

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# **Untersuchungen zum Renin-Angiotensin-System in felines und caninen Adipozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Janine Riedel**

Tierärztin aus Dessau

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3598

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

adipocytes, cell culture, cell differentiation, cats, dogs, gene expression,  
angiotensin, angiotensinogen, renin

Tag der Promotion: 31.01.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-272-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht  
mit einem Schlußpunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“

Hermann Hesse

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1	Das Fettgewebe .....	8
1.1.1	Aufbau .....	8
1.1.2	Entwicklung .....	8
1.1.3	Funktion des Fettgewebes .....	11
1.2	Das Renin-Angiotensin-System.....	12
1.2.1	Das systemische Renin-Angiotensin-System .....	12
1.2.2	Das lokale Renin-Angiotensin-System .....	15
1.3	Die pathophysiologische Bedeutung des RAS.....	17
1.3.1	Adipositas und deren assoziierte Erkrankungen beim Menschen .....	17
1.3.2	Adipositas und deren assoziierte Erkrankungen bei Katzen und Hunden .....	19
1.4	Zielsetzung .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
2.1	Proben .....	21
2.2	Laborgeräte.....	21
2.3	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.4	Reagenzien .....	22
2.5	Reagenzien für die PCR.....	24
2.6	Primer .....	24
2.7	Kits.....	25
2.8	Hergestellte Lösungen .....	26
2.9	Hergestellte Medien .....	27
2.10	Software, Datenbanken.....	28
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>29</b>
3.1	Bestimmung des Ernährungszustandes der Tiere .....	29
3.2	Isolierung der Adipozyten und Präadipozyten .....	29
3.3	Zellkultur .....	30
3.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	30
3.3.2	Passagierung der Zellen .....	30
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	30
3.3.4	Kryokonservierung der Zellen.....	31
3.3.5	Auftauen der kryokonservierten Zellen .....	31
3.3.6	Optimierung der Zellkulturbedingungen für die Differenzierung der Präadipozyten .....	31
3.3.6.1	Medien für die Differenzierung .....	31

3.3.6.2	Differenzierungsprotokoll.....	31
3.3.6.3	Ko-Kultur mit maturen Adipozyten.....	32
3.3.6.4	Dedifferenzierung maturer Adipozyten („ceiling culture“ ).....	32
3.3.6.5	Explantate.....	33
3.3.7	Kommerzielle feline Präadipozyten .....	33
3.3.8	Färbungen.....	34
3.3.8.1	Oil Red O Färbung .....	34
3.3.8.2	Nile Red Färbung.....	34
3.4	Molekularbiologische Untersuchungen .....	35
3.4.1	RNA-Isolierung.....	35
3.4.1.1	RNA-Isolierung aus maturen Adipozyten.....	35
3.4.1.2	RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen.....	35
3.4.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren .....	36
3.4.3	Kontrolle der Integrität der RNA .....	36
3.4.4	DNase I – Behandlung .....	37
3.4.5	Reverse Transkription .....	37
3.4.6	PCR .....	38
3.4.7	Gradienten-PCR zur Ermittlung der primerspezifischen Temperaturoptima.....	38
3.4.8	DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	39
3.4.9	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	40
3.4.10	Sequenzierung der PCR-Produkte .....	40
3.4.11	Real-Time-PCR.....	40
3.5	Datenverarbeitung und Statistik .....	42
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
4.1	Zellkultur .....	43
4.1.1	Etablierung einer Primärzellkultur aus Fettgewebe.....	43
4.1.1.1	Kultivierung und Differenzierung der Präadipozyten des Zellpellets .....	43
4.1.1.1.1	Medien für die Differenzierung .....	43
4.1.1.1.2	Differenzierungsprotokoll.....	45
4.1.1.1.3	Differenzierungsergebnisse der felines und caninen Zellen.....	45
4.1.1.1.4	Ko-Kultur mit maturen Adipozyten .....	47
4.1.1.2	Dedifferenzierung maturer Adipozyten („ceiling culture“ ).....	48
4.1.1.3	Explantate.....	49
4.1.2	Kommerzielle feline Präadipozyten .....	50
4.2	Molekularbiologische Untersuchungen .....	54
4.2.1	Untersuchungen zur Genexpression im felines Fettgewebe.....	54

---

4.2.1.1	Genexpression während der Adipogenese feline Prädipozyten <i>in vitro</i> ..54	
4.2.1.1.1	Zelltypspezifische Genexpression .....	55
4.2.1.1.2	Angiotensinogen .....	58
4.2.1.1.3	Enzyme des RAS .....	58
4.2.1.1.4	Rezeptoren des RAS .....	60
4.2.1.2	Genexpression in den feline isolierten muren Adipozyten .....	63
4.2.1.2.1	Vergleich der Genexpression zwischen viszerale und subkutanen Adipozyten .....	63
4.2.1.2.2	Vergleich der Genexpression zwischen den viszerale und subkutanen Adipozyten unter Berücksichtigung des BCS .....	69
4.2.1.2.3	Vergleich der Genexpression zwischen Katzen mit niedrigem und hohem BCS unter Berücksichtigung des Fettdepots .....	72
4.2.1.2.4	Untersuchungen zur Korrelation zwischen den verschiedenen feline Genexpressionsdaten .....	78
4.2.2	Untersuchungen zur Genexpression im caninen Fettgewebe .....	84
4.2.2.1	Zelltypspezifische Genexpression .....	84
4.2.2.2	Angiotensinogen .....	86
4.2.2.3	Enzyme des RAS .....	86
4.2.2.4	Rezeptoren des RAS .....	86
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>88</b>
5.1	Etablierung einer Primärzellkultur aus Fettgewebe.....	88
5.2	Genexpression in den feline Zellen .....	95
5.2.1	Genexpression während der Adipogenese feline Prädipozyten <i>in vitro</i> .....	95
5.2.2	Genexpression in den feline isolierten muren Adipozyten.....	99
5.2.2.1	Vergleich der Genexpression zwischen viszerale und subkutanen Adipozyten .....	99
5.2.2.2	Vergleich der Genexpression zwischen Katzen mit unterschiedlichem Ernährungsstatus .....	102
5.2.2.3	Untersuchungen zur Korrelation zwischen den verschiedenen feline Genexpressionsdaten .....	104
5.3	Genexpression in den caninen Zellen .....	106
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>

<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>121</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>136</b>
<b>14</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>138</b>

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Das Fettgewebe**

### **1.1.1 Aufbau**

Morphologisch und funktionell betrachtet gibt es bei den Säugetieren zwei Fettgewebsarten, das braune und das weiße Fettgewebe. Ersteres besteht aus ca. 20–40 µm großen plurivakulären Adipozyten, die eine hohe Anzahl an Mitochondrien aufweisen. Diese enthalten das Uncoupling Protein 1 (UCP1) und ermöglichen damit die zitterfreie Thermogenese bei Neugeborenen und Winterschläfern. Die Fettzellen des weißen Fettgewebes dagegen enthalten lichtmikroskopisch nur einen einzigen Lipidtropfen. Sie sind somit univakulär und mit einem Durchmesser von 40–120 µm größer als die Zellen des braunen Fettgewebes. Der Zellkern sowie die weiteren Zellorganellen werden durch den Lipidtropfen an den Rand gedrängt, so dass die typische Siegelringform der Fettzelle entsteht (Cinti 2002; Grether-Beck & Krutmann 2010; Poulos *et al.* 2010a).

Neben den Adipozyten besteht das Fettgewebe aus Endothelzellen, Präadipozyten, mesenchymalen Stammzellen, Fibroblasten, Monozyten bzw. Makrophagen und Nervenfasern (Hauner 2004). Die Zellzusammensetzung variiert je nach Lokalisation des Fettgewebes im Körper. Zu unterscheiden sind subkutanes und intraabdominales Fettgewebe, wobei letzteres aus dem viszeralen und dem retroperitonealen Fett besteht. Das viszerale Fett unterteilt sich wiederum in das omentale und das mesenteriale Fett (Wajchenberg 2000). Aufgrund seiner starken Innervation und Vaskularisierung sind im viszeralen Fettgewebe mehr Endothelzellen und Nervenfasern als im subkutanen Fettgewebe zu finden (Hauner 2004). Darüber hinaus gibt es eine stärkere Infiltration mit Monozyten und Makrophagen (Bornstein *et al.* 2000).

### **1.1.2 Entwicklung**

Bei den meisten Säugerspezies beginnt die Ausbildung des Fettgewebes bereits pränatal. Nach der Geburt nimmt die Menge des Fettgewebes rasant zu. Dies kann einerseits durch Lipogenese und damit verbundener Vergrößerung der Adipozyten, also durch Hypertrophie, erreicht werden, andererseits durch eine Zunahme der Adipozytenzahl, einer sogenannten Hyperplasie (Gregoire *et al.* 1998; Poulos *et al.* 2010a). Letztere findet beim Menschen vor allem in der Kindheit und Jugend statt. Im Erwachsenenalter dagegen steht bei der Gewichtszunahme eine Hypertrophie im Vordergrund. Dass die Adipogenese, also die

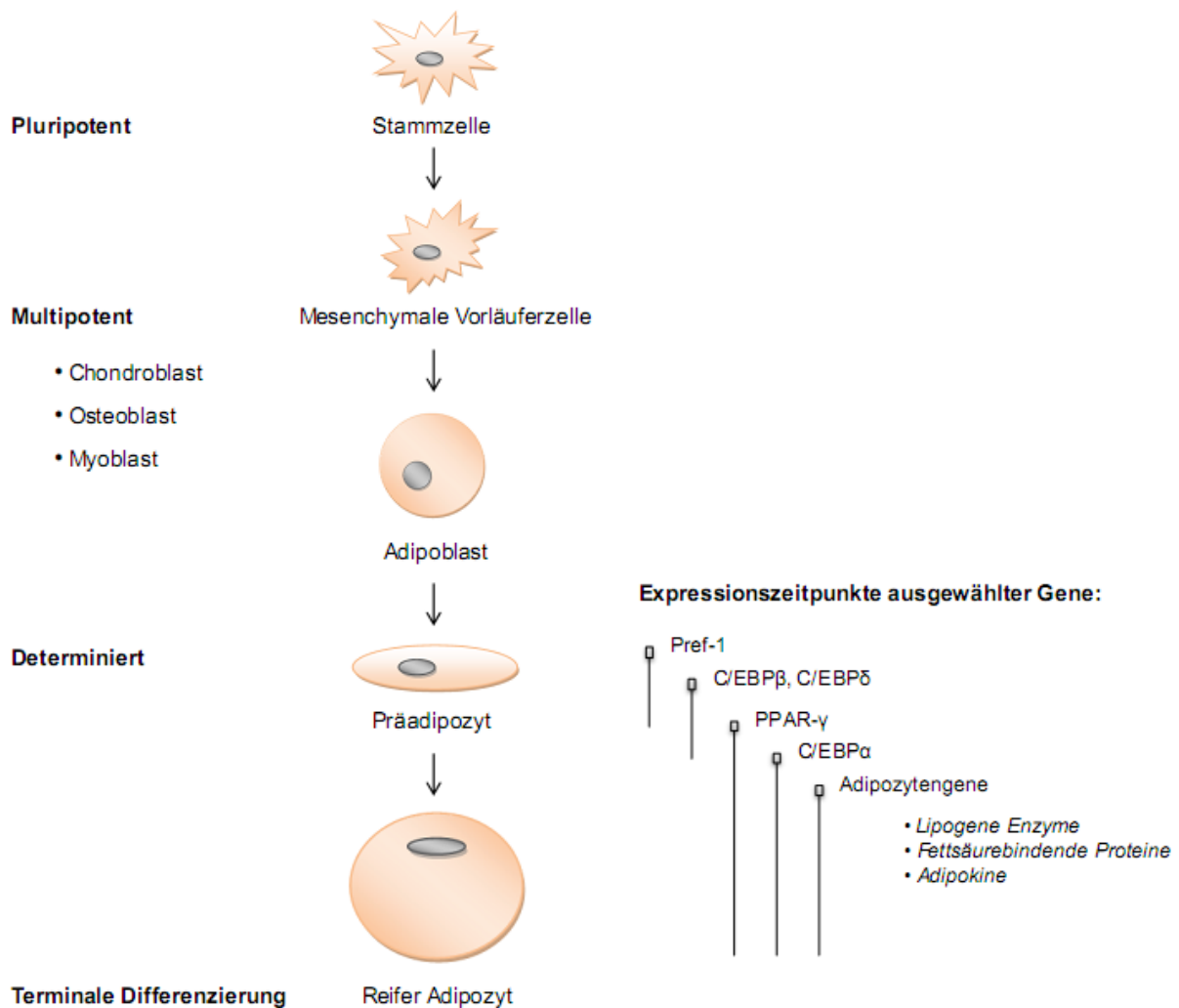


Entwicklung von Fettzellen aus Präadipozyten, aber auch noch im adulten Stadium von Bedeutung ist, zeigt eine Studie von Spalding *et al.* (2008). Demnach werden beim erwachsenen Menschen jedes Jahr ungefähr 10 % aller Fettzellen erneuert.

Wie in der Abbildung 1 zu erkennen ist, stellen pluripotente Stammzellen den Ausgangspunkt der Adipogenese dar. Diese differenzieren zu multipotenten mesenchymalen Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen sich in Chondro-, Osteo-, Myo- sowie Adipoblasten zu entwickeln (Gregoire *et al.* 1998). Die aus den Adipoblasten hervorgehenden Präadipozyten können ruhen, proliferieren oder in mature lipidgefüllte Adipozyten differenzieren (Poulos *et al.* 2010a). Diese letzte terminale Differenzierungsphase wurde hauptsächlich an den murinen Präadipozytenzelllinien 3T3-L1 und 3T3-F442A untersucht. Demnach ist ein Proliferationsstopp, der normalerweise durch Kontaktinhibition erreicht wird, nötig, um die weitere Differenzierung einzuleiten. Anschließend erfolgen bei den Zelllinien ein bis zwei Zellteilungen. Humane Präadipozyten dagegen differenzieren auch ohne postkonfluente Mitose (Rosen & MacDougald 2006).

Mit der fortschreitenden Veränderung des Phänotyps, vom fibroblastischen Typ der Präadipozyten hin zur sphärischen Form der maturen Fettzellen, ändert sich auch die Expression von mehr als 2000 Genen (Gregoire 2001). Entscheidend für die Regulation der Genexpression während der Adipogenese sind die Transkriptionsfaktoren Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) und CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ). Da bisher noch kein anderer Faktor gefunden wurde, der in Abwesenheit von PPAR- $\gamma$  die Adipogenese fördert und die meisten proadipogenen Faktoren letztendlich über seine Expression bzw. Aktivierung zu funktionieren scheinen, wird PPAR- $\gamma$  als Hauptregulator angesehen (Rosen & MacDougald 2006). Induziert wird er durch C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$ , die in der frühen Phase der Adipogenese exprimiert werden. Nach Bindung diverser Liganden, wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Eicosanoide, kann PPAR- $\gamma$  ein Heterodimer mit Retinoid X Receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) bilden und an das PPAR-response Element der DNA binden. Dies führt zur Transaktivierung verschiedener adipozytenspezifischer Gene, wie zum Beispiel Enzyme des Triacylglycerin- und Fettsäurestoffwechsels (Rosen & Spiegelman 2000; Cho *et al.* 2008). C/EBP $\alpha$  hingegen induziert die Expression des Insulinrezeptors sowie des Insulinrezeptor-Substrats-1 (IRS-1) und ist somit für die Ausbildung der Insulinsensitivität der Zelle verantwortlich. Da C/EBP $\alpha$  eine direkte Bindungsstelle im PPAR- $\gamma$  Promotor besitzt, induziert es ebenfalls PPAR- $\gamma$  und hält seinen Spiegel konstant (Rosen *et al.* 2002).

Neben den Faktoren die die Adipogenese fördern, gibt es auch einige Inhibitoren. Dazu zählt beispielsweise der Präadipozytenfaktor 1 (Pref-1). Dieser wird spezifisch und in hohem Maße von den Präadipozyten exprimiert und verhindert die Herabregulation des Transkriptionsfaktors Sex determining region Y box 9 (SOX9). Da SOX9 die Expression von C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  unterdrückt, wird über Pref-1 die Differenzierung der Präadipozyten gehemmt (Sul 2009). Auch andere anti-adipogene Faktoren, wie Wingless-type MMTV integration site family member 1 (Wnt-1) und GATA binding protein 2 (GATA-2) sowie GATA-3, wirken letztendlich über die Supprimierung des PPAR- $\gamma$  (Gregoire 2001).



**Abbildung 1: Schematischer Überblick über die Adipogenese mit Expressionszeitpunkten ausgewählter Gene.** (modifiziert nach Gregoire *et al.* 1998).

### 1.1.3 Funktion

Lange Zeit nahm man an, dass das weiße Fettgewebe, neben seiner schützenden Funktion vor thermischen und mechanischen Einflüssen, vor allem als Speicherorgan für überschüssige Energie in Form von Triacylglycerinen dient (Trayhurn 2007).

Diese Sichtweise hat sich jedoch in den letzten Jahren dramatisch geändert. Es wird nun sogar als das größte endokrine Organ des Körpers angesehen (Hug & Lodish 2005). Bisher wurden über 50 sogenannter Adipokine, also Proteine die von Adipozyten sezerniert werden, identifiziert (Trayhurn & Wood 2004). Über auto-, para- und endokrine Wege bilden sie ein Kommunikationsnetzwerk mit vielen anderen Geweben und Organen und sind somit in eine Vielzahl von physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen involviert (Hauner 2004).

Das wohl bekannteste Protein, das von den Fettzellen sezerniert wird, ist das Leptin. Es wurde bereits 1994 von Zhang *et al.* beschrieben. Sie konnten damals nachweisen, dass die genetisch adipösen Mäuse (ob/ob Mäuse) eine Mutation im Leptin-Gen aufweisen und ihre Fettzellen somit kein Leptin sezernieren können (Zhang *et al.* 1994). Dies führt dazu, dass die homozygoten ob/ob Mäuse schon mit drei Monaten das Doppelte im Vergleich zu ihren heterozygoten Geschwistern wiegen (Ingalls *et al.* 1950). Nachfolgende Studien zeigten, dass eine tägliche Injektion mit Leptin die Futteraufnahme bei ob/ob Mäusen senkt und sich Körpergewicht und –fett reduzieren, wobei die Muskelmasse konstant bleibt (Campfield *et al.* 1995; Halaas *et al.* 1995; Pelleymounter *et al.* 1995). Leptin agiert also als ein afferentes Sättigungssignal, das den Appetit und das Gewicht reguliert. Diese Wirkung wird durch Leptinrezeptoren im Hypothalamus hervorgerufen. Ihre Aktivierung stimuliert appetitzügelnde Peptide, wie Proopiomelanocortin (POMC) und Cocain and amphetamine-regulated transcript (CART), und inhibiert appetitanregende Peptide, wie zum Beispiel Neuropeptid Y (NPY) und das Agouti gene-related Protein (AGRP) (Ronti *et al.* 2006). Die Fettzellen sezernieren Leptin proportional zur Fettgewebsmenge sowie dem Ernährungszustand und geben dem Körper damit Informationen über die vorhandene Energiemenge (Wajchenberg 2000; Brennan & Mantzoros 2006).

Adiponektin hingegen, ein weiteres fast ausschließlich von den Fettzellen synthetisiertes Protein, wird bei steigendem Körpergewicht weniger exprimiert und freigesetzt. Bei Gewichtsverlust dagegen erhöht sich seine Plasmakonzentration. Da es, neben seiner antiinflammatorischen und vasodilatatorischen Wirkung, die Insulinsensitivität erhöht und den Blutzuckerspiegel senkt, könnte es an der Insulinresistenz bei Übergewicht beteiligt sein (Trayhurn & Wood 2004; Radin *et al.* 2009).

Zu den weit weniger bekannten Adipokinen, die in der Abbildung 2 zu sehen sind, zählen klassische Zytokine (z.B. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6/-8 (IL-6/-8)), Wachstumsfaktoren (z.B. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )) und Proteine des alternativen Komplementsystems (z.B. Adipsin) sowie Proteine, die an der vaskulären Hämostase (z.B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)), dem Lipidmetabolismus (z.B. Apolipoprotein E), der Angiogenese (z.B. Vascular endothelial growth factor (VEGF)) und der Akute-Phase Reaktion (z.B. Haptoglobin) beteiligt sind (Trayhurn & Wood 2004; Trayhurn & Wood 2005).

Interessanterweise wird von den Adipozyten ein wichtiges kardiovaskuläres Hormonsystem, das Renin-Angiotensin System (RAS), exprimiert. In der Humanmedizin wird dieses lokale System derzeit intensiv erforscht, da es an der Entwicklung Adipositas-assoziiertes Krankheiten beteiligt zu sein scheint.

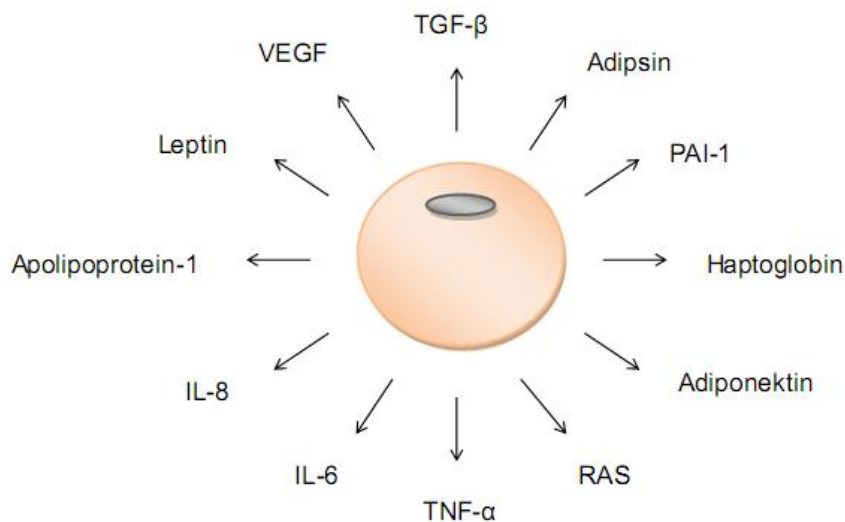


Abbildung 2: Beispiele für die von den Fettzellen sezernierten Adipokine.

## 1.2 Das Renin-Angiotensin-System

### 1.2.1 Das systemische Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System gilt als eines der wichtigsten Systeme des kardiovaskulären Apparates, indem es den Blutdruck, Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt reguliert (Bader 2010).

Ausgangspunkt für eine Reihe von proteolytischen Reaktionen ist hierbei das aus 452 Aminosäuren aufgebaute Angiotensinogen (AGT), welches hauptsächlich in der Leber gebildet wird und von dort in den Blutkreislauf gelangt (Abbildung 3). Dort wird es von Renin,

einer Protease aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere, an seinem N-terminalen Ende zum Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) gespalten. Das Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) spaltet nachfolgend am C-Terminus zwei Aminosäuren ab und es entsteht das biologisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II (Ang II). Dieses kann nun über die G-Protein-gekoppelten Angiotensin Rezeptoren Typ I (AT1) und Typ II (AT2) seine vielfältigen biologischen Wirkungen ausüben. Die meisten kardiovaskulären Effekte sind dabei AT1 Rezeptor vermittelt. Durch Vasokonstriktion, Natriumretention in den proximalen Tubuli der Niere, Aldosteronfreisetzung in der Zona glomerulosa der Nebenniere sowie Durststeigerung und Aktivierung des Sympathikus steigen Blutvolumen und Blutdruck. Über den AT2 Rezeptor kommt es dagegen zu einer Vasodilatation (Bader 2010; George *et al.* 2010).

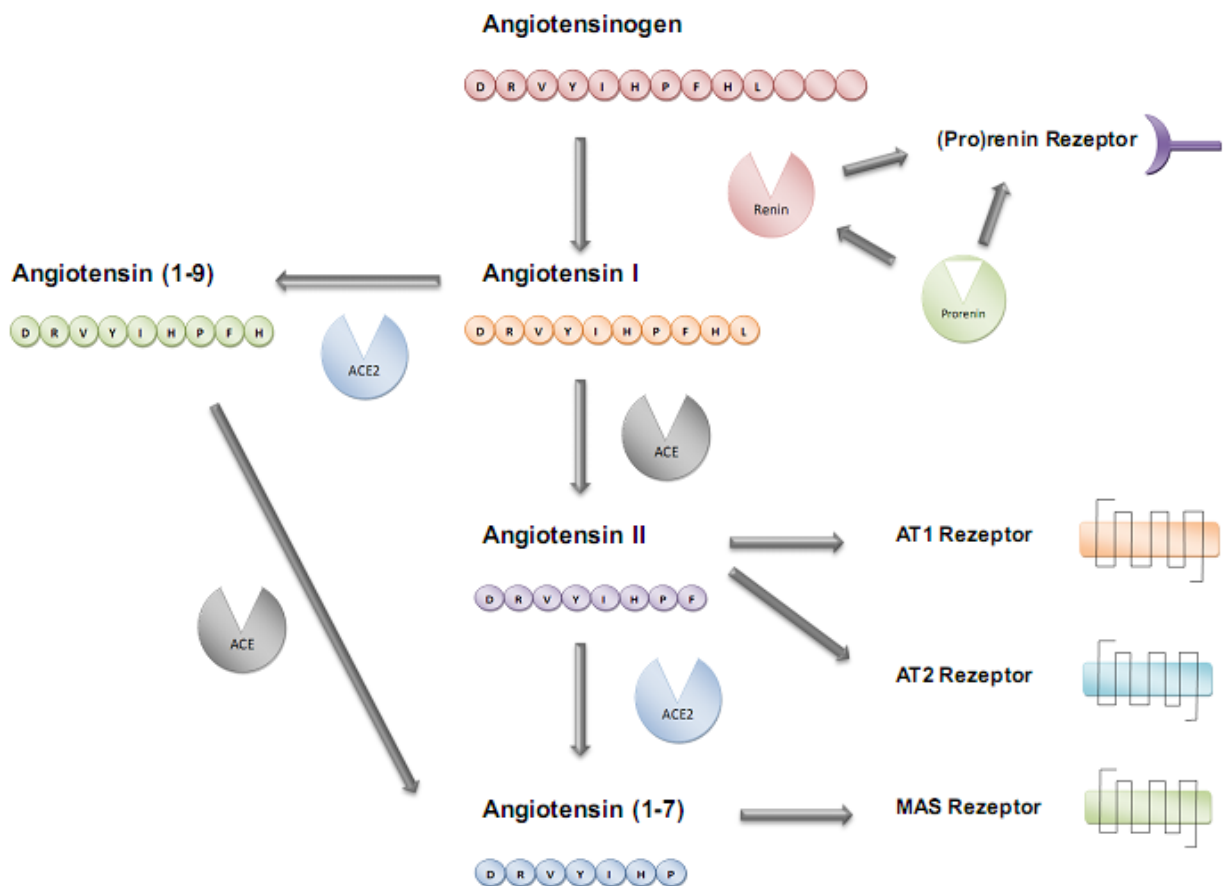


Abbildung 3: Das Renin-Angiotensin-System (modifiziert nach Bader 2010).

Neben diesen kurzfristigen Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System, gibt es aber auch noch Langzeiteffekte des Ang II. Über den AT1 Rezeptor wird die Zellproliferation angeregt, Differenzierung, Apoptose und Wachstumsinhibition sind dagegen AT2 Rezeptor vermittelt. Diese gegensätzlichen Effekte des AT2 Rezeptors scheinen vor allem in der embryonalen Entwicklung wichtig zu sein. Während der AT2 Rezeptor in den verschiedenen adulten Geweben und Organen nur gering exprimiert wird, ist er im fetalen Organismus der dominierende Rezeptortyp (Steckelings *et al.* 2005).

Dass das Renin-Angiotensin-System aber noch weitaus komplexer ist, zeigen die Forschungsarbeiten der letzten Jahre.

Ein Homolog des ACE wurde von zwei Forschergruppen im Jahr 2000 entdeckt (Donoghue *et al.* 2000; Tipnis *et al.* 2000). Das sogenannte Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) hydrolysiert eine endständige C-terminale Aminosäure vom Ang I bzw. Ang II. Als Produkte der proteolytischen Spaltung entstehen Angiotensin 1-9 (Ang(1-9)) aus Ang I sowie Angiotensin 1-7 (Ang(1-7)) aus Ang II (Bader 2010). Allerdings ist die katalytische Effizienz für Ang II 400-mal höher als für Ang I (Ribeiro-Oliveira *et al.* 2008). Durch die Metabolisierung von Ang I und Ang II durch ACE2 wird die Wirkung von ACE kompensiert (Crackower *et al.* 2002).

Dass dies tatsächlich eine gegenregulatorische Funktion darstellen könnte, wurde durch die Entdeckung des MAS Rezeptors (MAS), als Rezeptor für Ang(1-7), im Jahre 2003 bestätigt (Santos *et al.* 2003). Zum einen kann MAS mit AT1 heterodimerisieren und AT1 damit antagonisieren, zum anderen wird über MAS eine Stickstoffmonoxidfreisetzung ausgelöst, die zu einer Vasodilatation und Wachstumsinhibition führt (Bader 2010; de Kloet *et al.* 2010). Somit kann das RAS als ein dual funktionierendes System mit vasokonstriktorisches / proliferativen Wirkungen der ACE / Ang II / AT1 Achse sowie den vasodilatatorischen / antiproliferativen Wirkungen der ACE2 / Ang(1-7) / MAS Achse angesehen werden. Welche Effekte überwiegen ist von der Rezeptordichte sowie vom ACE / ACE2 Verhältnis abhängig. Eine höhere ACE-Aktivität und reduzierte ACE2 Aktivität führen zu einer vermehrten Ang II Produktion und damit AT1 bzw. AT2 Rezeptor Aktivierung. Eine höhere ACE2-Aktivität führt dagegen zu einer sinkenden Ang II Konzentration, da dieses zu Ang(1-7) abgebaut wird und nun mit MAS interagieren kann (Ribeiro-Oliveira *et al.* 2008). Dieses Gleichgewicht zwischen den beiden gegensätzlichen Mechanismen kann durch pathologische Zustände verändert werden. Beispielsweise steigt die ACE-Expression und Aktivität nach Schädigung des Herzwes, wodurch als homöostatische Antwort darauf der ACE2 Spiegel steigt (Goulter *et al.* 2004; Burrell *et al.* 2005; Ocaranza *et al.* 2006). Dies könnte auf die protektive Rolle des ACE2 hindeuten. So konnte bereits gezeigt

werden, dass eine ACE2 Überexpression vor myokardialer Hypertrophie und Fibrose schützt, die durch eine Infusion mit Ang II hervorgerufen werden kann (Huentelman *et al.* 2005).

Eine weitere neue Komponente des RAS ist der (Pro)reninrezeptor. Prorenin ist durch ein 43 Aminosäuren-langes Prosegment, welches die enzymatische Spaltstelle verdeckt, inaktiv. In den Renin-produzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates wird das Propeptid proteolytisch durch eine Proconvertase entfernt und Renin damit aktiviert. Bindet Prorenin dagegen am (Pro)reninrezeptor, so wird es durch eine Konformationsänderung aktiviert (Nguyen & Muller 2010). Der (Pro)reninrezeptor kann aber auch Renin binden und seine katalytische Effizienz um das Fünffache erhöhen (Nguyen *et al.* 2002). Somit führt eine Rezeptorbindung insgesamt zu einer gesteigerten Ang I Syntheseeffizienz.

Vervollständigt wird das RAS durch Degradationsprodukte des Ang I und Ang II, die jedoch funktionell nur eine untergeordnete Rolle spielen. Angiotensin III (Ang III bzw. Ang(2-8)) beispielsweise entsteht aus Ang II durch die Aminopeptidase A. Es hat ähnliche, aber weit weniger wirksame Effekte wie Ang II. Ang III kann dann durch die Aminopeptidase N zu Angiotensin IV (Ang IV bzw. Ang(3-8)) metabolisiert werden. Als Ang IV kann es an den Insulin-regulated aminopeptidase receptor (IRAP bzw. AT4) binden. Neben einer renalen Vasodilatation und Hypertrophie scheint Ang IV kognitive Prozesse zu beeinflussen. Die physiologische Relevanz weiterer Metabolite, wie Ang(3-7), Ang(1-9), Ang(1-12) und Ang A, ist dagegen noch relativ unklar (Ribeiro-Oliveira *et al.* 2008; George *et al.* 2010).

### **1.2.2 Das lokale Renin-Angiotensin-System**

Neben dem beschriebenen systemischen RAS gibt es auf der Gewebsebene ein lokales System. Dieses wurde in verschiedenen Organen bzw. Geweben, wie Gehirn, Nieren, Herz, Blutgefäßen, Nebennieren, Augen, Hoden sowie auch dem Fettgewebe, nachgewiesen (Bader & Ganten 2008). Obwohl die einzelnen Komponenten auch über den Blutstrom zu anderen Organen und Geweben gelangen, also endokrin wirken können, liegt seine hauptsächliche Bedeutung wohl in der Regulation lokaler homöostatischer Prozesse, wie Zellwachstum, Proliferation, Metabolismus und Apoptose (Ribeiro-Oliveira *et al.* 2008).

Seit Angiotensinogen 1988 erstmalig im Fettgewebe nachgewiesen wurde, ist das adipozytäre RAS Gegenstand intensiver Forschung, da es eine pathophysiologische Bedeutung in der Entwicklung Adipositas-assoziiierter Krankheiten haben könnte (Cassis *et al.* 1988).

Mittlerweile wurde beim Nager und Menschen nachgewiesen, dass das weiße Fettgewebe neben Angiotensinogen, auch Renin, (Pro)reninrezeptor, ACE, ACE2, AT1, AT2 sowie MAS exprimiert (Achard *et al.* 2007; de Kloet *et al.* 2010).

Dass das adipozytäre Angiotensinogen auch in den Blutkreislauf gelangen und somit den Blutdruck beeinflussen kann, zeigten Massiéra *et al.* 2001. Mäuse mit einer transgenen Überexpression des adipozytären Angiotensinogens wiesen einen höheren Angiotensinogenplasmaspiegel sowie einen höheren Blutdruck auf. Eine auf das Fettgewebe beschränkte Angiotensinogenexpression wirkte einer Hypotonie und Gewichtsabnahme in ansonsten AGT-defizienten Mäusen entgegen. In tierexperimentellen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die adipozytäre Angiotensinogenexpression nutritiven Einflüssen unterliegt. Bekamen die Tiere hochkalorisches Futter, stieg der Angiotensinogengehalt im Fettgewebe. Daher wird über eine mögliche Beteiligung des adipozytären RAS an der Adipositas-assoziierten Hypertonie spekuliert (Boustany *et al.* 2004; Rahmouni *et al.* 2004).

Über parakrine Effekte reguliert das adipozytäre RAS Wachstum und Differenzierung der Adipozyten. Es ist jedoch noch unklar, ob Ang II die Adipogenese fördert oder hemmt. Versuche an humanen Präadipozyten zeigten einen positiven, AT1-vermittelten Einfluss des Ang II auf die Proliferation (Crandall *et al.* 1999; Sarzani *et al.* 2008). Über AT2 wird dagegen die Differenzierung der Adipozytenvorläuferzellen stimuliert und die Lipogenese gefördert (Darimont *et al.* 1994; Jones *et al.* 1997b). Es gibt allerdings auch Studien die zu gegenteiligen Ergebnissen kommen. Demnach hemmt Ang II die adipogene Differenzierung über den AT1 Rezeptor (Schling & Löffler 2001; Saiki *et al.* 2008) bzw. über den AT2 Rezeptor (Matsushita *et al.* 2006). Da in verschiedenen Zellkulturexperimenten eine Zunahme der Angiotensinogenexpression im Verlauf der Präadipozytendifferenzierung gemessen wurde, könnte dies ein negativer Feedback-Mechanismus sein, der eine weitere Rekrutierung von Präadipozyten durch die Adipozyten verhindert (Janke *et al.* 2002; Saiki *et al.* 2008; Ye *et al.* 2009). *In vivo* Versuche an Mäusen zeigten jedoch einen gegenteiligen Effekt. Wird adipozytäres Angiotensinogen überexprimiert, so entwickeln sie eine höhere Fettgewebssmasse (Massiéra *et al.* 2001). Dagegen entwickeln Renin-Knock-out Mäuse sowie Mäuse mit einer AT1-Defizienz keine Diät-induzierte Adipositas (Kouyama *et al.* 2005; Takahashi *et al.* 2007). Dies lässt eine positive Rolle des Ang II in der Regulation der Fettgewebssmasse vermuten.



Dass die ACE2 / Ang-(1-7) / MAS Achse auch hier eine wichtige gegenregulatorische Rolle spielen könnte, zeigt sich in den Ergebnissen von Santos *et al.* (2008). Demnach zeigten MAS-Knock-out Mäuse, neben einer Glukoseintoleranz und reduzierter Insulinsensitivität, eine 50 %ige Steigerung der abdominalen Fettmasse. Transgene Ratten mit erhöhter Expression des Ang(1-7) dagegen hatten eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität sowie eine reduzierte Fettgewebmasse (Santos *et al.* 2010). Ferner wurde nachgewiesen, dass eine kurzzeitige fettreiche Ernährung bei Mäusen zu einem Anstieg der adipozytären ACE2 Expression und Aktivität führte. Die Expression blieb auch nach vier Monaten fettreicher Diät erhöht, während hingegen die Aktivität durch vermehrte Expression der Protease ADAM-17 sank. Da sich der Blutdruck initial noch nicht veränderte, sondern erst nach längerer Gabe des Futters stieg, könnte es sich bei der ACE2 Hochregulierung um einen kompensatorischen Mechanismus handeln, der den Körper vor einer verstärkten Aktivierung der ACE / Ang II / AT1 Achse schützen soll (Gupte *et al.* 2008).

### **1.3 Die pathophysiologische Bedeutung des RAS**

#### **1.3.1 Adipositas und deren assoziierte Erkrankungen beim Menschen**

Weltweit nimmt die Zahl übergewichtiger und adipöser Menschen zu und erreicht damit pandemische Ausmaße. Allein in den USA sind 32,2 % der Erwachsenen adipös, zählt man auch die Übergewichtigen dazu erhöht sich die Zahl auf 68 % (Flegal *et al.* 2010). Ähnliche Zahlen sind auch in Deutschland zu verzeichnen. Hier sind 58,2 % der Bevölkerung übergewichtig, 20,8 % davon adipös (Max Rubner-Institut 2008). Die Unterscheidung zwischen Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas wird von der World Health Organization (WHO) anhand des Body Mass Index (BMI) vorgenommen. Dieser wird berechnet indem das Körpergewicht durch das Quadrat der Körpergröße geteilt wird. Demnach spricht man bei einem BMI > 25 von Übergewicht, bei einem BMI > 30 von Adipositas (WHO 2000).

Mit zunehmendem Körpergewicht steigt das Risiko für gesundheitliche Probleme. Dazu gehören Erkrankungen der Gelenke, der Leber und Galle, des Respirations- und Reproduktionsapparates sowie Neoplasien (Kopelman 2007). Auch ein Zusammenhang zwischen Adipositas und chronischer Niereninsuffizienz konnte in mehreren Studien festgestellt werden (Kalaitzidis & Siamopoulos 2011). Zu den wichtigsten Adipositas-assoziierten Erkrankungen zählen jedoch der nicht-insulinabhängige Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen, hier insbesondere der Bluthochdruck (Hypertonie) (Kopelman 2007). Übergewichtige Personen haben beispielsweise 1,7-mal häufiger eine

Hypertonie als Normalgewichtige, wobei das Risiko je nach Adipositasgrad auf das 4,8-fache steigt (Nguyen *et al.* 2008). Der Symptomkomplex, bestehend aus zentraler Adipositas sowie zwei weiterer von insgesamt vier Risikofaktoren, zu denen Hyperglykämie bzw. Diabetes mellitus Typ 2, erhöhte Triglyceridwerte, niedriges HDL-Cholesterin und erhöhter Blutdruck bzw. Hypertonie gehören, wird von der International Diabetes Federation als metabolisches Syndrom bezeichnet (Alberti *et al.* 2006). In den USA sind 39 % der Erwachsenen davon betroffen (Ford 2005). Diese alarmierenden Zahlen geben Anlass für eine intensive Forschung auf dem Gebiet der Adipositas-assoziierten Erkrankungen.

Ein wichtiger Schlüsselfaktor für die Entstehung und Progression dieser Krankheiten könnte das RAS darstellen, da es bei adipösen Individuen vermehrt aktiviert wird (de Kloet *et al.* 2010). Schon ein Gewichtsverlust von 5 % senkt dagegen den Plasmaangiotensinogenspiegel um 27 %, Renin um 43 %, ACE um 12 %, adipozytäres Angiotensinogen um 20 % und den Blutdruck um 7 mm Hg (Engeli *et al.* 2005). Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung des adipozytären RAS hin, nicht nur im Hinblick auf die Entstehung einer Hypertonie, sondern auch auf die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz und Diabetes.

