

Aus der Klinik für Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des neuen Adipokines WISP1 bei Adipositas- assoziierten
Entzündungsreaktionen im Fettgewebe

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Veronica Murahovschi

aus Chisinau,
Republik Moldau

Datum der Promotion

04.09.2015

Inhalt

1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	3
2. Eidesstattliche Versicherung.....	4
3. Ausführliche Anteilserklärung an der Publikation.....	5
4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM).....	6
5. Druckexemplar der Publikation.....	7
6. Lebenslauf.....	21
7. Publikationsliste.....	23
8. Literaturverzeichnis.....	25
9. Danksagung.....	26

1.1 Zusammenfassung

Übergewicht und Fettleibigkeit sind mit vielen gesundheitlichen Problemen wie einem erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes, Fettleber, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs assoziiert. WNT1-inducible-signaling pathway protein 1 (WISP1), auch bekannt als CCN4, gehört zu der CCN Familie der extrazellulären Matrix assoziierten Signalwegproteinen und ist ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges [1]. Neue Untersuchungen zeigen, dass über den Wnt-Signalweg die Adipogenese reguliert wird und eine enge Verbindung mit der Entstehung des metabolischen Syndroms besteht [2]. In vorliegender Arbeit wurde die Auswirkung von Übergewicht, Gewichtsreduktion und Insulin auf die *WISP1*- Genexpression und die Freisetzung *in vitro* und *in vivo* bei Menschen untersucht. Außerdem wurde die entzündungsfördernde Wirkung von WISP1 in Zellkulturexperimenten mit humanen Adipozyten und Immunzellen näher charakterisiert.

Die Ergebnisse unserer klinischen Studien zeigen eine erhöhte *WISP1*- Genexpression im viszeralen Fettgewebe. In den Zellkulturversuchen wurde ein Anstieg der WISP1-Freisetzung während der humanen Adipozytendifferenzierung nachgewiesen. Die *WISP1*-Genexpression wurde durch die Gewichtsveränderungen bei Mäusen im Fettgewebe reguliert. Zudem beobachteten wir eine Senkung der WISP1- Konzentration im Plasma von weiblichen Probanden nach Gewichtsreduktion. In den humanen Studien korrelierte die *WISP1*- Genexpression positiv mit Makrophageninfiltration in das Fettgewebe und negativ mit Insulinsensitivität sowie zirkulierenden Adiponektinspiegeln. Weiterhin wurden die proinflammatorischen Effekte von WISP1 in Zellkulturexperimenten mit primären humanen Makrophagen nachgewiesen. Desweiteren wurde untersucht, ob zwischen WISP1 und der ektopischen Fettakkumulation in der Leber ein Zusammenhang besteht. Dafür wurde die *WISP1*- Genexpression in Leberproben von Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleber (NASH) mit der Kontrollgruppe ohne NASH verglichen. Es wurde keine Korrelation zwischen dem Krankheitsaktivitätsscore, dem Leberfettgehalt und der *WISP1*- Genexpression festgestellt. WISP1 wurde durch Insulin in den humanen Adipozyten und in den 3T3-L1 differenzierten Adipozyten *in vitro* hochreguliert. Wir konnten jedoch keine akute *WISP1* Regulation durch Insulin im subkutanen Fettgewebe bei übergewichtigen Probanden nach einem euglycemischen-hyperinsulinämischen und hyperglycemischen-hyperinsulinämischen Clamp feststellen.

Diese Arbeit beschreibt erstmals WISP1 als ein neues, proinflammatorisches Adipokin, welches bei zentraler Adipositas u. a. aus dem viszeralen Fettgewebe freigesetzt wird. Somit

ist WISP1 ein Zielmolekül für die Therapie der Adipositas und den Adipositas assoziierten Folgeerkrankungen.

