2013;379(1–2):51–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.006>
34. Weitzel JM, Hamann S, Jauk M, Lacey M, Filbry A, Radtke C, et al. Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2003 Oct;31(2):291–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519097>

35. Raasmaja A, Larsen PR. Alpha 1- and beta-adrenergic agents cause synergistic stimulation of the iodothyronine deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology* [Internet]. 1989 Nov [cited 2015 Nov 25];125(5):2502–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2571495>
36. Curcio-Morelli C, Zavacki AM, Christofollete M, Gereben B, de Freitas BCG, Harney JW, et al. Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 Jul [cited 2015 Nov 25];112(2):189–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=164294&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
37. Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* [Internet]. Jan [cited 2015 Nov 25];305(5936):712–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6633638>
38. Silva JE, Larsen PR. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest* [Internet]. 1985 Dec [cited 2015 Nov 25];76(6):2296–305. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=424353&tool=pmcentrez&render type=abstract>
39. Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, et al. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol*. 1994;266:R1371–82.
40. Silva JE, Rabelo R. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 1997 Mar 1 [cited 2015 Feb 18];136(3):251–64. Available from: <http://www.eje-online.org/content/136/3/251.abstract>
41. Branco M, Ribeiro M, Negrão N, Bianco AC. 3,5,3'-Triiodothyronine actively stimulates UCP in brown fat under minimal sympathetic activity. *Am J Physiol* [Internet]. 1999 Jan;276(1 Pt 1):E179-87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886965>
42. Hoefig CS, Jacobi SF, Warner A, Harder L, Schanze N, Vennström B, et al. 3-Iodothyroacetic acid lacks thermoregulatory and cardiovascular effects in vivo. *Br J Pharmacol*. 2015 Jul;172(13):3426–33.
43. Harder L, Schanze N, Sarsenbayeva A, Kugel F, Köhrle J, Schomburg L, et al. In vivo Effects of Repeated Thyronamine Administration in Male C57BL/6J Mice. *Eur Thyroid J*. 2018 Jan;7(1):3–12.
44. Gachkar S, Oelkrug R, Herrmann B, Scanlan TS, Sun Q, Biebermann H, et al. N- and O-Acetylated 3-Iodothyronamines Have No Metabolic or Thermogenic Effects in Male Mice. *Eur Thyroid J*. 2020 Feb;9(2):57–66.

45. Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F, et al. Are the effects of T₃ on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T₃ itself? *Endocrinology*. 2002;143(2):504–10.
46. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang S a., Simonides WS, et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 2008;29(7):898–938.
47. Kelly G. Peripheral metabolism of thyroid hormones: A review. *Altern Med Rev*. 2000;5(4):306–33.
48. SORIMACHI K, CAHNMANN HJ. A Simple Synthesis of [3,5- 125 I]Diiodo-L-Thyronine and of [3,5- 125 I]L-Thyroxine of High Specific Activity. *Endocrinology* [Internet]. 1977 Oct;101(4):1276–80. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-101-4-1276>
49. Pinna G, Meinhold H, Hiedra L, Thoma R, Hoell T, Gräf KJ, et al. Elevated 3,5-diiodothyronine concentrations in the sera of patients with nonthyroidal illnesses and brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(5):1535–42.
50. Senese R, Cioffi F, de Lange P, Leanza C, Iannucci LF, Silvestri E, et al. Both 3,5-diiodo-L-thyronine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine prevent short-term hepatic lipid accumulation via distinct mechanisms in rats being fed a high-fat diet. *Front Physiol*. 2017;8(SEP):1–9.
51. Fallahi P, Ferrari SM, Santini E, Camastra S, Frenzilli G, Puccini M, et al. Both 3,5-diiodo-L-thyronine (T₂) and T₃ modulate glucose-induced insulin secretion. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(2):503–8.
52. Lombardi A, Lanni A, de Lange P, Silvestri E, Grasso P, Senese R, et al. Acute administration of 3,5-diiodo-L-thyronine to hypothyroid rats affects bioenergetic parameters in rat skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett*. 2007;581:5911–6.
53. Lombardi A, Senese R, De Matteis R, Busiello RA, Cioffi F, Goglia F, et al. 3,5-Diiodo-L-thyronine activates brown adipose tissue thermogenesis in hypothyroid rats. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Nov 25];10(2):e0116498. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4319745&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Senese R, Cioffi F, De Matteis R, Petito G, de Lange P, Silvestri E, et al. 3,5 Diiodo-L-Thyronine (T₂) Promotes the Browning of White Adipose Tissue in High-Fat Diet-Induced Overweight Male Rats Housed at Thermoneutrality. *Cells*. 2019 Mar;8(3).
55. Piehl S, Heberer T, Balizs G, Scanlan TS, Smits R, Koksche B, et al. Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology*. 2008;149(6):3037–45.