Der Zusammenhang zwischen dem RAS und Diabetes konnte vor allem durch *post hoc* Analysen randomisierter Studien über die Wirksamkeit von ACE- und AT1-Blockern in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen festgestellt werden. Eine Metaanalyse von 22 Studien mit antihypertensiven Medikamenten kam zu dem Ergebnis, dass unter den verschiedenen Klassen blutdrucksenkender Wirkstoffe die RAS-Blocker am effektivsten das Risiko senken an Diabetes zu erkranken. ACE-Blocker reduzieren das Risiko um 33 %, AT1-Antagonisten sogar um 43 % (Elliott & Meyer 2007). Zwar ist die Schwankung des Blutflusses ein wichtiger Faktor bei der Kontrolle der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme, allerdings scheint die Wirkung der RAS-Inhibitoren unabhängig von ihrer Blutdrucksenkung zu sein. Verglichen mit Patienten die  $\beta$ -Blocker bekamen, hatten die Personen mit ACE-Blockern ein niedrigeres Risiko für die Entwicklung eines Diabetes bei gleicher blutdrucksenkender Wirkung (Niklason *et al.* 2004). Dass tatsächlich das RAS hier eine Rolle zu spielen scheint, zeigt sich in einem Experiment von Ogihara *et al.* (2002). Werden Ratten chronisch mit Ang II infundiert, so entwickeln sie, neben Bluthochdruck, eine Insulinresistenz. Der genaue Zusammenhang ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden der gemeinsame Signalweg, den sich Insulin und Ang II teilen, aber auch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, eine Inhibition der Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT4) sowie Senkung des Insulin-Sensitizers Adiponektin (de Kloet *et al.* 2010). Möglicherweise lässt sich dieser Effekt auch durch eine gestörte Adipogenese erklären. Sharma *et al.* (2002) stellten die Hypothese auf, dass die vermehrte Ang II

Produktion durch große Insulin-resistente Adipozyten die Rekrutierung von Präadipozyten hemmt. Dies führt zur vermehrten Speicherung von Lipiden im Muskel und anderen Geweben und zu einer sinkenden Insulinsensitivität. Wird das RAS dagegen geblockt, erhöht sich durch die Präadipozytenrekrutierung die Zahl kleiner Insulin-sensitiver Adipozyten. Diese sezernieren zusätzlich weniger inflammatorische Zytokine und mehr protektive Zytokine, wie beispielsweise Adiponektin (Ronconi *et al.* 2008).

### **1.3.2 Adipositas und deren assoziierte Erkrankungen bei Katzen und Hunden**

Adipositas ist nicht nur ein Problem in der humanen Bevölkerung, sondern auch unsere Katzen und Hunde werden immer übergewichtiger. Die aktuellsten Studien kommen zu dem Ergebnis, dass 19 - 29 % der Katzen übergewichtig sind, 6 – 8 % sogar adipös (Lund 2005). Vergleichbare Zahlen gibt es für die Hundepopulation. Hier sind 29 – 34 % übergewichtig und 5 – 8 % der Hunde adipös (Lund 2006).

Damit gehen auch gesundheitliche Probleme einher. Adipöse Katzen und Hunde haben häufiger orthopädische, urogenitale, dermale, immunologische und kardiorespiratorische Probleme sowie Neoplasien (German 2006b).

Ob im Zusammenhang mit der Adipositas auch der Blutdruck steigt, wurde bisher kaum untersucht. Während Bodey und Mitchell (1996) zu dem Schluss kamen, dass beim Hund die Körperkonstitution nur einen minimalen Einfluss auf den Blutdruck hat, fanden Montoya *et al.* (2006) einen eindeutig positiven Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und dem Blutdruck. Dafür spricht auch, dass Hunde gerne als Modell für die Pathogenese der Hypertonie und Insulinresistenz in experimentellen Studien verwendet werden (Truett *et al.* 1998; German 2006a). Bei der Katze hingegen gibt es lediglich eine epidemiologische Studie zum Blutdruck, die auch das Gewicht mit einbezieht. Demnach spielt das Alter des Tieres eine Rolle, das Körpergewicht dagegen nicht (Bodey & Sansom 1998). Gründe für die feline Hypertonie sind vielmehr zugrundeliegende Erkrankungen, wobei hier vor allem die chronische Niereninsuffizienz zu nennen ist. Da ein chronischer Bluthochdruck zu Schäden an den Endorganen Herz, Auge, ZNS und Niere führt, kann die Niereninsuffizienz aber auch als Konsequenz einer Hypertonie entstehen (Jepson 2011).

Auch leiden adipöse Hunde und Katzen, ähnlich dem Menschen, häufiger an Diabetes mellitus (German 2006b). Zwar erkranken Hunde insgesamt häufiger am wahrscheinlich autoimmunbedingten Diabetes mellitus Typ 1, für den Typ 2 wurde allerdings ein Zusammenhang mit Adipositas und Insulinresistenz nachgewiesen (Hoenig 2002; Lawler *et*

al. 2005; Klinkenberg *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu haben Katzen, vergleichbar dem Menschen, zu 80 – 95 % einen Diabetes mellitus Typ 2 (Rand *et al.* 2004; González *et al.* 2009). Risikofaktoren für die Entwicklung dieser Endokrinopathie sind das Alter, das Geschlecht, das Körpergewicht und eine Kastration. Demnach erkranken vor allem ältere, übergewichtige, kastrierte Kater an Diabetes (Panciera *et al.* 1990). Dabei scheint der Faktor Kastration nicht direkt für ein erhöhtes Risiko verantwortlich zu sein, vielmehr erhöht sich dadurch das Risiko, eine Adipositas zu entwickeln (McCann *et al.* 2007). Adipöse Tiere wiederum haben ein 3,9-fach höheres Risiko an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken (Scarlett & Donoghue 1998). Warum ein steigender Körperfettanteil zu sinkender Insulinsensitivität führt, ist jedoch noch nicht geklärt. Neben einem gestörten Glukosemetabolismus durch einen erhöhten Fettsäureplasmaspiegel und einer Leptinresistenz, wird vor allem über eine zu kohlenhydratreiche Ernährung diskutiert (Hoenig 2002). Inwiefern das RAS auch beim Diabetes der Katze eine Rolle spielt, lässt sich nicht belegen, da es bisher keine Daten dazu gibt.

### **1.4 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob auch die Adipozyten von Katzen und Hunden das Renin-Angiotensin-System exprimieren. Dafür sollten mature Adipozyten aus dem subkutanen und viszeralen Fettgewebe von Tieren mit unterschiedlichem Ernährungsstatus isoliert und auf die mRNA-Expression verschiedenster RAS-Komponenten untersucht werden. Überdies sollte als Grundlage für weitergehende *in vitro* Untersuchungen eine adipozytäre Primärzellkultur etabliert und untersucht werden. Anhand dessen sollte die Expression der RAS-Komponenten während der Adipogenese dargestellt werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Proben

Bei den genutzten Fettgewebsproben handelte es sich um Fettgewebsstücke, die bei Operationen anfielen und entsorgt worden wären. Sie stammten von Tieren aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin sowie aus freien Praxen in Berlin.

Zusätzlich wurden kryokonservierte feline Präadipozyten von der Firma Zen Bio (Durham USA) bezogen. Laut Herstellerangaben stammten die Zellen aus dem subkutanen Fettgewebe einer weiblichen Katze und wurden als zweite Passage geliefert.

### 2.2 Laborgeräte

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Laborgeräte**

Gerät	Typ	Hersteller, Firmensitz
Agarose-Gelkammer		Bio-Rad, München
Brutschrank		Heraeus, Hanau
Digitalkamera	AxioCAM MRc	Carl Zeiss Jena, Jena
Digitalkamera	Gene Genius	Syngene, Cambridge (UK)
Feinwaage		Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss Jena, Jena
Freezing Container		Carl Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Axioskop 20 + 50	Carl Zeiss Jena, Jena
Mikrowelle	Microstar MD 6459	MTC-Medion Technologie Center, Mülheim/Ruhr
Mixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Pipett-Boy	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Real-Time-PCR-Cycler	StepOne	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler		Adolf-Kühner AG, Basel
Spannungsgerät	Pharmacia GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Thermoversiegler	ALPS 50 V	Thermo Scientific, Wilmington (USA)
Vortex Minischüttler	VF1	Janke & Kunkel, Staufen

## Material

Wasserbad	GFL 1092	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Werkbank		BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Zählkammer	Neubauer-Kammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Zentrifuge	Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Hersteller, Firmensitz
Falcon Röhrchen (15 ml / 50 ml)	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
MicroAmp Platten	Applied Biosystems, Darmstadt
Pinzette	Aesculap, Tuttlingen
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen ohne Filter	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten, serologisch	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Spritzen	Braun, Melsungen
Spritzenfilter (Ø 0,45 µm / 0,22 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
ThinCerts®	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zellkulturplatten (6-,12-,24-Kavitäten)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zellschaber	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Zellsiebe (Ø 100 µm)	Fisher Scientific, Schwerte

## 2.4 Reagenzien

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien**

Substanz	Hersteller, Firmensitz
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Amphotericin B (250 µg/ml)	Biochrom, Berlin

## Material

---

Biotin	Sigma, Steinheim
BPB (Bromphenolblau)	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Steinheim
Dexamethason	Sigma, Steinheim
DMEM / Ham's F12	Biochrom, Berlin
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
D-Pantothensäure	Sigma, Steinheim
PBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA, Pasching (Österreich)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Ethanol ≥ 99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe
FBS (fetales bovines Serum)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	Sigma, Steinheim
Indometacin	Sigma, Steinheim
Insulin (bovin)	Sigma, Steinheim
Kollagenase Typ I	Biochrom, Berlin
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Nile Red	Sigma, Steinheim
Oil Red O	Sigma, Steinheim
Orange G	Sigma, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Rosiglitazon	Cayman, Michigan (USA)
TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer 10x	Carl Roth, Karlsruhe
TrypLE™ Express	Gibco, New York (USA)

---

## 2.5 Reagenzien für die PCR

Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien für die PCR

Produkt	Hersteller, Firmensitz
DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA (25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas, St. Leon-Rot
Immolase™ DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Immopuffer (10x) für Polymerase	Bioline, Luckenwalde
MgCl <sub>2</sub> -Lösung für Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Random Hexamer Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
Reaktionspuffer (5x) für Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
Reaktionspuffer (10x) für DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid™ Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
SensiMix™ SYBR Low-ROX	Bioline, Luckenwalde

## 2.6 Primer

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Software Primer3 erstellt. Die Synthese erfolgte durch die Firma Metabion (Martinsried).

Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer

Gen	Ensemble ID/ EMBL Ac. No	Primersequenz (5' → 3')	Amplifikat- größe	optimale Annealing- temperatur	Verwendet für
ACE	ENSFCAG 00000002078	for: gct gaa acc cct gta cca ga rev: gag gtg ttc cag atc ctc ca	133 bp	60°C	feline Zellen
	ENSCAFG 00000012998	for: gct gag caa cat gaa cag g rev: cag ggc gta gtt tct tga g	128 bp	59°C	canine Zellen
ACE-2	AB211997	for: tgg gtc atc agt gct ctc ag rev: ctg ttt tcc atg atg tca tcc	156 bp	58°C	feline Zellen
	GQ262793	for: cag cta cac cca acc att tg rev: ccc acc aag ttt tca tcc ac	203 bp	59°C	canine Zellen
Adiponektin	AB115956	for: cgg gtg aaa agg gtg aga aa rev: tga acg ctg agc ggt ata cg	162 bp	60°C	feline Zellen
	AB110099	for: ccg tga tgg ca gaga tgg c rev: agc ctc ggg gac ctt caa c	119 bp	60°C	canine Zellen



## Material

Angiotensinogen		for: gtg ggg atg atg ctg aac tt rev: gtg cgc cca agt aga aag ag	133 bp	59°C	feline Zellen
	U67197	for: aca ggg tgg aga atg gac ag rev: ggt gtt gtc cac cca gaa ct	141 bp	60°C	canine Zellen
AT1	ENSFCAT 00000000716	for: aag atc gct tca gcc agt gt rev: ttg gcc ata agc att gta cg	134 bp	59°C	feline Zellen
	U67200	for: act ttg cca cta tgg gct gt rev: tgc agg tga ctt ttg cca ta	212 bp	60°C	canine Zellen
AT2	ENSFCAT 00000014076 ENSCAFT 00000029009	for: ggc ttt ccc acc tga gaa at rev: atc ttc agg act tgg tca cg	181 bp	59°C	feline und canine Zellen
GAPDH	AB038241	for: gct gcc cag aac atc atc c rev: gtc aga tcc acg acg gac ac	134 bp	60°C	feline Zellen
	AB038240	for: gcc aag agg gtc atc atc tc rev: ctt tgg cta gag gtg cca ag	145 bp	60°C	canine Zellen
Leptin	AB041360 BAA35129	for: tga cac caa aac cct cat ca rev: tgg tcc atc ctg gac aaa ct	144 bp	58°C	feline und canine Zellen
MAS	ENSFCAG 00000002849 AET87092	for: aag aaa ccc ctt cac cgt ct rev: gct aat ggc cgt caa cag at	196 bp	60°C	feline und canine Zellen
PPAR-γ	ENSFCAG 00000006231 DQ016141	for: tgc tgt ggg gat gtc tca ta rev: cga ctc tgg att cag ctg gt	112 bp	60°C	feline und canine Zellen
Pref-1	ENSFCAG 00000000458	for: aag agt gct ccc ctc ctc tc rev: gga gca cgt tcc tct tct tg	172 bp	60°C	feline Zellen
	ENSCAFG 00000017925	for: agg gca tct gta cgg aca tc rev: ggc ttg cac aga cac tcg ta	161 bp	59°C	canine Zellen
(Pro)renin-rezeptor	ENSFCAG 00000009446 ENSCAFG 00000014116	for: gcc aag gat cat tct cct ga rev: ttt tgc aga gca tcg aca ag	128 bp	60°C	feline und canine Zellen
Renin	ENSFCAG 00000002902 ENSCAFG 00000009623	for: cga ccc cca gta tta cca ag rev: cct cct cac aga cca agg tg	116 bp	59°C	feline und canine Zellen

## 2.7 Kits

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits**

Method	Produkt	Hersteller, Firmensitz
DNA-Aufreinigung	Invisorb <sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Berlin
RNA-Isolierung	RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
	RNeasy <sup>®</sup> Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
Sequenzierungskit	ABI PRISM <sup>®</sup> BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

## 2.8 Hergestellte Lösungen

Tabelle 7: Liste der hergestellten Lösungen

Lösung/Puffer	Substanz	Volumen
BPB-Glycerin-Lösung	BPB (gesättigte Lösung)	15 µl
	DEPC-H <sub>2</sub> O	85 µl
	Glycerin	100 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	1 l
	DEPC	1 ml
	(bei 121°C 20 min autoklavieren)	
DNA-Agarose-Gel (2 %)	Agarose	2 g
	TAE-Puffer (1x)	100 ml
	(in der Mikrowelle aufkochen)	
DNA-Gel-Probenpuffer	Orange G	25 mg
	Glycerin (100 %)	5 ml
	EDTA (0,5 M)	40 µl
	TAE-Puffer (10x)	1 ml
	H <sub>2</sub> O	3,96 ml
Ethanol 70 %	Ethanol (>99,8 %)	35 ml
	DEPC-H <sub>2</sub> O	15 ml
MOPS-Puffer (10x)	MOPS	0,2 M
	Natriumacetat	50 mM
	EDTA	10 mM
MOPS-Puffer (1x)	MOPS-Puffer (10x)	100 ml
	DEPC-H <sub>2</sub> O	900 ml
Nile Red Stocklösung	Nile Red	50 mg
	Aceton	100 ml
Oil Red O Stocklösung	Oil Red O	300 mg
	2-Propanol (99 %)	100 ml
PCR-H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	100 ml
	(bei 121°C 20 min autoklavieren)	
RNA-Agarose-Gel (1 %)	Agarose	0,6 g
	MOPS-Puffer (10x)	6 ml
	DEPC-H <sub>2</sub> O	44,4 ml
	(in der Mikrowelle aufkochen)	

## Material

RNA-Gel-Probenpuffer	Formamid	75 µl
	Formaldehyd (37 %)	25 µl
	MOPS-Puffer (10x)	10 µl
	Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	1 µl
	BPB-Glycerin-Lösung	6 µl
TAE-Puffer (1x)	TAE-Puffer (10x)	100 ml
	H <sub>2</sub> O	900 ml

## 2.9 Hergestellte Medien

**Tabelle 8: Liste der hergestellten Medien**

Medium	Substanz	Endkonzentration
Adipozytenmedium	DMEM / Ham's F12	
	Penicillin / Streptomycin	100 U/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	HEPES	15 mM
	FBS	10 %
	Biotin	33 µM
	D-Pantothensäure	17 µM
	Insulin	10 µg/ml
Basismedium	DMEM / Ham's F12	
	Penicillin / Streptomycin	100 U/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	FBS	20 %
Einfriermedium	Präadipozytenmedium	
	DMSO	10 %
Induktionsmedium	DMEM / Ham's F12	
	Penicillin / Streptomycin	100 U/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	HEPES	15 mM
	FBS	10 %
	Biotin	33 µM
	D-Pantothensäure	17 µM
	Insulin	10 µg/ml
	Dexamethason	1 µM
IBMX	0,25 mM	

## Material

	Rosiglitazon	20 µM
Präadipozytenmedium	DMEM / Ham´s F12	
	Penicillin / Streptomycin	100 U/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	HEPES	15 mM
	FBS	10 %

## 2.10 Software, Datenbanken

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Software und Datenbanken**

<b>Programm</b>	<b>Software</b>
DNA-Sequenzalignment	ClustalW2 ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a> )
DNA-Sequenzanalyse	Chromas Lite
DNA-Sequenzdatenbank	Ensemble ( <a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a> ) EMBL ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/embl/">http://www.ebi.ac.uk/embl/</a> )
DNA-Quantifizierung	StepOne Software v2.1
Nukleinsäuren-Quantifizierung	ND 1000 v 3.1.0
Primerdesign	Primer3 ( <a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3">http://frodo.wi.mit.edu/primer3</a> )
Statistikprogramm	GraphPad Prism Version 5

## **3 METHODEN**

### **3.1 Bestimmung des Ernährungszustandes der Tiere**

Für die Bestimmung des Ernährungszustandes der Tiere, von denen die Fettproben stammten, wurden die Katzen und Hunde anhand einer Punkteskala bewertet. Angewandt wurde der Body Condition Score (BCS), der von Laflamme entwickelt wurde (Laflamme 1997b, 1997a). Demnach wurden die Tiere visuell und palpatorisch in eine Punkteskala von eins bis neun eingeteilt. Die eins entspricht einem stark kachektischen Tier, die neun dagegen einem stark adipösen Tier. Ein ideales Gewicht weisen die Tiere mit einem BCS von 5 auf. Für die Einteilung wurden die Taille, die Fettschicht über den Rippen sowie die Fettpolster am Bauch beurteilt. Im Folgenden werden die Tiere mit einem BCS < 5 als dünn bezeichnet, diejenigen mit einem BCS > 5 als übergewichtig. Die Daten zu den untersuchten zwölf Katzen und zwei Hunden befinden sich im Anhang in der Tabelle 15 und 16.

### **3.2 Isolierung der Adipozyten und Präadipozyten**

Die bei den Operationen anfallenden 1 - 2 g schweren subkutanen und viszeralen Fettgewebeproben wurden in sterile, mit PBS gefüllte Falcon Röhren überführt. Je nach Größe der Fettgewebeprobe wurden dafür 15 ml oder 50 ml große Falcon Röhren verwendet. Im Labor wurden die Proben unter einer sterilen Reinraumwerkbank mehrmals mit PBS gewaschen, um kontaminierendes Blut zu entfernen. Mit Skalpell und Pinzette wurde das Fett in ca. 2 x 2 x 2 mm kleine Stücke geschnitten und von allen sichtbaren Blutgefäßen befreit. Danach wurden die Proben in 15 ml Falcon Röhren mit DMEM / Ham's F12 und 1 mg/ml Kollagenase I für 60 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde noch einmal mit einer serologischen Pipette gründlich durchmischt und anschließend für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand aus muren Adipozyten wurde mit einer Pipette abgesaugt und direkt für die Ko-Kultur bzw. „ceiling culture“ eingesetzt. Das Zellpellet wurde mit PBS resuspendiert und mittels eines Zellsiebes (Porengröße 100 µm) filtriert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1100 rpm, eine Resuspension mit Präadipozytenmedium und letztendlich das Aussäen in die Zellkulturplatte.

Die muren Adipozyten wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen sofort nach ihrer Isolierung in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.3 Zellkultur**

#### **3.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Geräte waren sterilisiert bzw. wurden vorher desinfiziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 38°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre. Das Zellwachstum und die Morphologie wurden nach der Aussaat täglich, danach dreimal wöchentlich mit einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt und an ausgewählten Zeitpunkten mit einer Digitalkamera fotografiert.

#### **3.3.2 Passagierung der Zellen**

Bei Erreichen einer ca. 90 %igen Zellkonfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit der rekombinanten Trypsin-ähnlichen Proteaselösung TrypLE™ Express bedeckt und für 3 - 8 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen in Präadipozytenmedium aufgenommen und für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet wieder in Präadipozytenmedium resuspendiert und nach Zellzählung je nach Versuchsansatz in einer bestimmten Zellzahl ausgesät.

#### **3.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Um die Anzahl der Zellen zu ermitteln, wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierfür wurde das jeweilige Zellpellet mit 2 ml Präadipozytenmedium resuspendiert und 50 µl dieser Zellsuspension mit 100 µl 0,4 %iger Trypanblaulösung gemischt. Nach zweiminütiger Inkubation und erneutem Mischen wurde die Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben und die ungefärbten, d.h. lebenden Zellen, in den vier großen Quadraten gezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich dann durch folgende Formel:

Zellen / ml = Mittelwert der 4 Quadrate x 10<sup>4</sup> x Verdünnungsfaktor

(10<sup>4</sup> = Faktor der sich aus dem Volumen der Kammer ergibt)

### **3.3.4 Kryokonservierung der Zellen**

Für die Lagerung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit TrypLE™ Express bedeckt und für 3 - 8 min bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in Präadipozytenmedium aufgenommen, für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe eines Freezing Containers wurden die Zellen mit einer Kühlungsrate von 1°C/min auf -80°C abgekühlt. Die Langzeitlagerung fand in Stickstofftanks bei -192°C statt.

### **3.3.5 Auftauen der kryokonservierten Zellen**

In einem 37°C warmen Wasserbad wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut und sofort in Präadipozytenmedium aufgenommen. Die Suspension wurde 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und der Überstand mit dem darin enthaltenen DMSO entfernt. Für die Aussaat wurden die Zellen wieder in Präadipozytenmedium aufgenommen und auf die Zellkulturplatten verteilt.

### **3.3.6 Optimierung der Zellkulturbedingungen für die Differenzierung der Präadipozyten**

#### **3.3.6.1 Medien für die Differenzierung**

Anlehnend an die Medienzusammensetzung für die Differenzierung humaner und muriner Präadipozyten, wurde in verschiedenen Versuchen die optimale Konzentration und Kombination verschiedenster Zusatzstoffe zum Medium DMEM / Ham's F12 ermittelt. Einen Überblick über die getesteten Medien, die zur Einleitung der Differenzierung (Induktionsmedium) sowie zur Aufrechterhaltung des Adipozytenzustandes (Adipozytenmedium) verwendet wurden, geben die Tabellen 12 und 13 im Anhang.

#### **3.3.6.2 Differenzierungsprotokoll**

Neben den verschiedenen Medienzusammensetzungen wurde auch getestet, welches Protokoll für die Differenzierung am besten geeignet ist. Dafür wurde das Induktionsmedium entweder sieben Tage oder 14 Tage, mit oder ohne Mediumwechsel, sowie in dem Rhythmus drei Tage Induktionsmedium und ein Tag Adipozytenmedium zu den Zellen gegeben.

### 3.3.6.3 Ko-Kultur mit murenen Adipozyten

Um den Einfluss murener Adipozyten auf die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten zu untersuchen, wurden frisch isolierte mure Adipozyten in Zellkultureinsätze mit semipermeabler Membran (ThinCerts®) gegeben und zusammen mit frisch isolierten Präadipozyten des gleichen Tieres ko-kultiviert (Abbildung 4). Bis zum Erreichen der Zellkonfluenz wurde das Basismedium verwendet. Danach wurde es durch das Induktionsmedium der Firma Zen Bio ersetzt. Nach sieben Tagen wurde ein Teil des Induktionsmediums entfernt und das Adipozytenmedium der Firma Zen Bio dazugegeben. Das Adipozytenmedium wurde bis zum Ende des Versuchs verwendet und alle zwei bis drei Tage gewechselt.

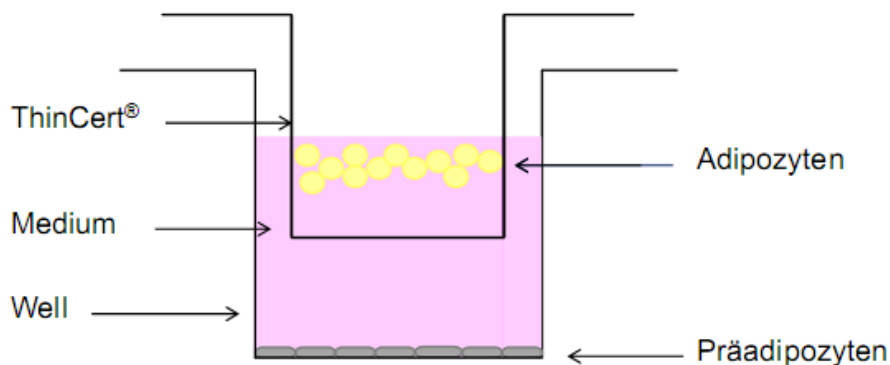


Abbildung 4: Schema einer Ko-Kultur von Präadipozyten und Adipozyten.

### 3.3.6.4 Dedifferenzierung murener Adipozyten („ceiling culture“)

Für den Versuch eine Zellkultur aus dedifferenzierten murenen Fettzellen zu erhalten, wurde die sogenannte „ceiling culture“ angewandt. Hierfür wurden die Adipozyten des Überstandes direkt nach ihrer Isolierung in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gegeben. Diese wurde mit so viel Basismedium gefüllt, dass die Fettzellen an der Oberfläche schwammen und Kontakt zur Flaschenoberfläche bekamen. Damit die Zellen am Flaschenboden anwachsen konnten, wurde die Flasche mit dem Flaschenboden nach oben zeigend für sieben Tage im Brutschrank inkubiert (Abbildung 5). Nach sieben Tagen wurde das Medium entfernt, die Flasche wieder umgedreht und 5 ml Medium dazugegeben. Nach Erreichen einer entsprechenden Zellzahl erfolgte eine Passagierung und Differenzierung.



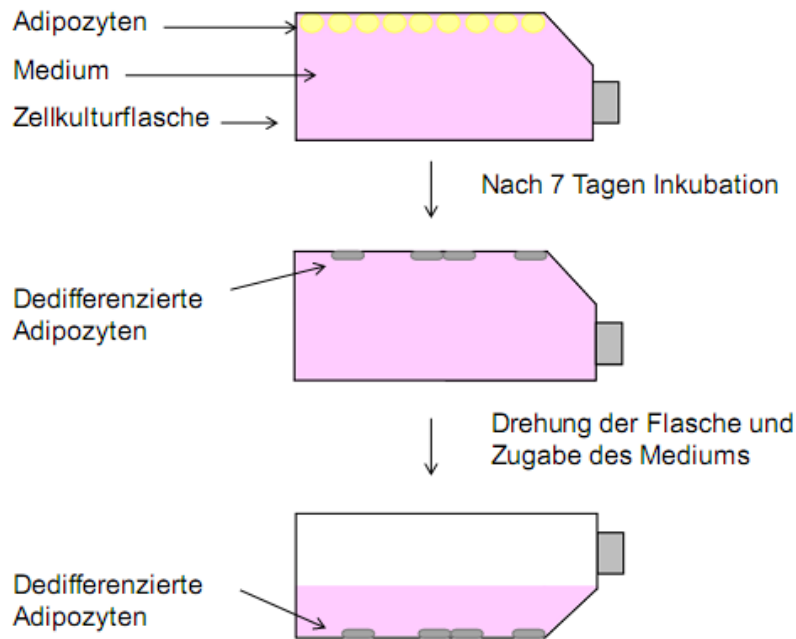


Abbildung 5: Schema des Versuchsaufbaus für die Dedifferenzierung maturaer Adipozyten.

### 3.3.6.5 Explantate

Aus den Fettproben wurden mit dem Skalpell 1 x 1 x 1 mm und 2 x 2 x 2 mm große Stücke geschnitten und in jeweils eine Kavität einer 24er Zellkulturplatte gelegt. Das Basismedium wurde nur soweit dazugegeben, dass die Fettstückchen auf dem Kavitätenboden auflagen und nicht an der Oberfläche schwammen. Um ein Austrocknen der Explantate zu verhindern, wurden die Platten in einer feuchten Kammer im Inkubator gelagert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Nach ca. sieben Tagen wurden die Explantate in neue Kavitäten umgesetzt. Die verbliebenen Zellen in der vorherigen Kavität wurden bis zur Konfluenz mit 1 ml Basismedium kultiviert. Anschließend wurden sie entweder weiterpassagiert, kryokonserviert oder mit Induktionsmedium und Adipozytenmedium versetzt.

### 3.3.7 Kommerzielle feline Präadipozyten

Die feline Präadipozyten der Firma Zen Bio wurden für die Genexpressionsstudie gemäß der Anleitung des Herstellers kultiviert und differenziert. Hierfür wurden die im Stickstoff gelagerten Zellen aufgetaut, gezählt und in einer Dichte von 14.000 Zellen / cm<sup>2</sup> ausgesät. Für den Genexpressionsversuch wurden an fünf verschiedenen Zeitpunkten jeweils drei Kavitäten einer 6er Zellkulturplatte untersucht. Bis zum Erreichen der Konfluenz wurde das feline Präadipozytenmedium der Firma verwendet. Um das Genexpressionsmuster der

Prädipozyten zu untersuchen, wurde die RNA der Zellen isoliert, die nur das Prädipozytenmedium bekamen. Alle anderen Kavitäten bekamen das Induktionsmedium von Zen Bio. Nach einem Tag wurde erneut die RNA von drei Kavitäten isoliert, nach sieben Tagen drei weitere Kavitäten. Von den verbliebenen sechs Kavitäten wurde 3 / 5 des Mediums abgesaugt und durch das Adipozytenmedium der Firma ersetzt. Im weiteren Verlauf wurden alle zwei bis drei Tage 3 / 5 des Mediums durch frisches Adipozytenmedium ausgetauscht. Nach sieben und nach 14 Tagen Adipozytenmediumgabe, also 14 und 21 Tage nach Gabe des Induktionsmediums, wurde die RNA der restlichen Kavitäten isoliert.

### **3.3.8 Färbungen**

#### **3.3.8.1 Oil Red O Färbung**

Für die Anfärbung der intrazellulären Fettvakuolen in den Adipozyten mit der Oil Red O Färbelösung wurde das Medium in den Zellkulturschalen abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und mit 3,7 %igem Formalin für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. In dieser Inkubationszeit wurde eine frische Oil Red O Gebrauchslösung hergestellt. Dabei wurden 24 ml Stocklösung mit 16 ml Aqua bidest. versetzt und nach 10 min mit einem Spritzenfilter ( $\varnothing$  0,45  $\mu$ m) gefiltert. Nach der Fixierung wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Oil Red O Gebrauchslösung bedeckt. Schließlich wurden die gefärbten Zellen mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend mit einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

#### **3.3.8.2 Nile Red Färbung**

Als weitere Färbemethode für Lipide wurde die Nile Red Färbung eingesetzt. Diese ist sensitiver als die Oil Red O Färbung, so dass schon kleinste Lipidtropfen in den Zellen zu sehen sind. Durch Anregung mit Licht fluoreszieren die Lipidtropfen gelb, die Zellen hingegen rot ( $\lambda_{\text{Emission}} = 528 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Exzitation}} = 450 - 500 \text{ nm}$ ). Die Färbung kann an lebenden wie auch an fixierten Zellen angewandt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde dafür in einer 1:100 Verdünnung mit PBS in die mediumfreie Zellkulturschale gegeben und für mindestens 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

## **3.4 Molekularbiologische Untersuchungen**

### **3.4.1 RNA-Isolierung**

Da die RNA-Isolierung aus zwei unterschiedlichen Zelltypen (native *versus* kultivierte Zellen) erfolgte, wurden jeweils unterschiedliche Protokolle angewandt, um eine möglichst hohe RNA-Konzentration zu erhalten.

#### **3.4.1.1 RNA-Isolierung aus murenen Adipozyten**

Für die RNA-Isolierung von Fettgewebe bietet sich die Phenol-Chloroform-Extraktion an. Zur Anwendung kam hierbei der RNeasy<sup>®</sup> Lipid Tissue Mini Kit von Qiagen. Dabei wird das Gewebe durch eine Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat lysiert und die RNasen inhibiert. Durch Zugabe von Chloroform entsteht eine zweiphasige Emulsion. Die Proteine befinden sich dann in der unteren organischen Phase, die RNA hingegen in der oberen wässrigen Phase. Die DNA sammelt sich an der Phasengrenze. Die RNA aus der wässrigen Phase wird anschließend mit Ethanol gefällt, über eine RNA-bindende Säule gebunden und schließlich mit RNase freiem Wasser eluiert.

Die tiefgefrorenen Adipozytenproben wurden für die Extraktion im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, um eine bessere Löslichkeit im Lysisreagenz zu erreichen. Die restlichen Schritte der Extraktion erfolgten nach dem im Handbuch beschriebenen Protokoll. Nach Elution der RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und schließlich bei -80°C gelagert.

#### **3.4.1.2 RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen**

Die RNA der kultivierten Zellen wurde mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit von Qiagen extrahiert. Bei dieser Methode werden die Zellen mit einem Guanidiniumisothiocyanatpuffer lysiert, die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt und die RNA über eine Säule in mehreren Waschsritten gereinigt. Am Ende erfolgt eine Elution mit RNase freiem Wasser.

Die Kavitäten mit den kultivierten Zellen wurden vor der Extraktion zweimal mit PBS gewaschen und der Puffer vollständig abgesaugt. Der Lysispuffer wurde direkt auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgelöst und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Anweisung des Herstellers. Die 30 µl RNA-haltiges Eluat wurden am Ende der Extraktion auf Eis gestellt und bei -80°C gelagert.

### 3.4.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurenkonzentration und -qualität wurden durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das für Proteine bei 280 nm. Über das Verhältnis  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  lässt sich also eine Aussage über die Reinheit der zu bestimmenden Nukleinsäure treffen. Eine Ratio  $\geq 1,8$  wird als rein für DNA, eine Ratio  $\geq 2,0$  als rein für RNA betrachtet.

Die Messung erfolgte am Nanodrop, ein Spektrophotometer, das die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren mit 1 µl Probe misst. Als Leerwert wurde das Eluierungsreagenz des jeweiligen RNA- bzw. DNA-Extraktionskits verwendet.

### 3.4.3 Kontrolle der Integrität der RNA

Durch eine RNA-Gelelektrophorese erfolgte die Kontrolle der RNA-Integrität. Mit dieser Methode wird die RNA-Qualität durch Visualisierung der 28S und 18S rRNA beurteilt. Eine intakte RNA zeichnet sich durch zwei deutlich getrennte Banden mit einer Ratio 28S:18S von 2:1 aus.

Um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen, wurde die komplette Gelelektrophoresekammer für 30 min mit 0,1 M NaOH gefüllt. Ein 1 %iges Agarose-Gel wurde, wie in Abschnitt 2.8. beschrieben, hergestellt und nach abkühlen auf ca. 50°C mit 9,6 ml 37 %igem Formalin aufgefüllt und in die Gelgießschale gegossen. Nach Abkühlung und Auspolymerisierung des Gels wurde die Kammer mit 1x MOPS-Puffer überschichtet. Anschließend wurde der Probenpuffer (siehe Kapitel 2.8.) mit 1 µg der zu untersuchenden RNA-Probe gemischt, für 10 min bei 70°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurden jeweils 17 µl Probe in die Geltaschen pipettiert und bei 70 Volt für eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Banden wurden durch eine UV-Lichtquelle visualisiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

### 3.4.4 DNase I – Behandlung

Um bei der nachfolgenden PCR-Analyse Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden die RNA Proben mit DNase I versetzt.

20 µl Reaktionsansatz:      1 µg RNA  
   2 µl Reaktionspuffer (10x) für DNase I  
   1 µl DNase I  
   ad 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Die Proben wurden für 30 min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 2 µl EDTA (25 mM) und Erhitzung auf 65°C für 10 min.

### 3.4.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der cDNA Synthese für eine nachfolgende PCR. Dabei wird durch eine RNA-abhängige DNA-RT-Polymerase aus dem RNA-Einzelstrang ein komplementärer cDNA Strang hergestellt. Random Hexamere dienen als Startpunkte und werden durch Einbau der Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) durch die RT-Polymerase verlängert.

40 µl Reaktionsansatz:      22 µl RNA (mit DNase I vorbehandelt)  
   8 µl Reaktionspuffer (5x) für Reverse Transkriptase  
   1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor  
   4 µl dNTPs  
   3 µl Random Hexamer Primer  
   2 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase

Die Proben wurden im Thermocycler für 10 min bei 25°C, für 60 min bei 42°C, für 10 min bei 70°C inkubiert und schließlich bei 4°C gekühlt.

### 3.4.6 PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird ein bestimmter DNA-Abschnitt mittels flankierender Primer exponentiell amplifiziert. Dies wird durch mehrfache Wiederholung des Reaktionszyklus, bestehend aus Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Primerhybridisierung und Elongation durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase, erreicht.

Für den qualitativen Nachweis der verschiedenen Gene wurde folgender genereller Ansatz verwendet.

25 µl Reaktionsansatz:      2,5 µl cDNA  
   2,5 µl Reaktionspuffer (10x) für Immolase  
   1 µl MgCl<sub>2</sub>  
   0,5 µl dNTPs  
   0,5 µl Forward Primer (20 µM)  
   0,5 µl Reverse Primer (20µM)  
   0,1 µl Immolase™ (Taq-Polymerase)  
   17,4 µl ddH<sub>2</sub>O

Im Thermocycler wurden die Proben 10 min bei 95°C erhitzt, um die Immolase zu aktivieren, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 59 - 62°C (Tabelle 5) und 30 sec bei 72°C. Abschließend erfolgte eine fünfminütige Elongation bei 72°C und schließlich eine Abkühlung auf 4°C.

### 3.4.7 Gradienten-PCR zur Ermittlung der primerspezifischen Temperaturoptima

Die optimalen Annealingtemperaturen für die anschließende Real-time-PCR wurden für die verschiedenen Primer im StepOnePlus™ Real-Time-PCR Gerät ermittelt. Die Temperaturspanne reichte von 58°C bis 63°C in 1°C Schritten. Die Temperatur mit dem niedrigsten Ct-Wert wurde schließlich für die weiteren Real-Time-PCR Experimente ausgewählt (Tabelle 5).



### 3.4.9 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Extraktion und Aufreinigung der ausgeschnittenen DNA-Banden wurde der Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit verwendet. Mit diesem ist es möglich DNA-Fragmente mit einer Größe von 80 bp bis 30 kbp zu isolieren und in einem Nidrigsalzpuffer zu eluieren.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung wurde anschließend im Nanodrop Spektrophotometer gemessen.

### 3.4.10 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Auftrags-Sequenzierung der Amplifikate wurde, nach der von Sanger entwickelten Kettenabbruchmethode, mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit durchgeführt.

10 µl Reaktionsansatz:	100 ng	cDNA
	0,5 µl	Forward oder Reverse Primer (20 µM)
	1 µl	BigDye Terminator Sequencing Buffer (5x)
	2 µl	BigDye Ready Reaction Mix
	ad 10 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Sequenzierreaktion im Thermocycler umfasste 25 Zyklen: 96°C für 10 sec, 50°C für 5 sec und 60°C für 4 min. Am Ende wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Die Auswertung der Reaktion wurde von der Firma GATC (Konstanz) kommerziell durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit dem Programm Chromas Lite analysiert und mit den Sequenzen der Datenbank EMBI und Ensembl durch die Software ClustalW2 verglichen.