1.2 Abstract

Overweight and obesity are highly associated with enhanced risk of Type-2-Diabetes, fatty liver, cardiovascular disease and cancer. WISP1, also known as CCN4, belongs to the CCN (acronym for Connective tissue growth factor (CTGF), cysteine rich protein (Cyr61), and Nephroblastoma overexpressed gene (nov)) family of extracellular matrix-associated signalling proteins and is a target gene of the canonical Wnt-signaling pathway [1]. Increasing evidence indicates that Wnt-signalling is an important adipogenesis regulator and is associated with the development of the metabolic syndrome [2]. The aim of this work was to analyse the effects of overweight, weight loss and insulin on *WISP1* (WNT1-inducible-signaling pathway protein 1) gene expression and release in humans. In addition, the pro-inflammatory effects of WISP1 on immune cells and adipocytes were investigated in detail.

The results of this work showed an increased gene expression of *WISP1* in visceral adipose tissue in humans. In cell culture experiments, we observed that WISP1 release increases during human adipocyte differentiation. *WISP1* gene expression was regulated by weight changes in mice. Furthermore, we observed a decrease of WISP1 concentration in plasma in female subjects after weight loss. *WISP1* gene expression correlated positively with macrophage infiltration in adipose tissue and negatively with insulin sensitivity as well as adiponectin level in human studies. The pro-inflammatory effects of WISP1 were shown in cell culture experiments with primary human macrophages. Further, we investigated the link between WISP1 and ectopic fat accumulation by comparing the gene expression of *WISP1* in liver samples of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NASH) to a control group. We couldn't identify any correlation between disease activity score, liver fat content and *WISP1* gene expression in these groups. In addition, *WISP1* gene expression was up-regulated by insulin in human adipocytes and 3T3-L1 differentiated adipocytes *in vitro*, but no regulation of *WISP1* gene expression by insulin was observed in subcutaneous adipose tissue in patients who underwent the hyperglycemic- hyperinsulinemic clamp.

Our data show for the first time, that WISP1 is a novel pro-inflammatory adipokine, released i.a. from visceral adipose tissue in central adiposity. Thus, WISP1 is a novel therapeutic target of obesity and obesity-associated disorders.

2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Veronica Murahovschi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des neuen Adipokines WISP1 bei Adipositas-assoziierten Entzündungsreaktionen im Fettgewebe“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

3 Ausführliche Anteilserklärung an der Publikation

Publikation : V. Murahovschi, O. Pivovarova, I. Ilkavets, R. M. Dmitrieva, S. Docke, F. Keyhani-Nejad, O. Gogebakan, M. Osterhoff, M. Kemper, S. Hornemann, M. Markova, N. Kloting, M. Stockmann, M. O. Weickert, V. Lamounier-Zepter, P. Neuhaus, A. Konradi, S. Dooley, C. von Loeffelholz, M. Bluher, A. F. H. Pfeiffer, N. Rudovich. **WISP1 is a novel adipokine linked to inflammation in obesity**, Diabetes. 2015 März 15.

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an der Idee und an der Konzeption des Artikels; Interpretation der Ergebnisse sowie die Verfassung der Arbeit in Zusammenarbeit mit den Koautoren; Beteiligung an der Überarbeitung des Manuskriptes; Testen des WISP1 ELISA Kits, WISP1 Messung in humanen Plasmaproben aus den Kohorten II und IV und die Auswertung der Daten;

Mitwirkung bei der Etablierung der Zellkultur von primären humanen Adipozyten aus subkutanem Fettgewebe; Gewinnung primärer humaner mesenchymaler Stammzellen aus Fettbiopsien; Gewinnung primärer humaner Monozyten aus Blutproben; Planung und Durchführung der Zellkulturversuche; Statistische Auswertung der *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Daten; Aufarbeitung der Proben für molekularbiologische Analysen; Durchführung der RT-PCR und die Auswertung der Ergebnisse; Das Testen der Antikörper und die Anfertigung der Western Blot Analysen, zum Teil mit Hilfe der Koautoren; Auswertung der Western Blot Analysen;

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

JCR-Web 4.5 Journal Summary List

http://admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR?RQ=LIST_SUMM..