56. Lanculescu AG, Giacomini KM, Scanlan TS. Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport. *Endocrinology*. 2009;150(April):1991–9.
57. Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, et al. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med*. 2004;10(6):638–42.
58. Khajavi N, Mergler S, Biebermann H. 3-Iodothyronamine, a Novel Endogenous Modulator of Transient Receptor Potential Melastatin 8? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:198.
59. Scanlan TS. Endogenous 3-iodothyronamine (T1AM): More than we bargained for. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(June):1674–6.
60. Braulke LJ, Klingenspor M, DeBarber a., Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, et al. 3-Iodothyronamine: A novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol*. 2008;178:167–77.
61. Lanculescu AG, Friesema ECH, Visser TJ, Giacomini KM, Scanlan TS. Transport of thyroid hormones is selectively inhibited by 3-iodothyronamine. *Mol Biosyst*. 2010 Aug;6(8):1403–10.
62. Klein J, Fasshauer M, Klein HH, Benito M, Ronald Kahn C. Novel adipocyte lines from brown fat: A model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *BioEssays*. 2002;24:382–8.
63. Cao Z, West C, Norton-Wenzel CS, Rej R, Davis FB, Davis PJ. Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocr Res*. 2009;34(4):101–8.
64. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;Vol. 4:155–81.
65. Kvetny J, Bomholt T, Pedersen P, Wilms L, Anthonsen S, Larsen J. Thyroid hormone effect on human mitochondria measured by flow cytometry. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(7):772–6.
66. Girardier L, Seydoux J, Clausen T. Membrane potential of brown adipose tissue. A suggested mechanism for the regulation of thermogenesis. *J Gen Physiol*. 1968 Dec;52(6):925–40.
67. Hernandez A, Obregon MJ. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2000;278(5):E769-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780931>
68. Tata JR, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pedersen S, Hedman R. The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J* [Internet]. 1963;86:408–28. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

69. Yau WW, Singh BK, Lesmana R, Zhou J, Sinha RA, Wong KA, et al. Thyroid hormone (T₃) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. *Autophagy*. 2019 Jan;15(1):131–50.
70. Cumero S, Fogolari F, Domenis R, Zucchi R, Mavelli I, Contessi S. Mitochondrial FoF₁-ATP synthase is a molecular target of 3-iodothyronamine, an endogenous metabolite of thyroid hormone. *Br J Pharmacol*. 2012;166(8):2331–47.
71. Bräunig J, Mergler S, Jyrch S, Hoefig CS, Rosowski M, Mittag J, et al. 3-Iodothyronamine Activates a Set of Membrane Proteins in Murine Hypothalamic Cell Lines. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:523.
72. Gachkar S, Oelkrug R, Martinez-Sanchez N, Rial-Pensado E, Warner A, Hoefig CS, et al. 3-Iodothyronamine Induces Tail Vasodilation Through Central Action in Male Mice. *Endocrinology*. 2017 Jun;158(6):1977–84.
73. Saba A, Chiellini G, Frascarelli S, Marchini M, Ghelardoni S, Raffaelli A, et al. Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology*. 2010;151(October):5063–73.
74. Friesema ECH, Grueters PA, Biebermann H, Krude H, Von Moers A, Reeser M, et al. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet*. 2004;364(9443):1435–7.
75. Ianculescu AG, Scanlan TS. 3-Iodothyronamine (T₁AM): a new chapter of thyroid hormone endocrinology? *Mol Biosyst*. 2010 Aug;6(8):1338–44.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Georg Brabant und PD Dr. Alexander Iwen für die Chance, in ihrer Arbeitsgruppe mitarbeiten zu dürfen und ihr Vertrauen, das es mir ermöglichte, viele Experimente selbst zu designen und zugleich für ihre ständige Erreichbarkeit und ihr produktives Feedback. Durch diese Freiheit konnte ich lernen, selbstständig zu arbeiten und wirklich wissenschaftlich tätig zu sein.

Ich danke Julia Resch, die mir mit viel Geduld viele Labortechniken beigebracht hat und mich in die praktische Arbeit eingeführt hat. Sie hat einige Western Blots für diese Arbeit beige-steuert und stand mir immer zur Seite, wenn ich Hilfe brauchte.

Ich danke Prof. Dr. Johannes Klein dafür, dass er mir die braunen Fettzellen seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt hat und ich danke seinen Arbeitsgruppenmitarbeiterinnen, allen voran, Frau Dr. Nina Perwitz, die mich in meiner Arbeit stets unterstützt hat und deren Anregungen und konstruktive Kritik mich nicht nur in den jeweiligen Methoden, die sie mir beibrachte, weitergebracht hat, sondern mich viel über die wissenschaftliche Methode und das Leben im Wissenschaftsbetrieb gelehrt hat. Sie hat mich überdies in die Zellkultur und die Nutzung des Oxographen eingeführt und stand mir bei Rückschlägen stets hilfreich zur Seite.

Ich danke Frau Dr. Stephanie Fliedner für wertvolle Anregungen und die Bereitstellung des Antikörpers gegen ATP-Synthase.

Ich danke Prof. Dr. Peter König und dem Institut für Anatomie für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Ich danke dem Institut für Systemische Entzündungsforschung ISEF insbesondere Dr. Tilmann Vollbrandt und Constanze Siggel für die Messungen am Durchflusszytometer.

Ich danke Prof. Dr. Olaf Jöhren vom Institut für Pharmakologie für die Bereitstellung des Fluoreszenzmessgerätes für die Oxoplate, sowie seine Einweisung und wertvolle Anregungen.

Ich danke Prof. Dr. Christian Sina vom Institut für Ernährungsmedizin für die Bereitstellung von β -CL (CL-316,243).

Ich danke Prof. Dr. Josef Köhrle vom Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité für sein Feedback bezüglich der Ergebnisse.

Ich danke Prof. Dr. Jens Mittag vom Center für Brain, Behavior and Metabolism (CBBM), Lübeck für das Gegenlesen der Doktorarbeit.

Ich danke der Universität zu Lübeck, die meine Arbeit mit ihrem Programm der „Lübecker Exzellenzmedizin“ gefördert hat und dem Cusanuswerk, das mich trotz der damit verbundenen längeren Studienzeit unterstützt hat.