### 3.4.11 Real-Time-PCR

Durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenz-markierten Sonden ermöglicht die Real-Time-PCR, im Gegensatz zur konventionellen PCR, eine quantitative Genexpressionsanalyse. Der hier verwendete Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I bindet an doppelsträngige DNA und emittiert nach Lichtanregung grünes Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm. Durch Messung der Fluoreszenz am Ende jedes Elongationsschrittes entsteht eine Amplifikationskurve. Diese weist eine sigmoidale Form auf, da am Anfang nur wenige Produkte entstehen. Es folgen eine exponentielle Phase und schließlich eine Plateauphase



durch Produkthemmung, Hybridisierung von Produktfragmenten und Substratverbrauch. Für die Quantifizierung wird ein Schwellenwert (threshold) in der exponentiellen Phase festgelegt, dessen Schnittpunkt mit der Amplifikationskurve einen Ct-Wert (Cycle threshold) liefert. Er ist definiert als Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Da sich die Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge verhält, ist der Ct-Wert umso größer, je kleiner die Menge an cDNA in der Probe ist. Für die Bestimmung der Ausgangsmenge an cDNA wurde eine Standardkurve erstellt. Dafür wurde die Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes (siehe Kapitel 3.4.9) mit dem Nanodrop gemessen und in einer 1:10 Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O, je nach Ausgangskonzentration, 10 bis 14 mal verdünnt. Von den letzten acht Verdünnungsstufen wurden jeweils 2 µl zu den 8 µl Reaktionsansatz in eine MicroAmp 96-Well Platte pipettiert.

8 µl Reaktionsansatz:           0,25 µl Forward Primer (10 µM)  
   0,25 µl Reverse Primer (10 µM)  
   5 µl SensiMix™ SYBR Low-ROX  
   2,5 µl ddH<sub>2</sub>O

Von den zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls 2 µl zum Reaktionsansatz dazugegeben. Als Negativkontrollen wurden ddH<sub>2</sub>O und Proben, bei denen die RT ohne reverse Transkriptase durchgeführt wurde (No-RT-Control), verwendet. Anschließend wurde die MicroAmp Platte mit einer Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und in das StepOnePlus™ Gerät platziert. Folgendes Temperaturprogramm wurde gewählt:

**Tabelle 11: Temperaturprogramm für die Real-time-PCR**

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Aktivierung der Polymerase</b>	95°C	10 min	1 x
<b>Denaturierung</b>	95°C	15 sec	
<b>Annealing</b>	58°C-60°C	20 sec	40 x
<b>Elongation</b>	72°C	30 sec	
<b>Schmelzkurvenanalyse</b>	95°C	15 sec	70 x
	60°C	1 min	
	60-95°C	15 sec	
	(+0,5°C pro Zyklus)		

Da sich der Fluoreszenzfarbstoff nicht nur an die DNA des PCR-Produktes, sondern auch an unspezifische Produkte wie Primerdimere bindet, erfolgte im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wird die Temperatur in 0,5°C Schritten von 60°C auf 95°C erhöht. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang und setzt den Fluoreszenzfarbstoff frei, die Fluoreszenz nimmt also schlagartig ab. Unspezifische Primerdimere haben eine niedrigere Schmelztemperatur und lassen sich somit vom gewünschten PCR-Produkt unterscheiden.

Für die Normalisierung der Genexpressionsdaten wurde das Referenzgen GAPDH verwendet (Gorzelniaik *et al.* 2001).

### **3.5 Datenverarbeitung und Statistik**

Die in der Real-time-PCR gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism 5 statistisch analysiert und graphisch dargestellt.

Die Daten zur Genexpression während der Adipogenese der felines Zellen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern dargestellt. Als *post hoc* Test für den Vergleich der Präadipozyten mit den jeweiligen Differenzierungszeitpunkten wurde der Dunnett Test angewendet. Für den Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte untereinander wurde hingegen der Bonferroni Test genutzt.

Die Auswertung der Daten zur Genexpression in den maturen Fettzellen erfolgte über den t-Test, wobei für den Vergleich zwischen den Fettgewebslokalisationen der gepaarte t-Test und für den Vergleich zwischen den unterschiedlichen Ernährungszuständen der Tiere der ungepaarte t-Test verwendet wurde. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern. Zusätzlich wurden die unterschiedlichen Gene mittels Pearson-Korrelation auf einen linearen Zusammenhang überprüft und eine Regressionsgerade berechnet.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert < 0,05 angesehen.

---

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Zellkultur**

Für die Untersuchungen zum lokalen RAS in felines und caninen Adipozyten wurde eine Zellkulturmethode aus Fettgewebeproben von Katzen und Hunden etabliert. Des Weiteren wurden käuflich erworbene feline Präadipozyten kultiviert und differenziert.

#### **4.1.1 Etablierung einer Primärzellkultur aus Fettgewebe**

Insgesamt wurden drei unterschiedliche Methoden für die Gewinnung und Kultivierung von Adipozyten angewandt. Bei der ersten Methode, die in der Literatur am häufigsten beschrieben ist, wurden die Fettgewebeproben mit Kollagenase enzymatisch zersetzt (Bunnell *et al.* 2008). Dadurch konnten die muren Adipozyten von den Präadipozyten, die sich in einem Zellpellet sammeln, durch Zentrifugation getrennt werden. Die Präadipozyten wurden anschließend durch die Gabe verschiedenster Substanzen, die in einem Induktionsmedium enthalten waren, zu Adipozyten differenziert. Die weitere Kultivierung der Adipozyten erfolgte mit einem sogenannten Adipozytenmedium. Alternativ dazu wurden kultivierte mature Adipozyten dedifferenziert sowie Zellen aus kultivierten Fettgewebsexplantaten gewonnen.

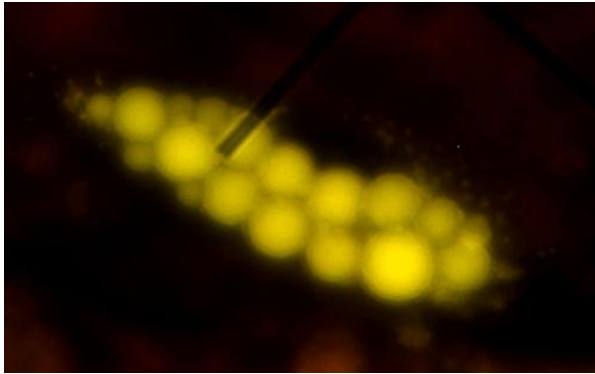
##### **4.1.1.1 Kultivierung und Differenzierung der Präadipozyten des Zellpellets**

Die anfängliche Kultivierung der Zellen des Pellets erfolgte in Anlehnung der in der Literatur beschriebenen üblichen Medienzusammensetzung und der Protokolle für murine und humane Präadipozyten bzw. Adipozyten, da es bisher zur Kultivierung felines Fettzellen keine Publikationen gibt. Die zwei publizierten Protokolle für eine canine Zellkultur wurden ebenfalls berücksichtigt. Dies führte allerdings zu keiner bzw. nur ungenügender Differenzierung der felines und caninen Zellen. Daher mussten die Bedingungen für die Zellkultur optimiert werden. Hierfür wurden die verschiedenen, im Folgenden beschriebenen, Medienzusammensetzungen, Differenzierungsprotokolle und Kultivierungssysteme getestet.

##### **4.1.1.1 1 Medien für die Differenzierung**

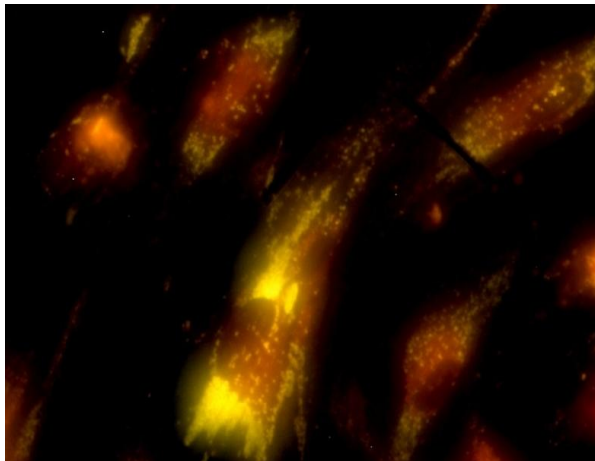
In zahlreichen Versuchen wurden unterschiedlichste Zusammensetzungen und Konzentrationen an Zusätzen, sowohl für das Induktions- als auch das Adipozytenmedium, getestet. Hierzu zählten Insulin, Dexamethason, IBMX, Rosiglitazon, Indometacin, Pantothenat, Biotin und FBS (siehe Tabelle 13 und 14 im Anhang).

Verschiedene Konzentrationen an Insulin im Induktions- und Adipozytenmedium führten beispielsweise zu einer unterschiedlich großen Lipidtropfenbildung. Mit der Zugabe von 10 µg/ml Insulin entstanden wesentlich größere Lipidtropfen (Abbildung 6), als mit der Zugabe von 100 µg/ml. Durch die höhere Insulinkonzentration bildeten sich dagegen diffus verteilte kleinere Lipidtropfen in den feline Zellen (Abbildung 6 und 7).



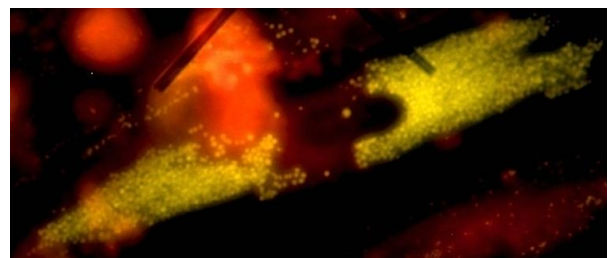
**Abbildung 6: Mit Nile Red gefärbter feline Adipozyt mit größeren Lipidtropfen bei Zugabe von 10 µg/ml Insulin in das Medium,**

21 Tage nach Induktion; Fluoreszenzmikroskop x 400.



**Abbildung 7 a) und b): Mit Nile Red gefärbte feline Adipozyten mit diffus verteilten kleineren Lipidtropfen bei Zugabe von 100 µg/ml Insulin in das Medium,**

21 Tage nach Induktion; Fluoreszenzmikroskop x 400.



a)

b)

Als essentieller Zusatzstoff im Induktionsmedium erwies sich der Wirkstoff Rosiglitazon. Er gehört zur Arzneimittelgruppe der Glitazone und aktiviert den Transkriptionsfaktor PPAR-γ. Entgegen der in den Publikationen üblichen angegebenen Konzentration von 10 µM, wurde er in der doppelten Konzentration dem Induktionsmedium zugesetzt. Dadurch erhöhte sich die Anzahl der differenzierten feline und caninen Adipozyten.

Die unterschiedlichen Konzentrationen der anderen Zusatzstoffe hatten dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Differenzierung der feline und caninen Zellen. Die Zusammensetzung des Induktions- und Adipozytenmediums, mit denen die insgesamt höchste Differenzierungsrate erreicht wurde, ist im Kapitel 2.9. angegeben.

#### **4.1.1.1.2 Differenzierungsprotokoll**

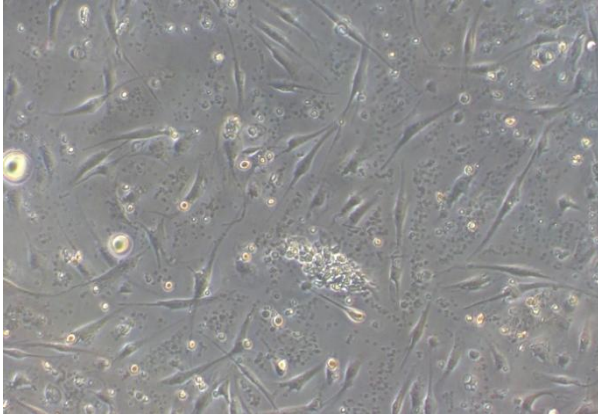
In der Literatur gibt es verschiedenste Angaben darüber wie lange das Induktionsmedium zu den Präadipozyten gegeben werden soll. Sie schwanken zwischen einem, zwei, drei und sieben Tage Induktionsmediumgabe mit und ohne Mediumwechsel.

Das Protokoll, mit dem die meisten Präadipozyten differenzierten, bestand in einer einmaligen Gabe des Induktionsmediums. Nach sieben Tagen wurde 3 / 5 des Mediums entfernt und durch das Adipozytenmedium ersetzt. Anschließend wurde alle zwei bis drei Tage 3 / 5 des Mediums gegen frisches Adipozytenmedium ausgetauscht.

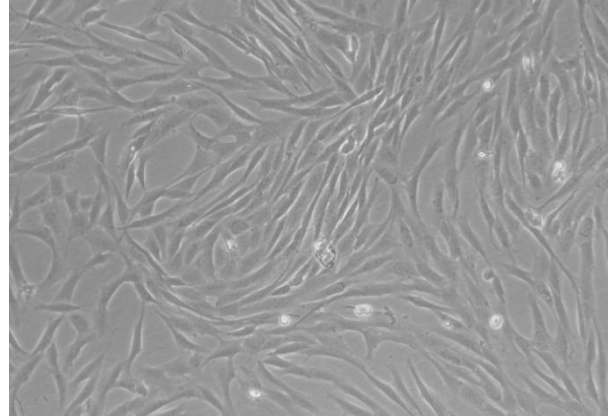
#### **4.1.1.1.3 Differenzierungsergebnisse der felines und caninen Zellen**

Die Kultivierung der felines und caninen Präadipozyten mit dem Präadipozytenmedium ließ nach ca. zwei bis drei Tagen proliferierende längliche Zellen erkennen (Abbildung 8). Die Zeitdauer bis zum Erreichen eines fast konfluenten Zellrasens schwankte dabei je nach Probe zwischen drei und sieben Tagen (Abbildung 9). Für die anschließende Differenzierung der Zellen wurde das Induktionsmedium für sieben Tage gegeben. Danach wurden 3 / 5 des Mediums entfernt und durch das Adipozytenmedium ersetzt. Im Verlauf der Differenzierung änderte sich die Form der Zellen. Die anfangs spindelförmig bis länglichen Zellen rundeten sich ab und bildeten kleine Lipidtröpfchen. Die Tropfen nahmen an Größe zu und konnten schließlich durch das Phasenkontrastmikroskop erkannt werden (Abbildung 10). Dabei zeigte sich, dass der Einsatz des Polarisationsfilters ein leichteres Erkennen der Lipidtropfen in den Fettzellen ermöglichte (Abbildung 11). Als Nachweis, dass es sich hierbei tatsächlich um Adipozyten handelt, wurden die Zellen am Ende gefärbt. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Nile Red schien, gegenüber der Oil Red O Färbung, die sensitivere Methode zu sein, da damit schon kleinste Lipidtröpfchen sichtbar wurden (Abbildung 12). Die typische Rotfärbung der Lipidtropfen bei der Oil Red O Färbung war dagegen erst bei den größeren Lipidtropfen zu sehen (Abbildung 13).

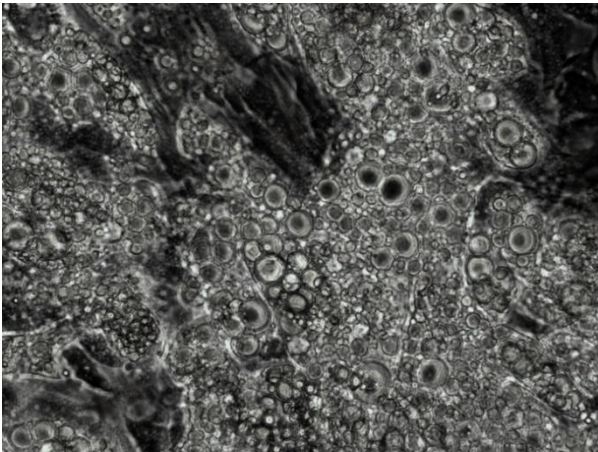
Insgesamt gab es jedoch große Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit der Zellen der verschiedenen Tiere, sowohl bei den caninen als auch den felines Proben. Welcher Einflussfaktor hier eine Rolle spielt ist bislang unbekannt.



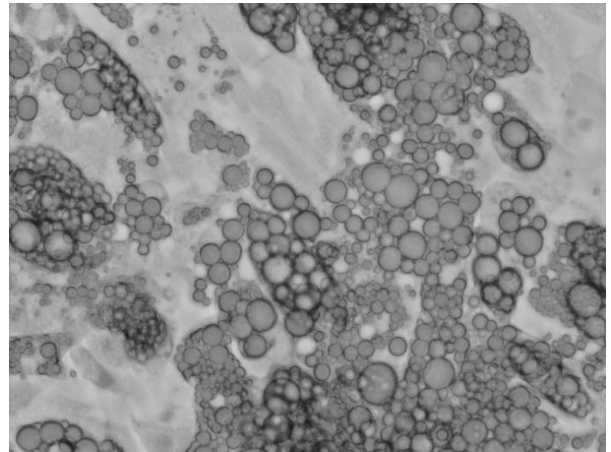
**Abbildung 8: Canine viszerale Zellen des Zellpellets nach drei Tagen Kultivierung;**  
Phasenkontrastmikroskop x 100.



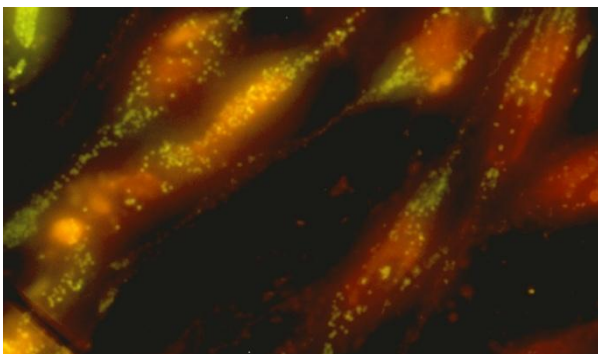
**Abbildung 9: Canine viszerale Präadipozyten nach sieben Tagen Kultivierung;**  
Phasenkontrastmikroskop x 100.



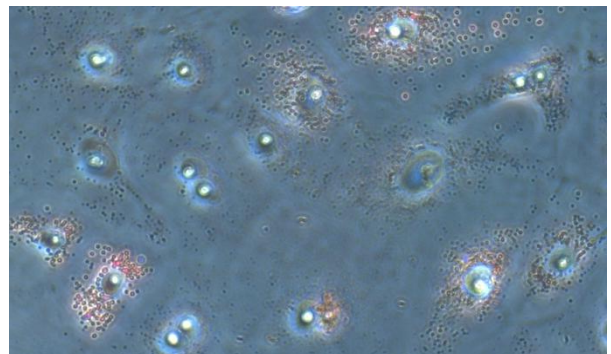
**Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme feline kultivierter Adipozyten, 14 Tage nach Induktion;** Phasenkontrastmikroskop x 320.



**Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme des gleichen Bildausschnitts wie Abbildung 10 mit Polarisationsfilter, 14 Tage nach Induktion;** Phasenkontrastmikroskop x 320.



**Abbildung 12: Feline differenzierende Zellen mit Nile Red Färbung, 14 Tage nach Induktion;** Fluoreszenzmikroskop x 400.

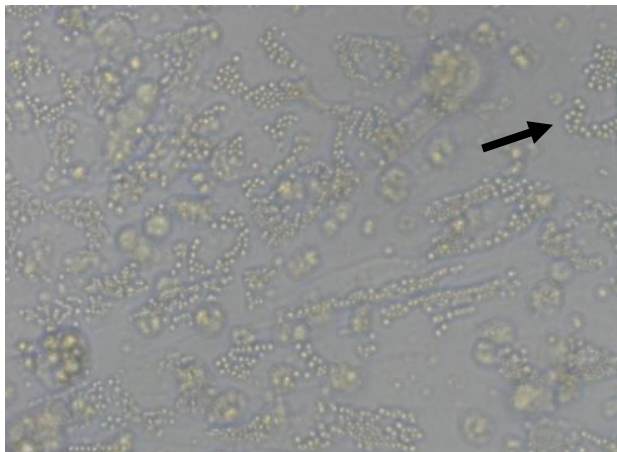


**Abbildung 13: Feline differenzierende Zellen mit Oil Red O Färbung, 14 Tage nach Induktion;** Phasenkontrastmikroskop x 320.

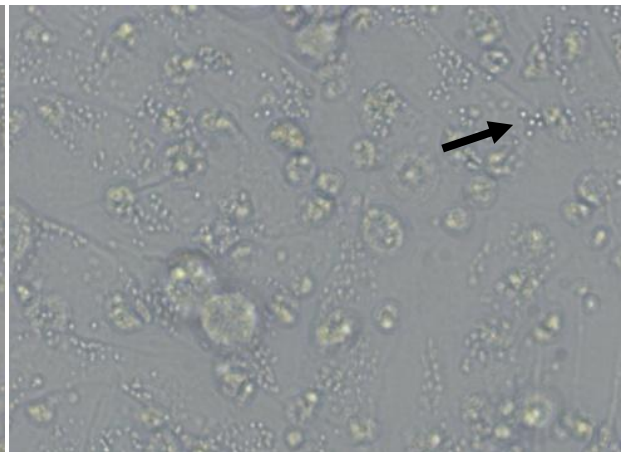


#### 4.1.1.1.4 Ko-Kultur mit murenen Adipozyten

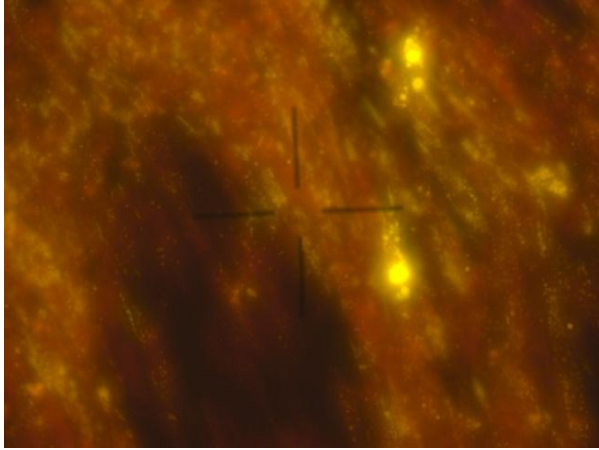
Eine mögliche Beeinflussung der Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten durch murene Adipozyten wurde in einem Ko-Kultur-Experiment untersucht. Dafür wurden canine subkutane und viszerale Präadipozyten mit den dazugehörigen murenen Adipozyten, wie in Kapitel 3.3.6.3. beschrieben, ko-kultiviert. Sieben Tage nach Gabe des Induktionsmediums waren kleine Lipidtropfen in den Zellen zu sehen (Abbildung 14). Dagegen gab es bei den Präadipozyten des gleichen Tieres, die nicht mit den murenen Adipozyten ko-kultiviert wurden, weniger Zellen mit kleinen Lipidtropfen. Diese Zellen enthielten auch nicht so viele kleine Lipidtropfen wie die Zellen in der Ko-Kultur (Abbildung 15). Allerdings waren bei den Kontrollzellen häufiger Adipozyten mit größeren Lipidtropfen zu sehen, die bis zum Ende des Versuchs stetig an Größe zunahmen. Zudem erhöhte sich die Anzahl dieser Zellen, so dass es am Schluss ca. die doppelte Menge an Fettzellen mit großen Lipidtropfen gab. In der Ko-Kultur dagegen bildeten nur sehr wenige Zellen größere Lipidtropfen. Die meisten Zellen behielten ihre kleinen Tröpfchen, die nur unwesentlich größer wurden. Dies zeigte sich auch in der Nile Red Färbung (Abbildungen 16 und 17).



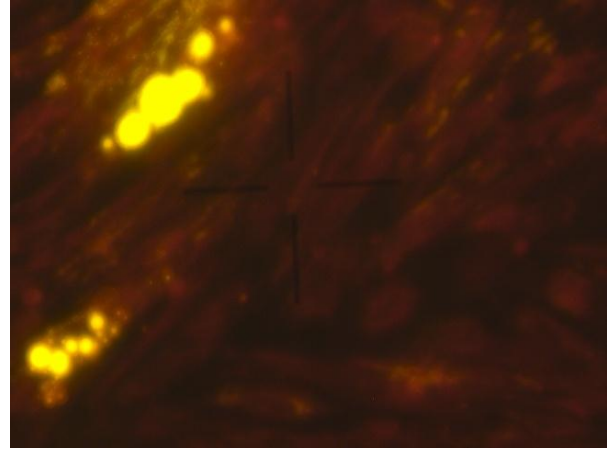
**Abbildung 14: Canine viszerale Zellen in Ko-Kultur sieben Tage nach Induktion;** Pfeil zeigt Lipidtropfen; Phasenkontrastmikroskop mit Polarisationsfilter x 100



**Abbildung 15: Canine viszerale Kontrollzellen sieben Tage nach Induktion;** Pfeil zeigt Lipidtropfen; Phasenkontrastmikroskop mit Polarisationsfilter x 100.



**Abbildung 16: Nile Red gefärbte canine subkutane Zellen in Ko-Kultur 21 Tage nach Induktion;** Fluoreszenzmikroskop x 200.



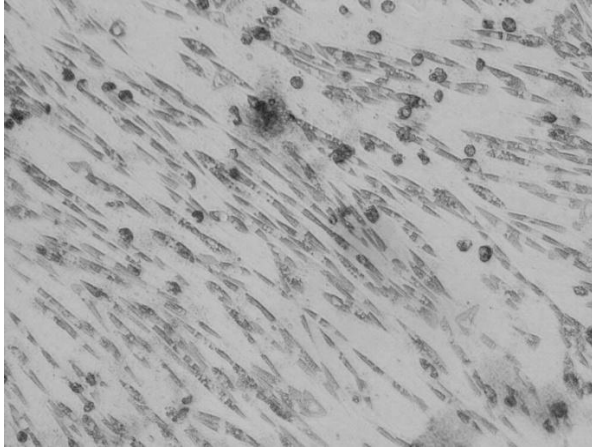
**Abbildung 17: Nile Red gefärbte canine subkutane Kontrollzellen 21 Tage nach Induktion;** Fluoreszenzmikroskop x 400.

#### **4.1.1.2 Dedifferenzierung maturer Adipozyten („ceiling culture“)**

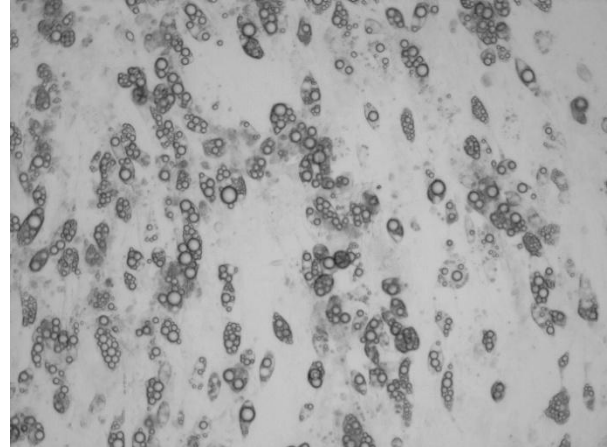
Ein völlig anderer Ansatz für die Gewinnung von adipozytären Zellen besteht in der Dedifferenzierung maturer Adipozyten.

Hierbei wurden frisch aus dem Fettgewebe isolierte mature Adipozyten für eine Woche in eine Zellkulturflasche gegeben. Diese wurde komplett mit Medium gefüllt, so dass die Adipozyten an der Flaschenoberfläche schwammen (siehe Kapitel 3.3.6.4.). Nach siebentägiger Inkubationszeit konnte man die ersten Zellen an der Flaschenoberfläche erkennen (Abbildung 18). Sie waren länglich und enthielten viele kleine Lipidtropfen. Das Zellwachstum schwankte jedoch zwischen den individuellen Fettproben. Die anschließende Passagierung und Zugabe des Induktions- und Adipozytenmediums führte bei den meisten feline Zellen zu einer Differenzierung zu Adipozyten (Abbildung 19), nicht jedoch bei den caninen viszerale Zellen. Hier differenzierten nur wenige Zellen zu Adipozyten.





**Abbildung 18: Proliferation caniner viszeraler Zellen durch „ceiling culture“, sieben Tage nach Inkubation in der Zellkulturflasche;** Phasenkontrastmikroskop x 50.



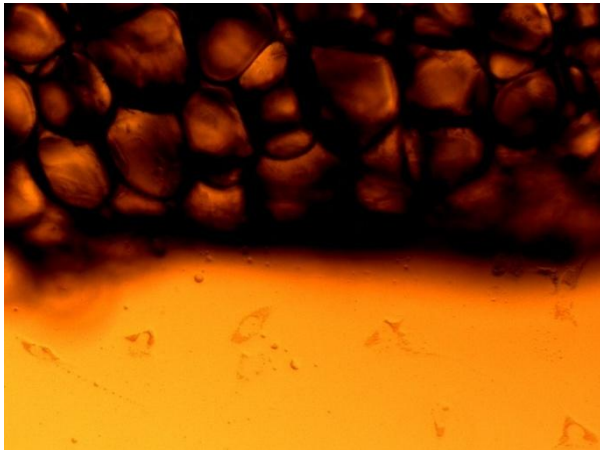
**Abbildung 19: Differenzierte feline subkutane Zellen der ersten Passage einer „ceiling culture“, 14 Tage nach Induktion;** Phasenkontrastmikroskop x 100 mit Polarisationsfilter.

#### 4.1.1.3 Explantate

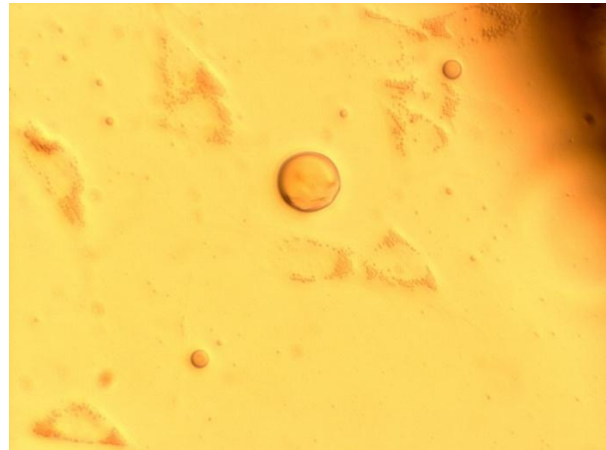
Eine weitere Methode für eine adipozytäre Zellkultur ist die Kultivierung von Fettgewebsexplantaten aus denen die Zellen auswachsen.

Bei den dafür eingesetzten caninen Explantaten konnte bereits nach zwei bis drei Tagen an den Rändern der Explantate eine Zellproliferation beobachtet werden (Abbildung 20a und b). Diese war bei den kleineren Explantaten höher als bei den größeren. Die Zellmorphologie änderte sich von einer anfangs polygonal bis ovalen Form zu einer eher spindelartigen länglichen Form (Abbildung 20b bis d). Im Zytoplasma aller Zellen befanden sich viele kleine Lipidtropfen, die mit Nile Red angefärbt werden konnten (Abbildung 20c). Nach ca. sieben Tagen gab es im Zentrum der Kavitäten einen dichten Zellrasen und die Explantate wurden umgesetzt. Da innerhalb einer Woche dieser Zustand wieder erreicht wurde, erfolgte eine nochmalige Umsetzung der Explantate. Auch noch zwei Wochen nach der Gewinnung der Fettgewebeproben konnte eine von den Explantaten ausgehende Zellproliferation verzeichnet werden.

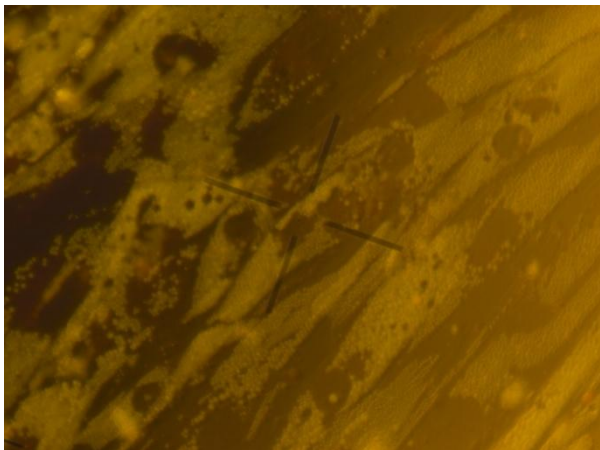
Die Passagierung der ausgewachsenen Zellen führte jedoch zu einem Verlust der kleinen Lipidtropfen im Zytoplasma. Trotz der Gabe des Induktions- und Adipozytenmediums konnte lediglich eine diffuse Gelbfärbung einiger Zellen durch Nile Red erreicht werden, größere Lipidtropfen bildeten sich dagegen nicht.



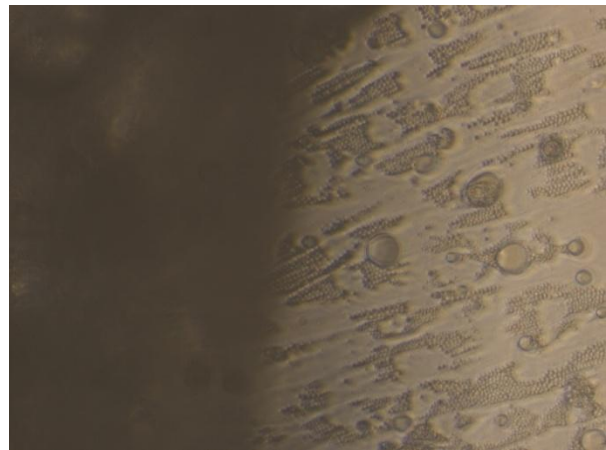
**Abbildung 20 a):** Erste Zellen bei einem caninen viszeralem Explantat nach drei Tagen Kultivierung; Phasenkontrastmikroskop mit Polarisationsfilter x 100.



**Abbildung 20 b):** Erste polygonale und ovale, auswachsende Zellen eines caninen viszeralem Explantates nach drei Tagen Kultivierung; Phasenkontrastmikroskop mit Polarisationsfilter x 320.



**Abbildung 20 c):** Auswachsende Zellen in der Nähe eines caninen subkutanen Explantates nach sieben Tagen Kultivierung; Nile Red Färbung; Fluoreszenzmikroskop x 400.



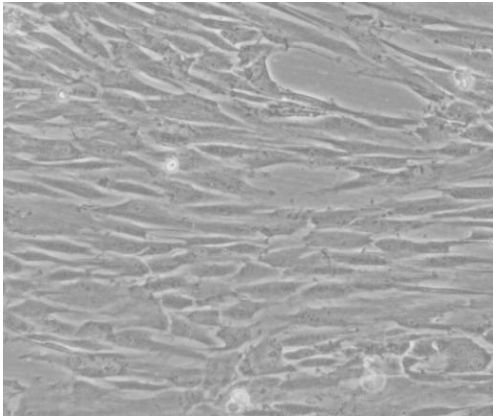
**Abbildung 20 d):** Auswachsende Zellen eines caninen subkutanen Explantates nach sieben Tagen Kultivierung; Phasenkontrastmikroskop x 100.

#### 4.1.2 Kommerzielle feline Präadipozyten

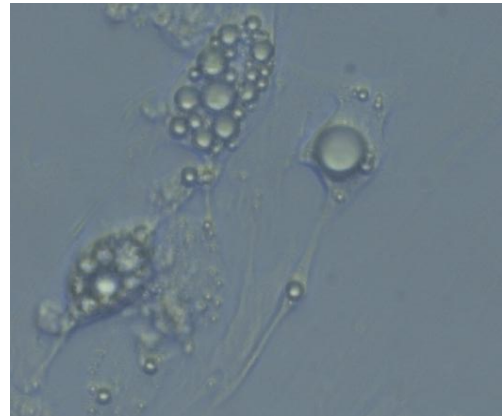
Neben der Kultivierung feline und canine Zellen aus Fettgewebeproben, wurden primäre feline Präadipozyten käuflich erworben. Die damit verbundene hohe Anzahl von Präadipozyten des gleichen Tieres, der gleichen Fettgewebslokalisation und der gleichen Passage ermöglichte die Genexpression des RAS während der Adipogenese mittels Real-time-PCR zu untersuchen. Canine Zellen dagegen sind aufgrund von Differenzierungsschwierigkeiten bisher nicht käuflich zu erwerben.

In einem Vorversuch wurde die Differenzierbarkeit, Passagierbarkeit und Genexpression der felines Zellen untersucht. Dafür wurden die kryokonservierten Zellen aufgetaut und in verschiedenen großen Zellkulturplatten nach Angaben des Herstellers kultiviert (siehe Kapitel 3.3.7).

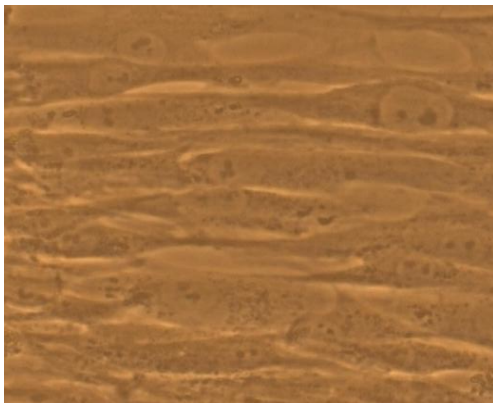
Für die Untersuchungen zur Differenzierbarkeit wurden die Zellen an verschiedenen Zeitpunkten mit einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und mit den beiden Farbstoffen Oil Red O und Nile Red gefärbt (Abbildungen 21 bis 24). Einen Tag nach Gabe des Induktionsmediums ließen sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nile Red erste kleine Lipidtropfen nachweisen. Nach einer Woche Kultivierung mit dem Induktionsmedium erhöhten sich sowohl die Anzahl der Zellen mit Lipidtropfen als auch die Lipidtropfengröße. Dies wurde nun auch durch den Farbstoff Oil Red O sichtbar. In den nachfolgenden zwei Wochen bildeten sich weitere Lipidtropfen in den Zellen, die schließlich zu größeren Tropfen fusionierten. Die Passagierung der Zellen führte zu einem Verlust der Differenzierungsfähigkeit. Daher wurden die Zellen für die Genexpressionsstudie nicht passagiert, sondern als zweite Passage verwendet.



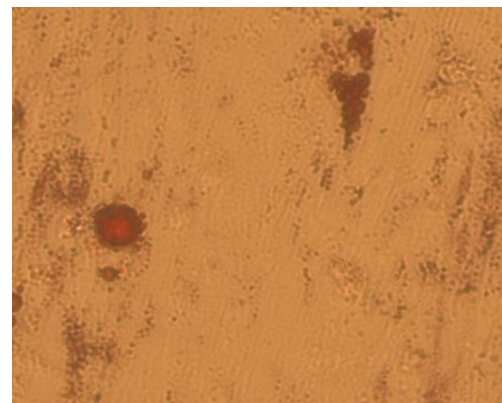
**Abbildung 21 a): Feline Zellen von Zen Bio einen Tag nach Induktion;**  
Phasenkontrastmikroskop x 100.



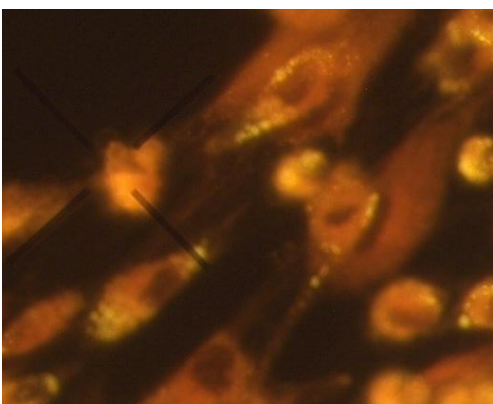
**Abbildung 22 a): Feline Zellen von Zen Bio sieben Tage nach Induktion;** Phasenkontrastmikroskop mit Polarisationsfilter x 320.



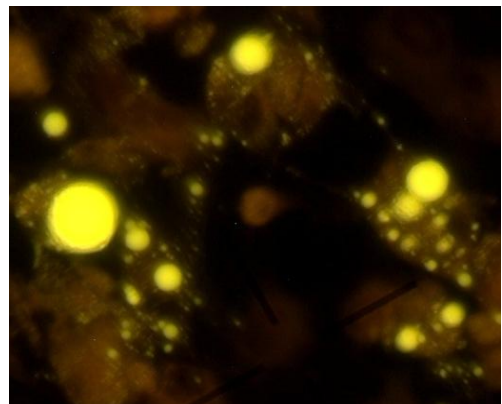
**Abbildung 21 b): Feline Zellen von Zen Bio einen Tag nach Induktion,** Oil Red O Färbung; Phasenkontrastmikroskop x 320.



**Abbildung 22 b): Feline Zellen von Zen Bio sieben Tage nach Induktion,** Oil Red O Färbung; Phasenkontrastmikroskop x 100.