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]

WELCOME HELP

2013 JCR Science Edition

Journal Summary List

Journals from: **subject categories ENDOCRINOLOGY & METABOLISM** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

[Journal Title Changes](#)

Sorted by: Impact Factor [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 123)

Navigation icons

Page 1 of 7

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ⁱ						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	ENDOCR REV	0163-769X	13623	19.358	24.124	3.400	25	>10.0	0.02068	8.524
<input type="checkbox"/>	2	CELL METAB	1550-4131	15636	16.747	17.878	3.052	153	4.5	0.07873	8.185
<input type="checkbox"/>	3	NAT REV ENDOCRINOL	1759-5029	2753	12.958	11.843	1.804	56	2.7	0.01608	4.312
<input type="checkbox"/>	4	TRENDS ENDOCRIN MET	1043-2760	6047	8.868	8.936	1.681	69	5.5	0.01917	3.311
<input type="checkbox"/>	5	DIABETES CARE	0149-5992	52771	8.570	8.462	2.233	626	7.2	0.10565	2.571
<input checked="" type="checkbox"/>	6	DIABETES	0012-1797	49801	8.474	9.105	2.212	425	8.4	0.09335	3.119
<input type="checkbox"/>	7	OBES REV	1467-7881	6388	7.859	7.922	2.076	105	4.5	0.02105	2.568
<input type="checkbox"/>	8	J PINEAL RES	0742-3098	6136	7.812	5.961	2.011	88	5.9	0.00753	0.918
<input type="checkbox"/>	9	ANTIOXID REDOX SIGN	1523-0864	14273	7.667	8.499	2.248	306	4.1	0.04464	2.489
<input type="checkbox"/>	10	FRONT NEUROENDOCRIN	0091-3022	3070	7.581	10.579	1.160	25	5.4	0.00932	3.398
<input type="checkbox"/>	11	DIABETOLOGIA	0012-186X	26485	6.880	6.835	1.532	284	7.5	0.05552	2.227
<input type="checkbox"/>	12	J BONE MINER RES	0884-0431	23020	6.589	6.520	1.324	250	8.3	0.04442	2.104
<input type="checkbox"/>	13	J CLIN ENDOCR METAB	0021-972X	69351	6.310	6.479	1.148	788	8.6	0.11799	1.985
<input type="checkbox"/>	14	CURR OPIN LIPIDOL	0957-9672	3898	5.803	6.017	1.230	61	6.3	0.00963	1.920
<input type="checkbox"/>	15	FREE RADICAL BIO MED	0891-5849	32994	5.710	5.983	0.852	399	8.3	0.05157	1.551
<input type="checkbox"/>	16	PSYCHONEUROENDOCRINO	0306-4530	10669	5.591	6.090	0.893	318	5.8	0.02402	1.691
<input type="checkbox"/>	17	DIABETES OBES METAB	1462-8902	5300	5.456	4.459	1.520	171	3.8	0.01771	1.276
<input type="checkbox"/>	18	INT J OBESITY	0307-0565	19384	5.386	5.880	1.363	237	8.2	0.03647	1.917
<input type="checkbox"/>	19	J CEREBR BLOOD F MET	0271-678X	14721	5.339	5.373	0.923	233	8.0	0.02879	1.751
<input type="checkbox"/>	20	J MAMMARY GLAND BIOL	1083-3021	2245	5.000	6.163	1.000	32	7.3	0.00519	2.029

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 123)

Navigation icons

Page 1 of 7

[Acceptable Use Policy](#)
Copyright © 2014 [Thomson Reuters](#).