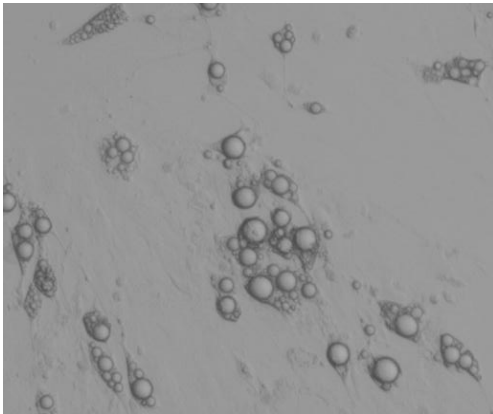


**Abbildung 21 c): Feline Zellen von Zen Bio einen Tag nach Induktion,** Nile Red Färbung; Fluoreszenzmikroskop x 400.

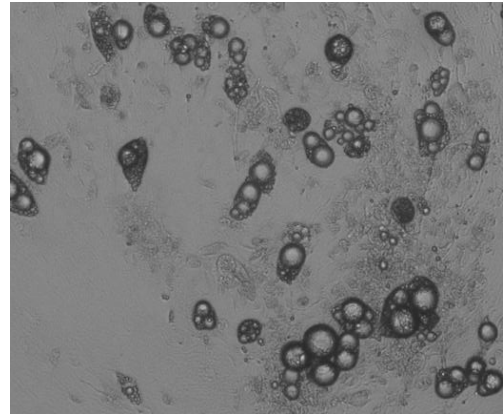


**Abbildung 22 c): Feline Zellen von Zen Bio sieben Tage nach Induktion,** Nile Red Färbung; Fluoreszenzmikroskop x 400.

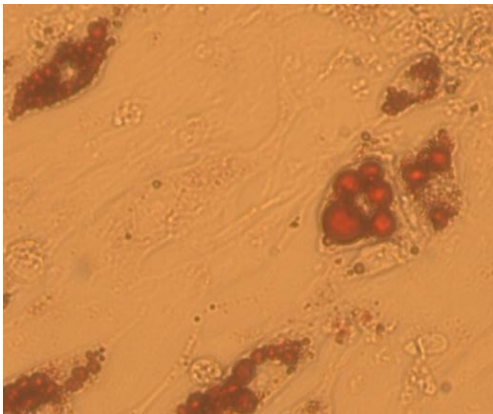




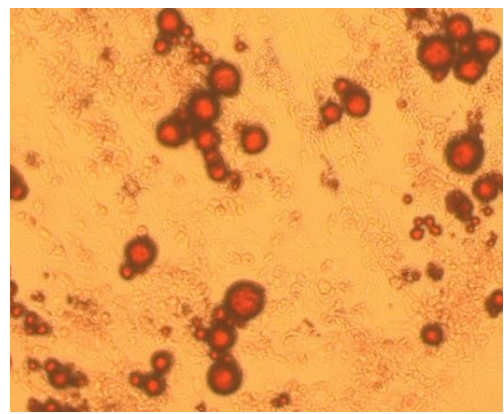
**Abbildung 23 a): Feline Zellen von Zen Bio 14 Tage nach Induktion;**  
Phasenkontrastmikroskop x 100.



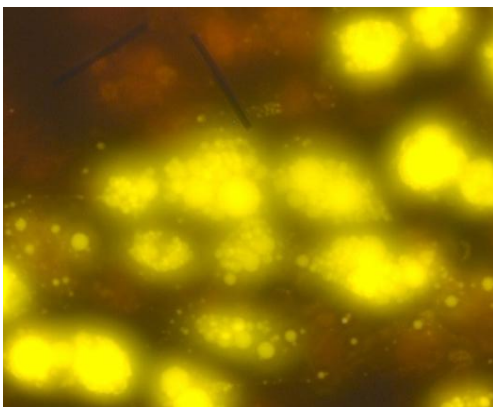
**Abbildung 24 a): Feline Zellen von Zen Bio 21 Tage nach Induktion;**  
Phasenkontrastmikroskop mit  
Polarisationsfilter x 100.



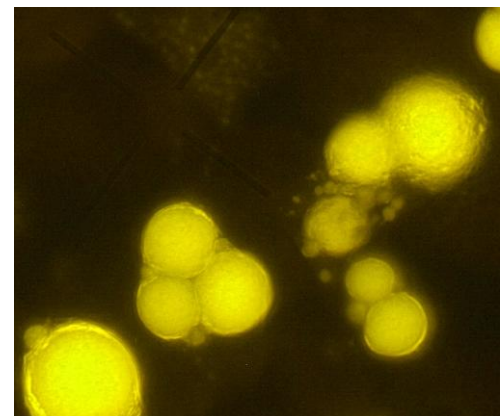
**Abbildung 23 b): Feline Zellen von Zen Bio 14 Tage nach Induktion, Oil Red O Färbung;**  
Phasenkontrastmikroskop x 320.



**Abbildung 24 b): Feline Zellen von Zen Bio 21 Tage nach Induktion, Oil Red O Färbung;**  
Phasenkontrastmikroskop x 100.



**Abbildung 23 c): Feline Zellen von Zen Bio 14 Tage nach Induktion, Nile Red Färbung;**  
Fluoreszenzmikroskop x 200



**Abbildung 24 c): Feline Zellen von Zen Bio 21 Tage nach Induktion, Nile Red Färbung;**  
Fluoreszenzmikroskop x 400

## 4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Als Grundlage für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen zum Renin-Angiotensin-System dienten einerseits primäre Präadipozyten, die *in vitro* zu Adipozyten differenziert wurden, andererseits aus dem Fettgewebe isolierte mature Adipozyten von Katzen und Hunden.

Im Vorfeld wurden spezifische Primer für die unterschiedlichen felines und caninen Gensequenzen erstellt, getestet und die erhaltenen amplifizierten PCR-Produkte auf ihre Sequenzhomologie untersucht. Die für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet.

### 4.2.1 Untersuchungen zur Genexpression im felines Fettgewebe

Für die initiale Untersuchung zum lokalen RAS im felines Fettgewebe wurde die Genexpression während der Adipogenese, unter Verwendung der käuflich erworbenen Präadipozyten, mittels Real-time-PCR analysiert. Des Weiteren wurden isolierte mature Adipozyten aus dem subkutanen und viszeralen Fettgewebe von Katzen mit unterschiedlichem Body Condition Score auf eine differentielle Genexpression untersucht.

#### 4.2.1.1 Genexpression während der Adipogenese feline Präadipozyten *in vitro*

Um zu sehen wie sich die Expression der einzelnen RAS-Komponenten im Laufe der Adipogenese ändert, wurden primäre feline Präadipozyten der Firma Zen Bio über einen Zeitraum von 21 Tagen differenziert (siehe Kapitel 4.1.2.). Während dieser Zeit wurde die Genexpression an fünf verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dafür wurde zuerst die RNA der Präadipozyten, die noch kein Induktionsmedium bekamen, isoliert. Einen Tag nach Induktion der Differenzierung wurde erneut die RNA von Zellen extrahiert, um den Einfluss des Induktionsmediums zu testen. Weitere RNA Isolierungen erfolgten sieben, 14 und 21 Tage nach Einleitung der Adipogenese. Um den Differenzierungsprozess auf Ebene der Genexpression nachvollziehen zu können, wurden der Präadipozyten-Marker Pref-1, der Adipogenese-Marker PPAR- $\gamma$  und die Adipozyten-Marker Leptin und Adiponektin gemessen. Zu den untersuchten RAS-Komponenten gehörten Angiotensinogen, die Enzyme Renin, ACE und ACE2 sowie die Rezeptoren AT1, AT2, MAS und der (Pro)reninrezeptor.

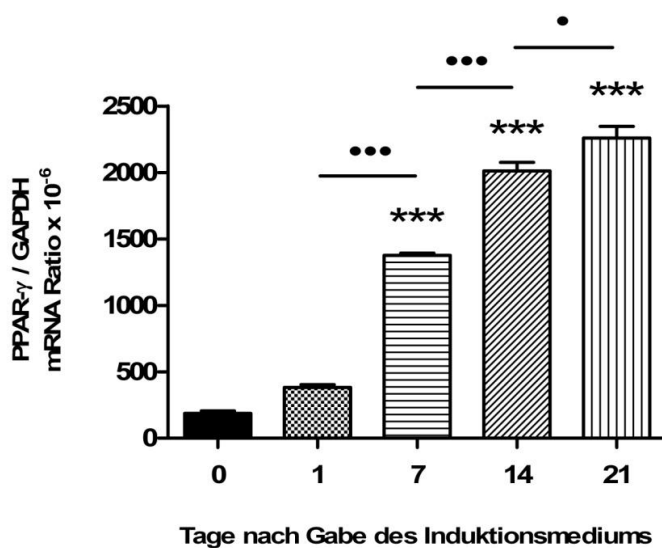
Die Normalisierung der erhaltenen Werte erfolgte mit dem Referenzgen GAPDH, welches sich in der Publikation von Gorzelniak *et al.* (2001) für Adipozyten als geeignet erwies. Für eine bessere graphische Darstellung der Ergebnisse wurden alle mRNA-Expressionsdaten mit dem Faktor  $10^6$  multipliziert.

#### 4.2.1.1.1 Zelltypspezifische Genexpression

##### PPAR- $\gamma$

Als Marker für den Differenzierungsprozess diente PPAR- $\gamma$ . Dieser Transkriptionsfaktor spielt durch die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren und adipozytenspezifischer Gene eine entscheidende Rolle bei der Adipogenese.

Während der Differenzierung der felines Zellen stieg die Expression von PPAR- $\gamma$  kontinuierlich an. Die erste signifikante Erhöhung gab es nach einer Woche Induktionsmediumgabe im Vergleich zu den Präadipozyten die kein Induktionsmedium bzw. nur einem Tag das Induktionsmedium bekamen. Dieser Expressionsanstieg setzte sich jeweils signifikant im weiteren Differenzierungsverlauf fort (Abbildung 25).



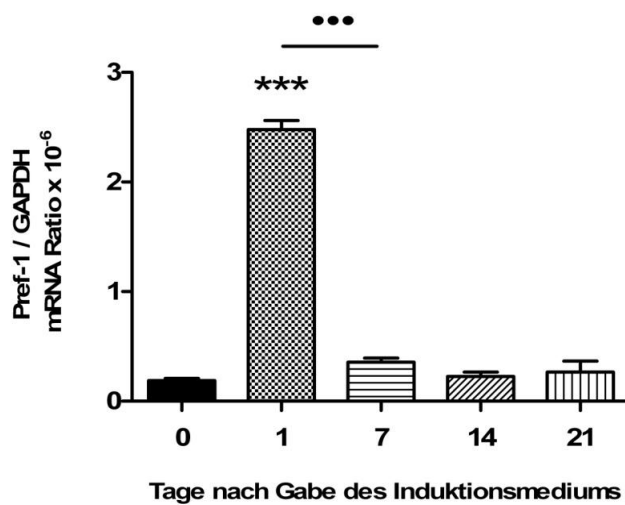
**Abbildung 25: Genexpression von PPAR- $\gamma$  während der Differenzierung der felines Präadipozyten.**

Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); \*\*\* p < 0,001 , • p < 0,05 zwischen zwei Zeitpunkten.

Pref-1

Pref-1 wird spezifisch von den Präadipozyten exprimiert (Sul 2009). Da es die Adipogenese inhibiert, sollte seine Expression während der Differenzierung sinken.

Pref-1 ließ sich an allen untersuchten Zeitpunkten in den felineen Zellen nachweisen. Allerdings gab es einen signifikanten Unterschied nur im Vergleich zu den Zellen, die einen Tag das Induktionsmedium bekamen. Die Expression war bei diesen Zellen gegenüber den Präadipozyten ohne Induktionsmedium deutlich erhöht. Eine Woche nach Induktion der Differenzierung sank die Expression jedoch wieder signifikant und blieb bis zum Versuchsende auf diesem niedrigen Niveau (Abbildung 26).



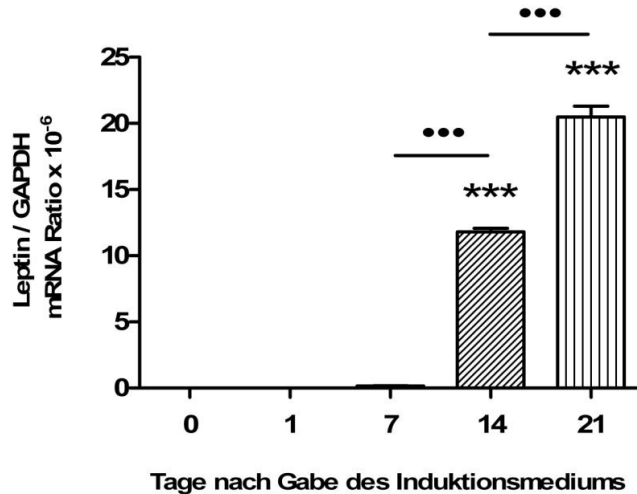
**Abbildung 26: Genexpression von Pref-1 während der Differenzierung der felineen Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); ... p < 0,001 zwischen zwei Zeitpunkten.

Leptin

Das Adipokin Leptin wird nahezu ausschließlich von Adipozyten synthetisiert und sezerniert und gilt somit als wichtiger Marker der Adipogenese.

Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen des Differenzierungsversuches wider. Eine Expression konnte erst sieben Tage nach Beginn der Differenzierung gemessen werden. Signifikant war dieser Anstieg 14 Tage nach Gabe des Induktionsmediums. Eine Woche später erhöhte sich die Expression noch einmal signifikant (Abbildung 27).



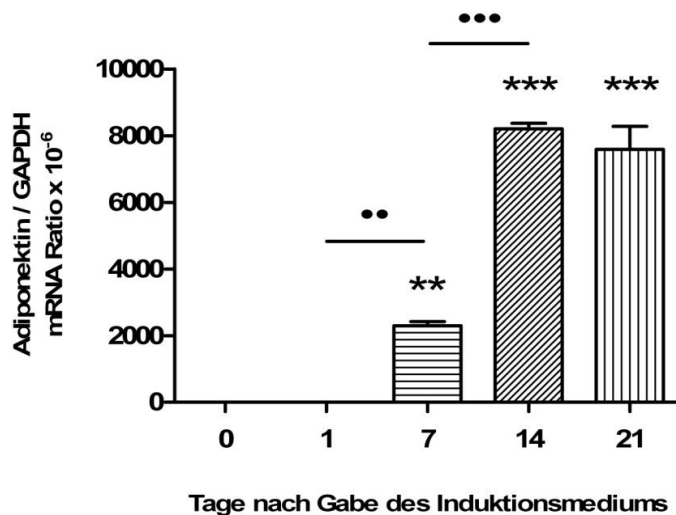


**Abbildung 27: Genexpression von Leptin während der Differenzierung der felines Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); \*\*\* p < 0,001 zwischen zwei Zeitpunkten.

### Adiponektin

Adiponektin ist ein weiteres Protein, welches exklusiv von den Adipozyten exprimiert wird.

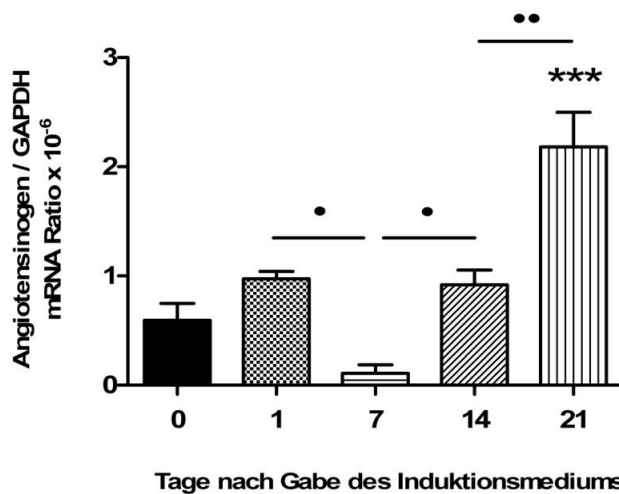
Dies bestätigen auch die Expressionsergebnisse der Differenzierungsstudie. Eine Adiponektinexpression war bei den Präadipozyten nicht nachweisbar. Erst sieben Tage nach Gabe des Induktionsmediums exprimierten die differenzierenden Zellen dieses Adipokin. Eine Woche später stieg die Expression noch einmal auf das ca. Vierfache (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Genexpression von Adiponektin während der Differenzierung der felines Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 , \*\* p < 0,01 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); \*\*\* p < 0,001 , \*\* p < 0,01 zwischen zwei Zeitpunkten.

#### 4.2.1.1.2 Angiotensinogen

Die mRNA-Expression von Angiotensinogen, dem Vorläuferprotein für die verschiedenen Angiotensin-Peptide, konnte an allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Präadipozyten war eine signifikante Erhöhung der Expression erst am Ende der Differenzierung, am Tag 21, zu sehen. Am siebten Tag der Differenzierung war die Expression signifikant niedriger als am ersten Tag. Eine Woche später erhöhte sich dieser Wert jedoch wieder auf das Niveau des ersten Tages, um sieben Tage später auf das ca. Doppelte anzusteigen (Abbildung 29).

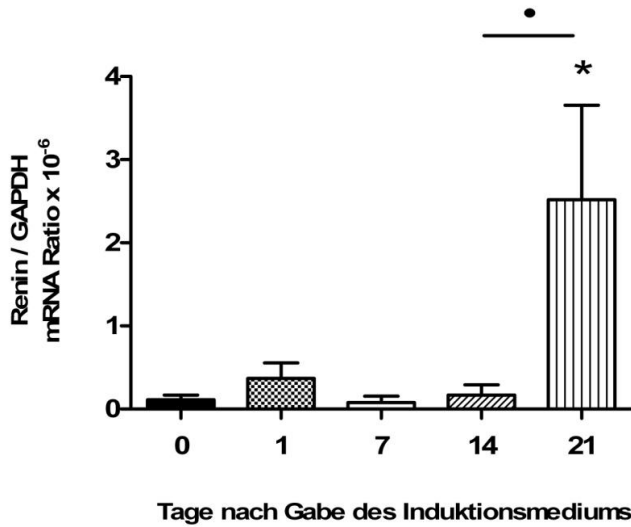


**Abbildung 29: Genexpression von Angiotensinogen während der Differenzierung der feline Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); \*\* p < 0,01 , • p < 0,05 zwischen zwei Zeitpunkten.

#### 4.2.1.1.3 Enzyme des RAS

##### Renin

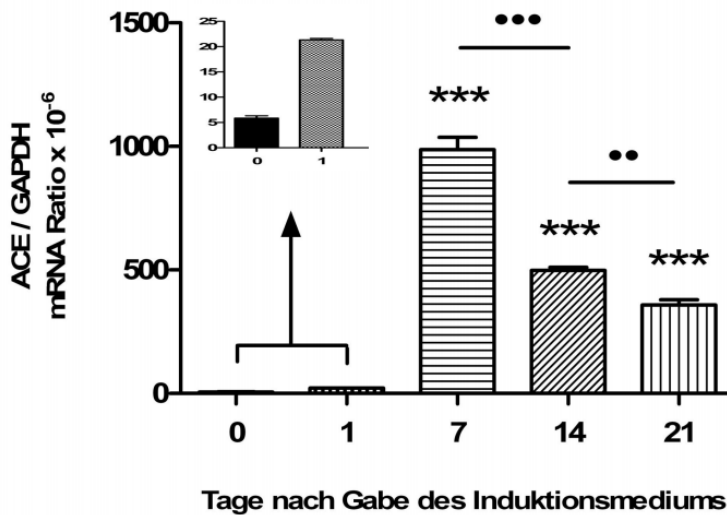
Die mRNA der Protease Renin wurde sowohl von den Präadipozyten als auch den differenzierenden Zellen an den verschiedenen Zeitpunkten exprimiert. Während es in den ersten zwei Wochen nach Gabe des Induktionsmediums im annähernd gleichen Maße exprimiert wurde, stieg seine mRNA Expression am 21. Tag signifikant an (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Genexpression von Renin während der Differenzierung der felines Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \* p < 0,05 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); • p < 0,05 zwischen zwei Zeitpunkten.

### ACE

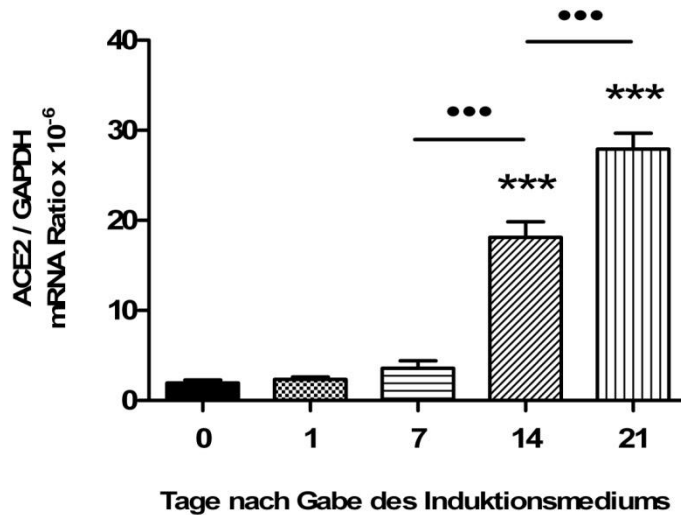
In der Abbildung 31 ist zu sehen, dass ACE schon von den Präadipozyten exprimiert wurde. Dies ist jedoch durch den sehr starken Anstieg, der nach einer Woche Induktionsmedium zu verzeichnen war, in der Abbildung 44 verdeckt. Nach diesem Anstieg sank die Expression bis zum 21. Tag auf weniger als die Hälfte der mRNA Menge.



**Abbildung 31: Genexpression von ACE während der Differenzierung der felines Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); \*\*\* p < 0,001 •• p < 0,01 zwischen zwei Zeitpunkten.

ACE2

Die Expression von ACE2 war in den Präadipozyten messbar und stieg, im Gegensatz zu ACE, in den Zellen kontinuierlich an. Die höchste Expressionsrate wurde am Ende des Versuchs erreicht (Abbildung 32).

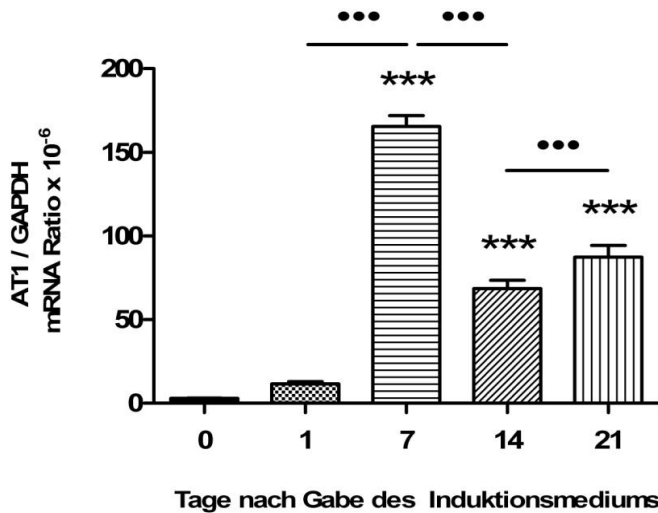


**Abbildung 32: Genexpression von ACE2 während der Differenzierung der feline Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); \*\*\* p < 0,001 zwischen zwei Zeitpunkten.

#### 4.2.1.1.4 Rezeptoren des RAS

AT1

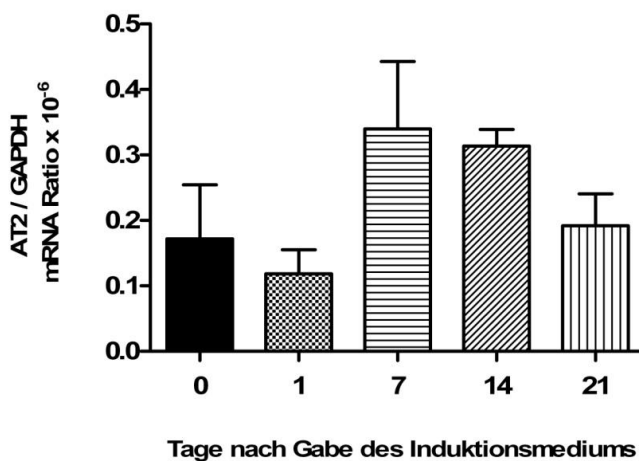
Der Abbildung 33 lässt sich entnehmen, dass die AT1 Expression, ähnlich der ACE Expression, nach einer Woche Induktionsmediumgabe am höchsten war. Danach sank die Expression signifikant. Zwischen der zweiten und dritten Woche gab es jedoch wieder einen signifikanten Anstieg in der Expression.



**Abbildung 33: Genexpression von AT1 während der Differenzierung der feline Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); ••• p < 0,001 zwischen zwei Zeitpunkten.

## AT2

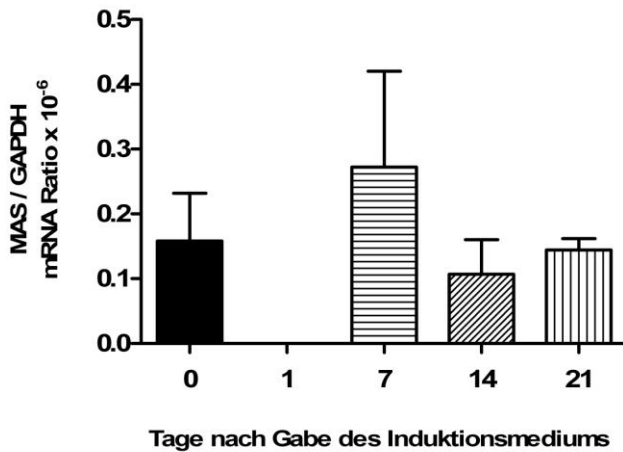
Zwar wurde AT2 von den Präadipozyten und den verschiedenen Differenzierungsstadien in geringem Maße exprimiert, die statistische Auswertung der Daten ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression. Allerdings war eine Tendenz für eine erhöhte Expression nach einer Woche Induktionsmedium zu sehen, die von einem Abfall gefolgt wurde (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Genexpression von AT2 während der Differenzierung der feline Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt).

MAS

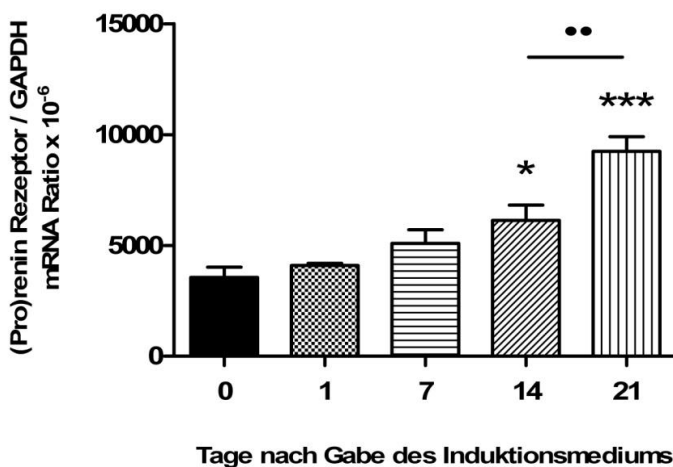
Eine Expression des MAS Rezeptors konnte ebenfalls in den felineen Zellen detektiert werden. Diese war allerdings, wie in der Abbildung 35 zu sehen, sehr niedrig. Am Tag eins ließ sich die Expression des Rezeptors in keiner der drei Zellproben nachweisen. An den Tagen sieben und 14 war die Expression nur in zwei der drei Proben messbar.



**Abbildung 35: Genexpression von MAS während der Differenzierung der felineen Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt).

(Pro)reninrezeptor

Der (Pro)reninrezeptor wurde an allen Zeitpunkten von den Zellen exprimiert. Bis zum Ende des Versuchs stieg die Expression dieses Rezeptors kontinuierlich an. Der erste signifikante Anstieg in der Expression war nach 14 Tagen Differenzierung zu sehen. Eine Woche später stieg die mRNA Expression noch einmal signifikant an (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Genexpression des (Pro)reninrezeptors während der Differenzierung der felineen Präadipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (n = 3 pro Zeitpunkt). \*\*\* p < 0,001 , \* p < 0,05 differenzierte Zellen vs. Präadipozyten (Tag 0); \*\* p < 0,01 zwischen zwei Zeitpunkten.

#### 4.2.1.2 Genexpression in den felines isolierten maturen Adipozyten

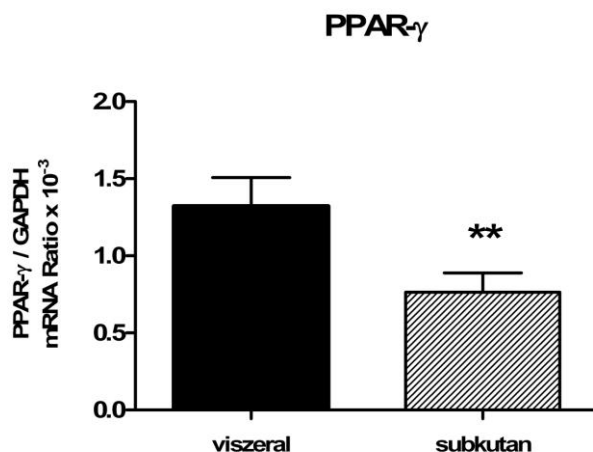
Zusätzlich zur Genexpressionsstudie an kultivierten Zellen wurden mature Adipozyten aus dem Fettgewebe isoliert und untersucht. Im Gegensatz zur Verwendung von Fettgewebeproben, die eine Vielzahl an Zelltypen enthalten, ist es durch diese Methode möglich, ausschließlich die Expression der Adipozyten zu messen. Die Fettzellen stammten sowohl aus dem subkutanen Fettgewebe als auch dem viszeralen Fettgewebe von Katzen mit einem unterschiedlichen Body Condition Score. Die einzelnen Daten der Tiere sind in der Tabelle 14 im Anhang dargestellt. Untersucht wurden dieselben RAS-Komponenten sowie zelltypspezifischen Gene wie im Differenzierungsversuch mit den kultivierten Zellen.

##### 4.2.1.2.1 Vergleich der Genexpression zwischen viszeralen und subkutanen Adipozyten

Da eine unterschiedliche Adipokinexpression zwischen den verschiedenen Fettdepots in der Literatur beschrieben wurde, ist zuerst die Genexpression zwischen den viszeralen und den subkutanen Adipozyten verglichen worden. Diese Expressionsanalyse setzte voraus, dass die Fettgewebeproben der unterschiedlichen Fettdepots jeweils von einem Tier stammen, damit individuell bedingte Einflüsse ausgeschlossen werden können. Da es bei neun Tieren sowohl viszerale als auch subkutane Proben gab, konnte für die statistische Auswertung der t-Test für gepaarte Stichproben angewandt werden. Für die graphische Darstellung wurden die Genexpressionsdaten, bis auf Adiponektin, mit dem Faktor  $10^3$  multipliziert.

##### Zelltypspezifische Genexpression

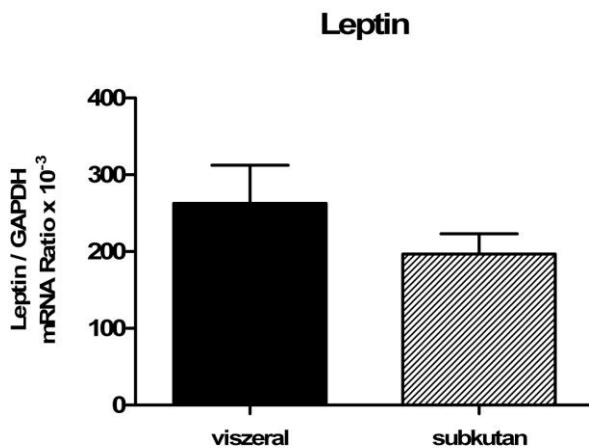
Wie in der Abbildung 37 zu sehen, war die mRNA Expression des Adipogenesemarkers PPAR- $\gamma$  in den subkutanen Fettzellen signifikant niedriger als in den viszeralen Zellen.



**Abbildung 37: Genexpression von PPAR- $\gamma$  in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils  $n = 9$ ). \*\*  $p < 0,01$ .

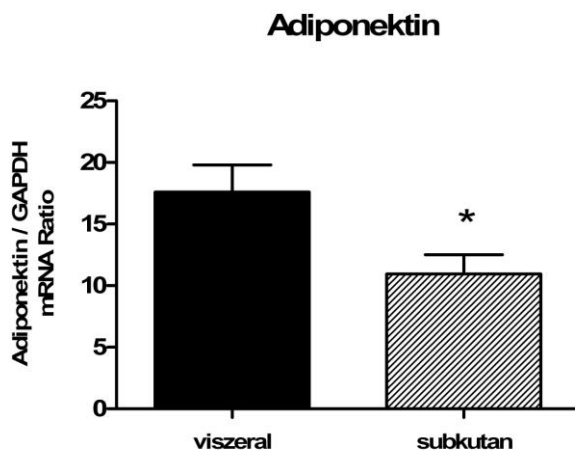
Die Expression von Pref-1 wurde zwar ebenfalls untersucht, allerdings konnte die Expression nur in drei der insgesamt 18 Proben gemessen werden. Dies war zu erwarten, da Pref-1 in hohem Maße von den Präadipozyten, die nur in einer geringen Anzahl im Fettgewebe vertreten sind, exprimiert wird. Auf eine graphische Darstellung der Ergebnisse wurde daher verzichtet.

Leptin hingegen wies eine hohe Expressionsrate auf. Einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Fettlokalisationen ließ sich jedoch nicht ermitteln (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Genexpression von Leptin in viszeralen und subkutanen muren Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils n = 9). p = 0,13.

Die höchste Expressionsrate zeigte Adiponektin. Bei diesem Adipokin konnte zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die subkutanen Fettzellen exprimierten weniger Adiponektin als die viszeralen Fettzellen (Abbildung 39).

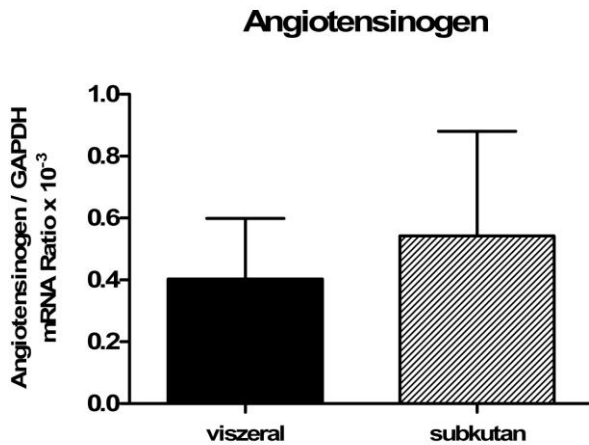


**Abbildung 39: Genexpression von Adiponektin in viszeralen und subkutanen muren Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils n = 9). \* p < 0,05.



Angiotensinogen

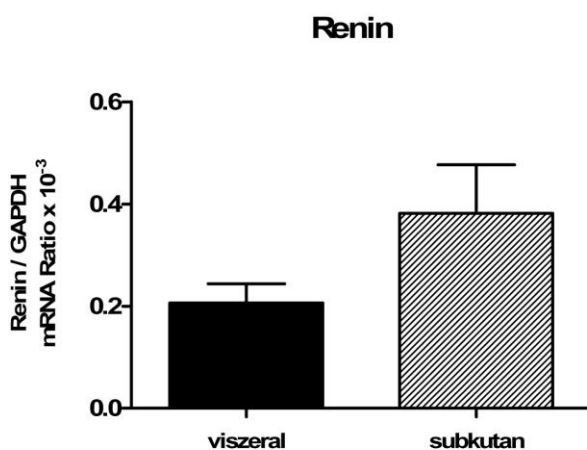
Die statistische Auswertung der Expressionsdaten des Angiotensinogens ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den viszeralen und den subkutanen Zellen (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Genexpression von Angiotensinogen in viszeralen und subkutanen muren Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils n = 9). p = 0,72.

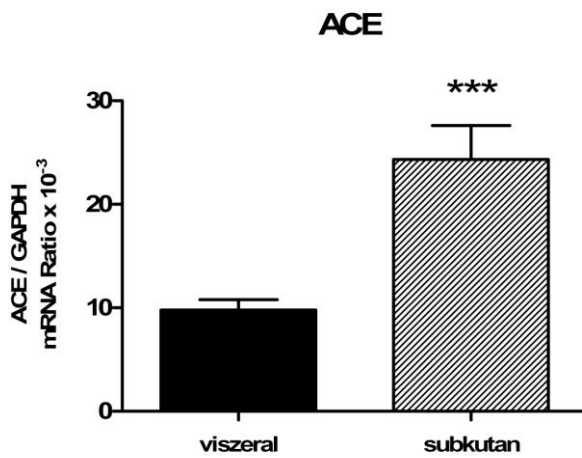
Enzyme des RAS

Bei der Expression des Renins konnte eine höhere Expression in den subkutanen Adipozyten festgestellt werden. Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,089 allerdings nicht statistisch signifikant (Abbildung 41).



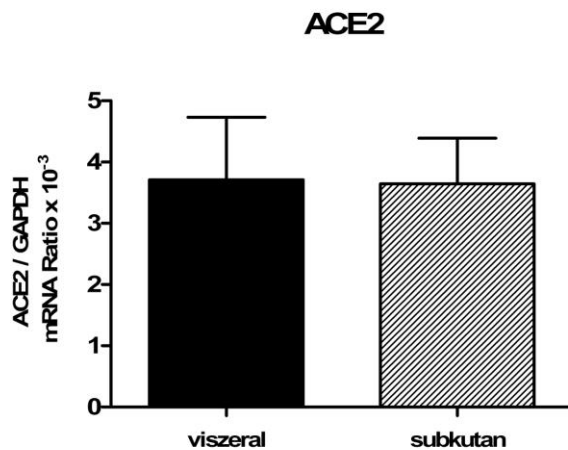
**Abbildung 41: Genexpression von Renin in viszeralen und subkutanen muren Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils n = 9). p = 0,089.

Die ACE-Expression in den subkutanen Adipozyten war gegenüber den viszeralen Zellen signifikant erhöht mit einem p-Wert  $< 0,001$  (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Genexpression von ACE in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils  $n = 9$ ). \*\*\*  $p < 0,001$ .

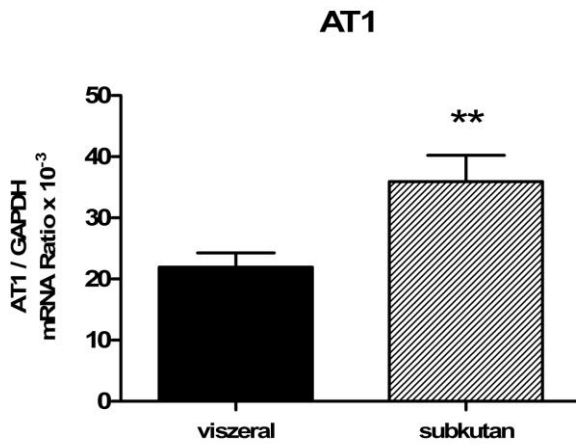
Im Gegensatz zu ACE war die Expressionsrate des ACE2 annähernd gleich zwischen den beiden Fettgewebslokalisationen (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Genexpression von ACE2 in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils  $n = 9$ ).  $p = 0,92$ .

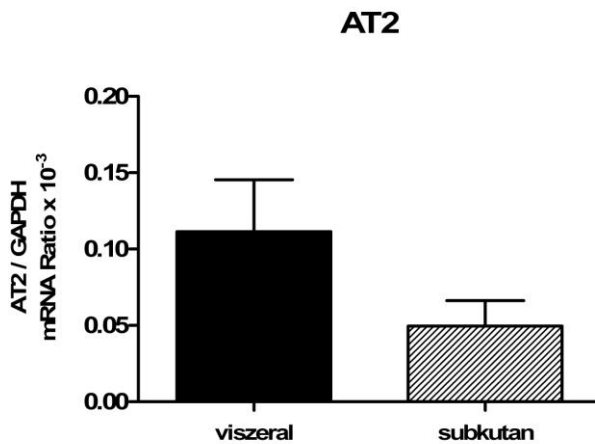
Rezeptoren des RAS

Wie in der Abbildung 44 zu sehen, wurde AT1 in den subkutanen Fettzellen signifikant stärker exprimiert als in den viszeralen Zellen.



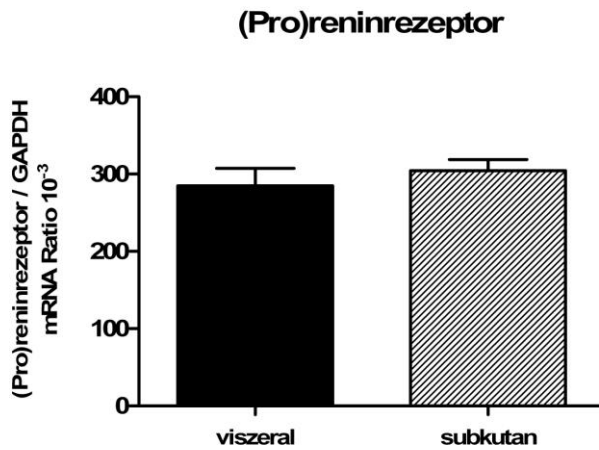
**Abbildung 44: Genexpression von AT1 in viszeralen und subkutanen murenen Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils n = 9). \*\* p < 0,01.

Hingegen war die AT2 Expression der viszeralen Adipozyten tendenziell höher, als die der subkutanen (Abbildung 45). Der p-Wert hierfür liegt bei 0,056, also nur knapp über dem festgelegten Wert von 0,05.



**Abbildung 45: Genexpression von AT2 in viszeralen und subkutanen murenen Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils n = 9). p = 0,056.

Der (Pro)reninrezeptor zeigte zwar eine starke Expression in den Adipozyten, ein Unterschied zwischen den subkutanen und den viszeralen Zellen war jedoch nicht zu sehen (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Genexpression des (Pro)reninrezeptors in viszeralen und subkutanen murenen Adipozyten.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (jeweils  $n = 9$ ).  $p = 0,50$ .

Ferner wurden die isolierten murenen Adipozyten auf die Expression des MAS Rezeptors untersucht. Seine Expression war allerdings so gering, dass sie nur in acht der 18 Proben nachweisbar war. Daher wurde auf eine statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

#### **4.2.1.2.2 Vergleich der Genexpression zwischen den felines viszeralen und subkutanen Adipozyten unter Berücksichtigung des BCS**

In diesem Kapitel wird die Genexpression der felines viszeralen und der subkutanen Adipozyten getrennt für die Tiere mit einem BCS < 5 und den Tieren mit einem BCS > 5 zusammengefasst (Tabelle 12). Dies ermöglicht eine Aussage, ob die erhöhte Fettgewebsmasse der übergewichtigen Tiere zu einer Verschiebung des Genexpressionsverhältnisses zwischen den beiden Fettgewebslokalisationen führt.

##### Zelltypspezifische Genexpression

Die Expression von PPAR- $\gamma$  war in den subkutanen Adipozyten, sowohl bei den Tieren mit einem BCS < 5 als auch bei den Tieren mit einem BCS > 5, niedriger als in den viszeralen Fettzellen. Der p-Wert für diesen Unterschied liegt allerdings bei 0,068 bzw. 0,065 und gilt damit nicht als statistisch signifikant.

Leptin wurde bei den dünnen Tieren in beiden Fettdepots ungefähr gleich stark exprimiert. Bei den übergewichtigen Tieren hingegen lässt sich eine Tendenz für eine erhöhte Expressionsrate in den viszeralen Adipozyten erkennen.

Adiponektin wurde bei beiden Tiergruppen in den viszeralen Fettzellen stärker exprimiert. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich jedoch nur bei den Tieren mit einem BCS > 5.

##### Angiotensinogen

Sowohl bei den Tieren mit einem BCS < 5 als auch den Tieren mit einem BCS > 5 ist kein Unterschied in der Expression von Angiotensinogen zwischen den beiden Fettdepots zu erkennen.

##### Enzyme des RAS

Das Verhältnis der Reninexpression zwischen den subkutanen und den viszeralen Adipozyten bei den Tieren mit einem BCS < 5 gleicht dem Verhältnis der Tiere mit einem BCS > 5. Demnach gibt es eine Tendenz für eine stärkere Expression in den subkutanen Adipozyten.

ACE wurde, sowohl bei den dünnen als auch den übergewichtigen Katzen, von den subkutanen Fettzellen in höherem Maße exprimiert. Dieser Unterschied ist nur bei den übergewichtigen Tieren signifikant. Bei den dünnen Tieren hingegen wird der Signifikanzwert nicht ganz erreicht ( $p = 0,052$ ).

ACE2 wurde bei beiden Tiergruppen von den viszeralen und den subkutanen Fettzellen ungefähr gleich stark exprimiert.

### Rezeptoren des RAS

Die AT1-Expression zwischen den beiden Fettlokalisationen unterscheidet sich zwar nicht signifikant bei beiden Tiergruppen, eine Tendenz für eine stärkere Expression in den subkutanen Adipozyten ist jedoch zu erkennen. So überschreitet der p-Wert bei den übergewichtigen Katzen nur knapp das festgelegte Signifikanzniveau von 5 %.

Die AT2-Expression war in den subkutanen Adipozyten bei beiden Tiergruppen tendenziell niedriger als in den viszeralen Adipozyten.

Der (Pro)reninrezeptor wurde bei den dünnen und den übergewichtigen Katzen von den viszeralen und subkutanen Fettzellen in gleichem Maße exprimiert.

Tabelle 12: Genexpressionsdaten der felines viszeralen und subkutanen Adipozyten getrennt nach ihrem BCS

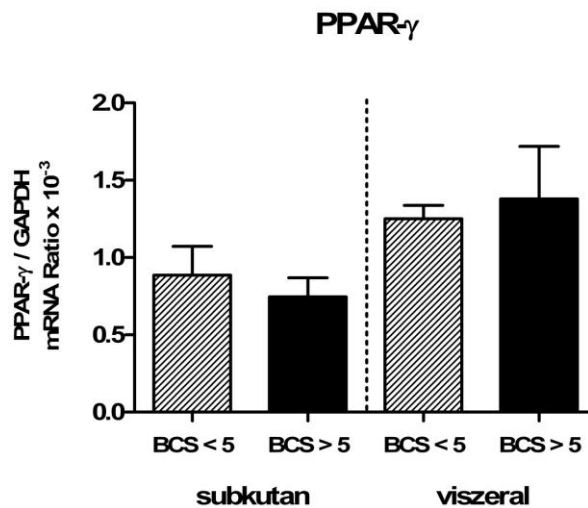
Gen	BCS	Fettort	Gen/GAPDH mRNA Ratio x 10 <sup>-3</sup>		p
			Mittelwert	Standardabweichung	
PPAR- $\gamma$	< 5	viszeral	1,249	0,220	0,068
		subkutan	0,787	0,522	
	> 5	viszeral	1,379	0,763	0,065
		subkutan	0,746	0,276	
Leptin	< 5	viszeral	163,600	70,790	0,735
		subkutan	151,100	85,870	
	> 5	viszeral	342,200	151,000	0,151
		subkutan	233,500	54,720	
Adiponektin	< 5	viszeral	16820,000	3478,000	0,215
		subkutan	12190,000	6190,000	
	> 5	viszeral	18200,000	8866,000	* p < 0,05
		subkutan	9938,000	3576,000	
Angiotensinogen	< 5	viszeral	0,579	0,865	0,672
		subkutan	0,990	1,498	
	> 5	viszeral	0,262	0,267	0,364
		subkutan	0,184	0,122	
Renin	< 5	viszeral	0,173	0,099	0,138
		subkutan	0,364	0,241	
	> 5	viszeral	0,233	0,126	0,352
		subkutan	0,396	0,344	
ACE	< 5	viszeral	10,510	4,347	0,052
		subkutan	24,110	12,080	
	> 5	viszeral	9,204	1,702	* p < 0,05
		subkutan	24,500	9,160	
ACE2	< 5	viszeral	4,466	2,699	0,140
		subkutan	5,380	2,139	
	> 5	viszeral	3,109	3,488	0,492
		subkutan	2,255	1,063	
AT1	< 5	viszeral	21,420	9,209	0,123
		subkutan	35,980	16,440	
	> 5	viszeral	22,340	5,851	0,054
		subkutan	35,930	11,220	
AT2	< 5	viszeral	0,135	0,149	0,213
		subkutan	0,041	0,032	
	> 5	viszeral	0,093	0,057	0,090
		subkutan	0,057	0,064	
(Pro)reninrezeptor	< 5	viszeral	281,800	56,620	0,244
		subkutan	303,800	44,100	
	> 5	viszeral	287,100	83,590	0,743
		subkutan	305,000	47,520	

#### 4.2.1.2.3 Vergleich der Genexpression zwischen Katzen mit niedrigem und hohem BCS unter Berücksichtigung des Fettdepots

Um die Frage nach einer differentiellen Genexpression zwischen den Tieren mit einem BCS < 5 und den Tieren mit einem BCS > 5 zu klären, wurden die in der Real-time-PCR gewonnenen Daten beider Gruppen miteinander verglichen. Aufgrund der Ergebnisse der beiden vorherigen Kapitel, wurden die Daten für beide Fettdepots getrennt ausgewertet.

##### Zelltypspezifische Genexpression

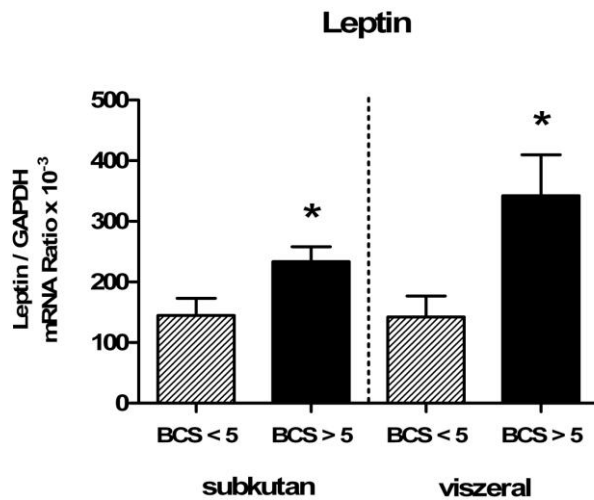
Sowohl bei den subkutanen als auch den viszeralen Adipozyten gab es bei der PPAR- $\gamma$ -Expression keinen Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Genexpression von PPAR- $\gamma$  in subkutanen und viszeralen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).  
subkutan: p = 0,57; viszeral: p = 0,73.

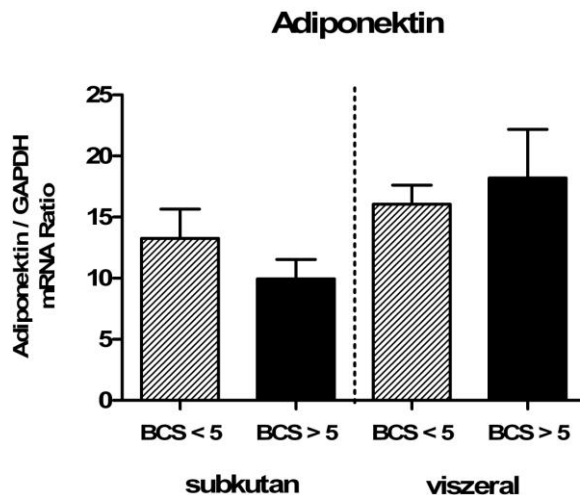


Leptin dagegen wurde von den subkutanen und viszeralen Fettzellen der übergewichtigen Tiere signifikant stärker exprimiert (Abbildung 48).



**Abbildung 48: Genexpression von Leptin in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).  
subkutan: \* p < 0,05; viszeral: \* p < 0,05.

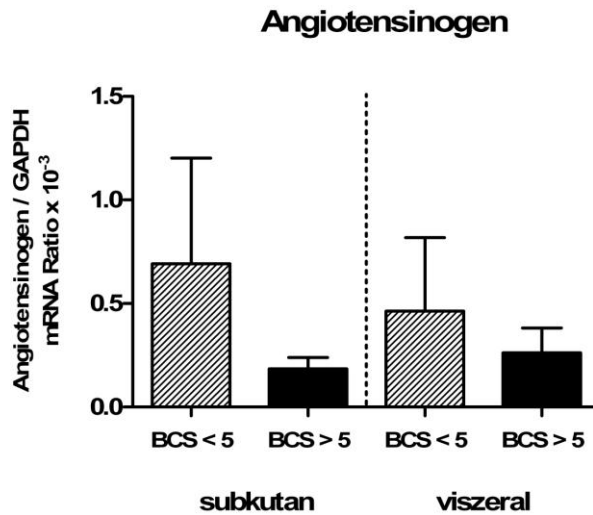
Für die Adiponektinexpression hingegen ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden BCS-Gruppen feststellen (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Genexpression von Adiponektin in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).  
subkutan: p = 0,30; viszeral: p = 0,63.

Angiotensinogen

Die graphische Darstellung der Angiotensinogenexpression lässt zwar eine niedrigere Expression bei den übergewichtigen Katzen vermuten, signifikant ist dies jedoch nicht. Auffallend ist die starke Streuung bei den dünnen Tieren. Daher lässt die geringe Streuung bei den übergewichtigen Tieren vermuten, dass im Zuge der Gewichtszunahme Angiotensinogen geringer exprimiert wird (Abbildung 50).

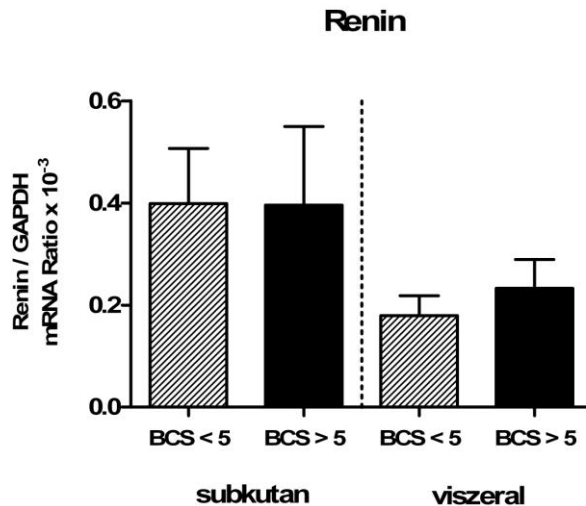


**Abbildung 50: Genexpression von Angiotensinogen in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).

subkutan: p = 0,39; viszeral: p = 0,61.

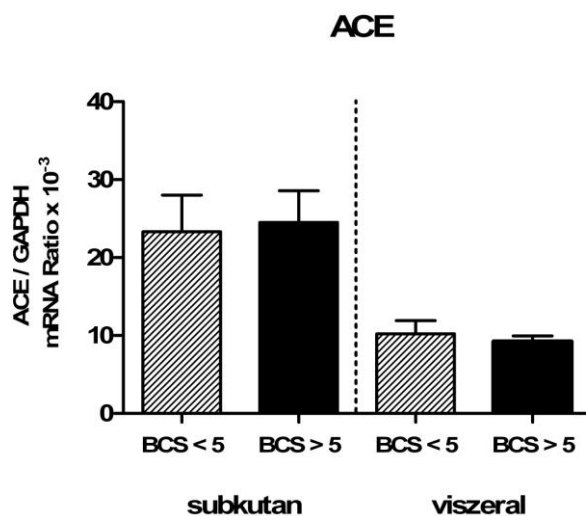
Enzyme des RAS

Die Protease Renin wurde von beiden Tiergruppen, in den subkutanen wie auch den viszeralen Adipozyten, im gleichen Maße exprimiert (Abbildung 51).



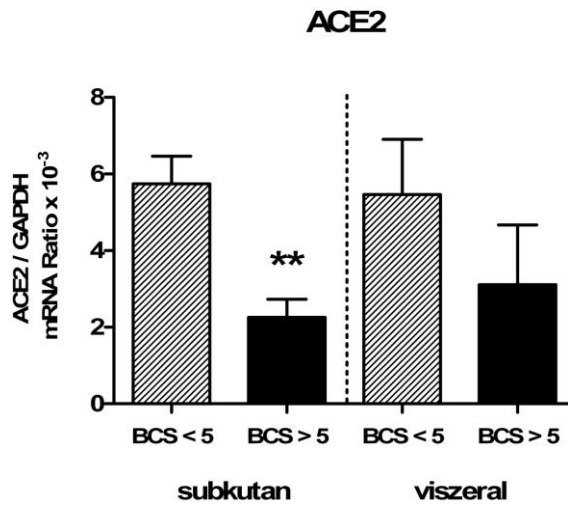
**Abbildung 51: Genexpression von Renin in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).  
subkutan: p = 0,99; viszeral: p = 0,46.

Auch die ACE-Expression der Fettzellen der übergewichtigen Tiere unterschied sich nicht von der Expression in den Zellen der dünnen Tiere. Dies trifft auf die subkutanen sowie die viszeralen Adipozyten zu (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Genexpression von ACE in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).  
subkutan: p = 0,86, viszeral: p = 0,61.

Die Adipozyten der übergewichtigen Katzen exprimierten weniger ACE2. Dies ist bei den subkutanen Adipozyten statistisch signifikant (Abbildung 53).

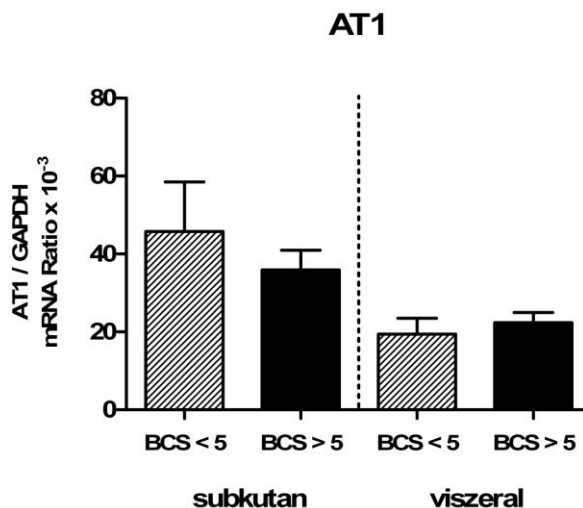


**Abbildung 53: Genexpression von ACE2 in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).

subkutan: \*\* p < 0,01; viszeral: p = 0,30.

### Rezeptoren des RAS

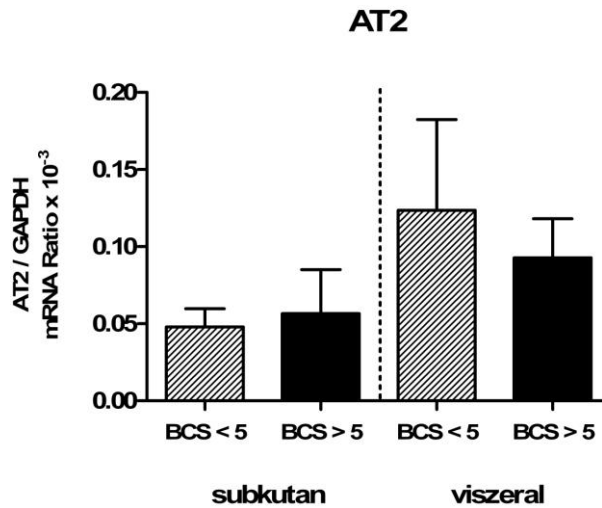
Die mRNA Expression von AT1 unterschied sich nicht zwischen den beiden Tiergruppen (Abbildung 54).



**Abbildung 54: Genexpression von AT1 in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).

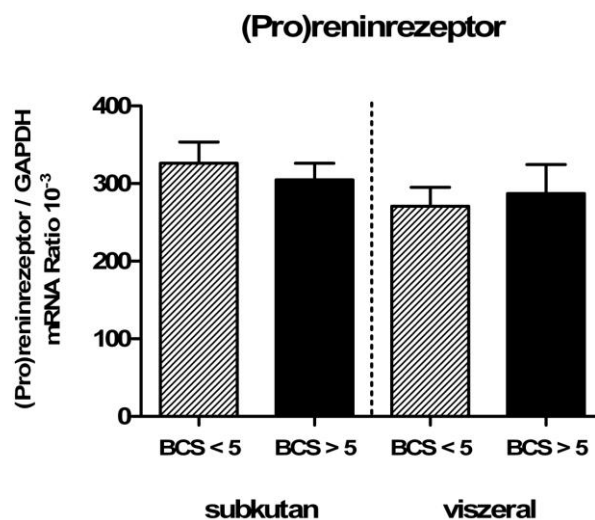
subkutan: p = 0,52; viszeral: p = 0,57.

Auch in der AT2-Expression gab es keinen Unterschied zwischen den dünnen und den übergewichtigen Tieren, sowohl bei den subkutanen als auch den viszeralen Adipozyten (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Genexpression von AT2 in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).  
subkutan: p = 0,77; viszeral: p = 0,64.

In der Expression des (Pro)reninrezeptors gab es ebenfalls keinen Unterschied zwischen den beiden BCS-Gruppen (Abbildung 56).

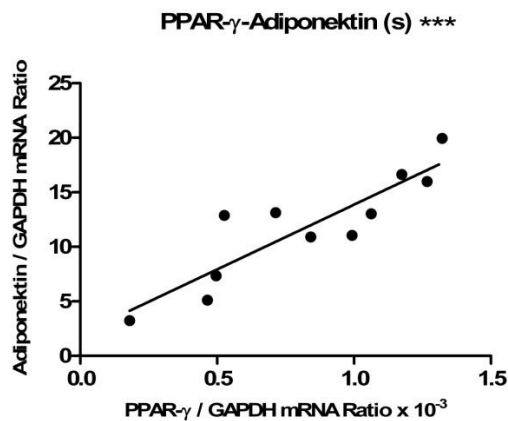


**Abbildung 56: Genexpression des (Pro)reninrezeptors in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.** Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (subkutan: BCS < 5: n = 6, BCS > 5: n = 5; viszeral: jeweils n = 5).  
subkutan: p = 0,57; viszeral: p = 0,72.

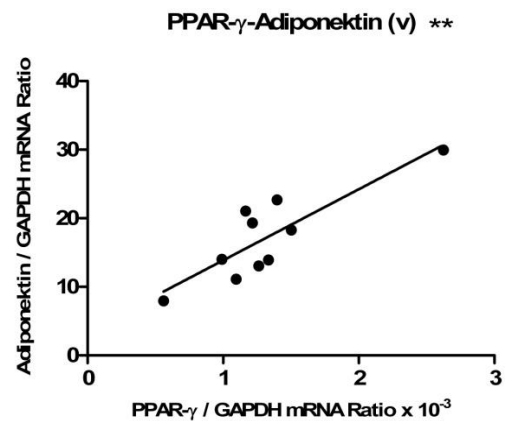
#### 4.2.1.2.4 Untersuchungen zur Korrelation zwischen den verschiedenen feline Genexpressionsdaten

Abschließend wurden die Genexpressionsdaten der isolierten Adipozyten mittels der Korrelation nach Pearson in Beziehung zueinander gesetzt. Dabei wurden die Daten für die subkutanen (s) und die viszeralen Adipozyten (v) getrennt ausgewertet. Die wichtigsten Ergebnisse hierzu werden im Folgenden graphisch mit einer linearen Regressionsgerade dargestellt.

Die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- $\gamma$  korreliert zum Beispiel signifikant positiv mit der Adiponektinexpression. Dies trifft sowohl auf die subkutanen als auch die viszeralen Adipozyten zu (Abbildungen 57 und 58).



**Abbildung 57:** Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$  und der Adiponektinexpression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 13).  
 $r = 0,89$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abbildung 58:** Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der Adiponektinexpression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.  
 $r = 0,85$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Die PPAR- $\gamma$  Expression korreliert ebenfalls signifikant positiv mit der ACE2-Expression bei beiden Fettdepots (Abbildungen 59 und 60).

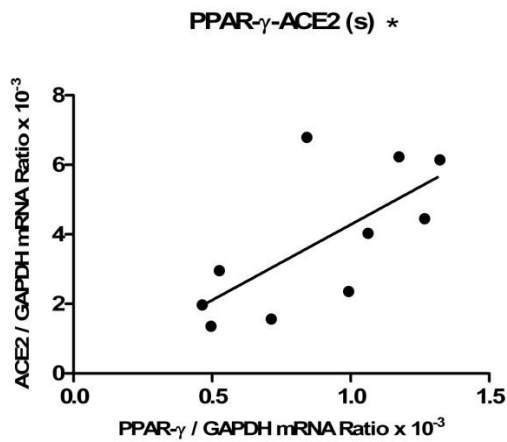


Abbildung 59: Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der ACE2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 13).

$r = 0,69$ ; \*  $p < 0,05$ .

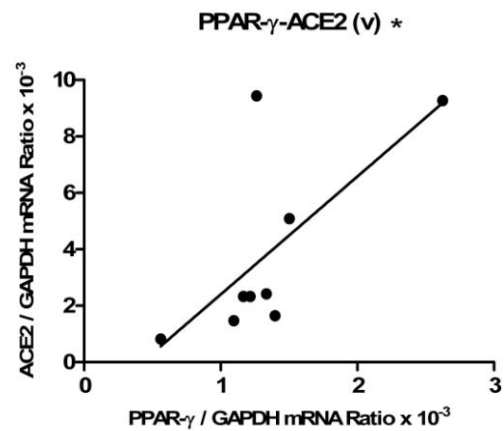


Abbildung 60: Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der ACE2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 12).

$r = 0,69$ ; \*  $p < 0,05$ .

Bei den subkutanen Adipozyten ist eine signifikant positive Korrelation zwischen der Adiponektin- und der ACE2-Expression (Abbildung 61) zu sehen. Diese Korrelation gibt es bei den viszeralen Zellen jedoch nicht (Abbildung 62).

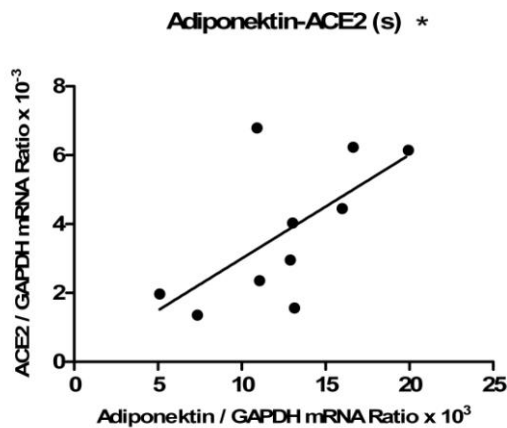


Abbildung 61: Korrelation zwischen der Adiponektin- und der ACE2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 13).

$r = 0,64$ ; \*  $p < 0,05$ .

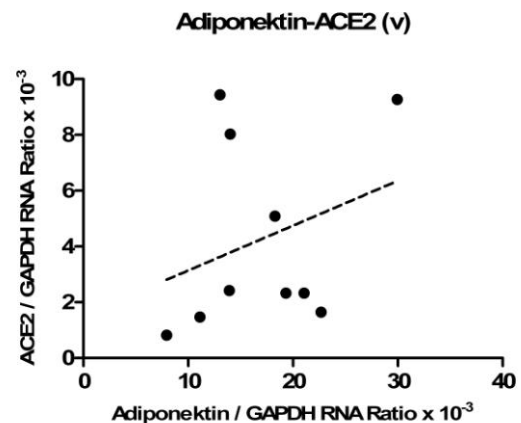


Abbildung 62: Fehlende Korrelation zwischen der Adiponektin- und der ACE2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.

$r = 0,30$ ;  $p = 0,39$ .

Leptin hingegen korreliert negativ mit der ACE2-Expression, sowohl bei den subkutanen als auch den viszeralen Adipozyten (Abbildungen 63 und 64).

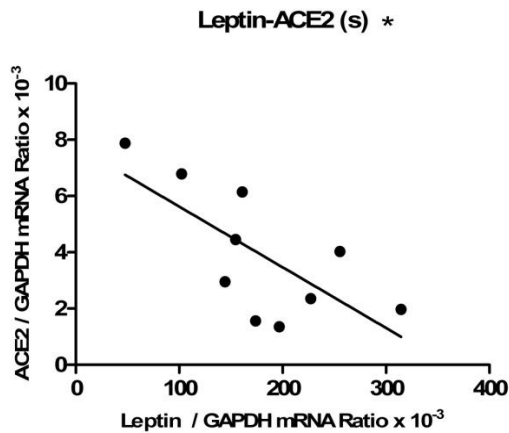


Abbildung 63: Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 19).  
 $r = -0,71$ ; \*  $p < 0,05$ .

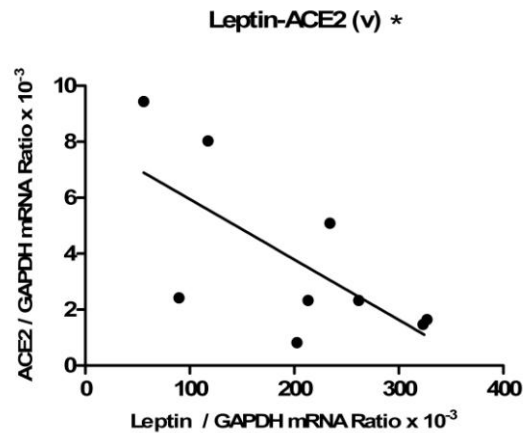


Abbildung 64: Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 6).  
 $r = -0,68$ ; \*  $p < 0,05$ .

Eine signifikant positive Korrelation gibt es dagegen zwischen der Leptin- und der ACE-Expression in den subkutanen Adipozyten (Abbildung 65). Dies trifft allerdings nicht auf die viszeralen Zellen zu (Abbildung 66).

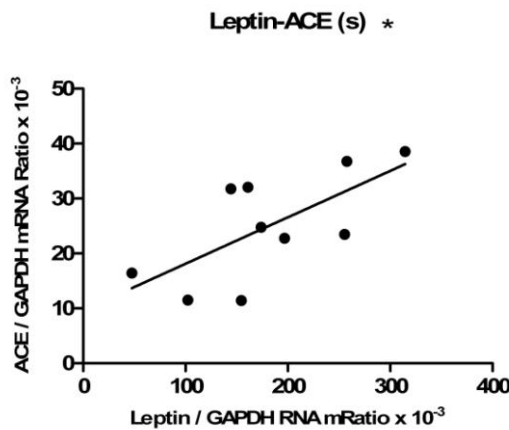


Abbildung 65: Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 17).  
 $r = 0,68$ ; \*  $p < 0,05$ .

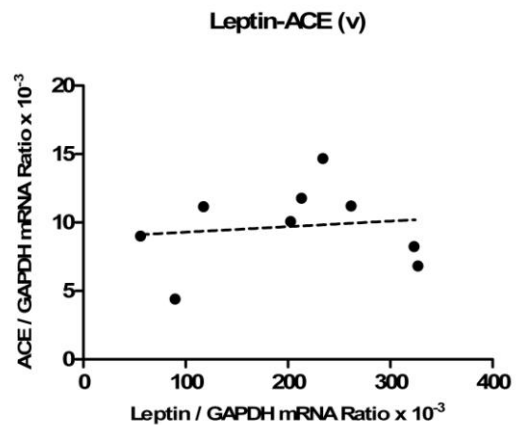


Abbildung 66: Fehlende Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 6).  
 $r = 0,13$ ;  $p = 0,74$ .



Eine Tendenz für eine positive Korrelation zwischen der Leptin- und der AT1-Expression ist in den Abbildungen 67 und 68 zu sehen.

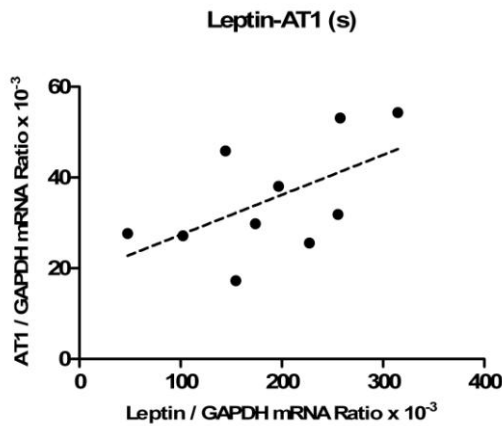


Abbildung 67: Fehlende Korrelation zwischen der Leptin- und der AT1-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 2).  $r = 0,57$ ;  $p = 0,088$ .

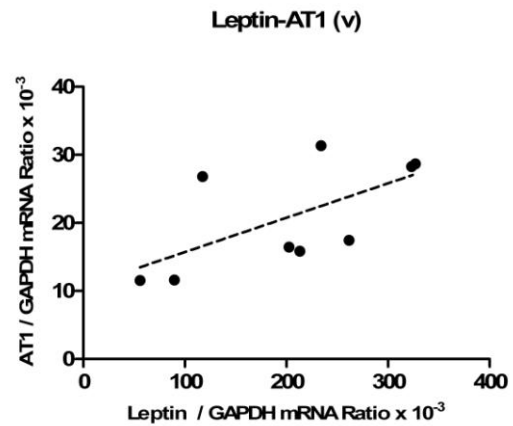


Abbildung 68: Fehlende Korrelation zwischen der Leptin- und der AT1-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 6).  $r = 0,63$ ;  $p = 0,069$ .

Ferner gibt es eine sehr starke Korrelation zwischen der ACE- und der AT1-Expression in den subkutanen Fettzellen (Abbildung 69). Eine Tendenz hierfür ist auch in den viszeralen Adipozyten festzustellen (Abbildung 70).

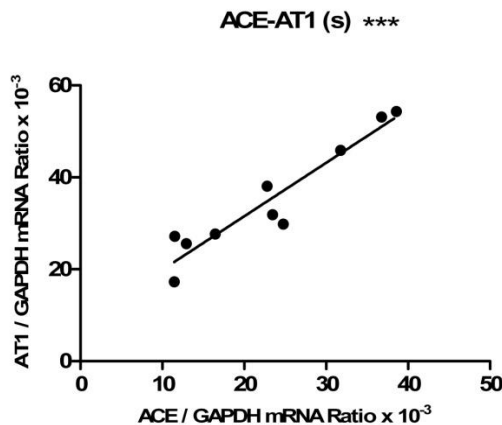


Abbildung 69: Korrelation zwischen der ACE- und der AT1-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 3).  $r = 0,95$ ;  $*** p < 0,001$

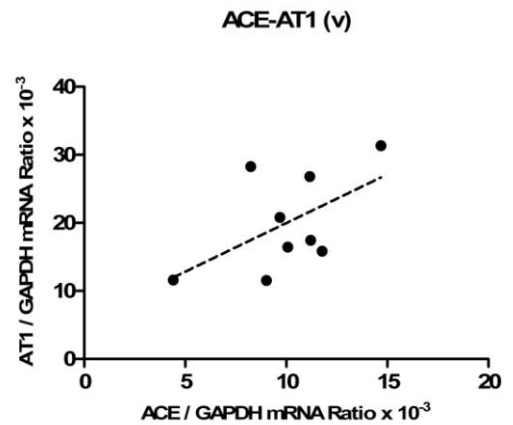


Abbildung 70: Fehlende Korrelation zwischen der ACE- und der AT1-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 16).  $r = 0,55$ ;  $p = 0,12$

Die ACE2-Expression hingegen korreliert in den subkutanen Adipozyten signifikant positiv mit der AT2-Expression (Abbildung 71). Bei den viszeralen Fettzellen kann jedoch keine Korrelation zwischen diesen beiden Genen festgestellt werden (Abbildung 72).

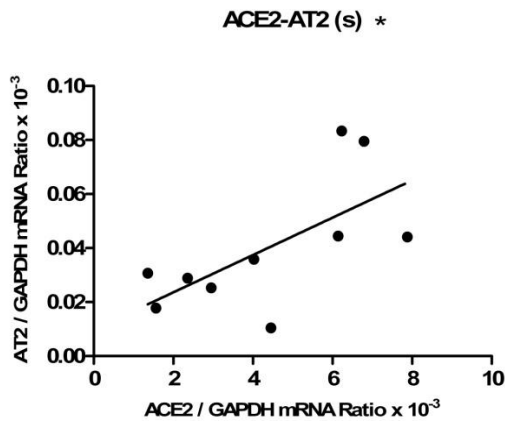


Abbildung 71: Korrelation zwischen der ACE2- und der AT2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 15).

$r = 0,66$ ; \*  $p < 0,05$

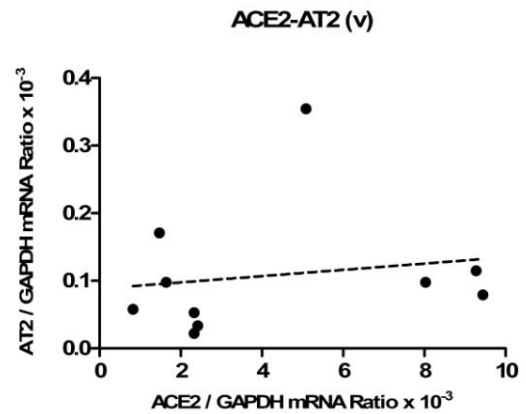


Abbildung 72: Fehlende Korrelation zwischen der ACE2- und der AT2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.

$r = 0,16$ ;  $p = 0,62$

Für Renin gibt es eine Korrelation mit der ACE-Expression. Diese unterscheidet sich allerdings zwischen den beiden Fettdepots. In den subkutanen Adipozyten korrelieren die beiden Genexpressionen positiv, in den viszeralen Zellen hingegen ist eine negative Korrelation zu sehen (Abbildungen 73 und 74).

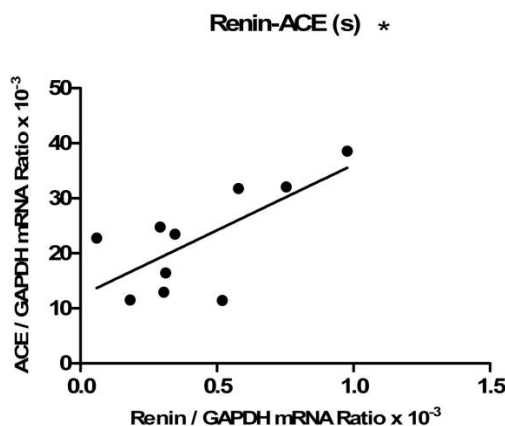


Abbildung 73: Korrelation zwischen der Renin- und der ACE-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 19).

$r = 0,69$ ; \*  $p < 0,05$

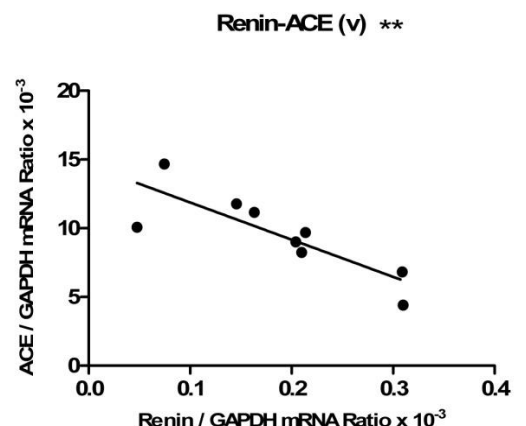
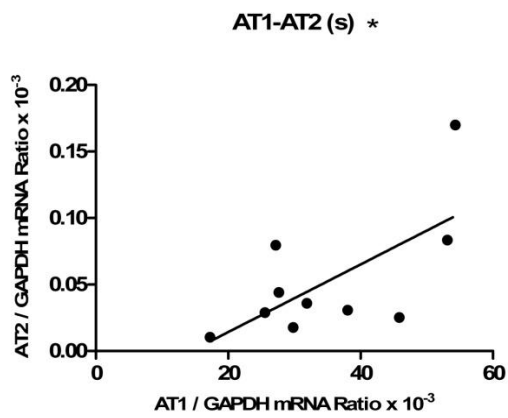


Abbildung 74: Korrelation zwischen der Renin- und der ACE-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 20).

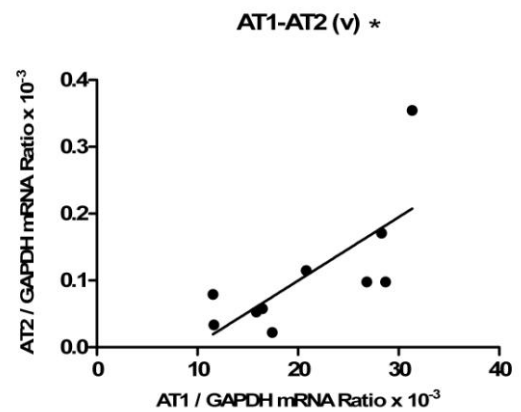
$r = -0,83$ ; \*\*  $p < 0,01$

Vergleicht man die AT1- mit der AT2-Expression in den beiden Fettdepots, so ergibt sich eine signifikant positive Korrelation (Abbildungen 75 und 76).



**Abbildung 75:** Korrelation zwischen der AT1- und der AT2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade (ohne Probe 3).

$r = 0,66$ ; \*  $p < 0,05$



**Abbildung 76:** Korrelation zwischen der AT1- und der AT2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.

$r = 0,72$ ; \*  $p < 0,05$

## **4.2.2 Untersuchungen zur Genexpression im caninen Fettgewebe**

Für die Untersuchung zum RAS im caninen Fettgewebe erfolgte ein qualitativer Nachweis in kultivierten Zellen und maturen Adipozyten mit der konventionellen PCR, da für eine quantitative vergleichende Genexpressionsuntersuchung mittels Real-time-PCR eine zu geringe Anzahl und Menge an caninen Fettgewebsproben zur Verfügung standen.

Untersucht wurden Fettgewebsproben von zwei Tieren mit einem unterschiedlichen Ernährungszustand. Für den Nachweis des RAS in den Präadipozyten wurden viszerale Zellen des Tieres H5 in der ersten Passage verwendet. Als RNA-Probe für differenzierte Adipozyten dienten die gleichen Zellen, allerdings wurden sie mit den Medien der Firma Zen Bio nach deren Protokoll differenziert und insgesamt 14 Tage lang kultiviert. Ferner wurden viszerale mature Adipozyten des gleichen Tieres (H5) sowie viszerale und subkutane mature Adipozyten eines anderen Tieres (H7) untersucht. Das Tier H5 wies einen BCS von fünf auf, der des Tieres H7 dagegen lag bei sieben.