 THOMSON REUTERS
Published by Thomson Reuters

5. Druckexemplar der Publikation

<http://dx.doi.org/10.2337/db14-0444>

6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7. Publikationsliste

V. Murahovschi, O. Pivovarova, I. Ilkavets, R. M. Dmitrieva, S. Docke, F. Keyhani-Nejad, O. Gögebakan, M. Osterhoff, M. Kemper, S. Hornemann, M. Markova, N. Klötting, M. Stockmann, M. O. Weickert, V. Lamounier-Zepter, P. Neuhaus, A. Konradi, S. Dooley, C. von Loeffelholz, M. Blüher, A. F. H. Pfeiffer, N. Rudovich. *Diabetes* März 2015

O. Pivovarova, S. Hornemann, S. Weimer, Y. Lu, **V. Murahovschi**, S. Zhuk, A. C. Seltmann, A. Malashicheva, A. Kostareva, M. Kruse, A. Busjahn, N. Rudovich, A. F. H. Pfeiffer. Regulation of nutrition-associated receptors in blood monocytes of normal weight and obese humans. *Regulatory Peptides*. 2014 Nov 20.

O. Pivovarova, S. Hornemann, Y. Lu, S. Möckel, **V. Murahovschi**, A.-C. Seltmann, M. Kruse, J. Mazuch, N. Rudovich, A. Kramer, A. Busjahn, A. F.H. Pfeiffer. Changes of dietary fat and carbohydrate content alter central and peripheral clock in humans. *JCEM* 2015 März 26

Pivovarova O, von Loeffelholz C, Ilkavets I, Sticht C, Zhuk S, **Murahovschi V**, Lukowski S, Döcke S, Kriebel J, de Las Heras Gala T, Malashicheva A, Kostareva A, Lock JF, Stockmann M, Grallert H, Gretz N, Dooley S, Pfeiffer AF, Rudovich N. Modulation of Insulin Degrading Enzyme activity and liver cell proliferation. *Cell Cycle*. 2015 Mai

Kongressbeiträge

V. Murahovschi, O. Pivovarova, I. Ilkavets, R. M. Dmitrieva, S. Döcke, F. Keyhani Nejad, Ö. Gögebakan, M. Osterhoff, N. Klötting, M. Stockmann, P. Neuhaus, A. Conradi, S. Dooley, C. von Loeffelholz, M. Blüher, A. F.H. Pfeiffer, N. Rudovich 2014 „WISP1 is a novel adipokine linked to inflammation and insulin resistance in visceral fat.“ 50th EASD Annual Meeting, Vienna, Poster Präsentation

C. Tacke, V. Murahovschi, F. Keyhani-Nejad, O. Pivovarova, I. Ilkavets, M. Kemper, S. Hornemann, R. Dmitrieva, A. Conradi, S. Dooley, A.F.H. Pfeiffer, N. Rudovich 2014 “Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) is a novel marker of obesity regulated by high fat diet.” 50th EASD Annual Meeting, Vienna, Poster Präsentation

V. Murahovschi, O. Pivovarova, I. Ilkavets, R. M. Dmitrieva, S. Döcke, F. Keyhani Nejad, Ö. Gögebakan, M. Osterhoff, N. Klötting, M. Stockmann, P. Neuhaus, A. Conradi, S. Dooley, C. von Loeffelholz, M. Blüher, A. F.H. Pfeiffer, N. Rudovich 2014 „WISP1 is a novel adipokine linked to inflammation and obesity.“ Oral Presentation on NuGo International course on “Signal proteins related diet and exercise” University of Oslo, Oslo, Norway

N. Rudovich, V. Murahovschi, O. Pivovarova, I. Ilkavets, R. M. Dmitrieva, S. Döcke, F. Keyhani Nejad, Ö. Gögebakan, M. Osterhoff, N. Klötting, M. Stockmann, P. Neuhaus, A. Conradi, S. Dooley, C. von Loeffelholz, Matthias Blüher, A. F.H. Pfeiffer, 2014 “Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) is a novel adipokine linked to inflammation

and insulin resistance in visceral fat.” The 74th Scientific Sessions of American Diabetes Association, San Francisco, Poster Präsentation