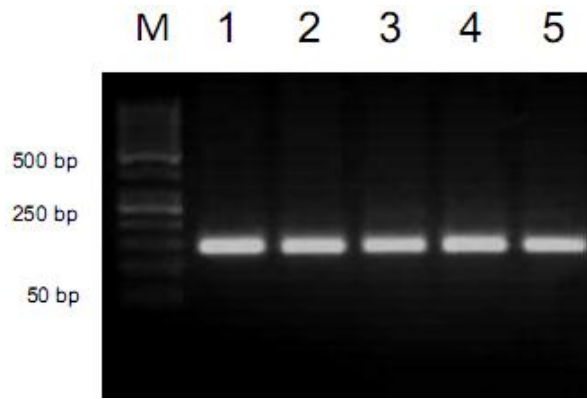
Ein Fragment des Referenzgens GAPDH wurde amplifiziert, um eine stark unterschiedliche Probenausgangsmenge ausschließen zu können. Wie in der Abbildung 77 a) zu sehen, wiesen alle Proben eine gleich starke GAPDH Bande auf.

### **4.2.2.1 Zelltypspezifische Genexpression**

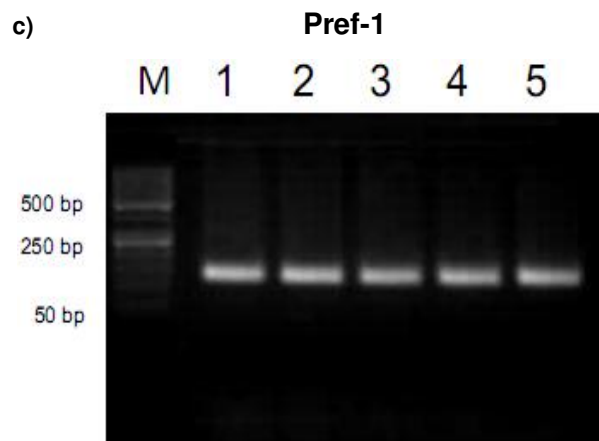
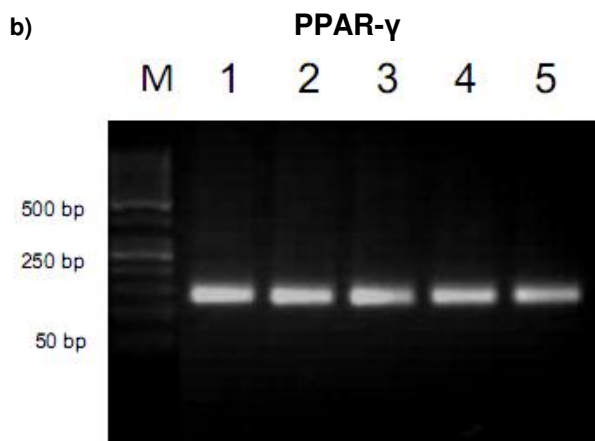
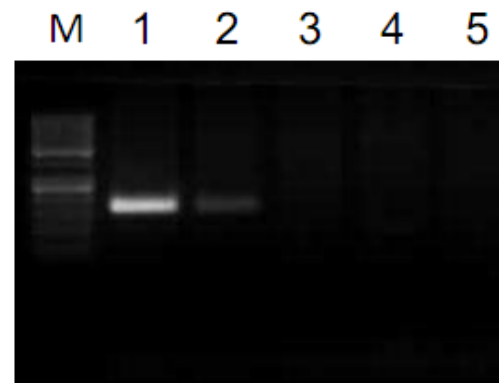
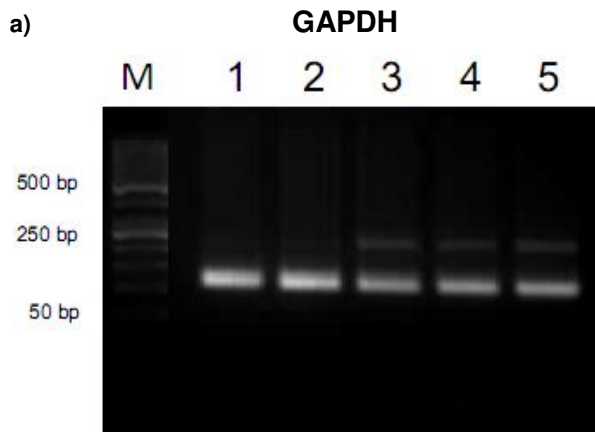
In der Abbildung 77b) ist das Ergebnis der PCR mit den Primern für den Transkriptionsfaktor PPAR- $\gamma$  dargestellt. Die kultivierten Präadipozyten und differenzierten Adipozyten zeigen nur die Bande von 112 bp, die dem PPAR- $\gamma$  Fragment entspricht. Bei den maturen Adipozyten hingegen ist eine zusätzliche Bande mit einer Größe von ca. 200 bp zu sehen.

In der Abbildung 77c) ist zu erkennen, dass Pref-1 nur von den kultivierten Zellen in nennenswerter Menge exprimiert wurde. Dabei zeigte sich, im Vergleich zu den differenzierten Adipozyten, eine stärkere Expression in den Präadipozyten.

Die Adipokine Leptin (Abbildung 77d) und Adiponektin (Abbildung 77e) dagegen werden von den kultivierten als auch den maturen Adipozyten exprimiert.



**Abbildung 77: mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von a) GAPDH, b) PPAR- $\gamma$ , c) Pref-1, d) Leptin, e) Adiponektin; 1: Präadipozyten; 2: differenzierte Adipozyten; 3: viszerale mature Adipozyten H5; 4: viszerale mature Adipozyten H7; 5: subkutane mature Adipozyten H7; M: 50 bp Marker.**



d) **Leptin**

e) **Adiponektin**

#### **4.2.2.2 Angiotensinogen**

Die Abbildung 78a) zeigt die mRNA Expression von Angiotensinogen. Das 141 bp lange Fragment konnte in allen Proben amplifiziert werden. Eine etwas schwächere Bande ist bei den differenzierten Adipozyten zu sehen.

#### **4.2.2.3 Enzyme des RAS**

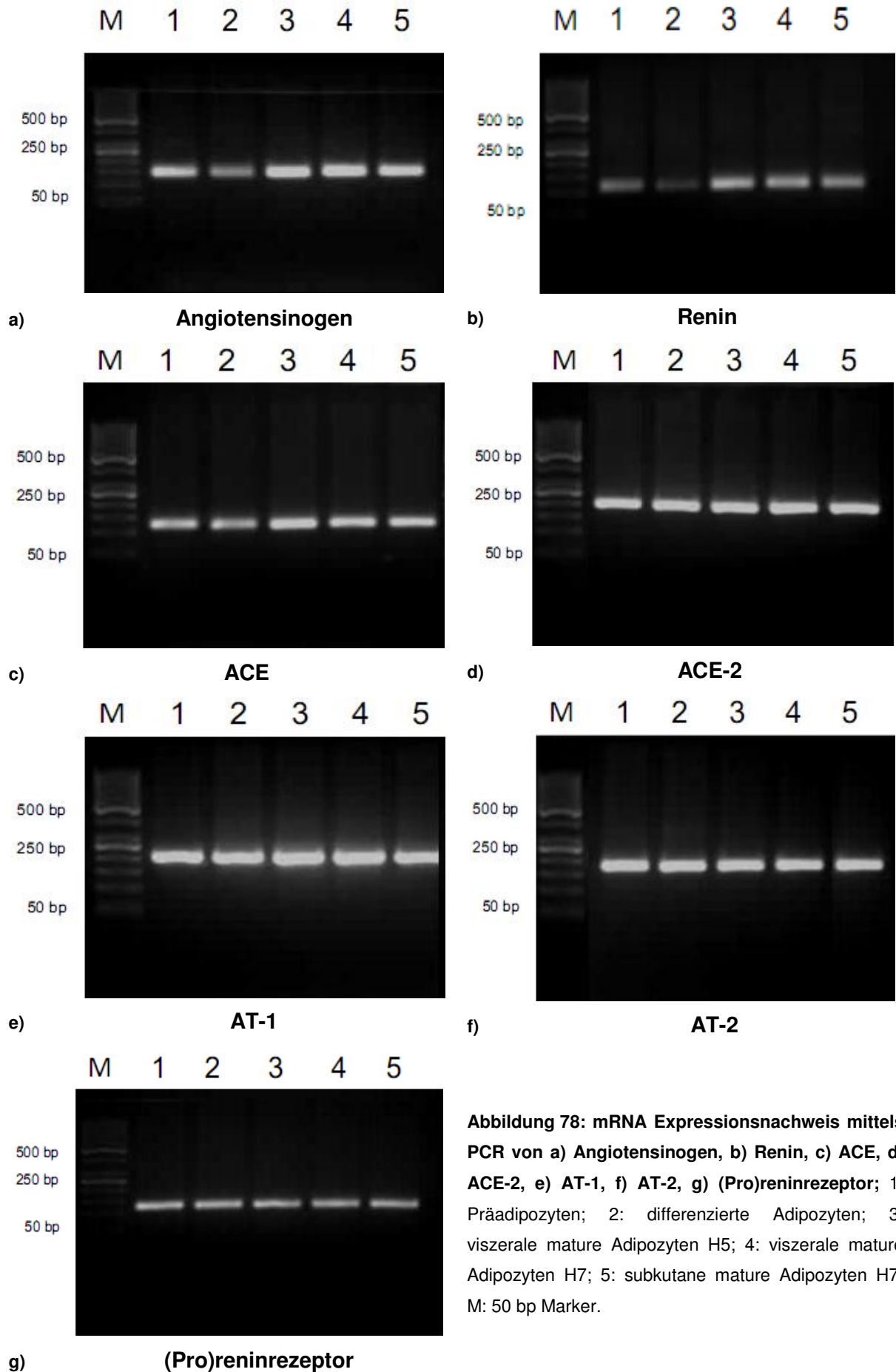
Die Protease Renin konnte mittels der PCR in den kultivierten Zellen und den murenen Fettzellen nachgewiesen werden (Abbildung 78b). Die Expression zwischen den Proben ist allerdings unterschiedlich. Da die murenen Adipozyten eine stärkere Bande als die kultivierten Zellen aufweisen, ist von einer stärkeren Expression auszugehen. Des Weiteren gibt es einen Unterschied zwischen den Banden der Präadipozyten und der differenzierten Adipozyten. Dieser Unterschied ist jedoch geringer als zwischen den kultivierten Zellen und den murenen Adipozyten.

Wie aus der Abbildung 78c) und d) hervorgeht, werden die beiden Peptidasen ACE und ACE2 sowohl von den Präadipozyten als auch den differenzierten Adipozyten und den murenen Fettzellen exprimiert.

#### **4.2.2.4 Rezeptoren des RAS**

Zusätzlich zu den Enzymen des RAS wurden die Proben auch auf die Expression der Rezeptoren getestet.

In den Abbildungen 78e) bis g) ist zu erkennen, dass die caninen Präadipozyten, die differenzierten Adipozyten und die viszerale und subkutanen Adipozyten die Rezeptoren AT1, AT2 sowie den (Pro)reninrezeptor exprimieren. Für den MAS Rezeptor konnten dagegen keine Banden detektiert werden (keine Abbildung).



**Abbildung 78: mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von a) Angiotensinogen, b) Renin, c) ACE, d) ACE-2, e) AT-1, f) AT-2, g) (Pro)reninrezeptor; 1: Präadipozyten; 2: differenzierte Adipozyten; 3: viszerale mature Adipozyten H5; 4: viszerale mature Adipozyten H7; 5: subkutane mature Adipozyten H7; M: 50 bp Marker.**

## 5 DISKUSSION

Aufgrund der weltweit steigenden Prävalenz adipöser Menschen wird derzeit an der Entstehung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen intensiv geforscht. Viele Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des lokalen adipozytären RAS an diesem komplexen Geschehen. Diese Erkenntnisse wurden bislang ausschließlich in Studien an Nagern und Menschen gewonnen. Für Katzen und Hunde dagegen gibt es bisher noch keine Untersuchungen zu diesen Zusammenhängen, obwohl diese beiden Spezies zunehmend von Adipositas und den damit verbundenen Erkrankungen betroffen sind. Daher sollten in dieser Arbeit feline und canine Adipozyten auf die Expression verschiedener RAS-Komponenten untersucht werden. Hierfür sollte eine Primärzellkultur etabliert werden, anhand der die Genexpression im Verlauf der Differenzierung von Präadipozyten hin zu Adipozyten untersucht werden sollte. Auf Grundlage dieser Zellkultur und den damit gewonnen Erkenntnissen könnten später weitergehende Untersuchungen zum lokalen RAS bei Katzen und Hunden erfolgen. Des Weiteren sollten mature Adipozyten aus dem subkutanen und viszeralen Fettgewebe von Tieren mit unterschiedlichem Ernährungszustand isoliert werden, um diese auf eine differentielle Genexpression zu untersuchen.

### 5.1 Etablierung einer Primärzellkultur aus Fettgewebe

*In vitro* Untersuchungen zum adipozytären RAS bieten den Vorteil, diese Adipokine unabhängig von ihren systemisch zirkulierenden Komponenten und unter konstanten und weniger komplexen Versuchsbedingungen zu untersuchen. Ferner ist es dadurch möglich dieses System gezielt zu beeinflussen, um anhand dessen Erkenntnisse zur Funktionsweise des RAS zu gewinnen. Da es zu Beginn dieser Arbeit noch nicht möglich war feline Zellen kommerziell zu erhalten, bestand die Aufgabe, neben einer caninen Zellkultur, auch eine feline Primärzellkultur zu etablieren. Unabhängig davon ermöglicht die Entwicklung eines Protokolls für die Primärzellkultur, Zellen von unterschiedlichen Individuen sowie unterschiedlichen Fettdepots zu untersuchen.

Schon seit einiger Zeit werden humane und murine Präadipozyten kultiviert und zu Adipozyten differenziert (Novakofski & Hu 1988). Dementsprechend findet man in der Literatur eine Vielzahl an Protokollen. Die am häufigsten angewandte Methode für die Gewinnung von Präadipozyten besteht in einer Dissoziation des Fettgewebes mittels Kollagenase und Trennung der Präadipozyten von den murenen Adipozyten durch



Zentrifugation. Die im Zellpellet vorhandenen Präadipozyten können anschließend kultiviert und durch Zugabe verschiedenster Substanzen differenziert werden (Bunnell *et al.* 2008).

Welche Substanzen für die Differenzierung der Zellen benötigt werden ist speziesabhängig. Für humane Zellen werden meist Dexamethason, IBMX, ein Thiazolidinderivat und Insulin verwendet (Poulos *et al.* 2010b). Dexamethason initiiert die Adipogenese einerseits über die Aktivierung von C/EBP $\delta$ , welches an den PPAR- $\gamma$  Promotor bindet, andererseits über eine Reduzierung der Pref-1 Expression (Shi *et al.* 2000; Rosen & Spiegelman 2000). Der Phosphodiesterasehemmer IBMX erhöht cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in den Zellen und aktiviert damit den Transkriptionsfaktor cAMP response element-binding protein (CREB). Dadurch wird die Expression von C/EBP $\beta$  induziert, welches wiederum zur Induktion der PPAR- $\gamma$  Expression führt (Cristancho & Lazar 2011). Das Thiazolidinderivat Rosiglitazon wirkt dagegen direkt als exogener Ligand für PPAR- $\gamma$  (Reyes & Lazalde 2007). Insulin wird als einzige Substanz von den Präadipozyten aller Spezies sowie von allen adipozytären Zelllinien für die Differenzierung benötigt (Poulos *et al.* 2010b). Im frühen Stadium der Adipogenese wirkt Insulin vorzugsweise über eine Bindung an den Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R), da dieser in den Präadipozyten höher exprimiert wird als der Insulinrezeptor. Über verschiedenste Signaltransduktionswege, wie eine Erhöhung des cAMP und Hemmung anti-adipogener Faktoren, wie beispielsweise GATA-2 und -3, aktiviert auch Insulin PPAR- $\gamma$  (Rosen & MacDougald 2006). Im Zuge der Differenzierung exprimieren die Zellen vermehrt Insulinrezeptoren (Smith *et al.* 1988). Die durch Bindung des Insulins ausgelöste Signaltransduktionskaskade führt zu einer verstärkten Expression und Translokation des GLUT4 und erhöht damit die Glukoseaufnahme in die Zellen. Die aufgenommene Glukose kann in den Fettzellen durch Bildung von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) zur Fettsäuresynthese genutzt werden (Kersten 2001). Eine Lipidformation kann zusätzlich durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors sterol regulatory element binding protein 1 C (SREBP-1C) ausgelöst werden. Dieser Faktor ist in der Kontrolle verschiedenster Gene der Lipogenese, wie die Fettsäuresynthese, involviert. Da PPAR- $\gamma$  die Expression lipogener Enzyme induziert, wirken letztendlich alle PPAR- $\gamma$  Aktivatoren, also auch Dexamethason, IBMX und Rosiglitazon, lipogen (Rosen *et al.* 2009). Zur Unterstützung der Fettsäuresynthese wird dem Medium häufig Biotin und Pantothenensäure zugegeben, da sie Ko-Faktoren für die Acetyl-CoA-Carboxylase und die Fettsäuresynthese sind (Rosen *et al.* 2009).

Diese verschiedensten Wirkstoffe, die für die Differenzierung von Präadipozyten eingesetzt werden, erwiesen sich auch in dieser Arbeit als essentiell für die felines und caninen Zellen. Zwar gab es zu dieser Zeit bereits zwei publizierte Protokolle für eine canine Zellkultur, mit diesen ließ sich aber kein optimales Differenzierungsergebnis erreichen (Wu *et al.* 2001;

Eisele *et al.* 2005). Das Protokoll von Wu *et al.*, welches kein Dexamethason und Thiazolidinderivat, dafür den PPAR- $\gamma$  Agonisten Indometacin enthielt, führte in unseren Versuchen zu keiner Differenzierung der Zellen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Eisele *et al.*, weshalb sie ein eigenes Protokoll, anlehnend an das für humane Zellen, entwickelten. Anhand des Protokolls von Eisele *et al.* sowie verschiedensten Protokollen für humane und murine Zellen, die in der Literatur zu finden sind, wurden in dieser Arbeit für die Differenzierung der felines und caninen Zellen eine Vielzahl an Medien mit unterschiedlichen Substanzen und deren Konzentrationen getestet. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass eine erhöhte Insulingabe zur Bildung vieler kleiner Lipidtropfen in den differenzierten Zellen führte. Mit einer niedrigeren Insulinkonzentration bildeten sich dagegen größere Lipidtropfen. Dies lässt sich möglicherweise mit einer entstehenden Insulinresistenz der Zellen und einer damit verbundenen reduzierten Glukoseaufnahme erklären. Werden beispielsweise humane kultivierte Adipozyten einem Medium mit hoher Insulinkonzentration ausgesetzt, so sinkt deren basale und stimulierte Glukoseaufnahme um 50 % (Renström *et al.* 2007). In 3T3-L1 Adipozyten führt eine Kultivierung mit niedriger Glukosekonzentration zur Bildung kleinerer Lipidtropfen als die Kultivierung mit einer höheren Glukosekonzentration (Lin *et al.* 2005). Daher könnte man annehmen, dass eine erhöhte Insulinkonzentration in den felines und caninen Zellen die Glukoseaufnahme senkt und dies zur Bildung kleiner Lipidtropfen führt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit eine niedrigere Insulinkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

Nachgewiesen werden konnte diese geringe Lipidtropfenbildung mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Nile Red. Dagegen färbte der Farbstoff Oil Red O nur Zellen die sehr viele bzw. größere Lipidtropfen enthielten. Dass die Nile Red Färbung eine sensitivere Methode als die Oil Red O Färbung darstellt, wurde zwar auch schon von einigen Autoren beschrieben (Mirejovsky *et al.* 1991; Barnes *et al.* 2003), trotzdem wird die Oil Red O Färbung noch immer als Standardmethode für die Anfärbung der Lipidtropfen bei Adipozyten angesehen. Daher wurden beide Färbemethoden in dieser Arbeit angewandt und führten zu vergleichbaren bzw. sich ergänzenden Ergebnissen.

Da es durch die Verwendung des Induktionsmediums nicht gelang alle Zellen zu differenzieren, wurde eine neue Kultivierungsmethode getestet. So sollte in einem Ko-Kultur Experiment der Einfluss maturer Adipozyten auf die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten untersucht werden. Dafür wurden canine subkutane und viszerale Präadipozyten mit maturen Adipozyten des gleichen Tieres kultiviert. Durch die 3  $\mu\text{m}$  großen Poren des Zellkultureinsatzes konnte ein Stoffaustausch zwischen den Fettzellen und den Präadipozyten stattfinden. Schon nach wenigen Tagen Induktionsmediumgabe zeigten sich viele kleine Lipidtropfen in den Zellen. Unter den Kontrollzellen des gleichen Tieres, die nicht

mit murenen Adipozyten ko-kultiviert wurden, gab es dagegen weniger Zellen mit kleinen Lipidtropfen. Ferner wiesen diese Zellen generell weniger Lipidtropfen auf. Einige der Zellen hatten jedoch größere Lipidvakuolen. Am Ende des Versuchs enthielten die meisten ko-kultivierten Zellen viele kleine Lipidtropfen, allerdings gab es kaum welche mit größeren Vakuolen. In der Kontrollgruppe hingegen gab es mehrere Fettzellen mit größeren Lipidtropfen, dafür hatten die restlichen Zellen kaum kleine Lipidtropfen. In einem ähnlichen Versuch von Janke *et al.* (2002) sollte der Einfluss des RAS auf die adipogene Differenzierung untersucht werden. Durch die Ko-Kultivierung humaner subkutaner Präadipozyten mit murenen Adipozyten sank jedoch die adipogene Differenzierung der Präadipozyten. Da sich dieser Effekt durch die Gabe eines AT1-Blockers aufheben ließ und die Zellen mit AT1-Blocker sogar besser differenzierten als die Kontrollzellen ohne AT1-Blocker, schlossen die Autoren auf einen inhibierenden Effekt von Ang II, welches von den murenen Fettzellen produziert wird. Allerdings sollte erwähnt werden, dass der verwendete AT1-Blocker Irbesartan ein partieller PPAR- $\gamma$  Agonist ist (Sarvani *et al.* 2008). Des Weiteren enthielt das Induktionsmedium kein IBMX. Werden humane viszerale Präadipozyten mit IBMX und Ang II kultiviert, so führt dies nicht zu einer Inhibition der Differenzierung, da einige Ang II Effekte durch den erhöhten cAMP Spiegel antagonisiert werden (Sarvani *et al.* 2008). Da in dem Ko-Kultivierungsversuch von Janke *et al.* keine Färbung mit Nile Red, sondern nur mit Oil Red O durchgeführt wurde, könnte es auch möglich sein, dass die winzigen Lipidtropfen, die in den caninen Zellen der eigenen Studie zu sehen waren, in den humanen Zellen jener Studie nicht beobachtet werden konnten. Da die caninen Zellen der Ko-Kultur morphologische Ähnlichkeiten mit den Zellen hatten, die eine hohe Insulingabe bekamen, könnte die Möglichkeit bestehen, dass die murenen Zellen durch ihre Stoffwechselaktivität den Glukosespiegel des Mediums senkten. Dadurch würde auch die Glukoseaufnahme der differenzierenden Zellen sinken und sie würden kleinere Lipidtropfen ausbilden. Dies würde aber auch bedeuten, dass die Präadipozyten in Gegenwart murerer Adipozyten besser differenzieren, denn nahezu alle Zellen wiesen diese Lipidtropfen auf. Dagegen führte die Kultivierung ohne murene Fettzellen nur bei einem Teil der Zellen zur Differenzierung. Verantwortlich für eine bessere Differenzierung in der Ko-Kultur könnte beispielsweise das von den murenen Adipozyten sezernierte Protein, Adiponektin sein. Zumindest führte eine Adiponektin-Überexpression in 3T3-L1 Zellen zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen. Zusätzlich akkumulierten diese Zellen vermehrt Lipide und wiesen eine höhere Expression und Translokation des GLUT4 auf (Fu *et al.* 2005). Da Adiponektin nicht nur autokrin, sondern auch parakrin wirkt, könnten die Fettzellen in der caninen Ko-Kultur durch die Sezernierung des Adiponektins einen positiven Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten ausgeübt haben. Eine stärkere Lipidbildung blieb eventuell dadurch aus, dass die Fettzellen den Glukosespiegel des Mediums senkten. Da die Fettzellen eine Vielzahl an

Adipokinen sezernieren, könnten aber auch viele andere Proteine für diese Effekte verantwortlich sein. Daher müsste der Einfluss maturer Adipozyten auf die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten weiter untersucht werden.

Eine weitere Zellkulturmethode, die in dieser Arbeit angewandt wurde, ist die sogenannte „ceiling culture“. Diese Methode zur Gewinnung adipozytärer Vorläuferzellen nutzt die Fähigkeit der Dedifferenzierung maturer Adipozyten. Hierbei wird Fettgewebe mittels Kollagenase dissoziiert und die maturen Adipozyten durch spezifische Zentrifugation von den restlichen Zellen getrennt. Die Fettzellen werden anschließend in eine Zellkulturflasche gegeben, die so viel Medium enthält, dass die Fettzellen an der Flaschenoberfläche haften können (Sugihara *et al.* 1986). Sugihara *et al.* (1987) konnten anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen nachweisen, dass die Fettzellen dabei ihre sphärische Form verlieren und stattdessen kleine Lipidtropfen am Zellrand aufweisen. Durch Zellteilung entstehen Tochterzellen die phänotypisch Fibroblasten gleichen, jedoch viele kleine Lipidtropfen enthalten. Diese Dedifferenzierung der maturen Fettzellen konnte auch in unseren caninen und felines Zellen beobachtet werden. Die anschließende Passagierung der Zellen und Zugabe des Induktions- und Adipozytenmediums führte zumindest bei den felines subkutanen Zellen zur Differenzierung vieler Zellen zu Adipozyten. Von den caninen viszeralen Zellen dagegen differenzierten nur wenige zu Adipozyten. Dies könnte zum einen an der unterschiedlichen Herkunft des Fetts liegen (subkutan *versus* viszeral), zum anderen aber auch an einem Unterschied in der individuellen bzw. speziesabhängigen Differenzierungsfähigkeit. Um dies zu klären, müssten weitere Fettgewebeproben von verschiedenen Fettgewebsdepots sowie von unterschiedlichen Tieren kultiviert und untersucht werden. Vielleicht lässt sich dieses Ergebnis aber auch durch ein unterschiedliches Differenzierungspotential der Zellen erklären. Matsumoto *et al.* konnten 2008 an humanen, murinen und porcinen Zellen demonstrieren, dass sich dedifferenzierte Fettzellen nicht nur in Adipozyten, sondern durch Zugabe der jeweiligen Induktionsmedien, auch in Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren lassen. Die Differenzierungsversuche an klonalen Populationen, die jeweils von einer einzigen porcinen dedifferenzierten Fettzelle stammten, zeigten aber auch, dass nicht alle Zellen das Potential haben in alle drei Zelltypen zu differenzieren. Von den acht klonalen Populationen konnten nur zwei in alle drei Zelltypen differenziert werden, drei der Zellpopulationen in zwei Zelltypen und drei der acht Populationen ließen sich nur noch in einen Zelltyp differenzieren. Aufgrund dessen vermuten die Autoren, dass die dedifferenzierten Fettzellen aus Subpopulationen bestehen, die sich in einem unterschiedlichen Stadium der Differenzierung befinden. Daher könnte es möglich sein, dass einige der caninen Zellen nicht zu Adipozyten differenzierten, da sie sich eventuell schon in einer Differenzierungsphase für den osteoblastären bzw. chondrozytären Zelltyp befanden. Um zu überprüfen, ob die felines und caninen dedifferenzierten Zellen überhaupt

diesen mesenchymalen Stammzellcharakter aufweisen, müssten die Zellen mit den entsprechenden Induktionsmedien kultiviert, gefärbt und ihre Genexpression untersucht werden.

Da für die „ceiling culture“ relativ große Probenmengen benötigt werden und diese nur selten für diese Arbeit zur Verfügung standen, wurde noch eine dritte Methode für eine adipozytäre Zellkultur angewandt. Hierbei sollten aus kleinen kultivierten Fettgewebsexplantaten Zellen auswachsen. Diese Zellkulturtechnik wurde schon für die Gewinnung anderer Zelltypen beschrieben, wie beispielsweise Keratinozyten, Perizyten, bronchiale Epithelzellen und Herzvorläuferzellen (Guo & Jahoda 2009; Maier *et al.* 2010; Pohl *et al.* 2009; Davis *et al.* 2009). Zu Beginn dieser Arbeit gab es für die Gewinnung adipozytärer Zellen aus einer Fettgewebsexplantationskultur noch keine Publikation, daher wurde ein eigenes Protokoll erarbeitet. Dieses bestand aus der Exzision von 2–8 mm<sup>3</sup> großen Stücken aus der Fettgewebprobe, die in jeweils eine Kavität einer Zellkulturplatte gelegt wurden. Das Medium wurde nur soweit zugegeben, dass die Explantate noch am Boden hafteten. Um ein Austrocknen der Explantate zu verhindern, wurden die Zellkulturplatten in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Februar 2011 publizierten Jing *et al.* eine ähnliche Methode. Sie platzierten im Abstand von 5 mm mehrere 1–2 mm<sup>3</sup> große inguinale Fettgewebsstücke von acht Wochen alten Mäusen und kultivierten diese in einer Zellkulturflasche. Ähnlich wie bei den caninen Explantaten, migrierten und proliferierten auch hier nach zwei Tagen die ersten spindelförmigen Zellen. Diese enthielten ebenfalls, wie die caninen Zellen, winzige Lipidtropfen. Nach Erreichen einer ca. 80 %igen Konfluenz wurden die murinen Zellen passagiert und durch Zugabe verschiedener Induktionsmedien erfolgreich in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenziert. Im Vergleich dazu verloren jedoch die caninen Zellen nach der Passagierung ihre Lipidtropfen. Die anschließende Gabe des Induktionsmediums führte zu keiner Differenzierung der Zellen. Da die Herkunft der Zellen nicht eruiert wurde, lässt sich hier nur spekulieren, warum die Zellen nicht differenzierten. In einer dreidimensionalen Kulturtechnik von Sonoda *et al.* (2008), bei der kleine Fettgewebsstücke von ein Wochen alten Ratten in ein Kollagengel gegeben wurden, proliferierten ebenfalls polygonal bis spindelförmige Zellen mit feinen Lipidtropfen, die als immature Adipozyten von den Autoren angesehen wurden. Ob es sich dabei um differenzierende Präadipozyten oder um dedifferenzierende Adipozyten handelt, wurde in dieser Publikation nicht erläutert. Des Weiteren proliferierten spindelartige Zellen ohne Lipidtropfen. Da sie sich in der Immunhistochemie als CD44 und CD105 positiv zeigten, wurde auf einen mesenchymalen Stammzellcharakter geschlossen. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen den caninen proliferierenden Zellen der Explantationskultur und den proliferierenden Zellen der „ceiling culture“, könnte auf eine ähnliche Herkunft der Zellen geschlossen werden. Würde dies zutreffen, so kämen für die

fehlende Differenzierung der Zellen der Explantate die gleichen Gründe in Frage, wie sie schon für die „ceiling culture“ erörtert wurden. Demnach könnten sich die Zellen schon in einer Differenzierungsphase für einen anderen Zelltyp, wie Osteoblast oder Chondrozyt, befinden. Ferner könnte die Differenzierungsfähigkeit der Zellen aufgrund eines unbekanntes Faktors, wie beispielsweise Alter oder Ernährungsstatus des Tieres, generell herabgesetzt sein.

Zusammenfassend betrachtet gibt es für die unterschiedlichen Kultivierungstechniken Vor- und Nachteile. Die Gewinnung der Präadipozyten aus dem Zellpellet ist zwar erfolgsversprechend, allerdings wird viel Ausgangsmaterial benötigt, da damit nur eine geringe Anzahl an Zellen gewonnen werden kann. Der Einfluss maturer Adipozyten auf die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten müsste weiter untersucht werden, aber selbst wenn es einen positiven Einfluss gibt, so besteht ein großer Nachteil in der begrenzten Lebensdauer der maturen Fettzellen. Für die Untersuchung des parakrinen Einflusses maturer Adipozyten auf die Differenzierung der Präadipozyten sowie auf den Stoffwechsel anderer Zelltypen, könnte die Ko-Kultur jedoch gut genutzt werden. Mit Hilfe der „ceiling culture“ kann eine hohe Anzahl an Vorläuferzellen gewonnen werden, dafür ist wieder eine relativ große Menge an maturen Fettzellen nötig. Einfacher ist dagegen die Explantationskultur, da sie zeitsparend ist und nur geringe Probenmengen benötigt werden. Dafür müsste aber die Differenzierungsfähigkeit der Zellen sichergestellt sein. Durch die geringe Probenanzahl, Probenmenge und die vorrangige Verwendung maturer Adipozyten für die Genexpressionsuntersuchung, konnten nicht alle Kultivierungsmethoden und Medienzusammensetzungen hinreichend getestet werden. So war es auch nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit der Proben untereinander von Faktoren wie Alter, Fettgewebslokalisierung oder Ernährungszustand der Tiere abhängt. Diese Zusammenhänge scheint es aber zu geben. Beispielsweise sinkt die Differenzierungsfähigkeit muriner Präadipozyten mit dem Alter (Karagiannides *et al.* 2001). Da die Fettgewebsproben dieser Arbeit von ausgewachsenen Tieren stammten, könnte die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten beeinträchtigt sein. Hinsichtlich des Einflusses der Fettgewebslokalisierung wurde an humanen Präadipozyten gezeigt, dass subkutane Zellen besser differenzieren als mesenteriale Zellen. Am schlechtesten differenzieren omentale Präadipozyten (Sepe *et al.* 2011). Auch konnte eine negative Korrelation zwischen dem BMI und der Differenzierungsfähigkeit humaner Präadipozyten festgestellt werden (van Harmelen *et al.* 2003). Um diese Faktoren auch auf canine und feline Zellen übertragen zu können, müsste eine Vielzahl an Proben dahingehend untersucht werden.

## 5.2 Genexpression in den felineen Zellen

### 5.2.1 Genexpression während der Adipogenese felineer Präadipozyten *in vitro*

Als Grundlage für weitergehende *in vitro* Untersuchungen zum lokalen Renin-Angiotensin-System in Präadipozyten und Adipozyten wurde in dieser Arbeit die Expression unterschiedlicher RAS-Komponenten im Verlauf der Adipogenese untersucht. Dies setzte eine hohe Zellzahl voraus, da die Zellen von einem Tier, einer Fettgewebslokalisierung und der gleichen, niedrigen Passage stammen sollten. Daher wurden für dieses Experiment die felineen Präadipozyten der Firma Zen Bio verwendet. Anhand des Differenzierungsprotokolls wurden fünf Zeitpunkte festgelegt, an denen die Expression der RAS-Komponenten untersucht wurde. An diesen Zeitpunkten wurde auch die Expression von Pref-1, PPAR- $\gamma$ , Leptin und Adiponektin gemessen, um den Differenzierungsprozess auf Ebene der Genexpression nachvollziehen zu können. Von den untersuchten Genen sind bisher nur die mRNA Sequenzen von GAPDH, Adiponektin, Leptin und ACE2 in der Datenbank EMBL publiziert worden. Auf Grundlage der über Sequenzvergleich mit dem humanen Genom ermittelten felineen Sequenzen der Datenbank Ensemble, konnten spezifische Primer erstellt und die Sequenzen für die Gene ACE, Angiotensinogen, AT1, AT2, MAS, PPAR- $\gamma$ , Pref-1, (Pro)reninrezeptor und Renin bestätigt werden.

Als Marker für die stattfindende Adipogenese wurde die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- $\gamma$  untersucht, da dieser der wohl wichtigste Regulator in diesem Prozess zu sein scheint (Rosen & MacDougald 2006). Eine Expressionserhöhung während der Differenzierung konnte auch für die felineen Zellen in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren (Janke *et al.* 2002; Gupte *et al.* 2008).

Pref-1 hingegen ist ein Marker für Präadipozyten. Aufgrund dessen würde man eine Abnahme der Expression im Verlauf der Differenzierung erwarten. Dies konnte jedoch bei dem Versuch mit den felineen Zellen nicht festgestellt werden. Seine Expression erhöhte sich sogar signifikant nach einem Tag Induktionsmediumgabe. Anschließend sank die Expression wieder auf das Niveau der Präadipozyten. Dieser kurzzeitige Anstieg der Expression scheint auf die Gabe des Induktionsmediums zurückzuführen zu sein. Dieses Medium enthielt zusätzlich zu den Komponenten des Präadipozytenmediums Biotin, Pantothenat, Insulin, Dexamethason, IBMX und ein Thiazolidinderivat. Jing *et al.* untersuchten 2009 die Expression von Pref-1 während der adipozytären Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen und konnten zeigen, dass IBMX die Expression von Pref-1 induziert, Dexamethason sie dagegen supprimiert. Daher ist anzunehmen, dass das im Induktionsmedium enthaltene IBMX zu einer kurzzeitigen Pref-1 Expressionserhöhung in den

felinen Zellen führte, diese jedoch durch das im Induktionsmedium ebenfalls enthaltene Dexamethason supprimiert wurde, so dass die Pref-1 Expression nach einer Woche wieder auf ein ähnliches Niveau, wie das der Präadipozyten, sank. Das Pref-1 anschließend überhaupt noch exprimiert wurde, könnte zwei Ursachen haben. Zum einen wurde das Induktionsmedium nach einer Woche nur zu 3/5 durch das IBMX-freie Adipozytenmedium ersetzt, eine gewisse Menge an IBMX verblieb also während der gesamten Differenzierungszeit und könnte zu einer Pref-1 Expression geführt haben. Zum anderen differenzierten nicht alle Zellen bis zum Versuchsende zu Adipozyten, so dass diese verbliebenen Zellen Pref-1 exprimiert haben könnten. Aufgrund dieses Versuchsergebnisses erwies sich Pref-1 als Präadipozytenmarker, entgegen einer Vielzahl an anders lautenden Publikationen, als ungeeignet.

Die Expressionsmuster von Leptin und Adiponektin hingegen entsprach den Erwartungen, dass sie im Zuge der Differenzierung von den entstehenden Adipozyten exprimiert werden. Dass die Expression von Leptin erst am 14. Tag signifikant anstieg und sich diese innerhalb einer Woche noch einmal erhöhte, könnte der Tatsache entsprechen, dass hypertrophierte Adipozyten vermehrt Leptin exprimieren (Körner *et al.* 2005; Skurk *et al.* 2007). Adiponektin hingegen wurde schon ab dem siebten Tag exprimiert, stieg bis zum 14. Tag an und fiel anschließend leicht ab. Diese Entwicklung zeigt sich auch während der Differenzierung humaner Präadipozyten (Körner *et al.* 2005). Dies könnte ein Hinweis auf die erhöhte Adiponektinexpression in kleineren Fettzellen gegenüber einer verminderten Expression in größeren Fettzellen sein, wie sie auch bei Ratten zu finden ist (DeClercq *et al.* 2011).

In dieser Arbeit zeigten die Untersuchungen der RAS-Komponenten Angiotensinogen, Renin, ACE, ACE2, AT1, AT2, MAS und (Pro)reninrezeptor erstmals, dass das lokale adipozytäre RAS nicht nur von humanen und murinen Zellen exprimiert wird, sondern auch von den felinen Zellen.

Das Prohormon Angiotensinogen wurde an allen Untersuchungszeitpunkten, wenn auch sehr gering, exprimiert. Dabei gab es einen signifikanten Abfall nach einer Woche Induktionsmediumgabe. Ob dies im Zusammenhang mit der Gabe des Induktionsmediums steht, müsste genauer untersucht werden. Das darin enthaltene Thiazolidinderivat scheint wohl keinen direkten Einfluss auf die Expression des Angiotensinogens zu haben (Rieusset *et al.* 1999). Eine Erhöhung der Expression kann dagegen über einen erhöhten cAMP-Spiegel erreicht werden (Serazin *et al.* 2004). Demnach müsste das im Induktionsmedium enthaltene IBMX als Phosphodiesterasehemmer die Expression sogar erhöhen. Für Insulin gibt es dagegen unterschiedliche Ergebnisse. Harte *et al.* (2003) und Jones *et al.* (1997a) berichten von einer Steigerung der Angiotensinogenexpression durch Insulin. In den



Versuchen von Aubert *et al.* (1998) jedoch senkt Insulin die Expression von Angiotensinogen. Dass dies ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren ist, zeigen die Ergebnisse von Aubert *et al.*. Demnach senkt Insulin die Angiotensinogenexpression, wenn es in physiologischen Konzentrationen gegeben wird. Eine höhere Konzentration und damit verbundene Insulinresistenz der Zellen führt dagegen zu einer Abnahme der Wirkung. Demgegenüber verstärkt die Gabe eines Thiazolidinderivates die Angiotensinogenexpression senkende Wirkung des Insulins, da es die Insulinsensitivität der Zellen erhöht. Dies könnte auch auf die feline Zellen zutreffen. Durch die gleichzeitige Gabe von Insulin und dem Thiazolidinderivat im Induktionsmedium könnte die Angiotensinogenexpression gesunken sein. Der Anstieg am Versuchsende könnte dagegen einer Insulinresistenz der Zellen zuzuschreiben sein, da die Konzentration des Thiazolidinderivats durch den Mediumwechsel auf das Adipozytenmedium stark abnahm. Aufgrund der vielfältigen Einflüsse in diesem *in vitro* System, gibt es für die Angiotensinogenexpression in differenzierenden Zellen unterschiedlichste Ergebnisse: einige Autoren berichten von einer Zunahme der Expression (Janke *et al.* 2002; Schling *et al.* 1999; Saiki *et al.* 2008; Ye *et al.* 2009), andere hingegen von einer Abnahme (Matsushita *et al.* 2006; Okada *et al.* 2010).

Angiotensinogen wird durch die Protease Renin enzymatisch gespalten (Abbildung 3). Die mRNA-Expression dieses Enzyms konnte auch in den feline Zellen gemessen werden. Allerdings war die Expression, bis auf den 21. Tag, so gering, dass eine statistische Auswertung der Daten aufgrund der starken Streuung der einzelnen Messergebnisse kaum möglich erscheint. Dass dieses Enzym von den Zellen nur gering exprimiert wird, zeigt sich auch in den unterschiedlichen Ergebnissen in der Literatur. Demnach gelang es zwar einigen Autoren eine Reninexpression in adipozytären Zellen nachzuweisen (Schling *et al.* 1999; Janke *et al.* 2002; Fowler *et al.* 2009), jedoch nicht allen (Engeli *et al.* 1999; Harp & DiGirolamo 1995; Saye *et al.* 1993).

Demgegenüber wies die Peptidase ACE, die Angiotensin I proteolytisch in Angiotensin II spaltet, eine relative hohe Expressionsrate auf. Einen starken Anstieg gab es nach einer Woche Induktionsmediumgabe. Anschließend sank die Expression bis zum Ende des Versuchs. Janke *et al.* (2002) konnten zwar ebenfalls einen Anstieg der Expression feststellen, diesem folgte aber kein Abfall in der Expression. Allerdings differenzierten sie die humanen subkutanen Zellen nur bis zum achten Tag, möglicherweise würde die Expression auch bei diesen Zellen anschließend sinken.

Eine gegensätzliche Expressionsentwicklung ließ sich für ACE2 feststellen. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse des Angiotensin I zu Angiotensin(1-9) bzw. des Angiotensin II zu Angiotensin(1-7). Seine Expression stieg kontinuierlich während der gesamten

Versuchsdauer. Einen rapiden Anstieg gab es nach 14 Tagen Kultivierung. Eine Woche später erhöhte sich die Expression noch einmal. In der einzigen Publikation, die es zur Expressionsentwicklung von ACE2 in differenzierenden adipozytären Zellen gibt, wird ebenfalls von einem Anstieg berichtet. Die Expression von ACE wurde in diesem Versuch mit murinen Zellen jedoch nicht untersucht (Gupte *et al.* 2008). Der gegensätzlichen Expressionsverlauf von ACE und ACE2 in den felinen Zellen könnte damit erklärt werden, dass es sich hierbei um einen Kompensationsmechanismus handelt. Aufgrund der steigenden ACE-Expression wird zeitverzögert ACE2 hochreguliert. ACE2 wirkt der ACE-Wirkung entgegen, da es Angiotensin I und –II metabolisiert. Somit kommt es zu einer geringeren AT1 bzw. AT2 Rezeptoraktivierung. Dieser gegenregulatorische Mechanismus wurde bisher vor allem bei Herz- und Leberschädigungen beschrieben, ob er auch im Fettgewebe vorkommt wurde bisher nicht untersucht (Goulter *et al.* 2004; Burrell *et al.* 2005; Ocaranza *et al.* 2006; Herath *et al.* 2007).

Die Untersuchung auf die Expression des AT1 Rezeptors ergab, dass dieser Rezeptor einen ähnlichen Expressionsverlauf zeigt wie ACE. Nach sieben Tagen Induktionsmediumgabe stieg die Expression stark an und fiel bis zum Versuchsende auf nahezu die Hälfte der maximalen Expression ab. Auch Schling *et al.* (2002) und Ye *et al.* (2009) berichteten von einem Anstieg der Expression in humanen adipozytären Zellen, der von einem Abfall gefolgt wird. Der AT2 Rezeptor wird hingegen nur sehr gering exprimiert und lässt aufgrund fehlender statistischer Signifikanzen nur Tendenzen in seinem Expressionsverlauf erkennen. Demnach steigt die Expression am siebten Tag an und sinkt bis zum 21. Tag wieder. Dass AT1 und AT2 einen ähnlichen Expressionsverlauf zeigen, wurde auch an humanen viszeralen Zellen gezeigt. Da in dieser Studie von Ye *et al.* eine negative Korrelation zwischen der Renin-Expression und der AT1-Expression gefunden wurde, schlossen die Autoren auf einen negativen Feedback-Mechanismus, der so auch in der Niere gefunden wurde. Die AT2 Expression hingegen korrelierte in dieser Publikation mit der Lipogenese. Dies würde auch den Ergebnissen von Jones *et al.* (1997b) entsprechen, die für AT2 einen positiven Einfluss auf die Lipogenese fanden. Diese Zusammenhänge könnten auch auf die felinen Zellen zutreffen.

Die Expression des MAS Rezeptors, der als Rezeptor für Ang(1-7) fungiert, konnte ebenfalls, wenn auch nur gering, in den felinen Zellen detektiert werden. Da jedoch die drei Einzelwerte eines Zeitpunktes stark voneinander abwichen, erfolgt hier keine statistisch relevante Auswertung.

Der (Pro)reninrezeptor wurde von den felineen Zellen relativ stark exprimiert, wobei die Expressionsrate bis zum Versuchsende kontinuierlich zunahm. Dies könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass der (Pro)reninrezeptor nicht nur die Aktivität des Renins erhöht, sondern auch intrazelluläre Signalwege aktiviert. Dazu gehören der wingless and Int-1 (Wnt) Signalweg sowie der mitogen-activated protein (MAP)-Kinase-Weg mit den beiden extracellular-signal-regulated Kinasen 1 (ERK1) und 2 (ERK2) (Nguyen & Muller 2010; Nguyen 2011). Durch die Aktivierung des letzteren Signaltransduktionsweges werden auch adipogene Transkriptionsfaktoren reguliert (Prusty *et al.* 2002). Da es aber bisher keine weiteren Erkenntnisse zur Funktion des (Pro)reninrezeptors in der Adipozytenphysiologie gibt, lässt sich dieses Ergebnis nur schwer interpretieren.

## **5.2.2 Genexpression in den felineen isolierten maturaen Adipozyten**

In dieser Arbeit wurde auch die Genexpression maturaer Adipozyten aus dem subkutanen und viszeraleen Fettgewebe von Tieren mit unterschiedlichem Ernährungsstatus untersucht und verglichen. Da bekannt ist, dass das RAS auch von Gefäßen und Immunzellen exprimiert wird, wurde nicht die gesamte Fettgewebprobe untersucht, sondern nur die daraus isolierten Adipozyten (Paul *et al.* 2006). Ein Nachteil könnte zwar darin gesehen werden, dass die Expression durch die Isolierung beeinflusst sein könnte, da jedoch bei allen Proben nach dem gleichen Protokoll vorgegangen wurde, würde dieser Einfluss alle Proben gleichermaßen betreffen. Somit spielt es für den Vergleich zwischen den Proben keine Rolle. Diese Methode wurde schon von vielen anderen Autoren angewandt und kann damit als hinlänglich etabliert angesehen werden (Dolinková *et al.* 2008; Montague *et al.* 1997; Engeli *et al.* 2004; Gorzelnjak *et al.* 2002).

### **5.2.2.1 Vergleich der Genexpression zwischen viszeraleen und subkutanen Adipozyten**

Zunächst wurde die Expression zwischen den viszeraleen und subkutanen Adipozyten verglichen, da sie aus Fettdepots stammen, die sich nicht nur morphologisch und funktionell unterscheiden, sondern auch eine unterschiedliche starke Adipokinexpression und –sekretion aufweisen (Ibrahim 2010). Da es möglich sein könnte, dass sich dieses Genexpressionsverhältnis im Zuge einer Fettgewebzunahme verschiebt, wurden die Daten zusätzlich unter Berücksichtigung des BCS ausgewertet. Um individuell bedingte Expressionsunterschiede zwischen den Tieren auszugleichen, wurden nur die Proben verwendet, bei denen es von einem Tier eine subkutane und eine viszerale Probe gab. Daher wurde auch der gepaarte t-Test für die statistische Auswertung angewandt.

Untersucht wurden die gleichen Gene wie in dem Differenzierungsversuch der felines Zellkultur.

Die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- $\gamma$  und des Adipokins Adiponektin war in den viszeralen Adipozyten gegenüber den subkutanen Adipozyten signifikant erhöht. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Zini *et al.* (2009) überein. Sie untersuchten ebenfalls, allerdings an Fettgewebsbiopsien und nicht an isolierten Adipozyten, die Expression dieser beiden Adipokine bei Katzen. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den vielen Publikationen über die Expression dieser Gene im humanen Fettgewebe, bei denen das subkutane Fettgewebe eine höhere Expression aufweist (Lefebvre *et al.* 1998; Dolinková *et al.* 2008; Fisher *et al.*; Lihn *et al.* 2004). Bei Ratten hingegen werden PPAR- $\gamma$  und Adiponektin, genau wie bei den untersuchten Katzen, im viszeralen Fettgewebe höher exprimiert (Atzmon *et al.* 2002; Altomonte *et al.* 2003; Einstein *et al.* 2005). Der deutlichere Expressionsunterschied zwischen den beiden Fettdepots bei den übergewichtigen Tieren könnte damit begründet werden, dass es im Zuge der Gewichtszunahme, neben einer Hypertrophie, zur Hyperplasie des Fettgewebes kommt. Dies würde nicht nur zu einer verstärkten PPAR- $\gamma$  Expression führen, sondern auch zu einer höheren Adiponektinexpression, da die entstehenden kleinen Adipozyten im Vergleich zu größeren Adipozyten eine höhere Adiponektinexpression aufweisen (DeClercq *et al.* 2011).

Die Expression von Leptin entspricht ebenfalls nicht den Erkenntnissen zur Expression im humanen Fettgewebe (Dolinková *et al.* 2008; Lefebvre *et al.* 1998; van Harmelen *et al.* 1998; Dusserre *et al.* 2000). Zwar ist das Ergebnis nicht statistisch signifikant, allerdings ist bei den untersuchten Katzen eine Tendenz für eine höhere Leptinexpression in den viszeralen Adipozyten zu erkennen. Betrachtet man die Ergebnisse getrennt nach ihrem BCS, so ist dieses Genexpressionsverhältnis nur bei den übergewichtigen Tieren zu finden. Bei den dünnen Tieren gibt es dagegen keinen Unterschied zwischen der Expression der subkutanen und der viszeralen Adipozyten. Der Unterschied zwischen den beiden Fettgewebsdepots wird beim humanen Fettgewebe damit begründet, dass die subkutanen Fettzellen größer sind als die viszeralen und sie somit mehr Leptin exprimieren (Wajchenberg 2000). Dass die viszeralen Adipozyten der Katzen eine höhere Expression aufweisen, könnte also damit zusammenhängen, dass sie größer sind als die subkutanen Adipozyten. Dies würde auch den deutlicheren Genexpressionsunterschied bei den übergewichtigen Tieren erklären, denn möglicherweise geht das erhöhte Körpergewicht dieser Tiere mit einer Hypertrophie der viszeralen Fettzellen einher.

Ebenso wie in den *in vitro* kultivierten felines Zellen, konnte auch in den murenen Fettzellen die Expression der untersuchten RAS-Komponenten nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete MAS, dessen Expression nur in acht der insgesamt 18 Proben messbar war. MAS wurde aber auch von den felines Zellkulturen im Differenzierungsversuch nicht an allen Zeitpunkten exprimiert.

Für Angiotensinogen konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den beiden Fettdepots gefunden werden. Zwar wurde bei den Tieren mit einem BCS < 5 von den subkutanen Adipozyten tendenziell mehr Angiotensinogen exprimiert, aufgrund der starken Streuung der Werte war dies jedoch nicht signifikant. Bei den übergewichtigen Tieren gab es hingegen eine Tendenz für eine stärkere Expression in den viszeralen Adipozyten. In der Literatur findet man hierzu Untersuchungen an humanen und murinen Fettgewebsproben und isolierten humanen Adipozyten, die zu dem Ergebnis kommen, dass Angiotensinogen vom viszeralen Fettgewebe stärker exprimiert wird (Dolinková *et al.* 2008; Dusserre *et al.* 2000; Atzmon *et al.* 2002; Giacchetti *et al.* 2002; van Harmelen *et al.* 2000a). Die dafür genutzten Proben wurden allerdings von Labortieren bzw. Personen unter standardisierten Bedingungen gewonnen. Dies ist insofern wichtig, da nachgewiesen wurde dass die Angiotensinogenexpression durch Fasten sinkt (Frederich *et al.* 1992). Die Katzen von denen die Fettgewebsproben stammten, hatten jedoch präoperativ eine unterschiedlich lange Nahrungskarenzzeit. Dies könnte die starke Streuung der einzelnen Werte erklären.

Des Weiteren wurden die Enzyme Renin, ACE und ACE2 untersucht. Bei Renin zeigte sich eine starke Tendenz für eine höhere Expression in den subkutanen Adipozyten. ACE wurde sogar höchst signifikant stärker von den subkutanen Zellen exprimiert. Dies stimmt mit den Untersuchungsergebnissen zur ACE-Expression im Fettgewebe von Ratten überein (Atzmon *et al.* 2002). Giacchetti *et al.* (2002) konnten dagegen keinen Unterschied in der Expression der beiden Fettdepots in den untersuchten humanen Proben feststellen. Die Peptidase ACE2 hingegen wurde von den felines subkutanen und viszeralen Adipozyten gleichermaßen exprimiert. Demgegenüber wird im humanen Fettgewebe ACE2 stärker vom viszeralen Gewebe exprimiert (Zhang *et al.* 2006).

Von den untersuchten Rezeptoren wurde AT1 in signifikant höherem Maße von den subkutanen Adipozyten exprimiert. Dies entspricht nicht den Ergebnissen zur AT1-Expression im humanen Fettgewebe. Hier zeigt sich eine höhere Expression im viszeralen Fettgewebe (Giacchetti *et al.* 2002). Bei AT2 hingegen gab es eine eindeutige Tendenz für eine höhere Expressionsrate in den viszeralen Zellen. Dies wurde von Giacchetti *et al.* jedoch nicht untersucht. Der (Pro)reninrezeptor dagegen wurde in gleich starkem Maße von den subkutanen und viszeralen Adipozyten exprimiert.

Zusammengefasst scheint sich die Adipokinexpression der subkutanen und viszeralen felines Zellen von den humanen Fettgewebsproben bzw. –zellen zu unterscheiden. Vielmehr weist sie Ähnlichkeiten zum murinen Fettgewebe auf. Möglicherweise lässt sich dies durch eine unterschiedliche Fettgewebsmorphologie erklären, da die Adipokinexpression auch von der Adipozytengröße abhängt (Skurk *et al.* 2007).

Einen Einfluss auf das Verhältnis der Genexpression zwischen den subkutanen und viszeralen Adipozyten scheint ein erhöhtes Körpergewicht zu haben. Erste Hinweise darauf liefern unsere Daten für PPAR- $\gamma$ , Adiponektin, Leptin und Angiotensinogen.

Insgesamt scheint das lokale RAS bei Katzen im Vergleich zum viszeralen stärker im subkutanen Fettgewebe exprimiert zu sein. Geht man von der Fettgewebszusammensetzung beim Menschen aus, so befindet sich 80 % des Fettgewebes subkutan (Ibrahim 2010). Aufgrund dieser Größenordnung, könnte das lokale RAS auch für die Spezies Katze in Bezug auf Adipositas-assoziierte Erkrankungen von Bedeutung sein.

#### **5.2.2.2 Vergleich der Genexpression zwischen Katzen mit unterschiedlichem Ernährungsstatus**

Im Zusammenhang mit den Adipositas-assoziierten Erkrankungen und dem lokalen adipozytären RAS würde man eine verstärkte Expression dieser Komponenten bei den adipösen Individuen vermuten. In der Literatur sind jedoch über die adipozytäre RAS-Expression bei adipösen Individuen, im Vergleich zu normalgewichtigen Individuen, kontroverse Ergebnisse zu finden. Um den Einfluss des Ernährungszustandes bei den Katzen zu klären, wurde die Expression maturer Adipozyten von Katzen mit einem BCS < 5, mit der von Katzen, die einen BCS > 5 hatten, verglichen. Da es bei einigen Adipokinen einen Unterschied in der Expression der subkutanen Adipozyten im Vergleich zu den viszeralen Adipozyten gab, erfolgte eine getrennte Auswertung für diese beiden Fettdepots.

Zusätzlich zu den RAS-Komponenten wurden auch die Expressionen von PPAR- $\gamma$ , Leptin und Adiponektin in die Auswertung mit einbezogen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied in der Leptinexpression zwischen den dünnen und übergewichtigen Tieren festgestellt werden. Dies traf sowohl auf die subkutanen als auch die viszeralen Adipozyten zu. Dass die Leptinexpression und –sekretion mit dem Körpergewicht korrelieren ist nicht nur beim Menschen bekannt, auch für die Katze wurde eine positive Korrelation zwischen der Leptinsekretion und der Fettgewebsmenge nachgewiesen (Appleton *et al.* 2000; Ahima & Flier 2000).

Angiotensinogen wurde in beiden Fettdepots von den dünnen Tieren tendenziell stärker exprimiert. Da die Werte der dünnen Tiere jedoch stark streuen, wird keine Signifikanz erreicht. Bei den übergewichtigen Tieren hingegen ist nur eine geringe Streuung der Werte zu sehen. Daher ist anzunehmen, dass Katzen mit einem BCS > 5 generell eine niedrigere Angiotensinogenexpression aufweisen. In der Mehrheit der Publikationen (Okada *et al.* 2010; Engeli *et al.* 2005; Gorzelniak *et al.* 2002; Yasue *et al.* 2010) wird ebenfalls eine niedrigere Expression bei adipösen Personen beschrieben, lediglich Dussere *et al.* (2000) und van Harmelen *et al.* (2000b) fanden eine höhere AGT-Expression im subkutanen Fettgewebe adipöser Menschen. Dass die geringere Expression bei den übergewichtigen Individuen dennoch zu einem erhöhten AGT-Plasmaspiegel führt, wird damit begründet, dass die absolute AGT-Menge durch die erhöhte Fettgewebsmenge letztlich höher ist (Yasue *et al.* 2010).

Für die Enzyme Renin und ACE sowie die Rezeptoren AT1, AT2 und (Pro)reninrezeptor konnte kein Expressionsunterschied zwischen den beiden Tiergruppen festgestellt werden. In der Literatur findet man hierzu Tendenzen für eine höhere, aber auch niedrigere sowie gleiche Expression dieser Gene zwischen normalgewichtigen und übergewichtigen Menschen (Engeli *et al.* 2005; Gorzelniak *et al.* 2002; Yasue *et al.* 2010). Einen wirklich signifikanten Unterschied in der Renin, ACE und AT1-Expression findet man dagegen nur bei adipösen Personen mit Bluthochdruck (Gorzelniak *et al.* 2002). Demgegenüber wurde die Expression von AT2 in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht.

Die einzige RAS-Komponente, die sich in ihrer Expression zwischen den beiden Tiergruppen unterscheidet ist ACE2. Interessanterweise exprimierten die Adipozyten der übergewichtigen Tiere weniger ACE2. Dies war bei den subkutanen Adipozyten signifikant. Eine vergleichbare Studie fehlt bislang in der Literatur. Gupte *et al.* (2008) untersuchten jedoch die ACE2-Expression im subkutanen Fettgewebe von Mäusen, die entweder eine fettarme oder eine fettreiche Diät bekamen. Die Mäuse, die die fettreiche Diät bekamen, zeigten eine höhere ACE2-Expression im Fettgewebe. Dies konnte selbst nach vier Monaten noch nachgewiesen werden. Da in dieser Studie die ACE-Expression nicht gemessen wurde, kann hier über eine kompensatorische Rolle des ACE2 nur spekuliert werden. Dass die Katzen mit einem BCS > 5 jedoch weniger ACE2 exprimierten, könnte an dem schon länger bestehenden Übergewicht liegen. Beispielsweise exprimierten Ratten nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt vermehrt ACE sowie ACE2. Acht Wochen später blieb die ACE-Expression erhöht, die ACE2-Expression dagegen war im Vergleich zu den Kontrolltieren sogar niedriger (Ocaranza *et al.* 2006). Möglicherweise wird bei chronisch pathologischen Zuständen das ACE / ACE2 Verhältnis aus dem Gleichgewicht gebracht. Zum Beispiel haben Patienten mit einer diabetischen Nierenerkrankung eine niedrigere renale ACE2-

Expression. Demgegenüber ist die ACE-Expression im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht (Reich *et al.* 2008). Momentan geht man davon aus, dass das Überwiegen der ACE Wirkungen gegenüber den ACE2 Wirkungen zu einem Fortschreiten von Erkrankungen führt. Verschiebt sich dagegen das Verhältnis in Richtung ACE2, so wird das Aufhalten oder sogar Aufheben pathologischer Prozesse gefördert (Ferreira *et al.* 2010). Daher könnte man vermuten, dass die verminderte ACE2-Expression bei den übergewichtigen Katzen eine Folge des chronischen Übergewichts ist. Ob sich dieses Ungleichgewicht der ACE / ACE2 Expression auch auf die Gesundheit der Tiere auswirkt bleibt noch zu klären.

Dass sich die Expression der RAS-Komponenten zwischen den beiden Tiergruppen signifikant nur in der ACE2-Expression unterscheidet, könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen bestanden die beiden Gruppen nur aus jeweils sechs bzw. fünf Tieren. Durch diese geringe Fallzahl könnten mögliche Unterschiede unentdeckt bleiben. Zum anderen zeigte die Gruppe der Tiere mit einem BCS > 5 nur ein moderates Übergewicht. Katzen mit einem BCS von 8 und 9 waren in dieser Gruppe nicht vertreten. Die Untersuchungen an humanen Fettgewebsproben umfassten hingegen Personen mit einem sehr starken Übergewicht. Unterschiede in der Renin-, ACE- und AT1-Expression konnten beim Menschen auch nur im Vergleich zwischen adipösen Hypertonikern und normalgewichtigen Personen gefunden werden. Entsprechende klinische Daten zu den Tieren der untersuchten Proben fehlten jedoch. Dass trotz dieser Limitierungen ein signifikanter Unterschied in der ACE2-Expression gefunden wurde unterstreicht dessen Bedeutung.

### **5.2.2.3 Untersuchungen zur Korrelation zwischen den verschiedenen felinen Genexpressionsdaten**

Abschließend wurden die verschiedenen Genexpressionsdaten auf ihre Korrelation hin untersucht. Ziel war es damit Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Genexpressionen zu gewinnen. Auch wenn diese nicht zwingend kausal sein müssen, so geben sie doch einen Einblick in das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Genexpressionen und können somit als Anhaltspunkte für weitergehende Untersuchungen dienen. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl sind diese Korrelationen jedoch kritisch zu betrachten.

Da nicht nur die RAS-Komponenten in die Korrelationsberechnungen mit einbezogen wurden, sondern auch PPAR- $\gamma$ , Adiponektin und Leptin, konnte eine starke, positive Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der Adiponektin-Expression in den felinen Adipozyten gefunden werden. Diese wurde auch im humanen subkutanen Fettgewebe nachgewiesen (Kursawe *et al.* 2010). Hierbei scheint es sich tatsächlich um einen kausalen Zusammenhang zu handeln, da im Adiponektin-Promotor ein PPAR-response Element



(PPRE) gefunden wurde. Bindet das Heterodimer PPAR- $\gamma$  / RXR an das PPRE, so wird die Transkription von Adiponektin erhöht (Iwaki *et al.* 2003). Dies erklärt zumindest einen Teil der anti-diabetischen Wirkung der Thiazolidinderivate. Demnach ist die höhere Insulinsensitivität, die durch die Gabe dieser Wirkstoffe erreicht wird, durch den erhöhten Adiponektin-Plasmaspiegel bedingt (Liu *et al.* 2009).

Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für die starke Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der ACE2-Expression verantwortlich sein. Gupte *et al.* (2008) vermuten ebenfalls eine Induktion der ACE2-Expression durch PPAR- $\gamma$ . In ihrem Experiment stieg die ACE2-Expression in 3T3-L1 Adipozyten durch die Gabe eines Thiazolidinderivats, welches als PPAR- $\gamma$  Agonist wirkt. Möglicherweise lässt sich durch diesen Zusammenhang auch ein Teil der blutdrucksenkenden Wirkung der Thiazolidinderivate erklären. Diese werden zwar zur Behandlung des Diabetes eingesetzt, als Nebeneffekt senken sie aber auch den Blutdruck beim Menschen (Chetty & Sharma 2006). Ob ein Teil dieser Wirkung eventuell durch eine erhöhte ACE2-Expression hervorgerufen wird, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Die signifikante Korrelation zwischen der Adiponektin- und der ACE2-Expression in den felines subkutanen Adipozyten, könnte dann darauf zurückgeführt werden, dass PPAR- $\gamma$  sowohl die Expression von Adiponektin als auch die Expression von ACE2 induziert. Daher würden die beiden Gene ebenfalls miteinander korrelieren.

Die Untersuchung auf Korrelation zwischen der Leptinexpression und den beiden Enzymen ACE und ACE2 ergab ein gegensätzliches Ergebnis. Leptin korrelierte in den subkutanen Adipozyten signifikant positiv mit ACE. Eine signifikante Korrelation zwischen Leptin und ACE2 gab es ebenfalls, allerdings war diese negativ. Dies würde der Vermutung entsprechen, dass mit steigendem Gewicht und entsprechend höherer Leptinexpression das ACE / ACE2 Verhältnis in Richtung ACE verschoben wird. Dies könnte somit bedeuten, dass es mit steigendem Körpergewicht zur Aktivierung des RAS, insbesondere der ACE / Ang II / AT1 Achse, kommt. Dies würden auch die positiven Korrelationen zwischen der ACE- und Reninexpression sowie der ACE- und AT1-Expression vermuten lassen. Überdies lässt der p-Wert von 0,088 bzw. 0,069 eine Tendenz für eine positive Korrelation zwischen der Leptin- und AT1-Expression erkennen.

Für die ACE2- und AT2-Expression konnte in den subkutanen Adipozyten ebenfalls eine positive Korrelation gefunden werden. Da sowohl durch das Enzym ACE2 als auch den Rezeptor AT2 die Wirkungen des AT1 Rezeptors geschwächt werden, könnte diese Korrelation als Teil des kompensatorischen Mechanismus verstanden werden. Dass es eine positive Korrelation zwischen der AT1- und der AT2-Expression gab, könnte dem vermuteten

gegenregulatorischen Feedback Mechanismus im vaskulären System entsprechen. Demnach wird durch die Aktivierung des AT1 Rezeptors der AT2 Rezeptor hochreguliert. Dadurch wird eine Vasodilatation ausgelöst, die der AT1 vermittelten Vasokonstriktion entgegenwirkt (Carey & Park 2006).

Um diese Hypothesen zu bestätigen, müsste jedoch eine größere Anzahl an Tieren untersucht werden.

### **5.3 Genexpression in den caninen Zellen**

Zusätzlich zu den felines Zellen, sollten die RAS-Komponenten auch in den caninen Zellen nachgewiesen werden. Eine Genexpressionsstudie während der Adipogenese der Zellen konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da hierfür nicht genügend Zellen in der Primärkultur gewonnen werden konnten und bisher keine kommerziellen caninen Präadipozyten zur Verfügung stehen. Durch eine zu geringe Probenanzahl war es überdies nicht möglich die Genexpression verschiedener Tiere zu vergleichen. Daher wurden die RAS-Komponenten sowie die Adipokine PPAR- $\gamma$ , Pref-1, Leptin und Adiponektin nur qualitativ mittels konventioneller PCR untersucht. Als Probenmaterial dienten hierbei kultivierte Präadipozyten und differenzierte Adipozyten sowie aus dem Fettgewebe isolierte mature Adipozyten.

Dass sich die *in vitro* differenzierten Adipozyten von den muren Adipozyten unterscheiden, ist anhand der PPAR- $\gamma$  Expression zu sehen. Während die kultivierten Präadipozyten und differenzierten Adipozyten lediglich die erwartete Bande von 112 bp zeigen, gibt es bei den muren Adipozyten eine zusätzliche ca. 200 bp große Bande. Da beim Menschen für PPAR- $\gamma$  mittlerweile vier verschiedene mRNA Isoformen nachgewiesen wurden, könnte es sich bei der zusätzlichen Bande um eine dieser Isoformen handeln (Gurnell 2005).

Der von den Präadipozyten sezernierte Faktor Pref-1 konnte nur in den kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Die kultivierten differenzierten Adipozyten zeigten dabei ein schwächeres Signal als die Präadipozyten. Sollte Pref-1 tatsächlich stärker von den Präadipozyten exprimiert werden, so unterscheidet sich dies von den felines Zellen, bei denen Pref-1 von beiden Zelltypen ungefähr gleich stark exprimiert wurde. Ein Grund hierfür könnte eine höhere Anzahl an Präadipozyten sein, die bei den caninen Zellen differenzierten. Somit würde Pref-1 weniger exprimiert und dementsprechend weniger nachweisbar sein. Es wäre aber auch möglich, dass die caninen Zellen auf die Pref-1 supprimierende Wirkung des Dexamethasons stärker reagierten.

In der Expression der beiden Adipokine Leptin und Adiponektin unterscheiden sich die caninen Zellen ebenfalls von den felines Zellen. Beide Adipokine konnten schon in den Präadipozyten nachgewiesen werden. Dass Leptin auch von humanen Präadipozyten exprimiert wird zeigten Körner *et al.* (2005). Allerdings merkten sie auch an, dass die Differenzierung bei diesen Zellen möglicherweise schon eingesetzt hatte. Dies könnte auch auf die caninen Präadipozyten zutreffen, die bis zur Isolierung der RNA 48 h kultiviert wurden.

Von den untersuchten RAS-Komponenten unterscheiden sich in der Expression zwischen den Zellen nur Angiotensinogen und Renin. Dabei weisen die maturen Adipozyten die stärksten mRNA-Signale auf. Bei den kultivierten Zellen ist ebenfalls eine Bande für Renin und Angiotensinogen zu sehen, allerdings ist diese bei den differenzierten Adipozyten etwas schwächer als bei den Präadipozyten. Bei den felines Zellen hingegen entspricht die Expression der Präadipozyten ungefähr der Expression der 14 Tage alten Adipozyten. Um jedoch eine quantitative Aussage über eine differentielle Genexpression im Verlauf der Adipogenese zu treffen, müssten Real-time-PCRs durchgeführt werden. Dies trifft auch auf die nachgewiesenen RAS-Komponenten ACE, ACE2, AT1, AT2 und den (Pro)reninrezeptor zu, die den Signalen nach zu urteilen sowohl von den maturen Adipozyten als auch den kultivierten caninen Adipozyten gleich stark exprimiert wurden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### Untersuchungen zum Renin-Angiotensin-System in felines und caninen Adipozyten

Das Fettgewebe dient nicht nur als Energiespeicher für den Körper, sondern synthetisiert und sezerniert darüber hinaus auch eine Vielzahl an Proteinen, die sogenannten Adipokine. Über auto-, para- und endokrine Wege sind sie in eine Vielzahl an physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. Unter diesen Adipokinen befinden sich auch Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Diese könnten möglicherweise einen Schlüsselfaktor für die Entstehung und Progression von Adipositas-assoziierten Erkrankungen darstellen. Da nicht nur die Zahl übergewichtiger und adipöser Menschen steigt, sondern auch unsere Katzen und Hunde zunehmend an Übergewicht und damit einhergehenden Krankheiten leiden, könnte das lokale adipozytäre RAS auch für diese beiden Spezies von Bedeutung sein. Ziel dieser Arbeit war es daher grundlegende Erkenntnisse zum adipozytären RAS bei Katzen und Hunden zu gewinnen. Ferner sollte eine adipozytäre Primärzellkultur etabliert werden, um zukünftig weitergehende *in vitro* Untersuchungen durchführen zu können. Hierfür wurden erfolgreich Präadipozyten aus dem Fettgewebe der Tiere gewonnen, kultiviert und durch die Zugabe verschiedenster Substanzen differenziert. Darüber hinaus wurde in einem Ko-Kultur Experiment der Einfluss maturer Adipozyten auf die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten untersucht sowie die Zellkulturtechniken der sogenannten „ceiling culture“ und Explantationskultur angewandt, um alternative Methoden für die Gewinnung adipozytärer Vorläuferzellen zu testen. Für die Untersuchung zur Genexpression im Verlauf der Adipogenese wurden käuflich erworbene feline Präadipozyten *in vitro* zu Adipozyten differenziert und, neben der Expression der Adipogenesemarker PPAR- $\gamma$ , Pref-1, Adiponektin und Leptin, die Expression der RAS-Komponenten Angiotensinogen, Renin, ACE, ACE2, AT1, AT2, MAS und (Pro)reninrezeptor an fünf Zeitpunkten mittels Real-time-PCR gemessen. Dabei zeigten sich Unterschiede in der Expression dieser Komponenten zwischen den Präadipozyten und den verschiedenen Differenzierungsstadien. Interessanterweise wiesen die beiden Enzyme ACE und ACE2 einen gegensätzlichen Expressionsverlauf auf. Da ACE2 durch die Metabolisierung von Angiotensin I und Angiotensin II die Wirkung von ACE aufhebt, könnte dies einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, der so auch in anderen Geweben gefunden wurde. Zusätzlich zur Genexpressionsuntersuchung in kultivierten Zellen sollten mature Adipozyten aus dem Fettgewebe von Katzen und Hunden isoliert und auf ihre Genexpression untersucht werden. Dadurch konnte erstmals nachgewiesen werden, dass das lokale RAS auch *in vivo* von felines und caninen Adipozyten exprimiert wird. Für die Spezies Katze wurde zusätzlich die Expression zwischen subkutanen und viszeralen Adipozyten sowie zwischen den Adipozyten von Tieren mit einem unterschiedlichen

Ernährungsstatus verglichen. Hierbei zeigte sich, dass ACE und AT1 signifikant stärker von den subkutanen Adipozyten exprimiert wurden. Hinsichtlich des Ernährungsstatus konnte eine signifikant niedrigere ACE2-Expression bei den übergewichtigen Tieren in den subkutanen Adipozyten festgestellt werden. Bei der Überprüfung auf Korrelation zwischen den mRNA-Expressionsergebnissen, zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen ACE und Leptin, einem Adipokin welches mit steigendem Körpergewicht vermehrt exprimiert wird. Dagegen korrelierte ACE2 negativ mit Leptin. Dies führt zur Annahme, dass es im Zuge des steigenden Körpergewichts zu einer Verschiebung des ACE / ACE2 Gleichgewichts in Richtung der ACE / Ang II / AT1 Achse kommt. Diese Ergebnisse könnten somit einen neuen Ansatz für die Erklärung der pathophysiologischen Wirkung des lokalen adipozytären RAS in der Entwicklung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen darstellen.

## 7 SUMMARY

### **Analysis of the renin-angiotensin system in feline and canine adipocytes**

The adipose tissue serves not only as an energy storage for the body, but also synthesizes and secretes many proteins, so-called adipokines. They are involved in a multitude of physiological and pathological processes via autocrine, paracrine and endocrine pathways. Among these adipokines are also components of the renin-angiotensin system (RAS). Possibly they are key factors for the development and progression of obesity-associated diseases. Similarly to the rising number of overweight and obese humans, our cats and dogs are increasingly affected by overweight and its related diseases, so that the local adipose tissue RAS could be also relevant for these species. Thus, the aim of this thesis was to obtain basic findings of the adipose tissue RAS in cats and dogs. Another intention was to establish a primary culture of adipose tissue for prospective further *in vitro* research. For this purpose preadipocytes were obtained from adipose tissue and cultivated and differentiated by addition of several agents successfully. Furthermore, the effect of mature adipocytes on the differentiation capacity of preadipocytes was examined in a co-culture experiment and the cell culture methods ceiling culture as well as explants culture were utilized to test alternative methods for gaining adipocyte progenitor cells. To investigate the gene expression during adipogenesis, purchased feline preadipocytes were differentiated to adipocytes *in vitro* and, besides the expression of the adipogenesis markers PPAR- $\gamma$ , pref-1, adiponectin and leptin, the expression of the RAS components angiotensinogen, renin, ACE, ACE2, AT1, AT2, MAS and (pro)reninreceptor were measured at five time points using real time PCR. Whereby it was shown that there are differences in the expression of these components between preadipocytes and the various differentiation stages. Interestingly, the two enzymes ACE and ACE2 showed an opposite expression course. Because ACE2 abolishes the effects of ACE through metabolizing Angiotensin I and Angiotensin II, this could be a compensatory mechanism that has also been found in other tissues. In addition to the analysis of cultivated cells, the gene expression of mature adipocytes that were isolated from the adipose tissue of cats and dogs were investigated. So it was proved for the first time that the local RAS is also expressed *in vivo* in feline and canine adipocytes. For the species cat the expression between subcutaneous and visceral adipocytes and between adipocytes of animals with different nutritional status were compared. This demonstrated that ACE and AT1 are expressed significantly more in subcutaneous adipocytes. Concerning the nutritional status a significant lower expression of ACE2 was observed in moderately overweight animals in the subcutaneous adipocytes. Testing the mRNA expression results on correlation revealed a positive relationship between ACE and leptin, an adipokine which expression augments with increasing body weight. On the contrary, ACE2 correlated negative with

leptin. This leads to the assumption that with increasing body weight the ACE / ACE2 balance shifts towards the ACE / Ang II / AT1 axis. Consequently, these results could provide a new approach for the explanation of the pathophysiological effects of the local adipose tissue RAS in the development of obesity-associated diseases.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE ...	Angiotensin Converting Enzyme ...
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AGRP	Agouti gene-related Protein
AGT	Angiotensinogen
Ang ...	Angiotensin ...
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AT ...	Angiotensin Rezeptor ...
BCS	Body Condition Score
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
C/EBP ...	CCAAT/enhancer binding protein ...
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CART	Cocain and amphetamine-regulated transcript
CD ...	Cluster of differentiation ...
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CREB	cAMP response element-binding protein
Ct	reshold cycle
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKH	Europäisch Kurzhaar
ERK ...	extracellular-signal-regulated kinase ...
FBS	fetales bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA ...	GATA binding protein
GLUT4	Glukosetransporter 4
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IL ...	Interleukin ...