V. Murahovschi, O. Pivovarova, I. Ilkavets, R. M. Dmitrieva, S. Döcke, F. Keyhani Nejad, Ö. Gögebakan, M. Osterhoff, N. Klötting, M. Stockmann, P. Neuhaus, A. Conradi, S. Dooley, C. von Loeffelholz, M. Blüher, A. F.H. Pfeiffer, N. Rudovich 2014 “Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) is a novel adipokine linked to inflammation and insulin resistance in visceral fat.” DZD Satelliten Workshop in Tübingen, Poster Präsentation

V. Murahovschi, O. Pivovarova, I. Ilkavets, R. M. Dmitrieva, N. Klötting, M. Stockmann, P. Neuhaus, A. Conradi, S. Dooley, M. Blüher, A. F.H. Pfeiffer, N. Rudovich 2014 “WISP1 (Wnt1 inducible signaling pathway protein 1) is a novel marker of adipose tissue inflammation.” 57. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), Dresden, Poster Präsentation

V. Murahovschi, I. Ilkavets, O. Pivovarova, R. Dmitrieva, S. Döcke, C. von Loeffelholz, S. Dooley, A.F.H. Pfeiffer, N. Rudovich, 2013 “WISP1 (Wnt1 inducible signalling pathway protein 1) is a novel marker of adipose tissue differentiation and obesity.” 49th *EASD* Annual Meeting, Barcelona, Poster Präsentation

V. Murahovschi, I. Ilkavets, O. Pivovarova, R. M. Dmitrieva, S. Dooley, A. F.H. Pfeiffer, N. Rudovich 2013 “WISP1 (Wnt1 inducible signaling pathway protein 1) ist ein neuer Marker der Fettgewebedifferenzierung und Adipositas.” 48. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG), Leipzig, Poster Präsentation

V. Murahovschi, O. Pivovarova, S. Zhuk, A. Malashicheva, A.F.H. Pfeiffer, N.N. Rudovich 2012 “GIP-dependent regulation of endothelial factors and cytokine release in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC), human macrophages and their coculture.” 55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), Mannheim, Oral Presentation

8. Literaturverzeichnis

[1] K. Maiese: WISP1: Clinical Insights for a Proliferative and Restorative Member of the CCN Family. *Curr Neurovasc Res.* 2014; 11(4):378-89

[2] H. Clevers, R. Nusse: Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* 2012; 149(6):1192-205

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas F. H. Pfeiffer für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese Promotion durchführen zu können. Für seine Unterstützung und wertvolle fachliche Diskussionen bin ich sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Natalia Rudovich, die mich mit hilfreichen Besprechungen und wertvollen Ideen und Anregungen stetig unterstützt hat.

Frau Dr. Olga Pivovarova danke ich für die Hilfe bei den methodischen Entwicklungen, für die konstruktive Diskussionen und Anregungen. Zu einem großen Dank bin ich auch unseren Kooperationspartner und Koautoren für die erfolgreiche und produktive Zusammenarbeit verbunden.

Frau Mariya Markova, Frau Katrin Sprengel, Frau Farnaz Keyhani-Nejad, Herrn Christopher Tacke, Frau Tanja Ahrens, Frau Katharina Keßler danke ich für die Unterstützung in methodischen Fragestellungen und Hilfe in tägliche Laborarbeit. Frau June Inderthal und Frau Berit Schmidt danke ich für die hilfreiche Unterstützung während der täglichen Arbeit. Frau June Inderthal danke ich ganz herzlich für das englische Korrekturlesen des Manuskriptes und der englischen Zusammenfassung meiner Doktorarbeit. Nicht zuletzt gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe Klinische Ernährung am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke für freundliche Atmosphäre und gute Zusammenarbeit.