## Abkürzungsverzeichnis

---

IRAP	Insulin-regulated aminopeptidase receptor
IRS-1	Insulinrezeptor-Substrat-1
M	Marker
MAP	mitogen-activated protein
MAS	MAS Rezeptor
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	Anzahl
NPY	Neuropeptid Y
OD	optische Dichte
p	Signifikanzwert
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PPRE	PPAR-response Element
Pref-1	Präadipozytenfaktor 1
r	Korrelationskoeffizient
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RXR $\alpha$	Retinoid X Receptor $\alpha$
s	subkutan
sec	Sekunde
SOX9	Sex determining region Y box 9
SREBP-1C	sterol regulatory element binding protein 1 C
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
U	Enzymeinheit (Unit)
UCP1	Uncoupling protein 1
UV	Ultraviolett
v	viszeral
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## Abkürzungsverzeichnis

---

w	weiblich
WHO	World Health Organization
Wnt-1	Wingless-type MMTV integration site family member 1

## 9 **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Schematischer Überblick über die Adipogenese mit Expressionszeitpunkten ausgewählter Gene.....	10
Abbildung 2: Beispiele für die von den Fettzellen sezernierten Adipokine.....	12
Abbildung 3: Das Renin-Angiotensin-System .....	13
Abbildung 4: Schema einer Ko-Kultur von Präadipozyten und Adipozyten .....	32
Abbildung 5: Schema des Versuchsaufbaus für die Dedifferenzierung maturer Adipozyten.....	33
Abbildung 6: Mit Nile Red gefärbter feline Adipozyt mit größeren Lipidtropfen bei Zugabe von 10 µg/ml Insulin in das Medium .....	44
Abbildung 7: Mit Nile Red gefärbte feline Adipozyten mit diffus verteilten kleineren Lipidtropfen bei Zugabe von 100 µg/ml Insulin in das Medium .....	44
Abbildung 8: Canine viszerale Zellen des Zellpellets nach drei Tagen Kultivierung .....	46
Abbildung 9: Canine viszerale Präadipozyten nach sieben Tagen Kultivierung .....	46
Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme feline kultivierter Adipozyten, 14 Tage nach Induktion .....	46
Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme des gleichen Bildausschnitts wie Abbildung 10 mit Polarisationsfilter .....	46
Abbildung 12: Feline differenzierende Zellen mit Nile Red Färbung, 14 Tage nach Induktion .....	46
Abbildung 13: Feline differenzierende Zellen mit Oil Red O Färbung, 14 Tage nach Induktion .....	46
Abbildung 14: Canine viszerale Zellen in Ko-Kultur sieben Tage nach Induktion.....	47
Abbildung 15: Canine viszerale Kontrollzellen sieben Tage nach Induktion.....	47
Abbildung 16: Nile Red gefärbte canine subkutane Zellen in Ko-Kultur 21 Tage nach Induktion .....	48
Abbildung 17: Nile Red gefärbte canine subkutane Kontrollzellen 21 Tage nach Induktion.....	48
Abbildung 18: Proliferation caniner viszerale Zellen durch „ceiling culture“, sieben Tage nach Inkubation in der Zellkulturflasche .....	49
Abbildung 19: Differenzierte feline subkutane Zellen der ersten Passage einer „ceiling culture“, 14 Tage nach Induktion.....	49
Abbildung 20 a): Erste Zellen bei einem caninen viszeralem Explantat nach drei Tagen Kultivierung .....	50
Abbildung 20 b): Erste polygonale und ovale, auswachsende Zellen eines caninen viszeralem Explantates nach drei Tagen Kultivierung .....	50

Abbildung 20 c): Auswachsende Zellen in der Nähe eines caninen subkutanen Explantates nach sieben Tagen Kultivierung .....	50
Abbildung 20 d): Auswachsende Zellen eines caninen subkutanen Explantates nach sieben Tagen Kultivierung .....	50
Abbildung 21 a): Feline Zellen von Zen Bio einen Tag nach Induktion.....	52
Abbildung 21 b): Feline Zellen von Zen Bio einen Tag nach Induktion, Oil Red O Färbung	52
Abbildung 21 c): Feline Zellen von Zen Bio einen Tag nach Induktion, Nile Red Färbung ....	52
Abbildung 22 a): Feline Zellen von Zen Bio sieben Tage nach Induktion .....	52
Abbildung 22 b): Feline Zellen von Zen Bio sieben Tage nach Induktion, Oil Red O Färbung .....	52
Abbildung 22 c): Feline Zellen von Zen Bio sieben Tage nach Induktion, Nile Red Färbung	52
Abbildung 23 a): Feline Zellen von Zen Bio 14 Tage nach Induktion .....	53
Abbildung 23 b): Feline Zellen von Zen Bio 14 Tage nach Induktion, Oil Red O Färbung .....	53
Abbildung 23 c): Feline Zellen von Zen Bio 14 Tage nach Induktion, Nile Red Färbung .....	53
Abbildung 24 a): Feline Zellen von Zen Bio 21 Tage nach Induktion .....	53
Abbildung 24 b): Feline Zellen von Zen Bio 21 Tage nach Induktion, Oil Red O Färbung .....	53
Abbildung 24 c): Feline Zellen von Zen Bio 21 Tage nach Induktion, Nile Red Färbung .....	53
Abbildung 25: Genexpression von PPAR- $\gamma$ während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	55
Abbildung 26: Genexpression von Pref-1 während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	56
Abbildung 27: Genexpression von Leptin während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	57
Abbildung 28: Genexpression von Adiponektin während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	57
Abbildung 29: Genexpression von Angiotensinogen während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	58
Abbildung 30: Genexpression von Renin während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	59
Abbildung 31: Genexpression von ACE während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	59
Abbildung 32: Genexpression von ACE2 während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	60
Abbildung 33: Genexpression von AT1 während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	61
Abbildung 34: Genexpression von AT2 während der Differenzierung der felines Präadipozyten.....	61

---

Abbildung 35: Genexpression von MAS während der Differenzierung der feline Prädipozyten.....	62
Abbildung 36: Genexpression des (Pro)reninrezeptors während der Differenzierung der feline Prädipozyten .....	62
Abbildung 37: Genexpression von PPAR- $\gamma$ in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	63
Abbildung 38: Genexpression von Leptin in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	64
Abbildung 39: Genexpression von Adiponektin in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	64
Abbildung 40: Genexpression von Angiotensinogen in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	65
Abbildung 41: Genexpression von Renin in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	65
Abbildung 42: Genexpression von ACE in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	66
Abbildung 43: Genexpression von ACE2 in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	66
Abbildung 44: Genexpression von AT1 in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	67
Abbildung 45: Genexpression von AT2 in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	67
Abbildung 46: Genexpression des (Pro)reninrezeptors in viszeralen und subkutanen maturen Adipozyten.....	68
Abbildung 47: Genexpression von PPAR- $\gamma$ in subkutanen und viszeralen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5 .....	72
Abbildung 48: Genexpression von Leptin in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5 .....	73
Abbildung 49: Genexpression von Adiponektin in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.....	73
Abbildung 50: Genexpression von Angiotensinogen in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5.und einem BCS > 5.....	74
Abbildung 51: Genexpression von Renin in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5 .....	75
Abbildung 52: Genexpression von ACE in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5 .....	75

Abbildung 53: Genexpression von ACE2 in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5 .....	76
Abbildung 54: Genexpression von AT1 in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.....	76
Abbildung 55: Genexpression von AT2 in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5.....	77
Abbildung 56: Genexpression des (Pro)reninrezeptors in subkutanen Adipozyten bei Katzen mit einem BCS < 5 und einem BCS > 5 .....	77
Abbildung 57: Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ und der Adiponektinexpression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	78
Abbildung 58: Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der Adiponektinexpression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	78
Abbildung 59: Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der ACE2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	79
Abbildung 60: Korrelation zwischen der PPAR- $\gamma$ - und der ACE2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	79
Abbildung 61: Korrelation zwischen der Adiponektin- und der ACE2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	79
Abbildung 62: Fehlende Korrelation zwischen der Adiponektin- und der ACE2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	79
Abbildung 63: Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	80
Abbildung 64: Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	80
Abbildung 65: Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	80
Abbildung 66: Fehlende Korrelation zwischen der Leptin- und der ACE-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	80
Abbildung 67: Fehlende Korrelation zwischen der Leptin- und der AC1-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	81
Abbildung 68: Fehlende Korrelation zwischen der Leptin- und der AC1-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	81
Abbildung 69: Korrelation zwischen der ACE- und der AT1-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	81
Abbildung 70: Fehlende Korrelation zwischen der ACE- und der AT1-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	81

Abbildung 71: Korrelation zwischen der ACE2- und der AT2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	82
Abbildung 72: Fehlende Korrelation zwischen der ACE2- und der AT2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	82
Abbildung 73: Korrelation zwischen der Renin- und der ACE-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	82
Abbildung 74: Korrelation zwischen der Renin- und der ACE-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	82
Abbildung 75: Korrelation zwischen der AT1- und der AT2-Expression der subkutanen isolierten Adipozyten (s) mit linearer Regressionsgerade.....	83
Abbildung 76: Korrelation zwischen der AT1- und der AT2-Expression der viszeralen isolierten Adipozyten (v) mit linearer Regressionsgerade.....	83
Abbildung 77 a): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR.von GAPDH .....	85
Abbildung 77 b): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR.von PPAR-y .....	85
Abbildung 77 c): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR.von Pref-1 .....	85
Abbildung 77 d): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR.von Leptin .....	85
Abbildung 77 e): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR.von Adiponektin .....	85
Abbildung 78 a): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von Angiotensinogen .....	87
Abbildung 78 b): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von Renin .....	87
Abbildung 78 c): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von ACE .....	87
Abbildung 78 d): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von ACE-2.....	87
Abbildung 78 e): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von AT-1.....	87
Abbildung 78 f): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von AT-2.....	87
Abbildung 78 g): mRNA Expressionsnachweis mittels PCR von (Pro)reninrezeptor.....	87

---

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der verwendeten Laborgeräte.....	21
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien .....	22
Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien für die PCR.....	24
Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer .....	24
Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits .....	25
Tabelle 7: Liste der hergestellten Lösungen .....	26
Tabelle 8: Liste der hergestellten Medien .....	27
Tabelle 9: Liste der verwendeten Software und Datenbanken .....	28
Tabelle 10: Temperaturprogramm für die Gradienten-PCR .....	39
Tabelle 11: Temperaturprogramm für die Real-time-PCR.....	41
Tabelle 12: Genexpressionsdaten der felines viszeralen und subkutanen Adipozyten getrennt nach ihrem BCS.....	71
Tabelle 13: Übersicht über die Zusammensetzung der getesteten Induktionsmedien (IM).	134
Tabelle 14: Übersicht über die getesteten Adipozytenmedien (AM).....	135
Tabelle 15: Tierdaten der verwendeten Proben für die Genexpressionsuntersuchung in maturen felines Adipozyten .....	135
Tabelle 16: Tierdaten der verwendeten Proben für die Genexpressionsuntersuchung in kultivieren und maturen caninen Adipozyten.....	135



## 11 LITERATURVERZEICHNIS

Achard, V., Boullu-Ciocca, S., Desbriere, R., Nguyen, G. & Grino, M. (2007). Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, R274-82.

Ahima, R.S. & Flier, J.S. (2000). Leptin. *Annu Rev Physiol*, 62, 413–437.

Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P. & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*, 23, 469–480.

Altomonte, J., Harbaran, S., Richter, A. & Dong, H. (2003). Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats. *Metab Clin Exp*, 52, 958–963.

Appleton, D.J., Rand, J.S. & Sunvold, G.D. (2000). Plasma leptin concentrations in cats: reference range, effect of weight gain and relationship with adiposity as measured by dual energy X-ray absorptiometry. *J Feline Med Surg*, 2, 191–199.

Atzmon, G., Yang, X.M., Muzumdar, R., Ma, X.H., Gabriely, I. & Barzilai, N. (2002). Differential gene expression between visceral and subcutaneous fat depots. *Horm Metab Res*, 34, 622–628.

Aubert, J., Safonova, I., Negrel, R. & Ailhaud, G. (1998). Insulin down-regulates angiotensinogen gene expression and angiotensinogen secretion in cultured adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 250, 77–82.

Bader, M. (2010). Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 439–465.

Bader, M. & Ganten, D. (2008). Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*, 86, 615–621.

Barnes, D.M., Hanlon, P.R. & Kircher, E.A. (2003). Effects of inorganic HgCl<sub>2</sub> on adipogenesis. *Toxicol Sci*, 75, 368–377.

Bodey, A.R. & Michell, A.R. (1996). Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs. *J Small Anim Pract*, 37, 116–125.

Bodey, A.R. & Sansom, J. (1998). Epidemiological study of blood pressure in domestic cats. *J Small Anim Pract*, 39, 567–573.

Bornstein, S.R., Abu-Asab, M., Glasow, A., P ath, G., Hauner, H. & Tsokos, M. *et al.* (2000). Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*, 49, 532–538.

Boustany, C.M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D.R., Randall, D.C. & Cassis, L.A. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, R943-9.

Brennan, A.M. & Mantzoros, C.S. (2006). Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2, 318-327.

Bunnell, B.A., Flaatt, M., Gagliardi, C., Patel, B., Ripoll, C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45, 115-120

Burrell, L.M., Risvanis, J., Kubota, E., Dean, R.G., MacDonald, P.S. & Lu, S. *et al.* (2005). Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J*, 26, 369-75; discussion 322-4.

Campfield, L.A., Smith FJ., Guisez Y., Devos R. & Burn P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural network. *Science*, 269, 546-549.

Carey, R.M. & Park, J. (2006). Role of angiotensin type 2 receptors in vasodilation of resistance and capacitance vessels. *Hypertension*, 48, 824-825.

Cassis, L.A., Saye, J. & Peach, M.J. (1988). Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension*, 11, 591-596.

Chetty, V.T. & Sharma, A.M. (2006). Can PPARgamma agonists have a role in the management of obesity-related hypertension? *Vascul Pharmacol*, 45, 46-53.

Cho, M.-C., Lee, K., Paik, S.-G. & Yoon, D.-Y. (2008). Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) modulators and metabolic disorders. *PPAR Res*, 2008, 679137.

Cinti, S. (2002). Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest*, 25, 823-835.

Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I. & Scanga, S.E. *et al.* (2002). Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 417, 822-828.

Crandall, D.L., Armellino, D.C., Busler, D.E., McHendry-Rinde, B. & Kral, J.G. (1999). Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology*, 140, 154-158.

Cristancho, A.G. & Lazar, M.A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 722-734.

Darimont, C., Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G. & Négre, R. (1994). In situ microdialysis of prostaglandins in adipose tissue: stimulation of prostacyclin release by angiotensin II. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 18, 783-788.

- Davis, D.R., Zhang, Y., Smith, R.R., Cheng, K., Terrovitis, J. & Malliaras, K. *et al.* (2009). Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS ONE*, 4, e7195.
- DeClercq, V., Taylor, C.G. & Zahradka, P. (2011). Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on blood pressure, adipocyte size and function. *Br J Nutr*, 1–9.
- Dolinková, M., Dostálová, I., Lacinová, Z., Michalský, D., Haluzíková, D. & Mráz, M. *et al.* (2008). The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol Cell Endocrinol*, 291, 63–70.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M. & Stagliano, N. *et al.* (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87, E1-9.
- Dusserre, E., Moulin, P. & Vidal, H. (2000). Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1500, 88–96.
- Einstein, F.H., Atzmon, G., Yang, X.-M., Ma, X.-H., Rincon, M. & Rudin, E. *et al.* (2005). Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. *Diabetes*, 54, 672–678.
- Eisele, I., Wood, I.S., German, A.J., Hunter, L. & Trayhurn, P. (2005). Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture. *Horm Metab Res*, 37, 474–481.
- Elliott, W.J. & Meyer, P.M. (2007). Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis. *Lancet*, 369, 201–207.
- Engeli, S., Gorzelniak, K., Kreutz, R., Runkel, N., Distler, A. & Sharma, A.M. (1999). Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens*, 17, 555–560.
- Engeli, S., Engeli, S., Böhnke, J., Gorzelniak, K., Janke, J. & Schling, P. *et al.* (2005). Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*, 45, 356–362.
- Engeli, S., Janke, J., Gorzelniak, K., Böhnke, J., Ghose, N. & Lindschau, C. *et al.* (2004). Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res*, 45, 1640–1648.
- Ferreira, A.J., Santos, R.A.S., Bradford, C.N., Mecca, A.P., Sumners, C. & Katovich, M.J. *et al.* (2010). Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension*, 55, 207–213.
- Fisher, F.M., McTernan, P.G., Valsamakis, G., Chetty, R., Harte, A.L. & Anwar, A.J. *et al.* (2002) Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res*, 34, 650–654.

- Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L. & Curtin, L.R. (2010). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*, 303, 235–241.
- Ford, E.S. (2005). Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care*, 28, 2745–2749.
- Fowler, J.D., Johnson, N.D., Haroldson, T.A., Brintnall, J.A., Herrera, J.E. & Katz, S.A. *et al.* (2009). Regulated renin release from 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296, E1383-91.
- Frederich, R.C., Kahn, B.B., Peach, M.J. & Flier, J.S. (1992). Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension*, 19, 339–344.
- Fu, Y., Luo, N., Klein, R.L. & Garvey, W.T. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res*, 46, 1369–1379.
- George, A.J., Thomas, W.G. & Hannan, R.D. (2010). The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*, 10, 745–759.
- German, A. (2006a). Clinical risks associated with obesity in companion animals - Veterinary Focus Magazine Vol 16.1: 2006. *Waltham Focus*, 21–26.
- German, A.J. (2006b). The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr*, 136, 1940S-1946S.
- Giacchetti, G., Faloia, E., Mariniello, B., Sardu, C., Gatti, C. & Camilloni, M.A. *et al.* (2002). Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens*, 15, 381–388.
- González, E.L.M., Johansson, S., Wallander, M.-A. & Rodríguez, L.A.G. (2009). Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996-2005. *J Epidemiol Community Health*, 63, 332–336.
- Gorzelnik K, Janke J, Engeli S & Sharma AM (2001). Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res*, 33, 625–627.
- Gorzelnik, K., Engeli, S., Janke, J., Luft, F.C. & Sharma, A.M. (2002). Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens*, 20, 965–973.
- Goulter, A.B., Goddard, M.J., Allen, J.C. & Clark, K.L. (2004). ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med*, 2, 19.
- Gregoire, F.M. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226, 997–1002.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M. & Sul, H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 78, 783–809.

Grether-Beck, S. & Krutmann, J. (2010). Fettgewebe. Zelluläre und molekulare Grundlagen. *Hautarzt*, 61, 838–846.

Guo, A. & Jahoda, C.A.B. (2009). An improved method of human keratinocyte culture from skin explants: cell expansion is linked to markers of activated progenitor cells. *Exp Dermatol*, 18, 720–726.

Gupte, M., Boustany-Kari, C.M., Bharadwaj, K., Police, S., Thatcher, S. & Gong, M.C. *et al.* (2008). ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295, R781-8.

Gurnell, M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19, 501-523.

Halaas JL., Gajiwala KS., Maffei M., Cohen SL., Chait BT. & Rabinowitz D. *et al.* (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543–546.

Harp, J.B. & DiGirolamo, M. (1995). Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue: changes with maturation and adipose mass enlargement. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 50, B270-6.

Harte, A.L., McTernan, P.G., McTernan, C.L., Crocker, J., Starcynski, J. & Barnett, A.H. *et al.* (2003). Insulin increases angiotensinogen expression in human abdominal subcutaneous adipocytes. *Diabetes Obes Metab*, 5, 462–467.

Hauer, H. (2004). The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav*, 83, 653–658.

Herath, C.B., Warner, F.J., Lubel, J.S., Dean, R.G., Jia, Z. & Lew, R.A. *et al.* (2007). Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis. *J Hepatol*, 47, 387–395.

Hoening, M. (2002). Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Mol Cell Endocrinol*, 197, 221–229.

Huentelman, M.J., Grobe, J.L., Vazquez, J., Stewart, J.M., Mecca, A.P. & Katovich, M.J. *et al.* (2005). Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol*, 90, 783–790.

Hug, C. & Lodish, H.F. (2005). Medicine. Visfatin: a new adipokine. *Science*, 307, 366–367.

Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, 11, 11–18.

Ingalls, A.M., Dicki, M.M. & Snell, G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, 41, 317–318.

- Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Makishima, M. *et al.* (2003). Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*, 52, 1655–1663.
- Janke, J., Engeli, S., Gorzelniak, K., Luft, F.C. & Sharma, A.M. (2002). Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes*, 51, 1699–1707.
- Jepson, R.E. (2011). Feline systemic hypertension: Classification and pathogenesis. *J Feline Med Surg*, 13, 25–34.
- Jing, K., Heo, J.-Y., Song, K.-S., Seo, K.-S., Park, J.-H. & Kim, J.-S. *et al.* (2009). Expression regulation and function of Pref-1 during adipogenesis of human mesenchymal stem cells (MSCs). *Biochim Biophys Acta*, 1791, 816–826.
- Jing, W., Xiao, J., Xiong, Z., Yang, X., Huang, Y. & Zhou, M. *et al.* (2011). Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering. *Artif Organs*, 35, 105–112.
- Jones, B.H., Standridge, M.K., Taylor, J.W. & Moustaid, N. (1997a). Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol*, 273, R236-42.
- Jones, B.H., Standridge, M.K. & Moustaid, N. (1997b). Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*, 138, 1512–1519.
- Kalaitzidis, R.G. & Siamopoulos, K.C. (2011). The role of obesity in kidney disease: recent findings and potential mechanisms. *Int Urol Nephrol*, 43, 771–784.
- Karagiannides, I., Tchkonina, T., Dobson, D.E., Stepan, C.M., Cummins, P. & Chan, G. *et al.* (2001). Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280, R1772-80.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, 2, 282–286.
- Klinkenberg, H., Sallander, M.H. & Hedhammar, A. (2006). Feeding, exercise, and weight identified as risk factors in canine diabetes mellitus. *J Nutr*, 136, 1985S-1987S.
- Kloet, A.D. de, Krause, E.G. & Woods, S.C. (2010). The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav*, 100, 525–534.
- Kopelman, P. (2007). Health risks associated with overweight and obesity. *Obes Rev*, 8 Suppl 1, 13–17.
- Körner, A., Wabitsch, M., Seidel, B., Fischer-Posovszky, P., Berthold, A. & Stumvoll, M. *et al.* (2005). Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 540–550.

- Kouyama, R., Suganami, T., Nishida, J., Tanaka, M., Toyoda, T. & Kiso, M. *et al.* (2005). Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology*, 146, 3481–3489.
- Kursawe, R., Narayan, D., Cali, A.M.G., Shaw, M., Pierpont, B. & Shulman, G.I. *et al.* (2010). Downregulation of ADIPOQ and PPAR $\gamma$ 2 gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with hepatic steatosis. *Obesity (Silver Spring)*, 18, 1911–1917.
- Laflamme, D.P. (1997a). Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. *Feline Practice*, 25, 13–18.
- Laflamme, D.P. (1997b). Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice*, 22, 10–15.
- Lawler, D.F., Evans, R.H., Larson, B.T., Spitznagel, E.L., Ellersieck, M.R. & Kealy, R.D. (2005). Influence of lifetime food restriction on causes, time, and predictors of death in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 226, 225–231.
- Lefebvre, A.M., Laville, M., Vega, N., Riou, J.P., van Gaal, L. & Auwerx, J. *et al.* (1998). Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes*, 47, 98–103.
- Lihn, A.S., Bruun, J.M., He, G., Pedersen, S.B., Jensen, P.F. & Richelsen, B. (2004). Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol*, 219, 9–15.
- Lin, Y., Berg, A.H., Iyengar, P., Lam, T.K.T., Giacca, A. & Combs, T.P. *et al.* (2005). The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 280, 4617–4626.
- Liu, Y., Chewchuk, S., Lavigne, C., Brûlé, S., Pilon, G. & Houde, V. *et al.* (2009). Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E657-64.
- Lund EM, A.P.K.C.K.J. (2005). Prevalence and risk factor for obesity in adult cats from private US veterinary practices. *Int J Appl Res Vet Med*, 2005, 88–96.
- Lund EM, A.P.K.C.K.J. (2006). Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private us veterinary practices. *Int J Appl Res Vet Med*, 2006, 177–186.
- Maier, C.L., Shepherd, B.R., Yi, T. & Pober, J.S. (2010). Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes. *Microcirculation*, 17, 367–380.
- Massiéra, F., Bloch-Faure, M., Ceiler, D., Murakami, K., Fukamizu, A. & Gasc, J.M. *et al.* (2001). Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J*, 15, 2727–2729.

- Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y. & Tanaka, N. *et al.* (2008). Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*, 215, 210–222.
- Matsushita, K., Wu, Y., Okamoto, Y., Pratt, R.E. & Dzau, V.J. (2006). Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. *Hypertension*, 48, 1095–1102.
- Max Rubner-Institut (2008). Nationale Verzehrsstudie II - Ergebnisbericht Teil 1. Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
- McCann, T.M., Simpson, K.E., Shaw, D.J., Butt, J.A. & Gunn-Moore, D.A. (2007). Feline diabetes mellitus in the UK: the prevalence within an insured cat population and a questionnaire-based putative risk factor analysis. *J Feline Med Surg*, 9, 289–299.
- Mirejovsky, D., Patel, A.S., Rodriguez, D.D. & Hunt, T.J. (1991). Lipid adsorption onto hydrogel contact lens materials. Advantages of Nile red over oil red O in visualization of lipids. *Optom Vis Sci*, 68, 858–864.
- Montague, C.T., Prins, J.B., Sanders, L., Digby, J.E. & O'Rahilly, S. (1997). Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*, 46, 342–347.
- Montoya, J.A., Morris, P.J., Bautista, I., Juste, M.C., Suarez, L. & Peña, C. *et al.* (2006). Hypertension: a risk factor associated with weight status in dogs. *J Nutr*, 136, 2011S-2013S.
- Nguyen, G. (2011). Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci*, 120, 169–178.
- Nguyen, G. & Muller, D.N. (2010). The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol*, 21, 18–23.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T. & Sraer, J.-D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*, 109, 1417–1427.
- Nguyen, N.T., Magno, C.P., Lane, K.T., Hinojosa, M.W. & Lane, J.S. (2008). Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J Am Coll Surg*, 207, 928–934.
- Niklason, A., Hedner, T., Niskanen, L. & Lanke, J. (2004). Development of diabetes is retarded by ACE inhibition in hypertensive patients--a subanalysis of the Captopril Prevention Project (CAPPP). *J Hypertens*, 22, 645–652.
- Novakofski, J., Hu, C.Y. (1988). Culture of isolated adipose tissue cells. *J Anim Sci*, 65, 12-24



- Ocaranza, M.P., Godoy, I., Jalil, J.E., Varas, M., Collantes, P. & Pinto, M. *et al.* (2006). Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*, 48, 572–578.
- Ogihara, T., Asano, T., Ando, K., Chiba, Y., Sakoda, H. & Anai, M. *et al.* (2002). Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension*, 40, 872–879.
- Okada, S., Kozuka, C., Masuzaki, H., Yasue, S., Ishii-Yonemoto, T. & Tanaka, T. *et al.* (2010). Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metab Clin Exp*, 59, 1241–1251.
- Pancieria, D.L., Thomas, C.B., Eicker, S.W. & Atkins, C.E. (1990). Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980-1986). *J Am Vet Med Assoc*, 197, 1504–1508.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 86, 747–803.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D. & Boone, T. *et al.* (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269, 540–543.
- Pohl, C., Hermanns, M.I., Uboldi, C., Bock, M., Fuchs, S. & Dei-Anang, J. *et al.* (2009). Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *Eur J Pharm Biopharm*, 72, 339–349.
- Poulos, S.P., Hausman, D.B. & Hausman, G.J. (2010a). The development and endocrine functions of adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323, 20–34.
- Poulos, S.P., Dodson, M.V. & Hausman, G.J. (2010b). Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235, 1185–1193.
- Prusty, D., Park, B.-H., Davis, K.E. & Farmer, S.R. (2002). Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, 277, 46226–46232.
- Radin, M.J., Sharkey, L.C. & Holycross, B.J. (2009). Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet Clin Pathol*, 38, 136–156.
- Rahmouni, K., Mark, A.L., Haynes, W.G. & Sigmund, C.D. (2004). Adipose depot-specific modulation of angiotensinogen gene expression in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E891-5.
- Rand, J.S., Fleeman, L.M., Farrow, H.A., Appleton, D.J. & Lederer, R. (2004). Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? *J Nutr*, 134, 2072S-2080S.

- Reich, H.N., Oudit, G.Y., Penninger, J.M., Scholey, J.W. & Herzenberg, A.M. (2008). Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney Int*, 74, 1610–1616.
- Renström, F., Burén, J., Svensson, M. & Eriksson, J.W. (2007). Insulin resistance induced by high glucose and high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes. *Metab Clin Exp*, 56, 190–198.
- Reyes, M.R. & Lazalde, B. (2007). Aortic preadipocyte differentiation into adipocytes induced by rosiglitazone in an in vitro model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 43, 159–161.
- Ribeiro-Oliveira, A., Nogueira, A.I., Pereira, R.M., Boas, W.W.V., Dos Santos, R.A.S. & Simões e Silva, A.C. (2008). The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag*, 4, 787–803.
- Rieusset, J., Auwerx, J. & Vidal, H. (1999). Regulation of gene expression by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma with rosiglitazone (BRL 49653) in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 265, 265–271.
- Ronconi, V., Turchi, F., Bujalska, I.J., Giacchetti, G. & Boscaro, M. (2008). Adipose cell-adrenal interactions: current knowledge and future perspectives. *Trends Endocrinol Metab*, 19, 100–103.
- Ronti, T., Lupattelli, G. & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 64, 355–365.
- Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 145–171.
- Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W. & Gonzalez, F.J. *et al.* (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*, 16, 22–26.
- Rosen, E.D. & MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 885–896.
- Rosen, E., Eguchi, J. & Xu, Z. (2009). Transcriptional targets in adipocyte biology. *Expert Opin Ther Targets*, 13, 975–986.
- Saiki, A., Koide, N., Watanabe, F., Murano, T., Miyashita, Y. & Shirai, K. (2008). Suppression of lipoprotein lipase expression in 3T3-L1 cells by inhibition of adipogenic differentiation through activation of the renin-angiotensin system. *Metab Clin Exp*, 57, 1093–1100.
- Santos, R.A.S., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P. & Buhr, I. *et al.* (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8258–8263.

- Santos, S.H.S., Braga, J.F., Mario, E.G., Pôrto, L.C.J., Rodrigues-Machado, M.d.G. & Murari, A. *et al.* (2010). Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 953–961.
- Santos, S.H.S., Fernandes, L.R., Mario, E.G., Ferreira, A.V.M., Pôrto, L.C.J. & Alvarez-Leite, J.I. *et al.* (2008). Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, 57, 340–347.
- Sarzani, R., Marcucci, P., Salvi, F., Bordicchia, M., Espinosa, E. & Mucci, L. *et al.* (2008). Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. *Int J Obes (Lond)*, 32, 259–267.
- Saye, J.A., Ragsdale, N.V., Carey, R.M. & Peach, M.J. (1993). Localization of angiotensin peptide-forming enzymes of 3T3-F442A adipocytes. *Am J Physiol*, 264, C1570-6.
- Scarlett, J.M. & Donoghue, S. (1998). Associations between body condition and disease in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 212, 1725–1731.
- Schling, P. (2002). Expression of angiotensin II receptors type 1 and type 2 in human preadipose cells during differentiation. *Horm Metab Res*, 34, 709–715.
- Schling, P. & Löffler, G. (2001). Effects of angiotensin II on adipose conversion and expression of genes of the renin-angiotensin system in human preadipocytes. *Horm Metab Res*, 33, 189–195.
- Schling, P., Mallow, H., Trindl, A. & Löffler, G. (1999). Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23, 336–341.
- Sepe, A., Tchkonja, T., Thomou, T., Zamboni, M. & Kirkland, J.L. (2011). Aging and regional differences in fat cell progenitors - a mini-review. *Gerontology*, 57, 66–75.
- Serazin, V., Dos Santos, E., Morot, M. & Giudicelli, Y. (2004). Human adipose angiotensinogen gene expression and secretion are stimulated by cyclic AMP via increased DNA cyclic AMP responsive element binding activity. *Endocrine*, 25, 97–104.
- Sharma, A.M., Janke, J., Gorzelniak, K., Engeli, S. & Luft, F.C. (2002). Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension*, 40, 609–611.
- Shi, X.M., Blair, H.C., Yang, X., McDonald, J.M. & Cao, X. (2000). Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPARgamma2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation. *J Cell Biochem*, 76, 518–527.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1023–1033.
- Smith, P.J., Wise, L.S., Berkowitz, R., Wan, C. & Rubin, C.S. (1988). Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 263, 9402–9408.

- Sonoda, E., Aoki, S., Uchihashi, K., Soejima, H., Kanaji, S. & Izuhara, K. *et al.* (2008). A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. *Endocrinology*, 149, 4794–4798.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A. & Bergmann, O. *et al.* (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453, 783–787.
- Steckelings, U.M., Kaschina, E. & Unger, T. (2005). The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides*, 26, 1401–1409.
- Sugihara, H., Yonemitsu, N., Miyabara, S. & Yun, K. (1986). Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation*, 31, 42–49
- Sugihara, H., Yonemitsu, N., Miyabara, S. & Toda, S. (1987). Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J Lipid Res*, 28, 1038–1045.
- Sul, H.S. (2009). Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol*, 23, 1717–1725.
- Takahashi, N., Li, F., Hua, K., Deng, J., Wang, C.-H. & Bowers, R.R. *et al.* (2007). Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell Metab*, 6, 506–512.
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G. & Turner, A.J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 275, 33238–33243.
- Trayhurn, P. (2007). Adipocyte biology. *Obes Rev*, 8 Suppl 1, 41–44.
- Trayhurn, P. & Wood, I.S. (2005). Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans*, 33, 1078–1081.
- Trayhurn, P. & Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, 92, 347–355.
- Truett, A.A., Borne, A.T., Monteiro, M.P. & West, D.B. (1998). Composition of dietary fat affects blood pressure and insulin responses to dietary obesity in the dog. *Obes Res*, 6, 137–146.
- van Harmelen, V., Elizalde, M., Ariapart, P., Bergstedt-Lindqvist, S., Reynisdottir, S. & Hoffstedt, J. *et al.* (2000a). The association of human adipose angiotensinogen gene expression with abdominal fat distribution in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24, 673–678.
- van Harmelen, V., Skurk, T., Röhrig, K., Lee, Y.-M., Halbleib, M. & Aprath-Husmann, I. *et al.* (2003). Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 889–895.

van Harmelen, V., Ariapart, P., Hoffstedt, J., Lundkvist, I., Bringman, S. & Arner, P. (2000b). Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res*, 8, 337–341.

van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Eriksson, P., Thörne, A., Hoffstedt, J. & Lönnqvist, F. *et al.* (1998). Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*, 47, 913–917.

Wajchenberg, B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 21, 697–738.

WHO (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 894, i-xii, 1-253.

Wu, P., Sato, K., Yukawa, S., Hikasa, Y. & Kagota, K. (2001). Differentiation of stromal-vascular cells isolated from canine adipose tissues in primary culture. *J Vet Med Sci*, 63, 17–23.

Yasue, S., Masuzaki, H., Okada, S., Ishii, T., Kozuka, C. & Tanaka, T. *et al.* (2010). Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *Am J Hypertens*, 23, 425–431.

Ye, Z.-W., Wu, X.-M. & Jiang, J.-G. (2009). Expression changes of angiotensin II pathways and bioactive mediators during human preadipocytes-visceral differentiation. *Metab Clin Exp*, 58, 1288–1296.

Zhang, X.-h., Zeng, Z.-p., Li, H.-z., Zhou, Y.-r., Zhang, J. & Tong, A.-l. *et al.* (2006). Expression of renin-angiotensin-aldosterone system in human adipose tissues. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 28, 766–769.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425–432.

Zini, E., Linscheid, P., Franchini, M., Kaufmann, K., Monnais, E. & Kutter, A.P. *et al.* (2009). Partial sequencing and expression of genes involved in glucose metabolism in adipose tissues and skeletal muscle of healthy cats. *Vet J*, 180, 66–70.

## 12 ANHANG

Tabelle 13: Übersicht über die getesteten Induktionsmedien (IM).

In dieser Arbeit wurde IM-24 als Induktionsmedium verwendet.

Zusatzstoff	Getestete Induktionsmedien											
	IM-1	IM-2	IM-3	IM-4	IM-5	IM-6	IM-7	IM-8	IM-9	IM-10	IM-11	IM-12
FBS	2%	2%	2%	10%	5%	2%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
Insulin	10 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Dexamethason	0,1 µM	1 µM	0,1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	0,1 µM	1 µM	1 µM	0,1 µM	1 µM	1 µM
IBMX	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	1 mM	1 mM	1 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,5 mM
Rosiglitazon	10 µM	10 µM	10 µM									10 µM
Indometacin				100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM			100 µM
Pantothenat												
Biotin												

Zusatzstoff	Getestete Induktionsmedien											
	IM-13	IM-14	IM-15	IM-16	IM-17	IM-18	IM-19	IM-20	IM-21	IM-22	IM-23	IM-24
FBS	2%	2%	2%	2%	2%	2%	20%	30%	2%	10%	10%	10%
Insulin	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
Dexamethason	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	10 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
IBMX	1 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,25 mM
Rosiglitazon	10 µM	20 µM	30 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	20 µM
Indometacin					100 µM							
Pantothenat									17 µM	17 µM	17 µM	17 µM
Biotin									33 µM	33 µM	33 µM	33 µM

**Tabelle 14: Übersicht über die Zusammensetzung der getesteten Adipozytenmedien (AM).**

In dieser Arbeit wurde AM-6 als Adipozytenmedium verwendet.

Zusatzstoff	AM-1	AM-2	AM-3	AM-4	AM-5	AM-6
Insulin	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
Dexamethason	0,1 µM	0,1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
Pantothenat					17 µM	17 µM
Biotin					33 µM	33 µM
FBS	2%	2%	2%	2%	2%	10%

**Tabelle 15: Tierdaten der verwendeten Proben für die Genexpressionsuntersuchung in maturaen felinen Adipozyten (EKH = Europäisch Kurzhaar, w = weiblich).**

Tier	Rasse	Alter in Jahren	Geschlecht	BCS	Fettdepot	Probennummer
K1	EKH	6	w	7	viszeral	1
					subkutan	2
K2	EKH	0,5	w	4	subkutan	3
K3	EKH	1	w	4	viszeral	4
					subkutan	5
K4	EKH	2	w	6	viszeral	6
					subkutan	7
K5	EKH	1	w	4	viszeral	8
					subkutan	9
K6	EKH	1	w	3	viszeral	10
K7	EKH-Main-Coon-Mix	0,5	w	3	subkutan	11
K8	EKH	2	w	4	viszeral	12
					subkutan	13
K9	EKH		w	7	viszeral	14
					subkutan	15
K10	EKH	5	w	6	viszeral	16
					subkutan	17
K11	EKH	2	w	4	viszeral	18
					subkutan	19
K12	EKH-Perser-Mix	2	w	7	viszeral	20
					subkutan	21

**Tabelle 16: Tierdaten der verwendeten Proben für die Genexpressionsuntersuchung in kultivierten und maturaen caninen Adipozyten (w = weiblich).**

Tier	Rasse	Alter in Jahren	Geschlecht	BCS
H5	Französische Bulldogge	4	w	5
H7	Golden Retriever	8	w	7

## 13 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Einspanier für die Betreuung und Unterstützung sowie sein stetes Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU-Berlin sowie den freien Praxen in Berlin möchte ich mich für die von ihnen zur Verfügung gestellten Proben bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu ganz besonderem Dank bin ich meiner Betreuerin Dr. Brit Badewien-Rentzsch verpflichtet. Sie gab mir nicht nur die Möglichkeit dieses Thema zu untersuchen, sondern auch den Freiraum eigene Ideen entwickeln und umsetzen zu können. Des Weiteren war Sie für mich in Ihrer Elternzeit jederzeit erreichbar, so dass Probleme, die während der Arbeit entstanden, schnell gelöst bzw. diskutiert werden konnten. Ihr engagiertes Interesse wurde auch durch eine erneute Schwangerschaft nicht getrübt. Selbst im Kreißsaal wurde die Arbeit noch von ihr korrekturgelesen. Dieser Einsatz für seine Doktoranden ist sicherlich nicht von jedem Betreuer zu erwarten, also liebe Brit, ein ganz ganz großes Dankeschön dafür!

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Angelika Bondzio und Petra Schulze für ihre Hilfsbereitschaft bei den kleineren und größeren Problemen im Laboralltag. Ulla Scholz danke ich darüberhinaus, dass sie mich bei der Anfertigung der Agarose-Gele unterstützte. Durch ihre herzliche und offene Art sorgten sie für eine tolle Atmosphäre im Labor und unterhaltsame Mittagspausen in der Mensa.

Lena Hoeke danke ich für die Einarbeitung in die Technik der Real-time-PCR und ihre Hilfe bei der RNA-Isolierung. Ein Dankeschön geht aber auch an alle anderen MitarbeiterInnen des Instituts für Veterinär-Biochemie, die geduldig meine Fragen beantworteten und mir bei Problemen weiterhalfen.

Für das fleißige Korrekturlesen, aber auch für die schöne Zeit neben der Promotion, möchte ich mich ganz herzlich bei Franziska Meier und Julia Ritter bedanken.

Nadine und Cathleen Jänicke danke ich für das Lesen der Summary.

Meinen Eltern und Großeltern möchte ich an dieser Stelle für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre moralische Unterstützung und finanzielle Hilfe während des Studiums und der Promotion danken. Ferner möchte ich meinen Eltern und Birgit für die Stunden danken, in denen sie meine Tochter betreuten und damit auch das Schreiben dieser Arbeit ermöglichten.



## Danksagung

---

Meiner Tochter Pauline möchte ich dafür danken, dass sie mir zwar in den letzten Monaten den Schlaf raubte, mir diese Zeit aber durch ihre Fröhlichkeit als wunderschön in Erinnerung bleiben wird.

Der größte Dank gilt jedoch meinem Mann. Danke Micha, dass du mit mir die Höhen und vor allem auch die Tiefen der letzten 12 Jahre durchlebt hast, vom Abitur, über das Studium bis hin zur Promotion. Danke, dass du mir in schwierigen Phasen immer wieder Mut gemacht hast und du selber auf vieles verzichtet hast, um mich bei der Verwirklichung meines Traumes zu unterstützen.

## **14 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Teltow, den 18. September 2012

Janine Riedel